

银翘散及其拆方对流感病毒感染自然杀伤细胞活性的影响及转录组的比较分析

陈蓓¹, 马荣^{2,3*}, 陈能斌⁴, 周德润⁴, 王湛钧⁴

1. 新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 中西医结合临床研究所, 上海 200437

3. 上海市中医药研究院, 中西医结合临床研究所, 上海 200437

4. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

摘要: **目的** 研究银翘散及其拆方(君药、臣药、佐药、使药)对流感病毒感染自然杀伤细胞活性及转录组的影响。**方法** 以小鼠流感病毒 PR8 (A/Puerto Rico/8/1934, H1N1 型) 感染 ICR 小鼠制备肺炎模型, 分为对照组、模型组和给药组, 每组 10 只; 银翘散、君药(金银花、连翘)、臣药(薄荷、牛蒡子、淡豆豉、荆芥穗)、佐药(桔梗、芦根、淡竹叶)和使药(甘草)、阳性药物利巴韦林分别 ig 模型小鼠 5 d; 第 5 天检测小鼠体质量、肺质量, 计算肺质量抑制率; 固定肺脏, 观察病理学变化(HE 染色)。以 PR8 病毒感染 C57BL/6J 小鼠制备肺炎模型, 分为对照组、模型组和给药组, 每组 3 只, 上述药物分别 ig 5 d, 第 5 天摘取肺脏, 制备白细胞悬液, 采用流式细胞术检测自然杀伤(nature killer, NK)细胞表面激活性受体 Ly-49D 和 Ly-49H 的含量, 以及细胞毒性受体 NKp46 的含量。为了进一步探究药物与病毒感染 NK 细胞之间的互作关系, 建立人流感病毒 HK8 (A/Hong Kong/8/68, H3N2 型) 感染人自然杀伤细胞系 NK-92MI 模型, 比较银翘散及臣药对病毒感染 NK 细胞转录组作用的异同。**结果** 银翘散及其拆方对 PR8 病毒感染引起的小鼠肺炎均有一定的抑制作用, 抑制作用由强到弱为臣药>银翘散>使药>君药>佐药, 其中臣药和银翘散组具有统计学差异($P<0.05$)。银翘散及其拆方均能增加肺脏 NK 细胞激活性受体 Ly-49D 和 Ly-49H 的含量, 其促进作用由强到弱为臣药>使药>银翘散>君药>佐药, 其中银翘散、君药、臣药和使药组均具有统计学差异($P<0.05$ 、 0.01)。结合上述 2 个指标, 臣药表现出与银翘散相似的药效特征, 且略优于银翘散。对于 PR8 病毒感染小鼠肺脏 NK 细胞毒性受体 NKp46 的含量, 臣药也表现出良好的诱导表达作用。HE 染色显示, 经臣药治疗的 PR8 病毒感染小鼠, 其肺脏结构完好, 肺泡和支气管腔内未出现炎症细胞和红细胞浸润。NK 细胞转录组分析显示, 臣药对于 HK8 病毒感染的 NK 细胞的作用位点, 不仅囊括了银翘散的作用位点, 而且比银翘散更为广泛。**结论** 对于流感病毒感染小鼠, 银翘散的拆方臣药表现出与银翘散全方相似的药效, 且略优于银翘散, 这可能与臣药对 NK 细胞活性的调节作用比银翘散更广泛有关。

关键词: 银翘散; 拆方; 自然杀伤细胞; 流感病毒; 转录组; Ly-49D; Ly-49H; NKp46

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)03-0765-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.020

Effects of Yinqiao San and its decomposed recipes on activities and transcriptome of natural killer cell infected with influenza virus

CHEN Bei¹, MA Rong^{2,3}, CHEN Neng-bin⁴, ZHOU De-run⁴, WANG Zhan-jun⁴

1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Clinical Research Institute of Integrative Medicine, Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

3. Clinical Research Institute of Integrative Medicine, Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China

4. School of Biotechnology, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

收稿日期: 2020-06-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81460700)

作者简介: 陈蓓, 硕士, 主要从事抗感染药理研究工作。E-mail: chenbei_lisa@163.com

*通信作者: 马荣, 博士, 助理研究员, 主要从事免疫药理学研究工作。E-mail: haijiaosky@126.com

Abstract: Objective To study the effect of Yinqiao San (银翘散, YQS) and its decomposed recipes on the activation and transcriptome of natural killer cells infected with influenza virus. **Methods** In influenza virus PR8 (A/Puerto Rico/8/1934, H1N1) infected mice ($n = 10$), ribavirin, YQS, Monarch drug (*Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus*), Ministerial drug (*Menthae Haplocalycis Herba*, *Arctii Fructus*, *Sojae Semen Praeparatum*, and *Schizonepetae Spice*), Assistant drug (*Platycodonis Radix*, reed root, and *Lophatheri Herba*) and Guide drug (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) was administrated orally for 5 d. The body weight and lung weight of the mice were measured on day 5, and the pulmonary inhibition rate was calculated. The lung was fixed and pathology was analyzed (HE staining). PR8 virus was used to infect C57BL/6J mice ($n = 3$). The above drugs were administered orally for 5 d, and the lungs were extracted on day 5 to prepare the white blood cell suspension. Flow cytometry was used to detect the content of the natural killer (NK) cell surface activating receptors Ly-49D and Ly-49H, as well as the content of the NK cell cytotoxic receptor NKp46. For further exploration of the interaction between the drug and virus-infected NK cells, an *in vitro* assay was conducted. The NK-92MI cell is a human natural killer cell line. The cells were infected with H3N2 (A/Hong Kong/8/68) human influenza virus and were used to compare the effect of YQS and its decomposed recipes on its transcriptome. **Results** The results showed that YQS and its decomposed recipes had a certain inhibitory effect on the pneumonia of mice caused by PR8 virus infection. The inhibitory effect from strong to weak was: Ministerial drug > YQS > Guide drug > Monarch drug > Assistant drug; There was a statistical difference in Ministerial drug and YQS group compared with virus infection group. On the influence of the content of the lung NK cell activating receptors Ly-49D and Ly-49H, YQS and its decomposed recipes could both increase the expression of the two receptors, and its promoting effect from strong to weak was: Ministerial drug > Guide drug > YQS > Monarch drug > Assistant drug; there were significant differences in YQS, Monarch drug, Ministerial drug and Guide drug groups compared with virus infection group. In combination with the above two indexes, the efficacy of Ministerial drug was similar to that of YQS, and slightly better than YQS. Moreover, for the content of cytotoxic receptor NKp46 in pulmonary NK cells infected with PR8 virus in mice, Ministerial drug also showed a good induced effect. HE staining of the lung showed that mice infected with PR8 virus treated with Ministerial drug had intact lung structure, and no inflammatory cells or red blood cell infiltration were observed in alveoli or bronchial lumens. Transcriptome analysis showed that the targets of Ministerial drug on virus-infected NK cells not only included the acting sites in YQS but also included the acting sites not involved in YQS. **Conclusion** For mice infected with influenza virus, Ministerial drug showed a similar or better efficacy than YQS, which may be related to the wider regulatory effect of Ministerial drug on NK cell activity than YQS.

Key words: Yinqiao San; decomposed recipes; NK cells; influenza virus; transcriptome; Ly-49D; Ly-49H; NKp46

银翘散出自清代吴塘所著的《温病条辨》，为辛凉解表的代表方剂，其主要功用为辛凉透表、清热解毒，是临床上治疗流行性感冒的常用中医药方剂。银翘散原方由连翘（30 g）、金银花（30 g）、桔梗（18 g）、薄荷（18 g）、淡竹叶（12 g）、荆芥穗（12 g）、淡豆豉（15 g）、牛蒡子（18 g）、生甘草（15 g）为散，以鲜芦苇根煎汤服用。现代药理学研究证明，银翘散能够降低流感病毒感染小鼠死亡率及肺部病毒载量、延长小鼠生存周期^[1-2]。在胸腺缺陷小鼠 [T 细胞缺陷，自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞正常] 模型中，NK 细胞活性在流感病毒感染后第 1 天显著升高，第 3、5、7 天明显降低；银翘散各剂量组 NK 细胞活性在流感病毒感染后第 3、5、7 天较模型组有明显提高^[3]。本课题前期研究表明，在 SCID 小鼠 (T 和 B 淋巴细胞缺陷，NK 细胞活性较正常小鼠高) 模型中，NK 细胞活性在流感病毒感染第 3 天开始降低；经银翘散治疗后，NK 细胞活性有所提高，并且各剂量组间体现出一定的量效关系^[4]，同时银翘散还能够增强抗病毒免

疫应答相关细胞及因子水平^[5-6]。

对于不同的免疫状态，流感病毒均能使 NK 细胞活性呈现降低趋势，而银翘散能够翻转这种免疫状态，增强 NK 细胞的免疫功能。为此，本实验进一步将流感病毒感染的 NK 细胞作为研究模型，通过君、臣、佐、使的拆方研究，明确银翘散发挥抗病毒及免疫增强作用的主要药物，为银翘散在临床中的精简应用提供实验依据，为中药抗流感病毒方剂的现代化研究提供研究思路。

1 材料

1.1 药品与试剂

金银花 (批号 1410001W)、连翘 (批号 1409002W)、薄荷 (批号 1408001S)、牛蒡子 (批号 1411002W)、淡豆豉 (批号 1410001W)、荆芥穗 (批号 1408001S)、桔梗 (批号 1410002S)、芦苇根 (批号 1407001W)、淡竹叶 (批号 14109001S) 和生甘草 (批号 1411003S)，均为配方颗粒，购自华润三九医药股份有限公司。本实验中使用的药物剂量均参照方剂中的临床剂量，将生药剂量折算为颗

粒剂的用量,并将临床剂量按照体表面积等效剂量转换法,换算为小鼠剂量,并按照临床配伍比例配伍使用。故本研究中各药物的小鼠剂量为金银花 0.44 g/kg、连翘 0.22 g/kg、薄荷 0.22 g/kg、牛蒡子 0.132 g/kg、淡豆豉 0.11 g/kg、荆芥穗 0.088 g/kg、桔梗 0.264 g/kg、芦苇根 0.11 g/kg、淡竹叶 0.088 g/kg、生甘草 0.367 g/kg。各拆方组中药味的剂量与其在全方中的剂量相同。银翘散和各拆方分别按照方剂配伍比例将各药物配方颗粒混合后,均以高纯水溶解,用于小鼠 ig 给药。将银翘散和臣药中使用的配方颗粒分别按照方剂配伍比例混合后,溶于高纯水,0.22 μm 微孔滤膜滤过后作为细胞实验用储备液。利巴韦林颗粒(批号 140920),购自四川百利药业有限责任公司。FITC-Ly-49D、PE-Ly-49H、FITC-CD3e、PE-CD49b 和 Alexa Fluor 647-NKp46 抗体,均购自 BD Pharmingen 公司。红细胞裂解液和 4%多聚甲醛溶液,购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.2 实验动物

4 周龄 SPF 级 ICR 和 C57BL/6J 小鼠,雌性,体质量 13~15 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物许可证号 SCXK(京)2014-0004。动物实验按照新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会相关规定进行,动物实验伦理批准号为 IACUC-20140214009。小鼠饲养于生物安全实验室(ABSL-2)动物室,室内温度 26 $^{\circ}\text{C}$,湿度(60 $\pm$ 5)%,且 12 h 明暗交替,正常饮食、饮水。小鼠给药体积为 0.2 mL/10 g。

1.3 病毒

小鼠流感病毒 A/Puerto Rico/8/1934 (PR8, H1N1 型),由中国中医科学院中药研究所生物安全实验室提供,经鸡胚传代使用。将鸡胚中获得的病毒原液用生理盐水稀释 600 倍,作为工作液,用于小鼠感染实验。

人流感病毒 A/Hong Kong/8/68 (HK8, H3N2 型)购自美国 ATCC (VR-1679TM),经犬上皮细胞 MDCK 传代后保存为病毒原液。

1.4 细胞株

人自然杀伤细胞 NK-92MI,购自美国 ATCC (CRL-2408TM)。细胞以 α -MEM (无核糖核苷和脱氧核糖核苷)培养基培养,培养基中添加 0.2 mmol/L 肌醇、0.1 mmol/L β -巯基乙醇和 0.02 mmol/L 叶酸,含 12.5%马血清和 12.5%胎牛血清。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$

二氧化碳孵箱中培养。银翘散和臣药对该细胞的剂量分别为银翘散 50 $\mu\text{g/mL}$,臣药 100 $\mu\text{g/mL}$ 。剂量经细胞活性实验(CCK-8 法)检测获得,为药物在 NK-92MI 细胞中的最高无毒剂量。

1.5 仪器

FACS Calibur 流式细胞仪,美国 Beckman-Coulter 公司。EG1160 包埋机,德国 Leica 公司;H93/RM2126 切片机,德国 Leica 公司;ECLIPSE LV100POL/50IPOL 光学显微镜,日本尼康公司。

2 方法

2.1 实验分组、小鼠肺炎模型的制备及给药

将 ICR 和 C57BL/6J 小鼠分别随机分为对照组、模型(PR8 病毒感染)组、银翘散组(3.09 g/kg)、君药(金银花、连翘)组(1.00 g/kg)、臣药(薄荷、牛蒡子、淡豆豉、荆芥穗)组(0.83 g/kg)、佐药(桔梗、芦苇根、淡竹叶)组(0.70 g/kg)和使药(生甘草)组(0.56 g/kg)、阳性药物(利巴韦林)组(82.5 mg/kg)。ICR 小鼠每组 10 只, C57BL/6J 小鼠每组 3 只。将小鼠乙醚浅麻醉后,用 PR8 病毒工作液滴鼻感染小鼠,30 μL /只,对照组小鼠滴鼻感染等体积的生理盐水。PR8 病毒感染后 1 h 按照组别分别 ig 给药。

2.2 小鼠肺质量抑制率的检测

各组 ICR 小鼠给药后第 5 天,称体质量,ip 氯胺酮(100 mg/kg)麻醉后 45 min,脱颈椎处死,摘取肺脏并称质量。计算肺指数(肺质量/体质量)和肺质量抑制率。

肺质量抑制率=(对照组小鼠肺质量-各药物组小鼠肺质量)/(对照组小鼠肺质量-模型组小鼠肺质量)

2.3 肺脏病理检测(HE 染色)

将各组 ICR 小鼠肺脏固定于 4%多聚甲醛溶液中 24 h。组织浸于液体石蜡,然后进行包埋、切片和贴片。切片置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 环境中烘烤 1 h,经脱蜡处理后,依次进行苏木素染色和伊红染色。切片于光学显微镜下观察并拍照。

2.4 肺脏 NK 细胞 Ly-49D 和 Ly-49H 受体含量的检测

各组 C57BL/6J 小鼠给药后第 5 天,ip 氯胺酮(100 mg/kg)麻醉后 45 min,脱颈椎处死,摘取肺脏,制备单细胞悬液,裂解红细胞后,每只小鼠取 1×10^7 个细胞,以 FITC-Ly-49D 抗体(1.5 μL /500 μL 体系)和 PE-Ly-49H 抗体(2.5 μL /500 μL 体系)4 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 30 min,400 $\times g$ 离心 10 min。取沉淀,用 2 mL PBS 洗一遍,400 $\times g$ 离心 10 min。将细胞沉

淀用 400 μL 2%多聚甲醛固定。采用流式细胞仪检测 NK 细胞表面激活性受体 Ly-49D、Ly-49H 的含量。同时设置 Ly-49D、Ly-49H 抗体的同型对照组。

2.5 肺脏 NK 细胞 NKp46 受体的检测

各组 C57BL/6J 小鼠给药后第 5 天, ip 氯胺酮 (100 mg/kg) 麻醉后 45 min, 脱颈椎处死, 摘取肺脏, 制备单细胞悬液, 裂解红细胞后, 每只小鼠取 1×10^7 个细胞, 以 FITC-CD3e (1.5 μL /500 μL 体系)、PE-CD49b (2.0 μL /500 μL 体系) 和 Alexa Fluor 647-NKp46 (2.0 μL /500 μL 体系) 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 共同孵育 30 min, 400 $\times$ g 离心 10 min。取沉淀, 用 2 mL PBS 洗一遍, 400 $\times$ g 离心 10 min。将细胞沉淀用 400 μL 2%多聚甲醛固定。采用流式细胞仪检测 NK 细胞毒性受体 NKp46 的含量。同时设置 NKp46 抗体的同型对照组。

2.6 H3N2 流感病毒感染 NK-92MI 细胞模型的制备及药物干预

将 NK-92MI 细胞接种于 6 孔板。实验设对照组、模型 (H3N2 感染) 组、银翘散组和臣药组, 每组 3 个复孔。将 H3N2 病毒原液以无血清培养基稀释 82.5 倍, 作为病毒工作液。以病毒工作液培养 NK-92MI 细胞 6 h, 1.5 mL/孔; 对照组以等体积不含病毒的培养基培养。补加完全培养基 1.5 mL/孔, 继续培养 16 h。银翘散组和臣药组分别加入银翘散和臣药储备液, 使质量浓度分别为 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 对照组加入等体积的高纯水。药物作用 10 h。

2.7 NK-92MI 细胞转录组分析

收集“2.6”项中的细胞, 提取细胞总 RNA, 分离并纯化 mRNA, 构建 cDNA 文库, 然后采用 Illumina 测序平台 (Illumina HiSeqTM 2500) 对文库进行测序 (上海欧易生物医学科技有限公司)。对差异基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析。

2.8 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件中单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对流感病毒感染小鼠肺炎的抑制作用

流感病毒 PR8 的感染使得小鼠体质量下降、肺脏质量增加, 进而肺脏指数显著高于正常小鼠 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 阳性药物利巴韦林、银翘散、君药 (金银花、连翘)、臣药 (薄荷、牛蒡子、淡

豆豉、荆芥穗)、佐药 (桔梗、芦苇根、淡竹叶) 和使药 (甘草) 均能够降低由流感病毒引起的肺指数增加; 其中利巴韦林、银翘散和臣药能够显著抑制肺指数的增加 ($P < 0.05$ 、0.01); 且臣药组对肺炎的抑制作用略优于银翘散组。结果见表 1。

表 1 银翘散及其拆方对流感病毒感染小鼠肺指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of YQS and its recipes on lung index of mice infected with PR8 virus ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肺指数	肺质量抑制率/%
对照	—	0.74 $\pm$ 0.05	—
模型	—	1.51 $\pm$ 0.15 ^{###}	—
利巴韦林	0.082 5	1.01 $\pm$ 0.16 ^{**}	65.05
银翘散	3.09	1.33 $\pm$ 0.11 [*]	23.86
君药	1.00	1.37 $\pm$ 0.17	17.91
臣药	0.83	1.25 $\pm$ 0.16 [*]	33.41
佐药	0.70	1.45 $\pm$ 0.17	8.24
使药	0.56	1.37 $\pm$ 0.15	18.17

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

通过以上结果发现, 利巴韦林和银翘散臣药的药效优于银翘散全方, 故针对对照组、模型组、利巴韦林组和臣药组小鼠的肺脏进行了病理分析。肺脏病理检测 (HE 染色) 显示, 对照组小鼠肺脏可见清晰肺泡; 肺泡、支气管内无任何细胞浸润, 支气管壁绒毛排列整齐。模型组小鼠 (PR8 流感病毒感染) 肺泡腔缩小, 甚至塌陷, 支气管中可见白细胞聚集, 支气管壁绒毛细胞排列杂乱。经利巴韦林和臣药治疗的小鼠肺脏仍可见大量完好的肺泡, 支气管壁绒毛排列整齐, 白细胞浸润减少; 利巴韦林组肺泡内仍可见因红细胞从血管漏出引起的水肿。见图 1。

3.2 对流感病毒感染小鼠肺脏 NK 细胞激活性受体 Ly-49D、Ly-49H 含量的影响

与正常 C57BL/6J 小鼠相比, PR8 流感病毒感染小鼠后使 NK 细胞激活性受体 Ly-49D、Ly-49H 在肺脏的含量显著降低 ($P < 0.01$)。经利巴韦林、银翘散、君药、臣药、佐药和使药治疗后, 各组小鼠肺脏 2 种受体含量均明显增加, 除佐药组外, 与模型组相比, 其余各组差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 2。结果显示, 各药物诱导 2 种受体表达的作用由强到弱依次为臣药 $>$ 使药 $>$ 银翘散 $>$ 君药 $>$ 佐药。各组小鼠肺脏 NK 细胞激活性受体 Ly-49D 和 Ly-49H 流式图见图 2。

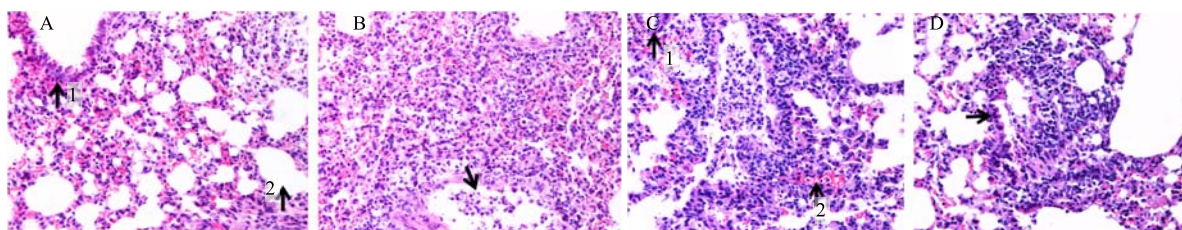


图 1 臣药对流感病毒 PR8 感染小鼠肺脏病理的影响 (HE 染色, $\times 200$)
A-对照 (箭头 1 所指为肺支气管, 箭头 2 所指为肺泡) B-模型 (箭头所指为白细胞浸润支气管腔) C-利巴韦林 (箭头 1 所指为肺支气管, 箭头 2 所指为红细胞渗漏入肺泡) D-臣药 (箭头所指为支气管)

A-control (arrow 1 refers to the bronchi and arrow 2 to the alveoli) B-model (the arrow indicates the infiltration of white blood cells into the bronchial cavity) C-ribavirin (arrow 1 indicates the bronchi of the lung and arrow 2 indicates the leakage of red blood cells into the alveoli) D-Ministerial drug (the arrow points to the bronchus)

图 1 臣药对流感病毒 PR8 感染小鼠肺脏病理的影响 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Ministerial drug on pulmonary pathology in mice infected with influenza virus PR8 (HE staining, $\times 200$)

表 2 银翘散及其拆方对流感病毒感染小鼠肺脏 NK 细胞激活受体 Ly-49D、Ly-49H 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of YQS and its recipes on content of Ly-49D and Ly-49H in lungs of mice infected with PR8 virus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Ly-49D ⁺ /%	Ly-49H ⁺ /%	Ly-49D ⁺ Ly-49H ⁺ /%
对照	—	5.07 ± 0.10	4.82 ± 0.89	2.71 ± 0.54
模型	—	0.74 ± 0.35 ^{##}	1.27 ± 0.17 ^{##}	0.43 ± 0.21 ^{##}
利巴韦林	0.082 5	4.57 ± 0.51 ^{**}	4.40 ± 0.83 ^{**}	2.67 ± 0.34 ^{**}
银翘散	3.09	3.17 ± 0.23 ^{**}	2.59 ± 0.84	1.55 ± 0.51 [*]
君药	1.00	2.47 ± 0.24 ^{**}	2.23 ± 0.48 [*]	1.30 ± 0.38 [*]
臣药	0.83	3.39 ± 0.46 ^{**}	3.07 ± 0.09 ^{**}	1.71 ± 0.12 ^{**}
佐药	0.70	2.57 ± 1.20	2.43 ± 1.01	1.36 ± 0.61
使药	0.56	2.97 ± 0.52 ^{**}	3.05 ± 0.46 ^{**}	1.70 ± 0.29 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

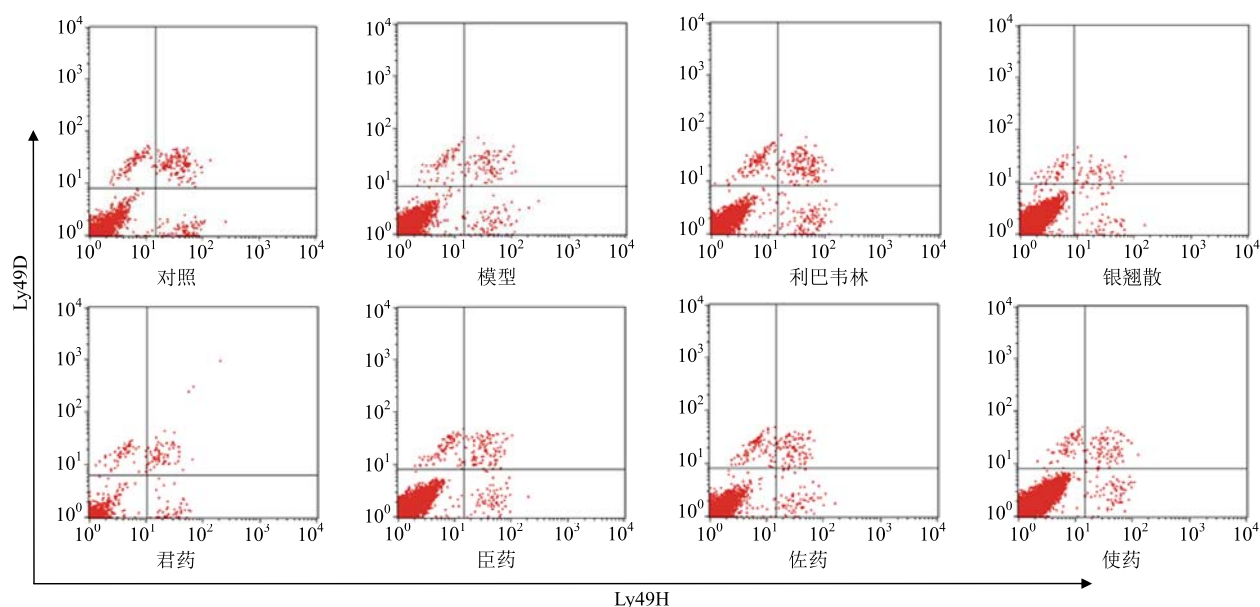


图 2 各组小鼠肺脏 NK 细胞激活受体 Ly-49D 和 Ly-49H 流式图

Fig. 2 Flow diagram of NK cell activating receptors Ly-49D and Ly-49H in mouse lung of each group

3.3 对流感病毒感染小鼠肺脏 NK 细胞毒性受体 NKp46 含量的影响

实验中首先分选出 CD3e 阴性 (CD3e⁻) 细胞, 即排除 T 淋巴细胞。在 CD3e⁻ 细胞群中, CD49b 阳性 (CD49b⁺) 的细胞即为 NK 细胞。NKp46 是 NK 细胞表面的 1 个激活性受体, 主要介导细胞毒性反应。正常 C57BL/6J 小鼠肺脏表达一定量的 NKp46 受体。当 PR8 流感病毒感染 C57BL/6J 小鼠后, 小鼠肺脏 NK 细胞表面 NKp46 受体的含量

出现减少的现象。通过小鼠肺脏 NK 细胞激活性受体 L49D/H 的检测对各药物活性进行初筛, 发现臣药的药效最好, 因此选择臣药和银翘散进一步进行小鼠肺脏 NK 细胞毒性受体 NKp46 含量的检测。经银翘散和臣药治疗的 PR8 病毒感染小鼠, NKp46 受体含量均高于模型组, 且臣药组效果优于银翘散组。抗病毒阳性药物利巴韦林不能改善因病毒感染引起的肺脏 NK 细胞 NKp46 受体含量减少的现象 (图 3)。

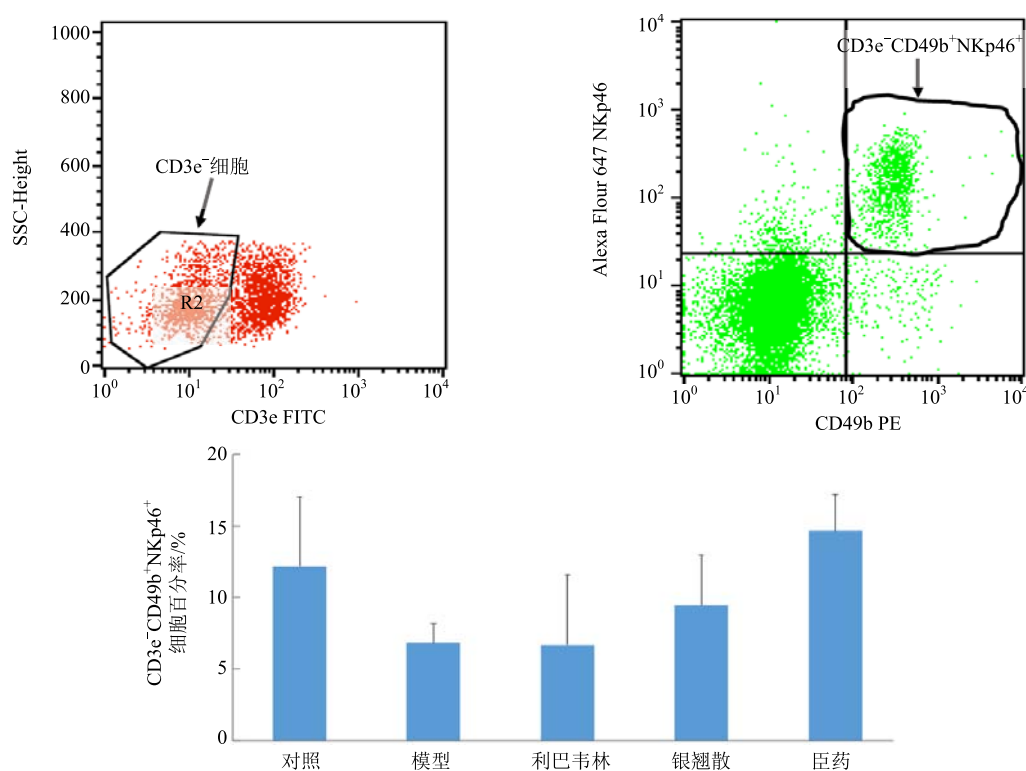


图 3 银翘散及其拆方对流感病毒 PR8 感染小鼠肺脏 NK 细胞细胞毒性受体 NKp46 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

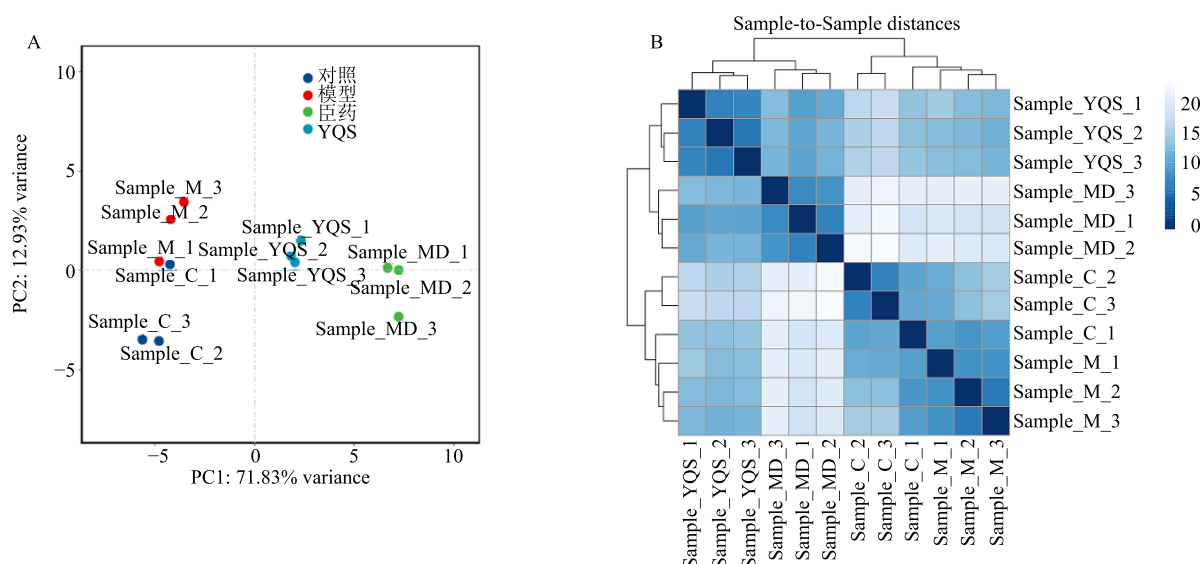
Fig. 3 Effect of YQS and its recipes on expression of cytotoxic receptor NKp46 in pulmonary NK cells of mice infected with influenza virus PR8 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 对流感病毒感染自然杀伤细胞转录组的影响

3.4.1 主成分分析和聚类分析 主成分分析能有效展示基因表达差异对样本的影响; 基因表达相似的样本距离近, 说明样本相似。聚类分析通过计算样本之间的距离, 考察样本之间的相似性。如图 4 所示, 对照组、模型组、臣药组和银翘散组, 同一组别的样本距离相近, 不同组之间在距离上能够区分开来; 不同处理方法引起 NK-92MI 细胞 mRNA 表达不同。

3.4.2 差异基因 GO 富集分析 在得到差异基因后, 从分子和细胞水平, 根据基因的功能, 将功能相似的基因富集为一类。目前 GO 分析有 3 个亚类, 包

括生物过程 (如信号转导)、分子功能 (如酶活性) 和细胞成分 (如核糖体)。每个亚类根据功能不同划分出不同条目。在 GO 富集分析中, 在差异最显著的前 30 条上调基因条目中, 银翘散组和臣药组有 16 个条目相同; 相同条目中, 臣药组上调基因不仅涵盖了银翘散组中表达上调的基因, 而且上调基因种类比银翘散组更广泛。具体条目和基因名称见表 3 和图 5。在相同上调基因中, *DDIT3*、*JUN*、*FOS*、*EGR1*、*EGR2*、*ATF*、*AREG*、*TNFAIP3*、*PPP1R15A*、*ZFP36L1* 10 个基因出现频次较高, 这些基因主要参与细胞生长和凋亡过程。不同上调基因条目见表 4。



C-对照 M-模型 MD-臣药 YQS-银翘散, 图 B 中横坐标表示样本名称, 纵坐标表示对应的样本名称, 颜色深浅代表相关系数大小
C-control M-model MD-Ministerial drug YQS-Yinqiao San In figure B, the abscissa represents the sample name, the ordinate represents the corresponding sample name, and the color represents the size of the correlation coefficient

图 4 H3N2 流感病毒感染 NK-92MI 细胞转录组数据主成分分析 (A) 及聚类分析 (B)

Fig. 4 Principal component analysis (A) and cluster analysis (B) of cell transcriptome data of NK-92MI infected with H3N2 influenza virus

表 3 GO 富集分析中臣药和银翘散组相同上调的基因

Table 3 Same up-regulated genes in Ministerial drug and YQS group based by GO enrichment analysis

基因亚类	基因条目	基因名称
生物过程	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	<i>DDIT3</i> , <i>TRIB3</i> , <i>PPP1R15A</i> , <i>BBC3</i>
	response to cAMP	<i>FOS</i> , <i>AREG</i> , <i>JUN</i>
	skeletal muscle cell differentiation	<i>FOS</i> , <i>EGR1</i> , <i>EGR2</i> , <i>ATF3</i>
	response to endoplasmic reticulum stress	<i>DDIT3</i> , <i>TRIB3</i> , <i>PPP1R15A</i> , <i>TXNDC5</i>
细胞成分	transcription factor AP-1 complex nucleus	<i>DDIT3</i> , <i>FOS</i> , <i>JUN</i>
	nuclear speck	<i>CACNA1A</i> , <i>DDIT3</i> , <i>FOS</i> , <i>TRIB3</i> , <i>SLC3A2</i> , <i>ZC3H6</i> , <i>AREG</i> , <i>EGR1</i> , <i>EGR2</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>SESN2</i> , <i>SGK1</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>JUN</i> , <i>ATF3</i> , <i>NR4A2</i> , <i>NR4A3</i>
	cytoplasm	<i>SGK1</i> , <i>NR4A2</i>
	cell surface	<i>PSAT1</i> , <i>CACNA1A</i> , <i>DDIT3</i> , <i>PPP1R15A</i> , <i>FBXO32</i> , <i>EGR1</i> , <i>EGR2</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>SESN2</i> , <i>SGK1</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>RGS16</i> , <i>NR4A2</i> , <i>VCAM1</i> , <i>SLC3A2</i> , <i>HRG</i> , <i>AREG</i> , <i>KCNE2</i> , <i>SLC7A11</i>
分子功能	transcription factor complex	<i>JUN</i> , <i>NR4A2</i> , <i>NR4A3</i>
	lysosome	<i>ARRDC3</i> , <i>KCNE2</i> , <i>BBC3</i>
	transcription factor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	<i>FOS</i> , <i>JUN</i> , <i>ATF3</i>
	RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	<i>DDIT3</i> , <i>FOS</i> , <i>EGR1</i> , <i>EGR2</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>JUN</i> , <i>ATF3</i> , <i>NR4A2</i> , <i>NR4A3</i>
	RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding	<i>EGR1</i> , <i>ATF3</i> , <i>NR4A2</i> , <i>NR4A3</i>
	DNA binding transcription factor activity	<i>DDIT3</i> , <i>FOS</i> , <i>ZC3H6</i> , <i>EGR1</i> , <i>EGR2</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>JUN</i> , <i>ATF3</i>
	RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	<i>DDIT3</i> , <i>FOS</i> , <i>EGR2</i> , <i>JUN</i> , <i>ATF3</i> , <i>NR4A2</i> , <i>NR4A3</i>

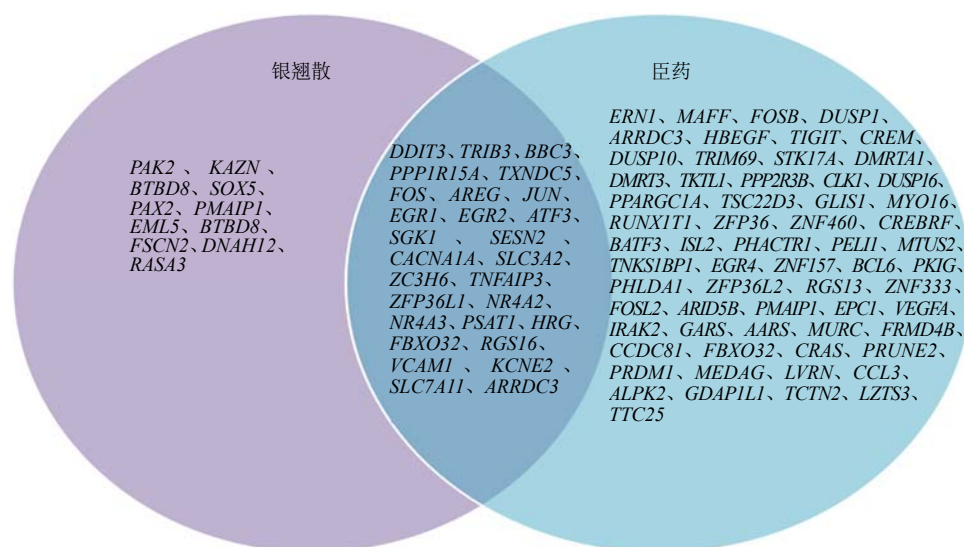


图 5 银翘散和臣药组相同上调基因条目中基因维恩图

Fig. 5 Venn diagram of genes in same up-regulated genes items of Ministerial drug and YQS groups

表 4 GO 富集分析中银翘散和臣药组不同上调基因条目

Table 4 Different up-regulated gene entries in Ministerial drug and YQS groups based on GO enrichment analysis

组别	不同上调基因条目
银翘散	release of cytochrome c from mitochondria、regulation of DNA binding transcription factor activity、reactive oxygen species metabolic process、amino acid transport、aging、protein kinase B signaling、protein-DNA complex、Golgi apparatus、endoplasmic reticulum、transcriptional activator activity、RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding、transcription regulatory region sequence-specific DNA binding、transcription regulatory region DNA binding、RNA polymerase II activating transcription factor binding、GTPase activator activity
臣药	negative regulation of transcription by RNA polymerase II、nuclear-transcribed mRNA catabolic process、deadenylation-dependent decay、3'-UTR-mediated mRNA destabilization、negative regulation of smooth muscle cell proliferation、positive regulation of nuclear-transcribed mRNA catabolic process、deadenylation-dependent decay、cellular response to tumor necrosis factor、platelet alpha granule lumen、secretory granule、cytoskeleton、mRNA 3'-UTR AU-rich region binding、MAP kinase tyrosine/serine/threonine phosphatase activity、transcriptional activator activity、RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding、protein homodimerization activity、protein phosphatase inhibitor activity

在 GO 富集分析的下调基因条目中，臣药组富集到 30 个条目，银翘散组仅富集到 10 个条目，具体基因条目见表 5。其中仅 nucleus 条目与臣药组相同，臣药下调该条目中的 51 个基因 (*FOXD4L1*、*EID3*、*SSH3*、*CCNE1*、*CENPBD1*、*SYCP3*、*PER3*、*CDKN2C*、*HSPA1B*、*PHF13*、*HEXIM1*、*FIGNL2*、*TREX2*、*ZNF296*、*ZBED1*、*UBC*、*H2AFX*、*CBX2*、*NFKBIE*、*RBM14*、*TUBB2A*、*HSPA5*、*TUBB4B*、*FEN1*、*FBXO43*、*FAM71F2*、*CABYR*、*EID2B*、*TEF*、*GADD45B*、*ATF5*、*BCL9L*、*CEMIP*、*MYLK2*、*ZCCHC5*、*PHF7*、*SERTAD3*、*FOXD2*、*FOXD4*、*TUBA1C*、*IMP3*、*TIGD1*、*TIGD3*、*TIGD4*、*TBRI*、*FOXJ1*、*DYRK3*、*ZFC3H1*、*UTP3*、*RARG*、*HIST1H2AG*)，银翘散仅下调该条目中的 5 个基因

(*FOXD4L1*、*EID3*、*SSH3*、*TRIM22*、*AKAP17A*)。

3.4.3 差异基因 KEGG 富集分析 利用 KEGG 数据库对差异基因进行信号通路 (pathway) 分析，可以找到富集差异基因的 pathway 条目，寻找不同样本的差异基因可能与哪些通路的改变有关。在富集的差异最显著的前 20 (Top 20) 条信号通路中，银翘散组和臣药组有 13 条通路重合，见表 6。相同信号通路所涉及到的上调基因，臣药组基本囊括了银翘散组的上调基因，且臣药组上调的基因数目比银翘散组多 (图 6)。臣药和银翘散组富集到的不同信号通路见表 7。

在 KEGG 富集到的 Top 20 下调信号通路中，银翘散组仅富集到 17 条信号通路；其中，仅 necroptosis 信号通路同时被银翘散和臣药调节，见表 8。

表 5 GO 富集分析中银翘散和臣药组下调基因条目

Table 5 Down-regulated gene entry in Ministerial drug and YQS groups based on GO enrichment analysis

组别	基因条目
银翘散	regulation of transcription, DNA-templated、transcription, DNA-templated、cytoplasm、plasma membrane、integral component of membrane、nucleoplasm、cytosol、nucleus、metal ion binding、protein binding
臣药	microtubule-based process、negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway、chromatin silencing、mitotic cell cycle、negative regulation of transcription by RNA polymerase II、canonical Wnt signaling pathway、humoral immune response、meiotic cell cycle、chromatin organization microtubule cytoskeleton organization、extracellular vesicle、vesicle、endoplasmic reticulum membrane、external side of plasma membrane、cytoskeleton、microtubule cytoskeleton、mitochondrial outer membrane、transcription factor complex、cellula component、nucleus、transcription regulatory region sequence-specific DNA binding、structural constituent of cytoskeleton、GTPase activity、ATPase activity、unfolded protein binding、GTP binding、transcriptional activator activity、RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding、ubiquitin protein ligase binding、RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding、nucleic acid binding

表 6 KEGG 富集分析中银翘散和臣药组相同上调信号通路及基因

Table 6 KEGG enrichment analysis of same up-regulated signal pathways and genes in Ministerial drug and YQS groups

信号通路	基因
colorectal cancer	<i>AREG</i> 、 <i>BBC3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>PMAIP1</i>
apoptosis	<i>BBC3</i> 、 <i>DDIT3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>PMAIP1</i>
rheumatoid arthritis	<i>CCL3L3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i>
TNF signaling pathway	<i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>TNFAIP3</i> 、 <i>VCAM1</i>
HTLV-I infection	<i>ATF3</i> 、 <i>EGR1</i> 、 <i>EGR2</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>VCAM1</i>
p53 signaling pathway	<i>BBC3</i> 、 <i>PMAIP1</i> 、 <i>SESN2</i>
salmonella infection	<i>CCL3L3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i>
IL-17 signaling pathway	<i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>TNFAIP3</i>
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	<i>EGR1</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>VCAM1</i>
chagas disease (American trypanosomiasis)	<i>CCL3L3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i>
Toll-like receptor signaling pathway	<i>CCL3L3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i>
MAPK signaling pathway	<i>AREG</i> 、 <i>CACNA1A</i> 、 <i>DDIT3</i> 、 <i>FOS</i> 、 <i>JUN</i>
fluid shear stress and atherosclerosis	<i>FOS</i> 、 <i>JUN</i> 、 <i>VCAM1</i>

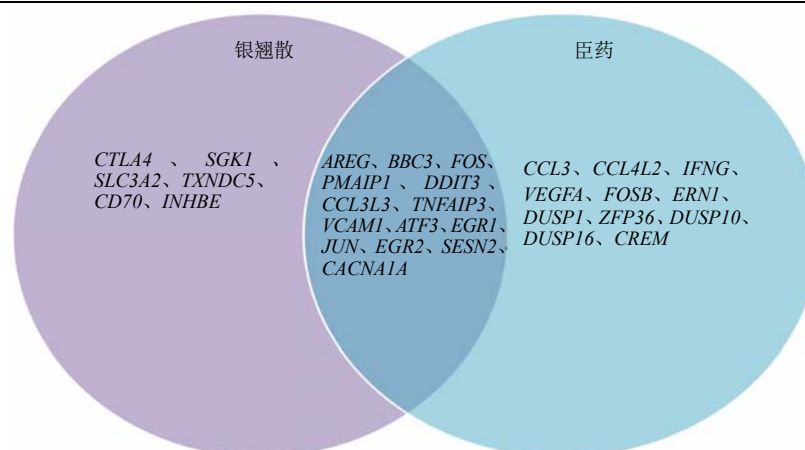


图 6 银翘散和臣药组相同上调信号通路中基因的维恩图

Fig. 6 Venn diagram of genes in same up-regulated signal pathway of Ministerial drug and YQS groups

表 7 KEGG 富集分析中银翘散和臣药组不同上调信号通路

Table 7 Different up-regulated signal pathways in Ministerial drug and YQS groups based on KEGG enrichment analysis

组别	信号通路
银翘散	T cell receptor signaling pathway、hepatitis B、mTOR signaling pathway、protein processing in endoplasmic reticulum、viral carcinogenesis、cytokine-cytokine receptor interaction、pathways in cancer
臣药	osteoclast differentiation、aminoacyl-tRNA biosynthesis、amphetamine addiction、leishmaniasis、ErbB signaling pathway、morphine addiction、cAMP signaling pathway

表 8 KEGG 富集分析中银翘散和臣药组下调信号通路 (前 20)

Table 8 Down-regulated signal pathways (Top 20) in Ministerial drug and YQS groups based on KEGG enrichment analysis

组别	信号通路
银翘散	glycosphingolipid biosynthesis-lacto and neolacto series、glycosphingolipid biosynthesis-globo and isoglobo series、glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series、nicotinate and nicotinamide metabolism、starch and sucrose metabolism、fanconi anemia pathway、taste transduction、choline metabolism in cancer、pyrimidine metabolism、glucagon signaling pathway、insulin resistance、insulin signaling pathway、cell adhesion molecules (CAMs)、necroptosis、purine metabolism、Axon guidance、regulation of actin cytoskeleton
臣药	pathogenic escherichia coli infection、gap junction、basal cell carcinoma、adipocytokine signaling pathway、antigen processing and presentation、apoptosis、breast cancer、gastric cancer、phagosome、cushing's syndrome、sphingolipid signaling pathway、cell cycle、systemic lupus erythematosus、mTOR signaling pathway、hippo signaling pathway、human papillomavirus infection、necroptosis、hepatocellular carcinoma、HTLV-I infection、proteoglycans in cancer

4 讨论

本研究显示, 银翘散及其拆方治疗病毒性肺炎药效强度为臣药>银翘散>使药>君药>佐药, 药效强度并非与君、臣、佐、使的中药配伍理论完全一致。金银花和连翘为君药, 疏散风热、清热解毒、避秽化浊; 臣药薄荷和牛蒡子疏散风热、清利头目、解毒利咽, 荆芥穗和淡豆豉发散解表; 佐药淡竹叶、芦苇根清热生津, 桔梗宣肺止咳; 生甘草调和诸药, 又合桔梗利咽止咳, 为佐使之用^[7]。从银翘散的方解可以看出, 金银花和连翘的功效相当于现代药理学中抗病毒、抗菌的作用, 而解热作用略微。薄荷、牛蒡子、荆芥穗和淡豆豉构成的臣药组, 其功效涵盖了现代药理学的解热、抗病毒、抗菌的作用。淡竹叶、芦苇根和桔梗都有解热作用, 桔梗还具有镇咳的作用^[8]。现代药理学研究表明生甘草的作用较为广泛, 包括免疫增强、抗病毒、抗菌、抗炎、镇咳、祛痰等作用^[9-10]。采用现代药理学方法对中药复方的配伍进行探究, 能够明确各配伍组分对复方整体药效的贡献程度。

NK 细胞在清除流感病毒中发挥着关键作用。人类 NK 细胞表面存在 2 类受体: 激活性受体(killer activating receptor, KAR) 和抑制性受体(killer

inhibiting receptor, KIR), 它们分别介导 NK 细胞的激活和抑制。与人类 NK 细胞相似, 小鼠 NK 细胞表面也存在这 2 类受体。研究证实^[11], 小鼠感染流感病毒后, Ly-49 抑制性受体 (Ly-49I 和 Ly-49Q) 缺陷的小鼠比野生型小鼠存活时间更长; 而当回补表达 Ly-49I 和 Ly-49Q 受体后, 小鼠又恢复了对流感病毒的敏感性。提示 NK 细胞参与流感病毒的疾病过程, Ly-49 受体直接参与了 NK 细胞清除流感病毒的免疫应答效应。

Ly-49 基因家族受体主要表达在小鼠 NK 细胞, 是 C 型凝集素超家族成员之一。Ly-49D 是 Ly-49 家族中第一个被证实传递激活性信号的蛋白分子^[12-13], 属于 KAR 类受体, Ly-49D 受体介导的生物学效应是促进 NK 细胞活化, 进而促使 NK 细胞发挥杀伤效应。PR8 流感病毒感染显著下调 Ly-49D 受体介导的促炎细胞因子和趋化因子的产生^[14]。

Ly-49H 是 Ly-49 家族的另一个激活性受体, 其激活效应由 NK 细胞表面的跨膜接头蛋白 DAP12 (DAP12 的胞质域含有免疫受体酪氨酸激活基序) 介导。Ly-49H 的抗病毒效应最早发现于小鼠巨细胞病毒 (murine cytomegalovirus, MCMV)。表达 Ly-49H 受体的转基因小鼠更不易感染 MCMV^[15]。

当 Ly-49H-DAP12 受体复合物突变的小鼠感染 MCMV 时, 脾脏病毒滴度增加 30~40 倍, 肝脏病毒滴度增加 2~5 倍, 且肝脏 NK 细胞产生 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的比例降低了 (56.00 $\pm$ 0.22)%, 说明 Ly-49H 的正常活化对抑制 MCMV 具有重要作用^[16]。有研究还发现, Ly-49H 受体表达呈阳性的 NK 细胞会在小鼠淋巴组织和非淋巴组织存在数月; 在 MCMV 感染小鼠的恢复期, 当再次感染 MCMV 时, Ly-49H 受体表达呈阳性的 NK 细胞会被重新激活, 并迅速发生脱颗粒、释放细胞因子^[17]。这打破了人们对 NK 细胞在传统意义上的认识: NK 细胞不仅参与抗病毒反应的固有免疫应答, 而且同样参与了获得性免疫应答。关于 Ly-49H 受体在流感病毒中的作用, 目前还未见相关文献报道。本研究中, PR8 流感病毒的感染使 Ly-49H 受体在肺脏的含量降低, 经抗病毒药物利巴韦林和银翘散及其拆方 (臣药、使药、君药和佐药) 治疗后, Ly-49H 受体含量均升高; 而且, 这些药物对流感病毒 PR8 感染引起的小鼠肺炎有抑制作用。上述药物对肺炎的抑制作用和对肺脏中 Ly-49D、Ly-49H 含量的促进作用基本一致, 其作用强度均为臣药>银翘散/使药>君药>佐药。说明上述药物对病毒性肺炎的抑制作用越强, NK 细胞激活性受体 (L-49D 和 Ly-49H) 在肺脏中的含量也越高。

NK 细胞的细胞毒效应是 NK 细胞杀伤靶细胞的重要途径, 该效应主要由细胞毒性受体介导。人类主要有 3 种细胞毒性受体: NKp30、NKp44 和 NKp46。小鼠 NK 细胞的细胞毒性反应由 NKp46 介导; 小鼠的 NKp46 又称作 NCR1 (natural cytotoxicity receptor 1)。NKp46 识别流感病毒血凝素^[18], 使 NK 细胞能够识别病毒感染的细胞, 进而损伤靶细胞, 防止流感病毒感染宿主细胞^[19]。有研究者采用绿色荧光蛋白 (green fluorescent proteins, GFP) 报告基因标记的 NKp46 受体示踪 NK 细胞, 发现在小鼠感染流感病毒 PR8 后的 5 d 内, 肺脏、血液、脾脏和骨髓均观察到 GFP, 且肺脏中 GFP 数量最多, 感染第 5 天的数量高于前 4 d; 并证明 NKp46 对于体内流感病毒的清除发挥了关键作用^[20]。本研究中, 小鼠肺脏中 NKp46 受体因感染 PR8 流感病毒含量降低, 银翘散和臣药均能增加 NKp46 受体的含量, 这可能是银翘散和臣药抑制小鼠感染 PR8 病毒引起肺炎的作用途径之一。

本研究分别从药效学 (肺质量抑制率) 和作用

机制 (NK 细胞激活性受体和细胞毒性受体) 2 方面证实: 银翘散中臣药 (薄荷、牛蒡子、淡豆豉、荆芥穗) 的药效与银翘散全方相似, 且略优于银翘散。这为银翘散的精简提供了现代药理学依据, 臣药可以作为一个独立的复方用于流感病毒引起的感冒的治疗。为了进一步探究臣药优于银翘散的原因, 本实验建立了人流感病毒 HK8 感染人 NK 细胞株 NK-92MI 的细胞模型, 分别以银翘散和臣药进行干预, 分析药物对 NK 细胞转录组的影响。

银翘散显著上调的基因在臣药组也同样显著上调; 且很多基因在臣药治疗后上调, 而银翘散不能显著上调这些基因 (图 5)。如对细胞表面成分的影响, 银翘散上调 6 个基因 (*VCAM1*、*SLC3A2*、*HRG*、*AREG*、*KCNE2*、*SLC7A11*), 而臣药同时还上调 *VEGFA*、*HBEGF*、*TIGIT* 3 个基因。T 细胞免疫球蛋白和免疫受体酪氨酸基抑制基序结构域 (T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain, TIGIT) 是一种新型的抑制性受体, 在 T 细胞和 NK 细胞上均有表达。TIGIT 编码的蛋白有助于辅助性 T 细胞和树突状细胞之间的相互作用, 以调节 T 细胞依赖的 B 细胞的反应。TIGIT 虽被定义为抑制性受体, 但研究表明, NK 细胞上 TIGIT 受体表达阳性的野生型小鼠对各种刺激的反应增强, 而 TIGIT 受体缺陷会损害 NK 细胞的 “missing-self” 识别功能。TIGIT-CD155 信号通路能够使 NK 细胞更好地作为效应细胞参与到免疫应答反应中, 而这一通路是不依赖于主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC I) 类分子的新的 NK 细胞激活的途径^[21]。

再如有关分子功能的 “RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding” 条目, 银翘散显著上调 4 个基因 (*EGR1*、*ATF3*、*NR4A2*、*NR4A3*), 而臣药除上调这 4 个基因外, 同时还上调 *GLIS1*、*CREBRF*、*BCL6*、*CREM*、*FOSL2*、*ARID5B* 6 个基因。如 cAMP 反应元件调节子 (cAMP responsive element modulator, CREM) 编码的蛋白是一种转录因子, 能够结合病毒中的环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 响应元件, 而且它是细胞因子生成重要的调节因子^[22]。FOS 相关抗原 2 (Fos-related antigen 2, FOSL2) 编码的蛋白是亮氨酸拉链蛋白, 它可以与 JUN 家族的蛋白形成二聚体, 从而形成转录因子复合物 AP-1, 主要参

与细胞增殖、分化和转化的调节。研究报道, FOSL2 是一个新颖的参与 NK 细胞成熟和功能发挥的转录因子^[23]。富含 AT 序列的相互作用结构域蛋白 5B (AT-rich interactive domain-containing protein 5B, ARID5B) 的编码产物是 DNA 结合蛋白, 它是一个富含 AT 的结构域。研究显示, 降低 NK-92MI 细胞中 ARID5B 的表达, 会引起细胞中线粒体氧化代谢损伤和电子传递链相关基因表达下调, 进一步表现出细胞生存受损和 IFN- γ 生成减少; 相反, 过表达 ARID5B 后, NK-92MI 细胞氧化代谢和 IFN- γ 的生成均增加^[24]。对于 GO 分析中富集到的下调基因, 臣药富集到 30 个条目, 银翘散仅富集到 10 个条目 (表 5); 说明臣药对 NK 细胞的作用位点远多于银翘散。

在 KEGG 富集分析的 TOP20 上调信号通路中, 臣药和银翘散有 13 条信号通路相同, 且臣药上调的基因不仅包含银翘散上调的基因, 还富集到其他基因 (图 6)。另外, 对于相同信号通路, 臣药和银翘散也出现不同的调节方式。如雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路, 银翘散对该通路表现为显著上调 (表 7), 而臣药对该通路表现为显著下调 (表 8); 且富集到的基因也不同, 银翘散上调 SESN2、SGK1、SLC3A2 3 个基因, 臣药下调 FZD2、TNF、WNT10B 3 个基因。

由此推测臣药和银翘散在转录水平对 NK 细胞中基因的调节作用相似, 但臣药的作用更为广泛。臣药的调节作用不仅涵盖了银翘散的全部作用, 涉及到的作用点还比银翘散更为广泛, 这或许是臣药药效与银翘散相似的一个重要原因。

综上所述, 本研究首先从药效学和效应相关机制证明, 对于流感病毒感染小鼠引起的肺炎, 臣药的治疗作用与银翘散相似, 且略优于银翘散; 并证明该药效与 NK 细胞活性增强相关。进一步采用转录组学分析得知, 臣药对 NK 细胞中基因的调节作用比银翘散更为广泛。本研究为银翘散的拆方研究提供研究思路, 亦为其组分臣药作为一个独立的复方、替代银翘散用于临床提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 王思源, 平静, 南春红, 等. 双表法对流感病毒感染小鼠肺形态学改变及肺组织病毒载量的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(12): 2638-2640.

[2] 孙志波, 崔晓兰. 银翘散对流感病毒 FM1 感染小鼠的

保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 69-71.

- [3] 毕明刚, 朱露莎, 许扬, 等. 银翘解毒口服液对流感病毒 FM1 感染胸腺缺陷小鼠 NK 细胞及 TNF- α , TGF- β 1 含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1586-1589.
- [4] 马荣, 许扬, 毕明刚, 等. 银翘解毒口服液对流感病毒 FM1 感染 SCID 小鼠 NK 细胞活性及 IFN- γ 含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1456-1459.
- [5] 马荣, 邓景岳, 刘东华, 等. 银翘解毒口服液对流感病毒 FM1 感染 SCID 小鼠血清 TNF- α 及 TGF- β 1 含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2488-2490.
- [6] 马荣. 银翘解毒口服液抗流感病毒鼠肺适应株 FM1 的免疫药理学初步研究 [D]. 张家口: 河北北方学院, 2010.
- [7] 邓中甲. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 43-44.
- [8] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 97-99.
- [9] 侯家玉. 中药药理学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 217-219.
- [10] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [11] Mahmoud A B, Tu M M, Wight A, et al. Influenza virus targets class I MHC-educated NK cells for immunoevasion [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(2): e1005446.
- [12] Mason L H, Anderson S K, Yokoyama W M, et al. The ly-49D receptor activates murine natural killer cells [J]. J Exp Med, 1996, 184(6): 2119-2128.
- [13] Idris A H, Smith H R, Mason L H, et al. The natural killer gene complex genetic locus Chok encodes Ly-49D, a target recognition receptor that activates natural killing [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(11): 6330-6335.
- [14] Guo H L, Kumar P, Moran T M, et al. The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection [J]. Immunol Cell Biol, 2009, 87(8): 579-589.
- [15] Lee S H, Zafer A, de Repentigny Y, et al. Transgenic expression of the activating natural killer receptor Ly49H confers resistance to cytomegalovirus in genetically susceptible mice [J]. J Exp Med, 2003, 197(4): 515-526.
- [16] Sjölin H, Tomasello E, Mousavi-Jazi M, et al. Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection [J]. J Exp Med, 2002, 195(7): 825-834.
- [17] Sun J C, Beilke J N, Lanier L L. Adaptive immune features of natural killer cells [J]. Nature, 2009, 457(7229): 557-561.

- [18] Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells [J]. *Nature*, 2001, 409(6823): 1055-1060.
- [19] Spies T, Groh V. Natural cytotoxicity receptors: Influenza virus in the spotlight [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(5): 443-444.
- [20] Gazit R, Gruda R, Elboim M, *et al.* Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1 [J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(5): 517-523.
- [21] He Y, Peng H, Sun R, *et al.* Contribution of inhibitory receptor *TIGIT* to NK cell education [J]. *J Autoimmun*, 2017, 81: 1-12.
- [22] Rauen T, Hedrich C M, Tenbrock K, *et al.* cAMP responsive element modulator: A critical regulator of cytokine production [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(4): 262-269.
- [23] Li K, Wu Y, Li Y, *et al.* Landscape and dynamics of the transcriptional regulatory network 2 during natural killer cell differentiation [J]. *Genom Proteom Bioinform*, 2020(20): 30166-30200.
- [24] Cichocki F, Wu C Y, Zhang B, *et al.* ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(9): 2379-2395.

[责任编辑 潘明佳]