

银花平感颗粒的体外抗甲型 H1N1 流感病毒作用

杜海霞¹, 万海同¹, 何昱¹, 杨洁红¹, 卢亦愚², 周惠芬^{*}

(1. 浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053; 2. 浙江省疾病预防控制中心)

摘要 目的 探讨银花平感颗粒体外抗甲型 A/PR8/34 (H1N1) 流感病毒的作用机制。方法 采用 MTT 比色法测定药物对巨噬细胞的最大无毒浓度 (TC_0), 半数细胞毒性浓度 (TC_{50}) 及药物不同给药方式的抗病毒有效率, 采用 *Probit* 回归分析计算其对病毒感染的半数抑制浓度 (IC_{50}) 及治疗指数 (TI); 流感病毒 H1N1 感染培养的 RAW264.7 细胞, 用利巴韦林 ($62.5 \mu\text{g/ml}$), 银花平感颗粒高 ($500 \mu\text{g/ml}$)、中 ($250 \mu\text{g/ml}$)、低 ($125 \mu\text{g/ml}$) 各剂量进行干预, 4、16、24 h 后收集细胞, 实时荧光定量 PCR 法观察各组细胞中 Toll 样受体 7 (TLR7)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子 κB p65 (NF- κB p65)、干扰素调节因子 7 (IRF7) 的变化。结果 银花平感颗粒在 $31.25 \sim 500 \mu\text{g/ml}$ 范围内可降低流感病毒复制, 其中药物治疗组在给药 24 h 后, 抗病毒有效率最高; 与正常对照组同时间比较, 模型对照组 TLR7、MyD88、IRF7、NF- κB p65 mRNA 表达水平均显著升高, 且 16 h 达最高峰, 较本组 4 h、24 h 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 经药物干预后, 银花平感颗粒高、中剂量组及利巴韦林组均显著下调流感病毒诱导 4、16、24 h 后的 TLR7、MyD88、IRF7 和 NF- κB p65 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 尤以银花平感颗粒高剂量组对 TLR7、MyD88 和 NF- κB p65 mRNA 表达水平的下调作用较利巴韦林组更为显著 ($P < 0.05$)。结论 银花平感颗粒体外可明显抑制流感病毒复制, 主要是通过治疗给药而发挥抗病毒作用, 其抗病毒效果可能与其抑制 TLR7/MyD88/IRF7 信号通路及 NF- κB p65 的激活有关, 且高剂量对流感的治疗效果优于利巴韦林。

关键词 银花平感颗粒; 甲型 H1N1 流感病毒; 小鼠肺泡巨噬细胞; TLR7/MyD88 信号通路

流行性感冒简称流感, 是由流感病毒引起的一种严重危害人类健康的呼吸道传染病, 根据其组成结构内部核蛋白和基质蛋白的不同, 流感病毒分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C) 型, 其中, 甲型流感病毒极易发生抗原的漂移变异, 易造成世界性大流行, 严重威胁人类健康^[1]。银花平感颗粒 (原名金平感颗粒) 具有清热解毒、宣肺解表疏邪之功效。前期研究表明, 银花平感颗粒体外对流感病毒有很好的抑制作用^[2]。动物实验中, 银花平感颗粒通过抑制流感病毒复制, 减轻小鼠肺部损伤, 并调节免疫功能^[3], 调节细胞因子的产生, 减轻肺组织炎症反应^[4], 抑制小鼠 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、肿瘤坏死因子相关激酶 6 (TRAF6)、核因子 κB p65 (NF- κB p65) 基因和蛋白的表达等发挥抗病毒作用^[5]。基于前期研究成

果, 本实验观察银花平感颗粒体外抗甲型 H1N1 流感病毒感染 RAW264.7 细胞的作用, 并检测银花平感颗粒对 Toll 样受体 7 (TLR7) 介导的信号通路相关靶点 mRNA 表达水平的影响, 探讨银花平感颗粒可能的抗病毒作用机制。

1 材料

1.1 病毒和细胞

甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR8/34 (H1N1), 由浙江省疾病预防控制中心提供, -80°C 保存备用。使用时接种于 9 日龄鸡胚尿囊腔, 连续传代 2 次后, 血凝试验测定病毒效价为 1:1024。狗肾细胞株 (MDCK), 由浙江省疾病预防控制中心惠赠, 细胞复苏传代后使用; 小鼠肺泡巨噬细胞株 (RAW264.7), 购自中国科学院上海细胞库, 细胞复苏传代后使用。

1.2 实验药物

银花平感颗粒由金银花、葛根、虎杖、麻黄、

基金项目: 国家自然科学基金 (81603531); 浙江省自然科学基金 (LZ14H270001)

* 通讯作者: zhouhuifen2320@126.com, (0571) 86633309

苦杏仁、甘草组成, 颗粒剂由杭州华东医药集团康润制药有限公司制备, 每包 6g, 批号 1606020, 用双蒸水配成质量浓度为 10 mg/ml 的溶液, 以此作为储备液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 4℃ 保存备用, 课题组前期采用 HPLC 法已对银花平感颗粒进行含量测定及质量控制^[4-5]。利巴韦林颗粒, 四川百利药业有限责任公司生产, 批号 131165。

1.3 主要试剂与仪器

MEM 培养基 (批号: 1855999)、DMEM 培养基 (批号: 1776559)、青霉素和链霉素母液 (批号: 4502001015)、胎牛血清 (FBS, 批号: 1808455)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 批号: 1809319)、0.25% 胰酶 - 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA, 批号: 25200056), 均为 Gibco 公司产品; 四甲基偶氮唑蓝 (MTT, 批号: 3580MG250)、二甲基亚砜 (DMSO, 批号: 140103), 均为 Sigma 公司产品; RNeasy Mini Kit 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司, 批号: 74104); PrimeScriptTM RT Master Mix (批号: AK4403)、SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒 (批号: AK7604) 均为 TaKaRa 公司产品; 琼脂糖 (批号: 111860)、DNA Marker (批号: A1801A), 均为大连宝生物工程有限公司产品。TE2000-U 型倒置相差荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); 3111 型细胞培养箱、FormaClass II -A2 生物安全柜均为美国 Thermo 公司产品; SX-500 高压灭菌锅 (日本 Tomy 公司); Molecular Devices Spectra-MAX Plus 384 酶标仪 (美国 MD 公司); NanoVue 超微量分光光度计 (美国 GE Healthcare 公司); ABI QuantStudio12KFlex 实时荧光定量 RT-PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司); LDZ5-2 低温离心机 (北京医用离心机厂)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDCK 细胞采用 MEM 培养基, RAW264.7 细胞采用 DMEM 培养基 (含 10% FBS, 1% 青链霉素混合液), 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养。细胞长满 70% ~ 80% 左右传代, 生长状态良好的细胞每 1 ~ 2 天传代, 0.25% 胰酶 (含 EDTA) 消化 1 ~ 2 min, 显微镜下观察细胞回缩变圆时, 采用含 10% FBS 的培养基终止消化, 吹打收集后, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入培养液, 再吹打成细胞悬液后, 每次分 3 ~ 5 瓶接种入新的培养瓶内。所有实验均采用对数生长期细胞。

2.2 病毒感染性 (TCID₅₀) 测定

将甲型流感病毒 A/PR8/34 (H1N1) 用病毒生长液 (含 1 μ g/ml 纯胰酶的 MEM 培养基) 进行 10 倍递次稀释, 将各稀释度的病毒液接种于 MDCK 细胞单层吸附的 96 孔板中, 每孔 100 μ l, 每个稀释度平行 6 个复孔, 同时设正常细胞对照不加病毒, 只加稀释液。置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱继续培养, 每日在倒置显微镜下观察细胞病变效应 (CPE), 并记录病变程度和孔数, 以细胞对照无明显退变、病毒感染细胞病变率达 50% 及以上的细胞孔为病变孔, 细胞病变率小于 50% 的为非病变孔, 按 Reed-Muench 法^[6] 计算 TCID₅₀。

2.3 药物细胞毒性实验

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/ml 浓度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l。长成单层后, 小心吸弃每孔培养液, 加入预先用细胞维持液连续稀释的药物, 设置 8 个浓度, 其中银花平感颗粒组按 4000、2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 μ g/ml; 利巴韦林颗粒组按 2000、1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 μ g/ml, 药物每个稀释度平行 6 个复孔, 同时设正常细胞对照组, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。24 h 后每孔加入 20 μ l、5 mg/ml MTT, 继续培养 4 h, 终止培养, 弃培养液, 每孔加 150 μ l DMSO, 振荡 10 min 充分溶解结晶物。酶标仪检测, 空白调零, 测定 490 nm 处的吸光度 A 值 (OD 值), 计算细胞存活率 (%), 细胞存活率 (%) = 药物组平均 A 值 / 正常细胞对照组平均 A 值 $\times$ 100%。本实验采用细胞存活率 > 90% 药物浓度作为最大无毒浓度进行后续实验。用统计软件 SPSS 20.0 对数据进行 Probit 回归分析, 计算药物半数细胞毒性浓度 (TC₅₀)。

2.4 药物抗病毒生长方式的检测

取已长成单层细胞的 96 孔培养板中的 RAW264.7 细胞, 吸弃细胞培养液, PBS 轻洗细胞表面 2 次, 根据病毒复制周期, 设计 3 种不同加药方式观察药物的抗病毒效果^[7]: 药物预防组, 先加入不同浓度的药液, 作用 24 h 后弃去孔中液体, 再加入 100TCID₅₀ 的病毒稀释液吸附 1h; 抗病毒吸附组, 病毒与不同浓度的药液混合后加入铺满单层的细胞中; 药物治疗组, 先加入 100TCID₅₀ 的病毒稀释液吸附 1h 后, 再加入不同浓度的银花平感颗粒药液。各组分别加入的银花平感颗粒药液浓度为最大无毒浓度以下对倍稀释的 5 个浓度, 并设正常细胞对照组和病毒对照组, 每个浓度 6 个复孔, 置

37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。24 h 后采用 MTT 法测定病毒对药物的作用, 计算药物抗病毒有效率 (%) , 药物抗病毒有效率 (%) = (药物组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) / (正常细胞对照组平均 A 值 - 病毒对照组平均 A 值) × 100% 。对各浓度组所得药物抗病毒有效率进行 *Probit* 回归分析, 计算药物对病毒所致细胞的 CPE 的半数有效浓度 (IC₅₀) , 采用治疗指数 (TI) 作为药物对病毒抑制效力的评价指标, TI = TC₅₀ / IC₅₀ 。

2.5 细胞分组及药物干预

选最大无毒浓度 (TC₀) 下抗病毒有效率较高的药物浓度进行后续实验。实验共分为 6 组: 正常对照组, 模型对照组, 利巴韦林组 (62.5 μg/ml) , 银花平感颗粒高 (500 μg/ml) 、中 (250 μg/ml) 、低 (125 μg/ml) 剂量组, 每组重复 5 次。将 RAW264.7 细胞以 5 × 10⁵ 个/ml 接种于 6 孔细胞培养板, 每孔 2.5 ml, 待细胞长至 70% ~ 80% 左右时, 除正常对照组外, 其余各组均接种 100 TCID₅₀ 的病毒稀释液, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h, 每 15 min 轻轻摇晃 1 次。吸附 1 h 后, 吸弃培养液, 加入 PBS 轻轻清洗 2 次, 分别加入上述各浓度药物, 正常对照组与模型对照组加入等体积的无血清的 DMEM 培养基, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 4、16、24 h。

2.6 观察指标及方法

荧光定量 PCR 法检测 RAW264.7 细胞中 Toll 样受体 (TLRs) 信号通路关键靶点 mRNA 的转录水平, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。RT-PCR 引物序列, TLR7: 上游 CAAAGCAGC-CAGCTCAAAGG; 下游 GGGAGCCAAGGA-CATCTTTCT, 产物大小 117 bp。MyD88: 上游 TGCCAGCGAGCTAATTGAGA; 下游 TGTGACAC-CTGGAGACAG, 产物大小 126 bp。干扰素调节因子 7 (IRF7) : 上游 CCAGCCACGGAAAATAGGGA; 下游 ATGCTGCATAGGGTTCCTCG, 产物大小 163 bp。NF-κB p65: 上游 TCAATGGCTACACAG-GACCA; 下游 TCGCTTCTTCACACACTGGA, 产物大小 185 bp。GAPDH: 上游 GCAAGTTCAACGGCA-CAG; 下游 CGCCAGTAGACTCCACGAC, 产物大小 141 bp。收集上述分别培养 4、16、24 h 的细胞, 采用 RNeasy Mine Kit 试剂盒提取细胞总 RNA, 按试剂盒说明书操作, NanoVue 超微量分光光度计检测 RNA 浓度与纯度 (A260/A280) , 用 RT 试剂盒

进行逆转录, 逆转录反应体系 (10 μl) 含 5 × PrimeScript RTM asterMix 2 μl, RNA 终浓度定量为 40 ng/ml。反应条件为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 10 min。引物进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应体系 20 μl, 反应体系含 SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μl, 10 μmol/L 上下游引物各 0.8 μl, cDNA 样本 1 μl。反应条件为 95℃ 2 min, 95℃ 15 s, 55℃ 35 s, 40 个循环, 反应结束后产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下观察并拍照, 同时做熔解曲线分析。ABI QuanStudio12Kflex 荧光定量 PCR 仪分析得出各个样品量 Ct 值, 使用相对定量 ΔΔCt 方法, 以 GAPDH 作为内对照, 用 2^{-ΔΔCt} 公式^[8] 计算相对表达量, ΔΔCt = (Ct 样本 - Ct 内参)_{实验组} - (Ct 样本 - Ct 内参)_{对照组} 。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 计量数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *LSD-t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 甲型 H1N1 流感病毒的 TCID₅₀ 结果

观察病毒所致 MDCK 细胞病变情况, 按 Reed-Muench 法计算得出流感病毒 A/PR8/34 (H1N1) 的 TCID₅₀ 为 10^{-5.3} /0.1 ml。

3.2 药物细胞毒性实验结果

表 1 示, 不同浓度药物对 RAW264.7 细胞毒性作用在一定范围内随着药物浓度的增加, 细胞存活率降低。经 *Probit* 回归分析, 银花平感颗粒对

表 1 各组细胞存活率结果

组别	药物浓度 (μg/ml)	样本量	细胞存活率 (%)
利巴韦林组	15.625	6	99.40 ± 6.46
	31.25	6	95.75 ± 5.48
	62.5	6	95.29 ± 4.14
	125	6	91.16 ± 2.66
	250	6	74.76 ± 13.71
	500	6	56.27 ± 12.37
	1000	6	36.63 ± 6.10
	2000	6	26.16 ± 3.06
银花平感颗粒组	31.25	6	95.17 ± 7.27
	62.5	6	95.42 ± 5.97
	125	6	96.70 ± 3.33
	250	6	97.98 ± 5.28
	500	6	90.05 ± 7.86
	1000	6	88.94 ± 4.00
	2000	6	54.01 ± 1.99
	4000	6	39.15 ± 3.81

RAW264.7 的 TC_{50} 和 TC_0 分别为 2.678、0.50 mg/ml; 利巴韦林对 RAW264.7 的 TC_{50} 和 TC_0 分别为 0.671、0.125 mg/ml。

3.3 各组不同浓度银花平感颗粒对甲型 H1N1 流感病毒的抗病毒有效率比较

表 2 示, 药物预防组各浓度银花平感颗粒对流感病毒预防作用不明显, 抗病毒有效率均 < 60%; 抗病毒吸附组各浓度药物抗病毒有效率高于药物预防组 ($P < 0.01$), 其值均为 30% ~ 65%; 药物治疗组各浓度药物对流感病毒治疗作用较明显, 明显高于药物预防组及药物抗病毒吸附组同浓度 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 抗病毒有效率均 > 40%, 最高抑制率可达 86.41% (500 μ g/ml)。在 31.25 ~ 500 μ g/ml 浓度范围内, 药物三种抗病毒生长方式同组内不同浓度间比较差异均有统计学意义, 且在此范围内随着药物浓度的增加抗病毒有效率升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组不同浓度银花平感颗粒对甲型 H1N1 流感病毒的抗病毒有效率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	31.25 μ g/ml	62.5 μ g/ml	125 μ g/ml	250 μ g/ml	500 μ g/ml
药物预防组	6	31.46 $\pm$ 2.83	36.12 $\pm$ 3.37 ^{▲▲}	42.69 $\pm$ 3.38 ^{▲▲▼}	49.29 $\pm$ 2.53 ^{▲▲▼#}	55.30 $\pm$ 1.75 ^{▲▲▼#&}
抗病毒吸附组	6	35.92 $\pm$ 2.43 [*]	40.74 $\pm$ 3.69 ^{*▲}	48.98 $\pm$ 2.40 ^{*▲▲▼}	53.99 $\pm$ 3.72 ^{*▲▲▼#}	59.81 $\pm$ 2.73 ^{*▲▲▼#&}
药物治疗组	6	42.04 $\pm$ 1.12 ^{*△△}	44.65 $\pm$ 1.24 ^{*△▲}	53.37 $\pm$ 2.55 ^{*△△▲▲▼}	74.83 $\pm$ 1.91 ^{*△△▲▲▼#}	84.45 $\pm$ 1.96 ^{*△△▲▲▼#&}

注: 与药物预防组同浓度比较, * $P < 0.01$; 与抗病毒吸附组同浓度比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与本组 31.25 μ g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与本组 62.5 μ g/ml 浓度比较, $\nabla P < 0.01$; 与本组 125 μ g/ml 浓度比较, $\#P < 0.01$; 与本组 250 μ g/ml 浓度比较, $\&P < 0.01$

表 3 各组 RAW264.7 细胞不同时间 TLR7、MyD88、IRF7、NF- κ B p65 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	TLR7	MyD88	IRF7	NF- κ B p65
正常对照组	4 h	5	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.09
	16 h	5	1.01 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.12
	24 h	5	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.08
模型对照组	4 h	5	2.60 $\pm$ 0.30 [*]	2.26 $\pm$ 0.14 [*]	2.57 $\pm$ 0.25 [*]	2.59 $\pm$ 0.17 [*]
	16 h	5	4.04 $\pm$ 0.38 ^{* &&}	3.88 $\pm$ 0.25 ^{* &&}	3.14 $\pm$ 0.19 ^{* &&}	3.62 $\pm$ 0.39 ^{* &&}
	24 h	5	3.72 $\pm$ 0.31 ^{* &&◆}	3.12 $\pm$ 0.18 ^{* &&◆◆}	2.77 $\pm$ 0.22 ^{*◆}	2.23 $\pm$ 0.20 ^{*◆◆}
利巴韦林组	4 h	5	1.40 $\pm$ 0.42 ^{△△}	1.72 $\pm$ 0.23 ^{△△}	1.70 $\pm$ 0.14 ^{△△}	2.01 $\pm$ 0.18 [△]
	16 h	5	2.20 $\pm$ 0.41 ^{△△}	2.32 $\pm$ 0.14 ^{△△&&}	1.66 $\pm$ 0.25 ^{△△}	2.50 $\pm$ 0.23 ^{△△&}
	24 h	5	2.49 $\pm$ 0.14 ^{△△&&}	1.56 $\pm$ 0.18 ^{△△◆◆}	1.45 $\pm$ 0.18 ^{△△}	1.57 $\pm$ 0.33 ^{△△◆◆}
银花平感颗粒低剂量组	4 h	5	2.28 $\pm$ 0.18 ^{▲▲}	1.99 $\pm$ 0.23	2.35 $\pm$ 0.14 ^{▲▲}	2.35 $\pm$ 0.38
	16 h	5	3.75 $\pm$ 0.15 ^{▲▲&&}	3.67 $\pm$ 0.27 ^{▲▲&&}	2.88 $\pm$ 0.08 ^{▲▲&&}	3.47 $\pm$ 0.33 ^{▲▲&&}
	24 h	5	3.38 $\pm$ 0.32 ^{▲▲&&}	2.97 $\pm$ 0.24 ^{▲▲&&◆◆}	2.55 $\pm$ 0.27 ^{▲▲}	1.99 $\pm$ 0.17 ^{▲◆◆}
银花平感颗粒中剂量组	4 h	5	2.08 $\pm$ 0.20 ^{△△▲}	1.81 $\pm$ 0.14 ^{△△}	2.11 $\pm$ 0.29 ^{△△}	2.05 $\pm$ 0.35 [△]
	16 h	5	2.58 $\pm$ 0.21 ^{△△▼&}	2.54 $\pm$ 0.27 ^{△△▼&&}	2.31 $\pm$ 0.25 ^{△△▼}	3.20 $\pm$ 0.21 ^{△△&&}
	24 h	5	2.37 $\pm$ 0.42 ^{△△▼}	2.33 $\pm$ 0.19 ^{△△▲▲▼&&}	2.25 $\pm$ 0.37 ^{△△▲}	1.73 $\pm$ 0.25 ^{△◆◆}
银花平感颗粒高剂量组	4 h	5	1.18 $\pm$ 0.16 ^{△△▼##}	1.37 $\pm$ 0.34 ^{△△▼#}	1.32 $\pm$ 0.11 ^{△△▲▼##}	1.59 $\pm$ 0.15 ^{△△▼#}
	16 h	5	1.28 $\pm$ 0.17 ^{△△▲▲▼##}	1.90 $\pm$ 0.18 ^{△△▲▼##&&}	1.38 $\pm$ 0.21 ^{△△▼##}	1.83 $\pm$ 0.13 ^{△△▲▲▼##}
	24 h	5	1.17 $\pm$ 0.17 ^{△△▲▲▼##}	1.23 $\pm$ 0.14 ^{△△▲▼##◆◆}	1.24 $\pm$ 0.09 ^{△△▼##}	1.37 $\pm$ 0.15 ^{△△▼#◆}

注: TLR7, Toll 样受体 7; MyD88, 髓样分化因子 88; IRF7, 干扰素调节因子 7; NF- κ B p65, 核因子 p65; 与正常对照组同时间比较, * $P < 0.01$; 与模型对照组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与利巴韦林组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与中药低剂量组同时间比较, $\nabla P < 0.01$; 与中药中剂量组同时间比较, $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$; 与本组 4 h 比较, $\& P < 0.01$, $\&\& P < 0.01$; 与本组 16 h 比较, $\◆ P < 0.05$, $\◆◆ P < 0.01$

IRF7, 16 h NF- κ B p65 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 银花平感颗粒高剂量组 16、24 h TLR7、MyD88, 4 h IRF7, 16 h NF- κ B p65 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组 4 h 比较, 利巴韦林组 24 h TLR7, 16 h MyD88、NF- κ B p65 均明显升高, 24 h NF- κ B p65 mRNA 表达明显降低; 银花平感颗粒低剂量组 16、24 h TLR7、MyD88, 16 h IRF7、NF- κ B p65 mRNA, 银花平感颗粒中剂量组 16 h TLR7、MyD88、NF- κ B p65 及 24 h MyD88 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组 16 h 比较, 利巴韦林组、银花平感颗粒低剂量组、银花平感颗粒高剂量组 24 h MyD88、NF- κ B p65, 银花平感颗粒中剂量组 24 h NF- κ B p65 mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

中医学认为, 流感属“时行感冒”和“风温”范畴, 多系气候反常、感受邪病、疫疠而发病^[9]。我们认为时行感冒初起存在着风热时毒侵袭肺卫、肺失宣降、表郁较甚的基本病理变化。银花平感颗粒是防治流感疗效显著的方剂^[2-3], 方中以金银花为君药, 清热解毒、疏散风热; 以虎杖、葛根为臣药, 其中虎杖清热解毒, 葛根解肌发表、生津舒筋, 二药助君药清热解毒、疏散卫表之邪; 以麻黄、杏仁为佐药, 麻黄发汗、解表宣肺、散邪, 杏仁宣肺、止咳, 二者一宣一降, 相互为用, 共佐君药疏散卫表之邪; 以甘草为使药, 清热解毒以治疗气喘咳嗽, 并具调和诸药之功。用于时行感冒初起邪在肺卫证, 属风热时毒客表、肺失宣降、表郁较甚。

本实验结果显示, 银花平感颗粒不同抗病毒方式均有一定的抗病毒作用, 提示其抗病毒作用是通过多种方式来实现的。此外, 以不同给药方式给予银花平感颗粒抗病毒有效率不同, 通过治疗加药方式给予银花平感颗粒, 其抗病毒有效率最高, 为主要的抗病毒作用, 故本实验采用治疗方式给药。

TLRs 是一种固有免疫病原模式识别受体, 通过识别病原体相关分子模式, 激活天然免疫系统来抵抗病原微生物的入侵, 是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁^[10]。已知 TLRs 有 13 种, 其中 TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR9 与抗病毒有关^[11]。近年研究发现, 巨噬细胞可通过 TLR7 识别单链 RNA 病毒, 启动细胞内信号转导通路, 诱导特异性基因表达, 分泌细胞因子和趋化因子, 发挥抗病毒作用, 从而引起重要的先天免疫应答反应^[12]。

MyD88 是 TLRs 信号通路中的一个关键接头分子, 在传递上游信息和疾病发生发展中具有重要的作用^[13]。TLRs 信号转导途径分为 MyD88 依赖型和 MyD88 非依赖型, TLR7 信号转导为 MyD88 依赖性。其具体机制如下: 病毒被内吞后, 内体膜上 TLR7 识别病毒单链 RNA 后促进本身的二聚体化, 胞内段 TIR 与募集接头蛋白 MyD88 结合, MyD88 通过其死亡结构域与白细胞介素 1 受体相关激酶结合, 募集并活化下游 TRAF6 因子, 激活 IRF7, 使之磷酸化入核。此外, 活化的 TRAF6 还可使抑制性 KB 激酶 (IKK) 和促分裂原活化蛋白激酶 (MKK) 磷酸化, 激活核因子 (NF- κ B) 和激活蛋白 1 (AP-1), 与核内活化的 IRF7 一起诱导炎症细胞因子和 I 型干扰素的表达及分泌^[14]。

本研究结果发现, 模型组 RAW264.7 细胞中 TLR7、MyD88、IRF7 和 NF- κ B p65 mRNA 表达水平较正常对照组同时时间均显著提高, 且 16 h 达到最高峰, 表明 H1N1 感染后存在 TLR7/MyD88 信号通路的激活, 说明感染后的初级阶段, 机体的固有免疫系统最先发挥抵御外来病原体的入侵, 随着时间延长, 这些基因产物就可通过其介导的信号转导途径引起相关基因的表达, 启动和调节固有免疫系统, 并诱导适应性免疫的产生, 在病毒感染早期发挥作用。但是这些基因产物及炎症因子的过度表达会损伤组织, 加重流感病毒所致的病变程度。银花平感颗粒高、中剂量组均显著降低 TLR7、MyD88、IRF7 和 NF- κ B p65 mRNA 表达, 减少炎症因子的发生, 且具有剂量依赖性, 说明银花平感颗粒对流感病毒感染的巨噬细胞有一定的治疗作用, 其作用机制可能与抑制 TLR7/MyD88 信号通路的激活有关。本实验也发现同时时间银花平感颗粒高剂量组对 TLR7、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 表达水平的下调作用较利巴韦林组更为显著, 说明银花平感颗粒高剂量组的抗病毒效果略优于利巴韦林组。

综上所述, 银花平感颗粒体外可明显抑制流感病毒的复制, 主要是通过治疗加药来发挥抗病毒作用, 其抗病毒效果可能与其抑制 TLR7/MyD88/IRF7 信号通路及 NF- κ B p65 的激活有关。

参考文献

- [1] 张强, 赵庆杰, 熊瑞生, 等. 抗流感病毒药物研究进展 [J]. 药学学报, 2010, 43(3): 289-299.
- [2] 彭慧琴, 徐哲明, 万海同, 等. 金平感颗粒对流感病毒的抑制作用 [J]. 浙江中医杂志, 2005, 40(2): 87-88.
- [3] 彭学谦, 何昱, 周惠芬, 等. 银花平感颗粒体内抗甲型 H1N1 流感病毒作用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40

(19): 3845-3850.

- [4] PENG XQ, ZHOU HF, LU YY, et al. Protective effects of Yinhuapinggan granule on mice with influenza viral pneumonia [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 30: 85-93. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.029.
- [5] PENG XQ, ZHOU HF, ZHANG YY, et al. Antiviral effects of Yinhuapinggan granule against influenza virus infection in the ICR mice model [J]. J Nat Med, 2016, 70(1): 75-88.
- [6] MUENCH H, REED L. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. Am J Epidemiol, 1938, 27(3): 493-497.
- [7] 刘晓婷, 张沂, 顾立刚, 等. 黄芩苷体外抗流感病毒作用的研究 [J]. 天津中医药, 2015, 32(4): 229-233.
- [8] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] 霍炳杰, 常靓, 刘羽, 等. 不同煎煮时间银翘散含药血清对甲型流感病毒刺激巨噬细胞 Toll 样受体及其下游 MyD88 依赖和非依赖途径的影响 [J]. 中医杂志, 2016, 57(7): 601-604.

- [10] TANAKA A, NAKAMURA S, SEKI M, et al. Toll-like receptor 4 agonistic antibody promotes innate immunity against severe pneumonia induced by coinfection with influenza virus and Streptococcus pneumoniae [J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(7): 977-985.
- [11] 罗兵, 李涛, 徐元宏. Toll 样受体的信号转导及抗感染免疫研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 165-169.
- [12] GU S, YIN N, PEI J, et al. Understanding molecular mechanisms of traditional Chinese medicine for the treatment of influenza viruses infection by computational approaches [J]. Mol Biosyst, 2013, 9(11): 2696-2700.
- [13] DOWNES JE, MARSHALL-CLARKE S. Innate immune stimuli modulate bone marrow-derived dendritic cell production in vitro, by toll-like receptor-dependent and -independent mechanisms [J]. Immunol, 2010, 131(4): 513-524.
- [14] BUITENDIJK M, ESZTERHAS SK, HOWELL AL. Gardiquimod: a Toll-Like receptor-7 agonist that inhibits HIV type 1 infection of human macrophages and activated T cells [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013, 29(6): 907-918.

Anti influenza A (H1N1) Virus Effect of *Yinhua Pinggan Keli* (银花平感颗粒): in vitro Study

DU Haixia¹, WAN Haitong¹, HE Yu¹, YANG Jiehong¹, LU Yiyu², ZHOU Huifen¹

(1. Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053; 2. Center for Diseases Control and Prevention of Zhejiang Province)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of *Yinhua Pinggan Keli* (银花平感颗粒) in anti influenza A/PR8/34 (H1N1) virus in vitro. **Methods** MTT method was used to detect maximum non-toxic concentration of drugs against macrophages (TC₀), median toxic concentration against cells (TC₅₀) and antiviral efficiency of different drug administration methods. Half inhibited concentration (IC₅₀) and treatment index (TI) in virus infection were calculated by probit regression analysis. RAW264.7 cells infected by influenza H1N1 virus were intervened by ribavirin (62.5 μg/ml), *Yinhua Pinggan Keli* of high (500 μg/ml), medium (250 μg/ml) and low (125 μg/ml) dose. After 4, 16 and 24 hours, the cells were collected. Changes of Toll-like receptor 7 (TLR7), myeloid differentiation factor 88 (MyD88), nuclear factor p65 (NF-κB p65), interferon regulatory factor 7 (IRF7) of cells in all groups were examined by real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) method. **Results** *Yinhua Pinggan Keli* of 31.25 to 500 μg/ml might reduce influenza virus replication. The antiviral effective rate in the medication group was the highest among all groups after administration for 24 h. Compared with the normal control group at the same time point, the expressions of TLR7, MyD88, IRF7 and NF-κB p65 mRNA in the model control group increased, with peak at 16 h. The difference was significant compared with 4 h and 24 h in the same group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After medicine intervention, the expression levels of TLR7, MyD88, IRF7 and NF-κB p65 mRNA induced by influenza virus for 4, 16 and 24 h were down-regulated in the *Yinhua Pinggan Keli* high, medium dose groups and the ribavirin group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Especially, the down-regulation effect on the expressions of TLR7, MyD88 and NF-κB p65 mRNA in the *Yinhua Pinggan Keli* high dose group was superior to that in the ribavirin group. **Conclusion** *Yinhua Pinggan Keli* in vitro might inhibit influenza virus replication. The anti-virus effect was mainly by therapeutic medication, which might relate to inhibiting TLR7/MyD88/IRF7 signaling pathway and activation of NF-κB p65. The treatment effect on influenza of high dose was superior to ribavirin.

Keywords *Yinhua Pinggan Keli* (银花平感颗粒); influenza A (H1N1) virus; mouse alveolar macrophage; TLR7/MyD88 signaling pathway

(收稿日期: 2017-03-07; 修回日期: 2017-09-15)

编辑: 王利芬