

## 四逆散方中甘草在巨噬细胞中诱导I型干扰素应答的作用与机制研究

李 硕, 蔡雅洁, 白金钊, 辜一情, 刘闰平\*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

**摘要:** 目的 在巨噬细胞中确定四逆散中具有I型干扰素 (IFN-I) 调控作用的中药, 并探究其具体作用靶点及主要作用成分。方法 通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 技术检测四逆散组方药材柴胡、枳实、白芍、甘草水提取物对IFN-I通路相关基因表达的影响; 通过CCK-8法检测甘草水提取物对巨噬细胞RAW264.7细胞活力的影响; qRT-PCR法检测甘草水提取物对IFN $\alpha$ 2诱导的干扰素诱导基因 (ISGs) mRNA表达水平的影响; 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测甘草水提取物对IFN $\alpha$ 2诱导的JAK1、TYK2、STAT1、STAT2蛋白磷酸化水平的影响; qRT-PCR法检测甘草水提取物中单体成分甘草酸、甘草苷、异甘草素、甘草素、18 $\beta$ -甘草次酸对IFN $\alpha$ 2诱导的ISGs的mRNA表达水平的影响。结果 四逆散组方药材柴胡、枳实、白芍各水提取物对IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*表达水平无显著影响, 而甘草水提取物显著增加了IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*的基因表达水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 甘草水提取物显著增加了IFN $\alpha$ 2诱导的JAK1、TYK2、STAT1、STAT2蛋白磷酸化 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 甘草水提取物中18 $\beta$ -甘草次酸能够显著增强IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*的mRNA表达 ( $P < 0.001$ )。结论 甘草水提取物能够显著激活JAK-STAT信号通路并诱导IFN-I下游ISGs的表达, 具有较强的固有免疫激活作用。18 $\beta$ -甘草次酸可能是甘草水提取物发挥激活IFN-I通路的主要有效成分之一。

**关键词:** 四逆散; 甘草; I型干扰素; 巨噬细胞; 免疫调控; JAK-STAT信号通路; 甘草酸; 甘草苷; 异甘草素; 甘草素; 18 $\beta$ -甘草次酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 09-1716-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.003

## Effects and mechanism of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in Si-Ni-San inducing type I interferon response in macrophages

LI Shuo, CAI Yajie, BAI Jinzhao, GU Yiqing, LIU Runping

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** To identify the Chinese medicine with type I interferon (IFN-I) activities in Si-Ni-San in macrophages and elucidate its specific targets and active components. **Methods** qRT-PCR analysis was used to detect expression of IFN-I pathway related genes in RAW264.7 cells treated with water extract of *Bupleuri Radix*, *Aurantii Fructus Immaturus*, *Paeoniae Radix Alba*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in Si-Ni-San. CCK-8 assay was performed to detect cell viability of RAW264.7 cells treated with water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. qRT-PCR analysis was used to detect effect of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on IFN $\alpha$ 2 induced mRNA expression of interferon inducible genes (ISGs). Western blotting was used to detect phosphorylation of JAK1, TYK2, STAT1, and STAT2 in IFN $\alpha$ 2-induced RAW264.7 cells treated with water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. qRT-PCR was used to detect effects of glycyrrhizic acid, liquiritin, isoglycyrrhizin, glycyrrhizin, and 18 $\beta$ -glycyrrhetinic acid on IFN $\alpha$ 2-induced mRNA expression level of ISGs. **Results** The water extracts of *Bupleuri Radix*, *Aurantii Fructus Immaturus*, and *Paeoniae Radix Alba* had no significant effects on IFN $\alpha$ 2-induced expression levels of *Isg15* and *Ifit1*, while water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* significantly increased IFN $\alpha$ 2-induced gene expression levels of *Isg15* and *Ifit1* ( $P < 0.01$ ,  $0.001$ ). Water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* significantly increased IFN $\alpha$ 2-induced phosphorylation of JAK1, TYK2, STAT1 and STAT2 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ , and  $0.001$ ). 18 $\beta$ -glycyrrhetinic acid in water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* could significantly enhance IFN $\alpha$ 2-induced mRNA expression of *Isg15* and *Ifit1* ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Water extract of

收稿日期: 2022-05-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82004029);北京市科技新星项目(Z201100006820025, Z211100002121167)

第一作者: 李 硕, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的免疫活性。E-mail: ls18845611672@163.com

\*通信作者: 刘闰平, 教授, 博士生导师。E-mail: liurunping@bucm.edu.cn

*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* can significantly activate JAK-STAT signaling pathway and induce the expression of ISGs downstream of IFN-I, which has a strong intrinsic immune activation effect. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid may be one of the main effective components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* water extract to activate IFN-I pathway.

**Key words:** Si-Ni-San; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; type I interferon; macrophage; immunoregulation; JAK-STAT signaling pathway; glycyrrhizic acid; liquiritin; isoglycyrrhizin; glycyrrhizin; 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid

I型干扰素(IFN-I)是连接固有免疫和适应性免疫的桥梁,也是第1个被描述的细胞因子家族,包括IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\kappa$ 、IFN- $\tau$ 、IFN- $\omega$ 、IFN- $\xi$ 等亚型<sup>[1]</sup>。IFN-I的表达受到上游多个模式识别受体的调控。视黄酸(维甲酸)诱导基因蛋白1(RIG-I)、干扰素刺激基因(STING)和Toll样受体(TLRs)等模式识别受体感知病原体或组织损伤,从而激活编码IFN-I的基因表达。IFN-I产生后,以自分泌和旁分泌的方式结合到细胞表面受体链IFNAR1和IFNAR2上,并通过活化Janus激酶1(JAK1)和酪氨酸激酶2(TYK2),激活信号转导与转录激活子(STAT)。磷酸化的STAT1和STAT2二聚化并转移到细胞核中,与干扰素调节因子9(IRF9)组装形成1种称为干扰素刺激基因因子3(ISGF3)的异源三聚体复合体<sup>[2]</sup>。活化的ISGF3易位到细胞核,并与基因启动子中IFN刺激的反应元件结合,导致干扰素诱导基因(ISGs)的转录。目前已发现有300多种ISGs分子,如ISG15、IFIT1-3、OAS1-3等。IFN-I由以巨噬细胞和树突状细胞为代表的固有免疫细胞产生,作用于适应性免疫细胞,在多种感染性疾病、癌症和自身免疫性疾病的免疫应答中发挥着重要作用<sup>[3-4]</sup>。目前已有许多中药及其活性成分被应用于这些疾病的治疗中,然而,很少有研究关注它们对这些疾病中异常的IFNs信号的影响。

前期研究发现四逆散能够调控IFN-I及其诱导基因<sup>[5]</sup>。四逆散始载于《伤寒杂病论》,由柴胡、枳实、白芍、甘草组成,具有透邪散郁、疏肝理脾的功效<sup>[6]</sup>。目前研究表明这4味中药及其活性成分具有免疫调节作用。柴胡中的柴胡皂苷A可以通过抑制白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )诱导的核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)及其下游炎性介质的激活,发挥抗骨关节炎作用<sup>[7]</sup>。枳实中的柚皮苷通过降低大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-6的表达,可预防环磷酰胺诱导的炎症、细胞凋亡和氧化DNA损伤<sup>[8]</sup>。白芍中的白芍总苷具有广泛的抗炎作用,已在国内用于类风湿性关节炎和红斑狼疮等自身免疫性疾病的治<sup>[9]</sup>。甘草水提物通过调节炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达,改善雷公藤甲素所致的大鼠急性肝损伤<sup>[10]</sup>。甘草中的主要成分,包括甘草酸、异甘草素、

甘草苷等单体,均能够调节脂多糖(LPS)诱导的炎症反应<sup>[11-13]</sup>。如上所述,四逆散中的4味中药及其主要活性成分的研究主要集中于经典炎症通路,然而,其对IFN-I的调控却少有报道。

因此,本研究以巨噬细胞为研究对象,以IFN $\alpha$ 2为诱导剂,进一步确定四逆散中具有IFN-I调控作用的中药,并探究其具体作用靶点。另外,本研究还初步探究四逆散中可能具有IFN-I调控作用的中药单体,为天然小分子药物在IFN-I相关疾病的治疗的应用提供一定的理论依据和实验支撑。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

四逆散由柴胡 *Bupleurum chinense* DC.、枳实 *Citrus aurantium* L.、白芍 *Paeonia lactiflora* Pall.、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 4味中药以1:1:1:1的配比组成。4味药材均购自北京同仁堂有限公司,经北京中医药大学药学院中药化学专业讲师徐冰鉴定合格。各药材水提物自制(制备方法:取药材研碎,加8倍量蒸馏水冷凝回流法煎煮2次。水煎液合并后,旋蒸浓缩至终质量浓度约0.6 g·mL<sup>-1</sup>,滤过。所有质量浓度均以生药量为基础进行计算,且各药材水提物质量浓度比与四逆散配比一致),各中药水提物分装放置-20℃保存,以避免冻融循环。

甘草酸(批号1405-86-3)、甘草苷(批号551-15-5)、异甘草素(批号961-29-5)、甘草素(批号1405-86-3)、18 $\beta$ -甘草次酸(批号471-53-4)均购自成都普思生物科技股份有限公司,质量分数均 $\geq$ 98%;鼠源重组蛋白IFN $\alpha$ 2(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司);DMEM培养基、RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Corning公司);青霉素-链霉素(美国Invitrogen公司);CCK-8检测试剂盒(新赛美公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Thermo Scientific公司);RNA提取试剂盒(Vazyme, RNA Isolation Kit);Western blotting Kit高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京兰博利德生物技术有限公司)。

### 1.2 细胞

巨噬细胞RAW264.7购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)公司。

### 1.3 仪器

HERA cellvios 160i CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); CKX53 倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司); Spectramax i3x 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); 5424R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Real-Time PCR System (Quant Studio™ 6 Flex); ChemiDoc™ MP Imaging System(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及获取

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养, 培养条件为 37 °C、5%CO<sub>2</sub>。根据细胞生长状态, 2~3 d 进行换液, 当细胞密度达到 80%~85% 时, 按 1:3 进行传代培养。

本实验选用 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(北京斯贝福实验动物科技有限公司), 体质量 20~25 g, 实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。动物饲养于符合 SPF 标准的 12 h 光暗交替环境中, 能够自由获取食水。所有动物实验和研究经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准项目号: BUCM-4-2020083001-3011), 并严格按照章程执行。

小鼠脱颈处死后, 剔除小鼠股骨和胫骨的剩余软组织, 剪去腿骨两端, 使用高速离心机离心腿骨、收集骨髓细胞。将收集的细胞于含 10% 胎牛血清、10% L929 细胞上清、1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, 第 3、5 天换液。原代细胞培养 7 d 后, 用细胞刮收集成熟的骨髓来源巨噬细胞(BMDM)。

### 2.2 四逆散组方药材水提物活性筛选

RAW264.7 细胞以每孔  $1.0 \times 10^5$  接种于 6 孔板, 设置对照组、IFN $\alpha$ 2 组、给药组(IFN $\alpha$ 2 分别加柴胡、枳实、白芍、甘草水提物)进行活性筛选。四逆散中 4 味中药的配比为 1:1:1:1, 为保证各药材水提物质量浓度比与四逆散配比一致, 在整理和挖掘相关文献后<sup>[14-15]</sup>, 设置各水提物的给药终质量浓度为  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 并使用相对增殖法评价水提物在该质量浓度下的潜在毒性作用。培养箱中孵育过夜, 次日, 更换新鲜培养基孵育 1 h 后给予各水提物, 继续培养 1 h, 相应的孔中加入  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IFN $\alpha$ 2。8 h 后, 显微镜下观察细胞形态并计数, 计算相对增殖率(RGR)=给药组细胞数/对照组细胞数,  $\text{RGR} \geq 100\%$  评为 0 级,  $75\% \leq \text{RGR} \leq 99\%$  评为 1 级,  $50\% \leq \text{RGR} \leq 74\%$  评为 2 级,  $25\% \leq \text{RGR} \leq 49\%$  评为 3 级,  $1\% \leq \text{RGR} \leq 24\%$  评为 4 级, 0 或 1 级为无毒性。

### 2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长期 RAW264.7 细胞, 将细胞密度调整为  $1.0 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 取 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔细胞培养板中, 培养箱孵育过夜。细胞密度达到 90% 左右时, 加入不同质量浓度的含药培养基 100  $\mu\text{L}$  (由培养基稀释), 使得甘草水提物的最终质量浓度为 0.094、0.190、0.375、0.750、1.500、3.000、6.000、12.000  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每个质量浓度均设置 3 个复孔, 设置正常培养的细胞对照组(加入培养基), 培养箱中孵育 24 h。倒出培养基, 每孔加入含有 10% CCK-8 溶液的培养基 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 避光孵育 1 h, 于酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

### 2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)反应检测 IFN-I 相关基因的表达

RAW264.7 细胞或 BMDM 细胞以每孔  $1.0 \times 10^5$  细胞接种于 6 孔板, 设置对照组、IFN $\alpha$ 2 组、给药组, 给药组具体包括: IFN $\alpha$ 2 分别加柴胡、枳实、白芍、甘草水提物组; IFN $\alpha$ 2 分别加甘草水提物低、中、高质量浓度组; IFN $\alpha$ 2 加甘草酸低、高浓度组, 甘草苷低、高浓度组, 异甘草素低、高浓度组, 甘草素低、高浓度组, 18 $\beta$ -甘草次酸低、高浓度组。细胞培养箱中孵育过夜。次日, 更换新鲜培养基孵育 1 h, 给药: 活性筛选实验中, 柴胡、枳实、白芍、甘草水提物终质量浓度均为  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与四逆散中 4 味中药配比一致; 在后续实验中, 甘草水提物低、中、高质量浓度组的终质量浓度分别为 1.5、3.0、6.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 依据参考文献整理与挖掘<sup>[16-17]</sup>, 设置甘草酸终浓度为 125、250  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘草苷终浓度为 20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 异甘草素终浓度为 20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘草素终浓度为 2、4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 18 $\beta$ -甘草次酸终浓度为 20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 继续培养 1 h, 相应的孔中加入  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IFN $\alpha$ 2。8 h 后, 使用 RNA 提取试剂盒分离细胞的总 RNA, 依据 Vazyme 逆转录和扩增试剂盒说明书, 将 RNA 逆转录为 cDNA。以 HPRT1 为内参进行 qRT-PCR 检测, 引物序列如表 1 所示。目标基因 mRNA 表达量的相对倍数变化以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行计算。

### 2.5 蛋白免疫印迹(Western blotting)检测相关蛋白表达

RAW264.7 细胞以每孔  $1.0 \times 10^5$  细胞接种于 6 孔板, 设置对照组、IFN $\alpha$ 2 组及 IFN $\alpha$ 2 加甘草水提物低、中、高质量浓度组, 细胞培养箱中孵育过夜。次日, 更换新鲜培养基孵育 1 h, 给予不同质量浓度的甘草水提物, 使得其最终质量浓度为 1.5、3.0、



表1 引物序列

Table 1 Primers sequence

基因	种属	引物序列(5'→3')
<i>Hprt1</i>	鼠	F-CAGACTTTGTTGGATTTGAAA R-GCTCATCTTAGGCTTTGTAT
<i>Isg15</i>	鼠	F-GGTGTCCGTGACTAACTCCAT R-TGGAAAGGGTAAGACCGTCTT
<i>Ifit1</i>	鼠	F-CTGAGATGTCACCTCACATGGAA R-GTGCATCCCCAATGGGTTCT

6.0 mg·mL<sup>-1</sup>,继续培养1 h,相应的孔中加入50 ng·mL<sup>-1</sup>的IFNα2。1 h后,使用RIPA裂解缓冲液裂解细胞,提取总蛋白。蛋白与loading buffer预混并加热变性加至10% SDS-PAGE凝胶中,转移至PVDF膜上,脱脂牛奶室温封闭,条带在相应的一抗中孵育过夜。TBST漂洗后在相应的二抗中孵育1 h。使用ChemiDoc™ MP Imaging System记录图像,并使用Quantity One软件进行图像分析。

## 2.6 统计学分析

数据采用GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, 美国)软件进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用one-way-ANOVA分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 四逆散中4味中药水提取物对RAW 264.7细胞无毒质量浓度的确定

为了寻找四逆散中具有IFN-I调控作用的中药,在RAW264.7细胞中,分别加入3 mg·mL<sup>-1</sup>柴胡、

枳实、白芍、甘草水提取物,再使用50 ng·mL<sup>-1</sup>的IFNα2激活IFN-I通路。8 h后,显微镜下观察并评定RGR,结果显示,对照组、IFNα2组、IFNα2分别加柴胡、枳实、白芍、甘草水提取物组细胞形态均正常、贴壁生长良好,RGR值均在75%~99%,细胞毒性等级评为1级,即上述各水提取物对RAW264.7细胞均无明显毒性。CCK-8检测结果显示,甘草水提取物质量浓度在0.094~12.000 mg·mL<sup>-1</sup>时,细胞的存活率均大于60%,见图1。因此,选择细胞存活率均>90%对应的质量浓度1.5、3.0、6.0 mg·mL<sup>-1</sup>分别作为甘草水提取物的低、中、高质量浓度进行后续实验。

### 3.2 四逆散中4味中药水提取物对IFN-I相关基因表达的影响

qRT-PCR结果(图2)显示,与对照组比较,IFNα2组显著诱导了*Isg15*和*Ifit1*的表达( $P < 0.05$ ,变化

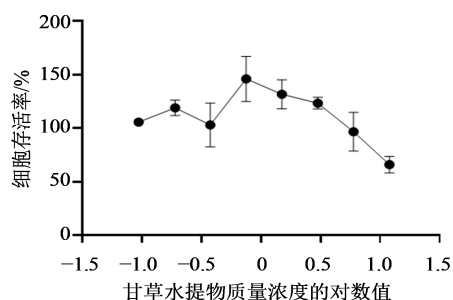
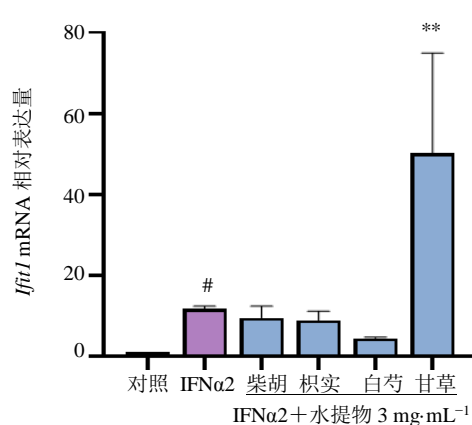
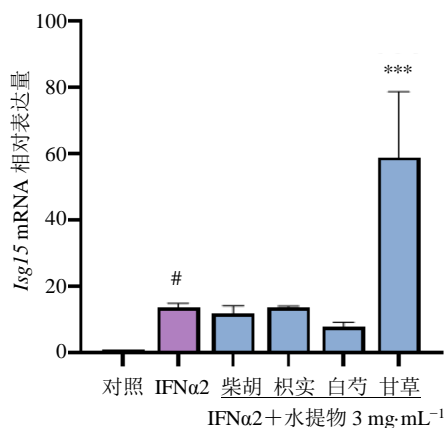


图1 甘草水提取物对RAW264.7细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 1 Effect of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on survival rate of RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与IFNα2组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

# $P < 0.05$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs IFNα2 group

图2 四逆散中4味中药水提取物对RAW264.7细胞IFN-I相关基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effects of water extract of four traditional Chinese medicines in Si-Ni-San on IFN-I related genes in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

倍数=13.6;  $P < 0.05$ , 变化倍数=12.3), 说明IFN $\alpha$ 2已经成功激活IFN-I通路。与IFN $\alpha$ 2组比较, 柴胡、枳实、白芍各水提物组对IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*表达水平无显著影响, 而甘草水提物显著增加了IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*的基因表达水平( $P < 0.001$ , 变化倍数=4.2;  $P < 0.01$ , 变化倍数=4.7)。

### 3.3 甘草水提物对巨噬细胞IFN-I相关基因表达的影响

RAW264.7细胞是体外研究常用的小鼠单核巨噬细胞系, 因此, 首先在RAW264.7细胞中给予低、中、高质量浓度的甘草水提物并使用IFN $\alpha$ 2诱导。qRT-PCR结果见图3-A, 与IFN $\alpha$ 2组比较, 甘草水提物以质量浓度相关的方式增强了*Isg15*的表达( $P < 0.05$ , 变化倍数=2.9,  $P < 0.05$ , 变化倍数=3.8;  $P < 0.01$ , 变化倍数=4.2), 且低、中质量浓度的甘草水提物显著增强了*Ifit1*的表达( $P < 0.001$ , 变化倍数=7.6;  $P < 0.05$ , 变化倍数=3.7)。巨噬细胞是骨髓来源的细胞, 因此本实验还分离了小鼠腿骨中的骨髓细胞并诱导其分化为BMDM, 按照相同方法处理细胞后使用qRT-PCR检测基因表达情况。与对照组相比, IFN $\alpha$ 2组*Isg15*和*Ifit1*的mRNA表达水平显著

升高( $P < 0.05$ , 变化倍数=115.0;  $P < 0.05$ , 变化倍数=76.3), 结果见图3-B。与RAW细胞中得出的结果一致, 甘草水提物的低、中、高质量浓度均显著增强了IFN $\alpha$ 2诱导的BMDM细胞中IFN-I下游基因的表达(*Isg15*:  $P < 0.05$ , 变化倍数=2.8;  $P < 0.01$ , 变化倍数=4.1;  $P < 0.01$ , 变化倍数=4.3。 *Ifit1*:  $P < 0.01$ , 变化倍数=6.2;  $P < 0.01$ , 变化倍数=6.2;  $P < 0.01$ , 变化倍数=6.3)。由于RAW264.7细胞中甘草水提物的质量浓度相关性较好, 且在IFN $\alpha$ 2诱导下, RAW264.7细胞中IFN-I通路的激活状态较为稳定。因此, 后续实验选择RAW264.7作为细胞模型。

### 3.4 甘草水提物对JAK1、TYK2磷酸化的影响

Western blotting实验结果(图4)显示, IFN $\alpha$ 2增加了磷酸化JAK1(p-JAK1)的表达, 而降低了总JAK1(t-JAK1)的水平。与IFN $\alpha$ 2组比较, 不同质量浓度的甘草水提物均增加了p-JAK1水平; 只有低质量浓度的甘草水提物增加了t-JAK1的表达; 以p-JAK1/t-JAK1的值表示蛋白磷酸化水平, 甘草水提物以质量浓度相关的方式增加了JAK1的磷酸化水平( $P > 0.05$ , 变化倍数=1.2;  $P < 0.001$ , 变化倍数=1.4;  $P < 0.001$ , 变化倍数=

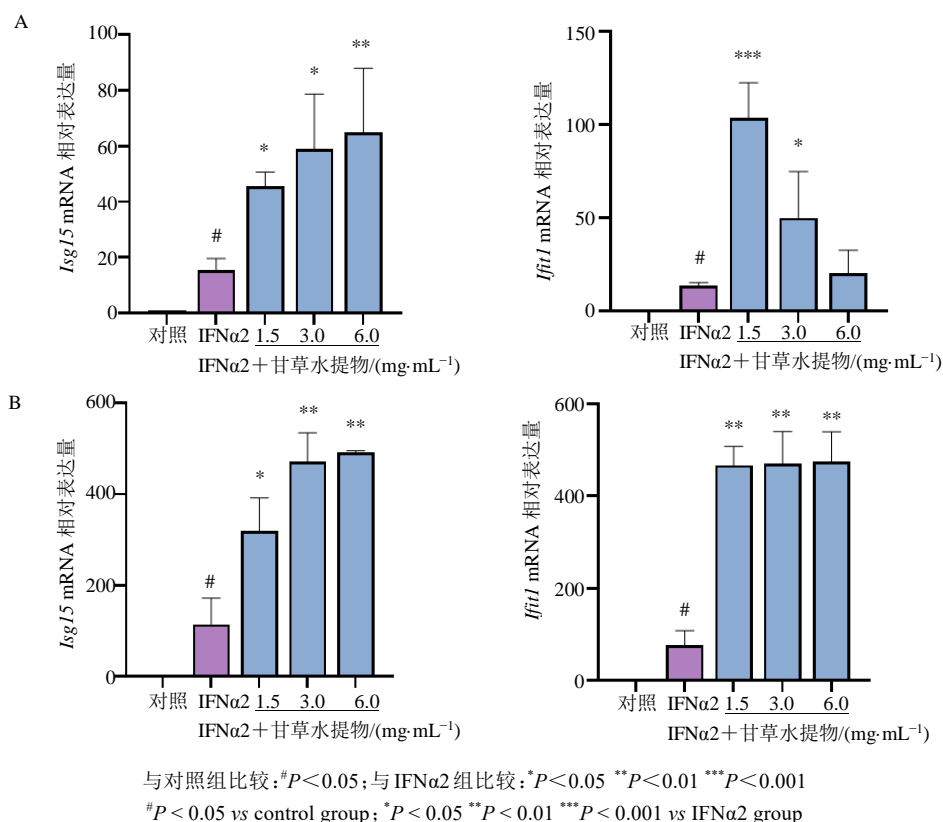


图3 甘草水提物对巨噬细胞(A-RAW264.7细胞, B-BMDM细胞)IFN-I相关基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Effect of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on expression of IFN-I related genes in macrophages (A-RAW264.7 cells, B-BMDM cells)( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

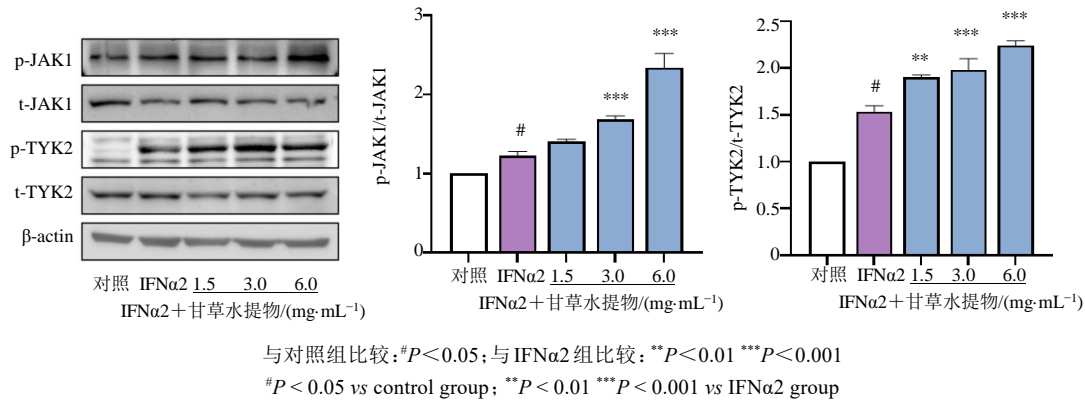


图4 甘草水提取物对RAW 264.7细胞JAK1、TYK2蛋白磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effects of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on phosphorylation of JAK1 and TYK2 protein in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

1.9)。另外,IFNα2显著增加了磷酸化TYK2(p-TYK2)的表达,而对总TYK2(t-TYK2)无显著影响。与IFNα2组比较,不同质量浓度的甘草水提取物均增加了IFNα2诱导的p-TYK2水平;而对t-TYK2表现出抑制作用;以p-TYK2/t-TYK2的值表示蛋白磷酸化水平,甘草水提取物以质量浓度相关的方式显著增加了TYK2的磷酸化水平( $P < 0.01$ , 变化倍数=1.2;  $P < 0.001$ , 变化倍数=1.3;  $P < 0.001$ , 变化倍数=1.5)。

### 3.5 甘草水提取物对STATs磷酸化的影响

Western blotting实验结果(图5)显示,IFNα2增加了总STAT1(t-STAT1)和磷酸化STAT1(p-STAT1)的表达。与IFNα2组比较,低、高质量浓度的甘草水提取物均降低了t-STAT1的水平,而中质量浓度的甘草水提取物增加了t-STAT1的水平;中、高质量浓度的甘草水提取物均增加了p-STAT1的水平;以p-STAT1/t-STAT1的值表示蛋白磷酸化水平,中、高质量浓度的甘草水提取物显著增加了STAT1的磷酸化水平( $P < 0.001$ ,

变化倍数=1.3;  $P < 0.05$ , 变化倍数=1.1)。IFNα2增加了磷酸化STAT2(p-STAT2)的表达,而降低了总STAT2(t-STAT2)的水平。与IFNα2组比较,不同质量浓度的甘草水提取物均增加了t-STAT2和p-STAT2的表达;以p-STAT2/t-STAT2的值表示蛋白磷酸化水平,甘草水提取物以质量浓度依赖的方式显著增加了STAT2的磷酸化水平( $P < 0.05$ , 变化倍数=1.2;  $P < 0.001$ , 变化倍数=1.4;  $P < 0.001$ , 变化倍数=1.7)。

### 3.6 甘草水提取物中各单体成分对IFN-I相关基因表达的影响

为了进一步探究甘草水提取物中发挥IFN-I激活作用的单体成分,在RAW264.7细胞中分别给予了甘草酸(125、250 μmol·L<sup>-1</sup>)、甘草苷(20、40 μmol·L<sup>-1</sup>)、异甘草素(20、40 μmol·L<sup>-1</sup>)、甘草素(2、4 μmol·L<sup>-1</sup>)、18β-甘草次酸(20、40 μmol·L<sup>-1</sup>)处理。qRT-PCR结果(图6)显示,高质量浓度18β-甘草次酸显著增强了IFNα2诱导的*Isg15*和*Ifit1*的表达( $P < 0.001$ , 变

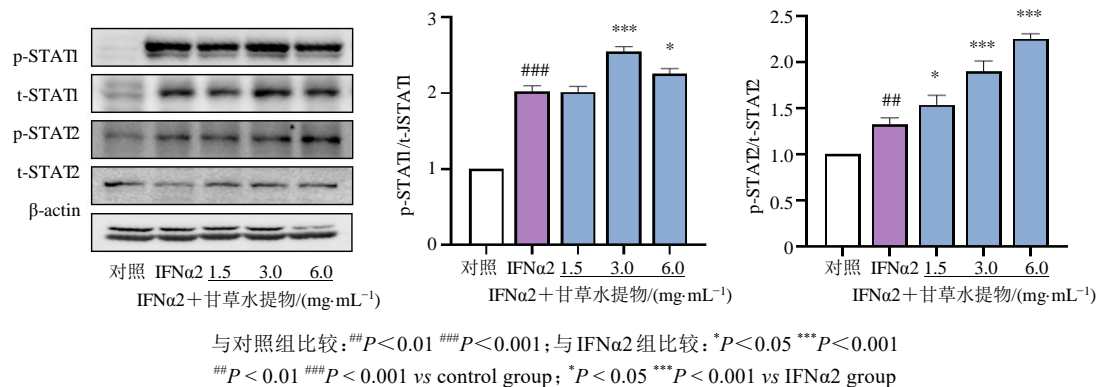


图5 甘草水提取物对RAW264.7细胞STATs蛋白磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Effects of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on phosphorylation of STATs protein in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

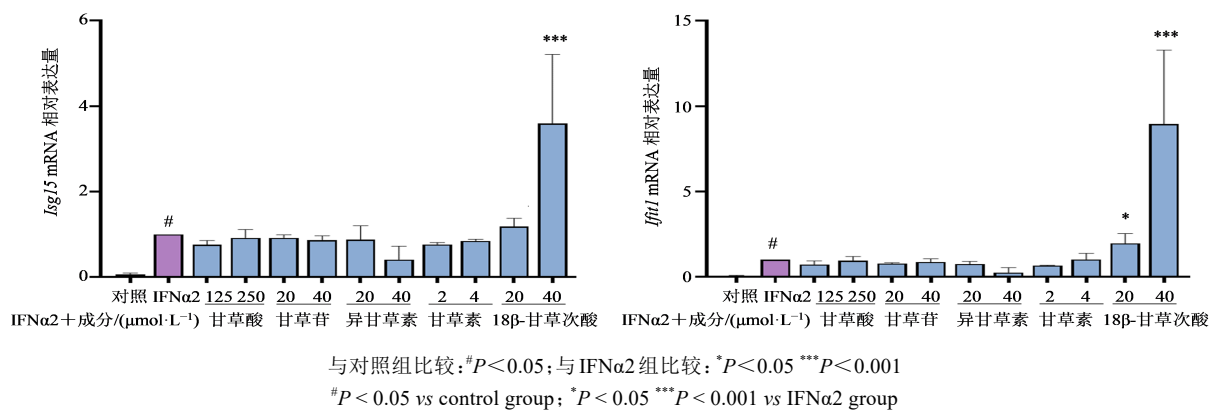


图6 甘草水提取物中单体成分对IFN-I相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Effects of components of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* water extract on expression of IFN-I related genes in RAW264.7 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

化倍数 = 3.6;  $P < 0.001$ , 变化倍数 = 9.0), 而其他单体化合物对IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*的表达无显著影响。

#### 4 讨论

前期研究发现四逆散对IFN-I通路下游多个靶点具有负调控作用<sup>[5]</sup>, 因而本课题组对其组成的4味中药水提物的IFN-I活性进行了研究, 结果显示白芍水提取物具有一定的IFN-I抑制作用, 而甘草是四逆散中发挥IFN-I激活作用的中药。四逆散中白芍和甘草的配伍符合中医方剂相反相成理论, 可能是四逆散在体内调畅气机进而发挥免疫双向调节作用的现代科学内涵。在本研究中, 主要关注甘草水提物的IFN-I激活作用。甘草始载于《神农本草经》, 古有“十方九草”之说, 现代药理学研究也表明, 甘草具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎杀菌、保肝等多种药理作用<sup>[18-20]</sup>。本研究中, 甘草水提取物在巨噬细胞系RAW264.7细胞和小鼠原代BMDM中均显著增强了IFN $\alpha$ 2诱导的*Isg15*和*Ifit1*表达。当机体受到病毒侵袭时, 能够迅速产生大量IFN-I及ISGs来抑制病毒在感染细胞中的复制。已有研究表明, 甘草水提取物对呼吸道合胞病毒、I型单纯疱疹病毒、肠道病毒71型等病毒均有一定的抑制作用<sup>[21]</sup>。在目前防治新型冠状病毒肺炎的中药专利复方中, 甘草的使用频次最高<sup>[22]</sup>。本研究结果提示, 甘草水提取物对ISGs的诱导作用可能是其发挥抗病毒作用的机制之一。

除了抗病毒作用, IFN-I还能够直接或间接地抑制肿瘤细胞的增殖。IFN- $\alpha$ 是第1个被美国FDA批准用于临床治疗的细胞因子, 目前已有40多个国家将其用于14种以上癌症的治疗, 包括慢性髓细胞白

血病、淋巴瘤、黑色素瘤等<sup>[23]</sup>。然而, 治疗所需剂量大、毒副作用明显、药物不耐受等副作用, 严重限制了IFN-I在临床的广泛应用<sup>[24]</sup>。通过将木犀草素、芹菜素等具有JAK-STAT激活作用的天然产物与IFN- $\alpha$ 联用, 能够在不影响抑瘤活性的前提下减少IFN- $\alpha$ 的使用剂量, 从而降低其副作用<sup>[25-26]</sup>。本研究结果显示, 甘草水提取物能够增强IFN $\alpha$ 2诱导的IFN-I下游JAK1、TYK2、STAT1、STAT2的激活, 且在有效质量浓度(1.5~6.0 mg·mL<sup>-1</sup>)下具有90%以上的细胞存活率。这提示甘草水提取物可通过对JAK-STAT的激活增强IFN-I的抗肿瘤作用, 同时降低其系统性毒副作用, 以扩大其临床应用。

综上所述, 本研究表明甘草水提取物对IFN-I通路的多个靶点具有激活作用(图7), 为甘草水提取物在抗病毒和抗肿瘤的药理作用评价和机制探究提供了新的方向。此外, 通过对甘草水提取物中各单体的IFN-I活性的初步探究, 发现18 $\beta$ -甘草次酸可能是甘草水提取物中发挥IFN-I激活作用的单体成分。后续将对18 $\beta$ -甘草次酸的药理作用及其潜在机制

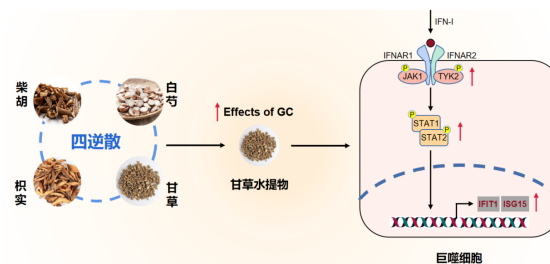


图7 甘草水提取物对IFN-I信号通路的影响

Fig. 7 Effects of water extract of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on IFN-I signaling pathway



进行更深入的研究,为天然小分子药物在与IFN-I相关疾病的治疗提供实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Ivashkiv L B, Donlin L T. Regulation of type I interferon responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36-49.
- [2] Gerlach N, Schimmer S, Weiss S, et al. Effects of type I interferons on friend retrovirus infection [J]. *J Virol*, 2006, 80(7): 3438-3444.
- [3] Jiang J, Zhao M, Chang C, et al. Type I interferons in the pathogenesis and treatment of autoimmune diseases [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, 59(2): 248-272.
- [4] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, et al. Type I interferons in infectious disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 87-103.
- [5] Cai Y J, Xu B, Zhou F, et al. Si-Ni-San ameliorates chronic colitis by modulating type I interferons-mediated inflammation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153495.
- [6] 刘海霞. 四逆散及其代表性成分芍药苷改善非酒精性脂肪肝的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.  
Liu H X. Study on mechanism of Sinisan and its representative component paeoniflorin in improving non-alcoholic fatty liver disease [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2021.
- [7] 高航. 柴胡皂苷A通过激活核受体LXR $\alpha$ 治疗骨关节炎的作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.  
Gao H. The therapeutic effects and mechanism of saikosaponin A on osteoarthritis by activating nuclear receptor LXR $\alpha$  [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [8] Wu J Z, Huang G R, Li Y J, et al. Flavonoids from *Aurantii Fructus Immaturus* and *Aurantii Fructus*: Promising phytochemicals for the treatment of liver diseases [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 89.
- [9] 汪娟, 王芳. 白芍总苷治疗自身免疫性疾病的研究进展 [J]. *医学综述*, 2021(22): 4481-4485.  
Wang J, Wang F. Research progress of total glucosides of paeony in treatment of autoimmune diseases [J]. *Med Recapitul*, 2021(22): 4481-4485.
- [10] 朱胜楠, 张靖, 谭亲友, 等. 甘草水提取物对雷公藤甲素致大鼠急性肝损伤的改善作用及对其体内IL-10、TNF- $\alpha$ 水平的影响 [J]. *中国药房*, 2019, 30(2): 216-220.  
Zhu S N, Zhang J, Tan Q Y, et al. Improvement effects of water extract of *Glycyrrhiza uralensis* on acute hepatic injury caused by triptolide and its effects on the levels of IL-10 and TNF- $\alpha$  in rats [J]. *China Pharm*, 2019, 30(2): 216-220.
- [11] 赵秀荣, 侯绍郅, 皇甫通, 等. 异甘草素改善RAW 264.7细胞线粒体生物发生抑制LPS诱导的炎症反应 [J]. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2022, 35(1): 60-69.
- [12] Zhao X R, Hou S Z, Huangpu T, et al. Isoliquiritigenin improves mitochondrial biogenesis in RAW 264.7 cells and inhibits LPS-induced inflammation [J]. *J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed*, 2022, 35(1): 60-69.
- [13] Chen Y Y, Qu L H, Li Y, et al. Glycyrrhizic acid alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by regulating angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and caveolin-1 signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2022, 45(1): 253-266.
- [14] Yang X H, Dang X W, Zhang X, et al. Liquiritin reduces lipopolysaccharide-aroused HaCaT cell inflammation damage via regulation of microRNA-31/MyD88 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 101(Pt B): 108283.
- [15] Kim M J, Kang H H, Seo Y J, et al. *Paeonia lactiflora* root extract and its components reduce biomarkers of early atherosclerosis via anti-inflammatory and antioxidant effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(10): 1507.
- [16] 辛然, 陈彦, 贾晓斌, 等. 枳实中黄酮成分及其提取物大鼠肠吸收特性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(14): 1850-1854.  
Xin R, Chen Y, Jia X B, et al. Intestinal absorption properties of flavones and extract of fructus aurantii immaturus in rats [J]. *China J Chin Mater Med*, 2010, 35(14): 1850-1854.
- [17] Duan X Y, Wen J, Zhang M, et al. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and its active components mitigate Semen *Strychni*-induced neurotoxicity through regulating high mobility group box 1 (HMGB1) translocation [J]. *Biomed Pharm*, 2022, 149: 112884.
- [18] 杨晓露, 刘朵, 卞卡, 等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(1): 99-104.  
Yang X L, Liu D, Bian K, et al. Study on *in vitro* anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its ingredients [J]. *China J Chin Mater Med*, 2013, 38(1): 99-104.
- [19] 连小龙, 令颖, 张尚龙, 等. 甘草有效成分抗肿瘤作用机制及联合抗肿瘤研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(11): 238-245.  
Lian X L, Ling Y, Zhang S L, et al. Anti-tumor mechanism of active ingredients of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its combined use in anti-tumor treatment: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(11): 238-245.
- [20] 李想, 李冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展 [J]. *江苏中医药*, 2019, 51(5): 81-86.  
Li X, Li J. The research progress of the pharmacological



- function of active components extracted from Gancao [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2019, 51(5): 81-86.
- [20] 王钧楠, 周永峰, 崔园园, 等. 甘草增强免疫的物质基础及其作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1844-1850.
- Wang J N, Zhou Y F, Cui Y Y, et al. Research progress on material basis and mechanism of *Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma* enhancing immunity [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(6): 1844-1850.
- [21] 李忠原, 李保宏, 刘苗苗, 等. 甘草对5种病毒的抑制作用及抗RSV活性部位的筛选 [J/OL]. *中成药*, (2021-08-13) [2022-04-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210813.1101.002.html>.
- Li Z Y, Li B H, Liu M M, et al. Effects of *Glycyrrhiza uralensis* on inhibiting five viruses and screening of active anti-RSV fraction [J/OL]. *Chin Tradit Patent Med*, (2021-08-13) [2022-04-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210813.1101.002.html>.
- [22] 李浩, 刘伟, 侯贺祥, 等. 中药防治新型冠状病毒肺炎专利复方用药规律分析 [J]. *中南药学*, 2021, 19(11): 2426-2431.
- Li H, Liu W, Hou H X, et al. Patent compound Chinese medicine prescriptions in preventing and treating COVID-19 [J]. *Central South Pharm*, 2021, 19(11): 2426-2431.
- [23] Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Interferon-alpha and cancer: Mechanisms of action and new perspectives of clinical use [J]. *Biochimie*, 2007, 89(6/7): 884-893.
- [24] Borden E C. Interferons  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer: Therapeutic opportunities from new insights [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 219-234.
- [25] Tai Z F, Lin Y, He Y J, et al. Luteolin sensitizes the antiproliferative effect of interferon  $\alpha/\beta$  by activation of *Janus kinase*/signal transducer and activator of transcription pathway signaling through protein kinase A-mediated inhibition of protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(3): 619-628.
- [26] Li S, Yang L J, Wang P, et al. Dietary apigenin potentiates the inhibitory effect of interferon- $\alpha$  on cancer cell viability through inhibition of 26S proteasome-mediated interferon receptor degradation [J]. *Food Nutr Res*, 2016, 60: 31288.

[责任编辑 刘东博]