

DOI:10.13350/j.cjpb.230102

· 论著 ·

天麻素抑制 Notch/NF- $\kappa$ B 信号通路对呼吸道合胞病毒感染大鼠的肺组织损伤及 Th17/Treg 细胞平衡的影响冷晓雪<sup>1</sup>, 李柏新<sup>2\*</sup>, 陈之光<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属盛京医院急诊科, 辽宁沈阳 110100; 2. 中国医科大学附属盛京医院康复中心)

**【摘要】** 目的 探讨天麻素(Gas)对呼吸道合胞病毒(RSV)感染肺炎大鼠肺组织的保护机制及对 Th17/Treg 细胞平衡的影响。方法 将 Wistar 雄性大鼠 60 只分为对照组(C组)、模型组(M组)、Gas 低剂量组(Gas-L, 5 mg/kg)、Gas 中剂量组(Gas-M, 10 mg/kg)、Gas 高剂量组(Gas-H, 20 mg/kg)、阳性组(0.15 g/kg 利巴韦林), 每组 10 只。药物干预结束后, 称定大鼠体质量和肺组织干湿重, 计算肺指数和肺组织 W/D 值; 取肺组织作 HE 染色检查并进行损伤评分; qRT-PCR 检测肺组织 RSV 病毒载量; 流式细胞术检测脾组织 Th17、Treg 细胞比例; ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A、TGF- $\beta$  含量; Western blot 检测肺组织 Notch/NF- $\kappa$ B 通路蛋白表达。结果 与 C 组相比, M 组肺组织出现中性粒细胞浸润, 肺泡破裂连片等病变, 肺指数、W/D 值、肺损伤评分、RSV 病毒载量、Th17 细胞比例、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 水平、Notch-1、Hes-1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白均显著升高(均  $P < 0.05$ ), Treg 细胞比例和 TGF- $\beta$  水平均显著下降(均  $P < 0.05$ )。Gas-M、H 组和阳性组肺损伤程度显著改善, 肺指数、W/D 值、肺损伤评分、RSV 病毒载量、Th17 细胞比例、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 及 Notch-1、Hes-1、p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平均显著下降(均  $P < 0.05$ ), Treg 细胞比例和 TGF- $\beta$  水平显著上升(均  $P < 0.05$ )。结论 Gas 具有减轻 RSV 感染肺炎大鼠的肺组织炎症损伤和维持 Th17/Treg 细胞平衡的作用, 可能通过抑制 Notch/NF- $\kappa$ B 信号通路实现。

**【关键词】** 天麻素; 呼吸道合胞病毒; 肺损伤; Notch/NF- $\kappa$ B 信号通路; Th17/Treg 细胞平衡

**【中图分类号】** R373

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)01-0006-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):6-11.]

**Influences of gastrodin on lung tissue damage and Th17/Treg balance in respiratory syncytial virus-infected rats by inhibiting Notch/NF- $\kappa$ B signaling pathway**

LENG Xiao-xue<sup>1</sup>, LI Bai-xin<sup>2</sup>, CHEN Zhi-guang<sup>1</sup> (1. Department of Emergency, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110100, China; 2. Rehabilitation Center, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University) \*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective mechanism of gastrodin (Gas) on lung tissue of rats with respiratory syncytial virus (RSV)-infected pneumonia and its influence on Th17/Treg cell balance. **Methods** Sixty Wistar male rats were grouped into control group (C group), model group (M group), Gas low-dose group (Gas-L, 5 mg/kg), Gas medium-dose group (Gas-M, 10 mg/kg), Gas high-dose group (Gas-H, 20 mg/kg), and positive group (0.15 g/kg ribavirin), 10 in each group. After the drug intervention, the body weight and the dry and wet weight of the lung tissue were weighed, and the lung index and the W/D value of the lung tissue were calculated; lung tissue was stained with HE and scored for damage; qRT-PCR was applied to detect RSV viral load in lung tissue; flow cytometry was applied to detect the proportions of Th17 and Treg cells in spleen tissue; ELISA method was applied to detect serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ ; Western Blot was applied to detect Notch/NF- $\kappa$ B pathway protein expression in lung tissue.

**Results** Compared with group C, the lung tissue of M group showed neutrophil infiltration, alveolar rupture and contiguous lesions, the lung index, W/D value, lung injury score, RSV viral load, the proportion of Th17 cells, levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, and the protein levels of Notch-1, Hes-1, and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the proportion of Treg cells and the level of TGF- $\beta$  decreased obviously ( $P < 0.05$ ). The degree of lung injury in the Gas-M, H groups and the positive group was obviously improved, the lung index, W/D value, lung injury score, RSV viral load, the proportion of Th17 cells, levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, and the protein levels of Notch-1, Hes-1, and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 decreased obviously ( $P < 0.05$ ), and the proportion of Treg cells and the level of

\* **【通讯作者】** 李柏新, E-mail: liboxin8880@163.com

**【作者简介】** 冷晓雪(1984-), 女, 吉林磐石人, 大专, 护师, 主要从事呼吸机相关肺炎, 感染, 脓毒症等方面的研究。  
E-mail: lengxiaoxue8886@163.com

TGF- $\beta$  increased obviously ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Gas can reduce the inflammatory injury of lung tissue and maintain the balance of Th17/Treg cells in RSV-infected pneumonia rats, which may be achieved by inhibiting Notch/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Key words】** gastrodin; respiratory syncytial virus; lung injury; Notch/NF- $\kappa$ B signaling pathway; Th17/Treg cell balance

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是下呼吸道易感常见病原体之一,婴幼儿容易感染该病毒导致支气管哮喘的发生<sup>[1-2]</sup>。目前临床针对感染 RSV 病人的治疗主要为帕利珠单抗和利巴韦林,前者经济代价高,在临床尚不能普及,后者毒副作用大,主要推荐用于重症婴幼儿<sup>[3]</sup>。天麻素(Gastrodin, Gas)是药用植物天麻中主要的酚类成分<sup>[4]</sup>,具有抗氧化应激、抗炎、保护神经系统等作用<sup>[5]</sup>。Notch 信号通路在一些疾病的病理病程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>,有研究发现 Notch 蛋白的上调可激活核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),导致炎性细胞因子的释放,加剧炎症反应<sup>[7]</sup>。Gas 可抑制 Notch 信号通路相关蛋白的表达,对机体发挥保护作用,降低疾病造成的损伤<sup>[8]</sup>。本研究建立 RSV 感染大鼠模型,从 Notch/NF- $\kappa$ B 信号通路出发,探讨 Gas 对 RSV 大鼠肺损伤的保护作用及其对机体 Th17/Treg 细胞平衡的调控机制。

## 材料与方 法

### 1 材 料

**1.1 实验动物和毒株** Wistar 雄性大鼠 6 周龄 60 只,体质量 190~210 g,购自广州锐格生物科技有限公司(许可证号:SCXK(粤)2021-0059)。所有大鼠均饲养于本院动物实验中心,适应性喂养 1 周检查无异常后用于实验。RSV Long 株,购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

**1.2 主要试剂与仪器** 天麻素(HPLC $\geq$ 98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;利巴韦林注射液(1 mL/100 mg)购自国药集团容生制药有限公司;白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自上海科艾博生物技术有限公司;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒购自上海麦克林生化科技有限公司;p-NF- $\kappa$ B p65 抗体、NF- $\kappa$ Bp65 抗体、Notch 抗体、兔抗 $\beta$ -actin 购自艾柏森(北京)生物科技有限公司。冷冻离心机购自德国艾本德股份公司。PCR 仪, qRT-PCR 仪及全自动酶标仪和流式细胞仪均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;光学显微镜购自日本奥林巴斯公司(Olympus Corporation)。

### 2 方 法

**2.1 动物分组与造模** 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组(C 组)、模型组(M 组)、Gas 低剂量组(Gas-L, 5 mg/kg)、Gas 中剂量组(Gas-M, 10 mg/kg)、Gas 高剂量组(Gas-H, 20 mg/kg)、阳性组(0.15 g/kg 利巴韦林),每组 10 只。除 C 组大鼠外,其余各组大鼠均用戊巴比妥麻醉,经鼻腔滴入 RSV Long 毒株,每只大鼠感染量为 0.1 mL。C 组大鼠同时滴入同体积无菌 0.9% 的氯化钠溶液,病毒接种持续 3d。造模成功后,C 和 M 组按照 10 g/kg 体重腹腔注射生理盐水,Gas 各组<sup>[9]</sup>分别按照低、中、高腹腔注射给予对应剂量的药物,阳性组腹腔注射利巴韦林 0.15 g/kg<sup>[10]</sup>,1 次/d,连续给药 7 d。

**2.2 血清炎症因子检测** 给药干预 7 d 后麻醉大鼠,取颈动脉血,分离血清,采用 ELISA 法检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17A、TGF- $\beta$  水平,按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

**2.3 肺指数与肺组织湿/干比(W/D)测定** 给药干预 7 d 后麻醉并处死大鼠,处死前称定大鼠体质量,处死后无菌剥离完整肺组织并称重计算肺指数。肺指数=[肺湿重/体质量] $\times$ 100%。将左肺组织 80 $^{\circ}$ C 烘干 2 h,称干重,计算肺组织 W/D 值。右肺各叶保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱待测。

**2.4 肺组织 HE 染色检查及损伤评分** 将右肺上叶固定后乙醇脱水、石蜡包埋、切片(厚度 4  $\mu$ m),经过苏木素-伊红(HE)染色后光学显微镜下观察肺组织病理学变化,通过损伤评分评估肺操作程度。评分细则如表 1。肺损伤程度=[(20 $\times$ a)+(14 $\times$ b)+(7 $\times$ c)+(7 $\times$ d)+(2 $\times$ e)]/100。

表 1 肺损伤评分细则  
Table 1 Detailed rules for lung injury score

评分项 Scoring items	评分(分) Grade (points)		
	0	1	2
a 肺泡中性粒细胞	无	1-5 个	>5 个
b 肺泡周边中性粒细胞	无	1-5 个	>5 个
c 透明膜	无	1 个	>1 个
d 蛋白质碎片	无	1 个	>1 个
e 肺泡间隔增厚程度	<2 倍	2-4 倍	>4 倍

**2.5 qRT-PCR 检测** 肺组织 RSV 病毒载量取右肺中、下部分组织在液氮中研磨,加入 TRIzol 提取肺组

织总 RNA, 根据试剂盒配置扩增体系, 进行 qRT-PCR, 根据标准曲线计算病毒载量。

**2.6 Western Blot 检测肺组织中相关蛋白检测** 取右肺中、下部分组织研磨后加入裂解液, 提取蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后各组取 20 μg 蛋白上样, 经 12% SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入一抗 Notch、NF-κBp65、p-NF-κBp65、IκBα、pIκBα(1 : 1000 稀释) 和 β-actin(1 : 2000 稀释), 4 °C 孵育 12 h, 洗涤; 加入二抗(1 : 2000 稀释), 室温孵育 1 h, ECL 显影, 采用 Image J 软件进行蛋白表达分析。

**2.7 流式细胞术检测脾组织中 Th17、Treg 细胞比例** 麻醉处死大鼠后, 无菌完整分离脾组织, 制备单细胞悬液, 分离淋巴细胞, 调整浓度至 1 × 10<sup>7</sup>/mL 的细胞悬液。在流式管中加入 1 × 10<sup>6</sup> 个上述细胞, 于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养 6 h, 然后分别进行如下孵育操作。Th17 细胞: 加入 Anti-CD4-FITC, 4 °C 避光孵育 30 min; 固定破膜后, 加入 Permeabilization buffer 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; 加入 Anti-IL-17A-PE, 4 °C 避光孵育 30 min。每一步均需离心并重悬细胞。Treg 细胞: 加入 Anti-CD4-FITC、Anti-CD25-

APC, 4 °C 避光孵育 20 min; 固定破膜后, 加入 Permeabilization buffer 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min; 加入 Anti-FOXP3-PE, 4 °C 避光孵育 30 min。每一步均需离心并重悬细胞。孵育完成后, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞仪上机检测。CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> 为 Th17 细胞, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 为 Treg 细胞。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 进行数据分析。实验数据用平均数和标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 要求数据符合正态分布并且方差为齐性, 如不符合上述条件, 则采用非参数检验分析; 组间两两比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 Gas 对 RSV 大鼠血清炎症的影响

结果见表 2。与 C 组比较, M 组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17 水平显著上升, TGF-β 水平显著下降(均 P < 0.05); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性药物血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17 水平显著下降, TGF-β 水平显著上升(均 P < 0.05); Gas 低组与 M 组差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 2 各组大鼠血清炎症因子的水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 2 Comparison of serum inflammatory factors in rats of each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

分组 Groups	TNF-α(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	IL-6(ng/mg)	IL-17(pg/mL)	TGF-β(pg/mL)
C 组	120.36 ± 10.36	32.52 ± 6.21	3.18 ± 0.12	5.08 ± 0.36	432.18 ± 23.66
M 组	231.43 ± 16.25 <sup>a</sup>	112.36 ± 12.12 <sup>a</sup>	15.23 ± 1.26 <sup>a</sup>	35.16 ± 6.26 <sup>a</sup>	178.28 ± 26.14 <sup>a</sup>
阳性组	136.25 ± 13.45 <sup>b</sup>	50.49 ± 6.78 <sup>b</sup>	4.56 ± 0.23 <sup>b</sup>	9.78 ± 1.14 <sup>b</sup>	292.13 ± 21.69 <sup>b</sup>
Gas-L 组	223.47 ± 12.59 <sup>c</sup>	108.46 ± 10.35 <sup>c</sup>	14.89 ± 0.96 <sup>c</sup>	34.45 ± 5.28 <sup>c</sup>	186.46 ± 24.78 <sup>c</sup>
Gas-M 组	145.78 ± 11.96 <sup>b</sup>	61.12 ± 6.23 <sup>b</sup>	5.78 ± 0.56 <sup>b</sup>	10.52 ± 1.98 <sup>b</sup>	276.29 ± 20.36 <sup>b</sup>
Gas-H 组	174.02 ± 10.25 <sup>b,c</sup>	89.39 ± 10.12 <sup>b,c</sup>	10.12 ± 3.46 <sup>b,c</sup>	17.28 ± 1.99 <sup>b,c</sup>	240.16 ± 18.69 <sup>b,c</sup>
F	135.371	132.992	111.996	134.021	167.217
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a 与 C 组比较, P < 0.05; b 与 M 组比较, P < 0.05; c 与 Gas-M 组比较, P < 0.05。

Note: a compared with group C, P < 0.05; b Compared with group M, P < 0.05; c Compared with the gas group Gas-M, P < 0.05.

### 2 Gas 对 RAV 大鼠肺指数和肺 W/D 的影响

结果见表 3。与 C 组比较, M 组大鼠肺指数和 W/D 值显著上升(均 P < 0.05); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性组的肺指数和 W/D 值均显著下降(均 P < 0.05); Gas 低剂量组与 M 组比较差异无统计学意义(P > 0.05)。

### 3 Gas 对 RSV 大鼠肺组织病理变化的影响

C 组、M 组、阳性组、Gas 低组、Gas 中组和 Gas 高组大鼠肺损伤评分分别为 0.39 ± 0.09、0.98 ± 0.02、0.78 ± 0.05、0.92 ± 0.04、0.75 ± 0.04 和 0.82 ± 0.05。C 组肺组织的中性粒细胞浸润不明显, 肺泡分布连续均匀; M 组大鼠肺组织中性粒细胞浸润明显, 肺泡破裂连片, 间隔增厚; Gas 低剂量组肺组织中性粒细胞浸

润明显, 肺泡间隔增厚, 与 M 组比较差异无统计学意义; Gas 中、高剂量组和阳性组中性粒细胞浸润和肺泡间隔增厚现象减轻。与 C 组相比, M 组肺损伤评分显著升高(P < 0.05); 与 M 组比较, Gas 低组肺损伤评分差异无统计学意义(P > 0.05), Gas 中、高剂量组和阳性组肺损伤评分显著降低(均 P < 0.05)(图 1)。

### 4 Gas 对 RSV 大鼠肺组织 RSV 病毒载量的影响

C 组、M 组、阳性组、Gas 低组、Gas 中组和 Gas 高组大鼠肺组织 RSV 病毒载量分别为 0.00 ± 0.00、11.18 ± 2.49、5.12 ± 1.02、10.53 ± 2.08、2.94 ± 1.45 和 6.84 ± 1.35。与 C 组比较, M 组大鼠肺组织 RSV 病毒载量显著增加(P < 0.05); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性组肺组织 RSV 病毒载量显著下降(均

$P < 0.05$ ), 其中中剂量组肺组织 RSV 病毒载量最低 ( $P < 0.05$ ); Gas 低剂量组与 M 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组大鼠肺指数和肺 W/D 值比较 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 3 Comparison of lung index and lung W/D value of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组 Groups	肺指数 Lung index	W/D 值 W/D value
C 组	0.61 ± 0.07	2.75 ± 0.25
M 组	1.35 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.61 ± 0.39 <sup>a</sup>
阳性组	0.74 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.19 ± 0.35 <sup>b</sup>
Gas-L 组	1.31 ± 0.08 <sup>c</sup>	5.53 ± 0.41 <sup>c</sup>
Gas-M 组	0.84 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.75 ± 0.26 <sup>b</sup>
Gas-H 组	0.93 ± 0.07 <sup>b,c</sup>	4.63 ± 0.31 <sup>b,c</sup>
F	138.220	130.167
P	0.000	0.000

注: a 与 C 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 M 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 Gas-M 组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: a compared with group C,  $P < 0.05$ ; b Compared with group M,  $P < 0.05$ ; c Compared with the gas group Gas-M,  $P < 0.05$ .

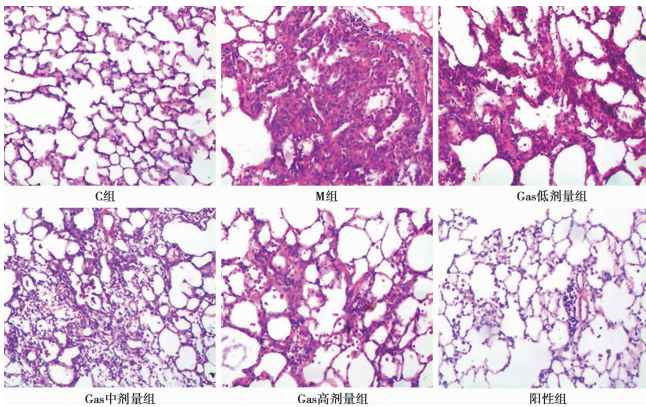


图 1 HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化 (200×)

Fig. 1 HE staining to observe the pathological changes of lung tissue in rats (200×)

## 5 Gas 对 RSV 大鼠脾组织中 Th17、Treg 细胞比例的影响

结果见图 2、表 4。与 C 组比较, M 组大鼠脾组织 Th17 细胞比例显著上升 ( $P < 0.05$ ); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性组脾组织 Th17 细胞比例显著下降 (均  $P < 0.05$ ), Gas 低剂量组 Th17 细胞比例与 M 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

与 C 组比较, M 组大鼠脾组织 Treg 细胞比例显著下降 (均  $P < 0.05$ ); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性组脾组织 Treg 细胞比例显著上升 (均  $P < 0.05$ ), Gas 低剂量组 Treg 细胞比例与 M 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3、表 4)。

## 6 Gas 对 RSV 大鼠肺组织中 Notch/NF-κB 通路的影响

结果见图 4、表 5。与 C 组比较, M 组大鼠肺组织 Notch-1、Hes-1、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白水平显

著上升 (均  $P < 0.05$ ); 与 M 组比较, Gas 中、高剂量组和阳性组肺组织 Notch-1、Hes-1、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白水平均显著下降 (均  $P < 0.05$ ), Gas 低组无显著变化 ( $P > 0.05$ )。

表 4 各组大鼠脾组织中 Th17、Treg 细胞比例 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 4 Proportion of Th17 and Treg cells in spleen tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组 Groups	Th17 细胞比例 Th17 cell ratio	Treg 细胞比例 Treg cell ratio
C 组	0.92 ± 0.32	6.88 ± 1.11
M 组	6.13 ± 0.69 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.58 <sup>a</sup>
阳性组	2.13 ± 0.45 <sup>b</sup>	5.64 ± 1.23 <sup>b</sup>
Gas-L 组	5.13 ± 1.08 <sup>c</sup>	2.64 ± 0.48 <sup>c</sup>
Gas-M 组	3.09 ± 0.96 <sup>b</sup>	5.38 ± 1.13 <sup>b</sup>
Gas-H 组	3.99 ± 1.11 <sup>b,c</sup>	4.21 ± 1.18 <sup>b,c</sup>
F	54.102	34.860
P	0.000	0.000

注: a 与 C 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 M 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 Gas-M 组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: a compared with group C,  $P < 0.05$ ; b Compared with group M,  $P < 0.05$ ; c Compared with the gas group Gas-M,  $P < 0.05$ .

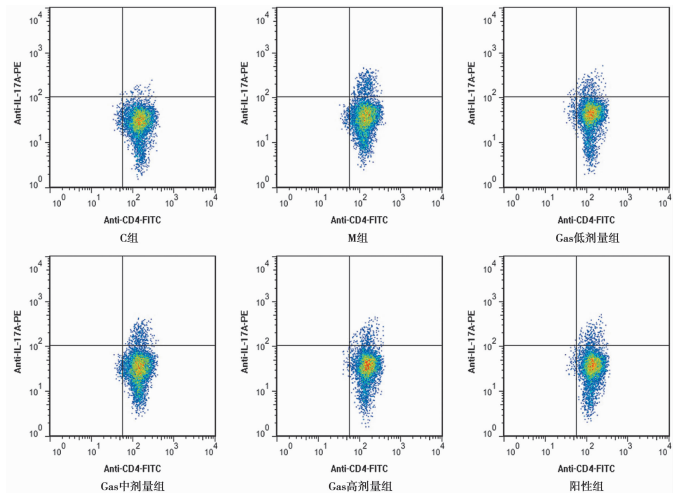


图 2 不同处理组中大鼠的 Th17 细胞比例

Fig. 2 Proportion of rat Th17 cells in different treatment groups

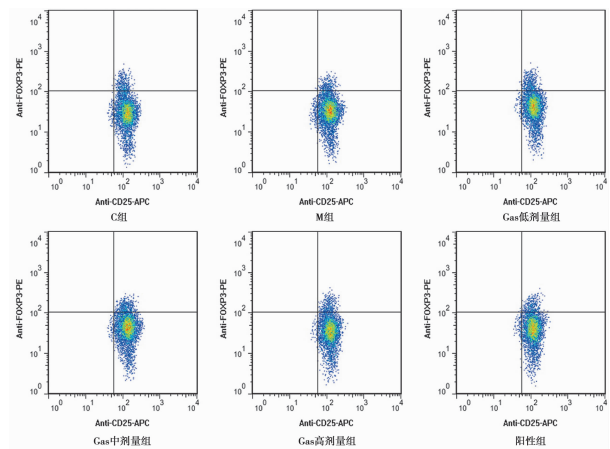


图 3 不同处理组中大鼠的 Treg 细胞比例

Fig. 3 Treg cell proportion of rats in different treatment groups

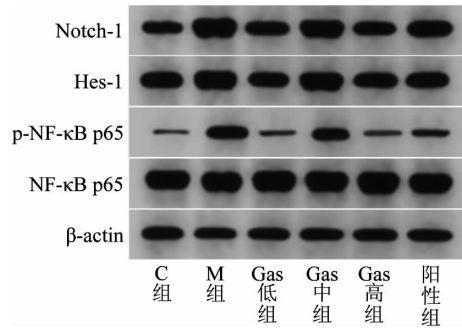


图 4 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 Notch-1、Hes-1、NF-κB p65 蛋白表达

Fig. 4 Detection of Notch-1, Hes-1, NF in lung tissue of rats in each group by Western blot- κ B p65 protein expression

表 5 各组大鼠肺组织 Notch-1、Hes-1、NF-κB p65 蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Notch-1, Hes-1, NF in lung tissue of rats in each group- κ B p65 protein expression level ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组 Groups	Notch-1	Hes-1	p-NF-κB p65/ NF-κB p65
C 组	0.88 ± 0.02	1.36 ± 0.01	0.18 ± 0.03
M 组	1.94 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.05 <sup>a</sup>
阳性组	1.02 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>b</sup>
Gas-L 组	1.74 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.89 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.05 <sup>c</sup>
Gas-M 组	1.11 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.08 <sup>b</sup>
Gas-H 组	1.30 ± 0.08 <sup>b,c</sup>	1.45 ± 0.08 <sup>b,c</sup>	0.46 ± 0.03 <sup>b,c</sup>
F	388.942	343.767	127.892
P	0.000	0.000	0.000

注: a 与 C 组比较,  $P < 0.05$ ; b 与 M 组比较,  $P < 0.05$ ; c 与 Gas 中组比较,  $P < 0.05$ 。

Note: a compared with group C,  $P < 0.05$ ; b Compared with group M,  $P < 0.05$ ; c Compared with the gas group Gas-M,  $P < 0.05$ 。

## 讨论

RSV 可在环境中通过飞沫和密接传播, 临床上导致患者缺氧、剧烈喘息, 甚至呼吸衰竭致死, 对患者健康构成巨大威胁<sup>[11-12]</sup>。Gas 具有抗炎性损伤和抗氧化等作用<sup>[13]</sup>。本实验结果显示, 经过 Gas 中、高剂量处理后, 大鼠肺指数和肺部 W/D 值显著下降, 肺组织中中性粒细胞浸润明显改善, 肺泡间隔增厚现象减轻, 肺损伤评分显著降低, 病毒载量显著下降, Gas 中剂量显示出与利巴韦林相当的抗细菌感染和肺保护作用, 提示 Gas 具有作为 RSV 所致肺损伤治疗药物的潜力。

RSV 诱导呼吸系统受损, 引起肺组织炎症, 导致机体 T 细胞失衡<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 经过造模后, M 组大鼠脾组织 Th17 细胞比例显著上升, Treg 细胞比例显著下降, 导致机体肺损伤加重。研究发现下呼吸道感染病情严重时, Th17/Treg 平衡向 Th17 漂移严重<sup>[15]</sup>。Th17/Treg 失衡可引发多种炎症疾病, Th17 细胞分泌 IL-17 因子可促进肺内中性粒细胞活化、释放弹性蛋白酶, 水解弹性蛋白, 引发肺功能减退, 加剧肺功能损伤<sup>[16-17]</sup>, 本研究结果与其相一致。经过 Gas 中、高剂量处理的大鼠肺组织 Th17 细胞比例显

著下降, Treg 细胞比例显著上升, 肺损伤程度降低。Th17 和 Treg 细胞在功能上和分化上相互拮抗<sup>[18]</sup>。Th17 细胞主要分泌 IL-17、IL-6 等细胞因子, Treg 细胞分泌 TGF-β 等细胞因子, 具有负向免疫调节的作用<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, M 组大鼠血清中 IL-17、IL-6 显著上升, TGF-β 显著下降, 与 M 组 Th17 细胞比例上升, Treg 细胞比例下降一致。Gas 可降低脓毒症小鼠血清和肺泡灌洗液中炎症因子的水平, 具有较强的抗炎作用<sup>[20]</sup>。本研究中, 经过 Gas 处理的大鼠血清中 IL-17、IL-6 显著下降, TGF-β 显著上升, 表明 Gas 可促进 Th17 和 Treg 细胞平衡恢复, 改善大鼠免疫功能。

Notch 信号通路的激活可导致炎症发生, 在过敏性气道炎症等炎症疾病中处于激活状态<sup>[21]</sup>。Notch 异常激活后, 会使 NF-κB 磷酸化水平增高, 下游基因 Hes1 同时高表达, 释放大量炎症因子, 加重炎症反应<sup>[7]</sup>。研究表明 Gas 可抑制 NF-κB 的活化来减轻脂多糖诱导的急性肺损伤<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, 经过 Gas 中、高剂量处理的大鼠肺组织 Notch-1、Hes-1、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白水平显著下降, 表明 Gas 可抑制 Notch/NF-κB 信号通路的激活, 可能为其降低肺部炎症反应, 减轻肺损伤的潜在机制。

综上所述, Gas 可降低 RSV 感染肺炎大鼠的炎症反应, 减轻肺损伤, 可能与抑制 Notch/NF-κB 信号通路有关, 并且中剂量的作用效果更好。然而, Gas 减轻 RSV 所致肺损伤的过程中是否有其他通路参与仍需进一步研究。

## 【参考文献】

- [1] Tahamtan A, Samadzadeh S, Rastegar M, et al. Respiratory syncytial virus infection; why does disease severity vary among individuals? [J]. Expert Rev Respir Med, 2020, 14(4): 415-423.
- [2] Stephen G, Baum, MD. Respiratory syncytial virus: another serious respiratory infection [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(1): e164-e165.
- [3] Lwensteyn YN, Bont LJ. Clinical development of respiratory syncytial virus antivirals-what we can learn from oseltamivir [J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(11): 2796-2798.
- [4] 张志龙, 鄧玉钢, 臧埔, 等. 天麻素、对羟基苯甲醇对中枢神经系统作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(02): 312-320.
- [5] Li J, Huang J, He Y, et al. The protective effect of gastrodin against the synergistic effect of HIV-Tat protein and METH on the blood-brain barrier via glucose transporter 1 and glucose transporter 3 [J]. Toxicol Res (Camb), 2021, 10(1): 91-101.
- [6] Mukherjee M, Deriso J, Otterpohl K, et al. Endogenous notch signaling in adult kidneys maintains segment-specific epithelial cell types of the distal tubules and collecting ducts to ensure water homeostasis [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(1): 110-126.
- [7] Zhao H, Chen Z, Xie LJ, et al. Suppression of TLR4/NF-KB signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury

- in rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 4311-4319.
- [8] 吴芳,左涵珺,任雪琪,等. 天麻素对氧糖剥夺诱导的小胶质细胞 Notch 信号通路的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(1): 38-44.
- [9] 产翠翠,马同军,王继胜,等. 天麻素注射液通过 NGF/TrkA 通路减轻大鼠脑缺血所致肺损伤[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(1): 116-122.
- [10] 熊美燕,李俊玉,唐翔宇,等. 柴胡对呼吸道合胞病毒感染大鼠肺组织病毒载量的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(8): 811-815.
- [11] Lee ES, Kim KY, Jeong KH, et al. Severe respiratory syncytial virus pneumonia in a kidney transplant recipient with desensitization: case report and comprehensive review of the literature [J]. *Exp Clin Transplant*, 2020, 18(4): 515-518.
- [12] 于德山,傅生芳,徐丛杉,等. 2018年甘肃省10岁以下儿童流感病毒和呼吸道合胞病毒感染特征[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020(2): 155-159.
- [13] Yuan B, Huang H, Qu S, et al. Gastrodin pretreatment protects liver against ischemia-reperfusion injury via activation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(5): 1159-1178.
- [14] 郑海涛,任献青,闫永彬,等. 人呼吸道合胞病毒感染对机体 Th1、Th2 影响的研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(4): 719-725.
- [15] Gianello V, Salvi V, Parola C, et al. The PDE4 inhibitor CHF6001 modulates pro-inflammatory cytokines, chemokines and Th1- and Th17-polarizing cytokines in human dendritic cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163(7): 371-38.
- [16] 乔赞,雷惠婷,易蔚,等. 肺“俞募配穴”艾炷灸对哮喘小鼠 Th17/Treg 平衡的影响[J]. *中国针灸*, 2020, 40(11): 1217-1222.
- [17] He S, Sun S, Lu J, et al. The effects of the miR-21/SMAD7/TGF- $\beta$  pathway on Th17 cell differentiation in COPD[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6338-6348.
- [18] Salve S, Padwal V, Nagar V, et al. T cell functionality in HIV-1, HIV-2 and dually infected individuals: correlates of disease progression and immune restoration [J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 198(2): 233-250.
- [19] Li XH, Sun LJ, Chen L, et al. Upregulation of microRNA-219-5p relieves ulcerative colitis through balancing the differentiation of treg/th17 cells[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2020, 32(7): 813-820.
- [20] 俞江灏,周金山,蒋晓宁,等. 天麻素通过抑制 TLR4/ASK1 信号减轻脓毒症小鼠的肺脏炎症[J]. *中成药*, 2021, 43(9): 2520-2524.
- [21] Tindemans I, Van Schoonhoven A, Kleinjan A, et al. Notch signaling licenses allergic airway inflammation by promoting Th2 cell lymph node egress [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(7): 3576-3591.
- [22] Zhang Z, Zhou J, Song DQ, et al. Gastrodin protects against LPS-induced acute lung injury by activating Nrf2 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 32147-32156.

【收稿日期】 2022-09-05 【修回日期】 2022-11-12

(上接 5 页)

#### 【参考文献】

- [1] Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(5): 593-605.
- [2] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.
- [3] Castro R, Nobre LS, Eleuterio RP, et al. Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(6): 2202-2219.
- [4] Yang J, Wang W, Chen Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity [J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 572-577.
- [5] Tian Y, Lian C, Chen Y, et al. Sensitivity and specificity of SARS-CoV-2 S1 subunit in COVID-19 serology assays [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 75.
- [6] Wang Y, Wang L, Cao H, et al. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(2): 892-898.
- [7] Garcia-Cordero J, Mendoza-Ramirez J, Fernandez-Benavides D, et al. Recombinant protein expression and purification of N, S1, and RBD of SARS-CoV-2 from mammalian cells and their potential applications [J]. *Diagnostics*, 2021, 11(10): 1808.
- [8] Chu KB, Kang HJ, Yoon KW, et al. Influenza virus-like particle (VLP) vaccines expressing the SARS-CoV-2 S glycoprotein, S1, or S2 domains [J]. *Vaccines*, 2021, 9(8): 920.
- [9] Tripathi NK, Shrivastava A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019(7): 420.
- [10] Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(5): 1140-1157.
- [11] Yang J, Petitjean SJ, Koehler M, et al. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-10.
- [12] Soraci L, Lattanzio F, Soraci G, et al. COVID-19 vaccines: current and future perspectives [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(4): 608.
- [13] Cox MMJ. Innovations in the insect cell expression system for industrial recombinant vaccine antigen production [J]. *Vaccines*, 2021, 9(12): 1504.
- [14] Galibert L, Merten OW. Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases [J]. *J Invertebr Pathol*, 2011(107): S80-S93.
- [15] Zitzmann J, Sprick G, Weidner T, et al. New insights into cell culture technology [M]. New York: IntechOpen, 2017: 43-97.
- [16] Struble LR, Smith AL, Lutz WE, et al. Insect cell expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 spike proteins that demonstrate ACE2 binding [J]. *Protein Sci*, 2022, 31(5): e4300.

【收稿日期】 2022-09-10 【修回日期】 2022-11-22