

板蓝根含药血清对病毒感染 RAW264.7 细胞的 TLR3 信号通路的影响

侯宪邦, 范方田, 何立巍*

(南京中医药大学药学院, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究板蓝根含药血清对呼吸道合胞病毒(RSV)感染 RAW264.7 细胞中干扰素- β (IFN- β), Toll 样受体 3 (TLR3), TBK1, 干扰素调节因子 3 (IRF3) 表达的影响, 阐释其可能的抗 RSV 机制, 为临床使用提供实验依据。**方法:**本实验分为 6 组, 分别为空白组, RSV 感染细胞模型组, 板蓝根含药血清低、中、高体积分数组(40%, 50%, 60% 板蓝根含药血清), 利巴韦林含药血清组(70% 利巴韦林含药血清)。除空白组外, 其余各组接种 RSV 造成病毒感染模型, 采用板蓝根含药血清或利巴韦林含药血清进行干预, 12 h 后收集细胞及其上清液, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测细胞上清液中 IFN- β 含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 RAW264.7 细胞中 TLR3, TBK1, IRF3 和 IFN- β mRNA 的表达; 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测 TLR3, TBK1, IRF3 和 p-IRF3 蛋白的表达。**结果:**RSV 感染 RAW264.7 细胞 12 h 后, 与空白组比较, 模型组 TLR3, TBK1 和 IFN- β mRNA 的表达显著升高, IFN- β , TLR3, TBK1 和 p-IRF3 蛋白的表达也显著升高($P < 0.01$), IRF3 mRNA 和蛋白均无明显变化; 与模型组比较, 板蓝根含药血清中、高体积分数组能够显著下调 RSV 诱导的 TLR3, TBK1 和 IFN- β mRNA 的高表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时明显下调 RSV 诱导的 TLR3, TBK1 和 p-IRF3 蛋白的高表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 板蓝根含药血清各体积分数组的下调作用低于利巴韦林含药血清组, 两者对 IRF3 mRNA 和蛋白均无明显调控作用。**结论:**RSV 能够诱导 TLR3 信号转导通路的激活从而促进 IFN- β 的表达, 而板蓝根含药血清通过下调 TLR3 信号通路关键信号分子 TLR3, TBK1, p-IRF3 使 IFN- β 适度表达。

[关键词] 板蓝根; 呼吸道合胞病毒; 病毒性肺炎; 模式识别受体; 干扰素- β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)09-0105-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017090105

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170215.0923.008.html>

[网络出版时间] 2017-02-15 9:23

Regulation Effect of Isatidis Radix-containing Serum on TLR3 Signal Transduction Pathway in RAW264.7 Cells Infected With Virus

HOU Xian-bang, FAN Fang-tian, HE Li-wei*

(Pharmacy School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulation effect of Isatidis Radix-containing serum on interferon- β (IFN- β), Toll-like receptors 3 (TLR3), TBK1, interferon regulatory factor 3 (IRF3) in RAW264.7 cells infected with virus, in order to explore its antiviral mechanism and provide experimental basis for clinical application. **Method:** The experiment was divided into 6 groups: normal control group, RSV infected model group, Isatidis Radix low, medium and high dose groups (40%, 50%, 60% Isatidis Radix-containing serum), and Ribavirin group (70% Ribavirin-containing serum). RAW264.7 cells were infected with RSV, and treated with Isatidis Radix-containing serum or Ribavirin-containing serum. After 12 hours, supernatant was

[收稿日期] 20170104(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473316);江苏省自然科学基金项目(BK20151356);江苏高校优势学科建设工程项目

[第一作者] 侯宪邦,在读硕士,从事天然药物生产加工与品质评价研究,Tel: 18952222810,E-mail: houxian.b@163.com

[通讯作者] *何立巍,博士,副教授,从事中药及天然药物化学研究,Tel: 0523-80639259,E-mail: he_lw@163.com

collected to detect the level of IFN- β with ELISA assay, cells were collected to detect the level of TLR3, TBK1, IRF3 and IFN- β mRNA with Real-time PCR, and protein expressions of TLR3, TBK1, IRF3 and p-IRF3 were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, model group showed obvious increases in expressions of TLR3, TBK1, IFN- β mRNA and protein of TLR3, TBK1, p-IRF3 12 h later after RAW264. 7 cells were infected with RSV ($P < 0.01$), with no significant change in IRF3 mRNA and protein. Compared with model group, medium and high-dose Isatidis Radix groups showed obvious decreases in the high expressions of TLR3, TBK1, IFN- β mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and the high expressions of protein of TLR3, TBK1, p-IRF3 ($P < 0.05$). The down-regulation effect of Isatidis Radix-containing serum was lower than that of Ribavirin-containing serum. Both of Isatidis Radix-containing serum and Ribavirin-containing serum had no a significant effect on the expressions of protein of IRF3 and mRNA of IRF3. **Conclusion:** RSV can activate TLR3 signaling transduction pathway to promote the expression of IFN- β . Isatidis Radix-containing serum can down-regulate TLR3, TBK1, p-IRF3 of TLR3 signaling transduction pathway to control the proper expression of IFN- β .

[**Key words**] Isatidis Radix, respiratory syncytial virus, viral pneumonia, pattern recognition receptor, interferon- β

板蓝根是中医临床上最常用的抗病毒中草药之一,始载于《神农本草经》,在中国已有两千多年的药用历史。现代科学研究表明,板蓝根具有抗流感病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、乙型肝炎病毒、柯萨奇病毒、乙型脑炎病毒的功效,尤其是在防治病毒感染引起的流行性感冒,病毒性肺炎等呼吸道疾病方面治疗效果显著,而且在病毒感染初期效果最好^[1]。板蓝根的抗病毒机制至今仍众说纷纭,现在大量报道都指向直接抗病毒作用^[2-3]与调节免疫抗炎作用^[4-5]相结合的多靶点作用机制。呼吸道合胞病毒(RSV)是含有包膜非片段性的单股负链 RNA 病毒,属于副黏液病毒科,肺炎病毒属,是引起婴幼儿及老年人下呼吸道感染最重要的病毒性病原^[6]。近年来大量研究表明 Toll 样受体 3(TLR3)与 RSV 感染关系密切^[7-8],TLR3 可以识别病毒复制和转录过程中产生的双链 RNA(dsRNA),通过非 MyD88 依赖的信号通路途径及 TRIF 依赖型通路,激活下游的激酶 TBK1,从而导致干扰素调节因子 3(IRF3)磷酸化活化,促进干扰素- β (IFN- β)的分泌介导机体抗感染应答反应^[9-10]。临床研究证实板蓝根具有治疗小儿病毒性肺炎的功效^[11-12],本课题组前期实验研究亦表明板蓝根对 RSV 有抑制作用。本研究从板蓝根含药血清对 TLR3 信号通路关键信号分子 TLR3, TBK1, IRF3, p-IRF3 的影响入手,通过体外实验研究,阐释板蓝根抗 RSV 感染的作用机制,为推动板蓝根的抗 RSV 临床应用提供药理学依据。

1 材料

1.1 细胞、病毒及动物 人喉癌上皮细胞(Hep-2

细胞)由中国科学院上海生科院细胞资源中心提供;小鼠肺泡单核细胞(RAW264.7 细胞)由扬州大学第一临床医学院惠赠;RSV A 型 Long 株由武汉大学国家典型培养物保藏中心提供。SPF 级 SD 大鼠由南京市江宁区青龙山动物繁育中心提供,动物合格证号 SCXK(浙)2015-0012。本研究获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 板蓝根颗粒(广州白云山和记黄埔中药有限公司,批号 H5K021),利巴韦林颗粒(湖南千金湘江药业股份有限公司,批号 151016);RPMI-1640 培养基,DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号分别为 AAH206539, AAK208935);0.25% 胰酶(含 EDTA),胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 1704814, 20151209);噻唑蓝(MTT),二甲基亚砷(DMSO),牛血清白蛋白(BSA)(美国 Sigma 公司,批号分别为 C10036912, 045M4080V, 10735078001);RNAprep pure 细胞/细菌试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 P4721);PrimeScript[®] RT 化学试剂盒(大连宝生物工程股份有限公司,批号 AK3802);RIPA 裂解液(强),PMSF,BCA 蛋白定量试剂盒及上样缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 0013151209, 060616160629, 022616160503, 0015150729);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司);蛋白酶抑制剂混合物,磷酸酶抑制剂混合物(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为 KGP602151019, KGP603150713);TLR3 通路抗体套样试剂盒(美国 CST 公司,批号 8348s);抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体,羊抗兔荧光二抗,ECL 蛋白质免疫印迹(Western

blot) Substrat (美国 Proteintech 公司, 批号分别为 2055361, SA001201, B500024); 蛋白 Marker(生兴生物技术有限公司, 批号 00318120); 1:29 bis-Acr, 10% 十二烷基磺酸钠 (SDS), APS(美国 Bio-Rad 公司, 批号分别为 B0016K011800, 323A032, B0016K022600); 三异丙基乙磺酰 (TRIS), 甘氨酸(北京索莱宝公司, 批号分别为 326A078, 605B069); 脱脂奶粉(美国 BD 公司, 批号 1138761), 小鼠 IFN- β 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (美国 Cloud-Clone Corp 公司, 批号 S6233X); 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 仪器 倒置式生物显微镜(日本 Nikon 公司), 细胞计数仪(上海睿钰生物科技有限公司), CFX96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪, ChemiDoc XRS + 成像仪, Power Pac Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Multiskan go 型酶标仪(美国 Thermo 公司); 5810R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); LD5-10B 型台式低速离心机(北京京立离心机有限公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备和处理 SD 大鼠饲养至 250 g 后分为 2 组, 每组 10 只, 每天分别予以板蓝根颗粒^[13] 52.5 mg·kg⁻¹, 利巴韦林颗粒 128.1 mg·kg⁻¹ (即利巴韦林给药量 10 mg·kg⁻¹) 水溶后分 2 次灌胃给药, 给药 7 d, 末次给药 1 h 后麻醉腹主动脉采血, 血液室温静置 2 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清含药血清置 56 °C 水浴灭活 30 min, 于 -20 °C 保存备用。含药血清的处理: 每 1 mL 含药血清加入 3 mL 甲醇, 涡旋混匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 置氮吹仪 37 °C 吹干后加含 2% FBS 的 DMEM 1 mL 复溶, 0.22 μ m 一次性无菌滤器过滤除菌后于 4 °C 保存备用。

2.2 细胞培养与病毒的扩增 Hep-2 细胞和 RAW264.7 细胞均采用 DMEM 高糖培养基(含 10% FBS, 1% 青链霉素混合液), 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。待单层细胞铺满 90% 以后, 0.25% 胰酶消化传代。所有实验均采用对数生长期细胞。RSV 的扩增: Hep-2 细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 5 mL 接种于 75 cm² 培养板瓶, 待细胞长成单层细胞后, 弃去培养液, 接种病毒液 5 mL, 吸附 1 h, 每 15 min 轻轻摇晃 1 次。加入含 2% FBS 的维持液, 继续至 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养并观察细胞病变情况。待细胞 80% 出现病变后, 置 -80 °C 和 37 °C 反复冻融 3 次。3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液即病毒液, 于 -80 °C 保存备用。

2.3 病毒 TCID50 的测定 将 Hep-2 细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 将含 RSV 的病毒液用 DMEM 高糖培养基连续 10 倍的稀释 8 个浓度。待细胞长成单层细胞时, 吸去培养液, 接种稀释后的病毒液, 每孔 100 μ L, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱吸附 1 h, 每 15 min 轻轻摇晃 1 次, 并设置正常细胞为阴性组。病毒接种 1 h 后将病毒液吸去, 每孔加 200 μ L 含 2% FBS 的维持液, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱。每天观察病变程度并记录结果, 以最高稀释度不再出现新的病变为止。采用 Reed-Muench 公式计算 TCID50, 具体公式如下。

距离比例 =

$$\lg \text{TCID}_{50} = \frac{\text{高于 50\% 病变率的百分数} - 50\%}{\text{高于 50\% 病变率的百分数} - \text{低于 50\% 病变率的百分数}} \times \text{距离比例值} \times \text{稀释倍数的对数}$$

2.4 药物对 RAW264.7 细胞毒性的测定 使用 2% FBS 的维持液将经过处理的利巴韦林和板蓝根含药血清各稀释成 8 个浓度。取对数期 RAW264.7 细胞以 1 × 10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L, 待单层细胞铺满全孔时, 加入上述配制的不同浓度的含药溶液, 并设置正常组, 置于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。每孔加入 MTT (1 g·L⁻¹) 20 μ L, 置于 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养 4 h, 移除培养液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 震荡, 置酶标仪检测各孔 490 nm 吸光度 A。

2.5 分组与样本处理 本实验共分为 6 组, 分别为空白组、RSV 感染细胞模型组、利巴韦林含药血清组、板蓝根含药血清低、中、高体积分数组。将 RAW264.7 细胞以 5 × 10⁵ 个/mL 2.5 mL 接种于 6 孔培养板, 待细胞长至 80% 左右时, 除空白组外, 各组接种 100 TCID₅₀ mL⁻¹ 的 RSV 液 500 μ L, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱吸附 1 h, 每 15 min 轻轻摇晃 1 次。接种病毒液 1 h 后, 吸去病毒液后, 利巴韦林含药血清组、板蓝根含药血清低、中、高体积分数组分别给予 2.5 mL 70% 利巴韦林含药血清, 40% 板蓝根含药血清, 50% 板蓝根含药血清, 60% 板蓝根含药血清, 空白组和模型组加入 2.5 mL 2% FBS 维持液, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 12 h, 将细胞培养液以及细胞按照检测相对应的处理方法进行处理。

2.6 ELISA 法检测 IFN- β 的含量 按照 ELISA 试剂盒的说明书操作, 检测 RAW264.7 细胞培养液中 IFN- β 的含量。

2.7 Real-time PCR 法检测 吸去细胞上清液,按照试剂盒说明书提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA,SYBR Green II Real-time PCR 法进行检测。PCR 反应条件(采用两

步法):95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 40 s,设置 40 个循环,同时做熔解曲线。以上实验独立重复 3 次,实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算。PCR 引物序列见表 1。

表 1 目标基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of gene

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
RSV-F	TTGGATCTGCAATCGCCA	CTTTGATCTTGTTCACCTTCTCCTTCT
IFN-β	CTGCGTTCCTGCTGTGCTTC	CGCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
TLR3	CAGGATACTTGATCTCGGCCCTT	TGGCCGCTGAGTTTTTGTTC
TBK1	CGGATCCATGCAGAGCACTTCTAATCAT	CCGCTCGAGCTAAAGACAGTCAACGTTGCC
IRF3	GGAAAGAAGTGTTCGGGTTAG	GAGGACTGTGTTACCGTT
β-actin	GTATCCTGACCCTGAAGTACC	TGAAGTCTCAAACATGATCT

2.8 Western blot 法检测 吸去细胞上清液,用预冷 PBS 缓冲液冲洗细胞,向培养 RAW264.7 细胞的 6 孔培养板每孔加入 200 μL 裂解液(每 1 mL RIPA 加入 PMSF 10 μL,磷酸酶抑制剂 10 μL,蛋白酶抑制剂 1 μL),置冰上刮下细胞,4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清液(总蛋白),使用 BCA 法蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后,湿法转膜(恒压 100 V 转移 90 min)。在 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,TBST 摇床漂洗 2 次。1:1 000 孵育一抗(4 ℃过夜),回收一抗,TBST 摇床漂洗 5 次,1:1 万孵育二抗(室温 1 h),TBST 摇床漂洗 5 次,ECL Western blot Substrate 孵育 1 min 显色,ChemiDoc XRS + 成像系统成像,实验结果采用 Image Lab 软件进行辉度值计算。

以选取 12 HPI 进行后续实验。见表 2~4。

表 2 RSV 感染 RAW264.7 细胞中 RSV-F mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 mRNA expression of RSV-F in RAW264.7 cells with RSV infection($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	RSV-F
0.5 h	1.00 ± 0.00
2 h	1.27 ± 0.09 ¹⁾
12 h	3.27 ± 0.20 ²⁾
24 h	4.55 ± 0.14 ²⁾
48 h	5.46 ± 0.18 ²⁾

注:与 0.5 h 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 RSV 感染 RAW264.7 细胞中 IFN-β mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 mRNA expression of IFN-β in RAW264.7 cells with RSV infection($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	IFN-β
0 h	1.00 ± 0.00
0.5 h	1.16 ± 0.08
2 h	1.44 ± 0.12 ¹⁾
12 h	2.45 ± 0.07 ²⁾
24 h	2.61 ± 0.15 ²⁾
48 h	2.83 ± 0.06 ²⁾

注:与 0 h 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 t 检验,多组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RSV 在 RAW264.7 细胞中的增殖特性 首先研究了在 RSV 感染的 RAW264.7 细胞中病毒的复制以及 IFN-β 的表达特性。RSV-F mRNA 的表达最早可以于感染后 0.5 h 检测到,12 h 显著提高($P < 0.01$),48 h 达到最大。未感染细胞即有内源性 IFN-β mRNA 的表达,在 RSV 感染细胞 12 h 后,与未感染的细胞相比,感染细胞中 IFN-β mRNA 的表达显著提高($P < 0.01$)。在 RSV 感染细胞 12 h 后,细胞上清液中 IFN-β 含量显著增加($P < 0.01$)。基于病毒感染细胞中 RSV-F 和 IFN-β mRNA 及蛋白表达水平较未感染的细胞在感染后 12 h(12 HPI)有显著提高,所

3.2 利巴韦林和板蓝根含药血清对 RAW264.7 细胞存活率的影响 空白血清对 RAW264.7 细胞存活率没有影响,利巴韦林和板蓝根含药血清均可剂量依赖性抑制 RAW264.7 细胞的增殖,其中板蓝根含药血清最大无毒体积分数约为 60%,利巴韦林含药血清最大无毒体积分数约为 70%,选取板蓝根含

表 4 RSV 感染 RAW264.7 细胞上清液中 IFN- β 含量
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Level of IFN- β in RAW264.7 cells supernatant with RSV infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	IFN- β /ng·L ⁻¹
0 h	41.25 ± 1.85
0.5 h	45.10 ± 2.43
2 h	54.83 ± 2.19 ¹⁾
12 h	73.98 ± 1.80 ²⁾
24 h	78.83 ± 4.15 ²⁾
48 h	85.00 ± 3.39 ²⁾

药血清最接近最大无毒体积分数的 3 个剂量进行后续实验即低体积分数组 40%, 中体积分数组 50%, 高体积分数组 60%。见表 5, 6。

表 5 利巴韦林含药血清对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of serum containing drug of Ribavirin on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	细胞存活率/%
阴性	-	100.00 ± 3.85
空白血清	-	100.00 ± 6.45
利巴韦林含药血清	30	97.31 ± 1.94
	40	96.45 ± 3.60
	50	95.92 ± 1.75
	60	93.56 ± 3.44
	70	89.60 ± 4.96
	80	53.13 ± 8.65
	90	37.84 ± 6.14
	100	19.95 ± 3.05

表 6 板蓝根含药血清对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of serum containing drug of Isatidis Radix on RAW264.7 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	细胞存活率/%
阴性	-	100.00 ± 5.16
空白血清	-	100.00 ± 4.72
板蓝根含药血清	30	99.51 ± 6.13
	40	97.98 ± 4.86
	50	95.75 ± 5.69
	60	90.61 ± 9.22
	70	71.77 ± 5.06
	80	51.68 ± 5.39
	90	35.12 ± 5.65
	100	16.13 ± 6.96

3.3 板蓝根含药血清调节病毒感染 RAW264.7 细胞中 IFN- β 表达的影响 通过 Real-time PCR 来检测细胞中 IFN- β mRNA 的表达, RSV 感染 RAW264.7 细胞 12 h 后, 细胞内 IFN- β mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), 利巴韦林和板蓝根高体积分数组对 IFN- β mRNA 高表达有显著下调作用 ($P < 0.01$), 利巴韦林组较板蓝根高体积分数组下调作用更为显著。用 IFN- β ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 IFN- β 的含量, RSV 感染 RAW264.7 细胞 12 h 后, RAW264.7 细胞上清液中 IFN- β 含量显著升高 ($P < 0.01$), 利巴韦林组和板蓝根高体积分数组与模型组相比细胞上清液中 IFN- β 显著降低 ($P < 0.01$), 利巴韦林组比板蓝根高体积分数组降低更为显著 ($P < 0.01$)。板蓝根含药血清对 IFN- β mRNA 和蛋白的调控作用均呈现剂量依赖性, 见表 7, 8。

表 7 板蓝根含药血清对 RSV 感染 RAW264.7 细胞后 IFN- β mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Isatidis Radix on mRNA expression of IFN- β in RAW264.7 cells with RSV infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	IFN- β
空白	-	1.00 ± 0.00
模型	-	2.44 ± 0.06 ³⁾
利巴韦林	70	1.16 ± 0.12 ²⁾
板蓝根	40	2.15 ± 0.07
	50	1.83 ± 0.11 ¹⁾
	60	1.44 ± 0.07 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 7 ~ 10 同)。

表 8 板蓝根含药血清对 RSV 感染 RAW264.7 细胞后细胞上清液中 IFN- β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Isatidis Radix on expression of IFN- β in RAW264.7 cells supernatant with RSV infection ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	IFN- β /ng·L ⁻¹
空白	-	42.60 ± 1.98
模型	-	75.31 ± 3.05 ³⁾
利巴韦林	70	45.91 ± 2.72 ²⁾
板蓝根	40	64.53 ± 4.15
	50	58.63 ± 2.14 ¹⁾
	60	53.97 ± 2.62 ²⁾

3.4 板蓝根对 RAW264.7 细胞 TLR3, TBK1, IRF3 mRNA 的影响 RSV 感染 RAW264.7 细胞 12 h 后, TLR3 和 TBK1 mRNA 表达量较空白组均显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 利巴韦林和板蓝根高体

积分数组均可显著下调 TLR3 和 TBK1 的高表达 ($P < 0.01$), 板蓝根对 TLR3 和 TBK1 的调控作用呈现体积分数依赖性, 但板蓝根高体积分数组的调节作用低于利巴韦林组, IRF3 mRNA 表达量模型组与空白组比较无显著变化, 利巴韦林和板蓝根对 IRF3 mRNA 表达无明显调控作用。见表 9。

表 9 板蓝根含药血清对 RSV 感染 RAW264.7 细胞后 TLR3, TBK1, IRF3 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

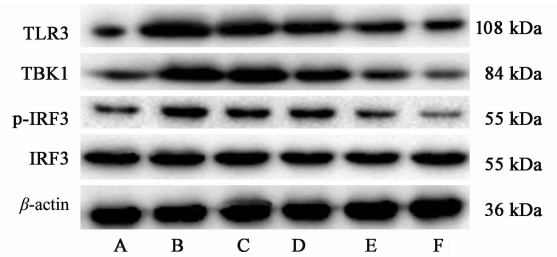
Table 9 Effect of Isatidis Radix on mRNA expression of TLR3, TBK1, IRF3 in RAW264.7 cells with RSV infection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	TLR3	TBK1	IRF3
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	1.96 ± 0.02 ³⁾	2.15 ± 0.04 ³⁾	1.02 ± 0.02
板蓝根	40	1.77 ± 0.05	1.84 ± 0.04	1.07 ± 0.04
	50	1.41 ± 0.01 ¹⁾	1.56 ± 0.02 ¹⁾	1.00 ± 0.05
	60	1.23 ± 0.01 ²⁾	1.33 ± 0.05 ²⁾	1.03 ± 0.01
利巴韦林	70	1.08 ± 0.02 ²⁾	1.14 ± 0.01 ²⁾	1.01 ± 0.01

3.5 板蓝根对 RAW264.7 细胞 TLR3, TBK1, IRF3, p-IRF3 蛋白表达的影响

RSV 感染 RAW264.7 细

胞 12 h 后, TLR3, TBK1, p-IRF3 蛋白表达量较空白组均显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 利巴韦林组和板蓝根高体积分数组均可显著下调 TLR3, TBK1, p-IRF3 蛋白的高表达 ($P < 0.01$), 板蓝根含药血清对 TLR3, TBK1, p-IRF3 蛋白高表达的下调作用具有剂量依赖性, 而高体积分数组板蓝根对 TLR3, TBK1, p-IRF3 蛋白高表达的下调作用低于利巴韦林 ($P < 0.01$)。IRF3 蛋白表达量模型组与空白组比较无显著变化, 利巴韦林和板蓝根对 IRF3 蛋白表达无明显调控作用。见图 1, 表 10。



A. 空白组; B. 模型组; C. 板蓝根 40% 组; D. 板蓝根 50% 组; E. 板蓝根 60% 组; F. 利巴韦林组

图 1 TLR3, TBK1, IRF3, p-IRF3 蛋白相对表达量

Fig.1 Expression of TLR3, TBK1, IRF3 and p-IRF3 protein

表 10 板蓝根含药血清对 RSV 感染 RAW264.7 细胞 TLR3, TBK1, IRF3, p-IRF3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of Isatidis Radix on protein expression of TLR3, TBK1, IRF3 and p-IRF3 in RAW264.7 cells with RSV infection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数/%	TLR3	TBK1	p-IRF3	IRF3
空白	-	0.45 ± 0.01	0.75 ± 0.05	0.16 ± 0.04	0.70 ± 0.02
模型	-	0.98 ± 0.03 ³⁾	1.39 ± 0.01 ³⁾	0.63 ± 0.02 ³⁾	0.73 ± 0.04
板蓝根	40	0.75 ± 0.01	1.34 ± 0.04	0.51 ± 0.04	0.69 ± 0.01
	50	0.66 ± 0.01 ¹⁾	1.10 ± 0.03 ¹⁾	0.35 ± 0.02 ¹⁾	0.71 ± 0.02
	60	0.54 ± 0.02 ²⁾	0.87 ± 0.04 ²⁾	0.22 ± 0.01 ²⁾	0.74 ± 0.06
利巴韦林	70	0.48 ± 0.02 ²⁾	0.78 ± 0.01 ²⁾	0.17 ± 0.03 ²⁾	0.74 ± 0.05

4 讨论

板蓝根在中国传统医学治疗病毒感染引起的疾病方面占有重要地位, 但其抗病毒机制尚未完全明确, 对于免疫系统的调节是板蓝根抗病毒作用机制之一。现今, 板蓝根对免疫系统影响的研究主要集中在它增强免疫方面, 据报道, 板蓝根能够提高小鼠外周血 CD3⁺ 与 CD4⁺ T 细胞的比例, 提高血清中 IgM, IgG 和 IgA 等免疫球蛋白水平, 促进淋巴细胞增殖^[14]。板蓝根还具有免疫佐剂功效, 与鸡新城疫疫苗联用时, 能增强新城疫血凝抑制抗体效价, 增加 CD4⁺ 与 CD8⁺ 的比值和免疫器官指数^[15-16]。上述结果均说明板蓝根对免疫系统起到积极的影响, 但

是过度的免疫反应会导致炎症和组织损伤, 板蓝根在抑制过度免疫反应方面的作用往往被低估。

本研究表明, RSV 感染 RAW264.7 细胞 12 h 后, RSV-ds RNA 能够激活 RAW264.7 细胞 TLR3 信号转导通路, 从而上调 TLR3 和 TBK1 的表达, 通过信号转导并最终导致 IRF3 磷酸化增加, 从而促进 IFN-β 的分泌。IFN-β 的分泌有利于机体快速清除病毒, 但是过量 IFN-β 的分泌会导致严重的炎症和机体损伤, 临床主要表现为肺炎, 经利巴韦林和板蓝根含药血清干预后, RSV 感染 RAW264.7 细胞中 TLR3 和 TBK1 的高表达均出现下调, 进而下调 p-IRF3 的表达, 最终抑制 IFN-β 的过量表达, 但利巴

韦林的抑制作用过于强烈,致使细胞上清液中IFN- β 表达量接近正常水平而不能起到有效的抗病毒作用,板蓝根的抑制作用温和,调节 IFN- β 的表达量使其高于正常水平低于疾病水平,保证有效清除病毒的同时又能减轻炎症,达到治标又治本的效果。

综上所述,板蓝根抗呼吸道合胞病毒的机制可能是通过其下调 RSV 感染 RAW264.7 细胞诱导的 TLR3 信号通路关键信号分子 TLR3 和 TBK1 的表达,从而下调 IRF3 的磷酸化,最终适度降低病毒感染后 IFN- β 的过量表达,使 IFN- β 的表达维持在一个平衡点,既能起到有效的抗病毒作用,又能避免炎症和组织损伤。

[参考文献]

[1] 杨亚勤. 板蓝根药理作用及临床应用研究[J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(3):252.

[2] 马丽娜,章从恩,鄢丹,等. 超滤质谱技术筛选板蓝根中抗流感病毒的活性成分[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5):812-816.

[3] 陈凯,窦月,陈智,等. 板蓝根抗病毒与抗内毒素等清热解毒药效作用及化学基础研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):275-278.

[4] 金明哲,任东鲜,孟繁平,等. 板蓝根对机体免疫功能及流感病毒 FM1 的作用[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2):394-396.

[5] 刘明华,孙玉红,李茂,等. 板蓝根提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6):1346-1347.

[6] Nair H, Nokes D J, Gessner B D, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children; a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet, 2010, 375 (9725):1545-1555.

[7] Delgado M F, Coviello S, Monsalvo A C, et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease[J]. Nat Med, 2009, 15(1):34-41.

[8] 李艳,李波,姚秀娟,等. Toll 样受体 11-13 在肥大细胞上的表达[J]. 首都医科大学学报, 2013, 34(2):251-257.

[9] LIU P, Jamaluddin M, LI K, et al. Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells[J]. J Virol, 2007, 81(3):1401-1411.

[10] 应颖,王鹏,周艳,等. 烟草霉菌感染激活小鼠肺组织 TLR3 信号通路的研究[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(11):948-952.

[11] 陈凯,窦月,孟凡刚,等. 板蓝根抗炎作用有效部位初步筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):200-203.

[12] 梁建卫. 清肺解毒法治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2007.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.

[14] 薛瑞,章激,曹军华,等. 板蓝根多糖对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中医药导报, 2012, 18(9):94-96.

[15] 邱妍,胡元亮,董发明,等. 板蓝根多糖对鸡新城疫苗免疫效果的影响[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(7):76-80.

[16] 郭新华,邱妍严,桂芹,等. 板蓝根多糖对鸡新城疫抗体滴度和免疫器官指数的影响[J]. 饲料工业, 2007, 28(16):50-52.

[责任编辑 周冰冰]