

·基础研究·

本文引用:张 彧,吴东升,齐 堃,曾丽红,张银银,李 玲,邓奕辉.五倍子酯提物抗流感病毒诱导的小鼠急性肺损伤作用机制[J].湖南中医药大学学报,2018,38(12):1366-1370.

五倍子酯提物抗流感病毒诱导的小鼠 急性肺损伤作用机制

张 彧,吴东升,齐 堃,曾丽红,张银银,李 玲*,邓奕辉*
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕目的 探索 Toll 样受体 4(TLR4)在 A 型流感病毒所致小鼠急性肺损伤中的作用,进一步探讨五倍子酯提物的干预机制。**方法** 实验设正常组、模型组、五倍子酯提物组和奥司他韦组,以流感病毒小鼠肺适应株 A/PR/8/34 滴鼻感染 C57BL 小鼠,建立小鼠急性肺损伤模型。病毒感染后第 1 天开始予以相应干预,共 6 d。分别于第 2、4、6 天处理动物。观察肺组织大体解剖学变化,肺组织切片病理学变化,ELISA 法检测肺泡灌洗液中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)水平,Western blot 法检测肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 的蛋白表达。**结果** 流感病毒感染小鼠后,模型组小鼠肺脏充血、水肿,外观呈暗褐色,肺泡间质水肿、肺泡腔变小,内有大量炎细胞浸润,肺泡灌洗液中 IL-6、IL-10 水平及肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达升高,与正常组相比,差异有显著统计学意义 ($P<0.01$)。与模型组相比,五倍子酯提物组能减轻肺部病变,降低肺泡灌洗液中 IL-6、IL-10 水平及肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达水平,差异有显著统计学意义 ($P<0.01$)。**结论** 五倍子酯提物可通过抑制 TLR4 的活化及下游 MyD88 依赖的转导路径,减少炎症因子的转录生成,减轻肺部炎症,减缓急性肺损伤进程。

〔关键词〕 五倍子酯提物;流感病毒;Toll 样受体 4;急性肺损伤;白细胞介素-6;白细胞介素-10

〔中图分类号〕 R285.5;R563

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.12.003

Mechanism of Action of *Galla chinensis* Ethyl Acetate Extract in Alleviating Acute Lung Injury Induced by Influenza Virus in Mice

ZHANG Yu, WU Dongsheng, QI Kun, ZENG Lihong, ZHANG Yinyin, LI Ling*, DENG Yihui*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in acute lung injury induced by influenza A virus in mice, and to further explore the mechanism of action of *Galla chinensis* ethyl acetate extract. **Methods** The mice were divided into normal group, model group, *Galla chinensis* extracts group, and oseltamivir group. A mouse model of acute lung injury was established by infecting C57BL mice through nasal dripping with mouse lung-adapted influenza virus strain A/PR/8/34. Corresponding treatments were administered from the first day after virus infection, and repeated for 6 days. The animals were disposed of on days 2, 4, and 6. The gross changes of the lungs and the pathological changes of lung tissue sections were assessed; ELISA was used to determine the levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in alveolar lavage fluid; Western blot was used to determine the protein expression of TLR4, MyD88, and TRAF6 in lung tissues. **Results** After influenza virus infection, compared with the normal group, the model group showed hyperemia and edema of the lung with dark-brown appearance, alveolar interstitial edema, and decreased size of alveolar cavities with extensive inflammatory cell infiltration, as well as significantly increased levels of IL-6 and IL-10 in alveolar lavage fluid and protein expression of TLR4, MyD88, and TRAF6 in lung tissues ($P<0.01$). Compared with the model group, the *Galla chinensis* extract group had

〔收稿日期〕 2018-01-21

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2016JJ2095);湖南省大学生创新创业训练计划项目(2016-293)。

〔作者简介〕 张 彧,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治感染性疾病的研究。

〔通讯作者〕 * 邓奕辉,女,教授,博士研究生导师,E-mail:dengyihui06@126.com;李 玲,女,副教授,实验研究员,E-mail:185738041@qq.com。

alleviated lung lesions, as well as significantly reduced levels of IL-6 and IL-10 in alveolar lavage fluid and protein expression of TLR4, MyD88, and TRAF6 in lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** *Galla chinensis* extract can reduce the transcription of inflammatory factors, alleviate lung inflammation, and slow down the progression of acute lung injury by inhibiting the activation of TLR4 and downstream MyD88-dependent transduction pathway.

[**Keywords**] *Galla chinensis* extract; influenza virus; Toll-like receptor 4; acute lung injury; interleukin-6; interleukin-10

人感染流感病毒引起的严重肺部感染,会通过激活肥大细胞释放炎性介质引起急性肺损伤(acute lung injury, ALI),甚至发展为急性呼吸窘迫综合征,被认为是流感病毒感染致死的主要原因^[1],引起了医学界广泛关注。流感病毒诱导 ALI 机制究竟如何,是防控流感病毒必须解决的关键问题。有研究发现, Toll 样受体 4 (TLR4) 能通过识别流感病毒基因组,激活 TLR 分子通路,并产生大量的炎性因子,导致肺损伤的发生^[2-3],被认为是 ALI 的强劲推力^[4]。MyD88 是 TLR4 信号传导依赖的经典途径,也对 ALI 起了重要作用^[5]。

《开宝本草》中记载五倍子具有敛肺降火、涩肠止泻、收湿敛疮、敛汗止血的功效,用于肺虚久咳、肺热咳嗽等^[6]。现代药理研究表明,五倍子具有多种药理活性,包括抗病毒、广谱抑菌、抗肿瘤、清除自由基抗氧化等^[7]。我们前期研究发现,五倍子能抑制呼吸道合胞病毒诱导的人支气管上皮细胞凋亡,降低病毒的复制^[8];抑制流感病毒神经氨酸酶的活性,通过控制病毒感染力^[9],降低肺指数,减轻肺部炎症等方式发挥抗流感病毒作用^[10]。同时,本研究旨在探索 TLR4 在流感病毒所致小鼠 ALI 中的作用,进一步探讨五倍子酯提取物抗流感病毒的干预机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级野生型 C57BL 小鼠,共 48 只,雌雄各半,体质量 18~20 g,小鼠及饲料、垫料均由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。动物许可证:SYXK(湘)2013-0005。

1.2 流感病毒株

A 型流感病毒小鼠肺适应株(A/PR/8/34),由湖南师范大学病毒研究室惠赠,本实验室-75℃冰箱保存。复苏后经 10 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,血凝效价 1:640 以上者供实验用。将病毒尿囊液以灭菌生理盐水作 50 倍稀释。

1.3 药物制备

五倍子购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。取五倍子 1 kg 粉碎,以 5 倍量乙醇回流提取,提取物浓缩后先后以石油醚、氯仿、乙酸乙酯萃取,其中乙酸乙酯萃取液浓缩后得五倍子乙酸乙酯浸膏,干燥研成粉末避光冷藏,经计算提取率为 10.65%。磷酸奥司他韦胶囊(宜昌长江药业有限公司,75 mg/粒)购自湖南省人民医院门诊药房。五倍子每日人临床剂量为 6 g,动物给药剂量按动物每公斤体质量占人体面积的比值计算^[11],五倍子临床等效剂量为 0.865 g/kg,五倍子酯提取物率为 10.65%,即五倍子酯提取物的临床等效剂量为 0.092 g/kg。用生理盐水配制临床等效剂量的阳性药物奥司他韦水溶液 21.63 mg/kg。

1.4 主要试剂及设备

超净工作台(Thermo);SDS-PAGE 电泳、转膜设备(Bio-Rad);ELX800 酶标仪(Bio-tek);TLR4、MyD88、TRAF6 兔多克隆抗体(Proteintech);普通光学显微镜(Olympus);HRP 标记的羊抗兔 IgG(Proteintech);4%多聚甲醛、IL-6 和 IL-10 ELISA 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及干预

将 48 只 C57BL 小鼠适应性喂养 2 d,按随机数字表法分为正常组(Sham)12 只和造模组 36 只。模型制备方法为:小鼠在吸入乙醚轻度麻醉的状态下,用 1 mL 注射器抽吸流感病毒液 0.15 mL 行鼻腔接种。正常组于相同条件下隔离饲养,并按同样方法鼻腔接种生理盐水 0.15 mL。造模后随机分为模型组(Model)、五倍子酯提取物组(Wbz)、奥司他韦组(Oseltamivir)各 12 只。造模当天为第 0 天,第 1 天开始第 1 次给药,每天 1 次,每次 0.4 mL,共给药 6 d。五倍子酯提取物组予五倍子酯提取物水溶液(0.092 g/kg),奥司他韦组予奥司他韦水溶液(21.63 mg/kg),正常组与模型组予等容量生理盐水。

2.2 检测指标及鉴定模型

各组分别于第2、4、6天给药后随机处理动物,每次4只,取肺泡灌洗液及肺组织进行指标检测。观察小鼠感染病毒后日常活动状态、肺解剖标本、肺病理切片并检测肺泡灌洗液内炎性因子含量及TLR4、MyD88、TRAF6蛋白表达情况。

2.2.1 小鼠活动状态及肺组织解剖学观察 每天观察各组小鼠活动状态,对小鼠肺进行大体解剖学观察并拍照记录。

2.2.2 ELISA法检测肺泡灌洗液中炎性因子的含量 用10%水合氯醛麻醉小鼠,切开颈部皮肤,暴露气管,在第2~3气管环处用手术刀片挑开一小“一”字形切口,插入清洁灌胃针头,结扎固定,连续2次用PBS缓冲液1.5 mL灌洗肺部,收集支气管肺泡灌洗液约2 mL,1 000 r/min离心15 min,取上清液保存于-20℃冰箱。用ELISA法检测各组肺泡灌洗液中IL-6、IL-10的含量。检测程序及方法按照ELISA试剂盒说明书进行。

2.2.3 HE检测小鼠肺部炎症情况 超净工作台上摘取肺组织,切成0.5 cm³大小,4%多聚甲醛固定、脱水、透明、石蜡包埋切片,5 μm厚切片,经苏木精和伊红染色、中性树胶封片。光学显微镜下观察肺组织病理改变。

2.2.4 Western blot法定量检测肺组织中TLR4、MyD88、TRAF6蛋白表达情况 分别提取各组小鼠肺组织总蛋白。取50 μg总蛋白100℃水浴10 min变性后,进行SDS-PAGE电泳,转膜,封闭处理1 h,加入一抗(TLR4、MyD88、TRAF6兔多克隆抗体,1:1 000),4℃孵育过夜,PBS清洗5 min×3次,加二抗(HRP标记的羊抗兔,1:3 000)室温孵育1 h,PBS清洗5 min×3次,暗室加ECL化学发光剂压片,显影、定影后扫描X胶片。采用Image-Pro Plus图像分析系统分析数据,目的蛋白的表达水平以目的蛋白条带灰度值比β-actin条带灰度值反映。

2.3 统计分析

采用SPSS 19.0统计软件进行分析处理,所有资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。显著性比较用ANOVA分析,组间比较应用LSD多重分析法。显著性以 $P<0.05$ 判定。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况和大体解剖学观察

与正常组相比,模型组小鼠在第2天后逐渐表现出精神沉郁,活动减少,食欲下降,耸毛,毛发杂乱,呼吸急促,鼻部流出有少许水样分泌物,个别出现异常兴奋,狂躁,攻击性增强等状态。与模型组比较,五倍子酯提取物组小鼠精神较好,毛发光泽,活动、呼吸及饮食情况基本正常。第6天小鼠剖检,从大体解剖学上见,除正常组外,其余各组小鼠肺组织可见明显水肿、出血、瘀血等现象(箭头所示),其中五倍子酯提取物组小鼠肺组织的水肿、出血明显轻于模型组;说明五倍子酯提取物在一定程度上减轻了ALI严重程度。见图1。

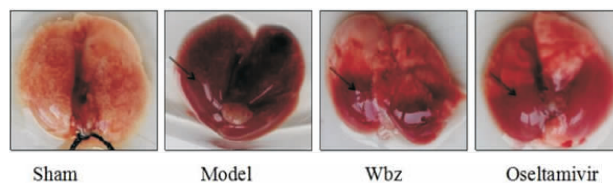


图1 各组小鼠肺组织大体解剖学观察

3.2 各组小鼠肺泡灌洗液中IL-6、IL-10水平比较

由表1-2可知:模型组小鼠肺泡灌洗液中IL-6和IL-10含量明显升高,与正常组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),第4天达到炎症高峰。第4天药物组小鼠肺组织中IL-6和IL-10表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表1 各组小鼠肺泡灌洗液中IL-6水平的比较

组别	$(\bar{x}\pm s, n=4, \text{pg/mL})$		
	第2天	第4天	第6天
正常组	22.431±0.870	21.806±0.865	22.426±1.306
模型组	31.456±2.776 ^{△△}	38.900±3.989 ^{△△}	37.257±3.412 ^{△△}
五倍子酯提取物组	24.081±1.260**	29.402±1.698**	24.423±0.951**
奥司他韦组	23.732±1.230**	26.979±1.854**	26.490±1.765**
<i>F</i> 值	23.082	34.566	40.335
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$

3.3 各组小鼠肺组织病理观察

由图2可知:正常组小鼠第2、4、6天小鼠肺组织未见明显变化。模型组小鼠第2天后可见支气管

表 2 各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-10 水平的比较 ($\bar{x}\pm s, n=4, \text{pg/mL}$)

组别	第 2 天	第 4 天	第 6 天
正常组	89.563±5.602	92.641±5.638	90.859±5.683
模型组	232.728±12.326 ^{△△}	373.581±10.010 ^{△△}	289.266±9.102 ^{△△}
五倍子酯提取物组	164.518±7.639**	191.168±8.956**	165.145±8.204**
奥司他韦组	179.872±5.904**	225.739±9.715**	191.856±13.532**
F 值	202.350	707.469	294.317
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$

上皮部分脱落,管壁水肿,管壁有以淋巴细胞、浆细胞为主的炎细胞浸润,管腔内可见大量脱落的组织、细胞及渗出物;第 4 天后,肺泡间质水肿、增厚、肺泡腔变小,内有大量炎细胞浸润,出现间质性肺炎病变,支气管壁扩张充血;第 6 天后,大量的炎细胞浸润,病变扩大,炎症进一步发展(图 2 箭头所示)。五倍子酯提组与模型组相比,表现为相同的病理学变化,间质水肿、炎细胞浸润、间质性肺炎等变化,但相应损伤程度较小。

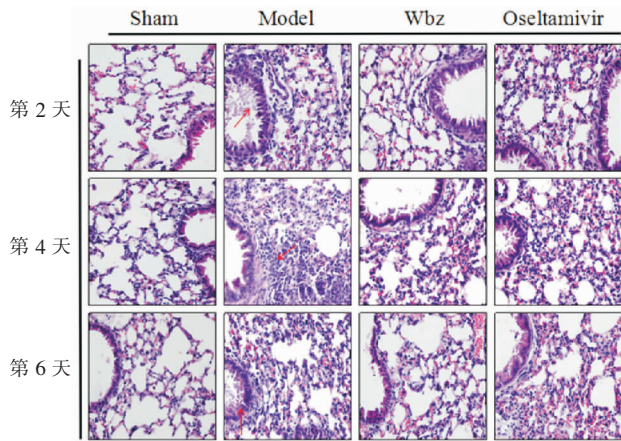


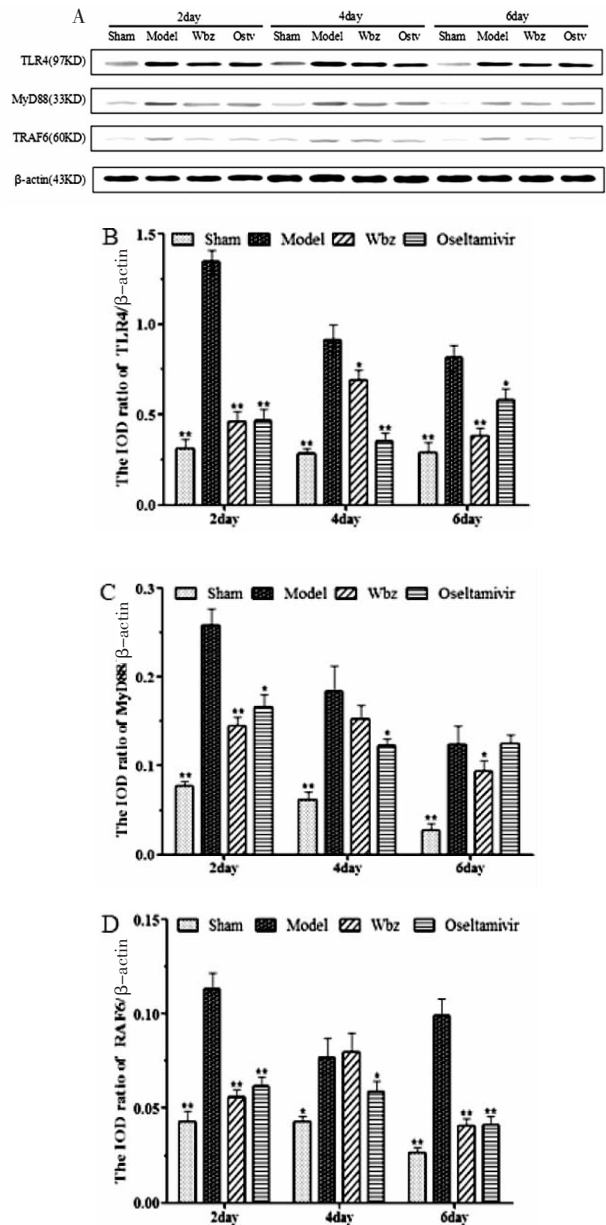
图 2 各组小鼠肺组织病理观察光镜图(HE 染色,×400)

3.4 各组小鼠 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达情况

由图 3 可知:正常组可以检测到少量的 TLR4、MyD88、TRAF6 的蛋白表达。模型组 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达最强,提示流感病毒感染后 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路被激活。五倍子酯提取物组和奥司他韦组 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达均低于模型组。其中奥司他韦组 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达最低。

4 讨论

TLR4 信号通路是炎症反应过程中的关键,也



注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。A.Western blot 实验电泳图像;B.TLR4/ β -actin 的灰度比值;C.MyD88/ β -actin 的灰度比值;D.TRAF6/ β -actin 的灰度比值

图 3 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达情况

是流感病毒感染时机体时被激活的重要信号通路之一。其基本过程是^[5,12-13]:流感病毒感染时,Toll 样受体识别并结合病毒蛋白或核酸,受体发生构象变化形成异源或同源二聚体,与 MyD88 结合,依次激活下游信号分子,如白介素受体相关激酶、肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF6),TRAF6 可使 NF- κ B 活化,促进基因转录,调控产生众多细胞因子(如 IL-6、IL-10、TNF- α 、IL-1 β 等),启动促炎与抗炎性反应,同时也造成了组织损伤。临床研究发现^[14],ALI 患者血清中的 IL-6 水平增高,且与多器官功能衰竭的发病机制密切相关。在肺损伤的动物模型中,L-

10的含量升高,抑制某些炎症因子的产生。

本研究结果表明,流感病毒感染模型组小鼠后,小鼠肺组织严重损伤,肺泡灌洗液中炎症因子IL-6和IL-10含量升高,肺组织中TLR4、MyD88、TRAF6的蛋白表达水平显著升高,且成时间相关性。本研究结果证实TLR4在流感病毒诱导的ALI发病机制中有着重要的作用,其可能的机制是流感病毒激活TLR4下游的MyD88依赖的信号通路,激活TRAF6,促进基因转录,调控IL-6、IL-10等炎症因子释放,因子与因子、因子与组织之间相互作用造成肺部炎症,推动ALI发生。与模型组相比,五倍子酯提物组小鼠肺组织受损较轻,肺泡灌洗液中IL-6和IL-10的释放减少,TLR4、MyD88、TRAF6的蛋白表达水平下调。提示五倍子酯提物可通过抑制TLR4的活化及下游MyD88依赖的转导路径,减少炎症因子的转录生成,减轻肺部炎症,减缓ALI进程。综上所述,TLR4在A型流感病毒诱导的ALI起了重要作用。五倍子酯提物能降低TLR4的活化,抑制下游MyD88依赖的转导路径,减少炎症因子的释放,减缓ALI进程,发挥抗病毒作用。

值得注意的是,奥司他韦对流感病毒感染小鼠后导致的急性肺损伤在第2、3天干预效果明显,可能是奥司他韦对流感病毒神经氨酸酶特异性靶点治疗发挥了重要作用。而五倍子酯提物在第5、6天效果明显,是否是五倍子酯提物在时效关系的作用下发挥对机体有宏观调控或多靶点治疗作用,值得进一步探究。

参考文献:

- [1] KORTEWEG C. GUJ. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans[J]. The American Journal of Pathology, 2008,172(5):1150-1170.
- [2] SALOMON R, HOFFMANN E, WEBSTER R G. Inhibition of

the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(30):12479-12481.

- [3] IMAI Y, KUBA K, NEELY G G, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury[J]. Cell, 2008,133(2):235-249.
- [4] OPITZ B, VAN LAAK V, EITEL J, et al. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(12): 1294-1309.
- [5] MARCHANT D, SINGHERA G K, UTOKAPARCH S, et al. Toll like receptor 4 mediated p38 mitogen activated protein kinase activation is a determinant of respiratory virus entry and tropism [J]. JVirol, 2010,84(21):11359-11373.
- [6] 江苏新医学院.中药大辞典(上)[M].上海:上海科技出版社,1986:391-392.
- [7] 韩建军,宁娜.五倍子药理作用的研究进展[J].淮海医药,2015,33(4):415-416.
- [8] 李玲,吴东升,刘璐,等.五倍子含药血清对呼吸合胞病毒感染人支气管上皮细胞损伤及NF- κ B核转位和表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(12):790-793.
- [9] 张波,周芳亮,卢芳国,等.96种中药材流感病毒神经氨酸酶活性的影响[J].中华中医药杂志,2014,29(9):100-103.
- [10] 李玲,丁煌,吴东升,等.三种有效中药对A型流感病毒感染小鼠肺部炎症的干预作用[J].时珍国医国药,2015,26(5):1038-1040.
- [11] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1997:1103.
- [12] CARMODY R J, CHEN Y H. Nuclear factor- κ B: activation and regulation during toll-like receptor signaling [J]. Cell Mol Immunol, 2007,4(1):31-41.
- [13] FITZGERALD K A, PALSSON-MCDERMOTT E M, BOWIE A G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction[J]. Nature, 2001,413(6851):78-83.
- [14] STEINBERG J, HALTER J, SCHILLERH, et al. Chemically modified tetracycline prevents the development of septic shock and acute respiratory distress syndrome in a clinically applicable porcine model [J]. Shock, 2005,24(4):348-356.

(本文编辑 杨瑛)