

麻杏石甘汤通过外泌体 *miR-1249-5p* 靶向 SLC4A1 抑制流感病毒细胞级联损伤效应研究

马心悦¹, 黄家望¹, 冯芷莹², 刘卓琳¹, 王康宇², 卢芳国³, 朱梦晨¹, 李玲^{2*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探究麻杏石甘汤通过外泌体 *miR-1249-5p* 靶向溶质载体家族 4 成员 A1 (solute carrier family 4 member 1, SLC4A1) 抑制流感病毒诱导的肺上皮细胞损伤-巨噬细胞极化的级联损伤效应的作用机制。方法 以肺上皮细胞为研究对象, 采用 CCK-8 检测麻杏石甘汤含药血清的安全剂量和对流感病毒刺激肺上皮细胞治疗剂量, NanoSight 鉴定肺上皮细胞源外泌体的粒径和浓度, qRT-PCR 检测外泌体中 *miR-1249-5p* 基因表达。以与肺上皮细胞源外泌体共培养的巨噬细胞为研究对象, 采用 qRT-PCR 检测巨噬细胞中 *miR-1249-5p*、*SLC4A1* 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路相关基因表达; Western blotting 检测巨噬细胞中 SLC4A1 和 NF- κ B 通路相关蛋白表达; 流式细胞术和 qRT-PCR 检测巨噬细胞 M1/M2 极化表型。结果 CCK-8 结果显示, 10%和 20%的麻杏石甘汤含药血清对肺上皮细胞无细胞毒性, 显著抑制流感病毒诱导的肺上皮细胞损伤 ($P < 0.05$ 、 0.01); NanoSight 检测各组肺上皮细胞源外泌体大小无明显变化, 外泌体浓度有所改变; qRT-PCR 结果显示流感病毒刺激的肺上皮源外泌体 *miR-1249-5p* 基因表达明显降低 ($P < 0.01$), 各给药组 *miR-1249-5p* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)。肺上皮源外泌体共培养后的巨噬细胞中 *miR-1249-5p* 基因表达与外泌体相一致 ($P < 0.05$ 、 0.001); qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示, 模型组巨噬细胞 *SLC4A1* 和 NF- κ B 通路基因和蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 各给药组 *SLC4A1* 和 NF- κ B 通路基因和蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 流式细胞术结果显示模型组巨噬细胞 CD86⁺比例明显增高 ($P < 0.01$), 各给药组巨噬细胞 CD86⁺比例显著降低 ($P < 0.05$); qRT-PCR 结果显示共培养后模型组巨噬细胞肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-1 β 的表达显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), IL-10 和转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的表达显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), 各给药组以上因子表达趋势与之相反 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 麻杏石甘汤可能通过肺上皮细胞源外泌体递送 *miR-1249-5p* 到巨噬细胞中, 并靶向巨噬细胞中 SLC4A1 调控 NF- κ B 信号通路, 抑制流感病毒的细胞级联损伤效应的作用机制。

关键词: 麻杏石甘汤; A 型流感病毒; 功能性外泌体; *miR-1249-5p*; 肺泡上皮细胞; 肺泡巨噬细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2832-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.016

Maxing Shigan Decoction inhibits influenza virus cells cascade damage by targeting SLC4A1 with exosome *miR-1249-5p*

MA Xin-Yue¹, HUANG Jia-wang¹, FENG Zhi-ying², LIU Zhuo-lin¹, WANG Kang-yu², LU Fang-guo³, ZHU Meng-chen¹, LI Ling²

1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

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

3. Medical School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2022-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973670); 国家自然科学基金资助项目 (82074250); 湖南省自然科学基金资助项目 (2020JJ5418, 2020JJ4063)

作者简介: 马心悦 (1995—), 女, 硕士研究生, 从事中医药抗菌抗病毒免疫学机制与药效物质基础研究。

*通信作者: 李玲 (1983—), 女, 高级实验师, 硕士, 从事中医药抗菌抗病毒免疫学机制与药效物质基础研究。

Tel: (0731)88458215 E-mail: liling1049@hnuucm.edu.cn

Abstract: Objective To explore the mechanism of Moxing Shigan Decoction (麻杏石甘汤) targeting *SLC4A1* through *miR-1249-5p* to inhibit the cascade damage effect of influenza virus induced lung epithelial cells damage macrophage polarization. **Methods** Lung epithelial cells were taken as the research object, CCK-8 was used to detect the safe dose of Moxing Shigan Decoction drug containing serum and therapeutic dose of Moxing Shigan Decoction on lung epithelial cells stimulated by influenza virus; NanoSight was used to identify the particle size and concentration of pulmonary epithelial cell derived exosomes, qRT-PCR was used to detect the expression level of *miR-1249-5p* in the exosomes. The co-culture system of pulmonary epithelial cell derived exosomes and macrophages was taken as the research object, qRT-PCR was used to detect *miR-1249-5p*, *SLC4A1*, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway related factor gene expressions in macrophages; Western blotting was used to detect *SLC4A1* and NF- κ B pathway related protein expressions in macrophages; Flow cytometry and qRT-PCR were used to detect the M1/M2 polarization phenotype of macrophages. **Results** CCK-8 results showed that 10% and 20% of Moxing Shigan Decoction containing serum had no cytotoxicity on lung epithelial cells and significantly inhibited influenza virus induced lung epithelial cell damage ($P < 0.05, 0.01$); NanoSight detection showed that there was no significant change in the size of lung epithelial cell derived exosomes in each group, but the concentration of exosomes changed; qRT-PCR results showed that the expression of *miR-1249-5p* gene in lung epithelial cell derived exosomes stimulated by influenza virus was significantly reduced ($P < 0.01$), and the expression of *miR-1249-5p* gene was significantly increased in each treatment group ($P < 0.05, 0.001$). The expression of *miR-1249-5p* gene in macrophages co-cultured with pulmonary epithelial derived exosomes was consistent with that of exosomes ($P < 0.05, 0.001$); The results of qRT-PCR and Western blotting showed that in macrophages of model group, *SLC4A1* and NF- κ B pathway genes and proteins expressions were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and *SLC4A1* and NF- κ B pathway genes and proteins expression in each treatment group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Flow cytometry results showed that CD86⁺ ratio of macrophages in model group was significantly increased ($P < 0.01$), while the CD86⁺ ratio of macrophages in each treatment group was significantly reduced ($P < 0.05$); The qRT-PCR results showed that in macrophages of model group after co-culture, tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interleukin-6 (*IL-6*) and *IL-1 β* expressions were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), *IL-10* and transforming growth factor- β 1 (*TGF- β 1*) expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the expression trend of above factors in each treatment group was opposite ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Moxing Shigan Decoction may deliver *miR-1249-5p* to macrophages through exosomes derived from lung epithelial cells, and target *SLC4A1* to regulate NF- κ B signaling pathway in macrophages, inhibits the cellular cascade damage effect of influenza viruses.

Key words: Moxing Shigan Decoction; influenza A virus; specific exosomes; *miR-1249-5p*; alveolar epithelial cells; alveolus macrophage

流行性感冒(简称流感)是一种由流感病毒引起的急性呼吸道疾病,以具有高度传染性、传播性和易于变异的甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)为主^[1-3]。每年因 IAV 引起的呼吸道疾病死亡的人数多达 65 万例,对社会经济和人类健康造成了巨大的负担。肺作为气体交换的主要器官,含有先天性和适应性免疫细胞,当机体感染 IAV 时能够诱导强大的免疫反应^[4]。肺上皮细胞作为肺泡中病原体防御的第一道防线,是肺损伤过程中被损伤的初始部位^[5],也是成为推动肺部疾病进展的一大动力。肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM Φ)位于肺实质内,是肺组织中的主要免疫细胞,在病毒清除和免疫调节中扮演着关键角色。并且与肺上皮细胞相比,在 IAV 感染期间 AM Φ 的感染效率很低,AM Φ 会向 M1 型极化转化,促进炎症细胞因子的分泌,导致肺组织中中性粒细胞浸润和组织损伤^[6]。外泌体是一种由宿主细胞分泌的细胞外囊泡,因其在机体生理病理活动中的

细胞通讯作用日益被关注。本课题组前期研究发现,IAV 可以引起肺上皮细胞源外泌体 miRNA 差异表达,通过外泌体 *miR-1249-5p* 靶向调节溶质载体家族 4 成员 A1 (solute carrier family 4 member 1, *SLC4A1*) 基因抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路,从而参与肺炎和功能障碍的过程^[7-8]。

麻杏石甘汤出自中医经典著作《伤寒论》,由麻黄、杏仁、石膏和甘草 4 味药组成,有辛凉宣泄、清肺平喘之功效,广泛用于流感性感冒之风寒郁而化热或外感风热的治疗,联合化学药可治疗支原体肺炎^[9]。课题组前期研究表明麻杏石甘汤能够通过调节细胞因子的分泌、调控炎症相关信号传导途径、抑制 IAV 诱导的损伤效应,发挥抗 IAV 的作用^[10-11],基于前期研究,采用麻杏石甘汤治疗后的肺上皮细胞源外泌体,赋予肺上皮细胞源外泌体药物治疗功能,探讨功能性外泌体调控巨噬细胞极化以及对麻杏石甘汤抗 IAV 的作用机制。

1 材料

1.1 细胞、病毒株和动物

小鼠肺上皮 MLE-12 细胞为本实验室传代保存, RAW246.7 肺泡巨噬细胞株来自中科院细胞库。

流感病毒小鼠肺适应株(A型, IAV, A/PR/8/34)为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(multiplicity of infection, MOI=0.1)]置于冰袋中备用。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 6~8 周龄, 体质量 220~250 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 质量合格证号 ZS-202110120005。动物饲养于湖南中医药大学动物实验中心, 动物实验经湖南中医药大学动物实验中心伦理委员会批准(批准号 LL2021101202)。

1.3 药材

麻杏石甘汤由麻黄 9 g(批号 2004060)、杏仁 9 g(批号 2020120302)、石膏 18 g(批号 2008090062)和炙甘草 6 g(批号 201003)组成, 以上药材均购自湖南中医药大学第一附属医院, 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麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey. 的干燥草质茎、蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、硫酸盐类矿物石膏族石膏、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.4 药品与试剂

RPMI 1640 基础培养液(批号 WF0021F221)、DMEM 基础培养液(批号 WH0021D031)、无外泌体培养液(批号 PB180438)、PBS(批号 WH0021D081)、无血清非程序冻存液(批号 WH0021A081)、双抗(批号 WH1021A161)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清(批号 SA210518)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 病毒稀释液[含 RPMI 1640 基础培养液、1 mol/L HEPES(批号 WH01111711SP)、1 mg/mL TPCK-Try、NaHCO₃、双抗]、病毒维持液(含 0.2%胎牛血清的病毒稀释液)、磷酸奥司他韦(批号 HY-17016)购自 MCE 公司; CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒(批号 BS350A)购自 Biosharp 公司; miRNA 逆转录引物购自上海生工生物工程有限公司; 白细胞介素-6

(interleukin-6, IL-6)抗体(批号 DF6087)购自 Affinity 公司; IL-1 β 抗体(批号 ab79559)购自英国 Abcam 公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体(批号 17590-1-AP)购自 Proteintech 公司; NF- κ B 抗体(批号 bs-0465R)、 β -actin 抗体(批号 AG07197903)购自 BIOSS 公司; SLC4A1 抗体(批号 23276S)购自美国 CST 公司; 二抗(批号 E-AB-1003)购自 Elabscience 公司。

1.5 仪器

流式细胞仪、Optima MAX-XP 型台式超速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 3111 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); Western blotting 工作系统、CFX Touch 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); NS300 型马尔文纳米颗粒跟踪分析仪(英国马尔文仪器公司)。

2 方法

2.1 麻杏石甘汤含药血清的制备

2.1.1 麻杏石甘汤水煎剂的制备 根据《方剂学》中麻杏石甘汤的药物组成、剂量及煎煮方法制备水煎剂, 按动物体表面积剂量换算法, 根据《方剂学》和《中药药理学》, 采用表面积剂量换算法, 制备 5 倍临床等效剂量的麻杏石甘汤煎剂。按照中药比例称取 1 剂的药材量, 加入 10 倍体积蒸馏水浸泡 20 min, 武火煮沸后文火煎煮 30 min, 煎煮后滤过, 二煎加入 7 倍体积蒸馏水, 同样方式煎煮完毕后, 合并 2 次滤过液, 水浴浓缩至含生药 3.8 g/mL。

2.1.2 含药血清的制备 SD 大鼠随机分为对照组和麻杏石甘汤组, 每组 10 只。麻杏石甘汤组 ig 药物, 对照组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 每次 4 mL, 连续 7 d, 在末次给药 2 h 后对大鼠进行麻醉固定, 腹主动脉采血, 在 4 °C 冰箱内静置 2 h, 3000 r/min 离心 10 min, 收集血清, 得到麻杏石甘汤含药血清和空白对照血清, 同组血清混合后 56 °C 灭活, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌后分装, -20 °C 保存备用。通过超高压液相色谱法检测麻杏石甘汤含药血清中的麻黄碱和甘草酸的质量浓度分别为 0.592、0.276 mg/mL。

2.2 细胞培养

MLE-12 和 RAW246.7 细胞用 10%胎牛血清、1%双抗、90%基础培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每天更换细胞培养液, 当细胞生长至培养瓶 90%时, 用 0.25%胰蛋白酶进行消化、传代。

2.3 CCK-8 检测细胞活性

2.3.1 麻杏石甘汤含药血清对正常肺上皮细胞活性的影响 MLE-12 细胞以 4000 个/孔接种至 96 孔板, 分别用 80%、40%、20%、10%的麻杏石甘汤含药血清以及空白血清干预 24 h。加入 CCK-8 试剂, 测定 450 nm 波长处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.3.2 麻杏石甘汤含药血清对 IAV 感染的肺上皮细胞活性的影响 MLE-12 细胞以 4000 个/孔接种至 96 孔板, 以 IAV 干预细胞 2 h, 再分别用 80%、40%、20%、10%的麻杏石甘汤含药血清以及空白血清干预 8 h。加入 CCK-8 试剂, 测定 450 nm 波长处的 *A* 值, 计算细胞存活率。

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

2.4 功能性外泌体的获取

将 MLE-12 细胞设置对照组、模型组及麻杏石甘汤含药血清低、高剂量 (10%、20%) 组和奥司他韦 (5 μmol/mL) 组, 待细胞长至 90% 时, 在 IAV 刺激 2 h 后, 对照组和模型组加入空白含药血清, 各给药组加入相应药物。处理 8 h 后, 收集各组细胞上清液, 通过差速超高速离心提取物为功能性外泌体样本。

2.5 纳米颗粒跟踪分析

将获取的各组功能性外泌体沉淀加入 1 mL PBS 重悬混匀后, 在比色皿中加入 0.2 mL 外泌体悬液, 使用 BT-Zeta100 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 通过 Origin 2021 软件分析实验数据。

2.6 BCA 检测外泌体浓度

将获取的各组功能性外泌体加入 1 mL PBS 重悬, 根据 BCA 试剂盒说明书, 在 96 孔板中每孔加入 20 μL 悬液, 每组 3 个复孔, 加入 BCA 工作液, 37 °C 孵育 30 min, 检测 562 nm 波长处的 *A* 值, 计算各组功能性外泌体浓度。

2.7 功能性外泌体与巨噬细胞共培养

将巨噬细胞以 1 × 10⁶ 个/孔接种至 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 取“2.4”项下收集的肺上皮细胞源外泌体加入 1 mL 基础培养液重悬, 将各组功能性外泌体分别与巨噬细胞共培养 24 h, 250 μL/孔, 设置对照组 (EVs-Con)、模型组 (EVs-Model)、麻杏石甘汤含药血清低剂量组 (EVs-LD)、麻杏石甘汤含药血清高剂量组 (EVs-HD)、奥司他韦组 (EVs-OS), 于 24 h 后收集巨噬细胞, 待后续检测。

2.8 qRT-PCR 检测功能性外泌体 miR-1249-5p mRNA 及巨噬细胞 miR-1249-5p、SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β、TNF-α、IL-10、TGF-β1 mRNA 表达

取“2.4”项下提取的功能性外泌体, 按照试剂盒说明书提取外泌体中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析, 检测外泌体 miR-1249-5p 基因表达水平。

按“2.7”项下方法处理细胞, 收集各组巨噬细胞, 预冷的 PBS 清洗 2 遍, 按照试剂盒说明书提取巨噬细胞中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-qPCR 分析, 检测巨噬细胞中 miR-1249-5p、SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β、TNF-α、IL-10、TGF-β1 基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
miR-1249-5p	F: AGGGAGGGGATGGGCC R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
U6	F: GAAGATTTAGCATGGCCCCTGA R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
SLC4A1	F: CTGTGCTGTGGGTGGTGAAGTC R: GGAGGATGAGACGACGGAGAGG
NF-κB	F: AGGCTCCTGTGCGTGTCTCC R: TCGTCTGTATCTGGCAGGTACTGG
TNF-α	F: GGTGTTGCCTGCTGCCTTCC R: GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
IL-6	F: CTGGCGGAGGAGGTGCTCTC R: GGAGGAAGGAGAAGAGGCTGAGG
IL-1β	F: GGTGTTGCCTGCTGCCTTCC R: GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
IL-10	F: AGAGAAGCATGGCCCAGAAATCAAG R: CTTACCTGCTCCACTGCCTTG
TGF-β1	F: GGCTACTGCCGCTTCTGCTC R: CCAGCTCCATGTTCGATGGTCTTG
GAPDH	F: AGCTCGCTGTGAGCTGCTGAC R: TGTACACATGTATTACAGTCTG

2.9 Western blotting 检测巨噬细胞 SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达

按“2.7”项下方法处理细胞, 收集各组巨噬细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度, 高温变性后蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 1 × TBST 洗涤, 加入 5% 牛血清白蛋白, 37 °C 封闭 2 h, 用 1 × TBST 洗涤, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜, 用 1 × TBST 洗涤, 加入二抗, 室温孵育 2 h。ECL 显影曝光后采用化学发光仪检测并分析。

2.10 流式细胞术检测巨噬细胞 M1/M2 分型

按“2.7”项下方法处理细胞，收集各组巨噬细胞，用预冷的 PBS 清洗 2 遍，制备成 5×10^6 个/mL 的细胞悬液，采用流式细胞仪检测巨噬细胞 M1/M2 分型。

2.11 统计学分析

运用 SPSS 21.0 统计软件进行处理数据，计量资料经检验符合正态分布，方差齐性，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用 One-way ANOVA 检测。

3 结果

3.1 麻杏石甘汤含药血清对正常肺上皮细胞活性的影响

如表 2 所示，与对照组比较，80%、40%麻杏石甘汤含药血清干预后，肺上皮细胞活性均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，20%、10%的含药血清组对肺上皮细胞活性无明显影响。

表 2 麻杏石甘汤含药血清对正常肺上皮细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of serum containing Maxing Shigan Decoction on activity of normal lung epithelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	浓度/%	A 值	抑制率/%
对照	—	2.43 ± 0.05	—
含药血清	10	2.36 ± 0.08	2.88 ± 0.03
	20	2.33 ± 0.05	4.07 ± 0.03
	40	$2.28 \pm 0.04^*$	5.89 ± 0.03
	80	$2.25 \pm 0.09^{**}$	7.41 ± 0.06

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 麻杏石甘汤含药血清对 IAV 感染的肺上皮细胞活性的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组肺上皮细胞活性显著下降 ($P < 0.001$)；与模型组比较，10%、20%、40%含药血清组细胞活性明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，80%的含药血清抑制细胞增殖。综合以上 2 个实验结果，选取 20%和 10%的含药血清进行后续实验。

3.3 功能性外泌体鉴定

使用纳米颗粒追踪分析技术确定外泌体大小，如图 1 所示，外泌体大小均一，粒径均为 50~100 nm，无明显差异。BCA 法对各组功能性外泌体总蛋白浓度进行检测，结果见图 2，表明不同干预因素会影响外泌体的分泌，所以后续实验决定采用同体积的外泌体干预巨噬细胞。

表 3 麻杏石甘汤含药血清对 IAV 感染的肺上皮细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 3 Effect of serum containing Maxing Shigan Decoction on activity of IAV infected lung epithelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	浓度/%	A 值	存活率/%
对照	—	0.69 ± 0.03	—
模型	—	$0.60 \pm 0.03^{***}$	—
含药血清	10	$0.68 \pm 0.03^{\#}$	13.42 ± 0.12
	20	$0.66 \pm 0.02^{\#\#}$	16.50 ± 0.07
	40	$0.64 \pm 0.04^{\#\#\#}$	20.83 ± 0.09
	80	0.57 ± 0.03	4.80 ± 0.07

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

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

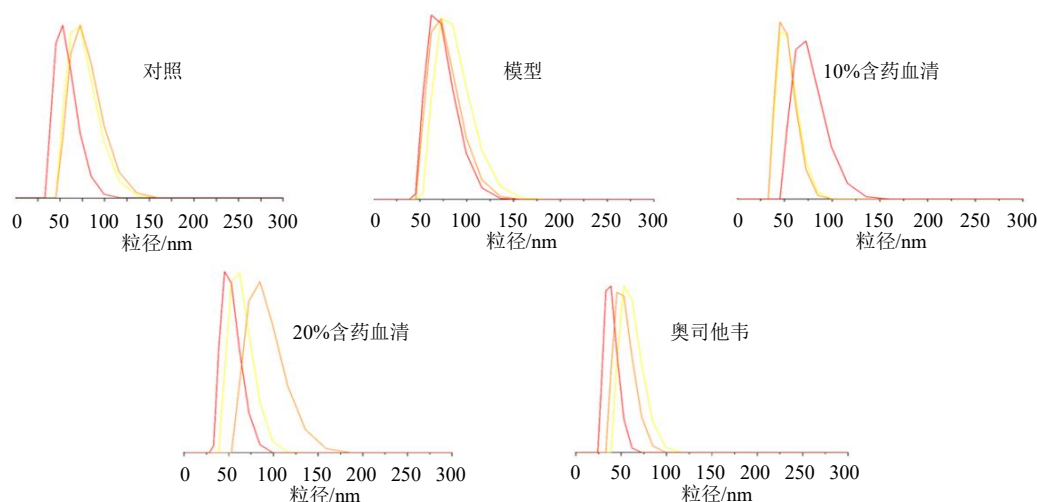


图 1 功能性外泌体粒径检测

Fig. 1 Functional exosome particle size detection

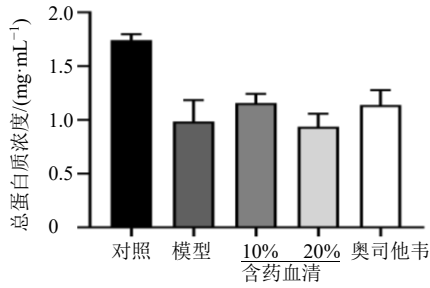
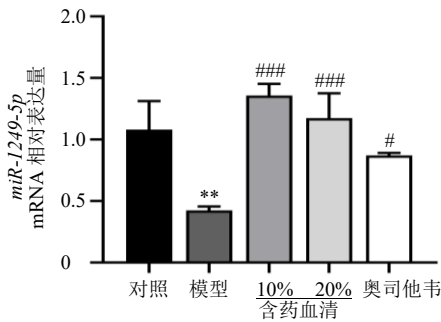


图2 功能性外泌体总蛋白浓度 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Total protein concentration of functional exosomes ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 功能性外泌体中 *miR-1249-5p* 基因表达

如图3所示,与对照组比较,模型组外泌体 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各给药组外泌体 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.05, 0.001$), 而含药血清低



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

图3 功能性外泌体中 *miR-1249-5p* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 3 *miR-1249-5p* gene expression in functional exosomes ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

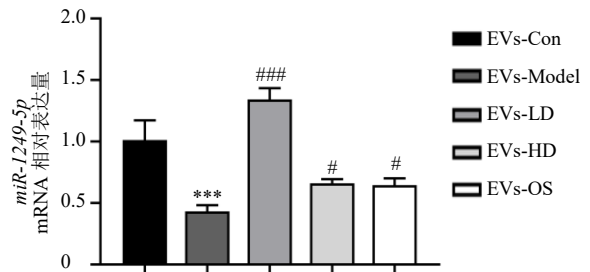
剂量组 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平高于含药血清高剂量组和奥司他韦组。

3.5 功能性外泌体对巨噬细胞 *miR-1249-5p* 基因表达的影响

如图4所示,与 EVs-Con 组比较, EVs-Model 组巨噬细胞 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与 EVs-Model 组比较,各给药组巨噬细胞 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.05, 0.001$), EVs-LD 组 *miR-1249-5p* mRNA 表达水平高于 EVs-HD 和 EVs-OS 组。

3.6 功能性外泌体对巨噬细胞 *SLC4A1*、*NF-κB*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达的影响

如图5所示,与 EVs-Con 组比较, EVs-Model



与 EVs-Con 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 EVs-Model 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs EVs-Con group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs EVs-Model group, same as below figures

图4 功能性外泌体对巨噬细胞 *miR-1249-5p* 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 4 Effect of functional exosomes on *miR-1249-5p* gene expression in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

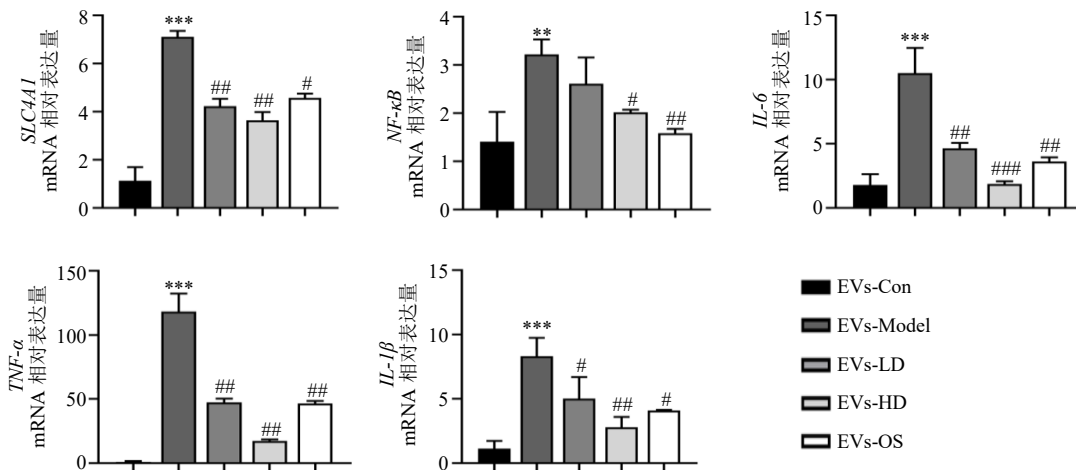


图5 功能性外泌体对巨噬细胞 *SLC4A1*、*NF-κB*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 Effect of functional exosomes on *SLC4A1*, *NF-κB*, *IL-6*, *IL-1β* and *TNF-α* mRNA expressions in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组巨噬细胞中 *SLC4A1*、*NF-κB*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；与 EVs-Model 组比较，各给药组巨噬细胞中 *SLC4A1*、*IL-6*、*IL-1β* 和 *TNF-α* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，EVs-HD 组、EVs-OS 组巨噬细胞中 *NF-κB* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 功能性外泌体对巨噬细胞 SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的影响

如图 6 所示，与 EVs-Con 组比较，EVs-Model 组巨噬细胞中 SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)；与 EVs-Model 组比较，各给药组巨噬细胞中以上蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.8 功能性外泌体对巨噬细胞 M1/M2 表型极化的影响

如图 7 所示，与 EVs-Con 组比较，EVs-Model

组巨噬细胞 CD86⁺的比例显著升高 ($P < 0.01$)；与 EVs-Model 组比较，各给药组巨噬细胞 CD86⁺细胞比例明显下降 ($P < 0.05$)。

3.9 功能性外泌体对巨噬细胞 M1/M2 表型基因表达的影响

如图 8-A 所示，与 EVs-Con 组比较，EVs-Model 组巨噬细胞 M1 极化表型相关因子 *TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-1β* mRNA 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)，M2 极化表型相关因子 *IL-10* 和 *TGF-β1* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与 EVs-Model 组比较，各给药组 *TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-1β* mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，M2 极化表型相关因子 *TGF-β1* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，EVs-HD 组、EVs-OS 组 M2 极化表型相关因子 *IL-10* mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，EVs-LD 组 *IL-10* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

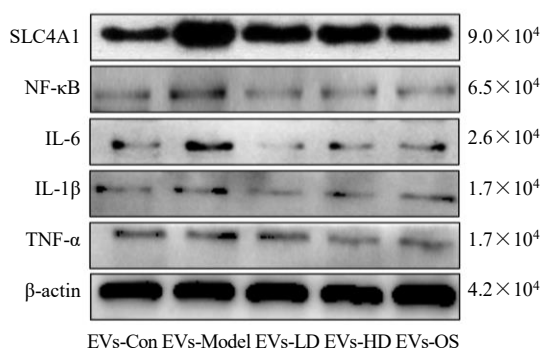


图 6 功能性外泌体对巨噬细胞 SLC4A1、NF-κB、IL-6、IL-1β 和 TNF-α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Fig. 6 Effect of functional exosomes on SLC4A1, NF-κB, IL-6, IL-1β and TNF-α protein expressions in macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

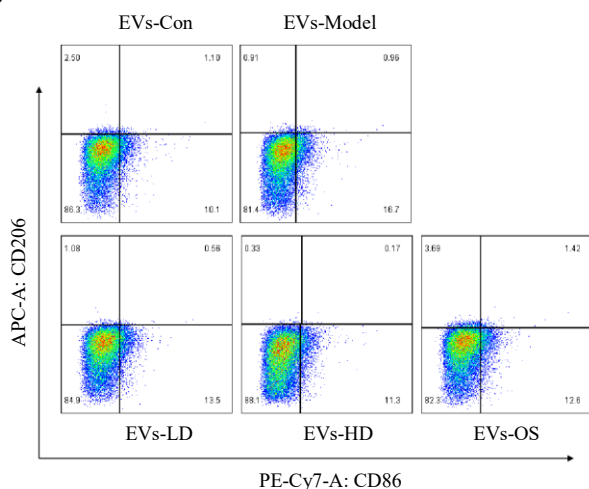
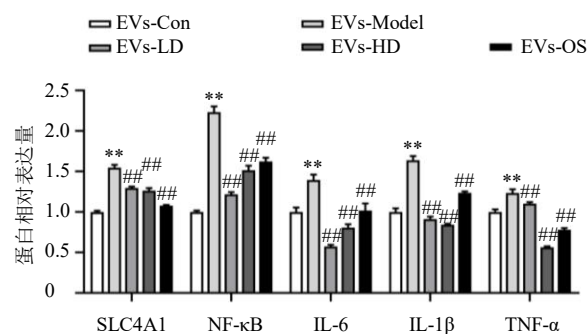
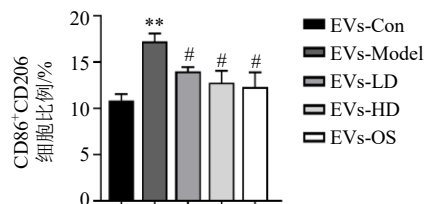


图 7 功能性外泌体对巨噬细胞 M1/M2 表型极化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Effect of functional exosomes on M1/M2 phenotype polarization of macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



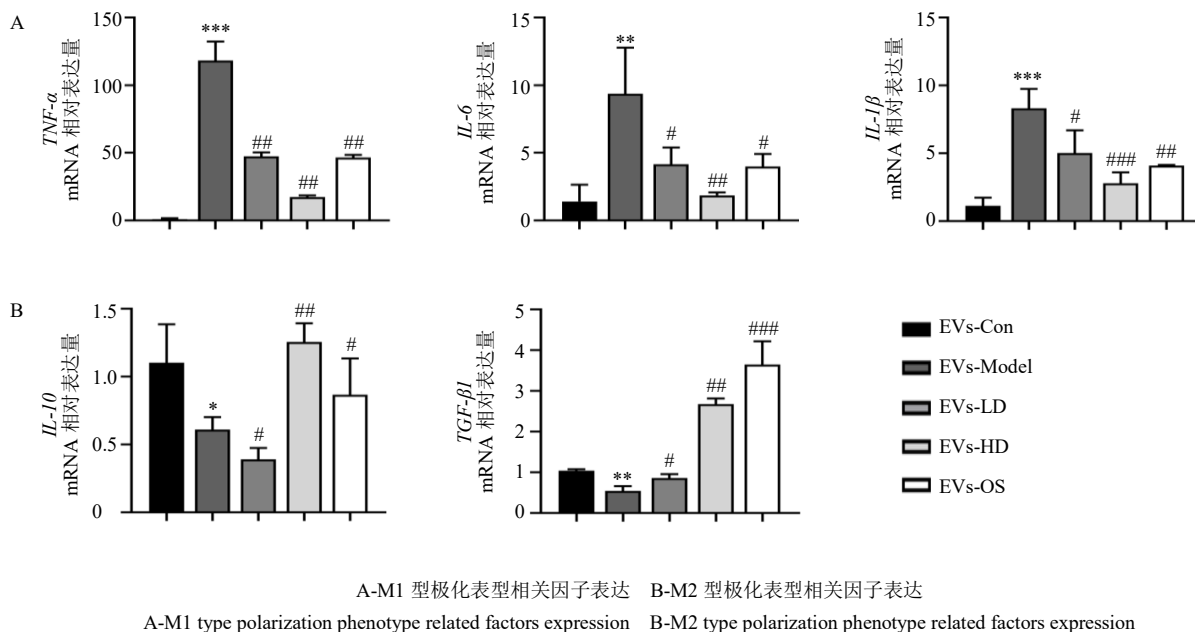


图 8 功能性外泌体对巨噬细胞 M1/M2 表型基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 8 Effect of functional exosomes on M1/M2 phenotype gene expression in macrophages ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

流感每年都会引发人类呼吸道疾病，对社会经济和人类健康造成了巨大的负担，且 IAV 传播速度快及病毒易于变异，因此对流感的预防和控制越来越困难^[12]。研究表明，miRNA 在病毒对宿主细胞的影响中发挥着重要作用^[13-14]。而外泌体作为细胞间物质递送的信使，在 IAV 感染期间，感染细胞释放的外泌体即可以通过携带病毒或宿主 miRNA 参与细胞之间释放和交换信息，调节宿主免疫应答进而增加病毒复制，激活和调节抗病毒反应^[15]。此外，细胞外泌体可以诱导肺部炎症和促进肺泡巨噬细胞活化，增加巨噬细胞的吞噬功能以消除病原体，选择性激活 M2 巨噬细胞抑制炎症反应，减缓肺部炎症^[16-18]。

本课题组前期研究表明，IAV 可以诱导肺上皮细胞源外泌体 miRNA 的差异表达^[7]。本研究通过对外泌体的鉴定证实，不同干预方式下外泌体的大小无明显变化，但外泌体的分泌会有差异。同时流感病毒诱导的肺上皮源外泌体 miR-1249-5p 的表达明显下降，而麻杏石甘汤组外泌体 miR-1249-5p 表达水平明显增加。当用不同干预方式获取的肺上皮源外泌体（即功能性外泌体）与巨噬细胞共培养后，各组巨噬细胞 miR-1249-5p 表达与外泌体 miR-1249-5p 表达相一致，这提示了肺上皮细胞可能通过分泌包裹 miR-1249-5p 的外泌体至巨噬细胞内，从而影

响巨噬细胞的炎症反应。此外，课题组前期研究发现，IAV 干预后肺上皮细胞源外泌体 miR-1249-5p 可以靶向调节 SLC4A1 基因抑制 NF-κB 信号通路调节炎症^[8]，因此，本研究通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测了 SLC4A1 和 NF-κB 信号通路的相关因子，麻杏石甘汤能够明显降低 SLC4A1、NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达，提示麻杏石甘汤可以增加外泌体 miR-1249-5p 的表达，下调 SLC4A1 的表达，进而抑制 NF-κB 信号通路。与此同时也发现，功能性外泌体与巨噬细胞共培养后，模型组外泌体干预后的巨噬细胞 CD86⁺ 的比例明显升高，TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA 的表达增加，IL-10、TGF-β1 mRNA 的表达降低，麻杏石甘汤组外泌体能够逆转这一趋势，表明麻杏石甘汤可以借助外泌体抑制巨噬细胞 M1 型极化，从而减缓炎症细胞浸润导致的急性肺损伤。

综上，麻杏石甘汤可能通过肺上皮细胞源外泌体递送 miR-1249-5p 到巨噬细胞中，并靶向巨噬细胞中 SLC4A1 调控 NF-κB 信号通路，抑制流感病毒的细胞级联损伤效应的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Khajehkazemi R, Baneshi M R, Iuliano A D, et al. Estimated mortality due to seasonal influenza in southeast of Iran, 2006/2007 to 2011/2012 influenza seasons [J].

- Influenza Other Respir Viruses*, 2023, 17(1): e13061.
- [2] Liao Y, Guo S, Liu G, *et al.* Host non-coding RNA regulates influenza A virus replication [J]. *Viruses*, 2021, 14(1): 51.
- [3] Ciminski K, Chase G P, Beer M, *et al.* Influenza A viruses: Understanding human host determinants [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27(2): 104-112.
- [4] Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and sepsis-associated acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.
- [5] Meischel T, Villalon-Letelier F, Saunders P M, *et al.* Influenza A virus interactions with macrophages: Lessons from epithelial cells [J]. *Cell Microbiol*, 2020, 22(5): e13170.
- [6] Li M, Xu H, Qi Y H, *et al.* Tumor-derived exosomes deliver the tumor suppressor *miR-3591-3p* to induce M2 macrophage polarization and promote glioma progression [J]. *Oncogene*, 2022, 41(41): 4618-4632.
- [7] 马心悦, 朱梦晨, 卢芳国, 等. 流感病毒诱导的小鼠肺上皮细胞损伤及外泌体 miRNA 差异表达谱研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 40-49.
- [8] Zhu M C, Ma X Y, Huang J W, *et al.* Extracellular vesicle-derived *miR-1249-5p* regulates influenza A virus-induced acute lung injury in RAW246.7 cells through targeting SLC4A1 [J]. *Microbes Infect*, 2022, 24(8): 104998.
- [9] 丰依明, 李智成, 谢瑞芳, 等. 麻杏石甘汤联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的系统评价 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(4): 768-779.
- [10] 赵澄, 吴涛, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肺组织 CCL3、CCL25 表达水平的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(10): 1216-1220.
- [11] 王平, 赵澄, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤对流感病毒感染小鼠肠道菌群及趋化因子 CCL5、CXCL10 的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 160-175.
- [12] Hartshorn K L. Innate immunity and influenza A virus pathogenesis: Lessons for COVID-19 [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 563850.
- [13] Zhao X P, Fan H X, Chen X, *et al.* Hepatitis B virus DNA polymerase restrains viral replication through the CREB1/HOXA distal transcript antisense RNA homeobox A13 axis [J]. *Hepatology*, 2021, 73(2): 503-519.
- [14] Khatun M, Sur S, Steele R, *et al.* Inhibition of long noncoding RNA linc-pint by hepatitis C virus in infected hepatocytes enhances lipogenesis [J]. *Hepatology*, 2021, 74(1): 41-54.
- [15] Zheng B J, Zhou J M, Wang H. Host microRNAs and exosomes that modulate influenza virus infection [J]. *Virus Res*, 2020, 279: 197885.
- [16] Zargar M J, Kaviani S, Vasei M, *et al.* Therapeutic role of mesenchymal stem cell-derived exosomes in respiratory disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 194.
- [17] Liu F, Peng W, Chen J Q, *et al.* Exosomes derived from alveolar epithelial cells promote alveolar macrophage activation mediated by *miR-92a-3p* in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 646546.
- [18] Arabpour M, Saghadzadeh A, Rezaei N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107823.

[责任编辑 李亚楠]