

基于 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的麻杏石甘汤抗 A 型流感病毒感染小鼠所致的病毒性肺损伤研究

李 玲¹, 魏 科², 卢芳国^{2*}, 蔡 亮³, 张 波², 张世鹰⁴, 高 强², 戴 冰⁵

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208
2. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208
3. 湖南省疾病预防控制中心 微生物检验科, 湖南 长沙 410208
4. 湖南中医药大学研究生学院, 湖南 长沙 410208
5. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探索 Toll 样受体 4 (TLR4) 在 A 型流感病毒所致肺组织损伤中的影响, 并进一步探讨麻杏石甘汤的干预作用。方法 以 A 型流感病毒滴鼻感染 WT 型小鼠为研究对象, 实验设麻杏石甘汤低、中、高剂量 (1.4、2.8、5.6 g/kg) 组、奥司他韦 (21.63 mg/kg) 组、模型组 and 对照组, ig 给予相应药物 5 d 后, 处理动物。常规法检测小鼠体质量, 计算肺指数、脾指数、胸腺指数, 观察肺组织病理变化, ELISA 法检测肺泡灌洗液中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的量, real-time PCR (RT-PCR) 法和 Western blotting 法检测肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 和蛋白的表达。结果 麻杏石甘汤能上调 A 型流感病毒感染小鼠的体质量、脾指数、胸腺指数, 改善肺组织病理损伤, 降低肺泡灌洗液中促炎因子水平, 下调脾指数和肺组织中 MyD88、TRAF6 mRNA 和蛋白表达量, 且存在一定的量效关系。其中麻杏石甘汤中、高剂量组的疗效与奥司他韦接近。结论 麻杏石甘汤作为有效的抗流感病毒中药复方, 能有效地减轻肺部炎症、保护免疫器官、调节细胞因子平衡, 其可能的作用机制是通过抑制 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的激活而缓解 A 型流感病毒感染小鼠所致的肺损伤。

关键词: 麻杏石甘汤; Toll 样受体 4; A 型流感病毒; 病毒性肺损伤; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)08-1591-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.017

Effect of Maxing Shigan Decoction against type A influenza virus infection in mice induced by viral lung injury based on TLR4-MyD88-TRAF6 signal pathways

LI Ling¹, WEI Ke², LU Fang-guo², CAI Liang³, ZHANG Bo², ZHANG Shi-ying⁴, GAO Qiang², DAI Bing⁵

1. College of traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Microbiology Laboratory, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410208, China
4. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. Pharmacy college, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the effect of TLR4 on type A influenza virus induced lung tissue injury, and to further explore the intervention effect of Maxing Shigan Decoction (MXSGD). **Methods** The WT influenza virus model in mice infected with influenza A virus was established. The mice were divided into low, medium, and high dose MXSGD groups, oseltamivir group, IAV group, and Sham group. After 7 d, the treated animals were treated with corresponding clinical equivalent dose of drug. Detection in mouse body weight, lung index, spleen index, thymus index, pathological changes of lung, and ELISA method for the detection of alveolar

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503445, 81473468); 湖南省自然科学基金项目 (2016JJ2095); 湖南省教育厅项目 (15C1032, 16C1203); 湖南省卫生计生委科研课题 (C2015-16, C2016049); 湖南省高校科技创新团队“感染性疾病中医药防治研究”资助项目 (15); 湖南省省级精品课程《免疫学基础与病原生物学》资助项目 (48); 湖南中医药大学重点学科基础医学、病原生物学资助项目 (1)

作者简介: 李 玲 (1983—), 女, 硕士, 研究方向为中医药防治感染性疾病的研究。Tel: 13687362479 E-mail: 185738041@qq.com

***通信作者** 卢芳国, 博士生导师, 教授, 研究方向为中医药防治感染性疾病的研究。Tel: 13647310305 E-mail: lufanguo0731@163.com

irrigation lotion in inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) content, real-time PCR and Western blotting detection of lung tissue TLR4, MyD88, TRAF6 mRNA, and protein expression. **Results** MXSGD could up-regulate the weight, spleen index, and thymus index of type A influenza virus infection in WT mice, improve the pathological injury of lung tissue, decrease alveolar lavage lotion proinflammatory cytokines content, and down regulate the expression of MyD88 and TRAF6 mRNA and protein in lung index and lung tissue and there is a certain dose effect relationship. The effect of high dose MXSGD group was close to oseltamivir. **Conclusion** MXSGD as effective anti influenza virus of traditional Chinese medicine compound can effectively reduce lung inflammation, protect immune organs, and regulate cytokine balance. The possible mechanism is alleviating the lung injury caused by type A influenza virus infection in mice through inhibition TLR4-MyD88-TRAF6 signaling pathway of activation.

Key words: Moxing Shigan Decoction; TLR4; influenza A virus; viral lung injury; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

流感病毒的致病机制极为复杂,可能通过多种途径造成机体的急性肺损伤。近年的研究发现,Toll 样受体 4 (TLR4) 与各种病毒感染关系十分密切,广泛参与病毒性感染性疾病的发生和病毒的逃逸。已有研究表明 TLR4 介导的信号通路是流感病毒感染宿主细胞时被活化的重要信号通路之一。而 MyD88、TRAF6 作为该通路的重要下游分子,已成为近些年的研究热点^[1-5]。

麻杏石甘汤源自汉代张仲景《伤寒论》“麻黄(去节)四两(9 g),杏仁(去皮尖)五十个(9 g)、甘草(炙)二两(6 g)、石膏(碎、绵裹)半斤(18 g)”,该方具有辛凉宣肺、清热平喘之功效,主治肺热火盛的肺炎和热邪犯肺的哮喘^[6]。目前该方广泛用于感冒、上呼吸道感染、急慢性气管炎、支气管肺炎、肺心病、荨麻疹、扁桃体炎、流感、禽流感、病毒性肺炎的治疗^[7]。前期研究表明,麻杏石甘汤能干预病毒吸附、直接杀伤病毒、抑制病毒增殖,并通过调节细胞因子的分泌、提供免疫保护、抑制流感病毒感染所导致的细胞凋亡等方式发挥抗流感病毒作用^[8-12]。本研究从形态、功能、分子 3 个方面,以 TLR4 基因敲除小鼠为研究对象,探讨 TLR4 介导的信号通路在流感病毒诱导小鼠肺部炎症的发病机制中的作用,以及麻杏石甘汤是否通过调控 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路抑制流感病毒感染导致的急性肺损伤。

1 材料

1.1 实验动物

从南京大学模式动物研究所购得 SPF 级野生型 C57BL 小鼠,雌雄各半,共 48 只,体质量 16~18 g,适应性喂养 1~2 d,动物质量合格证号 SYXK(湘) 2013-0005。

1.2 病毒株

流感病毒小鼠肺适应株(A 型,IAV, A/PR/8/34),由湖南师范大学病毒研究室惠赠。经

10 日龄鸡胚尿囊腔接种培养传代,血凝效价 1:640 以上者供实验用。将病毒尿囊液以灭菌生理盐水稀释成每 0.1 毫升 50 LD₅₀(感染复数,MOI=2.0)置于冰袋中备用。

1.3 药物

麻杏石甘汤组方药材购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经湖南中医药大学中药分析教研室戴冰教授鉴定均为《中国药典》2015 年版收录的正品;磷酸奥司他韦胶囊(瑞士罗氏公司,批号 H20090377)。

1.4 主要试剂及仪器设备

Trizol Reagent(上海康为医疗科技发展有限公司);RT-PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);TLR4、MyD88、TRAF6 兔多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);PCR 仪(德国 Biometra 公司);多功能酶标仪(美国 Bio-tek 公司);SDS-PAGE 电泳、转膜设备(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 麻杏石甘汤水煎液的制备

根据《方剂学》和《中药药理学》煎煮制备麻杏石甘汤水煎液,按其组成比例精确称量麻杏石甘汤 5 剂的药材量,加入 10 倍体积蒸馏水后,浸泡 20 min,煮沸后再煎煮 30 min,煎煮完毕后滤过;二煎加入 7 倍体积蒸馏水煮沸后再煎煮 20 min,煎煮完毕后滤过,合并 2 次滤液,水浴浓缩至 1 g/mL,备用。

2.2 实验分组及干预方式

实验分组及干预方式见表 1。按动物体表面积剂量换算法^[13],小鼠的临床给药剂量分别为麻杏石甘汤 2.8 g/kg,磷酸奥司他韦胶囊 21.63 mg/kg。

2.3 检测指标

2.3.1 小鼠一般情况观察 实验结束时称各组小鼠体质量,取肺脏、胸腺和脾脏,分别称质量,计算脏器指数(器官质量/体质量)。

2.3.2 ELISA 法检测肺泡灌洗液中炎性因子水平 实验结束时处死动物,沿气管完整取下肺,结扎右肺上叶,经气管用 PBS 灌洗肺部,收集支气管肺泡灌洗液约 2 mL,1 000 r/min 离心 15 min,留取上清液置-20 ℃冰存。用 ELISA 法检测各组肺泡灌洗液中炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的量。

2.3.3 肺病理观察 选取肺病变区肺组织,10%中性甲醛固定、梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,

间断连续 5 μ m 厚切片,HE 染色、脱水、透明、封片。光学显微镜下观察肺组织病理改变。

2.3.4 RT-PCR 法检测肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 的表达 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,超微量紫外分光光度计检测浓度后将 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA,并 PCR 扩增目的基因和内参基因,反应条件:94 ℃、4 min,94 ℃、30 s、60 ℃、30 s、72 ℃、45 s,30 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。从 NCBI 中下载以下基因序列,引物采用 Primer5.0 设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 2。

2.3.5 Western blotting 法检测肺组织中 TLR4、MyD88、

表 1 实验分组及干预方式

Table 1 Grouping and intervention

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	染毒方式	药物干预
对照	—	8	生理盐水滴鼻 0.15 mL/只	每只每天 ig 生理盐水 0.4 mL,连续 5 d
模型	—	8	IAV 滴鼻感染 0.15 mL/只	每只每天 ig 生理盐水 0.4 mL,连续 5 d
奥司他韦	0.021 63	8	IAV 滴鼻感染 0.15 mL/只	每只每天 ig 奥司他韦悬液 0.4 mL,连续 5 d
麻杏石甘汤	1.4	8	IAV 滴鼻感染 0.15 mL/只	每只每天 ig 麻杏石甘汤水煎液 0.4 mL,连续 5 d
	2.8	8	IAV 滴鼻感染 0.15 mL/只	每只每天 ig 麻杏石甘汤水煎液 0.4 mL,连续 5 d
	5.6	8	IAV 滴鼻感染 0.15 mL/只	每只每天 ig 麻杏石甘汤水煎液 0.4 mL,连续 5 d

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences of RT-PCR

基因名称	引物序列 (5'→3')
TLR4-F	GGAACAGACCAACTATCGGC
TLR4-R	GAGACAACCACTACCATCCG
MyD88-F	GGAACAGACCAACTATCGGC
MyD88-R	GAGACAACCACTACCATCCG
TRAF6-F	GCAGTGAAAGATGACAGCGTGA
TRAF6-R	TCCCGTAAAGCCATCAAGCA
β -actin-F	TCTGGCACCACCTTCT
β -actin-R	GATCTGGGTCATCTTCTCAC

TRAF6 蛋白的表达 取小鼠肺组织样本于液氮中研磨至粉末状,提取组织总蛋白质,应用 BCA 法测定蛋白的量,取 50 μ g 总蛋白上样。进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后,封闭处理 1 h,加入一抗 TLR4、MyD88、TRAF6 兔抗鼠多克隆抗体(1:1 000),孵育过夜,二抗(1:3 000)室温孵育 1 h,暗室加 ECL 化学发光剂压片,显影、定影后扫描 X-胶片。

2.4 统计分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较进行独立样本 *t* 检验。多组比较,先对样本进行方差齐性检验,方差齐时,用 One-Way ANOVA 检验,并用 LSD 法进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和

检验,先用 Kruskal-Wallis H 检验比较总的差异,再用 Mann-Whitney U 检验进行两组之间比较。计数资料采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。数据使用 SPSS 19.0 统计软件进行处理。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况的比较

如图 1 所示,模型组小鼠体质量、脾指数、胸腺指数均明显下降,肺指数均明显升高,与对照组比较,差异显著($P < 0.01$);各药物干预组均能不同程度改善小鼠的一般情况,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$ 、 0.01),且麻杏石甘汤 3 个剂量组呈一定的量效关系,其中麻杏石甘汤中、高剂量组效果与阳性药物奥司他韦效果相当。

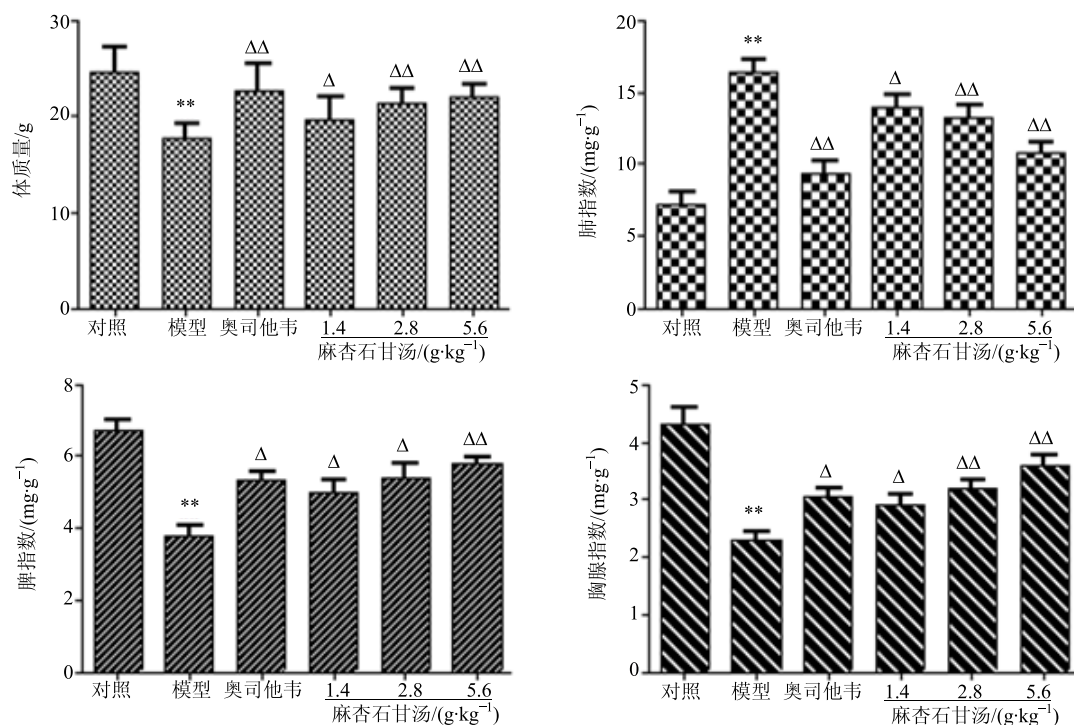
3.2 各组小鼠肺泡灌洗液中炎性因子水平比较

如图 2 所示,模型组小鼠肺泡灌洗液中炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平明显增多,与对照组比较,差异显著($P < 0.01$);各药物干预组均能不同程度下调促炎因子水平,与模型组比较,差异显著($P < 0.05$ 、 0.01),且麻杏石甘汤 3 个剂量组呈一定的量效关系,其中麻杏石甘汤中、高剂量组效果与阳性药物奥司他韦效果相当。

3.3 各组小鼠肺组织病理变化的比较

如图3所示,模型组小鼠肺组织炎症细胞浸润明显,肺泡壁毛细血管扩张充血,肺泡结构损伤严重;

各药物干预组均能不同程度改善肺部炎症,且麻杏石甘汤3个剂量组呈一定量效关系,其中麻杏石甘汤中、高剂量组与阳性药物奥司他韦效果相当。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 下同
 ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group, same as below

图1 各组小鼠体质量、肺指数、脾指数、胸腺指数的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Comparison of body weight, lung index, spleen index, and thymus index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

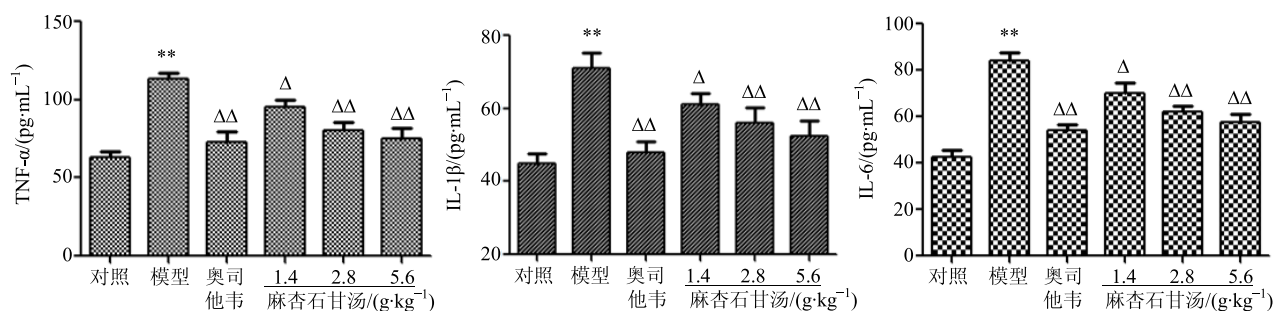


图2 各组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Contents of inflammatory factors in BALF of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

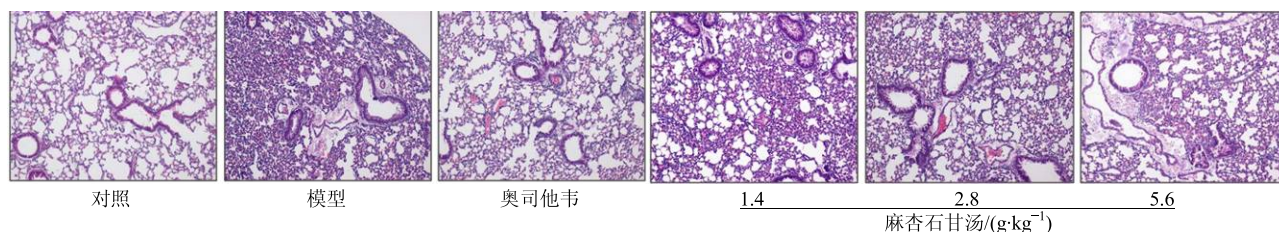


图3 各组小鼠肺组织病理观察结果 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 3 Pathological changes in lung tissue of mice in each group (HE, $\times 200$)

3.4 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达水平比较

如图 4 所示, 模型组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达量均有显著增多; 各药物干预组均能不同程度下调 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达, 且麻杏石甘汤 3 个剂量组呈一定的量效关系, 其中麻杏石甘汤中、高剂量组效果与阳性药物奥司他韦效果相当。

3.5 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达水平比较

如图 5 所示, 模型组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达量均有显著增多; 各药物干预组均能不同程度下调 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达, 且麻杏石甘汤 3 个剂量组呈一定的量效关系, 其中麻杏石甘汤中、高剂量组效果与阳性药物奥司他韦效果相当。

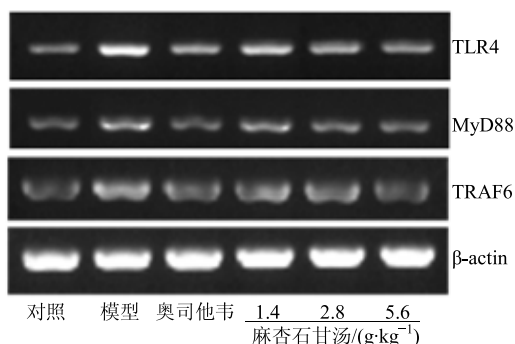


图 4 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达情况

Fig. 4 mRNA expression of TLR4, MyD88, and TRAF6 in lung tissue of mice in each group

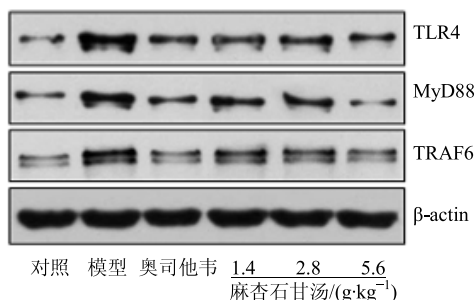


图 5 各组小鼠肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达情况

Fig. 5 Protein expression of TLR4, MyD88, and TRAF6 in lung tissue of mice in each group

4 讨论

流感病毒感染后可通过激活肥大细胞释放胰蛋白酶、组胺、 γ -干扰素 (IFN- γ) 等炎性介质致使

小鼠发生急性肺损伤, 被认为是流感病毒感染致死的主要原因^[1]。炎症反应的启动有赖于模式识别受体 (PRRS) 对病原体保守分子的识别^[14]。已经报道的能够识别流感病毒的 PRRS 主要有 Toll 样受体以及 RIG-1 等^[15]。TLR4 是 Toll 样受体中典型的模式识别受体, 主要表达于单核-巨噬细胞, 识别内外源性致炎因子, 介导肺部炎症反应^[16]。近年 Imai 等^[17]研究发现, H5N1 禽流感病毒可诱导小鼠氧化磷酸产生, 激活 TLR4-TRAF6-NF- κ B 通路, 诱导急性肺损伤, 抑制该信号通路可抑制流感病毒诱导的急性肺损伤。Marchant 等^[18]发现 TLR4-MyD88-p38 MAPK 通路与流感病毒穿入细胞及流感病毒组织嗜性密切相关, 抑制该信号通路可抑制流感病毒的感染。基于这些研究可以推测 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路在流感病毒复制及诱导急性肺损伤中起重要作用。本研究结果证实 TLR4 在流感病毒诱导小鼠肺部炎症的发病机制中有着重要的作用, 其可能的机制是 TLR4 通过直接或间接识别流感病毒, 启动 MyD88 依赖的信号通路, 激活肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TRAF6), 进而引起 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子介导机体抗病毒免疫应答, 引起一系列炎症反应, 与肺损伤之间有正相关性。这一研究结果也提示药物若能在早期干预, 可以通过有效阻止流感病毒诱导的 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路激活, 从而避免或减轻肺部损伤。

麻杏石甘汤组方精当, 疗效显著, 为历代医家所重视。该方依邪热在肺之理, 导宣肺清气之法。方中麻黄辛温发散而宣肺, 生石膏辛甘大寒而善长清泄肺热, 两药合用相反相成, 相制为用, 既祛除致病之因, 又调理肺的宣发功能, 共为君药; 杏仁味苦能降利肺气, 与麻黄配伍则宣降相因, 顺应肺主宣发和肃降的功能特点而增加平喘作用; 与石膏配伍则清肃协同, 加强清泄肺热之功能, 是为臣药; 炙甘草益气和中, 调和诸药, 是为佐药。四药合用, 共成辛凉疏表, 清肺平喘之功效。由于石膏倍麻黄, 其功效重在清宣肺热, 主治肺热火盛的肺炎和热邪犯肺的哮喘^[1]。现代药理学研究表明该方具有镇咳、祛痰、平喘、解热、抗炎、抗病毒等作用, 同时在中医理论指导下, 根据其配伍原则, 此方尤其注重机体整体和机体免疫能力的调节, 使机体对抗病原微生物的能力提高, 形成“正气内存, 邪不可干”的良好状态^[8-9]。

本研究结果表明, 麻杏石甘汤能够降低肺泡灌

洗液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达释放,改善肺部炎症,下调肺组织中 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达和蛋白表达水平,提示麻杏石甘汤可通过抑制流感病毒诱导的 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路的激活,下调炎症因子的释放,以抵抗流感病毒感染导致的急性肺损伤。但 TLR4-MyD88-TRAF6 信号通路是否为流感病毒诱导肺损伤的唯一通路还需要进行进一步的机制研究,而麻杏石甘汤的药效成分复杂,作用靶点多样,其抗流感病毒效应的物质基础需要进一步研究。

参考文献

- [1] Hu Y X, Jin Y, Han D P, *et al.* Mast cell-induced lung injury in mice infected with H5N1 influenza virus [J]. *J Virol*, 2012, 86(6): 3347-3356.
- [2] Korteweg C, Gu J. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(5): 1155-1170.
- [3] Xu T, Qiao J, Zhao L H, *et al.* Acute respiratory distress syndrome induced by avian influenza A (H5N1) virus in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(9): 1011-1017.
- [4] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [5] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 [J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [6] 张波,周芳亮,卢芳国,等. 96种中药材流感病毒神经氨酸酶活性的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 100-103.
- [7] 熊曼琪,王庆国,关庆增,等. 伤寒学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.
- [8] 文丹丹,王敏. 麻杏石甘汤治疗咳嗽变异性哮喘的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 285-287.
- [9] 张薇,李雁来,卢芳国. 麻杏石甘汤多糖含量测定方法研究 [J]. 实用预防医学, 2010, 17(11): 2145-2147.
- [10] 李玲. 麻杏石甘汤对 A 型流感病毒感染小鼠免疫调节作用的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2010.
- [11] 李玲,卢芳国,熊兴耀,等. 麻杏石甘汤对 A 型流感病毒感染小鼠的免疫保护作用 [J]. 中医药学报, 2010, 38(2): 25-28.
- [12] 卢芳国,张波,严杰,等. 麻杏石甘汤对 A 型流感病毒感染小鼠 IL-2、IL-4 蛋白表达水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3): 475-478.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [14] Dai J P, Li W Z, Zhao X F. A drug screening method based on the autophagy pathway and studies of the mechanism of evodiamine against influenza A virus [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42706.
- [15] Domizio J D, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, *et al.* TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN [J]. *Blood*, 2009, 114(9): 1794-1802.
- [16] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family [J]. *Immunol Lett*, 2003, 85: 85-95.
- [17] Imai Y, Kuba K, Neely G G, *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury [J]. *Cell*, 2008, 133(2): 235-249.
- [18] Marchant D, Singhera G K, Utokaparch S, *et al.* Toll like receptor 4 mediated p38 mitogen activated protein kinase activation is a determinant of respiratory virus entry and tropism [J]. *J Virol*, 2010, 84(21): 11359-11373.