

清热化湿抗毒方对 229E 型人冠状病毒的体外抑制作用研究

余亦程^{1,2}, 徐铁龙¹, 吴煜佳³, 李龙雪¹, 周显凤¹, 朱亚婷¹, 林子琦¹, 刘良倚^{1,2*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006; 3. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 研究清热化湿抗毒方对 229E 型人冠状病毒 (HCoV-229E) 的体外抑制作用。方法 采用体外 MRC-5 及 HuH-7 细胞模型分析清热化湿抗毒方的药物毒性及抗 HCoV-229E 的体外药效, 通过空斑实验验证其对 HCoV-229E 的抑制作用。设置预防给药组、感染期给药组和清热化湿抗毒方高、中、低剂量组, 采用实时荧光定量 PCR 法检测清热化湿抗毒方对病毒 RNA 表达的抑制作用; 免疫荧光法检测病毒结构蛋白的表达; 并对各组病毒上清液的半数组织感染量 (TCID₅₀)、核酸拷贝数、炎症因子水平进行检测。结果 清热化湿抗毒方对 MRC-5 和 HuH7 细胞的半数毒性浓度 (TC₅₀) 分别为 8.481、7.793 mg/mL, 对 HCoV-229E 的半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.798、1.101 mg/mL, 治疗指数分为 10.628、7.078; 且对 MRC-5 感染 HCoV-229E 后病毒空斑的形成具有抑制作用。在 RNA 和蛋白表达方面, 清热化湿抗毒方各剂量组可不同程度地抑制细胞内 HCoV-229E 的复制。而在病毒上清液中, 清热化湿抗毒方可降低活病毒载量、核酸拷贝数及炎症因子 IL-6 水平。结论 清热化湿抗毒方具有较好的体外抗 HCoV-229E 药物活性, 其抗病毒机制可能与差异调控 miRNA 直接靶向病毒 RNA 或宿主炎症应答基因发挥抑制作用有关。

关键词: 清热化湿抗毒方; 229 型人冠状病毒; 人胚肺细胞; 人肝癌细胞; 体外抗病毒

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)12-4174-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.12.045

近年来, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) 造成新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 全球大流行, 给人类健康和社会发展带来了严重的危害。截至 2023 年 11 月 19 日, 全球已报告 7.72 亿确诊病例和 600 多万例死亡, 且病毒仍在传播和不断变异中^[1]。可感染人的冠状病毒 (HCoV) 属于中医理论中的“疫疔之邪”, 邪气侵袭人体时, 首犯太阳肺, 或入太阴脾, 或入少阳三焦, 或入阳明胃肠; 虽有寒湿、湿热之分, 但起病不离太阳肺, 病性不离湿^[2]。结合江西地区病例起病多寒湿、临证多见湿热、兼夹燥象的特点, 国医大师伍炳彩教授针对中医致病特点, 基于《金匱要略》和《温病条辨》中风湿在表化热及肺症相关理论创制了清热化湿抗毒方^[3]。清热化湿抗毒方对大量上焦湿热证型的 COVID-19 患者的临床效果显著且无明显不良反应^[4], 还被用于治疗多种呼吸道传染病, 但其是否能直接抑制病毒尚未明确。本研究采用生物安全要求较低的 229E 型人冠状病毒 (HCoV-229E) 开展实验, 通过体外感染细胞评价清热化湿抗毒方的抗病毒药效, 结合空斑试验、活病毒载量、病毒蛋白及核酸拷贝数指标对其作用机制进行探讨, 以期为后续临床应用提供理论

依据。

1 材料与与方法

1.1 细胞 人胚肺细胞 (MRC-5)、人肝癌细胞 (HuH-7) 购于中国典型培养物保藏中心, 使用完全培养基 (含 84% 高糖 DMEM 培养基、15% FBS 及 1% 青/链霉素) 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 根据培养情况换液, 每 2~3 d 传代 1 次。

1.2 病毒 HCoV-229E 病毒由中国疾病预防控制中心病毒所卢学新教授惠赠, 接种于 MRC-5 细胞上, 使用维持培养基 (含 97% 高糖 DMEM 培养基、2% FBS 及 1% 青/链霉素), 于 37 °C、5% CO₂ 条件下扩增培养 48 h, 反复冻融 3 次, 离心后收集上清液。上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得病毒液。取少量病毒液检测其 TCID₅₀ 以确定活病毒载量, 其余病毒液分装, 于 -80 °C 保存。若冷冻保存时间超过 6 个月, 使用前需重新滴定 TCID₅₀。本实验中所用病毒液为含 100 TCID₅₀ 的 HCoV-229E (MOI=0.1)。

1.3 药物 清热化湿抗毒方饮片 (含蜂蜜杏仁 9 g、黄芩 9 g、连翘 9 g、茯苓 9 g、白豆蔻 6 g、滑石 9 g、桑叶 9 g、广藿香 9 g、生薏苡仁 15 g、生甘草 6 g) 购于江西江中中

收稿日期: 2024-07-24

基金项目: 国家自然科学基金 (82141214); 中央引导地方科技发展资金项目 (2022ZDH01096); 江西省研究生创新专项资金项目 (YC2023-B231); 江西中医药大学博士科研启动基金 (2023BSZR001); 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD22011)

作者简介: 余亦程 (1996—), 男, 博士生, 从事中医药防治呼吸道传染病的研究。Tel: 18979801333, E-mail: yyczys@163.com

* **通信作者:** 刘良倚 (1965—), 男, 博士, 主任医师, 从事中医药防治呼吸系统疾病的研究。Tel: 15770763696, E-mail: llj6505@163.com

药饮片有限公司,参考《中药饮片标准汤剂研究策略》^[5],加入8倍量水浸泡30 min,第一次煎30 min,第二次煎20 min,药液过滤后合并,58℃减压浓缩至1 g/mL,真空干燥制成干粉,4℃贮藏。使用前用超纯水配制质量浓度为500 mg/mL的溶液,过0.22 μm微孔滤膜,得母液。利巴韦林(RBV)注射液(规格1 mL/100 mg,批号H19993553)购于河南润弘制药股份有限公司,于4℃贮藏。

1.4 试剂 胎牛血清(FBS,货号FSP500,苏州依科赛生物科技股份有限公司);高糖型DMEM培养基、青霉素-链霉素(10 000 U/mL)、0.25%胰酶-EDTA(批号11965126、15140163、25300054,美国Gibco公司);1×PBS、1×PBST、二甲基亚砜(DMSO)、1%结晶紫染色液、4%多聚甲醛固定液、Triton X-100、5% BSA封闭液(货号P1020、P1031、D8371、G1062、FB002、T8200、SW3015,北京索莱宝科技有限公司);细胞活性测定试剂盒(CCK8)、YF®594羊抗兔二抗、DAPI染色液、抗荧光淬灭剂(货号C6005M、Y6107S、D4080、A4081,苏州优逸三迪生物科技有限公司);SteadyPure病毒RNA提取试剂盒(货号AG21021,湖南艾科瑞生物工程有限公司);逆转录试剂盒、嵌合染料法qPCR试剂盒(货号MR05101、MQ10701S,苏州莫纳生物科技有限公司);一步探针法RT-qPCR试剂盒 Human(货号Q223-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司);人IL-6、IL-10、TNF-α ELISA试剂盒(货号CHE0009、CHE0013-096、CHE0019,北京四正柏生物科技有限公司);兔抗HCoV-229E核衣壳抗体(货号40640-T62,北京义翘神州生物技术有限公司)。

1.5 仪器 D1008E掌上离心机、SK-O180-S LED数显圆周摇床(北京大龙兴创实验仪器股份公司);Neofuge 15R高速台式离心机(香港力康生物医疗科技控股有限公司);Infinite F Plex多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Veriti 96-well热循环仪、QuantStudio 5实时荧光定量PCR仪、NanoDrop One微量紫外可见分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司);ABI PRISM®7500 Real-time PCR检测系统(美国Applied Biosystems公司);UPC/HDS-FLS-IX53-L1F倒置荧光显微镜(美国Universal公司);DW-86L390D超低温医用冰箱(青岛澳柯玛超低温冷冻设备有限公司)。

1.6 药物毒性测定 将处于对数生长期的MRC-5和HuH-7细胞用胰酶消化成单个细胞后,分别以 1.0×10^4 /孔及 1.5×10^4 /孔的密度接种于96孔板,在37℃、5%CO₂条件下过夜培养。待细胞融合度达到约80%时,将清热化湿抗毒方母液用含2% FBS的DMEM培养基稀释至64 mg/mL,进而按2倍梯度稀释7个浓度,分别加入孔板中继续培养48 h,每个剂量设置4个复孔。给药48 h时,加入CCK8试剂并孵育1 h,在450 nm波长测定光密度(OD)值,并计算药物TC₅₀值。

1.7 体外抗病毒药效评价 将处于对数生长期的MRC-5

细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板,过夜培养,待细胞融合度达到80%时接种病毒,在37℃、5%CO₂条件下感染2 h后吸弃病毒液,加入含不同浓度汤剂的培养基处理(使用维持培养基以最大无毒剂量2倍稀释,共6个剂量),每个剂量设3个复孔,每天观察细胞病变效应(CPE),待病毒对照组CPE达4+时(>75%细胞出现病变死亡),CCK8法检测各组OD值,计算病毒抑制率,公式为病毒抑制率=[(药物组平均OD值-病毒组平均OD值)/(正常组平均OD值-病毒组平均OD值)]×100%。计算IC₅₀值,并得到安全治疗指数(SI),公式为SI=TC₅₀/IC₅₀。

1.8 空斑减少实验 将处于对数生长期的MRC-5细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,培养至致密单层细胞时(细胞交汇度>90%)进行实验。正常组使用无血清培养基干预,其余每孔加300 μL病毒液感染2 h。使用含4% FBS的DMEM培养基稀释药物,以100 μg/mL RBV干预作为利巴韦林组;清热化湿抗毒方设高、中、低剂量组(4、2、1 mg/mL);病毒对照组给予含4% FBS的DMEM培养基。以上含药培养基分别与1.2%低熔点琼脂糖按1:1比例混合成2% FBS的DMEM琼脂糖混合培养基,待混合液冷却至30℃时,每孔加入2 mL混合液,室温静置15 min,凝固后放回培养箱倒置孵育。96 h后向每孔加入1 mL 4%多聚甲醛4℃过夜固定细胞。清除琼脂糖覆盖层后,加入1 mL 0.1%结晶紫染色液室温染色15 min。清除染色液并用自来水轻柔润洗,晾干后镜下观察斑并计数。空斑抑制率=[(病毒组空斑数-药物组空斑数)/病毒组空斑数]×100%。

1.9 病毒核酸检测 将处于对数生长期的MRC-5细胞以 1.0×10^5 /孔的密度接种到12孔培养板,预防给药组(Pre4)在感染病毒前24 h更换含4 mg/mL清热化湿抗毒方的生长液,感染后更换维持液。当细胞融合度达85%时接种病毒2 h。感染期(Ina4)给药组在病毒感染2 h过程中加入4 mg/mL清热化湿抗毒方,感染后更换维持液;高、中、低剂量组在感染病毒后加入含不同质量浓度清热化湿抗毒方(4、2、1 mg/mL)的维持液培养。24 h后提取各组细胞内和细胞外上清液的RNA。细胞内HCoV-229E核衣壳蛋白(NP)mRNA逆转录合成cDNA模板后进行qPCR扩增,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参进行相对定量分析。上清液中的HCoV-229E膜蛋白(MP)mRNA使用RNA样本通过一步探针法进行检测,同时检测病毒质粒标准品以绘制标准曲线,计算各样本病毒核算拷贝数。引物和探针均由金斯瑞生物科技股份有限公司合成,见表1。

1.10 培养上清液病毒TCID₅₀的检测 在“1.9”项下实验收取样本时候,取100 μL细胞上清液于-80℃保存待检。另将处于对数生长期的MRC-5细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板中,过夜培养,待细胞融合度达到80%时,弃单层细胞培养上清液。将待检的细胞上清液以10倍梯度稀释7个浓度,每孔加入100 μL病毒稀释液。病毒感染2 h后

表1 引物及探针序列

名称	序列
GAPDH	正向 5'-CTCTGGAAGCTGTGGCGTGATG-3'
	反向 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'
HCoV-229E NP	正向 F: 5'-CGCAAGAATTCAGAACCAGAG-3'
	反向 5'-GGCAGTCAGGTTCTCAACAA-3'
HCoV-229E MP	正向 5'-TTGGCCACTCTCGTACTTGCTT-3'
	反向 5'-GTTCGAGCACGTCGAAAAG-3'
探针	5'-FAM-TTTGACACCTGGGCTAATTGGGA-BHQ1-3'

吸弃病毒稀释液，每孔加入 100 μL DMEM+2% FBS 的维持培养基，培养数日。每日观察细胞，出现 CPE 的以“+”标记，反之标记为“-”。采用 Reed-Muench 法计算各组细胞上清液的病毒 TCID₅₀。

1.11 感染细胞中 HCoV-229E 核衣壳蛋白的免疫荧光 (IF) 检测 在 12 孔板中铺设细胞爬片，将 MRC-5 细胞以 2.0×10⁵/孔的密度接种于细胞爬片上，细胞融合度达 80% 时接种 HCoV-229E 感染 2 h，正常组以无血清培养基同时干预，感染后清热化湿抗毒方组加入含 4 mg/mL 清热化湿抗毒方的维持液，利巴韦林组加入含 100 μg/mL RBV 的维持液。培养 48 h，PBS 润洗后加入 4% 多聚甲醛室温孵育 15 min，用预冷的 PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。加入含 0.2% Triton X-100 的 PBS 室温孵育透化 15 min 后，PBS 漂洗 3 次，每次 5 min。避光环境下，加入含 5% BSA 室温封闭 1 h，PBS 漂洗 5 min 后加入兔抗 HCoV-229E NP 抗体

(以 5% BSA 按 1 : 200 稀释)，4 ℃ 孵育过夜；复温后 PBST 漂洗 3 次，每次 15 min；加入羊抗兔荧光二抗 (以 5% BSA 按 1 : 500 稀释)，室温孵育 1 h，PBST 洗 3 次，每次 15 min。加入 DAPI 室温孵育 15 min，PBS 洗涤 2 次，每次 5 min，取出细胞爬片，滴加抗荧光淬灭剂，于载玻片封边后显微镜下拍照。

1.12 培养上清中炎症因子水平检测 采用 4A Biotech 的人 ELISA 试剂盒，参照说明书检测“1.9”项下实验所收集的各组细胞上清 IL-6、IL-10、TNF-α 水平。

1.13 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 清热化湿抗毒方的细胞毒性检测及体外抗病毒药效评价 清热化湿抗毒方对 MRC-5 和 HuH-7 细胞的 TC₅₀ 分别为 8.481 mg/mL (图 1A)、7.793 mg/mL (图 1B)。在药物安全剂量条件下，HCoV-229E 感染 MRC-5 和 HuH-7 细胞模型中，清热化湿抗毒方抗 HCoV-229E 的 IC₅₀ 分别为 0.798 mg/mL (图 1C)、1.101 mg/mL (图 1D)，SI 值分别为 10.628、7.078 (表 2)。清热化湿抗毒方治疗感染 HCoV-229E 的 MRC-5 及 HuH-7 细胞的 SI 均大于 2，具有较好的安全性，不属于美国 FDA 定义的窄治疗指数药物。以上结果表明，清热化湿抗毒方在细胞模型中具有良好的抗 HCoV-229E 药效和安全性。

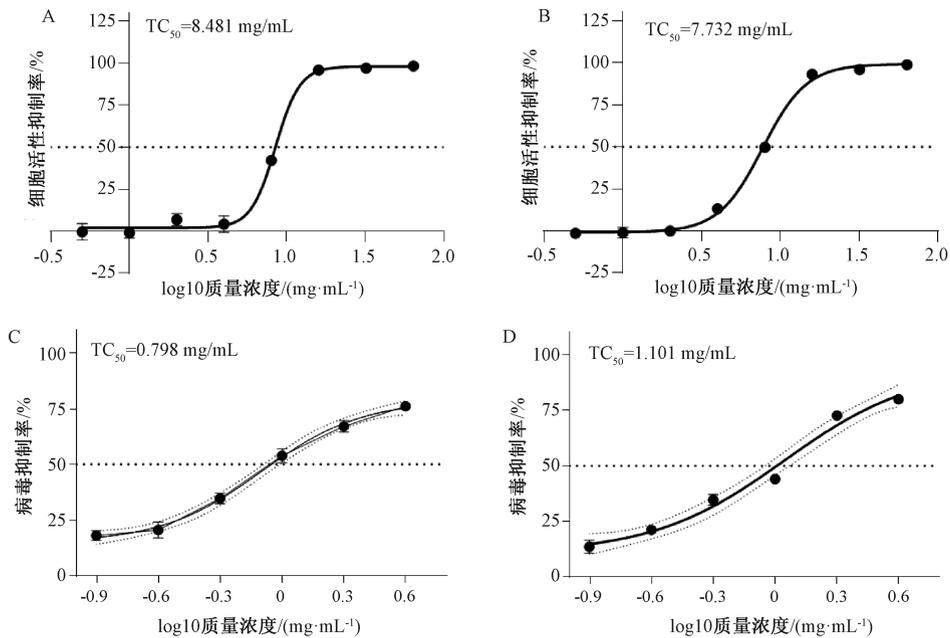


图1 清热化湿抗毒方的细胞毒性及抗冠状病毒药效评价 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

2.2 清热化湿抗毒方抑制冠状病毒的空斑减少实验 HCoV-229E 可导致 MRC-5 细胞培养中出现无细胞的区域，即“空斑” (图 2A)。利巴韦林组和清热化湿抗毒方各剂量组均对 HCoV-229E 病毒的空斑形成有抑制作用 ($P < 0.01$)，呈剂量相关性 (图 2B)。

2.3 清热化湿抗毒方对 HCoV-229E 的抑制作用

2.3.1 HCoV-229E 在 MRC-5 细胞内的 RNA 表达 由图 3 可知，与病毒对照组比较，利巴韦林组、清热化湿抗毒方预防给药组、感染期给药组对细胞内 HCoV-229E MP、NP mRNA 表达均有抑制作用 ($P < 0.01$)。高、中、低剂量组对病毒 HCoV-229E NP mRNA 表达具有抑制作用 ($P < 0.05$)，呈剂量相关性，对 MP mRNA 表达无抑制作用。

表2 清热化湿抗毒方的抗病毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞系	TC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	100 TCID ₅₀	
		IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	SI
MRC-5	8.481±0.315	0.798±0.055	10.628
HuH-7	7.793±0.256	1.101±0.264	7.078

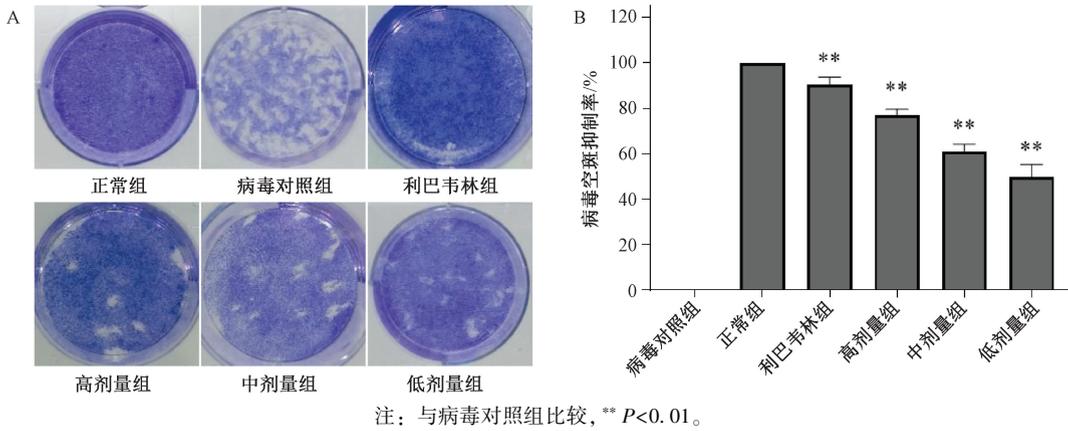


图2 清热化湿抗毒方对空斑形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

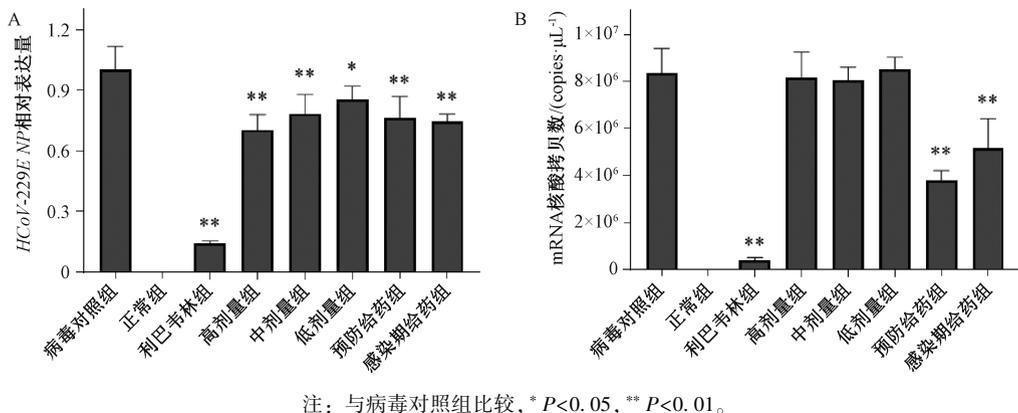


图3 清热化湿抗毒方对细胞内 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3.2 HCoV-229E 在培养上清液病毒载量和核酸拷贝数
镜下观察到 HCoV-229E 感染后的 MRC-5 细胞出现皱缩、变圆等 CPE 表现，见图 4A。与病毒对照组比较，各组细胞上清液中的病毒载量和核酸拷贝数均降低，其中预防给药组、感染期给药组、高剂量组、利巴韦林组差异显著 ($P < 0.01$)，见图 4B~4C。

2.3.3 清热化湿抗毒方对 HCoV-229E 结构蛋白表达的影响
如图 5 所示，清热化湿抗毒方干预后 MRC-5 细胞 HCoV-229E NP 表达（红色荧光）降低，表明清热化湿抗毒方具有抑制冠状病毒蛋白表达的药效作用。

2.4 清热化湿抗毒方对冠状病毒感染所致炎症因子的抑制作用
各组细胞上清液 IL-10、TNF- α 水平低于标准曲线的计算范围，表明 MRC-5 细胞感染病毒前后皆低表达 IL-10、TNF- α 。与正常组比较，病毒对照组上清液 IL-6 水平升高 ($P < 0.01$)；与病毒对照组比较，清热化湿抗毒方各组细胞培养上清液 IL-6 水平降低 ($P < 0.01$)，见图 6。

3 讨论

冠状病毒是一类具有包膜的正单链 RNA 病毒，因包膜

表面存在刺突蛋白、整体呈皇冠状而得名^[6]。人冠状病毒主要引起呼吸道症状，其中 HCoV-229E、HCoV-OC43 通常引起普通季节性感冒，HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 可导致支气管炎或肺炎^[7-8]。严重急性呼吸综合征冠状病毒、中东呼吸综合征冠状病毒和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 可导致呼吸道重症甚至死亡^[9]。目前大部分抗冠状病毒药物的作用机制尚未明确，疗效及安全性难以得到确证^[10]。

清热化湿抗毒方具有清热化湿、止咳退热、抗毒辟疫的功效，作为《江西省呼吸道传染性疾病预防方案》中推荐的有效方剂，其药效基础及具体机制有待深入研究。目前 BSL-3 生物安全条件较难获得，且感染冠状病毒的动物模型较难构建，需在免疫缺陷动物体内过表达相关受体，难以在短时间内研究药效^[11]。故本研究通过 HCoV-229E 感染 MRC-5 及 HuH-7 等易感细胞研究清热化湿抗毒方的抗病毒作用。病毒感染时会造成宿主细胞的死亡或损伤，形成空斑，常用于量化病毒感染^[12]。本研究首先检测了清热化湿抗毒方的药物细胞毒性，开展体外抗病毒药效评价实验，并通过空斑减少实验进行验证；通过 RT-qPCR 检测研究清

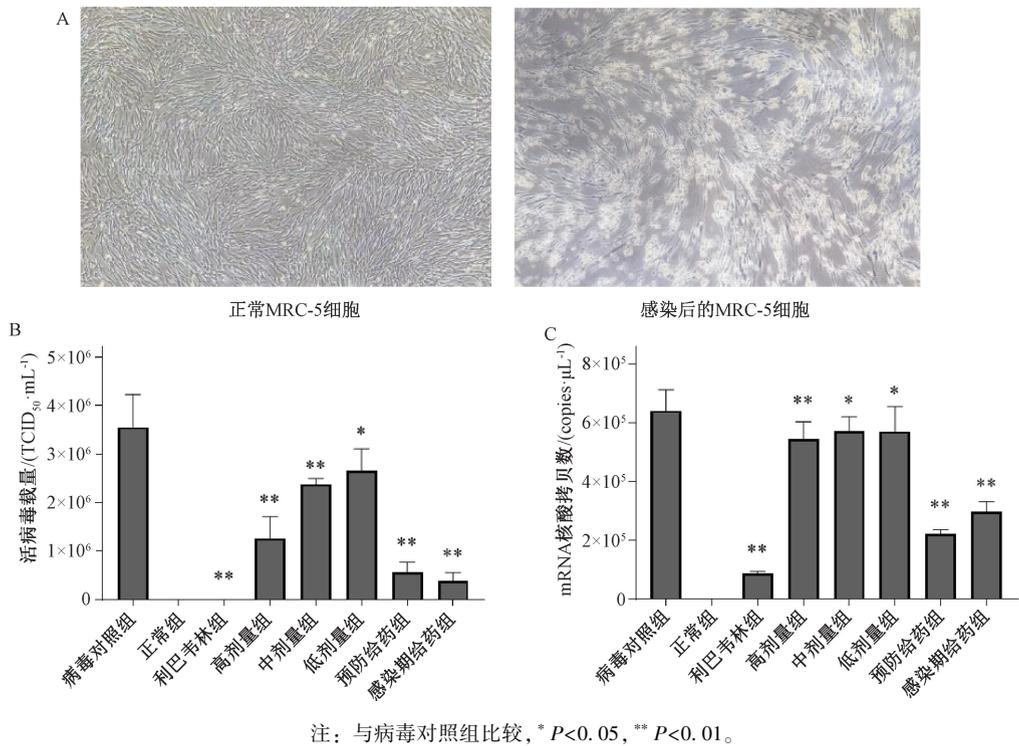


图4 清热化湿抗毒方对细胞上清液活病毒载量及病毒核酸拷贝数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

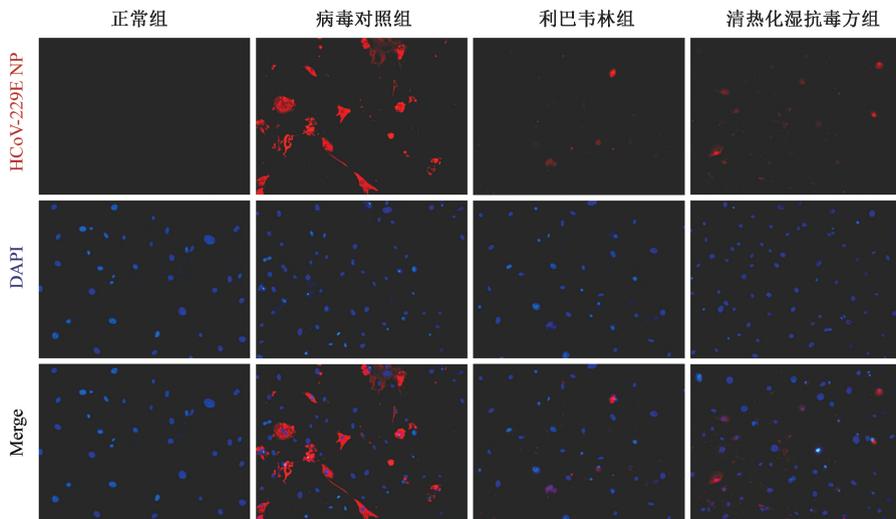
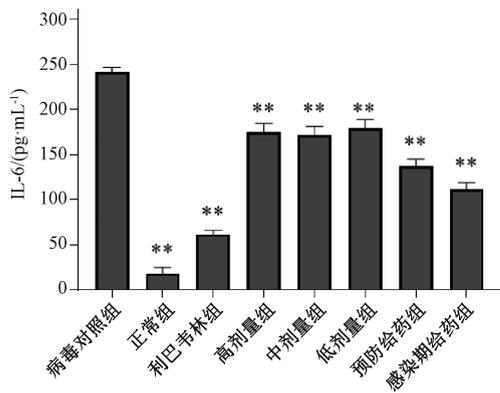


图5 清热化湿抗毒方对 MRC-5 细胞 HCoV-229E NP 表达的影响 ($\times 200$)

热化湿抗毒方对 MRC-5 细胞 RNA 表达的影响，免疫荧光检测干预后病毒结构蛋白表达；最后通过检测细胞上清液活病毒载量及炎症因子水平进行辅助验证。本研究发现，清热化湿抗毒方具有良好的抗冠状病毒药效，与抑制冠状病毒 RNA 复制、蛋白表达及炎症因子 IL-6 水平有关。

冠状病毒均以刺突蛋白和宿主细胞表面受体结合，进入细胞后其核衣壳降解，被核糖体翻译产生蛋白质^[13]。完整正链 RNA 为病毒遗传物质，被核壳蛋白包覆组成核壳；次基因组翻译出结构蛋白与辅助蛋白，组装成完整病毒并经胞吐释放以感染其他细胞^[14]。本研究发现不同时间给药的多个实验组可不同程度地抑制 HCoV-229E RNA 复制。预防给药、感染期给药可能直接作用于冠状病毒的吸附与入

侵阶段。而感染后给药，可能是汤剂中的有效成分抑制了病毒结构蛋白表达，使病毒组装受影响成为缺陷病毒，导致病毒生物学功能的缺失。目前，多项研究发现，中药材中大量植物 miRNA 可通过多途径吸收进入机体成为循环 miRNA^[15-17]。miRNA 发挥作用的机制通常是与 AGO 蛋白等形成沉默复合体，与靶基因 mRNA 的翻译区或 3'端非翻译区序列结合，导致 mRNA 翻译受抑制或降解^[18]。miRNA 可直接作用于病毒基因的翻译区以抑制病毒基因的翻译^[19]，而 HCoV 为单股正链 RNA 病毒可直接作为 miRNA 的作用靶点基因^[20]。因此，清热化湿抗毒方中的植物 miRNA 可能直达病所并靶向抑制病毒 RNA 复制。由于 HCoV 内在嵌套的多组 mRNA 具有共同的序列，因此在前导序列和 3'UTR 中



注：与病毒对照组比较，** $P < 0.01$ 。

图6 各组细胞上清液中 IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

具有靶位点的特定 miRNA 有可能靶向多组病毒 mRNA，产生较强的抗病毒作用^[21]。此外，miRNA 也有可能作用于宿主 MAPK、NF- κ B 等炎症应答中的关键基因以减弱炎症反应^[22]。

综上所述，清热化湿抗毒方具有良好的体外抗病毒药效，可作为抗冠状病毒药物，其抗病毒和抗炎机制、动物模型的药效有待进一步明确。课题组将从中药 miRNA 跨界靶向调控病毒/宿主 RNA 的方向，更深入地开展其机制及体内药效研究。

参考文献：

[1] WHO. COVID-19 epidemiological update—24 November 2023 [EB/OL]. [2023-11-24]. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update>.

[2] 王倩, 曲道炜. 从中医角度对新型冠状病毒肺炎病因及特点的认识[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6): 12-14.

[3] 伍建光, 张元兵, 兰智慧, 等. 国医大师伍炳彩论新冠肺炎[J]. 江西中医药大学学报, 2021, 33(3): 11-14.

[4] 徐铁龙, 谢青萍, 周旭, 等. 江西省新冠肺炎中医临床应用特征分析[J]. 江西中医药, 2022, 53(1): 35-38.

[5] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.

[6] Kuhn J H, Adkins S, Agwanda B R, et al. 2021 taxonomic update of phylum *Negarnaviricota* (*Riboviria*: *Orthornavirae*), including the large orders *Bunyavirales* and *Mononegavirales*[J]. *Arch Virol*, 2021, 166(12): 3513-3566.

[7] Coman V M, Muth D, Niemeyer D, et al. Hosts and sources of endemic human coronaviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2018, 100: 163-188.

[8] King A. An uncommon cold[J]. *New Sci*, 2020, 246(3280): 32-35.

[9] Wang Y, Grunewald M, Perlman S. Coronaviruses: an updated overview of their replication and pathogenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2020; 1-23.

[10] 牛军伟. 冠状病毒广谱抑制剂体内评价及抗病毒机制探究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2020.

[11] Liu D L, Chen C K, Chen D B, et al. Mouse models susceptible to HCoV-229E and HCoV-NL63 and cross protection from challenge with SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(4): e2202820120.

[12] Bewley K R, Coombes N S, Gagnon L, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays [J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(6): 3114-3140.

[13] Fung T S, Liu D X. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 296.

[14] Fehr A R, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23.

[15] Wu Q N, Li L X, Jia Y, et al. Advances in studies of circulating microRNAs: origination, transportation, and distal target regulation[J]. *J Cell Commun Signal*, 2023, 17(3): 445-455.

[16] Liu Y C, Chen W L, Kung W H, et al. Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi[J]. *BMC genomics*, 2017, 18: 1-6.

[17] Link J, Thon C, Schanze D, et al. Food-derived XenomicroRNAs: influence of diet and detectability in gastrointestinal tract—proof-of-principle study[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(2): 1800076.

[18] Xu T L, Sun Y W, Feng X Y, et al. Development of miRNA-based approaches to explore the interruption of mosquito-borne disease transmission [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 665444.

[19] 李瑞, 高灵茜, 高洁, 等. miRNA 参与流感病毒复制增殖的研究进展[J]. 生命的化学, 2020, 40(7): 1130-1136.

[20] Wang D, Jiang A, Feng J, et al. The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(10): 2135-2147.

[21] Traber G M, Yu A M. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2023, 384(1): 133-154.

[22] Han T, Guo L, Shen Y. Advances in Research on MicroRNAs regulating host antiviral innate immunity [J]. *Adv Microbiol*, 2019, 8: 15-21.