

苗药防感香囊对小鼠肺组织中 Toll 样受体 7 和干扰素 α/β 表达的影响

朱名洁, 李国均, 贾国泉, 张 权

【摘要】 目的 研究苗药防感香囊对小鼠肺组织 Toll 样受体 7 (TLR7)、干扰素 α (IFN α)、干扰素 β (IFN β) 的表达影响, 从 I 型干扰素信号通路角度探讨苗药防感香囊调节呼吸道免疫功能的作用机制, 同时为苗药防感香囊有效预防呼吸道感染提供科学理论依据。 **方法** 48 只昆明种雄性小鼠随机分为空白对照组、香囊组、冷刺激组、香囊+冷刺激组, 每组 12 只。香囊组、香囊+冷刺激组持续吸入苗药防感香囊 30 d, 第 31 天在已有干预基础之上给予冷刺激组、香囊+冷刺激组持续 1 周的冷刺激制造免疫低下模型, 其后处死小鼠, 留取标本检测。采用 HE 染色观察造模后肺组织结构, 免疫组织化学染色、实时荧光 PCR (Real time-PCR)、蛋白印迹法 (Western blot) 检测小鼠肺组织中 TLR7、IFN α 、IFN β 的基因/蛋白表达水平; 采用酶联免疫吸附测定小鼠血清中 IFN α 、IFN β 分泌水平。 **结果** 与空白对照组比较, 香囊组、香囊+冷刺激组小鼠肺组织中 TLR7、IFN α/β 的蛋白及 mRNA 表达增加 ($P<0.05$), 冷刺激组小鼠肺组织中 TLR7、IFN α/β 的蛋白及 mRNA 表达相对减少 ($P<0.05$); 与冷刺激组比较, 香囊+冷刺激组小鼠肺组织中 TLR7、IFN α/β 的蛋白及 mRNA 表达水平增加 ($P<0.05$); 与空白对照组比较, 仅香囊+冷刺激组中小鼠血清 IFN α 、IFN β 分泌水平升高 ($P<0.05$), 其他组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。 **结论** 苗药防感香囊能够良性调节小鼠肺组织 TLR7、IFN α 、IFN β 基因和 (或) 蛋白表达水平; 寒冷刺激能抑制小鼠肺组织 TLR7、IFN α 、IFN β 的转录与表达; 苗药防感香囊能在一定程度上改善寒冷对小鼠肺组织 TLR7、IFN α 、IFN β 表达的抑制状态; 苗药香囊可通过 TLR7 介导的通路中 IFN α 、IFN β 起到有效预防呼吸道感染, 增强机体非特异免疫的作用。

【关键词】 苗药防感香囊; Toll 样受体 7; 干扰素 α ; 干扰素 β ; 非特异性免疫; 呼吸道感染**【中图分类号】** R511.7**【文献标志码】** A**【文章编号】** 1672-271X(2019)05-0449-06**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.05.001Effects of Miao Fanggan Sachet on the expression of TLR7, IFN- α/β in lung tissue of mice

ZHU Ming-jie, LI Guo-jun, JIA Guo-quan, ZHANG Quan

(Department of Infectious Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

【Abstract】 Objective Respiratory tract infections are very common. Chinese medicine anti-allergic sachets have a good effect on adult and pediatric influenza, but the mechanism has not been widely reported. The study was aimed to investigate the effects of Miao Fanggan Sachets (MFS) on the expression of Toll-like receptor 7 (TLR7), interferon alpha (IFN α) and interferon beta (IFN β) in lung tissues of mice. Evaluate the preventive effects of MFS inhalation on the respiratory tract of mice and to explore the underlying molecular mechanism from the perspective of type I interferon pathway. **Methods** Konmin male mice (n/4 48) of SPF grade, aged from 6-7 weeks, with a body mass between 25 g and 30 g were randomly divided into 4 groups consisting of normal control group (group A), inhalation sachet group (group B), cold stimulation group (group C), and sachet plus cold stimulation group (group D).

Mice in group B, D were continuously given daily 10 grams of sachets for 12 hours and the sachet was changed every 6 days. From the 31st day, cold stimulation (Continual 7 days mice were exposed in $3\pm 1^\circ\text{C}$ ice box 15 minutes a day) was given to group C to make mice immunocompromised model. After 37 days, mice were sacrificed under anesthesia and lungs harvest-

基金项目: 国家自然科学基金 (81560962)

作者单位: 550004 贵阳, 贵州医科大学感染病学教研室 (朱名洁、李国均、贾国泉、张 权)

通信作者: 张 权, E-mail: 825109121@qq.com

1.2.2 饲养条件及动物模型建立 香囊组、香囊+冷刺激组将10 g香囊悬挂于小鼠笼箱外,每天持续吸入(8:00AM-8:00PM, 12 h/d, 30 d), 6 d更换1次香囊。具体方法:准备2个体积为0.5 m³四壁大小为7 cm×7 cm的通风口的纸箱,将香囊组与香囊+

冷刺激组的小鼠笼盒置于同一纸箱内,通风口悬挂香囊,每日持续 12 h 吸入香囊,6 d 更换一次;同一时段另一动物饲养间将空白对照组与冷刺激组置于同样规格的纸箱,不悬挂香囊,其他条件:温度、湿度相同,自由进食。第 31 天开始,冷刺激组与香囊+冷刺激组在原有干预基础上予以冷刺激(10 ℃冰盒内每天暴露 5 min,连续 7 d)。继续喂养小鼠,第 37 天处死小鼠,小鼠单眼球取血,剖胸收集肺组织用于进一步试验。

1.2.3 HE 染色、免疫组织化学法检测肺组织中 TLR7 蛋白相对表达量 取小鼠右下肺制 4 μm 厚防脱切片按组编号备用。制好切片部分用于 HE 染色,光学显微镜拍照,Mikawa 评分评估小鼠肺组织损伤程度。部分用 SP 免疫组织化学法对肺组织中 TLR7 蛋白进行检测:切片行脱蜡、水化、高压修复、消除内源性过氧化物酶、封闭液封闭 1 h、一抗(1:500)4 ℃过夜、二抗 37 ℃孵育 40 min、DAB 显色(步骤参照 DAB 试剂盒说明书进行操作)、苏木精复染、脱水、中性树胶封片,成片用 Leica DM2500 采集图像,400 倍光镜下随机选取 8 个视野,光亮度一致,拍照后用 Image-Pro Plus 6.0 对图像采集结果进行半定量分析,测定每张图像的阳性颗粒积分光密度(IOD),以均值统计。

1.2.4 Western blot 检测肺组织中 TLR7 蛋白表达 取 10 mg 小鼠肺组织进行匀浆离心,提取总蛋白。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书对总蛋白进行浓度测定,并调平各组蛋白浓度。上样后 7.5% SDS-PAGE 凝胶对 TLR7 进行电泳,湿转法转膜,含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 对转好的 PVDF 膜进行封闭 2 h,加入兔抗小鼠 TLR-7 IgG 抗体(1:1000)4 ℃冰箱内过夜,再在室温下加入二抗摇床上孵育 1 h,期间使用 TBST 洗膜,洗膜后用 ECL 显影,化学发光仪检测,内参为 β-actin。

1.2.5 RT-PCR 检测肺组织 TLR7、IFNα、IFNβ mRNA 表达 Trizol 法提取总 RNA,参照逆转录试剂盒及 PCR 反应试剂盒步骤获得 cDNA 并行荧光 PCR。反应体系(20 μL)包括:逆转录产物 4 μL,上游及下游引物各 0.5 μL,2×SYBR Green 10 μL, RNase-free H₂O 5 μL。循环参数:95 ℃预变性 5 min,95 ℃ 15 s、50 ℃ 2 min、60 ℃ 60 s,40 个循环。内参 β-actin,使用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。定量 PCR 引物序列:TLR7 F: 5'-TAGAGTCTTTGGGTTTCGATGGT-3', R: 5'-GTATGTGGTTGATGGTAAGGGTA-3'; IFNα F: 5'-AGGACTTTGGATTCCCCTTG-3', R: 5'-TCCTTTGAT-

GTGAAGAGGGTCAG-3'; IFNβ F: 5'-CTGCGTTCCT-GCTGTGCTTC-3', R: 5'-CGCCCTGTAGGTGAGGTT-GAT-3'; β-actin F: 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3', R: 5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'。

1.2.6 酶联免疫吸附试验检测血清 IFNα、IFNβ 的浓度 小鼠单眼球取血,按组标号,室温静置离心取血清,梯度稀释标准品,加入待测标本,置入 37 ℃温箱孵育 2 h,取出洗涤后参照 ELISA 试剂盒说明书依次加入生物素标记抗体、辣根过氧化物酶、底物显色液、终止液,使用酶标仪测定光密度值(OD 值),根据标准品作图计算目的蛋白含量。

1.3 统计学分析 使用 SPSS 17.0 及 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA),进一步两两比较用 Dunnett's *t* 检验。计数资料的比较采用卡方检验,当 $n < 40$ 或者 $T < 1$ 时用 Fisher 确切概率法。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色 400 倍光学显微镜下观察:小鼠肺组织轮廓完整,肺泡、毛细血管、气管、支气管结构清晰。空白对照组及香囊组小鼠肺间隔正常,肺泡腔内无明显炎性细胞浸润,肺泡壁无明显渗出。冷刺激组小鼠肺泡壁充血明显,毛细血管扩张,肺泡腔内可见大量渗出,并有较多中性粒细胞及巨噬细胞浸润。Mikawa 肺损伤评分提示:香囊+冷刺激组小鼠肺泡间隔毛细血管通透性增加,肺泡壁周围有炎性细胞浸润,程度较冷刺激组减轻。见图 1。

2.2 小鼠肺组织中 TLR7 蛋白和 mRNA 表达情况 免疫组织化学染色提示 TLR7 主要分布于细胞膜与细胞质中,阳性着色为黄褐色。Image-Pro Plus 6.0 对染色结果进行半定量分析,与空白对照组比较,香囊组、香囊+冷刺激组的 TLR7 表达量均显著增加($P < 0.05$),冷刺激组相对减少;与单纯冷刺激组比较,香囊+冷刺激组的 TLR7 表达显著增加($P < 0.05$)。见图 1、图 2。

Western blot 与 RT-PCR 检测结果提示:与空白对照组比较,香囊组与香囊+冷刺激组中 TLR7 蛋白和 mRNA 表达增高($P < 0.05$),冷刺激组表达量相对减低($P < 0.05$);与单纯冷刺激组比较,香囊+冷刺激组的 TLR7 蛋白和 mRNA 表达显著增加($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

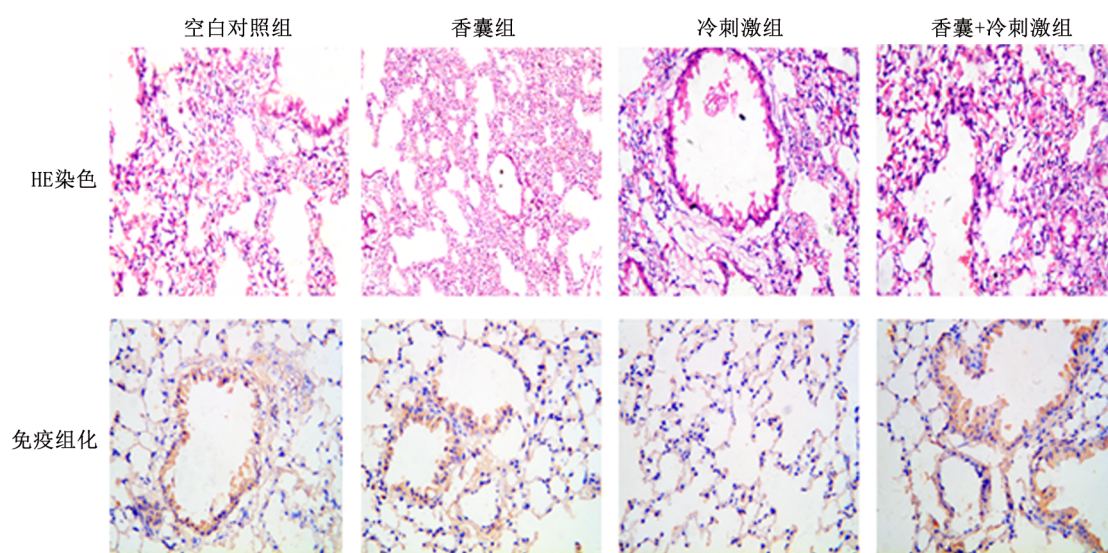
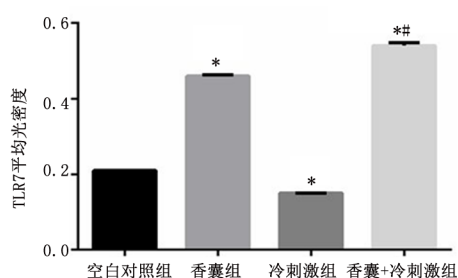


图1 小鼠肺组织 HE 染色及 TLR7 免疫组织化学染色结果 (×400)



与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与冷刺激组比较, # $P<0.05$

图2 免疫组织化学法测小鼠肺组织 TLR7 蛋白表达

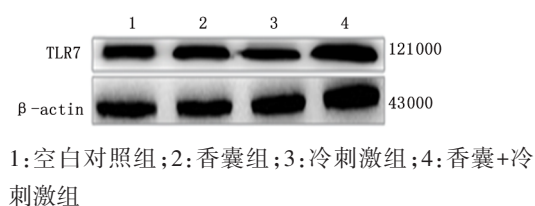
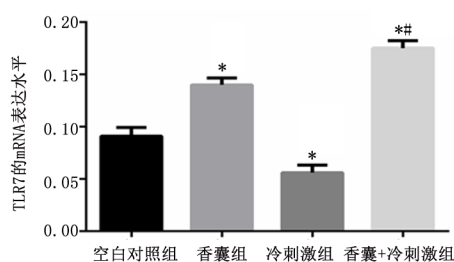


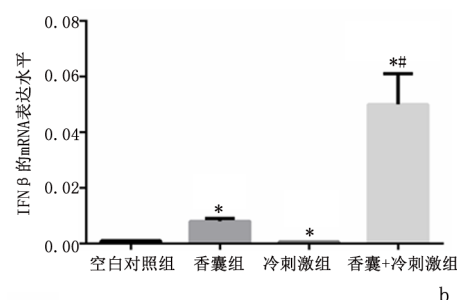
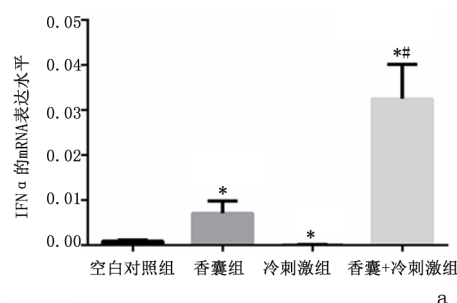
图3 各组小鼠肺组织中 TLR7 蛋白表达



与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与冷刺激组比较, # $P<0.05$

图4 各组小鼠肺组织中 TLR7 mRNA 相对表达量

2.3 各组小鼠肺组织中 IFN α 、IFN β 的 mRNA 含量表达及其在血清中的分泌情况 RT-PCR 检测显示:小鼠肺组织中,香囊组与香囊+冷刺激组中 IFN α 、IFN β 的 mRNA 表达水平相对升高,与空白对照组比较($P<0.05$),冷刺激组 IFN α 、IFN β 的 mRNA 表达相对减低($P<0.05$);与单纯冷刺激组比较,香囊+冷刺激组 IFN α 、IFN β 的 mRNA 表达显著增加($P<0.05$)。见图 5。



a: IFN α mRNA; b: IFN β mRNA

与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与冷刺激组比较, # $P<0.05$

图5 各组小鼠肺组织中 IFN α mRNA 和 IFN β mRNA 相对表达量

2.4 香囊对小鼠血清 IFN α 、IFN β 分泌水平的影响 采用 ELISA 法检测小鼠血清 IFN α 、IFN β 分泌水平,与空白对照组相比,苗药防感香囊+冷刺激组的 IFN α 、IFN β 分泌水平相对升高($P<0.05$),其余组间差异无统计学意义。见表 1。

表 1 苗药香囊对小鼠血清中 IFN α 、IFN β 分泌水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	IFN α	IFN β
空白对照组	12	16.400 \pm 0.230	18.160 \pm 0.326
香囊组	12	16.960 \pm 0.088*	18.210 \pm 0.747*
冷刺激组	12	16.68 \pm 1.074*	18.330 \pm 0.371*
香囊+冷刺激组	12	18.07 \pm 0.088**	24.030 \pm 0.402**

与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与冷刺激组比较, # $P<0.05$

3 讨 论

苗药防感香囊是苗族地区治疗一些疾病的重要手段,可用来预防疾病和弥补内服汤药之不足。苗药防感香囊中的挥发性药物,可经血管丛丰富的鼻黏膜吸入并逐步弥散至全身,避免首过效应的同时药物气味可刺激鼻神经,通过神经体液反射调节机体的免疫功能。国内已有报道有类似香囊在临床防治流感中有效,同时有相关动物实验表明香囊可提高病毒感染小鼠的免疫功能^[10]。

流行性感冒由流感病毒引起,多发于免疫低下人群,且常于气温较低的冬春季节大流行^[11]。近几年来流感大流行频繁爆发,包括 2009 年新甲型 H1N1 流感病毒、2013 年的人 H7N9 禽流感疫情,均对人们的生命、生活造成了较大的威胁。在抵御流感的过程中,因流感病毒毒株的高变异性、抗病毒药物及特效疫苗研发滞后于大流行等原因,临床普及具有局限性,提高机体免疫功能、预防流感显得尤为重要^[12-13]。综上考虑,本课题组在前期研究中,将苗药香囊与玉屏风颗粒、匹多莫德等经典增强免疫功能制剂进行了对比,并以冷刺激小鼠模拟人体在寒冷状态下的免疫低下模型,结果显示:苗药防感香囊可通过自然吸入而获得效果,一定范围内苗药香囊具有时间及剂量依赖性,10 g 苗药香囊持续吸入 30 d 后可良性调节 TLR 2/4-MyD88-Traf6 通路及部分下游相关炎症因子的表达^[14-17]。因此,我们推测苗药防感香囊有提高机体免疫功能、预防流感的效用,并可能通过 TLR7 介导 I 型干扰素信号通路发挥抗病毒效用。

I 型干扰素包括 20 种亚型,表达量最多的是

IFN α 、IFN β ,在早期抗病毒和调节免疫活性中起着重要的作用^[18]。IFN-I 在接收到病毒感染信号后,通过干扰素诱导基因产物 MX 蛋白、Janus 激酶 1 和酪氨酸激酶 2、信号转导及转录激活因子(signal transducers and activators of transcription 1, STAT)、IFN 调节因子 9(IFN regulatory factor 9, IRF9)、IFN 刺激基因因子等分子介导,激活干扰素诱导基因(interferon stimulated genes, ISGs),诱导相关蛋白表达,发挥抗病毒、调节免疫的生物学功能^[19]。同时有研究发现:TLR7 是流感病毒诱导 I 型干扰素的表达通路中的重要起始因子,TLR7 广泛存在于机体免疫细胞的胞内膜器,TLR7 识别病毒的单链 RNA,招募接头蛋白,通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6)等进一步激活一系列信号级联反应,诱导炎症因子及 I 型干扰素的产生,最终在干扰素及其他炎症因子的作用下,通过天然免疫清除感染的病毒^[20]。临床已有报道利用 TLR7 激动剂治疗慢性病毒性感染疾病^[21]。

本研究以此为切入点,通过预防性用药,对小鼠予以冷刺激模拟低温环境下的免疫低下状态,观察苗药防感香囊是否通过上调 TLR7、IFN α 、IFN β 起到调节免疫、清除感染病毒的作用。结果显示:小鼠肺组织中,冷刺激组 TLR7、IFN α 、IFN β 表达水平相对于空白对照组降低,小鼠肺泡壁充血,毛细血管通透性增加,肺泡内可见大量渗出和炎症细胞浸润,表明冷刺激造模成功;与空白对照组、冷刺激造模组相比,预防性吸入香囊治疗后的鼠肺组织中 TLR7、IFN α 、IFN β 表达显著上调,说明苗药香囊可通过良性调节上述靶点起预防流感作用,且一定程度上苗药香囊可改善冷刺激对小鼠肺组织 TLR7、IFN α 、IFN β 的抑制状态。在香囊+冷刺激组,TLR7、IFN α 、IFN β 表达水平均超过了单纯香囊刺激组,这表明在 TLR7 介导的 IFN α 、IFN β 表达的通路中冷刺激在其中某个环节可能起到了正调节作用,相关报道及本次实验可知一定条件下单纯冷刺激可造成机体免疫低下状态,但这并不代表冷刺激条件下机体放弃了对外界干扰的“抵抗”,冷刺激可引起交感神经兴奋、肾素血管紧张素增多等一系列神经生理变化来适应机体需求,目前已有报道证实冷刺激可促进气道重塑因子的表达^[22];持续预防性吸入苗药香囊可上调相关蛋白的表达,但遇冷刺激后,香囊+冷刺激干预后的 TLR7、IFN α 、IFN β 表达要超过

了单纯香囊组,我们猜测机体受冷刺激所引起的神经的兴奋、激素的释放对香囊相关免疫通路的激活起到了放大调节的作用,或者从其它旁路途径刺激了 TLR7、IFN α 、IFN β 的表达,香囊和冷刺激两者对 I 型干扰素的表达可能存在协同交互作用,这也可能是秋冬等气候变化流感易感季香佩疗法、防感香囊等药物广泛运用的原因之一。

综上,苗药防感香囊可上调 TLR7、IFN α 、IFN β 的表达,苗药香囊可通过 I 型干扰素信号通路起到有效预防呼吸道感染,增强机体非特异免疫的作用。苗药防感香囊以其廉价、方便、安全、易推广等特点可作为临床抗流感制剂的补充。下一步,我们将沿着已有的研究成果,对 TLR 通路中某一基因位点进行敲除,进一步探索苗药防感香囊调节机体免疫的机制,为防感香囊的推广及临床应用提供科学理论依据。

[参考文献]

- [1] 国家卫生和计划生育委员会,国家中医药管理局.流行性感冒诊疗方案(2018 年版)[J].中国感染控制杂志,2018,17(2):181-184.
- [2] Paules CI, Sullivan SG, Subbarao K, *et al.* Chasing Seasonal Influenza - The Need for a Universal Influenza Vaccine[J]. *New England J Med*, 2018, 378(1):7.
- [3] Sautto GA, Kirchenbaum GA, Ross TM. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal[J]. *Virology*, 2018, 15(1):17.
- [4] Subbarao K. Avian influenza H7N9 viruses: a rare second warning[J]. *Cell Res*, 2018, 28(1):1-2.
- [5] 余江维,王永秀,杜江,等.试论贵州苗医药文化的活态传承[J].*时珍国医国药*, 2016, 25(1):1-2.
- [6] 刘龙,岳小强,王丽娜,等.辟秽防感香囊预防流行性感冒的疗效及其免疫调节机制[J].*中西医结合学报*, 2010, 8(10):949-954.
- [7] 孟庆志,程明亮,张权,等.苗药香囊对正常小鼠肺泡灌洗液及血清 IL-2、IL-18 水平的影响[J].*中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2012, 6(6):517-519.
- [8] 张权,孟庆志.苗药防感香囊对小鼠呼吸道 TLR2/4、SIgA、IgG1 的影响[J].*时珍国医国药*, 2012, 23(11):2905-2906, 2908.
- [9] 金鸣昌,晏志,郭伟伟,等.苗药防感香囊预防甲型 H1N1 流感的应用观察[J].*中国中医药信息杂志*, 2013, 20(6):63-64.
- [10] 王旭东,谢飞,高益明.辟秽香囊抗流感病毒的实验研究[J].*中华中医药杂志*, 2010, 25(6):927-929.
- [11] 杨静,陈涛,祝菲,等.2017~2018 年度中国大陆流行性感冒病例报告情况分析[J].*热带病与寄生虫学*, 2018, 16(2):63-66.
- [12] Akiko I, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5):315-328.
- [13] Florian K, Peter P. Advances in the development of influenza virus vaccines[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(3):167-182.
- [14] Xian LI, Lei N, Duan XH, *et al.* A mouse model of upper respiratory tract mucosal immunity dysfunction induced by cold stimulation[J]. *Chinese J Pathophysiol*, 2011, 27(8):1662-1664.
- [15] 贾国泉,张权,谭家武,等.苗药香囊对小鼠肺组织中 NF- κ B 表达的影响[J].*广东医学*, 2017, 38(2):178-181.
- [16] Wang H, Zhang Q, Cheng ML, *et al.* Effect of the Miaoyao Fanggan sachet-derived isorhamnetin on TLR2/4 and NKp46 expression in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(1):138-144.
- [17] Zhang Q, Wang H, Cheng ML, *et al.* The miaoyao fanggan sachets regulate humoral immunity and cellular immunity in mice[J]. *J Complement Integr Med*, 2015, 12(1):43-51.
- [18] 武建杰,宗海斌,路坦,等.多聚肌苷酸多聚胞苷酸对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后炎症反应的脊髓保护作用[J].*医学研究生学报*, 2017, 30(6):596-600.
- [19] 徐迪晖,王继德,程天明,等. α 干扰素对结肠癌细胞株 lovo 和 sw1116 中 X 染色体连锁凋亡抑制相关因子 1 表达调节作用[J].*医学研究生学报*, 2007, 20(12):1242-1244.
- [20] Saitoh SI, Abe F, Kanno A, *et al.* TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1592.
- [21] Zhen A, Rezek V, Youn C, *et al.* Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1):260-268.
- [22] 朱芮,李敏超.寒冷刺激支气管上皮细胞产生外泌体促肺成纤维细胞表达气道重塑相关因子[J].*中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(10):1070-1075.

(收稿日期:2019-04-01; 修回日期:2019-05-17)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)