

· 论著 ·

流感病毒性肺炎小鼠自然杀伤细胞毒性相关
信号转导通路差异基因表达及两种不同治法
中药方剂的调控作用研究

卢娜娜 刘琪 顾立刚 周旭澎 吴珺 邱泽计 张洪春 晁恩祥 张沂

【摘要】 目的 观察疏风宣肺方和解表清里方对流感病毒性肺炎小鼠自然杀伤细胞(NK 细胞)毒性相关信号转导通路差异基因表达的调控作用。**方法** 将 90 只 ICR 小鼠按随机数字表法分为对照(N)组、模型(M)组、奥司他韦(C)组以及中药疏风宣肺方高、中、低剂量(SH、SM、SL)组和解表清里方高、中、低剂量(JH、JM、JL)组,每组 10 只。采用流感病毒亚甲型鼠肺适应株 FM1 滴鼻感染方法制备流感病毒性肺炎模型;N 组以 0.05 ml 等渗盐水滴鼻。于制模后 2 h, C 组给予奥司他韦 $11.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;SH、SM、SL 组给予疏风宣肺方(主要药物金银花、连翘、板蓝根等) 3.76 、 1.88 、 $0.94 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;JH、JM、JL 组给予解表清里方(主要药物麻黄、石膏、生甘草等) 4.36 、 2.18 、 $1.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;N 组及 M 组则灌胃等量生理盐水;各组均 0.2 ml/d, 连用 4 d。提取肺组织总 RNA, 采用基因芯片筛选出 NK 细胞毒性信号转导通路相关的差异表达基因, 以 I 表示信号强度;并采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)对部分基因进行验证。**结果** 在 NK 细胞毒性相关信号转导通路中, M 组较 N 组上调差异基因 43 个。用药治疗后, SM 组下调差异表达基因 36 个, JM 组下调差异表达基因 29 个, SL 组下调差异表达基因 22 个, JH 组下调差异表达基因 21 个, SH 组下调差异表达基因 20 个, JL 组下调差异表达基因 10 个;SH、SL、JH、JM、JL 组表达下调的基因均包括在 SM 组的表达谱中, 表明中剂量疏风宣肺方调控 NK 细胞毒性作用最显著。荧光定量 PCR 和 Western blotting 测定结果显示, 与 M 组比较, 疏风宣肺方与解表清里方各剂量组对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 mRNA 及蛋白表达均有显著抑制作用, 疏风宣肺方和解表清里方均以中剂量组最低(TNF- α mRNA: 1.07 ± 0.19 、 1.19 ± 0.14 比 3.20 ± 0.56 , 均 $P < 0.01$)。**结论** 流感病毒感染后在宿主细胞内增殖即成为带有病毒抗原的靶细胞, 并激活 NK 细胞毒性信号转导通路的相关基因表达增加, 被 NK 细胞识别并杀伤;两种方药可下调 NK 细胞中表达上调的差异基因, 下调机制与其能明确减少流感病毒性肺炎体内靶抗原、减弱 NK 细胞识别活化作用有关。

【关键词】 流感病毒性肺炎; 疏风宣肺方; 解表清里方; 自然杀伤细胞; 基因芯片; 小鼠

Screening for genes associated with natural killer cell mediated cytotoxicity in pneumonia mice infected with influenza virus and regulation of two herbal anti-virus formulas LU Na-na*, LIU Qi, GU Li-gang, ZHOU Xu-peng, WU Jun, QIU Ze-ji, ZHANG Hong-chun, CHAO En-xiang, ZHANG Yi. * Laboratory of Chinese Medicine on Viral Disease, Beijing University of Chinese Medicine, Basic Medical College, Beijing 100029, China Corresponding author: GU Li-gang, Email: lggulg@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulation of two herbal anti-virus formulas on gene expression profile associated with natural killer cell (NK cell) mediated cytotoxicity in pneumonia mice infected with influenza virus. **Methods** According to random number table, 90 ICR mice were divided into nine groups with 10 mice in each group: normal group (N), model group (M), oseltamivir group (control group, C), low-dose, medium-dose and high-dose Shufeng Xuanfei formula groups (SL, SM, SH groups), and low-dose, medium-dose and high-dose Jiebiao Qingli formula groups (JL, JM, JH groups). The model of pneumonia was reproduced by nasal dropping influenza virus A (FM1) in mice. N group was given isotonic saline 0.05 ml in nasal drops. After 2 hours of model-building, C group was received $11.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ oseltamivir phosphate. Shufeng Xuanfei formula (mainly honeysuckle, forsythia and radix isatidis, etc.) with 3.76 , 1.88 and $0.94 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were administrated to SH, SM and SL groups by gastric irrigation respectively. Jiebiao Qingli formula (mainly ephedra, gypsum, glycyrrhiza glabra, etc.) with 4.36 , 2.18 and $1.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were administrated to JH, JM and JL groups by gastric irrigation respectively. In N and M groups, normal saline was administrated with gastric perfusion. Each group was in equal dose of 0.2 ml daily over a 4-day period. Total RNA in lung tissue of mice were extracted in each group, then gene chips were used to screen these RNA samples.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.06.002

基金项目: 国家自然科学基金(81173371)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院中医药抗病毒重点实验室(卢娜娜、刘琪、顾立刚、周旭澎、吴珺、邱泽计、张沂); 北京中日友好医院(张洪春、晁恩祥); 山西中医学院(刘琪)

通信作者: 顾立刚, Email: lggulg@163.com

Some genes involved NK cell mediated cytotoxicity were select, with "I" representing of signal intensity. These candidate genes were verified by real-time fluorescent quantitation polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting.

Results In the pathway of NK cell mediated cytotoxicity, M group up-regulated 43 genes expression, and 36, 29, 22, 21, 20 and 10 genes showed down-regulation in SM, JM, SL, JH, SH and JL groups, respectively. Apart from gene co-expression network in SH, SL, JH, JM and JL, SM also expressed other differential genes which SH, SL, JH, JM and JL did not. So medium-does Shufeng Xuanfei formula had the most significant regulation in gene expression of NK cell mediated cytotoxicity. By real-time PCR and Western blotting experiments showed that compared with the M group, mRNA and protein expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in these two formula groups were significantly down-regulated, especially prominent in SM group and JM group (TNF- α mRNA: 1.07 ± 0.19 , 1.19 ± 0.14 vs. 3.20 ± 0.56 , both $P < 0.01$). **Conclusions** Influenza viral replication in host cell, which means influenza antigens exposure in infected cells as target cells. NK cells recognize and exert cell mediated cytotoxic function against influenza antigens. Genes associated with NK cell mediated cytotoxicity in influenza infection were up-regulated. Shufeng Xuanfei and Jiebiao Qingli formulas could down-regulate these genes. The mechanism of down-regulated genes is that the number of influenza infected cells and NK cells activation decreases in treatment with two formulas.

[Key words] Pneumonia infected with influenza virus; Shufeng Xuanfei formula; Jiebiao Qingli formula; Natural killer cell; Gene chip; Mouse

大流感病毒是引起呼吸道感染的重要病原体。自然杀伤细胞(NK 细胞)是介导非特异免疫应答的主要效应淋巴细胞,在流感病毒感染早期发挥着重要的作用,但其复杂的分子生物学机制和网络调控机制至今仍未阐明。基因芯片是近几年迅速发展的一项分子生物学技术,目前在甲型流感病毒性肺炎的研究中也得到越来越多的应用。本研究采用基因芯片技术检测流感病毒性肺炎小鼠与正常小鼠肺组织 NK 细胞毒性信号转导通路的基因表达差异,利用生物信息学方法对筛选的已知相关基因进行初步分析,探讨 NK 细胞识别并杀伤带有病毒抗原的靶细胞的机制,为采用两种不同治法方药进行有效的干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及流感病毒:90 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,体质量 13 ~ 15 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:0194690。动物在洁净柜中饲养,室温(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%。流感病毒亚甲型鼠肺适应株 FM1 由中国中医科学院中药所提供,使用时接种于 9 日龄鸡胚尿囊腔,35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,连续传代 3 次后收集尿囊液,测定血凝滴度为 2^{-8} ,对小鼠的半数致死量(LD_{50})为 $10^{-2.24}$,确定浓度为 4LD_{50} 。

1.2 药物:疏风宣肺方由金银花、连翘、板蓝根等组成,解表清里方由麻黄、石膏、生甘草等组成,北京中日友好医院药厂制成颗粒型冲剂,疏风宣肺方每包 6.2 g,解表清里方每包 7.3 g。对照药物为磷酸奥司他韦胶囊(商品名达菲)。

1.3 动物分组及模型制备:将小鼠按随机数字表法分为 9 组,即对照(N)组,模型(M)组,奥司他韦(C)组,中药疏风宣肺方高、中、低剂量(SH、SM、SL)组,

解表清里方高、中、低剂量(JH、JM、JL)组。高、中、低剂量分别为人临床治疗剂量的 2 倍、等量及 1/2。除 N 组以 0.05 ml 等渗盐水滴鼻外,其余各组小鼠经乙醚轻度麻醉后,在二级生物安全负压实验室内用 0.05 ml 的 4LD_{50} 流感病毒 FM1 稀释液滴鼻感染。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 给药方法:制模后 2 h,C 组给予奥司他韦 $11.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,SH、SM、SL 组给予疏风宣肺方 3.76 、 1.88 、 $0.94 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,JH、JM、JL 组给予解表清里方 4.36 、 2.18 、 $1.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,N 组及 M 组则灌胃等量生理盐水,各组均 0.2 ml/d,连续给药 4 d。摘眼球放血处死,无菌摘取全肺,每组随机取 3 只小鼠全肺保存于液氮中备用。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 基因芯片检测及数据处理:提取细胞总 RNA,样品经华联生物科技股份有限公司检测合格后用于芯片杂交及扫描,上述实验重复 3 次。计算探针信号在各组与 M 组的强度比值,用 I 表示信号强度。筛选差异表达基因的标准为: P 值控制在 0.05 以内,且 $\log_2$ 比值 > 1 表示上调基因, $\log_2$ 比值 < -1 表示下调基因。本研究利用 KEGG 基因组信息数据库和 PUBMED 数据库,分析涉及 NK 细胞导致的细胞毒性信号转导通路相关的差异表达基因。

1.5.2 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达:使用 TRIzol 试剂提取肺组织 RNA 后,用引物进行一步法实时荧光定量 PCR 反应。引物序列:TNF- α : 上游 5'-CCAAAGG GATGAGAAGTTCC-3', 下游 5'-CTCCACTTGGTGG TTTGCTA-3', 扩增产物片段 133 bp;内参照三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH): 上游 5'-GCAAGTTCAA CGGCACAG-3', 下游 5'-CGCCAGTAGACTCCACG

AC-3', 扩增产物片段 141 bp。反应体系: cDNA 2 μ l; 10 pmol/ μ l 引物 0.5 μ l, 赛博实时定量 PCR 扩增的预混合溶液 10 μ l, 以去离子 H₂O 补至 20 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 8 s、60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各样本目的基因的表达变化。

1.5.3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测 TNF- α 蛋白表达: 将肺组织样本低温研磨, 加入裂解液, 以 Bradford 法定量蛋白, 样品上样, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 半干电转膜仪转膜, 封闭后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 振荡, 将聚偏氟乙烯(PVDF)膜于室温下振荡温育, X 线胶片曝光, 经显影、定影、扫描后观察结果。应用 Image-Pro Plus 软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析, 以各目的条带与 GAPDH 的灰度值比值作为目的蛋白的

相对表达量。

1.6 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间差异采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因芯片数据分析生物学路径及差异表达基因(表 1): 在 NK 细胞毒性相关信号转导通路中, M 组较 N 组上调的差异表达基因有 43 个。用药治疗后, 与 M 组比较, SM 组下调差异表达基因 36 个, JM 组下调差异表达基因 29 个, SL 组下调差异表达基因 22 个, JH 组下调差异表达基因 21 个, SH 组下调差异表达基因 20 个, JL 组下调差异表达基因 10 个; SH、SL、JH、JM、JL 组表达下调的基因均包括在 SM 组的基因表达谱中, 表明中剂量疏风宣肺方调控 NK 细胞毒性作用最显著。

表 1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织自然杀伤细胞导致的细胞毒性信号转导通路相关差异表达基因

基因名称	Oligo 编号	全称	log ₂ 比值						
			M/N	SH/M	SM/M	SL/M	JH/M	JM/M	JL/M
Fcgr3	PH_mM_0009286	Fc γ 受体 III (Fc gamma receptor III, CD16)	2.47	-1.99	-3.17	-1.78	-2.46	-1.94	-1.27
Cd48	mMc002329	CD48 抗原 (CD48 antigen)	1.51	-0.02	-1.12	-0.21	0.09	-1.32	-0.09
Cd244	PH_mM_0015525	自然杀伤细胞受体 2B4 (natural killer cell receptor, 2B4)	1.07	-0.98	-1.09	0.76	-0.62	-1.16	-0.02
Tyrbp	mMc015985	TYRO 蛋白酪氨酸激酶结合蛋白 (TYRO protein tyrosine kinase binding protein, DAP-12)	1.73	-1.47	-2.25	-1.02	-0.81	-1.45	-0.46
Hest	mMR029204	造血细胞信号转导因子 (Hematopoietic cell signal transducer, DAP-10)	1.82	-1.03	-2.39	-1.58	-2.33	-1.63	-0.43
Zap70	mMC019091	Zeta 链相关蛋白激酶 (zeta-chain associated protein kinase, ZAP-70)	1.53	0.38	-1.36	-0.58	-0.93	0.03	0.99
Braf	PH_mM_0001502	Braf 转化基因 (Braf transforming gene, Braf)	1.57	-1.29	-1.65	-1.46	-1.37	-0.94	-1.13
Pik3r5	PH_mM_0003125	磷酸肌醇 3 激酶调控亚基 5, p101 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101, p101-PI3K)	3.12	-2.52	-3.90	-2.95	-3.19	-2.88	-2.01
Pik3cg	mMc005200	磷酸肌醇 3 激酶催化 γ 肽 (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide)	1.64	-0.75	-1.49	-1.25	-1.86	-1.06	-0.37
Map2k1	PH_mM_0006215	促分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1, Mek1)	1.76	-1.02	-1.14	-1.01	-1.05	-1.01	-0.34
Mapk1	mMC024552	促分裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, Erk)	2.23	-0.90	-1.04	-0.47	-0.56	-1.00	-0.92
Gzmb	PH_mM_0001308	颗粒酶 B (granzyme B)	4.36	1.17	-4.79	-0.13	-0.81	-0.68	0.87
Prf1	mMC017608	穿孔素 (perforin 1)	2.43	0.31	-2.71	-0.55	0.26	-1.08	0.71
Fas	mMC008894	肿瘤坏死因子受体超家族成员 6 (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6)	1.70	-1.13	-1.83	-0.88	-2.25	-1.52	-0.81
FasL	mMC013655	Fas 配体 (Fas ligand)	1.91	1.49	-2.13	-0.08	-0.73	-1.12	-1.74
TNF	mMC016605	肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF- α)	5.47	-3.86	-5.03	-4.58	-4.73	-3.86	-2.95
Casp3	mMC022395	天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)	1.86	0.22	-0.24	-0.18	-0.41	0.44	0.72
Csf2	mMC014357	集落刺激因子 2 (colony stimulating factor 2, GM-CSF)	2.41	-1.41	-2.03	-1.43	-2.66	-1.34	-1.30
Bid	PH_mM_0005297	BH3 结合域死亡拮抗因子 (BH3 interacting domain death agonist)	2.06	-0.48	-1.77	-0.66	-0.82	-0.98	-0.05
CD247	PH_mM_0012514	CD247 抗原 (CD247 antigen)	1.57	0.38	-1.59	-0.65	-0.97	-0.15	0.36
Rac2	PH_mM_0006793	ras 相关 C3 肉毒菌毒物底物 2 (RAS-related C3 botulinum substrate 2)	1.58	-1.63	-1.96	-1.62	-2.06	-1.84	-1.16
Sh3bp2	mMC009789	SH3 域结合蛋白 (SH3-domain binding protein 2)	3.07	-1.15	-3.00	-1.47	-1.82	-1.24	-0.53
Fcer1g	PH_mM_0009498	IgE Fc 组分高亲和性 I 受体 (Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide)	2.66	-1.18	-3.21	-1.34	-1.63	-1.43	-0.84

注: N: 对照组, M: 模型组, C: 奥司他韦组, SH、SM、SL 分别为疏风宣肺方高、中、低剂量组, JH、JM、JL 分别为解表清里方高、中、低剂量组

表 1 流感病毒性肺炎小鼠肺组织自然杀伤细胞导致的细胞毒性信号转导通路相关差异表达基因

续表 1

基因名称	Oligo 编号	全称	log ₂ 比值						
			M/N	SH/M	SM/M	SL/M	JH/M	JM/M	JL/M
Fcgr4	mMC006622	IgG Fc 组分低亲和性 IV 受体 (Fc receptor, IgG, low affinity IV)	4.40	-1.98	-4.28	-1.68	-2.56	-1.91	-1.24
PTK2b	mMC014559	蛋白酪氨酸激酶 (PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta)	3.05	-1.24	-2.92	-1.92	-2.08	-1.47	-0.74
Itgal	mMC021563	整联蛋白 α 样 (integrin alpha L)	2.71	-1.15	-2.23	-1.44	-1.59	-1.31	-0.77
Itgb2	PH_mM_0009371	整联蛋白 β 2 (integrin beta 2)	2.45	-1.58	-2.59	-1.93	-2.23	-1.81	-1.18
Itgb2l	mMC026188	整联蛋白 β 2 样 (integrin beta 2-like)	4.13	0.00	-4.46	0.00	-3.93	-3.76	-1.55
Ifnar1	PH_mM_0014587	干扰素 α, β 和 ω 受体 1 [interferon (alpha and beta) receptor 1]	1.45	-1.47	-1.73	-1.46	-1.56	-1.12	-0.94
Ifnb1	mMC016397	干扰素 β 1, 成纤维细胞 (interferon beta 1, fibroblast)	4.60	1.01	-5.09	-0.63	0.56	-1.20	1.65
Lat2	mMC018184	连接因子激活 T 细胞家族成员 2 (linker for activation of T cells)	2.92	0.17	-1.99	-0.46	-0.91	0.15	0.88
Pik3cd	PH_mM_0001034	磷酸肌醇 3 激酶催化 δ 肽 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta polypeptide)	1.42	-0.27	-2.08	-0.74	-0.86	-0.64	-0.06
Plcg2	PH_mM_0009127	磷脂酶 C, γ 2 (phospholipase C, gamma 2)	2.13	-1.13	-2.29	-1.38	-1.28	-1.28	-0.58
Prkcd	PH_mM_0009599	蛋白激酶 C, δ (protein kinase C, delta)	2.00	-0.94	-1.33	-1.28	-0.93	-1.33	-0.47
Ptpn6	PH_mM_0001332	蛋白酪氨酸磷酸酶非受体型 6 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6)	2.99	-1.26	-2.84	-1.70	-2.00	-1.52	-0.72
Shc1	PH_mM_0014084	SHC 转化蛋白 1 (src homology 2 domain-containing transforming protein C1)	1.28	-0.97	-1.07	-1.08	-0.62	-1.19	-0.27
Vav1	PH_mM_0014215	vav1 癌基因 (vav 1 oncogene)	3.36	-1.18	-3.53	-1.83	-2.27	-1.68	-0.55
Klrc1	PH_mM_0000670	杀伤细胞凝集素样受体亚家族 C 成员 1 (killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1)	1.37	3.04	0.16	1.22	-0.18	1.90	2.82
Lck	mMC001127	淋巴细胞特异蛋白酪氨酸激酶 (lymphocyte protein tyrosine kinase)	1.55	1.44	-0.81	0.32	-0.32	0.81	1.44
Raet1e	PH_mM_0015748	视黄酸早转录物 1e (retinoic acid early transcript 1E)	1.10	0.00	0.32	0.00	-0.27	0.37	-0.63
Raf1	mMC010690	鼠科白血病病毒癌基因同源物 1 (v-raf-leukemia viral oncogene 1)	1.09	-0.90	-0.86	-0.91	-0.90	-0.86	-0.68
Araf	mMC004111	v-raf 鼠科肉瘤 3611 病毒癌基因同源物 (v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog)	1.11	-0.48	-0.50	-0.18	-0.19	-0.45	-0.07
Sh2d1a	PH_mM_0001230	SH2 域蛋白 1A (SH2 domain protein 1A)	1.42	1.78	-0.77	0.23	-0.49	1.16	1.57

注: N: 对照组, M: 模型组, C: 奥司他韦组, SH, SM, SL 分别为疏风宣肺方高、中、低剂量组, JH, JM, JL 分别为解表清里方高、中、低剂量组

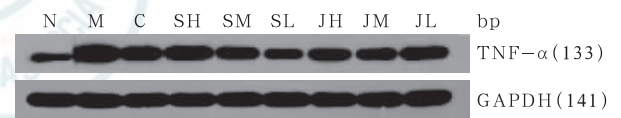
2.2 疏风宣肺方和解表清里方对流感病毒性肺炎小鼠肺组织 TNF-α 的 mRNA 和蛋白表达的影响 (表 2; 图 1): M 组 TNF-α 的 mRNA 和蛋白表达均较 N 组显著升高 ($P < 0.05$)。与 M 组比较, 疏风宣肺方和解表清里方各剂量组 TNF-α 的 mRNA 和蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中均以中剂量组为最低。且该结果和基因芯片表达结果基本相符。

表 2 各组流感病毒性肺炎小鼠肺组织

TNF-α mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TNF-α mRNA
对照组	10	1.04 ± 0.32
模型组	10	3.20 ± 0.56 ^a
奥司他韦组	10	1.68 ± 0.71 ^b
疏风宣肺方高剂量组	10	1.60 ± 0.17 ^b
疏风宣肺方中剂量组	10	1.07 ± 0.19 ^b
疏风宣肺方低剂量组	10	1.16 ± 0.12 ^b
解表清里方高剂量组	10	1.75 ± 0.33 ^b
解表清里方中剂量组	10	1.19 ± 0.14 ^{bd}
解表清里方低剂量组	10	2.07 ± 0.81 ^{cd}

注: TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$; 与解表清里方高剂量组比较, ^d $P < 0.05$; 与解表清里方中剂量组比较, ^e $P < 0.05$; 与疏风宣肺方同剂量组比较, ^f $P < 0.05$



TNF-α: 肿瘤坏死因子-α, GAPDH: 三磷酸甘油醛脱氢酶, N: 对照组, M: 模型组, C: 奥司他韦组, SH, SM, SL 分别为疏风宣肺方高、中、低剂量组, JH, JM, JL 分别为解表清里方高、中、低剂量组

图 1 蛋白质免疫印迹试验检测各组流感病毒性肺炎小鼠 TNF-α 的蛋白表达

3 讨论

流感病毒通过其表面血凝素 (HA) 蛋白与肺上皮细胞受体结合后, 在细胞内复制增殖。在流感病毒感染早期, 诱导 NK 细胞在呼吸道内积聚^[1]。NK 细胞是介导非特异性免疫应答的主要效应细胞, 活化的 NK 细胞直接控制流感病毒复制并限制病毒的扩散^[2]。流感病毒感染的呼吸道上皮细胞通过释放趋化因子, 使 NK 细胞向感染部位募集^[3], 外周血 NK 细胞数目减少^[4]。流感病毒 HA 在细胞膜上的堆积激活了 NK 细胞内的丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路, 致使 Raf/ 丝裂原激活蛋白激酶 (MEK)/ 细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号上调, 促进了 NK 细胞的分化和增殖^[5]。

NK 细胞膜表面活化性受体主要包括:CD16、NKP46、NKG2D 及 2B4。NK 细胞通过表面 CD16 识别与 IgG 结合的流感病毒感染细胞,而介导抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)。NK 细胞膜表面活化性受体 NKP46 和 NKG2D 分别与流感病毒 HA 和感染细胞表面的 ULBP1-3 相互作用,使 NK 细胞能够有效杀伤病毒感染的靶细胞^[6]。NKG2D 结合转接蛋白 DAP-10 介导 NK 细胞活化。DAP-12 也是 NK 细胞活化的转接蛋白信号分子,含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM 基序),招募脾酪氨酸激酶(SYK 激酶)并活化 PI3K。NKP46 受体与 HA 相互作用后,主要通过耦联含有 ITAM 的亚蛋白 CD3 ζ 、Fc ϵ RI γ 使酪氨酸磷酸化,其转导途径配体为 ZAP-70/SYK^[12]。SYK 和 ERK 也与 NK 细胞细胞毒作用相关^[7]。SYK 与 ERK 的磷酸化可以使细胞毒颗粒极化,激活 Raf,活化的 Raf 激活 MEK1/2,接着 MEK1/2 激活 ERK1/2,再通过 ERK1/2 激活核内的转录因子、细胞因子等调节流感病毒基因的转录表达,来调节细胞的增殖、分化,进而使 NK 细胞活化。活化的 NK 细胞通过释放穿孔素和颗粒酶直接杀伤靶细胞或是通过死亡受体 FasL 等与相应配体调节的靶细胞凋亡,还能分泌 TNF- α 、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等效应性细胞因子,发挥细胞毒效应。此外,通过 2B4/CD48 途径也可激活 NK 细胞的杀伤功能和分泌 γ -干扰素(IFN- γ)^[8]。

甲型 H1N1 流感患者对抗病毒药物奥司他韦(达菲)敏感,但其价格昂贵,在基层医院不易推广,而采用中西医结合方法治疗甲型 H1N1 流感能取得很好的效果^[9]。因此,寻找治疗流感病毒性肺炎的有效中药复方将成为一项值得深入研究的工作。根据疏风宣肺、解表清里的治疗原则,本课题组采用两种不同治法方药对北京中日友好医院发热门诊患者进行临床干预,取得初步临床疗效^[10]。疏风宣肺方中金银花、连翘、板蓝根等单味中药含有黄酮类、挥发油或凝集素类物质,具有抑制流感病毒唾液酸酶活性与膜融合的作用^[11-12]。金银花直接抑制甲型流感病毒 FM1 的活性,抑制病毒的增殖^[13];连翘可以抑制甲型流感病毒核蛋白 NP 基因转染后表达^[12];板蓝根提取液对鸡胚内流感病毒株 FM1 具有直接灭活作用,且抑制 TNF- α 的过度表达^[14]。解表清里方是在麻杏石甘汤基础上加减化裁而成,麻杏石甘汤能干扰病毒吸附、抑制病毒增殖、保护宿主细胞而发挥较强的抗流感病毒作^[16]。

流感病毒在宿主细胞内增殖即成为带有病毒抗原的靶细胞,可被 NK 细胞识别并杀伤,流感病毒感染后激活 NK 细胞毒性信号转导通路的相关基因表达增加^[6]。本研究中治疗组疏风宣肺方下调 NK 细胞上述基因的表达优于解表清里方,其下调作用机制与疏风宣肺方治疗流感病毒性肺炎后体内靶抗原(即流感病毒感染细胞)明显减少、NK 细胞识别活化作用减弱有关。本实验室前期研究发现,经中、低剂量疏风宣肺方和中剂量解表清里方治疗后,可调节特异性免疫应答中的辅助性 T 细胞 1/2(Th1、Th2)细胞因子的平衡,恢复宿主免疫平衡,主要通过激活宿主细胞免疫发挥作用,从而达到抗流感的目的^[15]。综上所述,疏风宣肺方和解表清里方对流感病毒性肺炎治疗有良好前景,值得进一步研究开发。

参考文献

- [1] van Helden MJ, de Graaf N, Boog CJ, et al. The bone marrow functions as the central site of proliferation for long-lived NK cells. *J Immunol*, 2012, 189:2333-2337.
- [2] McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol*, 2009, 86: 803-812.
- [3] 黄增峰, 缪心朗, 陈德昌, 等. 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠 CD19 细胞和 NK 细胞的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14: 219-221.
- [4] Jost S, Quillay H, Reardon J, et al. Changes in cytokine levels and NK cell activation associated with influenza. *PLoS One*, 2011, 6: e25060.
- [5] 代新究, 张丽姝, 洪涛. 应答流感病毒感染的宿主信号途径研究进展. *中国科学:生命科学*, 2010, 40:993-1001.
- [6] Achdout H, Meninger T, Hirsh S, et al. Killing of avian and Swine influenza virus by natural killer cells. *J Virol*, 2010, 84:3993-4001.
- [7] 梁淑娟, 孙沛, 魏海明, 等. ERK1/2 信号传导途径参与调控 NK 细胞的杀伤活性. *中国免疫学杂志*, 2003, 19:591-594, 598.
- [8] 刘丹, 李明春. NK 细胞表面活化性受体的研究进展. *国际免疫学杂志*, 2006, 29:302-305.
- [9] 庞学智, 张金泉. 中西医结合治疗甲型 H1N1 流感 56 例临床疗效探讨. *中国危重病急救医学*, 2011, 23:262.
- [10] 罗亚锋, 张洪春. 基于晁恩祥经验的中药治疗流行性感冒的随机对照试验. *北京中医药*, 2012, 31:836-839.
- [11] 曾郁敏. 毒热平注射液抗流感病毒作用及免疫调控机制的实验研究. 北京:北京中医药大学, 2009.
- [12] 段林建, 张清, 王农荣, 等. 连翘苷对甲型流感病毒核蛋白基因表达的影响研究. *中国全科医学*, 2012, 15:2082-2084.
- [13] 潘墨墨, 王雪峰, 岳志军, 等. 银翘散主要活性成分对流感病毒性肺炎小鼠治疗作用的研究. *中医儿科杂志*, 2011, 7:17-20.
- [14] 杨海霞, 李晓眠. 板蓝根提取液体内抗流感病毒作用的研究. *天津医科大学学报*, 2007, 13:19-22.
- [15] 刘琪, 顾立刚, 卢娜娜, 等. 疏风宣肺、解表清里方药对流感病毒性肺炎小鼠辅助性 T 细胞 1/2 平衡调节的研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20:1-4.
- [16] 卢芳国, 何迎春, 肖子曾, 等. 麻杏石甘汤体外抗 A 型流感病毒作用靶点的研究. *湖南中医药大学学报*, 2008, 28:5-9.

(收稿日期:2013-04-22)

(本文编辑:李银平)