

本文引用:左胜男,伍参荣,陈超龙,刘碧源,申可佳,谭晓凤,蔡锐,李珊.七味白术散对轮状病毒感染乳鼠小肠 iEL CD3⁺T 细胞核内抗病毒蛋白表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(2):178-183.

七味白术散对轮状病毒感染乳鼠小肠 iEL CD3⁺T 细胞核内抗病毒蛋白表达的影响

左胜男^{1,2},伍参荣^{1*},陈超龙¹,刘碧源¹,申可佳¹,谭晓凤¹,蔡锐¹,李珊¹

(1.湖南中医药大学医学院免疫学教研室,湖南长沙 410208;2.湖南光琇医院检验科,湖南长沙 410000)

〔摘要〕目的 探讨七味白术散对轮状病毒(human rotavirus, HRV)感染乳鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞(iEL) CD3⁺T 细胞核内抗病毒蛋白表达的影响,进一步阐明该方抗 HRV 机制。**方法** 选取 5 日龄 NIH 乳鼠 168 只,随机分为 7 组,正常对照组(N 组)常规喂养,其余各组建立 HRV 腹泻模型,并分别灌服生理盐水(M 组)、七味白术散(B 组)、病毒唑(Z 组)、抑制剂(Y 组)、七味白术散加抑制剂(BY 组)、病毒唑加抑制剂(ZY 组);分别于用药后 32、40、48 h 取各组乳鼠小肠黏膜,采用 Western blotting 方法测定小肠 iEL CD3⁺T 细胞核中双链 RNA 依赖的蛋白质激酶(PKR)、真核翻译起始子 2 的 α 亚基(eIF-2 α)、2',5'-寡腺苷酸合成酶(OAS)、RNA 酶 L(RNaseL)蛋白的表达。**结果** B 组乳鼠小肠黏膜 iEL 胞核中 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白表达 48 h 时明显高于 N 组、M 组、Y 组、BY 组、ZY 组以及 Z 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 七味白术散能促进感染乳鼠小肠黏膜 iEL CD3⁺T 细胞核中抗病毒蛋白 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 的表达,从而实现对 HRV 的清除作用。

〔关键词〕 七味白术散;轮状病毒;抗病毒蛋白;PKR; eIF-2 α

〔中图分类号〕 R289.3

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.007

Effect of Qiwei Baizhu Powder on the Intranuclear Expression of Antiviral Proteins in Small Intestinal iEL CD3⁺ T Cells in HRV-Infected Neonatal Mice

ZUO Shengnan^{1,2}, WU Canrong^{1*}, CHEN Chaolong¹, LIU Biyuan¹, SHEN Kejia¹, TAN Xiaofeng¹, CAI Rui¹, LI Shan¹

(1. Department of Immunology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hunan Guangxiu Hospital, Changsha, Hunan 410000, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the effect of Qiwei Baizhu Powder on the intranuclear expression of antiviral proteins in small intestinal intraepithelial lymphocyte (iEL) CD3⁺ T cells in human rotavirus (HRV)-infected neonatal mice, and to further elucidate its anti-HRV mechanism. **Methods** A total of 168 neonatal NIH mice aged 5 days were selected and randomly divided into seven groups. The normal control group (group N) was fed normally, while the mice in the other groups were treated to establish a model of HRV-induced diarrhea, and then were gavaged with normal saline (group M), Qiwei Baizhu Powder (group B), virazole (group Z), inhibitor (group Y), Qiwei Baizhu Powder plus inhibitor (group BY), and virazole plus inhibitor (group ZY), respectively. The small intestinal mucosa was taken from the neonatal mice in each group at 32, 40, and 48 hours after treatment, and the intranuclear expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase R (PKR), α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF-2 α), 2',5'-oligoadenylate synthetase (OAS), and ribonuclease L (RNaseL) in small intestinal iEL CD3⁺ T cells was determined by Western blot. **Results** The intranuclear expression of PKR, eIF-2 α , OAS, RNaseL in small intestinal iELs was obviously higher than those in groups N, M, Y, BY, ZY and Z at 48 h, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Qiwei Baizhu Powder can enhance the intranuclear expression of antiviral proteins, PKR, eIF-2 α , OAS, and RNaseL, in small intestinal iEL CD3⁺ T cells in HRV-infected neonatal mice, thus eliminating the HRV.

〔Keywords〕 Qiwei Baizhu Powder; human rotavirus; antiviral protein; protein kinase R; α subunit of eukaryotic initiation factor 2

〔收稿日期〕 2018-02-26

〔基金项目〕 国家自然科学基金青年基金项目(30772874);国家自然科学基金面上项目(81273990、81573811)。

〔作者简介〕 左胜男,女,硕士,中级检验师,研究方向:中草药复方防治病毒性腹泻。

〔通讯作者〕 *伍参荣,女,教授,博士研究生导师,E-mail:2370715304@qq.com。

轮状病毒(human rotavirus, HRV)是导致5岁以下婴幼儿急性腹泻和死亡的重要病原体,全世界每年大约50万儿童死于该疾病^[1],如何防治轮状病毒感染性腹泻也成为当前医学研究的热点。目前对于轮状病毒肠炎尚无特效治疗药物^[2],中药复方七味白术散(人参、白术、茯苓、甘草、葛根、藿香、木香)源自宋朝钱乙《小儿药证直诀》,是治疗小儿腹泻的经典方剂^[3]。临床和实验研究均表明,其对轮状病毒引起的腹泻有很好的治疗作用^[4-9]。

抗病毒蛋白(AVP)是由干扰素(IFN)通过JAK/STAT信号转导途径与相应的受体结合,激活信号级联反应诱导产生的。AVP包括双链RNA依赖的蛋白激酶(PKR)、2',5'-寡腺苷酸合成酶(OAS)、Mx蛋白等。其中最主要的是PKR和OAS:活化的PKR作用于真核细胞翻译起始子2的 α 亚基(eIF-2 α),使之磷酸化,从而使病毒肽链的合成受阻^[10-13];OAS能够活化RNA酶L(RNaseL),降解病毒mRNA^[14]。

前期研究已经从基因表达的水平证实了七味白术散能增强HRV感染乳鼠小肠黏膜上皮内淋巴细胞(iEL)IFN- γ 及IFN- γ R mRNA表达水平,本实验通过观察其对HRV感染乳鼠小肠iEL CD3⁺T细胞核内AVP表达的影响,进一步为该药治疗HRV感染提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

取5日C57BL/6乳鼠168只,由湖南中医药大学医学实验动物中心集体购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号SYXK(湘)2013-0005。小鼠购回后置消毒鼠盒中饲养,消毒牛奶人工喂养,保持室温20~25℃。

1.2 药物

七味白术散(组成:人参7.5g,白术15g,茯苓15g,葛根15g,藿香15g,木香6g,甘草3g)药材均购自湖南中医学院中医门诊部医林药号。用自来水-单蒸水-双蒸水分别洗3次,放入三角瓶中,加4倍体积的三蒸水浸泡2h(人参另泡另煎),煎2次,每次煎30min。去渣,两煎液混合,G4滤器过滤,于60℃水浴中浓缩成每毫升含原生药1g的药液,密封,隔水煮沸消毒;病毒唑,天津药业焦作

有限公司,批号:10060112,给药前用生理盐水稀释成1.4mg/mL;蛋白酪氨酸激酶抑制剂Genistein:给药前用DMSO溶解后用生理盐水稀释成5mg/mL。

1.3 细胞与病毒

MA104细胞,人轮状病毒HRV(Wa株)由中国科学院预防医学中心段昭军教授赠送。MA104细胞主要用于HRV(Wa株)扩增,扩增后的病毒保存于液氮,供实验造模用。

1.4 试剂及仪器

HRV抗原ELISA试剂盒(武汉博士德公司);NE-PER胞质胞核提取试剂盒(美国PIERCE公司);蛋白定量试剂盒(Thermo,USA.);兔抗小鼠PKR、eIF-2 α 和羊抗小鼠OAS、RNaseL(Santa Cruz公司);小鼠 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的相应二抗(羊抗兔IgG、兔抗羊IgG)(康为公司),ECL显色液。凝胶电泳仪(DYY-III型,北京六一仪器厂),转移电泳槽(VE-186,上海天能)。

1.5 HRV感染乳鼠模型的制备与分组

将168只乳鼠随机抽出24只乳鼠作为正常对照组(N组),其余乳鼠参照文献[8]经口感染,50 μ L/只(浓度100TCID₅₀/100 μ L)HRV悬液,N组乳鼠滴入等量细胞生长维持液。HRV感染24h后,造模组乳鼠均出现不同程度的腹泻,肛周有大便污染痕迹。收集乳鼠粪便,用鼠轮状病毒抗原ELISA试剂盒(上海一基实业有限公司产品)检测粪便中HRV抗原,拟确定造模成功。

造模成功后的乳鼠,再按随机数字法,将造模成功的乳鼠分为HRV腹泻模型,并分别灌服生理盐水(M组)、七味白术散(B组)、病毒唑(Z组)、抑制剂(Y组)、七味白术散加抑制剂(BY组)、病毒唑加抑制剂(ZY组),每组24只,加上N组(给予生理盐水)共7组,分别于造模给药后的32、40、48h处死乳鼠取小肠组织以及小肠淋巴细胞检测抗病毒蛋白。每个时间段检测分析8只乳鼠。

1.6 标本采集

分别在给药后32、40、48h3个时间点断头处死各组乳鼠后,立即取出回盲部至幽门的全部小肠,剥离去除肠系膜和脂肪组织,用Hanks液漂洗。

1.7 CD3⁺T淋巴细胞的分离

按文献[15]方法将小肠经Hanks液漂洗后,切

成 1 cm 的片段,加入 15 mL 含 2% FCS 的 RPMI-1640 液,置 37 °C 水浴震荡 30 min,取出后再用力震荡 15 s,静置 2 min,待肠片下沉,收集所有液体,用 150 目钢网过滤 2 次,收集滤液,将滤液装入事先制好的尼龙毛柱中流过,收集所有滤过的液体,浓缩制成 2×10^7 个/mL 的单细胞悬液,将此单细胞悬液于 4 °C $80 \times g$ 离心 5 min 以去除杂质,再经 45% 和 70% Percoll 制成的梯度分离液离心 $90 \times g$,25 °C 20 min,收集 45% 与 70% 界面层细胞,用含 5% FCS 的 RPMI-1640 洗 3 次,过免疫磁珠,分离出 CD3⁺T 淋巴细胞,备用。

1.8 Western blotting 方法测定 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白含量

操作步骤:(1) 按试剂盒说明抽提 CD3⁺T 淋巴细胞胞核中的蛋白质;(2)按试剂盒的说明对抽提出的胞核蛋白定量;(3) 配制 12% 分离胶,4% 的浓缩胶,上样,120V 下电泳 2 h,至溴酚兰迁移到分离胶底部;(4)转膜,60V 转移 2 h;(5)5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,加入相应的一抗(抗 PKR 多抗 1:500,抗 eIF-2 α 多抗 1:500,抗 OAS 多抗 1:500,抗 RNaseL 多抗 1:500)室温孵育 2 h,TBS 洗 3 次,加入二抗(羊抗兔 IgG、兔抗羊 IgG,用量 1:500)室温 2 h,TBS 洗 3 次;(6)DAB 室温显色 1~5 min,仪器扫描保存结果;(7)用凝胶图像分析软件 Gel-Pro analyzer 4.0 对目标带的分子量和净光密度值进行分析,以 β -actin 作为内参,以目标蛋白与 β -actin 的 IOD(累计光密度)比值计算蛋白相对表达量。

1.9 免疫组化测定 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白表达

操作步骤:(1) 新鲜小肠样本固定于甲醛溶液中;(2)石蜡包埋小肠样本并切片;(3)石蜡切片置于 67 °C 烘箱中,烘片 2 h,脱蜡后加 3% H₂O₂,室温下孵育 10 min;(4) 一抗室温孵育 2 h;(5) 二抗孵育 30 min;(6)DAB 液(二氨基联苯胺),显微镜下观察 5 min;(7)苏木素复染,0.1% HCl 分化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂封固,晾干后拍照观察分析。

1.10 统计学方法

本实验中测得指标均为计量指标,用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析,组间比较用

方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳鼠小肠黏膜组织 iEL CD3⁺T 细胞核中 PKR 蛋白表达

表 1 和图 1 结果提示 B 组 PKR 蛋白表达随时间变化,32 h 后逐渐升高,40 h 达到顶峰,48 h 下降 ($P < 0.05$);B 组 PKR 蛋白表达均高于 Z 组 ($P < 0.05$)。BY 组 PKR 蛋白表达高于 Y 组和 M 组 ($P < 0.05$);Y 组低于 M 组 ($P < 0.05$)。ZY 组的 32 h PKR 蛋白高于 M 组 ($P < 0.05$);而 40 h、48 h PKR 蛋白与 M 组比较无统计学意义 ($P < 0.05$)。

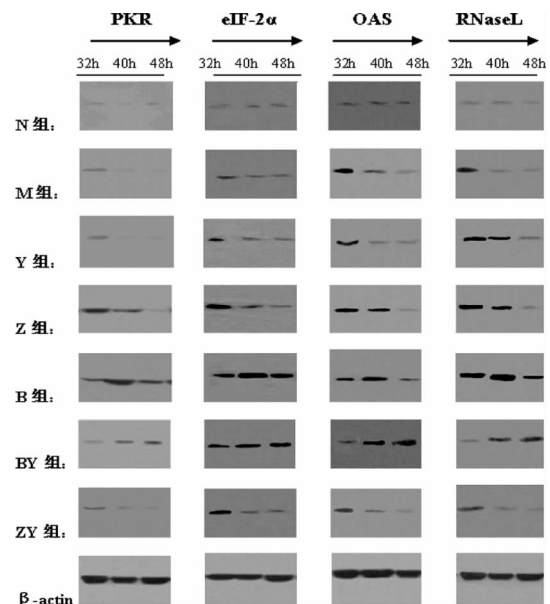


图 1 各组乳鼠小肠黏膜 iEL CD3⁺T 细胞核内抗病毒蛋白表达

表 1 各组乳鼠小肠黏膜 iEL CD3⁺T 细胞核内 PKR 蛋白与 β -actin 的相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	32 h	40 h	48 h	F 值	P 值
N 组	0.28±0.03	0.29±0.02	0.29±0.01	2.01	>0.05
M 组	0.36±0.02*	0.32±0.04*	0.30±0.02*	1.89	>0.05
B 组	0.41±0.03**▲	0.52±0.03**▲	0.45±0.02**▲	19.32	<0.05
Z 组	0.42±0.02**△	0.35±0.02**△	0.32±0.01**△	10.13	<0.05
Y 组	0.34±0.02**△▲	0.29±0.03**△▲	0.29±0.04**△▲	7.41	<0.05
BY 组	0.34±0.02**△▲	0.39±0.03**△▲	0.45±0.02**△▲	10.17	<0.05
ZY 组	0.37±0.02**△▲	0.32±0.01**△▲	0.30±0.03**△▲	10.03	<0.05
F 值	13.17	16.24	11.50		
P 值	<0.05	<0.05	<0.05		

注:与 N 组比较,* $P < 0.05$;与 M 组比较,# $P < 0.05$;与 B 组比较,△ $P < 0.05$;与 Z 组比较,▲ $P < 0.05$

2.2 乳鼠小肠黏膜组织 iEL CD3⁺T 细胞核中 eIF-2 α 蛋白表达

从表 2 和图 1 结果可以看出 HRV 感染后的不同时间乳鼠 iELCD3⁺T 细胞核中 eIF-2 α 蛋白相对表达量有统计学意义 ($P<0.05$)。B 组乳鼠小肠黏膜 iEL 细胞核中 eIF-2 α 蛋白表达明显高于 N 组、M 组、Y 组、BY 组和 ZY 组 ($P<0.05$); B 组 eIF-2 α 蛋白表达量用药 32 h 后逐渐升高, 40 h 达顶峰, 48 h 下降, 3 个时间点比较有统计学意义 ($P<0.05$)。B 组与 Z 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); Z 组各时间点 eIF-2 α 蛋白表达与 B 组比较 ($P<0.05$)。BY 组 eIF-2 α 蛋白表达高于 Y 组和 M 组 ($P<0.05$); Y 组、ZY 组各时间点 eIF-2 α 蛋白表达均低于 M 组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 各组乳鼠小肠黏膜 iELCD3⁺T 细胞核内 eIF-2 α 蛋白与 β -actin 的相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	32 h	40 h	48 h	F 值	P 值
N 组	0.29 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	2.42	>0.05
M 组	0.37 \pm 0.02*	0.33 \pm 0.04*	0.32 \pm 0.02*	2.84	>0.05
B 组	0.38 \pm 0.03*#	0.53 \pm 0.03*#	0.43 \pm 0.02*#	21.36	<0.05
Z 组	0.43 \pm 0.01*# Δ	0.34 \pm 0.02*# Δ	0.32 \pm 0.02*# Δ	9.87	<0.05
Y 组	0.35 \pm 0.01*# Δ	0.29 \pm 0.02*# Δ	0.28 \pm 0.03*# Δ	7.91	<0.05
BY 组	0.34 \pm 0.02*# Δ	0.40 \pm 0.03*# Δ	0.47 \pm 0.02*# Δ	13.75	<0.05
ZY 组	0.37 \pm 0.02*# Δ	0.32 \pm 0.03*# Δ	0.31 \pm 0.02*# Δ	8.79	<0.05
F 值	20.31	14.56	14.37		
P 值	<0.05	<0.05	<0.05		

注:与 N 组比较, * $P<0.05$; 与 M 组比较, # $P<0.05$; 与 B 组比较 $\Delta P<0.05$; 与 Z 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

2.3 乳鼠小肠黏膜组织 iEL CD3⁺T 细胞核中 OAS 蛋白表达

表 3 和图 1 结果可以看出不同时间点 HRV 感染乳鼠 iELCD3⁺T 细胞核中 OAS 蛋白相对表达量差异有统计学意义 ($P<0.05$)。B 组乳鼠小肠黏膜 iEL 细胞核中各时间点 OAS 蛋白表达均明显高于 N 组、M 组、Y 组、BY 组和 ZY 组 ($P<0.05$); B 组乳鼠 OAS 蛋白表达随时间变化逐渐升高, 40 h 达到顶峰, 48 h 下降 ($P<0.05$); B 组 OAS 蛋白表达与 Z 组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。BY 组 OAS 蛋白表达高于 Y 组和 M 组 ($P<0.05$); 40 h、48 h Y 组、ZY 组 OAS 蛋白表达分别与 M 组比较差别无统计学意义 ($P<0.05$)。

2.4 乳鼠小肠黏膜组织 iEL CD3⁺T 细胞核中 RNaseL 蛋白表达

表 4 和图 1 各组不同时间点 HRV 感染乳鼠

表 3 各组乳鼠小肠黏膜 iEL CD3⁺T 细胞核内 OAS 蛋白与 β -actin 的相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	32 h	40 h	40 h	F 值	P 值
N 组	0.31 \pm 0.03	0.30 \pm 0.01	0.29 \pm 0.01	2.37	>0.05
M 组	0.36 \pm 0.02*	0.33 \pm 0.04*	0.30 \pm 0.02*	8.21	<0.05
B 组	0.42 \pm 0.03*#	0.52 \pm 0.03*#	0.37 \pm 0.01*#	18.42	<0.05
Z 组	0.42 \pm 0.02*# \blacklozenge	0.35 \pm 0.01*# \blacklozenge	0.32 \pm 0.01*# \blacklozenge	11.67	<0.05
Y 组	0.38 \pm 0.02*# \blacktriangle	0.32 \pm 0.03*# \blacktriangle	0.31 \pm 0.04*# \blacktriangle	9.73	<0.05
BY 组	0.32 \pm 0.02*# \blacktriangle	0.36 \pm 0.03*# \blacktriangle	0.44 \pm 0.01*# \blacktriangle	12.24	<0.05
ZY 组	0.38 \pm 0.01*# \blacktriangle	0.31 \pm 0.01*# \blacktriangle	0.30 \pm 0.03*# \blacktriangle	9.76	<0.05
F 值	16.77	14.20	14.37		
P 值	<0.05	<0.05	<0.05		

注:与 N 组比较, * $P<0.05$; 与 M 组比较, # $P<0.05$; \blacklozenge 与 B 组比较, $P<0.05$; \blacktriangle 与 Z 组比较 $P<0.05$

iEL CD3⁺T 细胞核中 RNaseL 蛋白相对表达量有统计学意义 ($P<0.05$)。B 组乳鼠小肠黏膜 iEL 细胞核中各时间点 RNaseL 蛋白表达均明显高于 N 组、M 组、Y 组、BY 组和 ZY 组 ($P<0.05$); B 组 RNaseL 蛋白表达随时间变化, 32 h 后逐渐升高, 40 h 达到顶峰, 48 h 下降 ($P<0.05$); 32 h 时, B 组与 Z 组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 40、48 h 时, B 组 RNaseL 蛋白表达均高于 Z 组 ($P<0.05$)。BY 组 RNaseL 蛋白表达高于 Y 组和 M 组 ($P<0.05$); Y 组 RNaseL 蛋白表达高于 ZY 组 ($P<0.05$); 40、48 h ZY 组与 M 组比较差别无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组乳鼠小肠黏膜 iEL 核内 RNaseL 蛋白与 β -actin 的相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	32 h	40 h	48 h	F 值	P 值
N 组	0.32 \pm 0.02	0.31 \pm 0.02	0.33 \pm 0.01	2.57	>0.05
M 组	0.36 \pm 0.02*	0.33 \pm 0.03*	0.30 \pm 0.01*	8.84	<0.05
B 组	0.43 \pm 0.03*#	0.53 \pm 0.03*#	0.45 \pm 0.01*#	20.89	<0.05
Z 组	0.46 \pm 0.01*# Δ	0.37 \pm 0.02*# Δ	0.33 \pm 0.04*# Δ	12.21	<0.05
Y 组	0.39 \pm 0.02*# Δ	0.35 \pm 0.03*# Δ	0.32 \pm 0.04*# Δ	11.24	<0.05
BY 组	0.33 \pm 0.02*# Δ	0.35 \pm 0.04*# Δ	0.43 \pm 0.03*# Δ	15.82	<0.05
ZY 组	0.40 \pm 0.02*# Δ	0.33 \pm 0.03*# Δ	0.31 \pm 0.01*# Δ	9.09	<0.05
F 值	10.93	15.25	17.18		
P 值	<0.05	<0.05	<0.05		

注:与 N 组比较, * $P<0.05$; 与 M 组比较, # $P<0.05$; 与 B 组比较, $\Delta P<0.05$; 与 Z 组比较, $\blacktriangle P<0.05$

2.5 免疫组化观察乳鼠小肠组织 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白表达

图 2 结果表明, 40 h 时, M 组小鼠其小肠组织 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白表达与 N 组相比不明显。B 组小鼠其小肠组织 PKR、eIF-2 α 、OAS、

RNaseL 蛋白表达高于 N 组, M 组和 Z 组小鼠, 免疫组化结果与 Western blotting 结果相似。

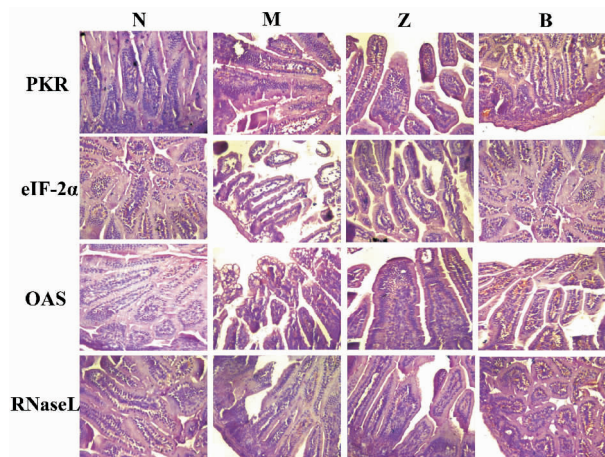


图2 轮状病毒感染 40 h 时各组乳鼠小肠 PKR、eIF-2 α 、OAS、RNaseL 蛋白表达

4 讨论

秋末冬初, 气候转冷, 小儿在“脏腑柔弱”“成而未全, 全而未壮”“脾常不足”的基础上, 感受风寒, 致脾胃功能失常, 水反为湿, 谷反为滞, 水谷并走大肠而致泄泻; “脾虚”“湿胜”为其病理基础。七味白术散原名白术散, 由人参、白茯苓、炒白术、藿香叶、木香、甘草、葛根组成, 由北宋“儿科之圣”钱乙创制。此方以人参、白术、甘草之甘温, 补胃和中; 木香、藿香辛温以助脾, 茯苓甘淡, 分阴阳, 利水湿, 葛根甘平, 倍于众药, 其气轻浮, 鼓舞胃气, 上行津液, 又解肌热, 是治脾胃虚弱泄泻之圣药。

轮状病毒是一种双链 RNA 病毒, 其主要通过诱导 TLR3 高表达, 从而激活下游炎症信号通路, 引起炎症因子释放^[16-17]。团队前期研究表明, 轮状病毒主要通过激活 TLR3 通路及下游 NF κ B 通路, 进而激活炎症反应并释放炎症因子等, 在这一过程中 TLR3 下游 MyD88 发挥关键作用^[18]。七味白术散主要通过选择性阻断 MyD88, 从而抑制下游通路, 进一步缓解轮状病毒引起的炎症因子释放。在此过程中七味白术散对 TLR3 无显著作用。在轮状病毒引起变化的诸多细胞因子中, IFN γ 被认为是一种主要的抗轮状病毒的细胞因子, 轮状病毒腹泻小儿升高的 IFN γ 水平与疾病的缓解相关^[19]。但是, 目前关于 IFN γ 介导轮状病毒引起腹泻的机制, 以及七味白术散是否对 IFN γ 下游信号蛋白产生影响等问题还尚未见报道。

DM Bass^[20]发现 IFN γ 能阻止轮状病毒侵入小

肠细胞, 并抑制其在人类小肠 Caco2 细胞的复制。IFN γ 通过 JAK-STAT 途径与相应的受体结合, 激活信号级联反应, 诱导 AVP 生成, 从而干扰病毒的感染和复制。AVP 包括 PKR、OAS、RNase L、RNA 特异性腺苷脱氨酶(ADAR)和 Mx 蛋白。其中最主要的是 PKR 和 OAS, 这两种酶的激活均需要病毒复制过程中产生的双链 RNA。PKR 是典型的干扰素诱导的抗病毒蛋白^[21], 具有调节先天免疫的作用^[22]。在绝大多数细胞中, PKR 有一定水平的基础表达, IFN 可通过 JAK-STAT 途径诱导 PKR 的转录。PKR 的氨基末端含有 2 个保守的 dsRNA 结合位点, dsRNA 能够活化 PKR, 导致 PKR 的构象改变, 激活 PKR 的激酶活性, 活化的 PKR 能够识别蛋白质合成的起始因子 eIF-2, 并使 eIF-2 的 α 亚基 51 位丝氨酸磷酸化, 磷酸化后的 eIF 失去启动蛋白质翻译过程的能力, 使病毒肽链的合成受阻^[23-24]。PKR 参与机体的抗病毒机制, 还与细胞凋亡密切相关, 其机制主要是上调 Fas 配体等 TNF 受体家族成员, 死亡信号转导分子 FADD 以及促凋亡的 Bax 分子的表达, 该作用也可通过 eIF-2 α 和 NF- κ B 介导^[25-27]。OAS 在静止细胞中低水平存在, IFN 作用时能被强烈诱导。病毒来源的 dsRNA 能够激活 OAS, OAS 在被双链 RNA 激活后, OAS 蛋白将 ATP 聚合成 pppA (2cp5cA)_n ($n=1$ 或 $n>1$) 寡聚体, 进而激活潜在的 RNaseL, RNaseL 能够降解病毒 mRNA, 因此, 抑制了以 RNA 作为中介的病毒复制^[28]。

本实验研究表明, 七味白术散能促进 HRV 感染乳鼠小肠粘膜 iEL 胞核中 IFN γ 下游 AVP 蛋白的表达。抗病毒蛋白 PKR 和 OAS 共同作用, 阻断病毒蛋白质合成并降解病毒 mRNA, 这可能是七味白术散治疗 HRV 感染性腹泻的重要机制。

参考文献

- [1] BROQUET A H, HIRATA Y, McAllister C S, et al. RIG-*I*MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(3):1618-1626.
- [2] PARASHAR UD AND GLASS RI. Rotavirus vaccines—early success, remaining questions[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360:1063-1065.
- [3] 钱乙. 小儿药证直诀(实用中医古籍丛书)[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2000:43.
- [4] HE S T, HE F Z, WU C R, et al. Treatment of rotaviral gastroenteritis with Qiwei Baizhu powder[J]. *World Journal of Gastroenterology*,

- 2001, 7(5):735-740.
- [5] 贺双腾,何飞舟,伍参荣,等.七味白术散对人轮状病毒在培养细胞内复制的抑制作用[J].中国中西医结合杂志.1995,15(11):669-671.
- [6] 贺双腾,何飞舟,伍参荣,等.七味白术散治疗轮状病毒肠炎的临床与实验研究[J].中国中西医结合杂志,1996,16(3):132-135.
- [7] 伍参荣,杨波,胡建中,等.七味白术散对人轮状病毒感染乳鼠胸腺细胞的程序性死亡和 IL-2、IL-2R 表达的影响[J].湖南中医学报,2001,21(3):8-9.
- [8] 伍参荣,谢朝晖,贺双腾.七味白术散对 HRV 感染乳鼠 NK、IFN- γ 、IL-4 的影响[J].中国中医药信息杂志,2002,9(4):23-24.
- [9] WU C R, XIAO J G, HE S T, et al. Effects of QWBZP on T-cell subsets and their cytokines in intestinal mucosa of HRV infection suckling mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 131(1):130-134.
- [10] SU Q, WANG S, BALTZIS D, et al. Tyrosine phosphorylation acts as a molecular switch to full-scale activation of the eIF2 α RNA-dependent protein kinase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(1): 63-68.
- [11] KAZEMI S, PAPAPOPOULOU S, LI S, et al. Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor2 (eIF2 α) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 α -dependent gene expression and cell death [J]. Molecular Biology of the Cell, 2004, 24(8): 3415-3429.
- [12] GOODMAN A G, SMITH J A, BALACHANDRAN S, et al. The Cellular Protein P58IPK Regulates Influenza Virus mRNA Translation and Replication through a PKR-Mediated Mechanism[J]. Journal of Virology, 2007, 81(5): 2221-2230.
- [13] ZHU R, ZHANG Y B, ZHANG Q Y, et al. Functional domains and the antiviral effect of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR from *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Virology, 2008, 82(14):6889-6901.
- [14] Sùnchez R and Mohr I. Inhibition of Cellular 2'-5' Oligoadenylate Synthetase by the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein [J]. Virology, 2007, 81(7):3455-3464.
- [15] 周正任,叶晓卉.小鼠小肠上皮内淋巴细胞的提取与抗原表型测定和功能的初步研究[J].中国免疫学杂志,2001,17(3):135-137.
- [16] BURNETT E, YEN C, TATE J E, et al. Rotavirus vaccines: current global impact and future perspectives[J]. Future Virology, 2016, 11(10): 699-708.
- [17] YANG X, TWITCHELL E, LI G, et al. High protective efficacy of rice bran against human rotavirus diarrhea via enhancing probiotic growth, gut barrier function, and innate immunity[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 15004.
- [18] WU C R, ZUO S N, SUN B Q, et al. Qi-Wei-Bai-Zhu powder improves inflammatory response via the myd88 pathway in neonatal mice infected with human rotavirus[J]. Biomedical Research, 2017, 28(20):9701-9706.
- [19] GUERRERO C A, ACOSTA O. Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. World Journal of Virology, 2016,5:38-62.
- [20] BASS D M. Interferon gamma and interleukin 1, but not interferon alfa, inhibit rotavirus entry into human intestinal cell lines[J]. Gastroenterology, 1997, 113(1): 81-89.
- [21] MCALLISTER C S, TOTH A M, ZHANG P, et al. Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus[J]. Journal of Virology, 2010, 84(1):380-386.
- [22] MINOR R A, LIMMON G V, MILLER-DEGRAFF L, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase regulates early innate immune responses during respiratory syncytial virus infection[J]. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2010, 30(4):263-272.
- [23] RYMAN K D, WHITE L J, JOHNSTON R E, et al. Effects of PKR/RNase-dependent and alternative antiviral pathways on alphavirus replication and pathogenesis[J]. Viral Immunology, 2002, 15:53-76.
- [24] VATTEM K M, STASCHKE K A, WEK R C. Mechanism of activation of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2(eIF2)[J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(13): 3674-3684.
- [25] KAUFMAN R J. Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: a new role for an old actor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999, 96(21):11693-11695.
- [26] LI S D, GREGORY A P, DING K Y, et al. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(26):10005-10010.
- [27] COUTURIER J, MOREL M, PONTCHARRAUD R. Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (A β)-treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice[J]. Journal Biological Chemistry, 2010, 285(2):1272-1282.
- [28] RICARDO SÀNCHEZ, IAN MOHR. Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein[J]. Journal of Virology, 2007, 81(7):3455-3464.