苗药防感香囊对小鼠肺组织 IRAK-M、SOCS1 基因和蛋白表达的影响

李君莉，张 权*，程明亮，吴 君，杨 京，张宝芳
（贵阳医学院附院 感染科，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨苗药防感香囊对小鼠肺组织白介素 1 受体相关激酶 M（IRAK-M）、细胞因子信号抑制因子（SOCS1）基因和蛋白表达的影响。**方法**：48 只小鼠随机分为空白对照组（A 组）、单纯香囊持续吸入组（B 组）、单纯冷刺激组（C 组）、香囊持续吸入加冷刺激组（D 组），每组 12 只，分别给予相应干预，37 d 后收集肺组织，采用定量 PCR 和免疫印迹法检测小鼠肺组织 IRAK-M 、SOCS1 mRNA 和蛋白表达。**结果**：B、D 组小鼠肺组织中 IRAK-M mRNA 表达水平低下，与 A、C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；B、D 组肺组织中 SOCS1 mRNA 表达水平低于 C 组（$P<0.05$）；B 组 SOCS1 蛋白表达水平低下，与 A、C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；其余各组 IRAK-M 的蛋白表达水平，差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**：苗药防感香囊能够下调 TLR 通路的负性调控因子 IRAK-M、SOCS1 mRNA 及 SOCS1 蛋白的表达水平，增强 TLR 通路介导的天然免疫功能。

［关键词］苗药防感香囊；蛋白激酶类；抑制蛋白类；免疫，天然
［中图分类号］R285.5；R286.4 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2014）05-0706-03

Effect of Miaoyao Anti-influenza Sachet on Lab Rat Lung IRAK-M, SOCS1 Gene and Protein Expression

LI Junli, ZHANG Quan, CHENG Mingliang, WU Jun, YANG Jing, ZHANG Baofang
(*Department of Infectious Disease, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the effect of Miaoyao anti-influenza sachet (referred to as: Miao Sachet) on lab rat lung IRAK-M, SOCS1 gene and protein expression. **Methods**: All the rats were divided into 4 groups randomly in equal numbers, control group (Group A); inhaling Miao Sachet group (Group B); cold stimulating group (Group C); inhaling Miao Sachet and cold stimulating group (Group D). Lung tissues were collected 37 days later, quantitative PCR and western blot were adopted to test IRAK-M, SOCS1 gene and protein expression. **Results**: The expression of *IRAK-M* and *SOCS*1 gene of B and D groups was lower than that of A and C groups, the differences were statistically significant ($P<0.05$); the expression of *SOCS*1 gene of B and D groups was lower than C group ($P<0.05$), the expression of *SOCS*1 gene of B group was lower than A and C groups, differences were statistically significant ($P<0.05$); comparing expressions of *IRAK-M* protein with each other, there was no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusions**: Expression of *IRAK-M*、SOCS1 expression could be regulated by Miao Sachet with continued inhaling.

［**Key words**］Miaoyao anti-influenza sachet; IRAK-M; SOCS1; TLR; innate immunity

流行性感冒极为常见，新型流感爆发的威胁从未止步，寻找一种有效防治流感的手段势在必行。贵州省黔东南州卫生局近年来推广应用苗药防感香囊在人群中预防流感，效果良好。为阐明苗药防

*通信作者 E-mail：france. zhang@ aliyun. com
网络出版时间：2014－09－23 网络出版地址：http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 5012. R. 20140923. 1700. 030. html

感香囊预防流感的确切机制，本研究探讨了其对小鼠肺组织白介素 1 受体相关激酶 M（interleukin-1 receptor associated kinase M，IRAK-M）、细胞因子信号抑制因子（suppressor of cytokine signaling，SOCS1）的基因及蛋白表达的影响。

1　材料和方法

1.1　材料和仪器　昆明种雄性小鼠购自第三军医大学实验动物中心，动物许可证号为 SCXK（渝）2007－0003。苗药防感香囊（主要成分为莴嘎勒、榜莴芜、佳莴姣米）购自新华大地民族医药开发（黔东南）有限公司。小鼠 IRAK-M、SOCS1、β-actin 和山羊抗兔单克隆抗体（美国 Santa Cruz）、SYBR Green Ⅰ（北京天根生化）、逆转录试剂盒（深圳 Fermentas）、PCR 引物序列（上海生工生物工程有限公司合成）；DA7600 荧光定量 PCR 扩增仪（深圳达安）及 GelDocXR 凝胶成像系统（美国 BIO-RAD）。

1.2　分组及给药　鼠龄 6～7 周的昆明种雄性小鼠 48 只，体质量 25～30 g，随机均分为空白对照组（A 组）、单纯香囊持续吸入组（B 组）、单纯冷刺激组（C 组）、香囊持续吸入加冷刺激组（D 组）。B 组每日予 10 g 香囊持续吸入 12 h，6 d 更换一次香囊；C 组第 30 天开始予 10±1 ℃冷水中游泳 5 min，单只进行，连续 7 d；D 组，每日予 10 g 香囊持续吸入 12 h，6 d 更换一次香囊，第 30 天起给予冷刺激，温度 10±1 ℃冷水中游泳 5 min，单只进行，连续 7 d。香囊具体给药方法：自备普通纸箱4 只，长、宽、高分别为 100 cm、80 cm、100 cm，体积 0.8 m^3，纸箱前后左右四面对称位置各挖一个通气窗，总共 4 个通气窗，每个通气窗面积为8 cm×5 cm，纸箱内悬挂香囊，每日 20∶00 点将鼠笼放于纸箱中，每组的 2 个鼠笼放于同一个纸箱中，次日 08∶00 点准时取出鼠笼。A、C 组予相同时间段置入纸箱处理，但箱内不悬挂香囊，保证所有小鼠的生活条件一致。4 组均于第 37 天处死，收集肺组织。

1.3　肺组织 IRAK-M、SOCS1 mRNA 检测　Trizol 法提取总 RNA，逆转录成 cDNA，再行 PCR。反应体系（20 μL）包括：逆转录产物 4 μL，10 μmol/L 上游及下游引物各 0.5 μL，2×SYBR Green 10 μL，RNase-free H_2O 5 μL。循环参数：95 ℃ 5 min，95 ℃ 15 s、50 ℃ 2 min、60 ℃ 1 min，40 个循环。实验过程中设立内参照 β-actin。引物设计见表 1。

表 1　IRAK-M、SOCS1 基因 RT-PCR 扩增引物序列

Tab. 1　The primer sequences of IRAK-M and SOCS1 gene for RT-PCR amplification

基因	引物序列	
	上游	下游
β-actin	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT	GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA
IRAK-M	GCCAGAAGAATACATGACAGG	GTCTAAGAAGGACAGGCAGGAGT
SOCS1	GAAGCCATCTTCACGCTG	ACACTCACTTCCGCACCTTC

1.4　肺组织中 IRAK-M、SOCS1 蛋白检测　取等量的蛋白样品 40 μg 上样，12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白、电转移法使蛋白转移至 PVDF 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h，洗膜后各加入抗 IRAK-M、SOCS1 一抗（浓度均为 1∶400），4 ℃过夜，TBST 洗膜后二抗室温孵育 1 h，洗膜后用 ECL 化学发光试剂曝光显影，洗片后用凝胶成像仪扫描，以 β-actin 蛋白表达水平作为内参。

1.5　统计学处理　计量资料用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间两两比较采用单因素方差分析，所有数据用 SPSS 16.0 统计软件分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　一般情况　饲养 37 d，4 组小鼠皮毛光滑、色泽明亮、无脱毛、反应灵敏、大便成形。4 组小鼠体质量较饲养前均有明显增加，A 组（47.3±4.6）g、B 组（46.7±2.5）g、C 组（47±4.1）g、D 组（47.6±3.4）g，各组小鼠体质量差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2　IRAK-M、SOCS1 的 mRNA 及蛋白表达　B、D 组小鼠肺组织中 IRAK-M mRNA 表达水平低下，与 A、C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；B、D 组肺组织中 SOCS1 mRNA 表达水平低于 C 组（$P<0.05$）；B 组 SOCS1 蛋白表达水平低下，与 A、C 组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；其余各组 IRAK-M 的蛋白表达水平，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2 及图 1。

3　讨论

鼻黏膜下血管丰富，吸入的脂溶性药物可迅速经黏膜下血管弥散至全身，吸入给药避免了首过效

表 2 各组小鼠肺组织中 IRAK-M 、SOCS-1 mRNA 和蛋白表达量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The expression levels of IRAK-M, SOCS1 mRNA and protein in lung tissues of mice in each group

组别	mRNA 的相对表达量		蛋白的相对表达量	
	IRAK-M	SOCS-1	IRAK-M	SOCS-1
A 组	0.74 ± 0.183	0.73 ± 0. 143[(2)]	0.67 ± 0.26	1.14 ± 0.52
B 组	0.38 ± 0.150[(1)(2)]	1.00 ± 0.344[(2)]	0.49 ± 0.14	0.64 ± 0.20[(1)]
C 组	1.57 ± 0.420[(1)]	1.67 ± 0.792	0.52 ± 0.16	0.97 ± 0.40
D 组	0.28 ± 0.037[(1)(2)]	1.13 ± 0.268[(2)]	0.61 ± 0.19	0.99 ± 0.44

[(1)] 与 A 组比较,$P < 0.05$;[(2)] 与 C 组比较,$P < 0.05$

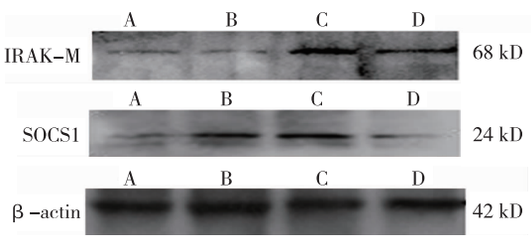


图 1 各组 IRAK-M 及 SOCS1 蛋白表达水平(Western blot)

Fig. 1 The expression levels of IRAK-M and SOCS1 in lung tissues of mice in each group

应,提高了药物利用度。药效浓度与药物剂量的直接关系不大,不同剂量的香囊所取得的效果非常接近[1]。苗药防感香囊由佳茏姣米、茏嘎勒和榜茏芜等天然药物组成,具有开窍醒脑、芳香辟秽、疏风散邪等功效。本课题组通过前期研究已证实持续吸入苗药防感香囊可使小鼠呼吸道及肺组织中 TLR2、TLR4、sIgA 及 IgG1 的表达上调及 IL-18、IL-2 的表达上调,促进获得性免疫应答细胞 $CD8^+$T、$CD4^+$T 细胞数量增加[2]。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是哺乳动物体内发现的一类与果蝇 Toll 蛋白具有同源性的受体家族,是固有免疫反应的模式识别受体,参与识别病原体、介导前炎症细胞因子的产生、启动免疫应答,为机体天然免疫的第一道防线[3]。目前为止,已发现多种 TLR 信号通路的负向调控分子,包括 IRAK-M、SOCS-1、A20、Tank、SIGIRR 及 ST2 等[4]。

IRAK-M 缺陷的细胞能够产生更多的细胞因子,对细菌感染的应答增强。IRAK-M 对 TLRs 信号转导负性调控的机制,目前还不十分清楚。IRAK-M 可能通过抑制 IRAK-1 的磷酸化,防止其与受体复合物分离,并促进 IRAK-1、IRAK-4 和 MyD88 之间的结合,进而对 TLRs 介导的信号通路起负性调控作用[4]。SOCS1 作为 TLR 信号通路的负向调控蛋白,能够在体内负性调节 IFN-γ 的信号转导;体外实验中过度表达 SOCSl 可完全阻断 IFN-γ 信号,在胚胎期参与调节 T 细胞的分化,负性调控树突状细胞的功能,避免自身免疫性疾病[5-6]。IRAK-M、SOCS-1 表达的下调,可增强 TLRs 介导的天然免疫功能,有效清除入侵病原体。

本研究结果表明苗药防感香囊能够下调 TLR 通路的负性调控因子 IRAK-M 和 SOCS1 mRNA 及 SOCS1 蛋白的表达水平,提高肺部局部免疫力,从而保护机体免受呼吸道感染性疾病的侵袭,香囊对机体的这种保护作用在冷刺激的条件下仍然持续存在。苗药防感香囊给药途径易被广大群众所接受,值得广泛推广应用,是防止呼吸道感染尤其是流行性感冒的好方法[7]。

4 参考文献

[1] 王旭东,谢飞,高益明. 辟秽香囊抗流感病毒的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2010(6):927.

[2] 张权,孟庆志. 苗药防感香囊对小鼠呼吸道 TLR2/4、SIgA、IgG1 的影响[J]. 时珍国医国药, 2012(11):2905 - 2906.

[3] 王慧,张权,程明亮,等. 香囊对小鼠呼吸道 TLR2、TLR4 基因及蛋白表达的影响[C]. 中华医学会呼吸病学年会论文汇编, 2011 :390 - 392.

[4] Kobayashi K, Hemandez LD, Galhn JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling[J]. Cell, 2002(2):191 - 202.

[5] Madonna S, Scarponi C, De P O, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK 1/2 activation[J]. FASEB J, 2008(9):3287 - 3297.

[6] Hananda T. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity[J]. Immunity, 2003(19):437 - 450.

[7] 沈微,陈华. 香佩疗法预防老年人上呼吸道感染效果观察[J]. 中国民族民间医药, 2010(2):105.

(2014-07-25 收稿,2014-08-18 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:赵 毅