

## 桂枝挥发油及桂皮醛抗流感病毒的机制研究

刘蓉<sup>1</sup>, 何婷<sup>1</sup>, 曾南<sup>1\*</sup>, 陈恬<sup>2</sup>, 苟玲<sup>1</sup>, 刘金伟<sup>1</sup>

1. 成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 成都医学院 病原生物学教研室, 四川 成都 610083

**摘要:** 目的 考察桂枝挥发油及其主要成分桂皮醛体外对甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1) 的直接杀灭作用, 探讨其抗流感病毒作用机制中 Toll 样受体 7 (TLR7) 信号通路的作用。方法 以流感病毒感染的狗肾传代细胞 (MDCK) 为载体, 测定桂枝挥发油及桂皮醛体外抑制流感病毒增殖的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 和治疗指数 (TI); ELISA 法检测 MDCK 细胞干扰素-β (IFN-β) 的分泌; RT-PCR 法考察 MDCK 细胞中 Toll 样受体 3 (TLR3)、TLR7、肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF-3)、白介素-1 受体相关激酶 4 (IRAK-4)、IFN-β 基因的表达。结果 桂枝挥发油及桂皮醛对流感病毒有明显的直接杀灭作用, IC<sub>50</sub> 分别为  $1.85 \times 10^{-7}$ 、 $5.77 \times 10^{-7}$  g/mL, TI 分别为 27.04、9.51。与病毒组比较, 桂枝挥发油和桂皮醛  $0.25 \times 10^{-5}$  g/mL 显著升高感染甲型流感病毒的 MDCK 细胞上清液中 IFN-β 的量 ( $P < 0.05$ ), 显著上调细胞中 TLR7、IRAK-4、IFN-β mRNA 表达水平 ( $P < 0.05$ )。结论 桂枝挥发油及桂皮醛对流感病毒 H1N1 的增殖有显著抑制作用, 作用机制可能与其激活 TLR7 信号通路、活化 IRAK-4、诱导 IFN-β 高表达有关。

**关键词:** 桂枝挥发油; 桂皮醛; 流感病毒 H1N1; TLR7 信号通路; 干扰素-β; 白介素-1 受体相关激酶 4

**中图分类号:** R282.710.5; R978.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)11-1460-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.019

## Mechanism of anti-influenza virus of volatile oil in *Cinnamomi Ramulus* and cinnamaldehyde

LIU Rong<sup>1</sup>, HE Ting<sup>1</sup>, ZENG Nan<sup>1</sup>, CHEN Tian<sup>2</sup>, GOU Ling<sup>1</sup>, LIU Jin-wei<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Department of Pathogenic Biology, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China

**Abstract: Objective** To study the anti-influenza virus A/PR/8/34 (H1N1) activity of the volatile oil in *Cinnamomi Ramulus* (VOCR) and cinnamaldehyde *in vitro*, and to reveal the effect of TLR7 signaling pathway in anti-influenza. **Methods** The IC<sub>50</sub> and therapeutic index (TI) of VOCR and cinnamaldehyde *in vitro* were determined using influenza virus-infected Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. ELISA was conducted to determine the level of interferon-β (IFN-β) in MDCK cells. The real-time RT-PCR was used to determine the mRNA expression of TLR3, TLR7, TRAF-3, interleukin-1 related acceptor kinase-4 (IRAK-4), and IFN-β. **Results** Both VOCR and cinnamaldehyde had the direct virucidal activities on influenza virus; The IC<sub>50</sub> values were  $1.85 \times 10^{-7}$  and  $5.77 \times 10^{-7}$  g/mL, respectively. The TI values were 27.04 and 9.51, respectively. Compared with the virus group, VOCR and cinnamaldehyde ( $0.25 \times 10^{-5}$  g/mL) had the significant effects on increasing the serum level of IFN-β in infected MDCK cells ( $P < 0.05$ ) and the mRNA expression of TLR7, IRAK-4, and IFN-β ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** VOCR and cinnamaldehyde have good anti-influenza virus activities in the cellular level. The mechanisms are related to the activation of TLR7 signaling pathway and IRAK-4, and leading to the high expression of IFN-β. **Key words:** volatile oil of *Cinnamomi Ramulus*; cinnamaldehyde; influenza virus H1N1; TLR7 signaling pathway; interferon-β; interleukin-1 related acceptor kinase-4

桂枝为樟科乔木植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝, 有发汗解肌、温经通阳之功效; 药理研究表明, 桂枝具有解热、镇痛、镇静、抗惊厥、抗炎、抗过敏、抗菌、抗病毒等作用<sup>[1]</sup>。桂枝

收稿日期: 2012-08-28

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30973923, 8173637); “2010 年度高层次留学人才回国资助人选”项目 (国家人社部社厅函[2010] 411 号); 2010 年度留学回国人员科技活动项目择优资助项目 (国家人社部社厅函[2010]412 号); 四川省教育厅培育项目 (12ZB037)

**作者简介:** 刘蓉 (1979—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为抗感染免疫。Tel: 13880765230 E-mail: liurong\_1116@126.com

**\*通信作者** 曾南 Tel: 13198502352 E-mail: zengnan966@126.com

的主要有效组分之一是挥发油,挥发油中主要含有桂皮醛。前期研究表明,桂枝挥发油和桂皮醛体外能明显抑制 H1N1 甲型流感病毒在 MDCK 细胞中的增殖<sup>[2]</sup>,在此基础上,本实验进一步考察桂枝挥发油和桂皮醛对流感病毒的直接杀灭作用,以及对感染流感病毒的 MDCK 细胞 Toll 样受体 3 (TLR3)、Toll 样受体 7 (TLR7)、肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF-3)、白介素-1 受体相关激酶 4 (IRAK-4)、干扰素- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) 基因表达的影响,以期阐释桂枝抗流感病毒的物质基础及 TLR/IFN 信号通路机制。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

桂枝原药材购于成都荷花池中药材市场,产地广西,经成都中医药大中药鉴定教研室严铸云教授鉴定为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝,质量符合《中国药典》2010 年版标准;采用《中国药典》2010 年版附录挥发油提取法乙法提取桂枝挥发油(淡黄色油状液体),无水硫酸钠脱水后避光密闭保存,其中桂皮醛质量分数 66.85%。桂皮醛对照品质量分数 $\geq 93\%$ ,百灵威科技有限公司,批号 MKBB245。将桂枝挥发油及桂皮醛 50  $\mu\text{L}$  加入 950  $\mu\text{L}$  二甲基亚砜(DMSO)溶液,配制成含桂皮醛 0.05 g/mL 的母液备用。临用时用培养液稀释至所需质量浓度。利巴韦林,10 mg/瓶, Sigma 公司,批号 020M4003。各药物临用时用培养液稀释至所需质量浓度。

DMEM 培养基、青霉素和链霉素母液、7.5% 牛血清白蛋白组分 V、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、胎牛血清、0.25% EDTA-胰酶,均购自 Invitrogen 公司;TPCK-胰酶、4,5-二甲基噻唑-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)、DMSO, Sigma 公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS), Thermo Scientific 公司;逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒, TaKaRa 公司。琼脂糖、DNA Marker、Trizol, 大连宝生物工程公司;Canine IFN- $\beta$  ELISA 试剂盒, R&D 公司。

### 1.2 病毒与细胞

甲型流感病毒鼠肺适应株 A/PR/8/34 (H1N1), 四川大学华西医学中心提供,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。使用前于 9 日龄鸡胚尿囊腔连续传代 2 次后,测血凝滴度为 1:512。MDCK 细胞,四川省疾病预防控制中心惠赠,细胞复苏传代后使用。

## 1.3 仪器

SW—CJ—IF 超净工作台,苏州净化设备有限公司;GHP—9270 恒温培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;ND1000 核酸蛋白测定仪, Nano Drop 公司;IQ5 Optical module 实时荧光定量 RT-PCR 仪, Bio-RAD 公司;Multiskan MK3 酶标仪,美国 Thermo 公司。

## 2 方法

### 2.1 对流感病毒的直接杀灭作用

前期实验显示,甲型流感病毒对 MDCK 细胞的半数感染量(TCID<sub>50</sub>)为  $1 \times 10^{-7}$  mL,桂枝挥发油及桂皮醛对 MDCK 细胞的最大无毒浓度(TC<sub>0</sub>)均为  $0.25 \times 10^{-5}$  g/mL,半数中毒浓度(TC<sub>50</sub>)为  $5.0 \times 10^{-6}$  g/mL<sup>[2]</sup>。将桂枝挥发油或桂皮醛从 2 倍 TC<sub>0</sub> 开始进行对倍稀释,并分别与 20 TCID<sub>50</sub> 病毒液等体积混合,配制试药-病毒混合溶液(试药质量浓度为  $0.25 \times 10^{-5} \sim 39 \times 10^{-9}$  g/mL,病毒液终浓度均为 10 TCID<sub>50</sub>),置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 1 h。待 96 孔板中细胞长成单层后,弃上清液, PBS 洗涤细胞 3 次,按 150  $\mu\text{L}$ /孔加入上述不同质量浓度的桂枝挥发油或桂皮醛-病毒混合液,同时设置对照组、病毒组和阳性对照组。对照组不加病毒,每孔只加细胞培养液 150  $\mu\text{L}$ ;病毒组每孔加病毒生长液 150  $\mu\text{L}$ ;阳性对照组每孔加入 TC<sub>0</sub> (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 利巴韦林与病毒的混合液 150  $\mu\text{L}$ 。每个组平行做 6 复孔, 33.5  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养,每日观察细胞病变(CPE),根据文献方法对 CPE 分级、记录<sup>[2]</sup>。当病毒组细胞 CPE 达++++~+++++,采用 MTT(终浓度 0.5 g/L)比色法检测 492 nm 处吸光度(A)值,计算流感病毒的抑制率,按 Reed-Muench 法计算试药的半数有效浓度(IC<sub>50</sub>)和治疗指数(TI)。

$$TI = TC_{50} / IC_{50}$$

### 2.2 ELISA 法检测 IFN- $\beta$ 分泌量

96 孔板中常规培养 MDCK 细胞,待细胞形成薄单层后弃上清, PBS 液洗细胞 3 次,每孔加入 10 倍 TCID<sub>50</sub> 流感病毒 100  $\mu\text{L}$ ,细胞对照组正常细胞每孔加入 PBS 液 100  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 1 h。吸弃上清液, PBS 液洗细胞 3 次,除细胞对照组外,将感染流感病毒的细胞分成桂枝挥发油组、桂皮醛组、病毒组、阳性对照组,每组设 8 个复孔。对照组加入无血清培养液,桂枝挥发油和桂皮醛组分别加入桂枝挥发油-病毒混合液和桂皮醛-病毒混合液(药物终质量浓度均为  $2.5 \times 10^{-6}$  g/mL),病毒组加入病毒生长液,阳性对照组加入利

巴韦林-病毒混合液(利巴韦林终质量浓度为  $1 \times 10^{-3}$  g/mL), 体积均为 150  $\mu$ L, 33.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 7 h。用无菌管收集各组细胞上清液, 3 000 r/min 离心 20 min, 仔细收集上清, 按照试剂盒说明书操作加入 IFN- $\beta$  对照品, 制备标准曲线, 加入待测样品, 完成 IFN- $\beta$  的结合, 再加入酶标抗体后显色, 酶标仪测定 450 nm 处 A 值。

### 2.3 RT-PCR 法检测相关基因表达

**2.3.1 样本制备** T25 细胞瓶中常规培养 MDCK 细胞, 待细胞形成薄单层后弃上清, PBS 液轻柔洗细胞 3 次, 每瓶加入 10 TCID<sub>50</sub> 病毒液 0.5 mL, 细胞对照组正常细胞加入 PBS 液 0.5 mL, 各组细胞于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 1 h, 吸出上清液, PBS 液轻柔洗涤细胞 3 次。除细胞对照组外, 感染流感病毒的细胞分成桂枝挥发油组、桂皮醛组、病毒组、阳性对照组。对照组加入无血清培养液, 桂枝挥发油和桂皮醛组分别加入桂枝挥发油-病毒混合液和桂皮醛-病毒混合液, 病毒组加入病毒生长液, 阳性对照组加入利巴韦林-病毒混合液, 各组药物质量浓度同“2.2”项, 均 6 mL/瓶, 每组 4 个样本, 33.5  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 7 h。消化、收集细胞, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集沉淀, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

**2.3.2 总 RNA 提取和 cDNA 逆转录合成** 采用 Trizol 法提取所收集的细胞总 RNA, 核酸蛋白测定仪测定 A<sub>260</sub> 值, 计算 RNA 的量, 并将各组细胞用双蒸水稀释成相同浓度, 按照试剂盒说明书进行逆转录。逆转录反应体系为: 0.1% DEPC 55  $\mu$ L, 50

$\mu$ mol/L Oligo dT Primer 5  $\mu$ L, 100  $\mu$ mol/L Random 6 mers 5  $\mu$ L, 总 RNA 10  $\mu$ L。漩涡混匀后 65  $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 立即置冰上, 再加入 5 $\times$ primescript 缓冲液 20  $\mu$ L, PrimeScript RT Enzyme Mix I 5  $\mu$ L, 漩涡混匀, 进行逆转录反应, 条件为 37  $^{\circ}$ C、17 min, 85  $^{\circ}$ C、5 s。

**2.3.3 RT-PCR 检测** RT-PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ L, 上下游引物混合物 1  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, 双蒸水 10.5  $\mu$ L。漩涡混匀后置 RT-PCR 仪上进行反应: 第 1 步预变性, 反应条件 95  $^{\circ}$ C、3 min; 第 2 步 PCR 反应, 反应条件 40  $^{\circ}$ C、95  $^{\circ}$ C、10 s, 60  $^{\circ}$ C、30 s。各引物均由大连宝生物工程有限公司设计合成, 引物序列见表 1。分析得出各个样品量的 Ct 值, 所有样品基因均经内参 18S RNA 的均一化处理, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式<sup>[3]</sup>计算 mRNA 的相对表达量。

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}})_{\text{对照组}}$$

### 2.4 统计学处理

数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据呈正态性分布时应用 SPSS 1.0 统计软件进行单因素方差分析, 不符合正态性分布时采用 K-W 检验。

## 3 结果

### 3.1 对流感病毒的直接杀灭作用

感染流感病毒的 MDCK 细胞皱缩、变圆、脱落。桂枝挥发油和桂皮醛对流感病毒具有抑制作用, 且抑制作用随质量浓度的升高而逐渐增强, CPE 逐渐减轻。桂枝挥发油在 TC<sub>0</sub> ( $2.5 \times 10^{-6}$  g/mL) 对流感病毒的直接杀灭率为 81.8%, 在  $1.25 \times 10^{-6} \sim 3.13 \times 10^{-7}$  g/mL 时, 对流感病毒的杀灭率均高于 50%。桂

表 1 基因引物序列及产物片段

Table 1 Sequences of gene primers and fragments of products

| 目的基因         | 引物序列 (5'-3')                                               | 产物片段 / bp |
|--------------|------------------------------------------------------------|-----------|
| 18S RNA      | 正向: CGGACAGGATTGACAGATT<br>反向: CAAATCGCTCCACCAACTAA        | 109       |
| TLR3         | 正向: CCTGGTTTGTTAATTGGATTAAACAG<br>反向: TGAGGTGGAGTGTTCAGAGG | 144       |
| TLR7         | 正向: TTTATCTGGATGGAACACAG<br>反向: AAGATACTGTTGGCTTCGAGGCT    | 138       |
| TRAF-3       | 正向: TAGGGCATTCGTTGAACTTTGGA<br>反向: TGTCCAGGTGAAGTTTCC      | 111       |
| IRAK-4       | 正向: GGCAAAGACAGGACATTTGTGT<br>反向: TTTTCTGGACTTGAGGAGTCAGG  | 80        |
| IFN- $\beta$ | 正向: CCAGTTCCAGAAGGAGGACA<br>反向: TGTCCAGGTGAAGTTTCC         | 120       |

皮醛在  $TC_0$  对流感病毒的杀灭率为 65.5%，在  $1.25 \times 10^{-6} \sim 6.25 \times 10^{-7}$  g/mL 时对流感病毒杀灭率 > 50%。利巴韦林在  $TC_0$  ( $1.5 \times 10^{-5}$  g/mL) 时对流感病毒杀灭低于 50%。桂枝挥发油、桂皮醛对流感病毒的  $IC_{50}$ 、 $TC_{50}$  和 TI 见表 2。

表 2 桂枝挥发油和桂皮醛对流感病毒的  $IC_{50}$ 、 $TC_{50}$  和 TI  
Table 2  $IC_{50}$ ,  $TC_{50}$ , and TI of VOCR and cinnamaldehyde on influenza virus

| 组 别   | $TC_{50} / (g \cdot mL^{-1})$ | $IC_{50} / (g \cdot mL^{-1})$ | TI    |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| 桂枝挥发油 | $5.0 \times 10^{-6}$          | $1.85 \times 10^{-7}$         | 27.04 |
| 桂皮醛   | $5.0 \times 10^{-6}$          | $5.77 \times 10^{-7}$         | 9.51  |
| 利巴韦林  | $> 1.0 \times 10^{-3}$        | —                             | —     |

因利巴韦林在  $TC_0$  对流感病毒的抑制率 < 50%，无法计算  $IC_{50}$  及 TI  
 $IC_{50}$  and TI of ribavirin could not be calculated in direct virucidal experiment because viral inhibitory ratio is less than 50%

### 3.2 对感染流感病毒的 MDCK 细胞 IFN- $\beta$ 分泌的影响

根据 IFN- $\beta$  对照品拟合回归方程为  $Y = 0.004\,772X + 0.035\,957$ ，按此方程换算待测样品的 IFN- $\beta$  的量。与对照组比较，病毒组 IFN- $\beta$  分泌量无显著差异。与病毒组比较，桂枝挥发油和桂皮醛能显著增加感染流感病毒的 MDCK 细胞 IFN- $\beta$  的分泌量 ( $P < 0.05$ )；利巴韦林组有促进 IFN- $\beta$  分泌的趋势，但与病毒组相比无显著差异，可能与其测定时间及抗病毒机制有关。结果见表 3。

表 4 桂枝挥发油及桂皮醛对感染流感病毒的 MDCK 细胞相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 4 Effects of VOCR and cinnamaldehyde on mRNA expression of related genes in H1N1-infected MDCK cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

| 组 别   | $\rho / (g \cdot mL^{-1})$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$    |                            |                          |                           |                            |
|-------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
|       |                            | TLR3                      | TLR7                       | TRAF-3                   | IRAK-4                    | IFN- $\beta$               |
| 对照    | —                          | 1.00 ± 0.00               | 1.00 ± 0.00                | 1.00 ± 0.00              | 1.00 ± 0.00               | 1.00 ± 0.00                |
| 病毒    | —                          | 1.58 ± 0.41               | 1.74 ± 0.48 <sup>▲</sup>   | 0.73 ± 0.12              | 1.42 ± 0.59 <sup>▲</sup>  | 6.53 ± 0.89 <sup>▲▲</sup>  |
| 桂枝挥发油 | $2.5 \times 10^{-6}$       | 0.53 ± 0.20 <sup>**</sup> | 11.92 ± 3.23 <sup>**</sup> | 0.58 ± 0.06              | 3.46 ± 0.46 <sup>**</sup> | 24.21 ± 9.72 <sup>**</sup> |
| 桂皮醛   | $2.5 \times 10^{-6}$       | 1.13 ± 0.22               | 7.95 ± 2.45 <sup>**</sup>  | 0.70 ± 0.17              | 3.06 ± 0.59 <sup>*</sup>  | 24.26 ± 2.50 <sup>**</sup> |
| 利巴韦林  | $1.0 \times 10^{-3}$       | 2.10 ± 0.89               | 1.82 ± 0.41                | 0.43 ± 0.10 <sup>*</sup> | 1.45 ± 0.06               | 8.09 ± 2.20                |

与对照组比较：<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ ；与病毒组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs virus group

## 4 讨论

流感属中医学“时行感冒”范畴，或称“重伤风”，流感病毒则是引起其“表证”的主要外邪之一，故治疗多采用解表之法<sup>[2]</sup>。桂枝作为辛温解表药的代表，临床配伍应用广泛，主治外感表证，挥发油是其“辛散解表”的重要物质基础之一<sup>[4]</sup>。在前期

表 3 桂枝挥发油及桂皮醛对感染流感病毒的 MDCK 细胞 IFN- $\beta$  分泌的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effects of VOCR and cinnamaldehyde on IFN- $\beta$  secretion in H1N1-infected MDCK cells ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 组 别   | $\rho / (g \cdot mL^{-1})$ | IFN- $\beta / (ng \cdot L^{-1})$ |
|-------|----------------------------|----------------------------------|
| 对照    | —                          | 228.592 ± 17.501                 |
| 病毒    | —                          | 228.723 ± 27.200                 |
| 桂枝挥发油 | $2.5 \times 10^{-6}$       | 285.958 ± 58.872 <sup>*</sup>    |
| 桂皮醛   | $2.5 \times 10^{-6}$       | 261.859 ± 30.872 <sup>*</sup>    |
| 利巴韦林  | $1.0 \times 10^{-3}$       | 233.045 ± 27.817                 |

与病毒组比较：<sup>\*</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs virus group

### 3.3 对感染流感病毒的 MDCK 细胞相关基因表达的影响

与对照组相比，病毒组 MDCK 细胞 TLR7、IRAK-4、IFN- $\beta$  基因表达明显上调 ( $P < 0.05$ 、0.01)，TLR3、TRAF-3 基因表达未见明显改变，提示流感病毒可激活 TLR7 信号通路的转导，而对 TLR3 信号通路则无明显影响。与病毒组比较，桂枝挥发油和桂皮醛组 MDCK 细胞 TLR7、IRAK-4、IFN- $\beta$  基因表达也明显上调 ( $P < 0.05$ 、0.01)，但桂枝挥发油组 TLR3 基因表达明显低于病毒组 ( $P < 0.01$ )，桂皮醛对 TLR3 基因表达则无明显影响，桂枝挥发油和桂皮醛对 TRAF-3 基因表达无显著差异。结果见表 4。

研究基础上，本实验进一步证实桂枝挥发油和桂皮醛在  $TC_0$  下对流感病毒具有直接杀灭作用，对感染流感病毒的 MDCK 细胞具有保护效应。

IFN 系统在非特异性免疫和特异性免疫之间起桥梁作用。正常情况下，机体内 IFN 水平较低，当机体受到病毒感染后，IFN 表达增多，从而防止病

毒的扩散和蔓延。IFN 不能直接灭活病毒,对病毒的抑制作用是通过与干扰素受体结合,经过一系列的信号转导过程,激活细胞基因,诱导细胞合成抗病毒蛋白(AVP)而发挥效应。同时,IFN 作为一类重要细胞因子,也参与机体的免疫调节,增强自然杀伤细胞(NK 细胞)、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力,以增强机体抗病毒能力<sup>[5]</sup>。

TLRs 是一类最具代表性的模式识别受体(PRRs),能够识别病原微生物中的特异性保守成分,即病原相关分子模式(PAMPs),与病毒识别关系最为密切的 TLRs 是 TLR3、TLR7<sup>[6-7]</sup>。TLRs 信号转导途径分为 MyD88 依赖性和非 MyD88 依赖性两种,TLR3 的信号转导是 MyD88 非依赖性的,其通过 Toll 样受体相关干扰素活化子(TRIF)诱导 IFN 和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)完成下游信息传递,最终信息转导以 IFN 活化为特征<sup>[8]</sup>。其中,TRAF-3 是非 MyD88 依赖性信号转导途径的重要接头分子,主要参与 TRIF 依赖性通路当中的信号转导<sup>[9]</sup>。TLR7 信号转导为 MyD88 依赖性,当 TLR7 与配体结合后促使其本身二聚化,并通过 TIR 区域传递信号和激发下游效应,启动 MyD88 依赖性通路活化。活化后的 MyD88 在重要的接头分子 IRAK-4 的作用下使 IRAK-1 发生自身磷酸化,继而引起 TRAF-6、转化生长因子- $\beta$  活化激酶(TAK1)的活化及 NF- $\kappa$ B 抑制因子 I- $\kappa$ B 的磷酸化和泛素化,从而解除了对与之结合的 NF- $\kappa$ B 的抑制作用,游离的 NF- $\kappa$ B 转位入核,使特定基因活化转录生成细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\beta$ ,进而发挥抗病毒感染作用<sup>[10-11]</sup>。

利巴韦林作为一种广谱抗病毒药物,对多种 RNA 和 DNA 病毒有效,其中对甲型、乙型流感病毒有较为明确的抑制作用。然而本实验结果发现,其在体外对 Toll 信号通路中关键分子的表达并无显著影响。分析原因,认为可能与其抗病毒机制有关。

本实验结果表明,桂枝挥发油和桂皮醛作用于感染流感病毒的 MDCK 细胞后,细胞上清液中 IFN- $\beta$  水平以及 IFN- $\beta$ 、TLR7、IRAK-4 基因表达水平平均明显上调,而对 TLR3、TRAF-3 基因表达无明显影响,提示桂枝挥发油及桂皮醛抗甲型流感病毒的作用机制与其诱导 IFN- $\beta$  的高表达有关;而激活 TLR7 信号通路,诱导通路中重要蛋白 IRAK-4 表达

上调,是桂枝挥发油与桂皮醛使感染流感病毒的细胞 IFN- $\beta$  表达增强的重要途径之一。然而,TLRs 亚型较多,桂枝挥发油与桂皮醛是否会通过影响其他通路的调馈来协同发挥抗病毒效应,实验中桂枝挥发油降低感染流感病毒的 MDCK 细胞中 TLR3 基因表达的表现,是否与桂枝挥发油中其他化学成分发挥负反馈调节作用,或者是因为 TLR 通路激活,下游炎症因子释放增多,在感染和炎症的平衡过程当中,细胞受到相关调节因子刺激发挥的负反馈调节方式有关,还有待深入研究。

#### 参考文献

- [1] 沈映君. 中药药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [2] 刘 蓉, 何 婷, 陈 恬, 等. 桂枝挥发油抗甲型流感病毒作用的实验研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 75-78.
- [3] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [4] 张艳丽, 顾立刚, 范新生, 等. 毒热平注射液抗流感病毒作用的体内实验研究 [J]. 吉林中医药, 2007(10): 57-58.
- [5] 李 军, 曾 芸. 病毒诱导 I 型干扰素产生的机制 [J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 395-398.
- [6] 常晓彤, 蔡晓峰, 王振辉. Toll 样受体信号转导途径研究进展 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(5): 340-346.
- [7] Yu N, Zhang S, Zuo F, *et al.* Cultured human melanocytes express functional toll-like receptors 2-4, 7 and 9 [J]. *J E Dermatol Sci*, 2009, 56(2): 113-120.
- [8] Chang M, Jin W, Sun S C. Peli 1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and Proinflammatory cytokine production [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(10): 1089-1095.
- [9] Hacker H, Redecke V, Blagoev B, *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effect or functions of TRAF3 and TRAF6 [J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 204-207.
- [10] Diebold S S, 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.
- [11] Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, *et al.* Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades [J]. *Int Immunol*, 2000, 12(1): 113-117.

## 蝎毒多肽增强 5-氟尿嘧啶对 H<sub>22</sub> 肝癌抑制作用的机制研究

郑安红, 张维东\*, 王兆朋, 王朝霞, 贾青, 张月英, 武利存

山东省医学科学院基础医学研究所 山东省罕见病重点实验室, 济南大学 山东省医学科学院 医学与生命科学学院, 山东济南 250062

**摘要:** **目的** 探讨蝎毒多肽增强 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 对肝癌 H<sub>22</sub> 抑制作用的机制。**方法** 以接种 H<sub>22</sub> 肝癌小鼠腹水方法建立小鼠荷瘤模型, 在接种后第 7 天将荷瘤小鼠随机分为模型组、蝎毒多肽 (20 mg/kg) 组、5-Fu (15 mg/kg) 组、低剂量蝎毒多肽 (5 mg/kg) + 5-Fu 组、高剂量蝎毒多肽 (20 mg/kg) + 5-Fu 组, 每组 10 只, 连续给药 21 d。绘制肿瘤体积增长曲线并计算抑瘤率; CD34 标记肿瘤微血管; 免疫组织化学法检测核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 联合给药组 H<sub>22</sub> 肝癌移植瘤的生长受到明显抑制 ( $P < 0.01$ ), 微血管密度 (MVD) 及 NF- $\kappa$ B、MMP-9、VEGF 蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 5-Fu 组相比, 高剂量蝎毒多肽 + 5-Fu 组的 MVD 及 NF- $\kappa$ B、MMP-9、VEGF 蛋白表达也显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而低剂量蝎毒多肽 + 5-Fu 组则无显著改变。**结论** 蝎毒多肽可增加 5-Fu 对肿瘤组织的抑制作用, 其机制可能与抑制 H<sub>22</sub> 肝癌组织 NF- $\kappa$ B 通路及 MMP-9、VEGF 的表达, 从而抑制新生血管形成有关。

**关键词:** 蝎毒多肽; 肝癌 H<sub>22</sub>; 核因子- $\kappa$ B; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶

**中图分类号:** R282.710.5; R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)11-1465-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.020

## Mechanism of polypeptide from scorpion venom increasing inhibition of 5-fluorouracil on H<sub>22</sub> hepatoma

ZHENG An-hong, ZHANG Wei-dong, WANG Zhao-peng, WANG Zhao-xia, JIA Qing, ZHANG Yue-ying, WU Li-cun

Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, School of Medical and Life Science, Jinan University, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

**Abstract:** **Objective** To explore the mechanism of polypeptide from scorpion venom (PSV) on increasing the inhibition of 5-fluorouracil (5-Fu) on H<sub>22</sub> hepatoma. **Methods** H<sub>22</sub> hepatoma model was established through sc inoculating H<sub>22</sub> cells suspension into 40 mice in right armpits. Then tumor-bearing mice were divided into five groups randomly on the day 7 after inoculating: model, PSV (20 mg/kg), 5-Fu (15 mg/kg), low-dose PSV (5 mg/kg) + 5-Fu, and high-dose PSV (20 mg/kg) + 5-Fu groups, 10 mice in each group, continuously administered for 21 d. Tumor volumes were measured once every other day, then the curves of tumor growth were drawn and the tumor inhibitory rate was calculated; CD34 was used to mark capillary; Immunohistochemical assay was used to detect the protein expression changes of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results** Compared with the model group, the growth of H<sub>22</sub> hepatoma transplantation tumor in the combinational groups was obviously inhibited ( $P < 0.01$ ); The microvessel density (MVD) and the protein expression of NF- $\kappa$ B, MMP-9, and VEGF in the two PSV groups were all decreased significantly ( $P < 0.01$ ); Compared with 5-Fu group, the MVD and the protein expression of NF- $\kappa$ B, MMP-9, and VEGF in the high-dose PSV + 5-Fu group were also decreased ( $P < 0.01$ ), while there was no significant difference between the low-dose PSV + 5-Fu group. **Conclusion** PSV may increase the inhibition of 5-Fu on H<sub>22</sub>

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073102, 30873408); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2010HQ003); 济南市科学技术发展计划 (201004012)

作者简介: 郑安红 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为实验肿瘤病理学。Tel: 18264170193 (0531)82919939 E-mail: ahzheng2008123@126.com

\*通信作者 张维东 Tel: (0531)82919939 E-mail: zhangweidongkui@163.com