

• 实验研究 •

流感病毒性肺炎湿热证小鼠 TLR-7 介导信号通路的变化

赖鹏华¹ 林培政^{2*} 王晓萍³ 刘 叶² 陈银环² 张奉学⁴ 何金洋⁴

(1. 厦门大学医学院中医系,福建省厦门市思明区思明南路 422 号,361005; 2. 广州中医药大学
温病学教研室; 3. 甘肃省中医院神经内科; 4. 广州中医药大学热带病研究所)

基金项目:国家自然科学基金—广东省联合基金项目(U0632009)

* 通讯作者:linpeizheng@gzhtcm.edu.cn, (020)39358999

[摘要] 目的 通过人工气候模拟,观察流感病毒性肺炎湿热证小鼠 Toll 样受体 7(TLR-7)介导信号通路的变化,探讨病毒性肺炎湿热证的物质基础。方法 将 50 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组 10 只、单纯湿热组 10 只、湿热模型组 15 只、单纯病毒组 15 只。单纯湿热组:全程高脂饲料喂养,连续 10 天置于气候箱;湿热模型组:全程高脂饲料喂养,连续 10 天置于气候箱,第 11 天接种病毒,接种病毒后不再置入气候箱;单纯病毒组:全程普通饲料喂养 14 天,不置入气候箱,第 11 天接种病毒 1 次,继续喂养 3 天,第 15 天处死采集标本,每组随机选取 8 个样本检测,比较各组 TLR-7、核因子- κ B(NF- κ B)、髓样分化因子 88(MyD88) mRNA 表达水平。结果 湿热模型组 TLR-7、MyD88、NF- κ B 三者 mRNA 表达水平较其他 3 组增高,但 TLR-7、MyD88 4 组间差异无统计学意义($P>0.05$),NF- κ B 水平湿热模型组高于其他 3 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 湿热因素干预能上调 TLR-7 介导信号因子,尤其是下游信号因子 NF- κ B,从而激发 Toll-NF- κ B 信号通路,导致湿热模型组小鼠肺脏病变程度较单纯病毒组重。

[关键词] 流感病毒;湿热证;Toll 样受体 7;核因子- κ B;髓样分化因子 88

Changes of TLR-7 Signal Pathway of Influenza Viral Pneumonia Mice with Damp-heat Syndrome

LAI Penghua¹, LIN Peizheng^{2*}, WANG Xiaoping³, LIU Ye², CHEN Yinhuang², ZHANG Fengxue⁴, HE Jinyang⁴

(1. Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. Gansu Provincial Hospital of TCM; 4. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the characteristic of damp-heat syndrome of viral diseases through observing the changes of signal pathway induced by TLR-7 transduction in mice with damp-heat syndrome of influenza viral pneumonia. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomized into control group (10 mice), damp-heat group (10 mice), model group (15 mice), and viral group (15 mice). The damp-heat group was fed with high-fat feed for the whole experimental process and put into the climate box for 10 days in succession. The model group was fed with high-fat feed for the whole experimental process, put into the climate box for 10 days in succession, and vaccinated with virus on the 11th day, then not back to the climate box again. The viral group was fed with normal feed for 14 days, not put into the climate box, and vaccinated with virus on the 11th day once, then fed for 3 days again. The animals were sacrificed on the 15th day, 8 samples were randomly selected from each group to detect the expression of TLR-7, NF- κ B, and MyD88 mRNA. **Results** The expressions of TLR-7, MyD88, and NF- κ B in the model group were higher than those in the viral group, but the difference of TLR-7 and MyD88 expressions in these two groups was not statistically significant, however the difference NF- κ B expression was statistically significant. The up-regulated amplitude of the three wasn't parallel. **Conclusion** Intervention with damp-heat may increase the TLR-7 signal factors, especially NF- κ B, which is the lower reach of pathway, thus aroused the Toll-NF- κ B signal pathway, leading to a more severe pathological condition and the higher mortality of mice with damp-heat syndrome.

Key Words influenza; virus; damp-heat syndrome; TLR-7; MyD88; NF- κ B

岭南地区由于其特殊的湿热环境导致流感发病多夹湿热^[1]。病毒性肺炎发病与病毒毒力和机体免疫应答相关,后者对疾病的表现和转归起着重要的

作用。TLRs 家族(TLRs)是天然免疫中重要的模式识别受体,同时也是连接天然免疫与获得性免疫的桥梁,在机体抗病原体感染中发挥重要的作用。

本研究通过比较观察流感病毒性肺炎湿热证小鼠 Toll 样受体 7(TLR-7)、髓样分化因子 88(MyD88)、核因子- κ B(NF- κ B)表达水平的变化,探讨岭南病毒性疾病湿热证,为湿热证的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠共 50 只,雌雄各半,体重 13~15g。由广东省医学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(粤)2003-2002。

1.2 饲料

高脂饲料配方:80%的基础饲料+8%的蜂蜜+12%的猪油,由广东省医学实验动物中心提供。

1.3 流感病毒

甲 1 型流感病毒毒种(H_1N_1)由中国药品生物制品检定所提供,广州中医药大学热带病研究所病毒室增强毒力,测定 $LD_{50}=4.25$,实验时取冷冻毒种用流水冲浸解冻后,将其稀释为每 0.5ml 含 $2LD_{50}$ 的病毒液。

1.4 实验试剂及仪器

Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号:15596026),逆转录试剂盒(Fermentas 公司,批号:K1622),Realtime PCR Master Mix(SYBRGreen,日本 TOYOBO 公司,批号:QPK-201),引物合成(上海英骏生物技术有限公司);人工气候箱(广东省医疗器械厂生产);7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.5 动物分组、给药及造模方法

50 只 BALB/c 小鼠,按随机数字表法随机分为正常对照组 10 只、单纯湿热组 10 只、湿热模型组 15 只、单纯病毒组 15 只。正常对照组:普通饲料喂养 14 天;单纯湿热组:全程高脂饲料喂养,连续 10 天置于气候箱,气候箱条件设置:温度 $(32\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、湿度 $90\%\pm 5\%$ 暴露,6h/天,不接种病毒,第 11 天不再置入气候箱继续喂养 3 天;湿热模型组:全程高脂饲料喂养,连续 10 天置于气候箱(气候箱条件设置如单纯湿热组)暴露,6h/天,第 11 天接种病毒(接种病毒方法:在乙醚轻度麻醉下,用浓度为 $2LD_{50}$ 的病毒液滴鼻感染小鼠,每只 0.05ml),接种病毒后不再置入气候箱,继续常温喂养 3 天;单纯病毒组:全程普通饲料喂养 14 天,不置入气候箱,第 11 天接种病毒 1 次(方法如湿热模型组),继续常温喂养 3 天。

1.6 标本采集及预处理

实验结束后,小鼠禁食不禁水 12h,第 15 天以

急性大失血法处死采集标本。每组随机选取 8 个标本检测。取约 $5\text{mm}\times 5\text{mm}$ 大小肺组织,立即放入液氮冻存管中, -80°C 低温保存。

1.7 小鼠肺组织 TLR-7、MyD88、NF- κ B 检测

采用半定量反转录聚合酶链反应(PCR)法检测。具体步骤如下:小鼠肺组织不断加液氮研磨成粉末状,再按 1:10 比例加 Trizol 提取 RNA,按照试剂盒要求操作。取 $10\mu\text{l}$ 制备好的 RNA 模板做逆转录反应,逆转录反应体系组成:模板 RNA $10\mu\text{l}$ 、Oligo(dT)引物 $1\mu\text{l}$ 、DEPC 处理水 $2\mu\text{l}$ 、5 倍 buffer $4\mu\text{l}$ 、RiboLock Ribonuclease inhibitor $1\mu\text{l}$ 、10mM dNTP mix $2\mu\text{l}$ 、M-MuLV 逆转录酶 $1\mu\text{l}$,转录条件为 43°C 1h。TLR7 引物:上游 5'-GGTG-GCAAAATTGGAAGATCC-3',下游 5'-AGCTG-TATGCTCTGGGAAAGGTT-3',扩增片段长度为 111bp;MyD88 引物:上游 5'-CAGCGAGGTTTG-CATCTTCTT-3',下游 5'-TCACTTTCTTGGG-GACTCAGG-3',扩增片段长度为 106bp;NF- κ B-P65 引物:上游 5'-ACGCGGATTCCTGTACACCT-3',下游 5'-CAGGAGCTCCACAGGACAGA-3',扩增片段长度为 113bp;GAPDH(内参照基因)引物:上游 5'-AACAGGGTGGTGGACCTCAT-3',下游 5'-GGGATAGGGCCTCTCTTGCT-3',扩增片段长度为 100bp。定量 PCR 采用 $25\mu\text{l}$ 体系,引物浓度为 250nmol/L ,扩增条件为: 95°C 1min,然后 95°C 15s, 60°C 1min,共 40 循环。最后进行定量分析,以目的基因与内参照基因的比值(P)表示目的基因 mRNA 的表达。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠 TLR-7 mRNA 表达水平比较

表 1 示,湿热模型组 TLR-7 mRNA 表达水平高于其他 3 组,单纯湿热组则低于其他 3 组,单纯病毒组与正常对照组数值相近,但 4 组之间 TLR-7 mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠 MyD88 mRNA 表达水平比较

表 1 示,湿热模型组 MyD88 mRNA 表达水平比正常对照组、单纯湿热组、单纯病毒组高,单纯湿热组则比其他 3 组低,但 4 组动物肺组织 MyD88 mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 TLR-7、MyD88、NF- κ B mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TLR-7	MyD88	NF- κ B-p65
正常对照组	8	1.56 $\pm$ 0.10	1.40 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$
单纯湿热组	8	1.50 $\pm$ 0.07	1.36 $\pm$ 0.11	1.42 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
湿热模型组	8	1.64 $\pm$ 0.26	1.58 $\pm$ 0.33	1.89 $\pm$ 0.14*
单纯病毒组	8	1.56 $\pm$ 0.12	1.45 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.28* Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与湿热模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组小鼠 NF- κ B mRNA 表达水平比较

表 1 示,湿热模型组、单纯病毒组动物肺组织 NF- κ B mRNA 表达水平较正常对照组升高($P < 0.01$);湿热模型组较单纯病毒组和单纯湿热升高明显($P < 0.05$)。单纯湿热组与正常对照组比较,NF- κ B mRNA 表达水平稍增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

TLRs 能特异性地识别病原相关分子模式(PAMPs),通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号转导入细胞内,产生复杂的级联信号反应导致 NF- κ B 信号通路的激活,引起 IFN- β 以及 TNF- α 等相应炎性介质的瀑布式释放,趋化和激活嗜中性白细胞,活化淋巴细胞,启动针对病原微生物的固有和获得性免疫^[2-3]。TLRs 介导抗病毒免疫途径主要有两条:MyD88 依赖途径和非 MyD88 依赖途径。Lund 等^[4]通过 TLR-7 缺陷小鼠体内研究推断流感病毒等 ssRNA 病毒通过 TLR7 刺激 IFN- α/β 应答。Diebold 等^[5]用聚乙烯亚胺(PEI)浓缩流感病毒 ssRNA 可以诱导野生型小鼠 pDC 产生 IFN- α 。研究发现^[6]TLR-7 对流感病毒的识别及其诱导的中性粒细胞炎症因子的分泌是必需的。因此实验选择 TLR-7、MyD88、NF- κ B 为观察指标。在 TLRs/RLRs 信号通路中,NF- κ B 主要通过经典途径被激活,故本研究检测的为与经典途径相关的 NF- κ B(p65)。实验结果提示,TLR-7、MyD88、NF- κ B 三者 mRNA 表达水平增高与流感病毒感染相关,但湿热模型组上调幅度较大,尤以 NF- κ B 明显,从而激发 Toll-NF- κ B 信号通路下游炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-12 等大量分泌,从而引起炎症反应,在吞噬病原体的同时,过度的炎症反应破坏正常组织结构和功能,因此湿热模型组小鼠肺脏病变程度较单纯病毒组重,死亡率也较高^[7]。

本实验在研究设计时,假设病毒入侵后,TLR-7 通过 MyD88 依赖通路启动胞内信号传导,活化因子 MyD88、NF- κ B 等转录因子三者表达增高,且三

者表达的增高为平行的,但后者假设未得到证实。实验结果显示,单纯病毒组和湿热模型组 TLR-7、MyD88 均值虽较正常组增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而单纯病毒组和湿热模型组 NF- κ B 均值较正常对照组增高幅度较大,且差异有统计学意义($P < 0.05$),三者上调幅度不平行。考虑有以下几种可能:①TLR-7 及 MyD88 表达水平与病毒毒力相关:本实验感染流感病毒浓度为 2LD₅₀,攻击量较小,毒力较弱,故 TLR-7 二者表达水平变化不大。②TLR-7 及 MyD88 表达水平与病程相关:TLR-7 于疾病进展过程中消耗,实验取材时间为疾病后期,故二者表达水平较低。③存在其他激活 NF- κ B 表达的通道:TLRs 相关免疫反应是复杂的、交叉的。已有报道^[8]Toll 样受体-3(TLR-3)在支气管和肺泡上皮细胞中组成型表达,这些细胞在遇到 A 型流感时受体会上调,增强了炎症信号,在 A 型流感病毒引起的严重炎症反应中发挥重要作用。依赖 MyD88 的信号通路为 TLRs 的共有通路,但 TLR-3 的信号通路和其他受体共有的信号通路有所不同,它介导的胞内信号传导通路除依赖 MyD88 的信号通路外,还可通过依赖 TRIF 的信号通路发生作用。由于 TRIF 中具有 TRAF 同源的结构域,因此在 IRAK 缺失的细胞中,当 TLR3 识别 dsRNA 后,也可通过 TRIF 作用于 TRAF6 使 TAK1 磷酸化而激活,激活的 TAK1 导致 IKK 和 MKK6 的磷酸化,最终使 NF- κ B 和 MAPK 信号途径被活化^[9]。该研究还显示,流感病毒引发的炎症反应中,TLR3 正是通过 TRIF 依赖的信号通路发挥作用,而非 MyD88 依赖通路。故本实验中 NF- κ B 上调幅度与 TLR-7、MyD88 不平行,可能与流感病毒入侵后,TLR3 通过 TRIF 依赖信号通路亦活化 NF- κ B,导致其上调幅度较大相关。

本实验结果显示,湿热因素干预能上调 TLR-7 介导信号因子,尤其下游信号因子 NF- κ B,从而激发 Toll-NF- κ B 信号通路,导致湿热模型组小鼠肺

(下转第 1495 页)

血通络之法,选用临床常用的化浊解毒活血通络中药制定本研究的协定处方,方中石菖蒲、黄连辟秽化浊,郁金活血兼有清心开窍之功,三药合而为君。地龙、川芎通达脑络气血之瘀滞,丹参、赤芍凉血活血,当归养血活血,诸药共担臣药之职。茯苓健脾渗湿,使痰浊无以生成。泽泻渗湿泄热,使浊毒之邪从下而出,为方中之佐。川芎上行头目兼有引经之用,为方中之使。该方切中脑缺血再灌注损伤之病机,共奏化浊解毒、活血通络之功。本研究表明化浊解毒活血通络法能够提高小鼠的学习记忆能力,改善脑络损伤所导致的行为学障碍。海马是脑缺血缺氧时最容易受损的部位之一^[8],因此我们还选用海马CA1区作为观察研究的对象,研究结果表明小鼠海马CA1区神经细胞形态学的优劣表现与各组小鼠的行为学成绩高低呈正相关,这与现代医学对海马CA1区功能的认识相一致。化浊解毒活血通络法能够从一定程度上抑制海马CA1区神经细胞的迟发性坏死,改善海马CA1区的神经细胞形态学表现,对脑缺血再灌注损伤小鼠的受损神经细胞有明显修复作用。

综上所述,化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤有比较明显的神经保护作用,也从一定程度

上佐证了浊毒致病理论与脑系疾病之间存在相关性。化浊解毒活血通络中药对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用机制可能是多元性的,还需要进一步探索,以便为化浊解毒活血通络法在临床的广泛应用提供有力证据。

参考文献

- [1] 甘照儒,桑栋楠. 脑缺血再灌注损伤级联反应研究进展[J]. 医学综述,2009,15(1):43-45.
- [2] 李佃贵,李海滨,裴林,等. 慢性萎缩性胃炎从浊毒论治[J]. 四川中医,2004,22(1):17.
- [3] 吴深涛. 糖尿病病机的后变要素——浊毒[J]. 上海中医药大学学报,2004,18(1):24.
- [4] 许金秀,杨牧,周红. 大鼠永久性大脑中动脉阻塞模型的建立[J]. 四川动物,2010,29(3):461-465.
- [5] 王正品,李佃贵,杜艳茹,等. 浊毒致病论与现代中医病因学[J]. 中医杂志,2010,51(1):11-13.
- [6] 赵进喜,庞博. 中医学“浊”的涵义及其临床意义[J]. 中医杂志,2009,50(7):581-584.
- [7] 许筱颖,郭霞珍. 浊毒致病理论初探[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(1):28-29.
- [8] 曹仁存. 反复性脑缺血与神经元选择性易损性[J]. 国外医学脑血管疾病分册,1995,3(6):293-296.

(收稿日期:2010-11-24;修回日期:2011-05-18)

[编辑:行之]

(上接第1491页)

脏病变程度较单纯病毒组重,死亡率也较高^[7]。TLRs介导反应是复杂的、交叉的,目前国内外研究显示流感病毒与TLR-3亦相关,本实验仅对TLR-7进行观察,未对TLR-3进行观察,通路之间的相互影响尚未弄清与阐明,需进一步研究证实。

参考文献

- [1] 林棉,缪英年,吴志光,等. 岭南流感的证型特点及治法研究[J]. 中国中医急症,2007,16(12):1493-1493,1500.
- [2] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults[J]. Cell, 1996,86(6):973-983.
- [3] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol,2003,21:335-376.
- [4] Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(15): 5598-5603.
- [5] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral

responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. Science,2004,303(5663):1529-1531.

- [6] Wang JP, Bowen GN, Padden C, et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus[J]. Blood,2008,112(5):2028-2034.
- [7] 赖鹏华,林培政,王晓萍,等. 小鼠流感病毒性肺炎湿热证造模方法探讨[C]. 第三届中医药现代化国际科技大会·中医药防治重大传染病的研究论文集. 成都:四川科学技术出版社,2010:354-358.
- [8] Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 5571-5580.
- [9] Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program[J]. Immunity,2002, 17(3):251-263.

(收稿日期:2010-12-14;修回日期:2011-05-17)

[编辑:行之]