文章编号：1001-8689(2018)12-1574-04

黄虎方对 HBV 转基因小鼠病毒复制及 TKB1-IRF7-IFNα/β 通路的影响

廖婷婷[1,2]　黄群[1,2]　张传涛[1,2,*]　辜海英[1]　杨沁[3]
(1 成都中医药大学附属医院，成都 610075；2 成都中医药大学，成都 610072；3 乐山市中医医院，乐山 614000)

摘要：目的　观察黄虎方 (HH 方) 治疗 HBV 转基因小鼠抗乙肝病毒 (hepatitis B virus，HBV) 疗效及其作用机制。**方法**　HBV 转基因小鼠随机分为 4 组，苦参素组小鼠给予含 150mg/(kg·d) 苦参素混悬液，高、低剂量 HH 方组小鼠分别给予含 7g/(kg·d)、2g/(kg·d) HH 混悬液，均为每日 1 次灌胃，共 5 周，Elisa 法检测血清及肝组织中乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)，Elisa 法检测血清干扰素 α(interferon-α, IFNα)、干扰素 β(interferon-β, IFNβ)，定量 PCR 法检测血清中乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸 (hepatitis B virus DNA, HBVDNA) 及肝组织中 HBVDNA、TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase 1, TKB1)mRNA、干扰素调控因子 7(interferon regulatory factor 7, IRF7) mRNA 表达。Western Bloting 检测肝组织中 TKB1、IRF7 蛋白表达。**结果**　高剂量 HH 方 (7g/(kg·d)) 可以显著降低 HBV 转基因小鼠肝脏和血清中的 HBsAg、HBVDNA 水平，差异具有统计学意义 (P<0.01, P<0.05)，与苦参素组比较差异无统计学意义 (P>0.05)。高剂量 HH 方显著增强小鼠 TKB1 mRNA、IRF7 mRNA 及蛋白表达，差异具有统计学意义 (P<0.01, P<0.05)。高剂量 HH 方可显著升高血清 IFNα、IFNβ，差异有统计学意义 (P < 0.01, P < 0.05)。**结论**　HH 方具有一定抗 HBV 作用，推测可能与影响 TKB1、IRF7 的 mRNA 和蛋白表达进而促进 IFNα /β 分泌有关。

关键词：黄虎方；抗乙肝病毒；作用机制
中图分类号：R9　　**文献标志码**：A

Influence on virus replication and TKB1-IRF7-IFNα/β pathway in HBV transgenic mice treated with HuangHu Fang

Liao Ting-ting[1,2], Huang Qun[1,2], Zhang Chuan-tao[1,2], Gu Hai-ying[1] and Yang Qin[3]
(1 Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075; 2 Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072; 3 Leshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Leshan 614000)

Abstract　**Objective**　To observe the anti-HBV effect and the action mechanism of HuangHu Fang (HH Fang) in HBV transgenic mice. **Methods**　HBV transgenic mice were randomly divided into four groups. The Matrine group was fed with the suspension containing 150mg/(kg·d) Matrine, the high and low dose HH Fang groups were given the suspension containing 7g/(kg·d) and 2g/(kg·d) HH Fang, once daily for five weeks. Elisa was used to detect HBsAg in the serum and liver tissue. Elisa was also used to detect serum Interferon-α and Interferon-β. Quantitative PCR was used to detect HBVDNA in serum and HBVDNA, TANK-binding kinase 1 mRNA, and interferon regulatory factor 7 mRNA in liver tissue. The Western Blotting method was used to detect protein expression of TKB1 and IRF7 in liver tissue. **Results**　High dose HH Fang (7g/(kg·d)) could significantly reduce HBsAg, HBVDNA in the serum and liver of HBV transgenic mice. The difference was statistically significant (P<0.01, P<0.05) compared with the Matrine group, where the difference was not statistically significant (P>0.05). High doses HH Fang significantly increased mRNA and protein expression of TKB1 and IRF7, and the difference was statistically significant (P<0.01,

收稿日期：2018-09-26
基金项目：国家自然科学基金 (No. 81102720)；四川省中医药管理局中医药科技研究专项 (No. 2016C013)；四川省中医药管理局中医药科技研究专项 (No. 2016Q018)；四川省教育厅科研项目 (No. 17ZB0145)
作者简介：廖婷婷，女，生于 1983 年，主治医师，主要从事中医药防治肝病及内分泌代谢病研究，E-mail: 4578695@qq.com
* 通讯作者，E-mail: 664958917@qq.com

P<0.05). High-dose HH Fang could significantly increase the level of IFNα and IFNβ in the serum, and the difference was statistically significant (*P*<0.01, *P*<0.05). **Conclusion**　HH Fang had some anti-HBV effects, presumably related to influencing mRNA and protein expression of TKB1 and IRF7 to promote IFNα/β secretion.

Key words　HH Fang; Anti-hepatitis B virus; Action mechanism

HBV 感染呈世界性流行，我国属 HBV 感染高流行区，积极开展防治 HBV 感染研究具有重要意义。本研究提出慢性病毒性乙型肝炎核心中医病机是“脾虚湿盛血瘀”，在实践中不断优化、总结了抗 HBV 中药复方 HH 方，该方由虎杖、扯根菜、龙芽草、叶下珠、苦参、郁金、薏苡仁、猪苓等组成，共奏清热利湿、健脾、活血之功。本研究前期不仅标定 14 个特征峰构成 HH 方的指纹图谱 [1]，还证实其具有确切的抗 HBV 作用 [2-3]。本研究旨在借助 HBV 转基因小鼠模型进一步证实 HH 方抗乙肝病毒的作用及其对 TKB1-IRF7-IFNα/β 通路的影响以揭示其作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试剂与设备

HBsAg 试剂盒 (westang, F58200)；HBVDNA 试剂盒 (上海科华生物，201408151)；干扰素 α 试剂盒 (westang, F10640)；干扰素 β 试剂盒 (westang, F10650)；第一链 cDNA 合成试剂盒 (Life Technology, 12328-040)；UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (Sangon Biotech, SK1321/SK1322)；定量 PCR 试剂 (ABI SybrGreen PCR Master Mix (2X), 4368706)；内参抗体 GAPDH(HyTest Ltd) Anti-TBK1 antibody (Santa Cruz, sc-52957)；Anti-IRF7 antibody (Santa Cruz, sc-74471)；PVDF 膜：Immobilon-P Transfer Membrane, 0.45μm (Millipore, IPVH08130)；凝胶成像系统 (上海复日科技有限公司)；定量 PCR 仪 (ABI Stepone plus)；酶标仪 (Thermo DENLEY DRAGON Wellscan MK3)；Clinx ChemiScope 系列荧光及化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司)。

1.1.2　实验动物

SPF 级 HBV 转基因小鼠购于中国人民解放军第 458 医院全军肝病中心，生产许可证号：SCXK(军)2012-0018，生产合格证号：0021757。

1.1.3　实验药品

(1) 苦参素胶囊：购自正大天晴药业集团股份有限公司，国药准字 H20010763，产品批号：131121102。

(2)HH 方：虎杖 15g、扯根菜 20g、龙芽草 15g、叶下珠 24g、苦参 15g、郁金 15g、薏苡仁 30g、猪苓 20g 等。上述药物 20 倍量，粉碎后浸泡 20min，常压下煮沸 1h 后，低温低压蒸发浓缩，取粉，备用。

1.2　方法

1.2.1　分组及给药

将 HBV 转基因小鼠 36 只 (6~8 周龄) 随机分为 4 组：模型组 (M)、苦参素对照组 (P)、高剂量 HH 方组 (H)、低剂量 HH 方组 (L)，每组均 8 只小鼠 (雌雄各半)，模型组小鼠给予同体积生理盐水灌胃，苦参素对照组给予同体积含 150mg/(kgd) 苦参素混悬液，高、低剂量 HH 方组分别给予同体积含 7 和 2g/(kg·d) HH 混悬液，均为每日 1 次灌胃，疗程 5 周。

1.2.2　指标检测

(1) 肝组织及血清 HBsAg、HBVDNA：股动脉取血，3000r/min 离心 15min，取血清。肝脏用生理盐水洗 2~3 次除去血液，剥掉表面的结缔组织的脂肪。剪碎，用生理盐水反复洗涤至无血色止，然后再加生理盐水 (1:3)，用组织捣碎机或匀浆器作成匀浆。用酶联免疫法 (ELISA) 检测 HBsAg。定量 PCR 试剂盒检测 HBVDNA。

(2) 肝脏组织 TKB1/IRF7 mRNA 检测：应用 Primer Express 2.0 软件设计引物，GAPDH(内参)：F：5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3'，R：5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'，均 125bp；TBK1：F：5'-TGTGGAGTGTTGGAGTGACAT-3'，R：5'-GACGGCTTCCCAGTGATTATT-3'，118bp。IRF7：F：5'-CGAGTGCTGTTTGGAGACTG-3'，R：5'-ATCCCTACGACCGAAATGCT-3'，123bp。PCR 反应体系 (20μL) 包括：10μL 2X Sybr Green qPCR Master Mix、1μL 引物 F(10μmol/L)、1μL 引物 R(10μmol/L)、7μL ddH20、1μL Template(cDNA)，把加好样品的 384 孔板放在 LightCycler480 Software Setup(Roche 罗氏) 中进行反应，反应条件：预变性 10min，94 ℃，(融解：20s, 94 ℃；退火：15s，60℃；延伸：20s，72℃)×40 个循环。采用相对表达量 $=2^{-\triangle Ct}$(其中 $\triangle Ct=Ct$ 待测基因 $-Ct$ 内参基因)。

(3) 肝脏组织 TKB1/IRF7 蛋白检测：Western Bloting 法检测：肝组织低温电动快速匀浆 (加 50~100mg/mL 裂解液)，12000g 离心，4 ℃，2min，蛋白样品调至等浓度后上样、电泳，转印 (1.5h,

1~2mA/cm^2, 10% gel)、封闭 (non-fat milk)、一抗孵育 (一抗稀释液 GAPDH：1:20000；TLR3：1:200；IRF7：1:100)、二抗孵育 (山羊抗兔、兔抗山羊：1:10000)、曝光 (两种显色底物 1:1，在暗室中将 X 光片曝光 1min)。显影、定影。

(4) 血清 IFNα/β 检测：股动脉取血、离心、取血清，ELISA 法检测血清 IFNα、IFNβ 水平。

1.3　统计方法

应 SPSS19.0 统计软件包处理数据，计量资料用 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 有统计学意义。

2　结果

2.1　小鼠肝组织和血清 HBsAg、HBVDNA

与模型组比较，苦参素组、高剂量 HH 方组 HBV 转基因小鼠肝组织和血清 HBsAg、HBVDNA 水平明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与对照组比较，低剂量组肝组织 HBsAg、HBVDNA 及血清 HBVDNA 明显升高，差异有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与低剂量组比较，高剂量组的小鼠肝组织和血清 HBsAg、HBVDNA 水平明显下降，差异有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)(表 1)。

2.2　小鼠肝组织 TKB1/IRF7 mRNA 及蛋白

2.2.1　肝组织 TKB1 mRNA、IRF7 mRNA 水平

与模型组比较，高剂量组 TLR3mRNA、IRF7 mRNA 水平显著升高，差异具有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与高剂量组比较，低剂量组 TLR3 mRNA、IRF7 mRNA 显著降低，差异具有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)(表 2)。

2.2.2　肝组织 TBK1、IRF7 蛋白水平

与模型组比较，高剂量组 TBK1、IRF7 水平显著升高，差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与高剂量组比较，低剂量组 IRF7 显著降低，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)；而低剂量组 TBK1 无显著变化，差异无统计学意义 ($P>0.05$)(表 3、图 1)。

2.3　小鼠血清 IFNα、IFNβ

与模型组比较，苦参素组、高剂量 HH 方组的小鼠 IFNα、IFNβ 明显升高，差异有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与对照组比较，低剂量组 IFNα 显著降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与低剂量组比较，高剂量组的小鼠 IFNα、IFNβ 水平明显升高，差异有统计学意义 ($P<0.01$, $P<0.05$)(表 4)。

表 2　小鼠肝组织 TKB1mRNA、IRF7mRNA 情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2　TKB1 mRNA and IRF7 mRNA in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TKB1mRNA	IRF7mRNA
M	8	$2.70\times10^{-2}\pm6.94\times10^{-3}$	$2.62\times10^{-2}\pm1.30\times10^{-2}$
H	8	$5.21\times10^{-2}\pm7.13\times10^{-3b}$	$6.39\times10^{-2}\pm5.26\times10^{-2a}$
L	8	$2.89\times10^{-2}\pm1.17\times10^{-2d}$	$2.83\times10^{-2}\pm8.92\times10^{-3c}$

注：$^bP<0.01$ vs M 组、$^aP<0.05$ vs M 组；$^dP<0.01$ vs H 组、$^cP<0.05$ vs H 组

表 3　小鼠肝组织 TBK1、IRF7 蛋白情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 3　TBK1 and IRF7 proteins in liver tissues of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TBK1	IRF7
M	8	1.58±0.20	0.91±0.23
H	8	2.24 ± 0.67^a	1.59 ± 0.38^a
L	8	2.06±0.67	0.78 ± 0.47^d

注：$^aP<0.05$ vs M 组；$^dP<0.01$ vs H 组

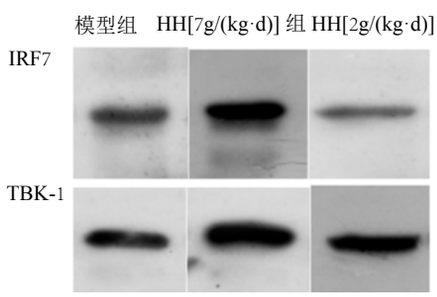


图 1　小鼠肝组织 IRF7、TBK1 蛋白表达 (免疫印迹图)

Fig. 1　IRF7 and TBK1 protein expression in mouse liver tissue (immunoblotted map)

3　讨论

慢性病毒性乙型肝炎可以归属中医“黄疸”等范畴论治。《金贵要略 . 黄疸病》提出“黄家所得，从湿得之”，治“黄”不离治“湿”。《金匮要略》云：“见肝之病，知肝传脾，当先实脾，四季脾旺不受邪，即勿补之”，脾为湿邪来源，治“肝”不忘“健脾”。叶天士《临证指南医案》指出“大凡经主气，络主血，久病血瘀，初为气结在经，久则血伤入络”，

表 1　小鼠 HBsAg (S/COV)、HBVDNA (IU/mL) 情况 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1　HBsAg (S/COV) and HBV DNA (IU/mL) in mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肝 HBsAg	血 HBsAg	肝 HBVDNA	血清 HBVDNA
M	8	21.35±1.55	19.02±0.37	1343000.00±278991.55	19828.75±3874.08
P	8	13.14 ± 1.46^b	10.58 ± 2.19^b	879500.00 ± 199999.29^b	2573.75 ± 454.59^b
H	8	11.98 ± 0.85^d	9.93 ± 2.28^d	765625.00 ± 287161.94^d	2276.38 ± 402.53^d
L	8	17.91 ± 3.03^f	14.53 ± 3.27^e	1163500.00 ± 106361.92^e	16640.00 ± 4320.74^f

注：$^bP<0.01$ vs M 组、$^dP<0.01$ vs M 组；$^eP<0.05$ vs P 组，$^fP<0.01$ vs P 组；$^eP<0.05$ vs H 组、$^fP<0.01$ vs H 组

表 4　小鼠血清 IFNα、IFNβ(pg/mL) 情况 ($\bar{x}\pm s$)
Tab. 4　Serum IFNα, IFNβ (pg/mL) in mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IFNα	IFNβ
M	8	19.39±3.47	19.44±7.34
P	8	30.76±10.36[a]	32.87±13.62[a]
H	8	33.11±9.06[d]	36.01±14.11[d]
L	8	20.12±3.84[ef]	24.85±8.19[g]

注：[a]$P < 0.05$ vs M 组、[d]$P < 0.01$ vs M 组；[e]$P < 0.05$ vs P 组；[f]$P < 0.01$ vsH 组，[g]$P < 0.05$ vsH 组

慢性病毒性乙型肝炎病久缠绵，“久则血伤入络”，治疗应重视活血通络。所以治疗该病应注重利湿、健脾、活血。HH 方中以虎杖、马鞭草、赶黄草、叶下珠等清热利湿解毒，为君药。以猪苓、薏苡仁等渗湿、健脾，给“湿”以去路，并鼓舞驱邪之正气，为臣药，郁金等活血通络，纠正“络病”状态，阻止病理状态持续进展，共为臣药。甘草调和诸药，为使药，全方正中慢性病毒性乙型肝炎核心病机。

宿主细胞的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 通过识别病原体的病原相关分子模式启动信号转导，诱导Ⅰ型干扰素等细胞因子表达，激活宿主先天性和适应性免疫应答，以内吞的方式进入细胞的病毒，被定位于内体膜上的 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 识别，TLRs 通过诱导干扰素等细胞因子的合成及调节 Th1 和 Th2 的反应等而产生免疫刺激、发挥抗病毒作用 [4]。

TANK 结合激酶 1(TANK-binding kinase, TBK1) 在宿主抵抗病原体感染的过程中起着重要作用 [5]，Toll 样受体 (TLRs) 和 RIG-1 样受体 (RLRs) 介导的宿主免疫应答均能激活 TBK1，诱导干扰素的产生，抵抗和清除病原体，TBK1 在宿主先天免疫应答中有着极其重要的作用 [6]。IRF7 主要表达于能够产生Ⅰ型干扰素的浆细胞样树突状细胞上，而 TLR7/9 也能大量表达在浆细胞样树突状细胞。在正常情况下表达水平很低，当浆细胞样树突状细胞上的 TLR7/9 受到病毒或相应配体刺激后，通过激活信号转导通路分泌大量Ⅰ型干扰素而发挥抗病毒作用。在这过程中，位于胞质的 IRF7 会与 TBK1/IKKi 作用发生磷酸化效应，通过磷酸化作用进入核内，能激活 IFN-β 和 IFN-α 基因。TLR7/8/9 还可通过 MyD88-TRAF3 通路激活干扰素调控因子 7(interferon regulatory factor7, IRF7)，诱导Ⅰ型干扰素的分泌 [7]，TBK1 和 IRF7 是 TLRs 信号通路诱导产生Ⅰ型干扰素过程中的关键因子。

本研究不仅证实高剂量 HH 方 [7g/(kg·d)] 可以显著降低 HBV 转基因小鼠肝组织及血清 HBsAg、HBVDNA 水平，发挥抗病毒作用，且药物疗效存在“量效”正比关系。本研究还从蛋白和转录水平同时观察了 HH 方对干扰素生成相关的 TKB1 和 IRF7 的影响，研究发现高剂量 HH 方 [7g/(kg·d)] 可以显著增强 TKB1 和 IRF7 的 mRNA 及蛋白表达水平，进而促进内源性 IFNα、IFNβ 的分泌，推测这与 HH 方抗病毒作用机制有关，但是低剂量 [2g/(kg·d)]HH 方对 TKB1、IRF7、IFNα、IFNβ 等指标均无明显影响。所以本研究推测 HH 方抗 HBV 作用可能与 TKB1-IRF7-IFNα/IFNβ 通路增强机体免疫状态有关。但是由于 HH 方为中药，其成分复杂，作用靶点广泛，所以是否还存在其他更重要的作用机制仍需进一步验证。

参 考 文 献

[1] 周道杰 , 张传涛 , 郭尹玲 , 等 . HH 胶囊的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 云南中医学院学报 , 2015, 38(3): 16-19.

[2] 张传涛 , 廖志航 , 吴疆 , 等 . HH 胶囊抗乙肝病毒的体外 (2.2.15 细胞) 实验研究 [J]. 时珍国医国药 , 2011, 22(1): 78-80.

[3] 张传涛 , 廖志航 , 吴疆 , 等 . HH 胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制 [J]. 世界华人消化杂志 , 2010, 18(7): 652-656.

[4] Isogawa M, Robek M D, Furuichi Y, *et al*. To ll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*[J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 7269-7272.

[5] Miyahira A K, Shahangian A, Hwang S, *et al*. TANK-binding kinase-1 plays an important role during *in vivo* type Ⅰ IFN responses to DNA virus infections[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2248-2257.

[6] Radtke A L, Delbridge L M, Balachandran S, *et al*. TBK1 protects vacuolar integrity during intracellular bacterial[J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(3): e29.

[7] Hacker H, Redecke V, Blagoev B, *et al*. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6[J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 204-207.