

清肺解毒颗粒通过肠道菌群对呼吸道合胞病毒感染小鼠固有免疫的影响

孙亚磊¹, 罗 萌¹, 代 婷¹, 高 静², 苏凯奇², 郭 宇¹, 吴明莉², 陈立典¹, 冯晓东^{1,2*}

1. 河南中医药大学康复医学院, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学 第一附属医院康复中心, 河南 郑州 450003

摘 要: 目的 探究清肺解毒颗粒通过肠道菌群对呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 感染小鼠固有免疫的影响。方法 将 BALB/c 雌性小鼠随机分为对照组、模型组、清肺解毒颗粒组、抗生素组、抗生素+清肺解毒颗粒组。在滴鼻 RSV 造模前, 抗生素组及抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 ig 四环素 4 周 (0.15 mL), 构建伪无肠道菌表型。除对照组外其余各组滴鼻 RSV, 清肺解毒颗粒组、抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 ig 清肺解毒颗粒 (120 mg/kg), 1 次/d, 3 d 后处死小鼠。苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色法观察肺组织的病理改变, q-PCR 检测小鼠肺组织呼吸道合胞病毒融合蛋白 (respiratory syncytial virus-fusion protein, *RSV-F*)、呼吸道合胞病毒附着蛋白 (respiratory syncytial virus-glycoprotein, *RSV-G*)、呼吸道合胞病毒非结构蛋白 1 (respiratory syncytial virus-non-structural protein 1, *RSV-NS1*)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-6*、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、干扰素- α (interferon- α , *IFN- α*)、*IFN- β* 、人 I 型黏病毒对抗蛋白 (myxovirus resistance proteins I, *MX1*)、*MX2*、干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *ISG15*)、三重基序蛋白 5 (tripartite motif-containing protein 5, *TRIM5*)、2'-5'寡聚腺苷酸合成酶-1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase-2, *OAS1*)、*OAS2*、蛋白激酶 R (protein kinases R, *PKR*) mRNA 表达水平。采用高效液相色谱-质谱法检测小鼠粪便中对羟基苯丙酸 (desaminotyrosine, DAT) 含量, ELISA 方法检测血清 IFN- α 、IFN- β 水平。免疫组化、免疫荧光、Western blotting 方法检测维甲酸诱导基因-1 (retinoic acid inducible gene-1, *RIG-I*)、线粒体信号蛋白 (mitochondrial antiviral-signaling protein, MAVS)、*MX1*、*OAS1* 表达水平。结果 与模型组比较, 清肺解毒颗粒组药效明显, 即小鼠肺组织病理性损伤得以显著改善、RSV 病毒水平、炎症因子水平显著降低 ($P < 0.01$), 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠药效减弱 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 清肺解毒颗粒组小鼠固有免疫抗病毒效应中的 *RIG-I*、*MAVS*、*IFN- α* 、*IFN- β* 、*MX1*、*MX2*、*OAS1*、*OAS2*、*ISG15*、*TRIM5*、*PKR* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠上述 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 清肺解毒颗粒组 DAT 含量显著增加 ($P < 0.01$), 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组 DAT 含量显著降低 ($P < 0.05$)。结论 清肺解毒颗粒可能通过调控 *RIG-I*/MAVS/IFN 信号通路, 活化固有免疫抗病毒反应, 发挥抗 RSV 效应, 清除肠道菌群则影响其药效。

关键词: 清肺解毒颗粒; 肠道菌群; 对羟基苯丙酸; 呼吸道合胞病毒; 固有免疫; 牡荆素; 异鼠李素; 槲皮素; 山柰酚; 芫花素; 芹菜素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)24-8490-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.017

Effect of Qingfei Jiedu Granules on innate immunity of RSV-infected mice via intestinal bacteria

SUN Yalei¹, LUO Meng¹, DAI Ting¹, GAO Jing², SU Kaiqi², GUO Yu¹, WU Mingli², CHEN Lidian¹, FENG Xiaodong^{1,2}

1. Rehabilitation Medicine College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Rehabilitation Center, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

收稿日期: 2024-08-02

基金项目: 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) 项目 (242102310508); 2023 年度河南省“双一流”创建学科中医学科学研究专项 (HSRP-DFCTCM-2023); 河南中医药大学博士科研启动项目 (00104311-2024-2-33)

作者简介: 孙亚磊 (1992—), 男, 博士, 讲师, 从事呼吸系统疾病的中医药防治与康复研究。E-mail: sunyalei7263@163.com

*通信作者: 冯晓东 (1968—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事常见功能障碍的中医药防治与康复研究。E-mail:

fxd0502@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of Qingfei Jiedu Granules (清肺解毒颗粒) on the innate immunity of respiratory syncytial virus (RSV) infected mice through intestinal flora. **Methods** BALB/c female mice were randomly divided into control group, model group, Qingfei Jiedu Granules group, antibiotic group, antibiotic + Qingfei Jiedu Granules group. Before nasal RSV modeling, mice in the antibiotic group were administrated with a quadruple antibiotic (0.15mL) for four weeks to establish a pseudopteral bacterial phenotype. Except control group, mice in the other groups were given nasal RSV, Qingfei Jiedu Granules group and antibiotic+Qingfei Jiedu Granules group by intragastric administration (120mg/kg), and the mice were killed 3 days later. Hematoxylin-eosin (HE) was used to observe the pathological changes of lung tissue. Respiratory syncytial virus-fusion protein (*RSV-F*), glycoprotein (*RSV-G*), non-structural protein 1 (*RSV-NS1*), interleukin-1 β (*IL-1 β*), *IL-6*, tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interferon- α (*IFN- α*), *IFN- β* , myxovirus resistance proteins I (*MX1*), *MX2*, interferon stimulated gene 15 (*ISG15*), tripartite motif-containing protein 5 (*TRIM5*), 2'-5'-oligoadenylate synthetase-2 (*OAS2*), protein kinases R (*PKR*) of mice lung tissue were detected by q-PCR. The content of desaminotyrosine (DAT) in feces was detected by HPLC/MS, and the serum IFN- α , IFN- β levels were detected by ELISA. The expression levels of retinoic acid inducible gene I (*RIG-I*), mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS), *MX1* and *OAS1* were detected by immunohistochemistry, immunofluorescence and Western blotting. **Results** Compared with the model group, the efficacy of Qingfei Jiedu Granules group was obvious, that is, the pathological injury of lung tissue was significantly improved, and the levels of RSV virus and inflammatory factors were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with Qingfei Jiedu Granules group, the efficacy of antibiotic + Qingfei Jiedu Granules group was weakened ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, levels of *RIG-I*, *MAVS*, *IFN- α* , *IFN- β* , *MX1*, *MX2*, *OAS1*, *OAS2*, *ISG15*, *TRIM5*, *PKR* in Qingfei Jiedu Granules group were increased ($P < 0.01$). Compared with Qingfei Jiedu Granules group, the expression levels of *MX1*, *MX2*, *OAS1*, *OAS2*, *ISG15*, *TRIM5* and *PKR* in antibiotic + Qingfei Jiedu Granules group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the DAT content in Qingfei Jiedu Granules group was significantly increased ($P < 0.01$), while the DAT content in antibiotic + Qingfei Jiedu Granules group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Qingfei Jiedu Granules may activate the innate immune antiviral response by regulating *RIG-I*/MAVS/*IFN* signaling pathway, and exert anti-RSV effect, while clearing intestinal flora affects its efficacy.

Key words: Qingfei Jiedu Granules; intestinal bacteria; desaminotyrosine; respiratory syncytial virus; innate immunity; vitexin; isorhamnetin; quercetin; kaempferol; genkwanin; apigenin

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是呼吸系统疾病中最常见的病原体之一, 是 1 种包含 10 个基因编码、11 种蛋白质的单链 RNA 病毒, 属于肺病毒科正肺病毒属^[1]。流行病学研究显示, RSV 是全球儿童下呼吸道感染和死亡的主要原因, 可导致每年近 3 300 万名 5 岁以下儿童罹患下呼吸道感染, 其中超过 10 万例患儿死亡^[2-3]。西医针对 RSV 肺炎的治疗措施较为有限, 目前没有特效的、能够大范围应用的药物被推荐用于抗 RSV 治疗, 使得寻求替代药物治疗迫在眉睫^[4-5]。

清肺解毒颗粒是 1 种黄酮类化合物的组分颗粒混合物, 是中医药“复方-有效部位-有效成分”3 阶段研究的产物。研究表明其有显著的抗 RSV 效应^[6], 但其作用机制并未完全清楚, 需进一步研究。

固有免疫是机体抗病毒的首道生理防线, 其可依靠胞质 RNA 感受器视黄酸诱导基因 I (retinoic acid inducible gene I, *RIG-I*) 来识别 RSV 病毒, 并触发线粒体抗病毒信号蛋白 (mitochondrial antiviral

signaling protein, MAVS) 活化, 最终导致 I 型干扰素 (type I interferon, I-IFN) 的分泌。I-IFN 通过结合 IFN- α/β 受体 (interferon- α/β receptor, IFNAR) 的方式, 可促使大量抗病毒蛋白基因, 干扰素刺激基因 (interferon stimulated genes, ISGs) 的转录, 包括人 I 型黏病毒对抗蛋白 (myxovirus resistance proteins I, *MX1*)、*MX2*、干扰素刺激基因 15 (interferon stimulated gene 15, *ISG15*)、三重基序蛋白 5 (tripartite motif-containing protein 5, *TRIM5*)、2'-5' 寡聚腺苷酸合成酶 -1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase-1, *OAS1*)、*OAS2*、蛋白激酶 R (protein kinases R, *PKR*) 等, 在抗病毒的过程中, 通过抑制 RSV 吸附、入胞、组装、出芽等, 从而发挥抗病毒效应^[7]。但 RSV 具有免疫逃逸机制, 通过抑制固有免疫抗病毒反应, 从而保全复制自身^[8-9]。如何加强机体固有免疫抗病毒效应, 是发掘潜在抗 RSV 药物的可供选择路径之一。

肠道菌群在中医药抗病毒中有着不可忽视的作用, 研究表明肠道菌群可将黄酮类化合物降解为有机化合物对羟基苯丙酸 (desaminotyrosine,

DAT), 其能够活化 IFNAR, 增加 ISGs 的表达起到抗病毒效应^[10]。前期研究发现, 清肺解毒颗粒可能通过活化固有免疫反应发挥抗 RSV 效应^[6], 然而这一效应过程是否受肠道菌群降解黄酮类化合物的影响并未阐明。因此, 本研究探究清肺解毒颗粒经肠道菌群降解对其抗 RSV 的影响。

1 材料

1.1 病毒、细胞株与动物

SPF 级健康 BALB/c 雌性小鼠 40 只, 6~8 周龄, 购于上海杰思捷实验动物有限公司, 许可证号 SCXK(沪) 2018-0004, 适应性饲养于 (22±2) °C 环境下, 自由进食。本研究动物实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准通过 (批准号 IACUC-S202403103)。RSV 毒株由中科院武汉病毒研究所提供; 人喉表皮样癌 HEP-2 细胞 (批号 60246) 购自南京科佰生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

清肺解毒颗粒组分化合物及含量比例为牡荆素: 异鼠李素: 槲皮素: 山柰酚: 芫花素: 芹菜素=1: 1.16: 1.18: 2.24: 1.43: 3.76, 各组分化合物 (批号分别为 ST00340120、ST03200120、ST00230120、ST00450120、ST04150120、ST00410120) 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。甲硝唑、硫酸新霉素、万古霉素、氨苄青霉素 (批号分别为 M109874、N412785、V301569、A102050) 均购自上海阿拉丁生化科技有限公司; RIG-I、MX1、 β -actin 抗体 (批号 53275、222856、7018) 购自艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司; MAVS 抗体 (批号 4983S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; OAS1 抗体 (批号 14955-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; IFN- α/β ELISA 试剂盒 (批号 F10640) 购自上海西唐生物科技有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (批号 1051835640001)、逆转录试剂盒 (批号 1051844928001) 购自江苏爱必梦生物科技有限公司; DEPC 水 (批号 t681178)、苏木素-伊红染色液 (批号 C0105) 购自南京碧云天生物技术有限公司提供; DMEM 细胞培养基 (批号 210313) 购自苏州沃美生物有限公司; PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

1.3 仪器

MCO175 型 CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司); Multiskan skyHigh 型酶标仪 (美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); PowerPac Basic 型电泳仪 (美国伯乐公司); LightCycler480 型荧光定量 PCR 分析仪 (瑞士 Roche 公司); TS2 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); AB Sciex 4500 型 LC/MS/MS 质谱系统 (上海爱博才思分析仪器贸易有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

40 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为对照组、模型组、抗生素组、清肺解毒颗粒组、抗生素+清肺解毒颗粒组, 每组 8 只。四环抗生素溶液由甲硝唑 (1 g/L)、硫酸新霉素 (0.5 g/L)、万古霉素 (1 g/L)、氨苄青霉素 (1 g/L) 组成。在进行 RSV 造模前, 抗生素组、抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 ig 四环抗生素溶液 (0.15 mL) 4 周, 1 次/d, 广泛清除小鼠肠道菌, 构建伪无菌肠道菌表型小鼠^[10]。对照组小鼠给予 DMEM 培养基, 其余各组小鼠 RSV (5 mL/kg) 滴鼻, 12 h/次, 共 2 次。清肺解毒颗粒组、抗生素+清肺解毒颗粒组 ig 清肺解毒颗粒混悬液 (120 mg/kg), 其余各组 ig 等体积羧甲基纤维素钠, 1 次/d, 连续给药 3 d。药物剂量依据前期实验结果设定^[6], 治疗 3 d 后, 麻醉处死小鼠。

2.2 肺组织病理切片观察及评分

收集各组小鼠肺小叶, 经 4% 多聚甲醛溶液固定、脱水石蜡包埋、制片、HE 染色, 在光学显微镜下观察。根据肺组织的实变性变化、肺泡壁增厚、淋巴细胞浸润 3 方面进行评分, 评分标准^[11]: 正常 0 分, 轻度损伤 1 分、中度损伤 2 分、重度损伤 3 分。

2.3 病毒滴度检测

采用组织培养感染剂量法 (tissue culture infectious dose, TCID) 测定肺组织中的病毒滴度。对肺组织进行匀浆后, 经过离心、滤过收集上清液, 对上清液进行 10 个体积浓度梯度稀释, 分别给予 HEP-2 细胞, 在显微镜下观察细胞病变, 采用两氏法^[12]计算病毒液的半数组织培养感染剂量 (50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀)。

2.4 荧光定量 PCR 检测基因转录及特定菌的 DNA 水平

肺组织进行研磨、离心等操作, 提取肺组织总 RNA, 利用蛋白核酸分析仪对 RNA 进行纯度与含量的测定。以 GAPDH 为参照基因, SYBR Green

荧光法检测相关基因 mRNA 表达水平, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
RSV-F	F: CGAGCCAGAAGAGAACTACCAAGG R: TGGCGATTGCAGATCCAACACC
RSV-G	F: CGGCAAAACCACAAAGTCACA R: TTCTTGATCTGGCTTGTTGCA
RSV-NS1	F: ATCCAATTTCAACAATGCCAGTG R: TGTCTCTATTAGGCCATTAGGTTGAG
MX2	F: GAGGAGGAAGCTGAGGAGGAGAAG R: GATGCGGTTGTGAGCCTCTTGG
ISG15	F: CGATTCCTGGTGTCCTGACTAAC R: TAAGACCGTCTGGAGCACTGC
TRIM5	F: ACCATCGCCAGGGAACAAAGAAAG R: GTTGAGCCTCTGTGACCTCTTGC
OAS2	F: TCCTCTACGTCCTCAATGAGAATCC R: GTGTGGTGAAGCAGTCTGAGAAC
IL-1 β	F: TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG R: AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
IL-6	F: CTCCCAACAGACCTGTCTATAC R: CCATTGCACAACCTCTTTCTCA
TNF- α	F: CACGCTCTTCTGTCTACTGAACCTC R: CTTGGTGGTTTGTGAGTGTGAGG
PKR	F: ATTGGCTTAGGTGGATTGGTCAAG R: TACTTCGTGCTCCGCCTTCTC
<i>Clostridium orbiscindens</i>	F: GCACAAGCGGTGGAGT R: CTTCTCCGTTTGTCAA
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

根据文献报道^[10], 给药 4 周四联抗生素溶液能够成功构建伪无肠道菌表型小鼠。为了明确模型构建的可靠性, 在给予抗生素前后分别收集小鼠粪便, 并选择肠道菌中的 1 种梭状芽孢杆菌 (*Clostridium orbiscindens*) 进行其 DNA 的定量分析。

2.5 ELISA 法检测相关蛋白表达水平

根据 ELISA 试剂盒说明书, 分别加入标准品或样本品 100 μ L 封板后进行孵育。之后进行一抗、抗体工作液、底物工作液反应, 终止反应后于 450 nm 处测各孔吸光度 (A) 值。

2.6 HPLC-MS 法检测小鼠粪便中对羟基苯丙酸含量

2.6.1 样本制备 精密称取对照品, 加超纯水溶解定容制成对照品母液 (1 μ g/mL), 经衍生过程绘制标准曲线。称取 0.1 g 样品, 加入 1 mL 60%乙腈水溶液, 振荡 1 min, 低温匀浆 300 s, 10 000 r/min 低温离心 15 min, 取上清进行衍生处理。

2.6.2 色谱条件 Agilent Poroshell 120EC-C₁₈ 色谱柱

(50 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μ m); 流动相为 0.05%甲酸水溶液 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 20%~80% B;进样体积 10 μ L; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.6.3 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI) 分别在正、负离子模式下进行检测, 雾化气压力 50 psi (1 psi=6.895 kPa), 加热气压力 50 psi, 气帘气压力 35 psi, 加热气温度 450 $^{\circ}$ C。

2.7 免疫组织化学法检测相关蛋白表达水平

取小鼠肺组织切片进行脱蜡水化、抗原修复、BSA 封闭、一抗、二抗孵育后, 辣根过氧化氢酶显色、复染、脱水封片, 于在显微镜下观察。使用 Image-Pro Plus 6.0 软件, 以平均累计光密度值作为免疫组织化学结果。

2.8 免疫荧光检测相关蛋白表达水平

取小鼠肺组织切片进行脱蜡水化、抗原修复、BSA 封闭、一抗、二抗孵育。DAPI 复染细胞核, 加入荧光淬灭剂, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 于荧光显微镜下观察, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析荧光强度值。

2.9 Western blotting 法检测蛋白表达水平

用裂解液裂解各组小鼠肺组织, 提取总蛋白, BCA 法测定浓度。调整蛋白样品浓度与上样缓冲液混匀, 沸水浴加热变性, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 在质量浓度为 5%脱脂奶粉中封闭 1 h, TBST 洗膜后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后, 采用 ECL 化学发光, 以 β -actin 为内参, 使用 Image-J 分析软件分析蛋白相对表达水平。

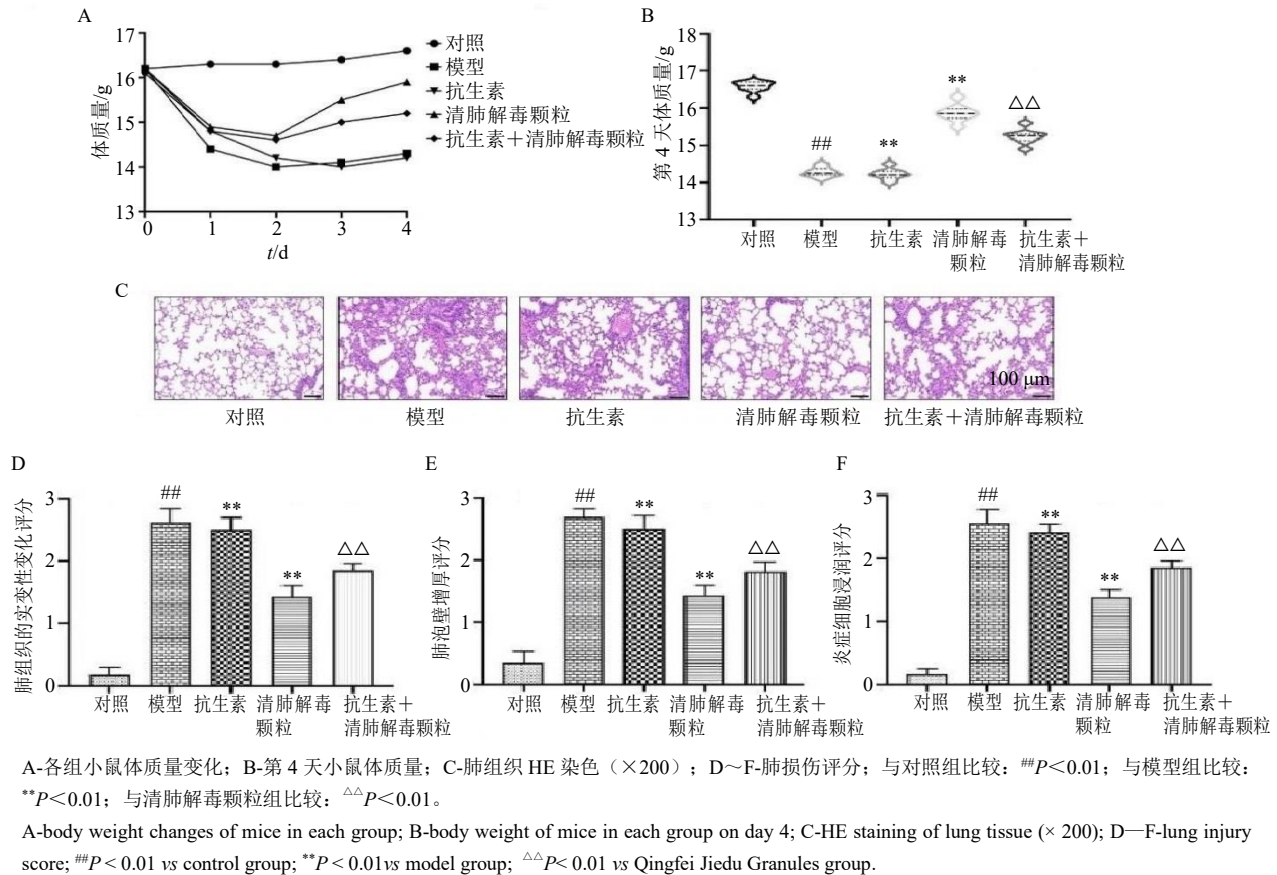
2.10 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析, 所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较, 若服从正态性和方差齐性, 使用单因素方差分析; 若不服从正态性或方差齐性, 使用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。

3 结果

3.1 伪无肠道菌表型的确证及对小鼠体质量及肺损伤的影响

梭状芽孢杆菌 (*Clostridium orbiscindens*) DNA 荧光定量 PCR 分析结果显示, 四联抗生素给药前, 抗生素组、抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠粪便中 DNA 拷贝数为 $5\,503.68 \pm 640.47$, 四联抗生



素给药后,拷贝数为 22.49 ± 6.65 ,表明经 4 周的四联抗生素给药,能够成功构建伪无肠道菌表型小鼠。如图 1-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠体质量下降;与模型组比较,给予清肺解毒颗粒治疗后,小鼠体质量下降趋势显著减缓。与清肺解毒颗粒组比较,抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠体质量显著下降 ($P < 0.01$)。如图 1-C~F 所示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织病理损伤严重,肺实变、肺泡壁增厚、炎性细胞浸润明显,病理损伤评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,给予清肺解毒颗粒治疗后,小鼠肺组织病理损伤显著减轻、病理损伤评分降低 ($P < 0.01$);与清肺解毒颗粒组比较,抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠肺组织病理损伤加重、病理损伤评分升高 ($P < 0.01$)。

3.2 对病毒水平及炎症水平的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠肺组织中病毒滴度及 *RSV-F*、*RSV-G*、*RSV-NSI* 转录水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,清肺解毒颗粒组小鼠肺组织中病毒滴度及 *RSV-F*、*RSV-G*、*RSV-*

NSI 转录水平显著降低 ($P < 0.01$);与清肺解毒颗粒组比较,抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠肺组织中病毒滴度及 *RSV-F*、*RSV-G*、*RSV-NSI* 转录水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组比较,模型组小鼠炎性因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,清肺解毒颗粒组小鼠炎性因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 水平显著降低 ($P < 0.01$);与清肺解毒颗粒组比较,抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠炎性因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 水平升高 ($P < 0.01$)。以上结果表明,清肺解毒颗粒能够抑制病毒水平,具有抗炎作用,而肠道菌的清除干扰了其药效的发挥。

3.3 对 DAT、IFN- α 及 IFN- β 水平的影响

如表 3 所示,与模型组比较,清肺解毒颗粒组小鼠 DAT 含量显著增加 ($P < 0.01$);与清肺解毒颗粒组比较,抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 DAT 含量显著减少 ($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组小鼠 IFN- α 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,清肺解毒颗粒组 IFN- α 含量显著升高 ($P < 0.01$),表明清肺解毒颗粒具有 RSV 抑制 IFN- α 分泌的逆转

表 2 清肺解毒颗粒对病毒及炎症水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of Qingfei Jiedu Granules on virus and inflammation levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	病毒滴度/ (lgTCID ₅₀ /0.1 kg)	mRNA 水平					
		RSV-F	RSV-G	RSV-NS1	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照	0.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	5.39±0.36 ^{##}	50.62±15.54 ^{##}	26.30±3.47 ^{##}	3.50±0.90 ^{##}	7.58±0.29 ^{##}	12.07±0.23 ^{##}	9.30±0.82 ^{##}
抗生素	5.25±0.25	50.49±4.95	30.19±1.22	4.10±0.97	7.57±0.38	13.32±0.56	9.76±0.92
清肺解毒颗粒	2.82±0.07 ^{**}	9.01±1.95 ^{**}	3.09±0.60 ^{**}	1.62±0.26 ^{**}	3.52±0.43 ^{**}	6.41±0.83 ^{**}	3.48±0.44 ^{**}
抗生素+清肺 解毒颗粒	4.02±0.34 ^{△△}	29.90±6.34 [△]	12.43±1.32 ^{△△}	1.99±0.04	6.04±0.30 ^{△△}	9.10±0.91 ^{△△}	5.92±0.25 ^{△△}

与对照组比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{**}*P*<0.01; 与清肺解毒颗粒组比较: [△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01, 下表同。
[#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{**}*P*<0.01vs model group; [△]*P*<0.05 ^{△△}*P*<0.01 vs Qingfei Jiedu Granules group, same as bellow tables.

表 3 清肺解毒颗粒对 DAT、IFN-α、IFN-β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of Qingfei Jiedu Granules on DAT, IFN-α, IFN-β levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	DAT/(μg·g ⁻¹)	IFN-α/(ng·L ⁻¹)	IFN-β/(ng·L ⁻¹)	IFN-α mRNA 水平	IFN-β mRNA 水平
对照	10.53±2.21	28.42±2.63	11.97±4.15	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	10.02±2.86	158.61±67.99 ^{##}	22.18±0.97	2.87±0.60 ^{##}	1.39±0.13 [#]
抗生素	9.05±1.12	40.93±2.15	13.68±8.74	2.54±0.57	1.13±0.07
清肺解毒颗粒	17.67±2.58 ^{**}	677.27±41.42 ^{**}	49.18±24.87	5.25±0.73 ^{**}	2.67±0.31 ^{**}
抗生素+清肺解毒颗粒	11.78±2.80 [△]	91.52±13.54 ^{△△}	7.34±2.55 ^{△△}	3.77±0.22 [△]	1.86±0.15 ^{△△}

效应; 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 IFN-α、IFN-β 含量显著降低 (*P*<0.01)。与对照组比较, 模型组小鼠 IFN-α、IFN-β mRNA 水平显著升高 (*P*<0.05、0.01); 与模型组比较, 清肺解毒颗粒组 IFN-α、IFN-β mRNA 水平显著升高 (*P*<0.01); 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠 IFN-α、IFN-β mRNA 水平显著降低 (*P*<0.05、0.01)。以上结果表明, 清肺解毒颗粒能够有效增加 IFN-α、IFN-β 的表达水平, 而肠道菌的清除干扰了其药效的发挥。

3.4 对 RIG-I、MAVS 水平的影响

如图 2~4 及表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织中 RIG-I、MAVS 表达显著升高 (*P*<0.01); 与模型组比较, 清肺解毒颗粒组肺组织中 RIG-I、MAVS 表达显著升高 (*P*<0.01); 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠肺组织中 RIG-I、MAVS 表达并无明显差异。

3.5 对干扰素刺激基因 ISGs 水平的影响

为进一步探究肠道菌破坏导致抗病毒差异的可能机制, 检测了固有免疫抗病毒反应中一系列的 ISGs 抗病毒蛋白, 包括 MX1、MX2、OAS1、

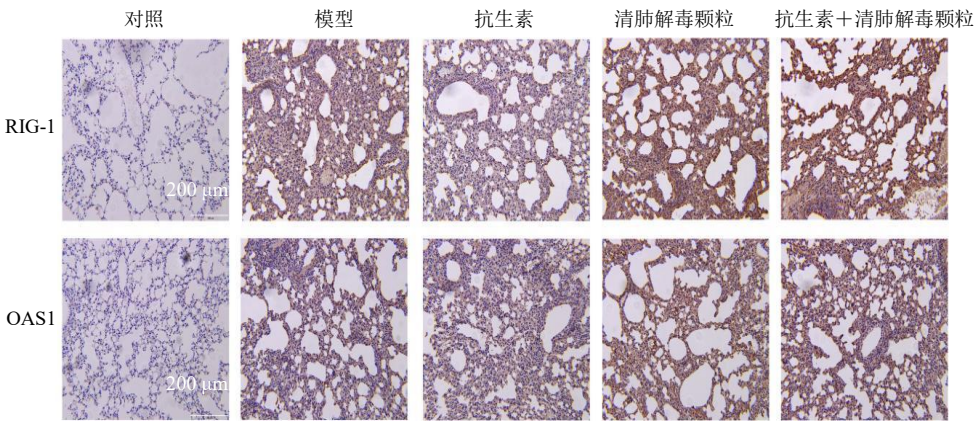


图 2 清肺解毒颗粒对 RIG-I、OAS1 水平的影响 (×200)

Fig. 2 Effects of Qingfei Jiedu Granules on RIG-I and OAS1 levels (× 200)

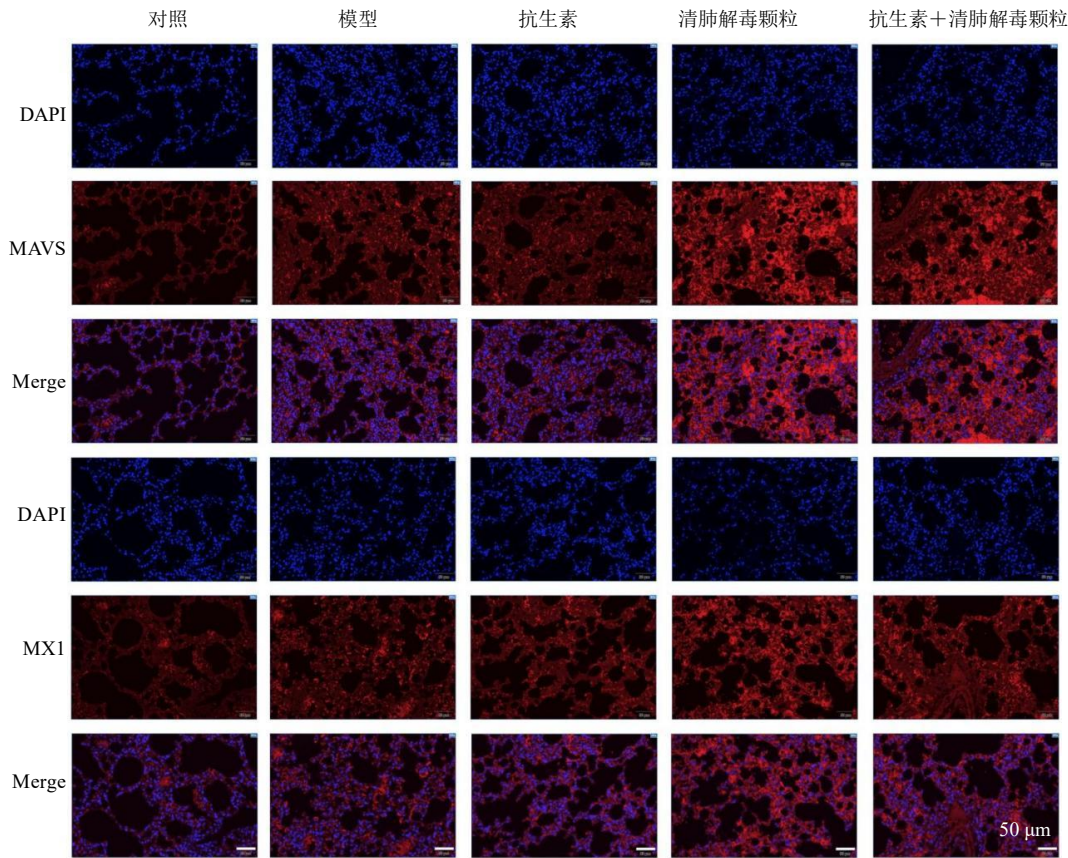


图 3 清肺解毒颗粒对 MAVS、MX1 水平的影响

Fig. 3 Effects of Qingfei Jiedu Granules on MAVS and MX1 levels

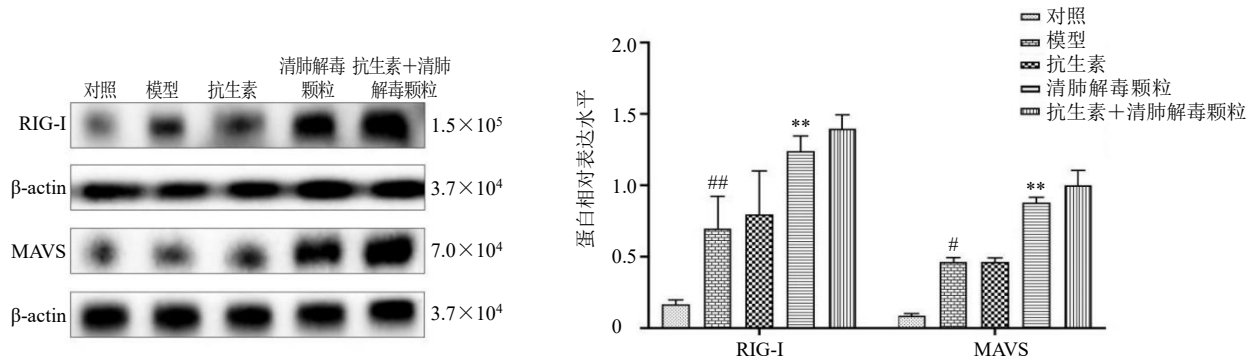


图 4 清肺解毒颗粒对 RIG-I、MAVS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of Qingfei Jiedu Granules on RIG-I and MAVS levels ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 4 清肺解毒颗粒对 RIG-I、MAVS、MX1、OAS1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of Qingfei Jiedu Granules on RIG-I, MAVS, MX1 and OAS1 levels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	RIG-I	MAVS	MX1	OAS-1
对照	6.35±0.89	6.93±1.63	7.92±1.11	4.85±1.37
模型	37.60±2.39 ^{##}	38.64±7.69 ^{##}	19.08±1.47 ^{##}	19.28±1.52 ^{##}
抗生素	28.77±5.14	34.38±3.08	21.30±1.09	17.35±2.42
清肺解毒颗粒	54.98±2.76 ^{**}	91.13±4.64 ^{**}	51.52±4.43 ^{**}	42.68±1.70 ^{**}
抗生素+清肺解毒颗粒	51.40±2.82	90.85±4.83	30.65±1.77 ^{△△}	31.08±2.58 ^{△△}

OAS2、ISG15 及 TRIM5。如图 5 和表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 MX1、OAS1 表达显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，清肺解毒颗粒组肺组织中 MX1、OAS1 表达显著升高 ($P<0.01$)；与清肺解毒颗粒组比较，抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠肺组织中 MX1、OAS1 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

进一步检测了 MX2、ISG15、TRIM5、OAS2、PKR 的转录水平，结果 (表 5) 表明，与对照组比较，模型组小鼠肺组织中 MX2、ISG15、OAS2 mRNA 表达显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，清肺解毒颗粒组肺组织中 MX2、ISG15、TRIM5、OAS2、PKR mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$)；与清肺解毒颗粒组比较，抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠肺组织中 MX2、ISG15、TRIM5、OAS2、PKR mRNA 表达水平下降 ($P<0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

肠道菌群主要是由细菌等大量微生物定植于机体肠道的微生物群落，研究表明肠道菌群在宿主的新陈代谢、免疫稳态调控中有着至关重要的作用^[13]。在应对病毒侵袭的过程中，肠道菌群可以不依赖病毒与宿主细胞的直接反应，而直接启动 I-IFN 系统的活化，从而发挥抗病毒效应^[14]。此外，肠道菌群还可产生一系列能够进入体循环的代谢产物，

如 DAT^[15]。研究发现，肠道菌能够代谢天然活性产物中的黄酮类化合物，从而产生 DAT，对机体的固有免疫系统产生调控效应，这与黄酮类化合物具有免疫调节效应相佐证^[16]。

本研究结果显示，清肺解毒颗粒能够起到抗 RSV 效应，即抑制 RSV 的复制从而改善肺损伤，同时抑制炎症因子水平，但清除肠道菌后该效应被显著抑制，说明肠道菌在清肺解毒颗粒抗 RSV 过程中有着至关重要的作用。此外，清肺解毒颗粒能增加 RIG-I、MAVS、IFN- α 、IFN- β 、MX1、OAS1、MX2、ISG15、OAS2、TRIM5、PKR 等基因水平，但在清除肠道菌后，IFN- α 、IFN- β 上游 RIG-I、MAVS 水平不受影响，下游 MX1、OAS1、MX2、ISG15、OAS2、TRIM5、PKR 受到显著影响，说明肠道菌对于清肺解毒颗粒抗 RSV 的干扰效应主要作用在 IFN- α 、IFN- β 下游基因。HPLC-MS 结果显示，与模型组比较，清肺解毒颗粒组 DAT 含量显著增加，而抗生素+清肺解毒颗粒组小鼠的 DAT 含量相较于清肺解毒颗粒组明显减少。这与之前的报道结果一致^[15]，即肠道菌的效应主要是降解黄酮类化合物产生 DAT，DAT 作用于 IFNAR 从而使得下游的 MX1、OAS1、MX2、ISG15、OAS2、TRIM5、PKR 等 ISGs 水平升高，从而发挥抗病毒效应 (图 6)。

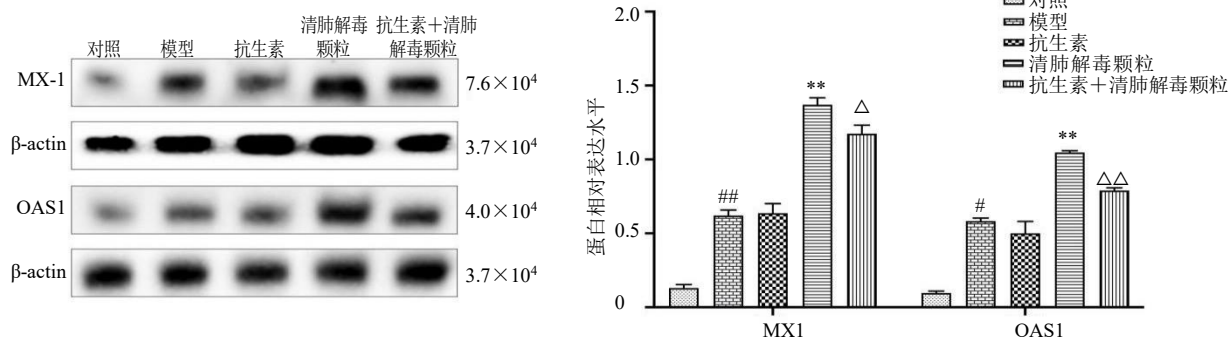


图 5 清肺解毒颗粒对 MX-1、OAS1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of Qingfei Jiedu Granules on MX-1 and OAS1 levels ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表 5 清肺解毒颗粒对 ISGs 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Effects of Qingfei Jiedu Granules on ISGs levels ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	mRNA水平				
	MX2	ISG15	TRIM5	OAS2	PKR
对照	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	2.12±0.14##	1.37±0.04#	1.74±0.18	4.03±0.56##	1.46±0.14
抗生素	2.00±0.26	1.13±0.09	1.67±0.48	3.56±1.06	1.42±0.07
清肺解毒颗粒	3.52±0.45**	3.07±0.24**	13.55±1.59**	7.86±0.53**	4.53±0.57**
抗生素+清肺解毒颗粒	2.80±0.06Δ	1.82±0.14ΔΔ	7.34±0.68ΔΔ	5.72±0.38Δ	3.43±0.40ΔΔ

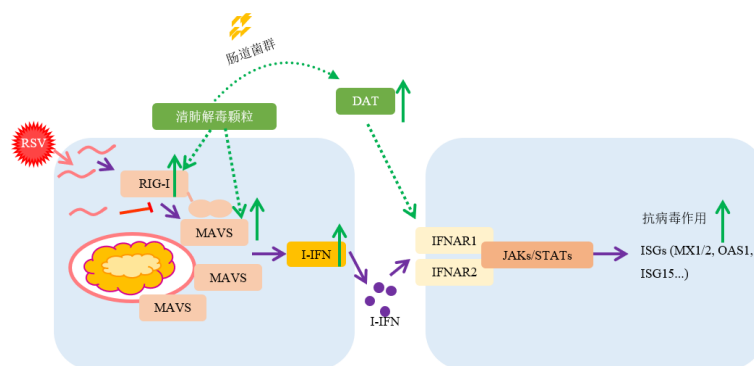


图 6 清肺解毒颗粒潜在效应机制

Fig. 6 Potential effect mechanism of Qingfei Jiedu Granules

值得注意的是, 本研究发现抗生素组仍能检测到 DAT, 说明产生 DAT 的途径可能不止目前所认识的单一线路。此外, 与清肺解毒颗粒组比较, 抗生素+清肺解毒颗粒组的 IFN- α 、IFN- β 含量降低, 这与已知的机制结果不同, 有待更深入探究。

综上, 本研究证明了清肺解毒颗粒可通过激活 RIG-I/MAVS/I-IFN 信号通路发挥抗 RSV 作用, 其药效的发挥受到肠道菌作用的影响。本研究结果对为深层次理解清肺解毒颗粒作用机制及中医药抗病毒机制研究提供了可供参考的研究思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Savic M, Penders Y, Shi T, *et al.* Respiratory syncytial virus disease burden in adults aged 60 years and older in high-income countries: A systematic literature review and meta-analysis [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2023, 17(1): e13031.
- [2] Carbonell-Estrany X, Simões E A, Bont L J, *et al.* Prioritising respiratory syncytial virus prevention in low-income and middle-income countries [J]. *Lancet Glob Health*, 2023, 11(5): e655-e657.
- [3] Li Y, Wang X, Blau D M, *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: A systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399(10340): 2047-2064.
- [4] Hu Z W, Lin J H, Chen J T, *et al.* Overview of viral pneumonia associated with influenza virus, respiratory syncytial virus, and coronavirus, and therapeutics based on natural products of medicinal plants [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 630834.
- [5] Zohar T, Hsiao J C, Mehta N, *et al.* Upper and lower respiratory tract correlates of protection against respiratory syncytial virus following vaccination of nonhuman Primates [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(1): 41-52.
- [6] 孙亚磊, 高静, 苏凯奇, 等. 清肺解毒颗粒调控I型干扰素通路抗 RSV 效应的机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(5): 2564-2568.
- [7] Schneider W M, Chevillotte M D, Rice C M. Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 513-545.
- [8] Ouyang Y, Liao H Q, Hu Y, *et al.* Innate immune evasion by human respiratory syncytial virus [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 865592.
- [9] van Royen T, Rossey I, Sedeyn K, *et al.* How RSV proteins join forces to overcome the host innate immune response [J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 419.
- [10] Steed A L, Christophi G P, Kaiko G E, *et al.* The microbial metabolite desaminotyrosine protects from influenza through type I interferon [J]. *Science*, 2017, 357(6350): 498-502.
- [11] Shen C, Zhang Z, Xie T, *et al.* Rhein suppresses lung inflammatory injury induced by human respiratory syncytial virus through inhibiting NLRP3 inflammasome activation via NF- κ B pathway in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10:1600.
- [12] Xiong R, Fu R, Wu Y, *et al.* Long-term infection and pathogenesis in a novel mouse model of human respiratory syncytial virus [J]. *Viruses*, 2022, 14(8):1740.
- [13] Spindler M P, Siu S, Mogno I, *et al.* Human gut microbiota stimulate defined innate immune responses that vary from Phylum to strain [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(10): 1481-1498.
- [14] Erttmann S F, Swacha P, Aung K M, *et al.* The gut microbiota prime systemic antiviral immunity via the cGAS-STING-IFN-I axis [J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 847-861.
- [15] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [16] Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, *et al.* The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17(7): 2396-2418.

[责任编辑 罗 曦]