

基于 JAK2-STAT3 通路研究流感相关脑病的发病机制与麻杏石甘汤的干预作用

陈纯静¹, 赵澄¹, 张香港¹, 王平¹, 肖荣¹, 胡珏¹, 熊涛¹, 卢芳国^{1,2*}

1. 湖南中医药大学医学院, 湖南长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410208

摘要: 目的 基于 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, JAK2/STAT3) 通路介导的细胞因子表达研究流感相关脑病的发病机制, 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 (influenza A virus, IAV) 滴鼻感染 BALB/c 小鼠为研究对象, 设置对照组、模型组、奥司他韦组、抗病毒颗粒组和麻杏石甘汤组。给予相应药物治疗 3、7 d 后, 计算小鼠脑指数; 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肺组织、脑组织病理变化; qRT-PCR 法检测脑组织中 *JAK2*、*STAT3*、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-10* 和 *IL-4* mRNA 表达; Western blotting 法检测脑组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达; 免疫组化法检测脑组织中磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 蛋白表达; ELISA 法检测脑组织中 IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 水平。结果 IAV 肺部感染的小鼠脑指数增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肺组织及大脑皮质出现明显病理变化; 脑组织中 *JAK2*、*STAT3*、*IL-1 β* 基因和蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), p-STAT3 表达水平升高 ($P < 0.01$), *IL-10*、*IL-4* 基因表达水平降低 ($P < 0.01$), IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 分泌水平失调 ($P < 0.05$ 、 0.01)。麻杏石甘汤能改善脑组织水肿及肺、脑组织病理变化, 下调脑组织中 *JAK2*、*STAT3*、*IL-1 β* 基因和蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 下调 p-STAT3 表达水平 ($P < 0.01$), 上调 *IL-10*、*IL-4* 基因和蛋白的表达水平 ($P < 0.01$)。结论 JAK2/STAT3 通路介导的细胞因子失衡可能是流感相关脑病的分子机制之一, 麻杏石甘汤作为有效的抗流感病毒中药复方, 可通过调控 JAK2/STAT3 通路减轻 IAV 肺部感染小鼠的脑组织病理损伤。

关键词: 流感相关脑病; 麻杏石甘汤; Janus 激酶 2; 信号转导和转录激活因子 3; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-10; 白细胞介素-4

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3694-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.015

Pathogenesis of influenza associated encephalopathy and intervention effect of Maxing Shigan Decoction based on JAK2-STAT3 pathway

CHEN Chun-jing¹, ZHAO Cheng¹, ZHANG Xiang-gang¹, WANG Ping¹, XIAO Rong¹, HU Jue¹, XIONG Tao¹, LU Fang-guo^{1,2}

1. Medical College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the pathogenesis of influenza associated encephalopathy based on cytokines expressions mediated by Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) pathway, and further explore intervention effect of Maxing Shigan Decoction (麻杏石甘汤). **Methods** Influenza A virus (IAV) intranasally infected BALB/c mice were used as research objects, control group, model group, oseltamivir group, antiviral granule group and Maxing Shigan Decoction group were set up. After

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074250); 国家自然科学基金资助项目 (81774126); 国家自然科学基金资助项目 (81973670); 湖南省自然科学基金资助项目 (2020JJ4063); 长沙市杰出创新青年人才培养计划项目 (2019-23); 湖南中医药大学中医药防治新型冠状病毒肺炎科专项项目 (2020XGXM03); 湖南省研究生优秀教学团队 (基础医学研究生教学团队, [2019]370-118); 湖南中医药大学一流学科《基础医学》资助项目 (NO: 1); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2020CX01); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金资助项目 (2020ZXYJH36, 2020ZXYJH13, 2020ZXYJH18)

作者简介: 陈纯静, 女, 博士研究生, 研究方向为感染性疾病中西医结合防治研究。E-mail: 513807931@qq.com

***通信作者:** 卢芳国, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为感染性疾病的中医药防治研究。E-mail: lufanguo0731@163.com

3 and 7 d of corresponding drug treatment, brain index of mice was calculated; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue and brain tissue; qRT-PCR method was used to detect *JAK2*, *STAT3*, interleukin-1 β (*IL-1 β*), *IL-10* and *IL-4* mRNA expressions; Western blotting was used to detect the protein expressions of *JAK2* and *STAT3* in brain tissue; Immunohistochemical method was used to detect phosphorylated *STAT3* (p-*STAT3*) protein expression; IL-1 β , IL-10 and IL-4 levels in brain tissue were detected by ELISA. **Results** Brain index of mice infected with IAV lung was increased ($P < 0.05, 0.01$), lung tissue and cerebral cortex showed obvious pathological changes; *JAK2*, *STAT3*, IL-1 β gene and protein expressions in brain tissue were increased ($P < 0.05, 0.01$), p-*STAT3* expression level was increased ($P < 0.01$), *IL-10* and *IL-4* gene expressions were decreased ($P < 0.01$), levels of IL-1 β , IL-10 and IL-4 were unregulated ($P < 0.05, 0.01$). Maxing Shigan Decoction improved brain tissue edema and pathological changes in lung and brain tissue, down-regulated *JAK2*, *STAT3*, *IL-1 β* gene and protein expression levels in brain tissue ($P < 0.05, 0.01$), down-regulated p-*STAT3* expression level ($P < 0.01$), up-regulated *IL-10*, *IL-4* gene and protein expression levels ($P < 0.01$). **Conclusion** Imbalance of cytokines mediated by *JAK2/STAT3* pathway may be one of molecular mechanisms of influenza associated encephalopathy. As an effective anti-influenza virus Chinese medicine compound, Maxing Shigan Decoction can improve brain histopathological damage of mice with IAV lung infection by regulating *JAK2/STAT3* pathway.

Key words: influenza associated encephalopathy; Maxing Shigan Decoction; Janus kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3; interleukin-1 β ; interleukin-10; interleukin-4

流感相关脑病 (influenza associated encephalopathy, IAE) 是在急性流感过程中出现的一种中枢神经系统功能障碍临床综合征, 其病情轻重不一, 典型临床表现为急性高热后突发惊厥, 起病 1~2 d 内 (通常在发热起病后的 24 h 内) 快速进展至昏迷或死亡^[1]。IAE 的发病机制迄今尚未阐明, 提出的假说包括细胞因子风暴学说、病毒直接侵袭脑组织、免疫交叉反应等几个方面, 目前尚无定论。其中, 较为认可的一种说法是细胞因子风暴学说: 机体在感染流感病毒后释放促炎症因子, 进而诱导了细胞因子级联反应, 导致细胞因子风暴, 引发神经及免疫系统功能紊乱和中枢神经系统的免疫病理损伤, 导致 IAE 的发生, 但其具体机制有待研究^[2]。

麻杏石甘汤源自汉代张仲景《伤寒论·辨太阳病脉证并治法》, 由麻黄 (去节) 4 两 (9 g)、杏仁 (去皮尖) 50 个 (9 g)、甘草 (炙) 2 两 (6 g)、石膏 (碎、绵裹) 半斤 (18 g) 配伍而成, 具有辛凉宣泄、清肺平喘之功效。本课题组前期研究表明, 麻杏石甘汤能够干预病毒吸附、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^[3-8]。本研究以流感病毒肺部感染小鼠模型为研究对象, 从 Janus 激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3, *JAK2/STAT3*) 通路研究 IAE 的发病机制, 并进一步探讨麻杏石甘汤的干预作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 100 只, 雌雄各半, 体质

量 (20 \pm 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK(湘) 2019-0004, 饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 恒温 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C, 恒湿 (50 \pm 5) %, 12 h 交替昼夜循环, 实验单位使用许可证编号 SYXK(湘) 2019-0009。实验过程中对小鼠的处理措施已经过湖南中医药大学动物实验中心伦理委员会批准, 批准号为 LL2020092501。

1.2 病毒株

A 型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 小鼠肺适应株 (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。

1.3 药材

麻杏石甘汤中的麻黄 9 g (批号 2004060)、杏仁 9 g (批号 2020120302)、石膏 18 g (批号 2008090062)、甘草 6 g (批号 201003) 均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 由湖南中医药大学药学院戴冰教授鉴定分别为麻黄科植物木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 的干燥草质茎、蔷薇科落叶乔木植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、硫酸盐类矿物硬石膏族石膏、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.4 药品与试剂

磷酸奥司他韦胶囊 (以奥司他韦计, 75 mg/粒, 批号 M1057) 由意大利 Delpharm Milano S.R.L. 生产, 上海罗氏制药有限公司分装, 购自中南大学湘雅三医院门诊药房, 用蒸馏水充分溶解, 制成实验

用质量浓度为 2.165 mg/mL 的混悬液; 抗病毒颗粒 (9 g/袋, 批号 2001089) 由四川光大制药有限公司生产, 购自湖南中医药大学附属第一医院门诊药房, 用蒸馏水充分溶解, 制成实验用质量浓度为 0.39 g/mL 的溶液; 兔抗鼠 JAK2 抗体 (批号 ab39636)、STAT3 抗体 (批号 ab109085) 购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体 (批号 0070175)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号 SA00001-2) 购自 Proteintech 公司; 磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 抗体 (批号 AF300993) 购自艾方生物; RNA simple 总 RNA 提取试剂盒 (批号 DP419) 购自 TIANGEN 公司; NovoScript 逆转录试剂盒 (批号 E047-01B)、NovoStartSYBR qPCR Super Mixture cDNA 扩增试剂盒 (批号 E096-01A) 购自 Novoprotein 公司; PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-10、IL-4 ELISA 试剂盒 (批号 E-EL-M0037c、E-EL-M0046c、E-EL-M0043c) 购自 Elabscience。

1.5 仪器

BSC-1300 IIA2 型生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司); TP-200D 型电子分析天平 (湘仪天平仪器有限公司); RMZ135 型精密轮转切片 (德国 Leica 公司); 光学扫描显微镜 (Axioscope 5) + Axiocam 503 color 显微镜摄像头 [蔡司科技 (苏州) 有限公司]; TGL20M 型高速冷冻离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); ELX-800 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); LightCycler96 型荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司)。

2 方法

2.1 麻杏石甘汤水煎液的制备

根据《方剂学》中麻杏石甘汤的药物组成、剂量、制备方法制备该方水煎液^[9], 按其组成比例精确称定麻杏石甘汤 1 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, 水浴浓缩至含生药 0.605 g/mL, 4 °C 避光保存备用。本课题组前期通过水提醇沉淀法对麻杏石甘汤全方多糖进行分离与定性定量测定^[10], 测定得多糖含量为 2.04%; 采用超高效液相色谱法对麻杏石甘汤水煎液 3 种主要有效成分 (麻黄碱、甘草苷、苦杏仁苷) 的含量进行了检测, 其质量分数分别为 0.10%、0.06%、0.49%。

2.2 分组与给药

BALB/c 小鼠适应性喂养 2 d 后, 按完全随机设计法分别将 50 只雄鼠和 50 只雌鼠分为 5 组, 每组 10 只, 各挑选 1 组随机进行组合, 将小鼠分为对照组、模型组、奥司他韦 (化学药对照) 组、抗病毒颗粒 (中药对照) 组和麻杏石甘汤组, 每组共 20 只小鼠 (10 只雄鼠、10 只雌鼠), 雌、雄鼠分开饲养。除对照组外, 其余动物按照本课题前期研究方法建立 IAV 肺部感染模型^[11]。以临床等效剂量 (临床等效剂量按动物每千克体质量占人体体表面积比值计算^[12]) 的药物于感染后 24 h 开始 ig 给药, 每天 1 次, 每次 0.2 mL, 连续给药 3、7 d。奥司他韦、抗病毒颗粒、麻杏石甘汤组的给药剂量分别为 21.63 mg/(kg·d)、3.9 g/(kg·d)、6.05 g/(kg·d)。对照组和模型组 ig 等体积生理盐水。

2.3 标本采集

分别于给药治疗 3、7 d 后, 禁水禁食 8 h 后, 每组随机选取 10 只小鼠, 称定动物体质量后, 摘眼球放血法处死小鼠, 转移至超净工作台内解剖, 称取小鼠全脑质量, 取部分脑、肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定, 部分脑组织置于 EP 管中, 冻存于 -80 °C 冰箱备用。

2.4 指标检测

2.4.1 脑指数 脑指数为脑质量与体质量之比。

2.4.2 肺组织、脑组织病理变化 用 4% 多聚甲醛固定肺、脑组织, 经石蜡包埋、切片 (5 μ m)、二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光学显微镜下 ($\times 200$) 观察肺、脑组织病理变化。

2.4.3 qRT-PCR 法检测脑组织中 JAK2、STAT3、IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 mRNA 的表达 取出 -80 °C 保存的脑组织, 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组样品的总 RNA, 逆转录合成 cDNA。以 cDNA 做模板, 按 NovoStartSYBR qPCR Super Mixture 试剂说明, 分别加入 β -actin、JAK2、STAT3、IL-1 β 、IL-10、IL-4 引物进行扩增。引物序列: JAK2 上游引物 5'-ACTGGACTATATGTGCTACGA-3', 下游引物 5'-GTTCCCTCTTAGTCCCGCTGA-3'; STAT3 上游引物 5'-CAATACCATTGACCTGCCGAT-3', 下游引物 5'-GAGCGACTCAAACCTGCCCT-3'; IL-1 β 上游引物 5'-TGAAATGCCACCTTTTGACAGT-3', 下游引物 5'-TTCTCCACAGCCACAATGAGT-3'; IL-10 上游引物 5'-GTTCCCTACTGTCATCCCC-3', 下游引物

5'-AGGCAGACAAACAATACACACCA-3'; *IL-4* 上游引物 5'-ATGTACCAGGAGCCATATCCACGG-3', 下游引物 5'-TCCCTTCTCCTGTGACCTCGTT-3'; *β-actin* 上游引物 5'-ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC-3', 下游引物 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCAC-3'。PCR 反应体系为 20 μL, 反应体系含 cDNA 2 μL、NovoStartSYBR qPCR Super Mixture 10 μL、10 μmol/L 上下游引物各 2 μL, 以 ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件: 95 °C、1 min; 95 °C、20 s, 60 °C、20 s, 72 °C、30 s, 40 个循环; 95 °C、10 s, 65 °C、60 s, 97 °C、1 s 绘制熔解曲线。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。

2.4.4 Western blotting 法检测脑组织中 JAK2、STAT3 蛋白的表达 取出-80 °C 保存的脑组织, 提取组织总蛋白质, 应用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 40 μg 总蛋白上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后, 封闭处理 1 h, 分别加入 JAK2 抗体 (1:1000)、STAT3 抗体 (1:2000)、β-actin 抗体 (1:10000), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗 (1:5000) 室温孵育 1 h, 避光显影。

2.4.5 免疫组化法检测脑组织中 p-STAT3 蛋白表达 取脑组织石蜡切片, 常规脱蜡至水, 抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断, 加入 3% 牛血清白蛋白封闭后滴加 p-STAT3 抗体 (1:100), 4 °C 湿盒中孵育过夜, 加入酶标二抗 (1:200) 室温孵育 50 min, DAB 显色剂处理 5 min, 苏木素复染 3 min, 脱水封片, 镜下观察结果 (×400)。

2.4.6 ELISA 法检测脑组织 IL-1β、IL-10、IL-4 水平 取出-80 °C 保存的脑组织, 加入 PBS 及蛋白酶抑制剂进行组织匀浆, 离心后取上清液, 分装保存, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测脑组织中 IL-1β、IL-

10、IL-4 水平。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐时, 用 LSD 进行多重比较, 方差不齐采用 Games Howell 检验。

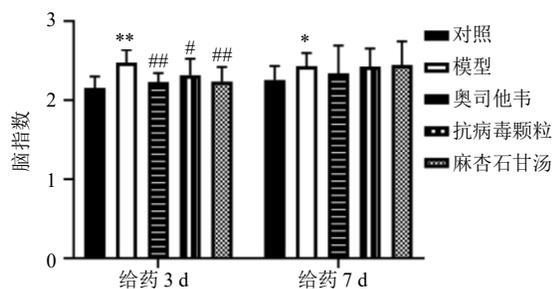
3 结果

3.1 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠脑指数的影响

如图 1 所示, 给药治疗 3 d 后, 模型组小鼠脑指数较对照组增加 ($P < 0.01$), 各给药组脑指数较模型组降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给药治疗 7 d 后, 模型组小鼠脑指数较对照组增加 ($P < 0.05$), 各给药组较模型组无明显差异。

3.2 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠肺组织、脑组织病理学的影响

如图 2 所示, 对照组小鼠肺组织形态完整, 肺泡腔轮廓清晰, 腔内无分泌物, 未见明显炎症细胞



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 1 麻杏石甘汤对 IAV 感染小鼠脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of Maxing Shigan Decoction on brain index of IAV infected mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

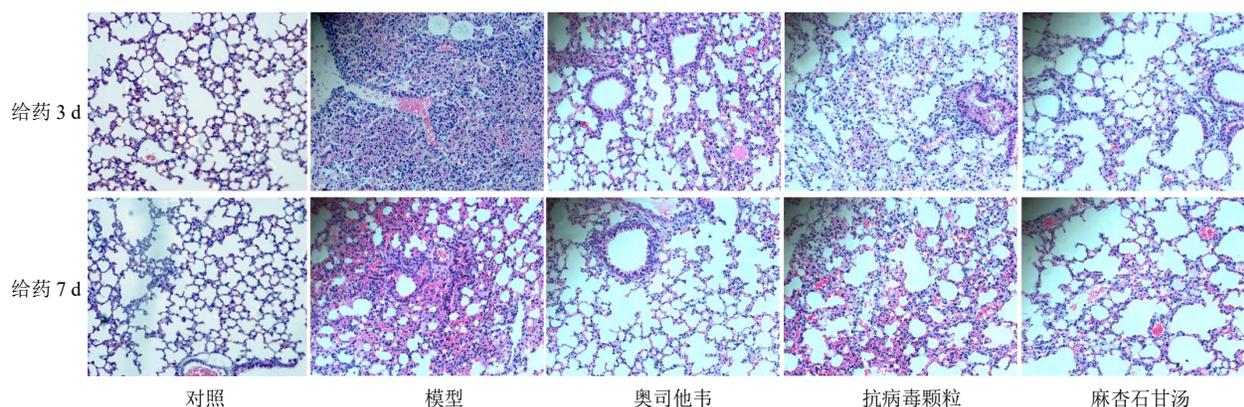


图 2 麻杏石甘汤对各组小鼠肺组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Maxing Shigan Decoction on lung histopathology of mice in each group (HE, ×200)

浸润；模型组肺组织出现明显病理变化，肺泡塌陷，肺泡腔内和肺间质中可见大量炎性细胞浸润；与模型组比较，各给药组肺部炎症和损伤程度均有所减轻，肺泡腔轮廓较清晰，腔内炎性细胞浸润减少。以上结果提示，经 IAV 滴鼻感染后，成功建立了小鼠流感病毒肺炎模型。如图 3 所示，与对照组比较，

模型组小鼠大脑皮质出现明显水肿，水肿部位脑组织结构疏松，未见炎性细胞浸润；与模型组比较，各给药组小鼠大脑皮质水肿得到改善。如图 4 所示，各组小鼠海马细胞排列整齐、密集，结构完整，多层分布，偶见细胞皱缩，染色加深，各组形态无明显差异。如图 5 所示，各组小鼠小脑小脑皮质层次

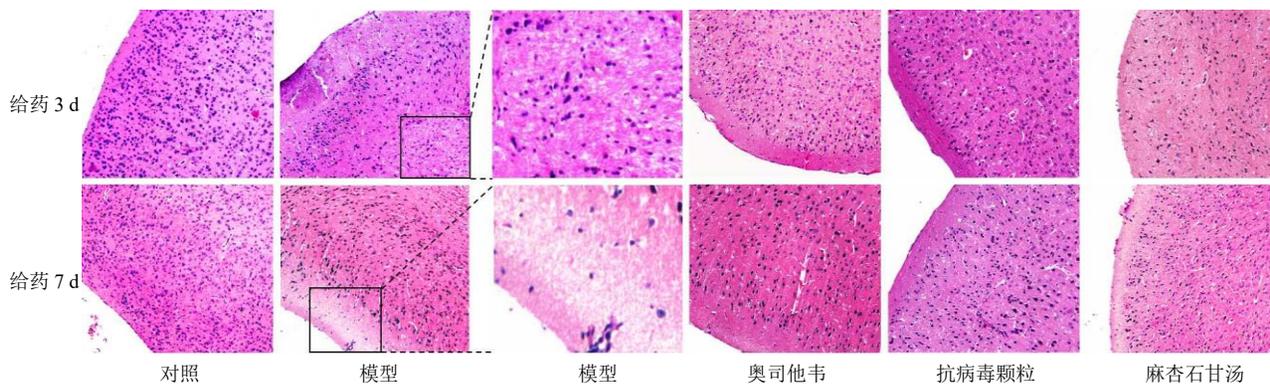


图 3 麻杏石甘汤对各组小鼠大脑皮质组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of Maxing Shigan Decoction on cerebral cortex histopathology of mice in each group (HE, × 200)

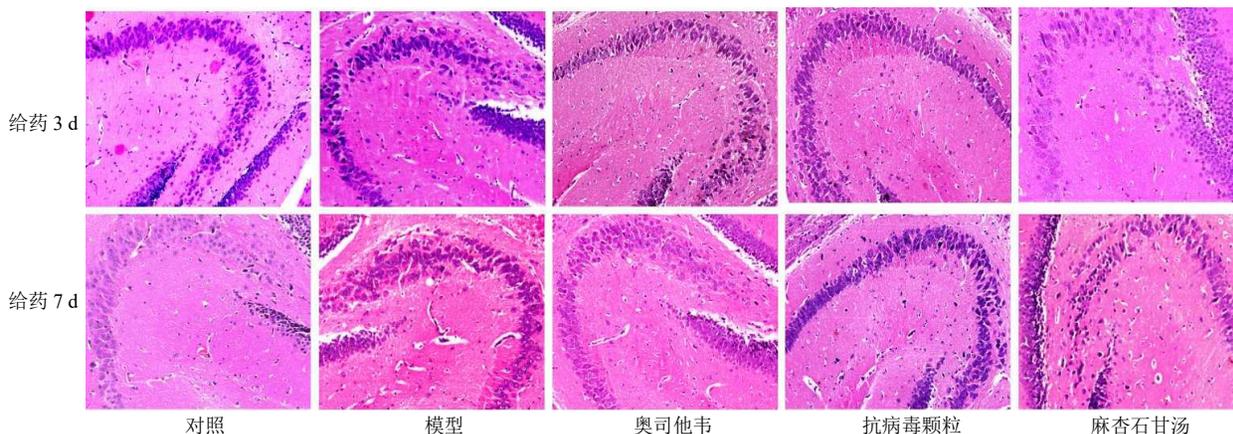


图 4 麻杏石甘汤对各组小鼠海马组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 4 Effect of Maxing Shigan Decoction on hippocampal histopathology of mice in each group (HE, × 200)

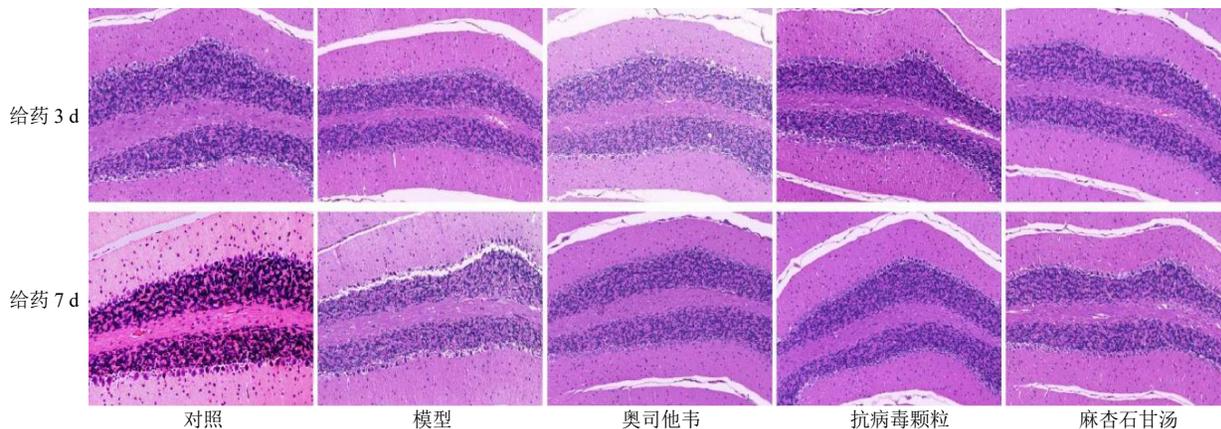


图 5 麻杏石甘汤对各组小鼠小脑病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 5 Effect of Maxing Shigan Decoction on cerebellum histopathology of mice in each group (HE, × 200)

清晰, 细胞形态正常, 细胞核, 细胞轮廓清晰, 排列整齐, 偶见浦肯野细胞层部分细胞核变形固缩, 细胞形态不规则, 各组形态无明显差异。

3.3 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠脑组织中 JAK2、STAT3 mRNA 表达的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠脑组织 JAK2、STAT3 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药治疗 3 d 后, 各给药组 JAK2 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), 奥司他韦组和麻杏石甘汤组 STAT3 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 给药治疗 7 d 后, 抗病毒颗粒组和麻杏石甘汤组 JAK2 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 抗病毒颗粒组 STAT3 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

3.4 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠脑组织中 IL-1 β 、IL-10、IL-4 mRNA 表达的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 给药 3 d 后模型组小鼠脑组织 IL-1 β mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), IL-10 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), 给药 7 d 后模型组小鼠脑组织 IL-4 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药治疗 3 d 后, 各给药组 IL-1 β mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), 麻杏石甘汤组 IL-10 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), 各给药组 IL-4 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); 给药治疗 7 d 后, 各药物组 IL-1 β mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), IL-10 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 抗病毒颗粒组 IL-4 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

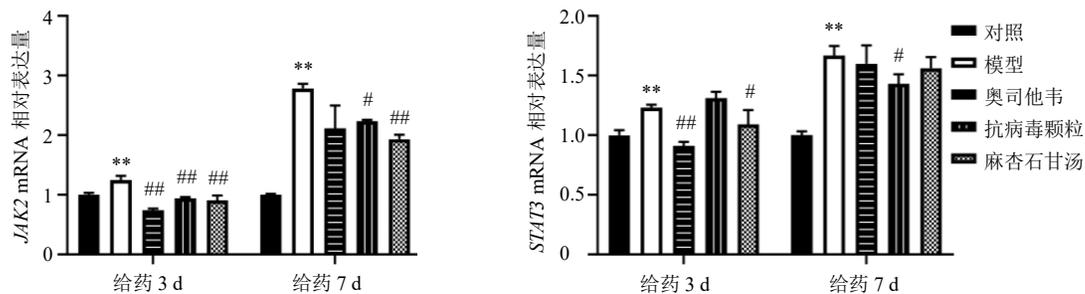


图 6 麻杏石甘汤对各组小鼠脑组织中 JAK2、STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of Maxing Shigan Decoction on JAK2 and STAT3 mRNA expressions in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

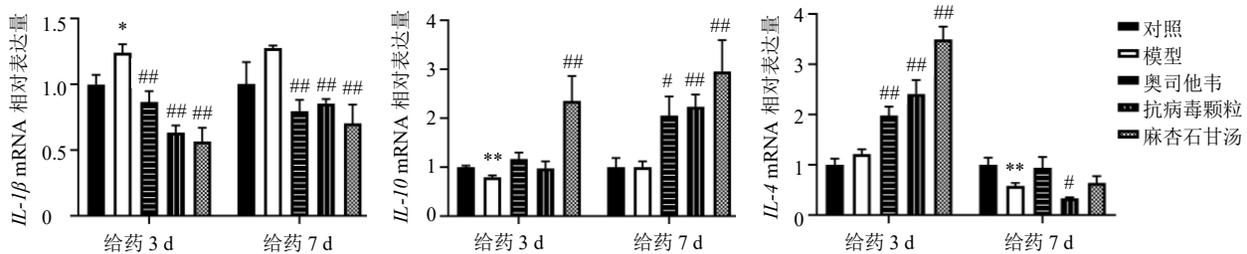


图 7 麻杏石甘汤对各组小鼠脑组织中 IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of Maxing Shigan Decoction on IL-1 β , IL-10 and IL-4 mRNA expressions in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠脑组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠脑组织 JAK2、STAT3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 给药 3 d 后, 抗病毒颗粒组、麻杏石甘汤组 JAK2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), 奥司他韦组、抗病毒颗粒组 STAT3 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 给药 7 d 后, 各给药组 JAK2、STAT3

蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.6 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠大脑皮质、海马、小脑中 p-STAT3 蛋白表达的影响

如图 9~12 所示, 与对照组相比, 模型组大脑皮质 p-STAT3 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大脑皮质 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 各组小鼠海马及小脑组织中 p-STAT3 蛋白表达水平无显著差异。

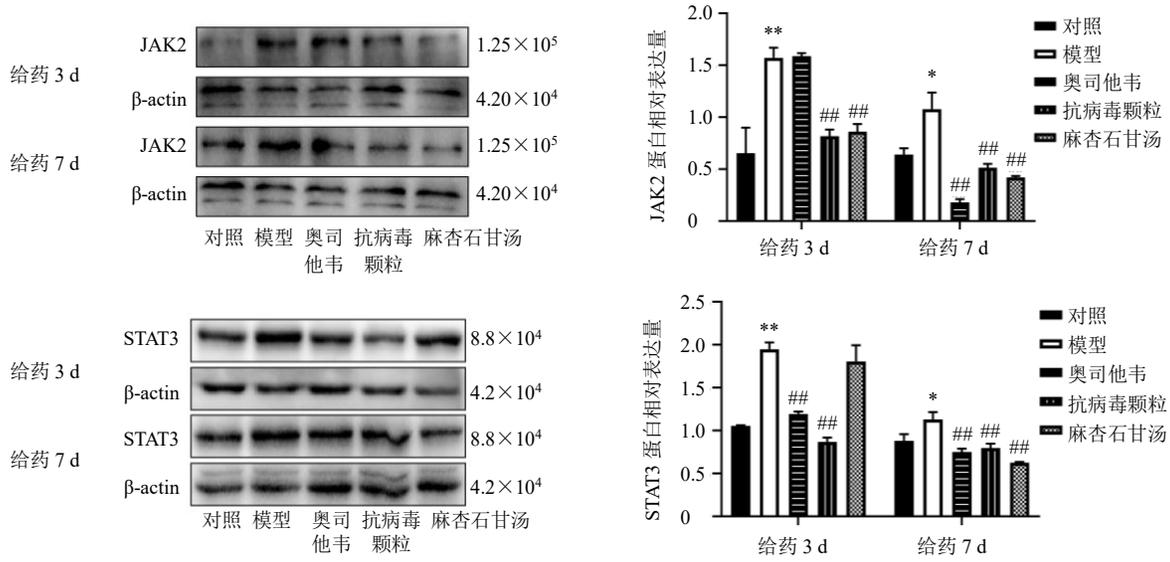


图 8 麻杏石甘汤对各组小鼠脑组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Moxing Shigan Decoction on JAK2 and STAT3 protein expressions in brain tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

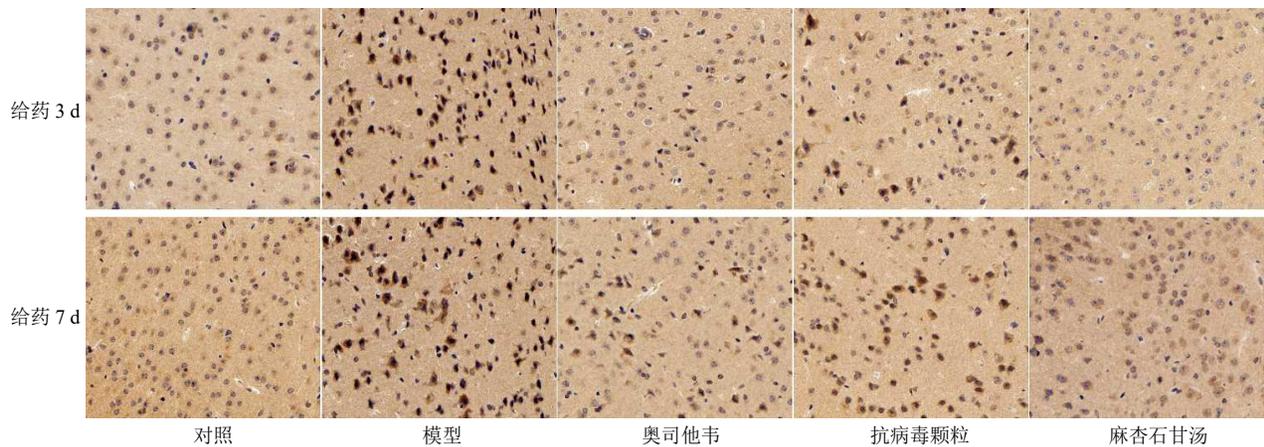


图 9 各组小鼠大脑皮质 p-STAT3 蛋白表达的免疫组化图 ($\times 400$)

Fig. 9 Immunohistochemical staining graph of p-STAT3 protein expression in cerebral cortex of mice in each group ($\times 400$)

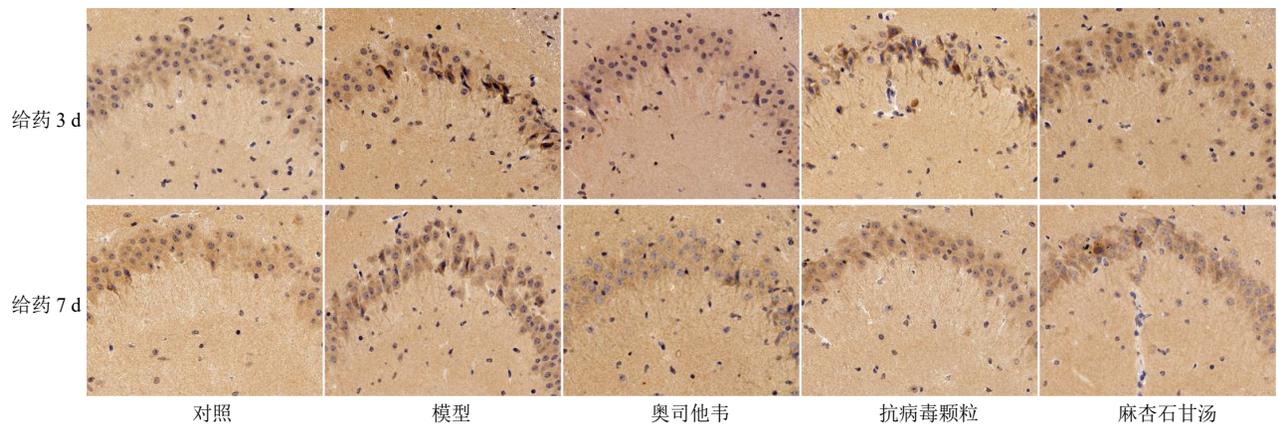


图 10 各组小鼠海马 p-STAT3 蛋白表达的免疫组化图 ($\times 400$)

Fig. 10 Immunohistochemical staining graph of p-STAT3 protein expression in hippocampus of mice in each group ($\times 400$)

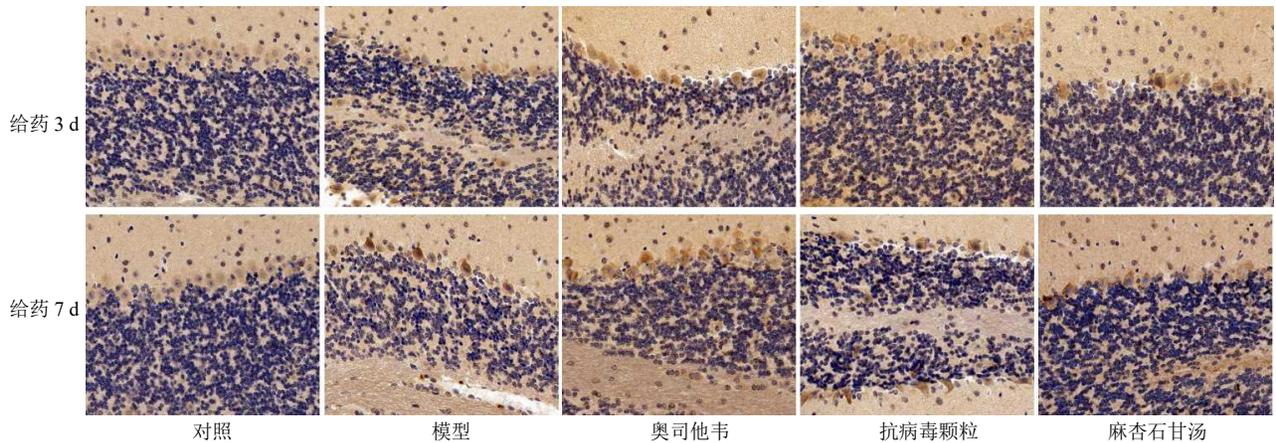


图 11 各组小鼠小脑 p-STAT3 蛋白表达的免疫组化图 (×400)

Fig. 11 Immunohistochemical staining graph of p-STAT3 protein expression in cerebellum of mice in each group (× 400)

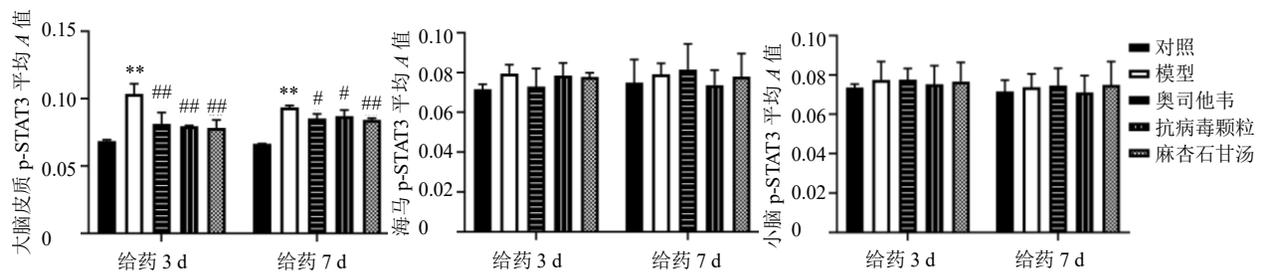


图 12 麻杏石甘汤对各组小鼠大脑皮质、海马和小脑 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of Maxing Shigan Decoction on p-STAT3 protein expression in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 麻杏石甘汤对 IAV 肺炎小鼠脑组织中 IL-1 β 、IL-10、IL-4 水平的影响

如图 13 所示,与对照组相比,给药 3 d 后模型组脑组织匀浆中 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$), IL-10 及 IL-4 水平降低 ($P < 0.01$), 给药 7 d 后模型组脑组织匀浆中 IL-1 β 、IL-10、IL-4 水平均升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组相比,给药治疗 3 d 后,奥司他韦组 IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$), 抗病毒颗粒组和麻杏石甘汤组 IL-1 β 水平降低 ($P < 0.01$), 各药物组 IL-10 及 IL-4 水平均升高 ($P < 0.01$); 给药 7 d 后,各给药组 IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$ 、0.01),

IL-10 和 IL-4 水平均升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

4 讨论

根据流感的症状特点,可将其分为 4 种类型:单纯型流感、肺炎型流感、胃肠型流感以及中毒型流感。其中,中毒型流感见于少数有基础性疾病、免疫力较差的患者。这些患者病情持续恶化,进展为重症肺炎,继发急性呼吸窘迫综合征及脓毒性休克,累及多个器官,例如神经系统损伤、心脏损害、肌炎、横纹肌溶解综合征等^[13]。流感导致的神经系统损伤包括脑炎、脑膜炎、脊髓炎、吉兰-巴雷综合征、IAE 等^[14]。IAE 是指在急性流感过程中伴随中

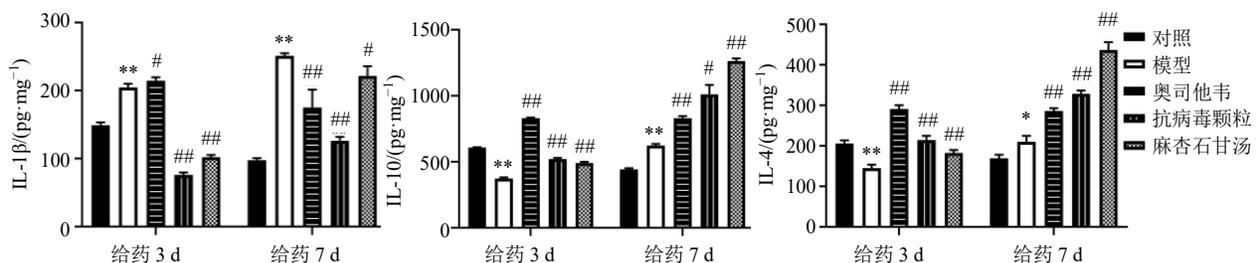


图 13 麻杏石甘汤对各组小鼠脑组织中 IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effect of Maxing Shigan Decoction on levels of IL-1 β , IL-10 and IL-4 in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

枢神经系统功能障碍的一种临床综合征,引起 IAE 的流感病毒以甲型流感病毒尤其是 H1N1、H3N2 最常见,此外,乙型流感病毒感染也可导致 IAE 的发生^[15-16]。北京儿童医院报道 IAE 引起的患儿死亡占流感死亡患儿的 36.84%。患儿从发病到死亡平均 3 d^[17]。目前关于 IAE 的发生机制并不十分明确。有研究认为是由于病毒直接入侵神经系统,通过复制导致其功能障碍,但是多数临床报道 IAE 患者的脑脊液或尸检脑组织中流感病毒检出率低,甚至脑组织检测不到病毒抗原或病毒 RNA^[18-20],意味着病毒在中枢神经系统中未复制或者没有足够数量的复制,或在取样前病毒已经被清除^[21-23]。还有研究发现,病毒感染后激发机体免疫反应,机体与病毒抗原存在交叉抗原,从而导致器官损伤。而更为认可的一种说法是细胞因子风暴学说:由于病毒感染,患者血清中促炎症细胞因子水平增高,造成全身炎症反应综合征,引起脓毒血症,这些细胞因子可以损伤血管内皮细胞,导致血脑屏障通透性增加,血脑屏障受损,细胞因子可进入中枢神经系统,诱导神经元细胞及神经胶质细胞凋亡,同时刺激神经胶质细胞释放更多的细胞因子,从而影响神经系统功能^[2]。

本研究建立了小鼠流感病毒肺部感染模型,通过检测小鼠脑组织病理变化及相关信号通路蛋白、细胞因子的表达水平,初步探索 IAE 的发病机制。结果显示,与对照组相比,模型组小鼠肺组织出现明显病理变化,提示肺炎模型构建成功,且模型组小鼠脑指数增加,大脑皮质出现明显水肿,水肿部位脑组织结构疏松,但未见明显炎性细胞浸润。流感病毒感染机体后,激活各种天然免疫细胞,诱导多种炎症因子及趋化因子的分泌,这些因子在感染早期主要介导抗病毒免疫反应,在持续感染或重症感染时,相关信号通路激活,其下游产物可进一步介导各种炎症因子的释放,引起免疫紊乱,炎症因子失衡,发生细胞因子风暴,导致全身炎症反应综合征,严重者并发多器官功能障碍综合征,甚至死亡。目前,细胞因子风暴被认为是 IAE 的主要发病机制。JAK/STAT 信号转导通路是多种细胞因子发挥作用的重要信号通路之一,与“细胞因子风暴”的发生密切相关^[24-27]。本研究发现,与对照组相比,模型组小鼠脑组织中 JAK2、STAT3 基因及蛋白表达水平升高,STAT 家族位于 JAKs 的下游,激活的 JAKs 可使 STAT 发生磷酸化,从而形成二聚体入核,发挥相应的作用。因此,本研究还检测了脑组

织磷酸化 STAT3 的表达水平,结果表明,与对照组相比,模型组大脑皮质 p-STAT3 表达水平均增加。以上实验结果提示,经流感病毒肺部感染后,小鼠脑组织 JAK2/STAT3 信号通路被激活。同时,本研究还检测了脑组织中细胞因子 IL-1 β 、IL-10、IL-4 基因表达及分泌水平,发现与对照组相比,模型组均存在不同程度变化,说明模型组小鼠脑组织中炎症因子表达紊乱。综上所述,本研究结果提示,流感病毒肺部感染后,机体脑组织发生病理损伤,其机制可能是由脑组织中 JAK2/STAT3 信号通路的激活及炎症因子的失衡所介导的。本研究结果为 IAE 的发病机制提供了一定的思路及启发。

中药治疗流感有着悠久的历史。麻杏石甘汤是临床上治疗流感的常用基础方剂之一,国家卫生健康委员会发布的 2018—2020 年《流行性感感冒诊疗方案》中,均将该方作为基础方用于流感热毒袭肺证的辩证治疗^[14,28-29]。本研究发现,给予临床等效剂量麻杏石甘汤治疗后,与模型组相比,小鼠肺、脑组织病理损伤减轻,脑指数下降,脑水肿缓解,同时 JAK2、STAT3 基因及蛋白表达水平均降低,p-STAT3 表达水平降低,IL-1 β 、IL-10、IL-4 紊乱相对恢复平衡,提示该方可缓解流感病毒肺炎模型小鼠脑组织的损伤,其机制可能是通过调节脑组织中 JAK2/STAT3 信号通路及炎症因子失衡。本研究为麻杏石甘汤治疗流感相关性疾病提供了实验支持及科学依据,但麻杏石甘汤的药效成分复杂,作用靶点多样,后续将通过质谱等技术手段,对麻杏石甘汤中的药效物质进行解析,并结合体内外实验,进一步探索其抗流感病毒效应的物质基础。本研究尚存在诸多不足,例如在对脑组织中各个指标进行检测时,选取的是全脑,而病理检测及 p-STAT3 检测结果发现,模型组脑组织的损伤及 p-STAT3 的表达变化主要集中在大脑皮质,后续将进一步对小鼠脑组织进行分区分离,对不同区域的相关指标进行检测,以提高实验结果的可信度。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sugaya N. Influenza-associated encephalopathy in Japan [J]. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2002, 13(2): 79-84.
- [2] Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, et al. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy [J]. *Brain Dev*, 2014, 36(6): 484-488.

- [3] 李玲, 魏科, 卢芳国, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1591-1596.
- [4] 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): 475-477.
- [5] 张波, 李玲, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肺部炎症与神经氨酸酶活性影响的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 1094-1099.
- [6] 张世鹰, 何谷良, 卢芳国, 等. 基于 TLR7/8 介导的 IFN- α/β 蛋白表达水平探讨麻黄先煎之麻杏石甘汤抗流感病毒的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3): 1188-1193.
- [7] 李玲, 戴冰, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤不同比例配伍对流感病毒感染小鼠影响的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(1): 309-313.
- [8] 王平, 赵澄, 卢芳国, 等. A 型流感病毒对小鼠肺部菌群及趋化因子 CCL5 和 CXCL10 的影响及麻杏石甘汤干预作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5523-5537.
- [9] 李冀. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 36-37.
- [10] 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.
- [11] 李玲, 丁煌, 吴东升, 等. 三种有效中药对 A 型流感病毒感染小鼠肺部炎症的干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1038-1040.
- [12] 贺石林. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 48-49.
- [13] 吕小琴, 张磊, 狄浩然, 等. 流行性感冒研究进展概要 [J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 278-282.
- [14] 国家卫生健康委员会, 国家中医药局. 流行性感冒诊疗方案 (2019 年版) [J]. 中华临床感染病杂志, 2019, 12(6): 451-455.
- [15] Studahl M. Influenza virus and CNS manifestations [J]. *J Clin Virol*, 2003, 28(3): 225-232.
- [16] Popescu C P, Florescu S A, Lupulescu E, *et al.* Neurologic complications of influenza B virus infection in adults, Romania [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(4): 574-581.
- [17] 刘珺, 王荃, 钱素云, 等. 流感病毒感染患儿 19 例死亡原因分析 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(2): 134-138.
- [18] Togashi T, Matsuzono Y, Narita M, *et al.* Influenza-associated acute encephalopathy in Japanese children in 1994-2002 [J]. *Virus Res*, 2004, 103(1/2): 75-78.
- [19] Maricich S M, Neul J L, Lotze T E, *et al.* Neurologic complications associated with influenza A in children during the 2003-2004 influenza season in Houston, Texas [J]. *Pediatrics*, 2004, 114(5): e626-e633.
- [20] Mastroli M V, Rubino C, Resti M, *et al.* Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019 [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 1012.
- [21] Fujimoto Y, Shibata M, Tsuyuki M, *et al.* Influenza A virus encephalopathy with symmetrical thalamic lesions [J]. *Eur J Pediatr*, 2000, 159(5): 319-321.
- [22] Santini M, Kutleša M, Zarković K, *et al.* Influenza A 2009 H1N1 encephalitis in adults with viral RNA in cerebrospinal fluid [J]. *Scand J Infect Dis*, 2012, 44(12): 992-996.
- [23] 李旭芳, 艾斌, 叶家卫, 等. 儿童甲型 H1N1 流行性感冒相关性脑病七例临床分析 [J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(7): 538-542.
- [24] 赵九洲, 姜晓旭, 李宏伟, 等. JAK-STAT 信号通路及巨噬细胞炎症调控的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(5): 402-404.
- [25] 杨昕, 唐哲, 张鹏, 等. JAK/STAT 信号通路在肺癌中的研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(1): 45-51.
- [26] 彭长铁. JAK2-STAT3 信号通路在缺血性疾病的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 159-164.
- [27] Roux-Lombard P. The interleukin-1 family [J]. *Eur Cytokine Netw*, 1998, 9(4): 565-576.
- [28] 国家卫生健康委员会. 流行性感冒诊疗方案 (2018 年版修订版) [J]. 传染病信息, 2018, 31(6): 500-504.
- [29] 国家卫生健康委员会, 国家中医药局. 流行性感冒诊疗方案 (2020 年版) [J]. 传染病信息, 2020, 33(5): 385-390.

[责任编辑 李亚楠]