



· 药理 ·

# 毒热平注射液对巨噬细胞 TIR 信号通路的影响

张艳丽<sup>1</sup>, 王宁萍<sup>1</sup>, 顾立刚<sup>2</sup>, 李澎涛<sup>2\*</sup>

(1. 宁夏医科大学 病原生物学与免疫学教研室, 宁夏 银川 750004;

2. 北京中医药大学 中医药抗病毒教育部重点实验室, 北京 100029)

**[摘要]** 目的: 研究毒热平注射液对流感病毒感染的小鼠腹腔巨噬细胞株 Ana-1 细胞 TIR (Toll/IL-1 receptors) 信号传导通路的影响。方法: 用 100 TCID<sub>50</sub> 流感病毒亚甲型鼠肺适应株 A/FM/1/47 (H1N1) 感染小鼠腹腔巨噬细胞株 Ana-1 后换用 10, 1 mg · L<sup>-1</sup> 含药维持液继续培养, 分别于 12, 24 h 弃细胞上清液并收集细胞, 提取巨噬细胞 RNA, 进行实时定量 PCR 反应 (RT-PCR), 动态测定毒热平注射液对病毒感染前后巨噬细胞 TIR 信号传导通路中各信号蛋白: Toll 样受体 7 (TLR7)、髓样分化因子 88 (MyD88)、IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK4)、肿瘤坏死因子相关激酶 6 (TRAF6) 和核因子 κB (NF-κB) mRNA 表达水平的影响。结果: 毒热平注射液可剂量依赖性地下调病毒感染巨噬细胞 TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6, NF-κB mRNA 的表达水平。结论: 毒热平注射液能通过调节 TIR 信号传导通路各信号蛋白的活性发挥抗病毒感染作用。

**[关键词]** Ana-1; 毒热平注射液; 流感病毒; TIR; TLR7

固有免疫应答是机体抵御微生物感染的第一道防线<sup>[1]</sup>。参与固有免疫应答的细胞主要有树突状细胞 (DC)、巨噬细胞以及中性粒细胞等。这些细胞可通过一类属于 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 家族的受体识别入侵病原体。TLRs 被刺激因子配体激活后产生“瀑布式信号”反应, 促使前炎症因子产物释放和其后的免疫应答。目前研究发现病毒感染的巨噬细胞 TLR7 表达上调, 巨噬细胞可通过 TLR7 介导识别病毒 ssRNA, 通过 TIR (Toll/IL-1 receptors) 信号传导途径, 主要是 MyD88 依赖的信号通路发挥先天抗病毒免疫反应, 导致共刺激分子的活化和细胞因子的产生, 并引发随后的适应性免疫应答<sup>[2]</sup>。如果该通路活化失控, 则会导致大量前炎症介质产生, 导致机体的炎症损伤。本实验旨在探讨毒热平注射液对流感病毒感染后巨噬细胞 TLR7 的表达及 TIR 信号传导通路各信号蛋白活性的影响, 以期发现该药抗病毒作用的分子靶点。

## 1 材料

### 1.1 病毒 流感病毒亚甲型鼠肺适应株 A/FM/1/

47 (H1N1), 中国中医科学院中医所提供, 本实验室 - 76 °C 保存备用。于 9 日龄鸡胚尿囊腔连续传代 2 次后, 测血凝滴度为 1:512。

**1.2 细胞** 狗肾细胞株 (MDCK) 购自中国军事医学科学院细胞室, 由本室传代后使用; 小鼠腹腔巨噬细胞株 Ana-1 购自南京凯基生物科技发展有限公司, 由本室传代后使用。

**1.3 药物** 毒热平注射液 (DRP), 由黄芩、栀子、灯盏花和猪胆粉 4 味药物制成的中药复方注射剂, 棕色液体, 含生药 17.4 g · L<sup>-1</sup>, 由广东省康美药业有限公司开发提供。

**1.4 试剂** Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培养基和 RPMI-1640 培养基 (均为 GBICO 公司); 新生牛血清 (民海生物公司)。生长液: 含 10% 新生牛血清的 1640 培养液; 维持液: 不含血清而含 2 mg · L<sup>-1</sup> 胰蛋白酶的 1640 培养液; 消化液: 含 0.5% 胰蛋白酶和 0.02% 的乙二胺四乙酸 (EDTA)。引物及相关试剂由赛百盛生物公司合成提供; RT 逆转录试剂盒 (Fermentas 公司); SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (美国应用生物公司)。一抗: P65 (sc-372) 为 Santa cruz 产品; 二抗 (抗兔) (ZB-2301) 购自北京中山生物技术有限公司。

## 2 方法

**2.1 病毒感染性测定 (TCID<sub>50</sub> 的测定)** 用无血清

**[收稿日期]** 2009-07-27

**[基金项目]** 宁夏医科大学特殊人才启动项目 (XT200802)

**[通信作者]** \* 李澎涛, Tel: (010) 64287015, E-mail: lptao@263.net

**[作者简介]** 张艳丽, Tel: (0951) 6980102, E-mail: wi\_ntersweet@

126.com



DMEM 培养液对流感病毒 FM1 株行连续 10 倍递次稀释,将各稀释度的病毒接种于  $3 \times 10^8$  个/L 的 MD-CK 细胞中,每个稀释度平行做 6 个复孔,同时设正常细胞对照。37 °C 吸附 2 h 后吸弃病毒液换用维持液继续培养,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 法计算病毒的 TCID<sub>50</sub> (median tissue culture infective dosage)。流感病毒 FM1 的 TCID<sub>50</sub> =  $1 \times 10^{-4.3}$ 。

**2.2 小鼠巨噬细胞株 Ana-1 的培养** 复苏小鼠腹腔巨噬细胞 Ana-1,将细胞混悬于生长液中,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,次日换液,3 d 后传代 1 次,取生长状态良好的 Ana-1 细胞,消化液作用 5 min 后,弃去消化液,加入适量生长液,吹打细胞,计数并调细胞  $3 \times 10^9$  个/L,移入 12 孔板,每孔加细胞悬液 1 mL,贴壁培养 4 h 后弃去未贴壁的细胞。

**2.3 药物细胞毒性试验(MTT 比色法)** 待 Ana-1 细胞生长状态最好时,消化细胞,用生长液调整细胞至所需浓度,将该细胞液加入 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL,于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至致密细胞单层。用维持液将毒热平注射液(DRP)稀释为不同浓度,加入细胞培养板中,每孔 100 μL,每

个药物稀释浓度平行做 3 个复孔,同时设正常细胞对照。于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后,用 MTT(终质量浓度为  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )比色法检测药物对 Ana-1 细胞的毒性,按 Reed-Muench 法计算药物最大无毒浓度(TC<sub>0</sub>)和半数中毒浓度(TC<sub>50</sub>)。

**2.4 毒热平注射液作用于病毒感染的巨噬细胞** 用维持液稀释 100 TCID<sub>50</sub> 的流感病毒 FM1 株,每孔 0.5 mL 于 37 °C 吸附单层 Ana-1 细胞 1.5 h 后,吸弃病毒液用温浴的 PBS 清洗细胞 2 遍后,分别换用  $10, 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的含药维持液作为实验药物组,同时设有正常细胞对照组和病毒对照组,每浓度 2 个复孔。37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,分别孵育 12, 24 h 后,吸弃各孔细胞上清液,将 12 孔细胞培养板用封口膜封闭、标示后迅速放入 -76 °C 保存。

**2.5 TIR 信号传导通路各信号蛋白 mRNA 活性的测定** 严格按试剂盒说明步骤提取巨噬细胞 RNA,采用 RT-PCR 方法(引物序列见表 1)测定 TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6, NF-κB p65 mRNA 的表达:PCR 扩增条件为 95 °C 3 min 变性,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 45 s;共 40 个循环,最后是 72 °C 7 min 延伸。以 β-actin 作为内参。反应完毕后对荧光定量 PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下扫描分析结果,同时对扩增产物作熔解曲线。

表 1 TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6, NF-κB 的引物序列

| 引物名称      | 引物序列  | 产物长度/bp |
|-----------|---|---------|
| TLR 7     | F:5'-TGCCACCTAATTTACTAGAGCTCTATCTTTAT-3'<br>R:5'-TAGGTCAAGAACTTGCAACTCATTG-3' | 295     |
| MyD88     | F:5'-CCAGAGTGGAAAGCAGTGTC -3'<br>R:5'-GTCCTTCTTCATCGCCTTGT-3'                 | 225     |
| IRAK4     | F:5'- AATAACACCCAAATCTGACA-3'<br>R:5'- AGAGTACATTGCTTCCACC-3'                 | 205     |
| TRAF6     | F:5'-TGACTTTGTGTTTTCTGGCTCTTAC-3'<br>R:5'-TAGGTTAGATCTTGGTGACAGATCA-3'        | 81      |
| NF-κB p65 | F:5'-CGAAACTCAACTTCTGTCCC -3'<br>R:5'-CATGGCTGAGGAAGGGAC -3'                  | 189     |
| β-actin   | F:5'-GTGGGAATGGGTCAGAAG-3'<br>R:5'-GGTACTTCAGGTCAGGATA-3'                     | 75      |

**2.6 统计学方法** 实验数据采用 SPSS 软件进行统计分析。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

### 3 结果

**3.1 药物对细胞的毒性测定** 检测药物的最大无

毒浓度(TC<sub>0</sub>)为  $1.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,半数毒性浓度(TC<sub>50</sub>)为  $2.73 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.2 信号蛋白 mRNA 扩增产物凝胶电泳分析** 电泳结果表明,扩增的基因长度包括内参 β-actin 均符合设计长度,结果与荧光定量 PCR 一致,说明整个



反应体系准确、可靠。

**3.3 信号蛋白 mRNA 扩增溶解曲线** 反应完毕后对扩增产物作溶解曲线,未见其他杂峰,无非特异性扩增。

**3.4 毒热平注射液对信号蛋白 mRNA 表达的影响**

以样本 cDNA 稀释后求得的  $\beta$ -actin 的扩增标准曲线斜率为  $-3.273$ ,相关系数为  $-0.998$ ,模板浓度对数值与 Ct 值之间呈良好的线性关系。根据标准

表 2 毒热平注射液对 TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6, NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | 剂量<br>/mg · L <sup>-1</sup> | TLR7                        |                             | MyD88                       |                             | IRAK4                       |                             | TRAF6                       |                             | NF- $\kappa$ B              |                             |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|      |                             | 12 h                        | 24 h                        | 12 h                        | 24 h                        | 12 h                        | 24 h                        | 12 h                        | 24 h                        | 12 h                        | 24 h                        |
| 细胞对照 | -                           | 0.316 ± 0.004               | 0.249 ± 0.002               | 0.221 ± 0.003               | 0.211 ± 0.004               | 0.111 ± 0.004               | 0.087 ± 0.002               | 0.211 ± 0.002               | 0.191 ± 0.001               | 0.079 ± 0.002               | 0.072 ± 0.003               |
| 病毒对照 | -                           | 1.749 ± 0.002 <sup>1)</sup> | 1.572 ± 0.004 <sup>1)</sup> | 2.186 ± 0.005 <sup>1)</sup> | 1.865 ± 0.006 <sup>1)</sup> | 0.744 ± 0.003 <sup>1)</sup> | 0.723 ± 0.003 <sup>1)</sup> | 1.975 ± 0.006 <sup>1)</sup> | 1.961 ± 0.004 <sup>1)</sup> | 0.66 ± 0.005 <sup>1)</sup>  | 0.687 ± 0.005 <sup>1)</sup> |
| 毒热平  | 1.0                         | 1.335 ± 0.008 <sup>2)</sup> | 0.765 ± 0.008 <sup>2)</sup> | 1.332 ± 0.003 <sup>2)</sup> | 0.664 ± 0.004 <sup>2)</sup> | 0.573 ± 0.003 <sup>2)</sup> | 0.411 ± 0.007 <sup>2)</sup> | 1.548 ± 0.009 <sup>2)</sup> | 0.861 ± 0.004 <sup>2)</sup> | 0.328 ± 0.008 <sup>2)</sup> | 0.227 ± 0.007 <sup>2)</sup> |
|      | 10                          | 0.573 ± 0.004 <sup>2)</sup> | 0.359 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.445 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.297 ± 0.008 <sup>2)</sup> | 0.315 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.183 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.684 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.402 ± 0.002 <sup>2)</sup> | 0.207 ± 0.002               | 0.149 ± 0.002 <sup>2)</sup> |

注:与病毒对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.001$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

TLRs 是先天性免疫识别的主要受体,亦是一种模式识别受体,仅在固有免疫中发挥重要作用,而且可诱导适应性免疫应答的产生。近年研究发现 pDC 和巨噬细胞可通过 TLR7 介导识别病毒 ssRNA,从而启动 TLR7 依赖的抗病毒机制。TIR 信号传导通路包括髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径和 MyD88 不依赖途径。目前的研究表明,TLR7 以 MyD88 依赖的信号通路 (MyD88-dependent pathway) 活化免疫细胞。MyD88 依赖的信号通路涉及多种信号蛋白,研究较为清楚的包括接头分子 MyD88,IL-1 受体相关激酶 4 (IL-1 receptor associated kinase 4, IRAK4)、肿瘤坏死因子相关激酶 6 (TNF receptor associated kinase 6, TRAF6)、丝裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) 以及核因子 NF- $\kappa$ B。LTR7 与流感病毒结合后促进本身的二聚体化以及与连接蛋白 MyD88 的结合,MyD88 通过其死亡域 (death domain) 与白细胞介素-1 受体相关激酶 (IRAK) 结合,两者作用导致 IRAK 的自身磷酸化,从而激活肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (IRAF-6),使有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族活化,其中 NF- $\kappa$ B 诱导激酶激活 I- $\kappa$ B 家族  $\alpha, \beta$  激酶,导致 I- $\kappa$ B 家族的广泛磷酸化而降解,使 NF- $\kappa$ B 转位到胞核,其活性二聚体激活并控制炎症因子的分泌:如 IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , NO 等;同时促进选择素、整合素、趋化因

曲线求出待测样本目的基因 mRNA 的相对拷贝数,与相对应的  $\beta$ -actin 的相对拷贝数比较,求出其 mRNA 表达水平(表 2)。结果表明,毒热平注射液能明显下调各信号蛋白 mRNA 表达的水平,且该下调作用表现出剂量依赖性和时间依赖性:10 mg · L<sup>-1</sup> 组效果比 1 mg · L<sup>-1</sup> 组更为明显,该药作用 24 h 的下调上述信号蛋白 mRNA 表达水平的作用明显于 12 h 的 mRNA 表达的水平。

子及相应受体的表达,趋化因子主要包括有 IL-18, 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, 巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$  等。这些趋化因子结合在血管上皮细胞,激活中性粒细胞,介导中性粒细胞在上皮细胞的黏附、滚动及向炎症部位的积聚。在本实验中发现,流感病毒感染的巨噬细胞内,作为病毒受体的 TLR7 其 mRNA 表达水平极显著地高于未被病毒感染的正常细胞对照组,信号通路下游的蛋白包括 MyD88, IRAK4, TRAF6, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达均显著高于细胞对照组。说明病毒感染后的初级阶段,机体的固有免疫系统最先发挥抵御外来病原体的作用。流感病毒活化 TLR7 介导的抗病毒信号转导通路,导致 NF- $\kappa$ B 信号转导途径的活化,调节包括生长因子、转录因子、细胞素、趋化因子、抗凋亡蛋白等在内的基因转录:产生大量的前炎症因子、趋化因子以及  $\alpha/\beta$  干扰素等,在病毒入侵机体的早期即可通过其介导的信号转导途径引起相关基因的表达,这些基因产物就可启动和调节固有免疫,并诱导适应性免疫的产生<sup>[3]</sup>,在早期发挥抗病毒作用。但是,炎症因子和趋化因子的过度表达还会损伤组织,加重流感病毒所致的病理改变,如肺损伤,促进病情的进步发展。毒热平注射液能适度下调包括 TLR7 在内的 MyD88, IRAK4, TRAF6, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达,显著低于病毒对照组但是高于正常细胞对照组,减少炎症因子和趋化因子的产生。



毒热平注射液是根据长期临床实践基础上形成的中医理论“毒损肺络”的病机理论,结合现代医学有关下呼吸道感染性疾病的病理过程及治疗的研究成果,针对感染性疾病的中心环节——炎症反应,配伍研制而成,具有清热解毒、凉血通络之功效。本实验室前期进行的体内试验证实该药可抑制小鼠病毒性肺炎<sup>[4]</sup>;体外实验表明该药能促进 Th1 细胞应答而抑制 Th2 细胞应答,使细胞因子达到一种新的动态平衡,利于机体免疫系统缓解炎症损伤,进行抗病毒感染<sup>[5]</sup>。本研究表明毒热平注射液能通过下调 TLR7 介导的 TIR 信号传导通路中各信号蛋白的活性发挥抗流感的作用。

Toll 样受体的发现及其深入研究为揭开病原体的跨膜信号传导的调控机制提供了广阔的前景。对信号通路中因子的修饰必然成为治疗的靶向,前炎症因子和抗炎因子之间的平衡为错综复杂的网络状信息所调控,而在病理学条件下,抗炎因子提供

的控制并不足以抵抗前炎症因子的效应。尽管人类内在的免疫应答机制相当复杂,但是对转录信号的特异性抑制干扰介入治疗有望对病毒性肺损伤的预后有益。

[参考文献]

- [1] Vance R E, Isberg P P, Portnoy D A. Patterns of pathogenesis: Discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system [J]. Cell Host Microbe, 2009, 6(1): 10.
- [2] Diebold S S, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral response by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA [J]. Science, 2004, 303(5):1529.
- [3] Rita Simone, Antonio Floriani, Daniele Saverino. Stimulation of human CD4<sup>+</sup>T lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 up-regulates expression of costimulatory and modulates proliferation[J]. Microbiol J, 2009, 3:1.
- [4] 张艳丽,顾立刚,范新生,等. 毒热平注射液抗甲型流感病毒的作用研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(10):684.
- [5] 张艳丽,顾立刚,范新生. 毒热平注射液抗流感病毒感染小鼠的保护作用[J]. 宁夏医学院学报, 2008, 30(2):150.

## Effect of Dureping injection on TIR signal pathway on Ana-1 cells

ZHANG Yanli<sup>1</sup>, WANG Ningping<sup>1</sup>, GU Ligang<sup>2</sup>, LI Pengtao<sup>2\*</sup>

(1. Department of Etiology and Immunology of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Chinese Medicine Antivirus Lab of Beijing University of Chinese Medicine, Educational Department of China, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Dureping injection to the murinal celiac macrophage Ana-1 on TIR signal pathway. **Method:** Ana-1 cell line was infected by influenza virus FMI strain and treated with the Dureping injection in different concentrations (10, 1 mg · L<sup>-1</sup> group) for 12 h and 24 h. Then we collected the cells, extracted mRNA and measured the expressions of TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6 and NF-κB p65 respectively by RT-PCR. **Result:** Dureping injection down-regulated the expression of TLR7, MyD88, IRAK4, TRAF6 and NF-κB p65 mRNA in Ana-1 cell line infected by influenza virus, in a dose-dependent manner significantly. **Conclusion:** Dureping injection has an obvious effect against influenza virus FMI strain by regulating the TIR signal pathway.

[Key words] Ana-1; Dureping injection; influenza virus; TIR; TLR7

doi: 10.4268/cjcm20100618

[责任编辑 张宁宁]