

白花蛇舌草对病毒肺炎小鼠免疫细胞因子表达的影响^{*}

乌鲁木齐市中医医院 马丽亚 董晶晶 高智星 张晓谊^{*}, 乌鲁木齐 830000

摘要 目的: 研究白花蛇舌草对病毒肺炎小鼠免疫细胞因子表达的影响。方法: 选取48只昆明种小鼠, 分为正常组、模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组, 每组12只。模型组、白花蛇舌草组和病毒唑组均以25 μL(流感病毒新鲜尿囊液10倍系列稀释成 1×10^{-4})流感病毒滴鼻感染小鼠, 构建肺炎小鼠模型。构模后, 白花蛇舌草组以3.0825 g/kg白花蛇舌草灌胃; 病毒唑组以10 mg/kg病毒唑灌胃, 均每天灌胃1次, 连续7 d。正常组小鼠以等量的生理盐水灌胃处理。7 d后, 称取体质量和肺组织质量, 计算肺指数。收集血液和肺组织, 用酶联免疫吸附法(ELISA)测定TNF-α、IL-6含量。收集肺泡灌洗液, 计数白细胞数及分类。用Western blot方法测定肺组织中Toll样受体4(TLR4)、核因子-κB p65(NF-κB p65)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)蛋白水平。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠肺指数升高, 血和肺组织中TNF-α、IL-6含量升高, 肺泡灌洗液中白细胞总数、单个核细胞数、中性粒细胞数目均增多, 肺组织中TLR4、NF-κB p65、ICAM-1、VCAM-1蛋白表达水平升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 白花蛇舌草组和病毒唑组小鼠肺指数降低, 血清和肺组织中TNF-α、IL-6含量降低, 肺泡灌洗液中白细胞总数、单个核细胞数、中性粒细胞数目均减少, 肺组织中TLR4、NF-κB p65、ICAM-1、VCAM-1蛋白表达水平降低(均 $P < 0.05$)。结论: 白花蛇舌草可以降低肺炎小鼠免疫细胞因子表达, 其机制可能与TLR4/NF-κB信号轴和粘附分子表达有关。

关键词 肺炎; 白花蛇舌草; 炎症; 细胞因子

中图分类号 R563.1⁺4

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20210114

Effects of Hedyotis diffusa willd on expression of immune cytokines in mice with virus pneumonia MA Li-ya, DONG Jing-jing, GAO Zhi-xing, ZHANG Xiao-yi^{*}. Urumqi Traditional Chinese Medicine Hospital, Urumqi 830000, China

Abstract Objective: To study the effect of Hedyotis diffusa willd on the expression of immune cytokines in mice with pneumonia. Methods: A mouse model of pneumonia was established by infecting mice with influenza virus nose drop infection of 25 μL (diluted to 10^{-4}), the stomach was treated with Hedyotis diffusa Willd (3.0825 g/kg, 200 μL, gavage) once a day for 7 days. The body weight and lung tissue mass of mice were weighed, the lung index calculated, and serum and lung tissue were collected. The contents of TNF-α and IL-6 were determined by ELISA. Bronchoalveolar lavage fluid was collected, and leukocytes were counted and classified. The levels of TLR4, NF-κB p65, ICAM-1 and VCAM-1 proteins in lung tissues were measured by Western blotting. Results: As compared with normal mice, the lung index of mice with influenza virus pneumonia, the levels of TNF-α and IL-6 in serum and lung tissues, the total number of leukocytes, the number of mononuclear cells and the number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid, and the expression levels of TLR4, NF-κB p65, ICAM-1 and VCAM-1 protein in lung tissue increased. Treatment with Hedyotis diffusa willd could reduce the lung index of pneumonia mice, the levels of TNF-α and IL-6 in serum and lung tissue, the total number of leukocytes, the number of mononuclear cells and the number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid, and the expression levels of TLR4, NF-κB p65, ICAM-1 and VCAM-1 in lung tissue. Conclusion: Hedyotis diffusa willd can reduce the expression of immune cytokines in pneumonia mice, which may be related to TLR4/NF-κB signal axis and adhesion molecules.

Key words Pneumonia; Hedyotis diffusa Willd; Inflammation; Cytokines

流感病毒肺炎是常见的肺部疾病^[1,2]。在大量炎性介质作用下, 患者肺组织血管壁的通透性发生改变, 导致肺组织水肿或出血, 血管内皮细胞大量表达细胞间粘附分子-1 (intercellular cell adhesion mol-

ecule-1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)等, 从而聚集更多的炎性细胞, 引起更多的炎性介质释放, 导致肺损伤^[3]。白花蛇舌草是茜草科植物, 具有清热解毒、消炎止痛等功效, 常用于治疗阑尾炎、气管炎、毒蛇咬伤^[4,5]。本实验观察白花蛇舌草对流感病毒肺炎小鼠免疫细胞因子表达的影响及其机制, 为白花蛇舌草治疗流感病毒肺炎提供理论参考。

^{*}基金项目: 乌鲁木齐市沙依巴克区科学基金资助项目 (No: 20130112)

^{*}通信作者: 张晓谊, E-mail: 1729309453@qq.com

材料与方 法

材料 48 只昆明种小鼠,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半,均购自新疆维吾尔自治区医科大学实验动物中心。ICAM-1 抗体、VCAM-1 抗体均购自美国 Abcam;白花蛇舌草(批号 171209)购自上海江莱生物科技有限公司;流感病毒甲型鼠肺适应株 A/AF/1/34 (H1N1)由中国预防医学科学院提供,血凝滴度为 1:512,小鼠 LD50 为 10 ~ 5.4; TNF- α 、IL-6 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Toll 样受体 4(toll-like receptor-4, TLR4) 抗体、核因子- κ Bp65 (nuclear factor- κ Bp65, NF- κ B p65) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。

建模^[6]和分组 昆明种小鼠随机分成 4 组:正常组、模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组,每组 12 只,将小鼠用乙醚轻度麻醉以后,模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组滴鼻接种稀释成 10⁴ 的流感病毒 25 μ L,正常组以等量的磷酸盐缓冲液(PBS)代替。在接种后 4 h,白花蛇舌草组以 3.0825 g/kg(200 μ L)白花蛇舌草灌胃;病毒唑组以 10 mg/kg(200 μ L)病毒唑灌胃,均 1 次/d,连续 7 d。正常组小鼠以等量的生理盐水灌胃处理。

样本采集和肺指数测定 在接种后 7 d,禁食禁水 8 h,取 6 只小鼠,用镊子摘取眼球后采血,用眼科剪剪开颈部皮肤,暴露器官,于环状软骨处把气管剪开,将注射器插入,将左肺组织夹闭,用 PBS 溶液将右肺组织洗涤 3 次,回收肺泡灌洗液。另外取 6 只小鼠,称取小鼠体质量,取肺组织并称量质量,计算肺指数。肺指数 = 肺质量 \div 体质量。将肺组织分成 2 份,一份用于制作肺组织匀浆液,检测 TNF- α 、IL-6 含量,另外一份用于 Western blot 法检测 TLR4、NF- κ B P65、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达。

检测血和肺组织匀浆液中 TNF- α 、IL-6 含量 采集的肺组织经过生理盐水洗涤以后,按照每 1 g 肺组织中添加 9 mL 的生理盐水配制匀浆液。采集的血液 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,血清少时以 1 800 转/min 离心 15 min。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 TNF- α 、IL-6 含量,步骤同试剂盒说明书。

白细胞分类计数 肺泡灌洗液在 4 $^{\circ}$ C, 1 800 转/min 离心后,将上清液吸弃,添加 Tris-NH₄Cl,将红细胞破坏,以细胞计数板对白细胞总数计数,另外吸取 200 μ L 滴加到载玻片上进行瑞氏染色,对细胞进行分类计数。

检测 TLR4、NF- κ B P65、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达水平 采集的肺组织在液氮组织中研磨成粉后,添加蛋白裂解液,用 Bradford 法测定蛋白浓度。每组取 40 μ g 蛋白样品,添加到上样缓冲液混合后,沸水中反应 5 min。用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,分离胶浓度为 10%,电泳电压为 120 v,浓缩胶浓度为 5%,电泳电压为 80 v。用半干法进行转膜,转膜置于 4 $^{\circ}$ C 条件下进行,转膜电流为 30 mA。将转膜后的 NC 膜置于 5% 牛血清白蛋白中,室温条件下结合 1 h。再将 NC 膜放在一抗反应液中,4 $^{\circ}$ C 过夜。取出 NC 膜,放在二抗反应液中,室温中孵育 2 h。经过 ECL 发光试剂盒化学发光以后,用 Image-Pro Plus 分析条带的灰度值。内参为 β -actin,分析目的蛋白相对表达水平。

统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计学软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组差异比较采用单因素方差分析,组间比较用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肺指数 模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组肺炎小鼠肺指数高于正常组(均 $P < 0.05$)。白花蛇舌草组、病毒唑组低于模型组(均 $P < 0.05$),表明白花蛇舌草能够改善肺炎小鼠肺指数,见表 1。

表 1 4 组小鼠肺指数($\bar{x} \pm s$)

组别	只	肺指数
正常组	12	0.76 \pm 0.09
模型组	12	1.28 \pm 0.12 [*]
白花蛇舌草组	12	0.93 \pm 0.08 ^{*#}
病毒唑组	12	0.79 \pm 0.05 ^{*#}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

血及肺 TNF- α 、IL-6 含量 模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组肺炎小鼠血及肺组织 TNF- α 、IL-6 含量高于正常组(均 $P < 0.05$);且白花蛇舌草组、病毒唑组低于模型组(均 $P < 0.05$),表明白花蛇舌草可减少血清及肺组织中炎症因子表达,见表 2。

肺泡灌洗液炎性细胞数目 模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组肺炎小鼠肺泡灌洗液中白细胞总数、单个核细胞数、中性粒细胞数高于正常组(均 $P < 0.05$)。且白花蛇舌草组、病毒唑组低于模型组(均 $P < 0.05$),表明白花蛇舌草可减少肺泡灌洗液中炎性细胞数目,见表 3。

表2 4组小鼠血和肺组织 TNF- α 、IL-6 水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	只	血		肺组织	
		TNF- α	IL-6	TNF- α	IL-6
正常组	12	21.54 \pm 2.36	40.25 \pm 4.36	38.65 \pm 5.26	37.62 \pm 2.56
模型组	12	46.29 \pm 4.15 [*]	49.81 \pm 2.16 [*]	45.20 \pm 2.67 [*]	50.79 \pm 4.20 [*]
白花蛇舌草组	12	30.60 \pm 2.13 ^{*#}	43.01 \pm 2.11 ^{*#}	40.21 \pm 1.54 ^{*#}	42.75 \pm 3.78 ^{*#}
病毒唑组	12	27.46 \pm 2.62 ^{*#}	43.90 \pm 3.69 ^{*#}	39.68 \pm 1.19 ^{*#}	40.95 \pm 2.62 ^{*#}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

表3 肺泡灌洗液中炎性细胞数目 ($\times 10^7/L, \bar{x} \pm s$)

组别	只	白细胞总数	单个核细胞数	中性粒细胞数
正常组	12	4.59 \pm 0.51	3.26 \pm 0.38	0.56 \pm 0.05
模型组	12	7.52 \pm 0.89 [*]	13.56 \pm 1.17 [*]	5.62 \pm 0.84 [*]
白花蛇舌草组	12	5.84 \pm 0.42 ^{*#}	6.95 \pm 0.71 ^{*#}	3.95 \pm 4.10 ^{*#}
病毒唑组	12	5.02 \pm 0.36 ^{*#}	4.58 \pm 0.62 ^{*#}	2.14 \pm 0.23 ^{*#}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

肺组织 TLR4、NF- κ B P65、ICAM-1、VCAM-1 蛋白表达 模型组、白花蛇舌草组、病毒唑组肺炎小鼠肺组织中 TLR4、NF- κ B p65、ICAM-1、VCAM-1 水平高于正常组(均 $P < 0.05$);且白花蛇舌草组、病毒唑组低于模型组(均 $P < 0.05$),表明白花蛇舌草可减少肺组织中 TLR4、NF- κ B p65、ICAM-1、VCAM-1 表达,见图1和表4。

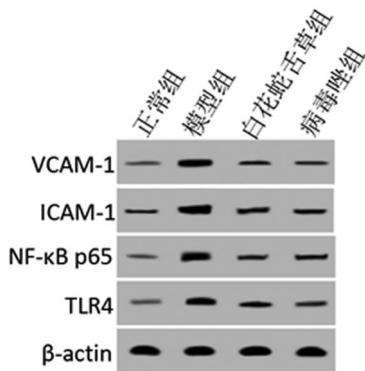


图1 Western blot 检测肺组织中 TLR4、NF- κ B p65、ICAM-1、VCAM-1 表达

讨论

TNF- α 是单核/巨噬细胞活化产生的,可促进炎

症反应^[7-9]。IL-6 是一种多效应细胞因子,在肺炎患者中表达水平升高,在自然杀伤性细胞、活化的 B 细胞等表面广泛表达,具有调节免疫和炎症的作用。病毒、细菌等感染都可以促进 IL-6 的表达^[10,11]。本实验发现肺炎模型小鼠肺指数升高,血清和肺组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达水平升高,肺泡灌洗液中白细胞总数及单个核细胞数、中性粒细胞数均升高,说明成功构建了肺炎小鼠模型。本实验中白花蛇舌草组小鼠血清及肺组织中的炎症因子 TNF- α 、IL-6 含量较模型组降低,小鼠肺指数也降低,肺泡灌洗液中炎性细胞数目也降低。白花蛇舌草具有清热解毒等功效,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等功效^[12-14]。在哮喘引起的肺组织炎症中,白花蛇舌草具有抑制肺组织中炎症因子表达并减少肺泡灌洗液中炎性细胞数目的作用,白花蛇舌草还具有抗气道炎症的功效^[15]。本实验表明白花蛇舌草也具有抗流感病毒肺炎作用。

在哮喘诱导的肺组织炎症、脂多糖诱导的血管内皮炎症等研究中,白花蛇舌草可以降低 NF- κ B 信号通路激活水平,其抗炎机制可能与 NF- κ B 有关^[15,16]。TLR4/NF- κ B 信号轴是目前公认的和炎症有关的信号调节通路,TLR4 可以激活 NF- κ B 信号

表4 肺组织 TLR4、NF- κ B p65、ICAM-1、VCAM-1 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只	TLR4	NF- κ B p65	ICAM-1	VCAM-1
正常组	12	0.15 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05	0.19 \pm 0.04
模型组	12	0.92 \pm 0.11 [*]	1.06 \pm 0.10 [*]	1.14 \pm 0.13 [*]	0.87 \pm 0.07 [*]
白花蛇舌草组	12	0.46 \pm 0.09 ^{*#}	0.40 \pm 0.05 ^{*#}	0.49 \pm 0.09 ^{*#}	0.41 \pm 0.06 ^{*#}
病毒唑组	12	0.42 \pm 0.03 ^{*#}	0.43 \pm 0.06 ^{*#}	0.45 \pm 0.07 ^{*#}	0.39 \pm 0.08 ^{*#}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

通路,诱导炎症反应^[17]。NF-κB 家族有多个亚型,其常常以二聚体的形式存在,其中 NF-κBp65 是 NF-κB 信号发挥生物学功能不可缺少的组成部分^[18]。炎症条件下,肺组织血管内皮释放大量的 ICAM-1、VCAM-1 等粘附分子,ICAM-1、VCAM-1 具有积聚炎性细胞、诱导炎性浸润的作用,二者在肺炎患者中高表达^[19]。本实验显示,白花蛇舌草处理后的肺炎小鼠肺组织中的 TLR4、NF-κB p65、ICAM-1、VCAM-1 含量降低,说明白花蛇舌草可能通过 TLR4/NF-κB 信号轴和抑制粘附分子的表达发挥抗炎作用。

参考文献

- 1 Abdelrazek MA, Leone M, Venna N. Hemorrhagic encephalitis associated with H3N2 influenza A viral pneumonia[J]. *Neurology*, 2018, 90(7):336-337.
- 2 He J, Li J, Lu P, et al. Radiological description about the globally first case of human infected avian influenza virus (H10N8) induced pneumonia[J]. *Radiol Infect Dis*, 2016, 3(1):44-47.
- 3 Tomasi CD, Vuolo F, Generoso J, et al. Biomarkers of Delirium in a Low-Risk Community-Acquired Pneumonia-Induced Sepsis[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1):722-726.
- 4 李波. 白花蛇舌草的化学成分和药理作用研究进展[J]. *天津药学*, 2016, 28(5):75-78.
- 5 杜江洋, 徐元, 王楠, 等. 白花蛇舌草-半枝莲药对组分诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15):123-131.
- 6 Fukao K, Noshi T, Yamamoto A, et al. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 74(3):654-662.
- 7 Ma C, Lin W, Liu Z, et al. NDR1 protein kinase promotes IL-17- and TNF-α-mediated inflammation by competitively binding TRAF3[J]. *Embo Rep*, 2017, 18(4):586-602.
- 8 Ding H, Wei J, Zhao Y, et al. Progranulin derived engineered protein

- Atsttrin suppresses TNF-α-mediated inflammation in intervertebral disc degenerative disease[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65):109692-109702.
- 9 Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadehbardei L, et al. The Effect of Curcumin on TNF-α, IL-6 and CRP Expression in a Model of Polycystic Ovary Syndrome as an Inflammation State[J]. *J Reprod Infertil*, 2017, 18(4):352-360.
- 10 Hao L, Zhang W, Tao Z, et al. Mechanism of microRNA-21 regulating IL-6 inflammatory response and cell autophagy in intervertebral disc degeneration[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2):1441-1444.
- 11 Lin YL, Chen SH, Wang JY. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(1):51-59.
- 12 崔健, 施松善, 王顺春, 等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. *天津药学*, 2014, 8(19):235-240.
- 13 芦柏震, 周俐斐, 侯桂兰, 等. 白花蛇舌草抗肿瘤作用研究进展[J]. *医药导报*, 2009, 28(3):344-346.
- 14 逯双, 杨培民, 曹广尚. 白花蛇舌草活性成分多糖与黄酮研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(3):122-125.
- 15 朴红梅, 宋秋红, 金延燕, 等. 白花蛇舌草对哮喘模型小鼠 Th1/Th2 免疫平衡的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(17):1381-1385.
- 16 杨珍. 益肾清利颗粒干预慢性肾炎 NF-κB 信号通路的临床及实验研究[D]. 南京中医药大学, 2014.
- 17 Wang L, Li Z, Zhang X, et al. Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF-κB, TNF-α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(1):97-106.
- 18 Zhao L T, Wang H, Zhang W M, et al. Serum NF-κBp65, TLR4 as Biomarker for Diagnosis of Preeclampsia[J]. *Open Med*, 2017, 12(1):399-402.
- 19 Thakkar V, Patterson K A, Stevens W, et al. Increased serum levels of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in systemic sclerosis are not specific for pulmonary manifestations[J]. *Clin Rheumatol*, 2018, 37(6):1563-1571.

(2018-11-20 收稿 2020-11-14 修回)

(上接第 35 页)

- 11 范惠明, 罗伟. 小剂量阿奇霉素对慢阻肺患者 TNF-α、IL-8 和 CRP 影响及对黏液高分泌抑制作用[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2018, 15(1):155-158.
- 12 宋淑范, 辛平. 炎症细胞因子 IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8 对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺癌生长及转移的影响[J]. *临床与病理杂*

志, 2017, 37(11):2323-2331.

- 13 任静. 血清中 IL-6、TNF-α 与慢性阻塞性肺疾病患者病情分级、呼吸功能的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(13):1781-1783.

(2019-06-08 收稿 2020-06-14 修回)