

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.07.016

实验研究

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

霍炳杰^{*}, 常靓, 刘羽, 李梅, 刘亚娴

(河北医科大学第四医院, 河北省石家庄市健康路 12 号, 050011)

摘要 目的 探讨银翘散抗甲型流感病毒的最佳煎煮时间。方法 将银翘散药粉分别制备成浓度为 0.25 (低)、0.50 (中)、1.00 g/ml (高) 的溶液, 加热到 100℃ 时开始计时, 分别煎煮至 3、6、12 min, 4℃ 保存备用。55 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、流感病毒组、3 min 组 (高、中、低浓度)、6 min 组 (高、中、低浓度)、12 min 组 (高、中、低浓度)。3、6、12 min 组大鼠给予相应浓度的银翘散溶液灌胃, 正常对照组及流感病毒组给予等量生理盐水, 每天 2 次, 每次 2 ml, 共 5 天, 腹主动脉取血制备含药血清。用甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 刺激小鼠巨噬细胞株 Ana-1, 同时给予不同煎煮时间下的银翘散含药血清进行干预, 培养 24 h 后吸取上清, 检测 Toll 样受体 3、4 型 (TLR3、TLR4) mRNA 和蛋白表达, 及其下游髓样分化因子 (MyD88) 依赖和非依赖途径相关因子 (MyD88、TRAF-6、TRIF、TRAM) mRNA 的表达。结果 与正常对照组比较, 流感病毒组 TLR3、TLR4、MyD88、TRAF-6、TRAM、TRIF mRNA 的表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 经不同煎煮时间、不同浓度银翘散干预后, 各治疗组细胞的 TLR3、TLR4、MyD88、TRAF-6、TRAM 和 TRIF mRNA 均明显下降 ($P < 0.05$), 尤以 3 min 组中、高浓度下降最为明显, 较 12 min 组同浓度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与流感病毒组比较, 6 min 组中浓度组对 TLR3 蛋白的表达有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 3 min 组和 6 min 组各浓度均可降低 TLR4 蛋白含量 ($P < 0.05$)。与 12 min 组同浓度比较, 3 min 组高浓度和 6 min 组中、高浓度对 TLR4 蛋白的表达有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 银翘散抗甲型流感病毒作用的最佳煎煮时间可能为煮沸后 3~6 min。

关键词 银翘散; 煎煮时间; 甲型流感病毒; 巨噬细胞; Toll 样受体; 髓样分化因子

银翘散源于《温病条辨》, 由清代温病学家吴鞠通创制, 并在临床实践中广为应用。文中对于本方的煎煮时间有详细记载, 其方后载“香气大出, 即取服, 勿过煮”^[1], 但“过煮”“香气大出”究竟是多长时间至今仍无定论。Toll 样受体 (TLRs) 是一种模式识别受体, 它对机体免疫特别是感染免疫具有重要意义, 是构成机体免疫的第一道防线^[2], 在启动天然免疫和调节获得性免疫中均发挥重要作用^[3]。其中 TLR4 被激动以后, 可通过 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径作用于炎症基因和干扰素诱导基因的转录^[4]。本研究从

mRNA 和蛋白水平观察不同煎煮时间下的银翘散含药血清对甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 刺激小鼠巨噬细胞株 Ana-1 Toll 样受体 3、4 型 (TLR3、TLR4) 及其下游髓样分化因子 (MyD88) 依赖和非依赖途径相关因子 (MyD88、TRAF-6、TRIF、TRAM) 的影响, 以探讨银翘散治疗甲型流感的最佳煎煮时间。

1 材料与方法

1.1 动物、病毒和细胞

清洁级雄性 SD 大鼠 55 只, 4~6 周龄, 体重 (210 ± 10) g, 购自河北省实验动物中心, 实验动物合格证编号: 1412004。甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1, 由中国预防医学科学院病毒研究所提供。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81202679)

^{*} 通讯作者: hbj331@163.com, 15032818025

小鼠巨噬细胞株 Ana-1, 购自中国科学院细胞库。

1.2 药物、主要试剂和仪器

银翘散 (银花、连翘、桔梗、淡豆豉、甘草、竹叶、荆芥、薄荷、牛蒡子、芦根) 由河北医科大学第四医院中药房提供, 药物配伍比例参照《温病条辨》^[1], 将各药轧成细面后混匀。使用 500 ml 的烧杯, 在烧杯中加入 200 ml 水, 低、中、高浓度分别加入 50、100、200 g 药面, 分别制备成浓度为 0.25、0.50、1.00 g/ml 的溶液。用电磁炉 160℃ 加热, 当药汁温度达到 100℃ 时开始计时, 分别煎煮至 3、6、12 min, 4℃ 保存。

M-MLV 反转录酶 (批号: M1701), Promega 公司; RNA 酶抑制剂 (批号: D2310C), Takara 公司; MyD88 (批号: BS6083)、TRAF-6 (批号: BS3684)、TRAM (批号: 12705-1-AP)、TLR3 (批号: BS6749)、TLR4 (批号: BS3489) 等多克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品。SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (型号: RR420A), Takara 公司; 紫外分光光度计 (型号: DU 800), 美国 Beckman Coulter 公司; 凝胶成像系统 (版本: 170-8170), 美国 Bio-Rad 公司; 荧光定量 PCR 仪 (型号: 7500HT), ABI 公司。

1.3 不同煎煮时间银翘散含药血清制备

55 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组、流感病毒组、3 min 组 (高、中、低浓度)、6 min 组 (高、中、低浓度)、12 min 组 (高、中、低浓度), 正常对照组和流感病毒组每组 5 只, 3 min 组、6 min 组和 12 min 组每个浓度 5 只。仅流感病毒组给予甲型流感病毒鼠肺适应株 FM1 0.05 ml 滴鼻。3 min 组 (高、中、低浓度)、6 min 组 (高、中、低浓度)、12 min 组 (高、中、低浓度) 分别给予相应银翘散溶液灌胃, 正常对照组和流感病毒组给予等量生理盐水。各组大鼠每天灌胃 2 次, 每次 2 ml, 共 5 天。于末次灌胃后 1 h 乙醚麻醉动物无菌条件下经腹主动脉取血, 4℃ 静置 1 h, 3000 r/min 离心 15 min, 分离含药血清。将同组大鼠含药血清混匀, 56℃ 水浴 30 min 灭活血清, 微孔滤膜过滤除菌, 冻存管分装, -20℃ 保存备用。

1.4 细胞培养及干预方法

小鼠巨噬细胞株 Ana-1 培养在含 10% 新生牛血清的 1640 培养基中, 培养在 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 2~3 天换液并传代 1 次, 取生长状态良好的 Ana-1 细胞株进行实验。小鼠巨噬细胞株 Ana-1 加入 24 孔板, 每孔 1 ml 细胞悬液, 分组同上, 除

正常对照组外其余各组给予 0.5 ml FM1 病毒刺激, 同时给予相应血清 1 ml 进行干预, 每组设 4 个复孔, 常规培养箱中培养 24 h 终止, 吸出上清, -80℃ 冰箱保存备用。

1.5 细胞 TLR3、TLR4 及其下游 MyD88 依赖和非依赖途径相关因子 mRNA 检测

采用荧光定量 PCR 法, 参照试剂操作说明提取细胞总 RNA, 以 cDNA 做模板, 反应体系为: cDNA 模板 (稀释 10 倍) 4 μl; 反向通用引物 (北京华大基因公司合成) 10 μM 1 μl; 正向引物 10 μM 1 μl; ROX Reference Dye II 1 μl; SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 2 × 25 μl; 加 DEPC 水至 50 μl。按下述反应条件, 进行 PCR 扩增: 95℃ 10 min, 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环, 70~95℃ 绘制熔解曲线。

1.6 细胞 TLR3、TLR4 蛋白检测

采用 Western blot 方法, 上述细胞培养 24 h 后, 收集细胞, 提取蛋白并定量, 同时配制 10% 分离胶、4% 的浓缩胶, 用微量移液器上样, 电泳, 转膜 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜。免疫反应: 分别加 TLR3 和 TLR4 一抗 (1:1000) 孵育 2 h, 以 β-actin 作为内参, 洗膜, 加二抗稀释液 (1:1000) 孵育 2 h, 进行化学发光反应, 显影和定影, 扫描胶片, 用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.7 统计学方法

采用 SAS V8 软件进行数据处理, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 TLR3、TLR4 及其下游 MyD88 依赖和非依赖途径相关因子 mRNA 比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 流感病毒组 TLR3、TLR4、MyD88、TRAF-6、TRAM、TRIF mRNA 表达水平均明显升高 (P < 0.05); 经不同煎煮时间、不同浓度银翘散含药血清干预后, 各治疗组细胞的 TLR3、TLR4、MyD88、TRAF-6、TRAM 和 TRIF mRNA 明显下降 (P < 0.05), 尤以 3 min 组中、高浓度下降最为明显, 较 12 min 组同浓度差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.2 各组细胞 TLR3、TLR4 蛋白含量比较

表 2 示, 与流感病毒组比较, 6 min 组中浓度组对 TLR3 蛋白的表达有显著抑制作用 (P <

表 1 各组细胞 TLR3、TLR4 及其下游 MyD88 依赖和非依赖途径相关因子 mRNA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TLR3	TLR4	MyD88	TRAF-6	TRAM	TRIF
正常对照组	4	1.018 ± 0.007	1.021 ± 0.011	1.072 ± 0.058	1.031 ± 0.037	1.043 ± 0.041	1.059 ± 0.043
流感病毒组	4	3.845 ± 0.086*	3.899 ± 0.092*	3.807 ± 0.069*	4.055 ± 0.150*	3.786 ± 0.319*	4.018 ± 0.144*
3 min 组	低浓度	4	2.847 ± 0.066 Δ [▲]	2.799 ± 0.111 Δ	2.386 ± 0.063 Δ [▲]	2.897 ± 0.102 Δ	2.333 ± 0.097 Δ [▲]
	中浓度	4	2.255 ± 0.044 Δ [▲]	2.237 ± 0.094 Δ [▲]	2.195 ± 0.068 Δ [▲]	2.424 ± 0.098 Δ [▲]	2.128 ± 0.126 Δ [▲]
	高浓度	4	2.157 ± 0.040 Δ [▲]	2.194 ± 0.125 Δ [▲]	2.121 ± 0.092 Δ [▲]	2.380 ± 0.057 Δ [▲]	1.996 ± 0.141 Δ [▲]
6 min 组	低浓度	4	3.133 ± 0.052 Δ	3.233 ± 0.124 Δ	3.089 ± 0.102 Δ	3.471 ± 0.073 Δ	2.836 ± 0.105 Δ
	中浓度	4	3.076 ± 0.063 Δ	3.146 ± 0.174 Δ	2.868 ± 0.099 Δ	3.297 ± 0.091 Δ	2.690 ± 0.129 Δ
	高浓度	4	2.921 ± 0.055 Δ [▲]	2.919 ± 0.086 Δ	2.770 ± 0.167 Δ	3.008 ± 0.106 Δ	2.573 ± 0.075 Δ
12 min 组	低浓度	4	3.349 ± 0.069 Δ	3.453 ± 0.080 Δ	3.479 ± 0.058 Δ	3.652 ± 0.093 Δ	3.394 ± 0.175 Δ
	中浓度	4	3.324 ± 0.045 Δ	3.425 ± 0.077 Δ	3.300 ± 0.086 Δ	3.611 ± 0.077 Δ	3.279 ± 0.167 Δ
	高浓度	4	3.293 ± 0.024 Δ	3.406 ± 0.073 Δ	3.201 ± 0.077 Δ	3.601 ± 0.115 Δ	3.108 ± 0.127 Δ

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与流感病毒组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 12 min 组同浓度比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组细胞 TLR3、TLR4 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TLR3 / β -actin	TLR4 / β -actin
正常对照组	3	0.664 ± 0.019	0.501 ± 0.012
流感病毒组	3	0.771 ± 0.028	0.685 ± 0.018
3 min 组	低浓度	3	0.801 ± 0.012
	中浓度	3	0.712 ± 0.020
	高浓度	3	0.770 ± 0.024
6 min 组	低浓度	3	0.789 ± 0.022
	中浓度	3	0.232 ± 0.059*
	高浓度	3	0.741 ± 0.024
12 min 组	低浓度	3	0.744 ± 0.032
	中浓度	3	0.640 ± 0.050
	高浓度	3	0.650 ± 0.026

注: 与流感病毒组比较, * $P < 0.05$; 与 12 min 组同浓度比较, $\Delta P < 0.05$

0.05), 3 min 组和 6 min 组各浓度均可降低 TLR4 蛋白含量 ($P < 0.05$)。与 12 min 组同浓度比较, 3 min 组高浓度和 6 min 组中、对高浓度 TLR4 蛋白的表达有显著抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

流感属中医学“时行感冒”和“风温”的范畴, 分别散见于温病中的“风温”“春温”“湿温”“冬温”等病证中, 多系气候反常、感受邪毒、疫疠而发病。银翘散是预防和治疗流感疗效显著的方剂^[5-6]。石钺等^[7]曾对银翘散抗流感病毒活性进行研究, 结果显示其有良好的抗流感病毒作用, 并筛选出了银翘散抗流感病毒有效部位群。杨子峰等^[8]观察不同浓度银翘散煎剂对流感病毒导致细胞病变的抑制作用和改善小鼠肺炎严重程度的情况, 表明银翘散可改善流感病毒引起的小鼠肺炎症状, 延长生命, 对流感病毒感染小鼠有死亡保护作用。银翘散抗流感病毒的作用已被证实, 但究竟

银翘散煎煮多久抗流感病毒作用最强, 是否银翘散存在最佳煎煮时间? 因此, 本研究对银翘散抗病毒作用的最佳煎煮时间及其对相关信号通路干预机制进行了探讨。

1977 年人类发现了第一个存在于人细胞表面的 Toll 样蛋白, 并指出它对机体免疫特别是感染免疫具有重要意义^[9]。TLR4 被激动以后, 可通过以下两条细胞内信号转导途径作用于炎症基因和干扰素诱导基因的转录^[9]: 1) MyD88 依赖途径, 即 TLR4 被激动后, 其胞内部分募集接头蛋白 MyD88→激活 TRAF-6→激活 IKK→激活 NF- κ B→启动炎症因子相关基因的转录→产生和分泌 TNF- α 等。2) MyD88 非依赖途径, 即 TLR4 被激动后, 其胞内部分依次募集接头蛋白 TRAM 和 TRIF→激活 TRAF-6, RIP1 或 TBK1→分别激活 NF- κ B 或 IRF-3→启动 NF- κ B 相关的后期基因或干扰素诱导基因的转录, 产生和分泌白细胞介素或干扰素等。TLRs 作为先天性免疫的始动环节, 识别外源性微生物, 并保持其适当活性, 成为当前防治疾病的重要靶标^[9]。

本研究以小鼠巨噬细胞株 Ana-1 为研究对象, 在 mRNA 水平和蛋白水平分析不同煎煮时间的银翘散对 TLR3、TLR4 及下游 MyD88 依赖和非依赖途径的影响。结果显示, 不同煎煮时间、不同浓度的银翘散均能在一定程度上阻断 TLR3 和 TLR4 的高表达, 并能阻断 TLR4 信号转导的 MyD88 依赖和非依赖途径, 尤以 3 min (高、中浓度) 组和 6 min (高浓度) 组最显著, 由此推断银翘散的最佳煎煮时间可能为煮沸后 3~6 min, 从而为更加准确合理地应用该方提供客观而科学的依据。

参考文献

[1] 吴塘. 温病条辨 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 17-49.

- [2] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURN P, JANEWAY CAJR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.
- [3] KRAMMER F, PICA N, HAI R, et al. Chimeric hemagglutinin influenza virus vaccine constructs elicit broadly protective stalk-specific antibodies [J]. J Virol, 2013, 87(12): 6542-6550.
- [4] HEIL F, AHMAD-NEJAD P, HEMMI H, et al. The Toll-like receptor 7(TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily [J]. Eur J Immunol, 2003, 33(11): 2987-2997.
- [5] 杜力军, 凌一揆. 银翘散实验研究综述 [J]. 中成药, 1992, 14(3): 41.
- [6] 杨子峰, 黄碧松, 刘妮, 等. 银翘散抗甲 1 型流感病毒作用的实验研究 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(7): 1423-1424.
- [7] 石钺, 石任兵, 陆蕴如, 等. RP-HPLC 测定银翘散抗流感病毒有效部位群中牛蒡子苷的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(4): 293-294.
- [8] WAN Q, WANG H, HAN X, et al. Baicalin inhibits TLR7/MYD88 signaling pathway activation to suppress lung inflammation in mice infected with influenza A virus [J]. Biomed Rep, 2014, 2(3): 437-441.

Effects of Medicated Serum with *Yinqiao San* (银翘散) with Different Decocting Time on Influenza A Virus Stimulated Macrophage Toll-like Receptors and Downstream MyD88 Dependent and Independent Pathway

HUO Bingjie, CHANG Liang, LIU Yu, LI Mei, LIU Yaxian

(Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050011)

ABSTRACT Objective To study best decocting time of *Yinqiao San* against influenza A virus. **Methods** The researchers prepared powder of *Yinqiao San* respectively into solutions with concentration 0.25 g/ml (low), 0.50 g/ml (medium) and 1.00 g/ml (high). Timing after those solutions were heated to 100℃, the three solutions were respectively boiled for 3, 6, 12 min and reposit in 4℃ to standby. Fifty-five SD rats were randomly divided into normal control group, influenza virus group, 3 min group (high, medium and low concentration), 6 min group (high, medium and low concentration), 12 min group (high, medium and low concentration). The 3, 6, 12 min groups were given solutions of *Yinqiao San* with the corresponding concentration to gavage. The normal control group and the influenza virus group were given equal normal saline, 2ml each time, twice a day for five days. Took blood from abdominal aorta to prepare medicated serum. Rat-lung adapted strains of influenza A virus (FM1) was used to stimulate macrophage strains (Ana-1) of rats under intervention with medicated serum with *Yinqiao San* with different decocting time and absorbed supernatant after those were cultivated for 24 h. Expression of toll-like receptors type 3, 4 (TLR3, TLR4) mRNA and protein and mRNA of factors (MyD88, TRAF-6, TRIF, TRAM) related with dependent and independent pathway of its downstream myeloid differentiation factor (MyD88) were determined. **Results** Compared with the normal control group, expression levels of TLR3, TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM, TRIF mRNA in the influenza virus group significantly increased ($P < 0.05$). Under intervention with *Yinqiao San* with different decocting time and concentration, TLR3, TLR4, MyD88, TRAF-6, TRAM and TRIF mRNA of cells in each treatment group significantly decreased ($P < 0.05$), especially apparent in the 3 min group of medium and high concentration. There was statistically significant difference from the 12 min group with the same concentration ($P < 0.05$). Compared with the influenza virus group, the 6 min group with medium concentration significantly inhibited the expression of TLR3 protein ($P < 0.05$). In the 3 min group and the 6 min group with each concentration the content of TLR4 protein was reduced ($P < 0.05$). Compared with the 12 min group with the same concentration, the 3 min group with high concentration and the 6 min group with medium and high concentration had significant inhibition to expression of TLR4 protein ($P < 0.05$). **Conclusion** Best decoction time of *Yinqiao San* against influenza A virus was probably 3 ~ 6 min after boiling.

Keywords *Yinqiao San* (银翘散); decoction time; influenza A virus; macrophage; Toll-like receptors; myeloid differentiation factor

(收稿日期: 2015-09-08; 修回日期: 2015-11-27)

编辑: 邓 媛