

基于 TLR3/TAK/NF-κB 信号通路探究壮宣饮对 H1N1 流感病毒性肺炎大鼠肺损伤的保护作用

邹 敏¹, 翟 阳², 肖持坚¹, 梁 敏¹, 徐怡辉¹, 兰小婉¹, 梅小平^{3*}

(1. 广西国际壮医医院儿科, 广西南宁 530001; 2. 广西国际壮医医院脑病科, 广西南宁 530001; 3. 广西国际壮医医院内分泌代谢病科, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 探讨壮宣饮对 H1N1 流感病毒性肺炎大鼠肺损伤及 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路的影响。**方法** 将大鼠随机分为对照组、模型组、奥司他韦组 (13.5 mg/kg) 和壮宣饮高、中、低剂量组 (14.0、7.0、3.5 g/kg), 每组 12 只。采用甲型流感病毒 H1N1 滴鼻法建立流感病毒性肺炎大鼠模型, 造模 24 h 后灌胃给予相应剂量药物。给药 5 d 后观察大鼠一般状态变化, 检测大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 水平, 计算肺湿/干重比, HE 染色观察大鼠肺组织病理学变化, RT-qPCR 法检测肺组织 H1N1 病毒载量, Western blot 法检测肺组织 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠精神萎靡、毛色无光泽、呼吸加快、行动迟缓、体质量下降, 肺湿/干重比值和 BALF 中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 水平升高 ($P<0.01$), 肺组织病理学评分、H1N1 病毒载量、TLR3、p-IκBα 蛋白表达及 p-TAK1/TAK1、p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值升高 ($P<0.01$), IκBα 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 奥司他韦组和壮宣饮各剂量组大鼠精神状态良好, 皮毛有光泽, 呼吸较平稳, 体质量增加, 肺湿/干重比值和 BALF 中 TNF-α、IFN-γ、IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 肺组织病理学评分、H1N1 病毒载量、TLR3、p-IκBα 蛋白表达及 p-TAK1/TAK1、p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), IκBα 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 壮宣饮可有效降低促炎细胞因子的释放, 减轻 H1N1 流感病毒性肺炎大鼠的肺损伤, 其作用机制可能与抑制 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路有关。

关键词: 壮宣饮; 流感病毒性肺炎; H1N1; TLR3; TAK1; NF-κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3420-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.044

病毒性呼吸道感染 (如甲型流感病毒) 是世界范围内常见且危及生命的疾病^[1]。肺上皮细胞是甲型流感病毒复制的主要部位, 肺下呼吸道感染可能会发展为致命的肺炎^[2]。Toll 样受体 3 (toll-like receptors 3, TLR3) 在肺上皮细胞对甲型流感病毒的免疫反应中起关键作用^[3]。在病毒复制过程中产生的双链 RNA (dsRNA) 被 TLR3 感知, 甲型流感病毒优先激活 TLR3, TLR3 在感染致命的甲型流感病毒和随后的炎症过程中起关键作用^[4]。转化生长因子 β 激活激酶 1 (transforming growth factor-β-activated kinase 1, TAK1) 已被证明是 TLR 信号传导介质, TLR3 通过促进 TAK1 活化导致核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 等下游反应元件激活, 最终导致促炎因子释放^[5-6]。故针对 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路开发更安全有效的抗炎抗病毒药物具有重要意义。

中医药及特定方剂在病毒感染防治上具有其独特的优势和发展前景^[7]。壮宣饮是在壮药龙盘止咳方基础上化裁

而来, 具扶正补虚、清热宣肺、化痰止咳功效。现代药理研究表明, 壮药龙盘止咳方对肺部炎症损伤具有保护作用^[8-9], 还可能通过抑制 TLR3/NF-κB 信号通路, 减轻甲型流感病毒感染小鼠肺损伤^[10]。而壮宣饮是否对流感病毒性肺炎具有保护作用尚未可知。因此, 本研究采用甲型流感病毒的常见亚型 H1N1 诱导建立流感病毒性肺炎大鼠模型, 探究壮宣饮抗流感作用, 并分析其潜在机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 72 只, 体质量 300~350 g, 7~8 周龄, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 2019-0003], 饲养于广西中医药大学 [实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2019-0001], 环境温度 (20±2)℃, 相对湿度 45%~55%, 保持 12 h/12 h 光照/黑暗循环。动物实验经广西国际壮医医院动物伦理委员会审查通过 (伦理号 GXZYY20210018)。

收稿日期: 2022-08-15

基金项目: 2021 年度中医药自筹经费科研课题 (20210036); 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (2018KY0302); 2021 年广西国际壮医医院院级科研课题 (GZ2021012)

作者简介: 邹 敏 (1989—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为小儿肺系、脾系疾病防治。E-mail: erkty09@163.com

* **通信作者:** 梅小平 (1989—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为内分泌疾病的中西医防治。E-mail: bsle17@163.com

1.2 病毒 甲型流感病毒毒株 A/PuertoRico/8/34 (PR8, H1N1) 由中国疾病预防控制中心提供。病毒接种在 Madin-Darby 犬肾细胞 (MDCK) 中进行纯化, 在 10 日龄的鸡胚中进行复制, 通过噬斑测定确定病毒滴度。实验开始前, 在大鼠中预先滴定不同浓度病毒以确定合适的攻击剂量, 最终确定 1×10^6 PFU/mL 的浓度建立 H1N1 肺炎大鼠模型。所有涉及病毒感染的实验均在生物安全三级 (BSL-3) 实验室进行。

1.3 药物 壮宣饮由龙脷叶 10 g、鱼腥草 10 g、不出林 5 g、柿叶 5 g、盘龙参 5 g、陈皮 10 g、法半夏 5 g、炙麻黄 5 g、五味子 5 g、白术 8 g、炒麦芽 8 g、甘草 3 g 组成, 均购自北京同仁堂南宁大药房, 经专家鉴定为正品, 由广西国际壮医医院制剂室制备。将上述药材加水煎煮 2 次后合并药液, 浓缩至生药量 0.7 g/mL。磷酸奥司他韦颗粒 (宜昌东阳光长江药业股份有限公司, 国药准字 H20080763, 15 mg, 批号 190614)。

1.4 试剂 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C0105S); 大鼠 IL-6、TNF- α 、IFN- γ ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 货号 ml102828、ml002859、ml064291); 兔源一抗 TLR3、TAK1、p-TAK1、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、 β -actin (英国 Abcam 公司, 货号 ab137722、ab109526、ab109404、ab16502、ab76302、ab8227)。

1.5 仪器 iMark680 多功能酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); ABI Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); BX53 光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 分组、建模及给药 将大鼠随机分为对照组、模型组、奥司他韦组 (13.5 mg/kg) 和壮宣饮高、中、低剂量组 (14.0、7.0、3.5 g/kg), 每组 12 只, 腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 除对照组外其余各组大鼠鼻内滴入 100 μ L 甲型流感病毒 (PR8) 病毒溶液 (1×10^6 PFU/mL) 诱导建立感染肺炎模型^[11]; 对照组滴入等量无菌生理盐水, 感染大鼠均未死亡。感染 24 h 后, 各给药组灌胃给予相应剂量药物, 对照组灌胃给予等体积生理盐水, 每天 2 次 (早晚各 1 次), 持续 5 d。

2.2 指标检测

2.2.1 大鼠一般状态 在实验过程中观察大鼠一般状态变化, 包括精神状态、活动、饮食、毛色、体质量等。

2.2.2 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症因子水平 给药结束后, 每组随机选取 6 只大鼠, 在无菌条件下于颈部正中行气管插管, 分离气管叉并结扎右侧肺主支气管, 将 2 mL 生理盐水通过注射器缓慢注入左肺, 重复 3 次, 回收 BALF (约 3 mL)。纱布过滤后将 BALF 于 4 $^{\circ}$ C 下 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测。通过 ELISA 法检测 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平。

2.2.3 肺湿/干重比 收集 BALF 后处死大鼠, 取左侧肺组织, PBS 洗涤后滤纸干燥并称量湿重, 然后放入 80 $^{\circ}$ C 烘

箱中连续干燥 48 h, 再称量干重, 计算肺湿/干重比。

2.2.4 肺组织病理学观察 剩余 6 只大鼠处死后取肺组织, 将左肺于 4% 多聚甲醛中固定用于组织病理学分析; 右肺置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。将固定的左肺组织用石蜡包埋, 然后切 5 μ m 切片, 经脱蜡水化后, 用 HE 染液进行染色, 于光学显微镜下观察, 并评估肺损伤的严重程度^[12]。评分标准为 0 分, 肺组织正常, 未见明显病理损伤; 1 分, 肺组织炎性细胞浸润低于 25%, 肺泡腔内无炎性分泌物; 2 分, 肺组织炎性细胞浸润范围 25% ~ 50%, 肺泡腔内有少量炎性分泌物和炎性细胞; 3 分, 肺组织炎性细胞浸润范围 50% ~ 75%, 肺泡腔内可见大量炎性分泌物和炎性细胞; 4 分, 肺受累范围大于 75%, 肺泡腔内充满炎性分泌物和炎性细胞并扩张。

2.2.5 RT-qPCR 法检测肺组织 H1N1 病毒载量 使用 TRIzol 试剂提取右肺下叶组织总 RNA, 使用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成 cDNA, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒在 ABI Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR 反应。反应体系 (20 μ L) 为 1 μ L cDNA、10 μ L 2 $\times$ SYBR Green Supermix、正反向引物各 1 μ L、7 μ L ddH₂O。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因, 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算病毒相对定量。H1N1 病毒 M 基因正向引物序列 5'-GAGAAAGAAGTCCTTGTGC-3', 反向引物序列 5'-TCTATCATCCAGTCCATCCC-3'; GAPDH 正向引物序列 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3', 反向引物序列 5'-GGAAATTGTGAGGGAGATGC-3'。

2.2.6 Western blot 法检测肺组织 TLR3/TAK1/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达 将右肺中、下叶组织加 RIPA 缓冲液 (含蛋白酶和磷酸酶抑制剂) 裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即为总蛋白溶液。使用 BCA 试剂盒测量蛋白质浓度, 经煮沸变性后取等量蛋白 (30 μ g), 用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加一抗 TLR3、TAK1、p-TAK1、I κ B α 、p-I κ B α 、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、 β -actin (1 : 2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 与 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h。增强型化学发光试剂 (ECL) 显色, 通过 Image J 软件量化条带的灰度值, 以 β -actin 为内参计算目的蛋白表达量。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠一般状态的影响 对照组大鼠精神状态良好, 皮毛洁白有光泽, 饮食和呼吸均正常, 行动和反应灵敏, 体质量增加; 模型组大鼠精神萎靡, 毛色枯黄无光泽, 饮食减少, 呼吸加快, 行动迟缓, 体质量降低; 奥司他韦组和壮宣饮高剂量组大鼠精神状态较正

常，皮毛有光泽，饮食增加，呼吸较平稳，体质量增加；壮宣饮中、低剂量组大鼠精神状态一般，皮毛欠光泽，饮食尚可，呼吸有急促现象，行动和反应略迟钝，体质量增加较少，大鼠整体状态较模型组有所好转，见表 1。

表 1 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠体质量的影响 (g, $\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	给药前	给药后
对照组	319.65±28.29	370.98±31.20
模型组	314.40±30.05	325.46±27.35**
奥司他韦组	315.37±25.62	359.80±30.71 [#]
壮宣饮高剂量组	312.25±26.48	361.25±28.04 [#]
壮宣饮中剂量组	317.81±24.59	342.30±26.18
壮宣饮低剂量组	316.60±25.02	330.72±24.26

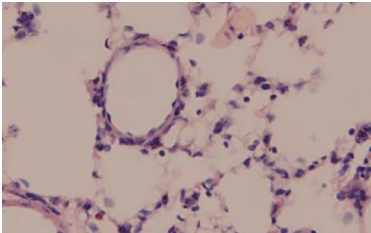
注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ 。

3.2 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平的影响 与对照组比较，模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，奥司他韦组和壮宣饮各剂量组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平降低 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见表 2。

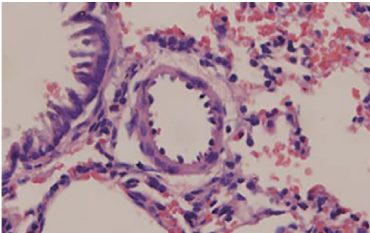
表 2 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平的影响 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	TNF- α	IFN- γ	IL-6
对照组	31.15±5.28	15.96±2.01	24.81±3.59
模型组	162.90±8.79**	89.72±5.25**	115.20±7.10**
奥司他韦组	59.72±6.03 ^{##}	35.30±4.20 ^{##}	47.53±4.21 ^{##}
壮宣饮高剂量组	56.45±6.14 ^{##}	33.54±3.61 ^{##}	41.66±5.17 ^{##}
壮宣饮中剂量组	88.31±7.50 ^{##}	58.18±4.79 ^{##}	65.85±5.90 ^{##}
壮宣饮低剂量组	124.25±9.01 ^{##}	70.23±5.04 ^{##}	83.14±6.82 ^{##}

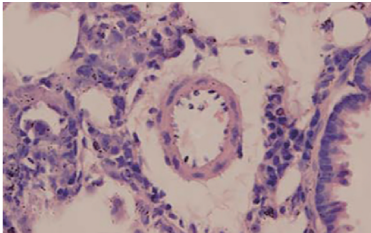
注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。



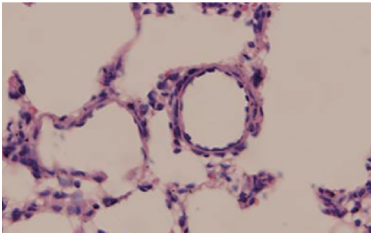
对照组



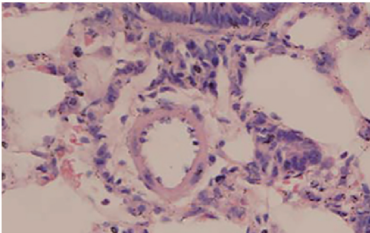
模型组



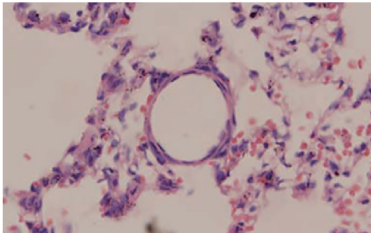
奥司他韦组



壮宣饮高剂量组



壮宣饮中剂量组



壮宣饮低剂量组

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色 (×200)

3.6 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺组织 TLR3/TAK1/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组大鼠肺组织 TLR3、p-I κ B α 蛋白表达和 p-TAK1/TAK1、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值升高 ($P<0.01$)，I κ B α 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，奥司他韦组和壮宣饮

3.3 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺湿/干重比的影响 与对照组比较，模型组大鼠湿/干重比值升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，奥司他韦组和壮宣饮各剂量组大鼠湿/干重比值降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见表 3。

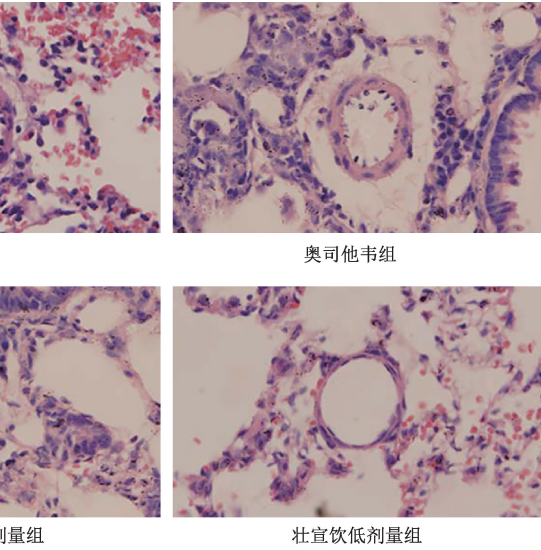
表 3 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺湿/干重比、组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	湿/干重比	病理学评分/分
对照组	2.68±0.32	0.39±0.05
模型组	4.79±0.50**	2.85±0.31**
奥司他韦组	3.25±0.38 ^{##}	1.47±0.19 ^{##}
壮宣饮高剂量组	3.19±0.35 ^{##}	1.42±0.16 ^{##}
壮宣饮中剂量组	3.64±0.42 ^{##}	1.89±0.20 ^{##}
壮宣饮低剂量组	4.00±0.45 [#]	2.36±0.27 ^{##}

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

3.4 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺组织病理形态的影响 对照组大鼠肺泡壁正常，肺泡腔完整，无炎性细胞浸润；模型组可见肺泡壁增厚，肺泡腔内大量炎性细胞浸润和渗出物，肺组织病理学评分较对照组升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，奥司他韦组和壮宣饮各剂量组大鼠肺泡壁增厚不明显，肺泡腔内炎性细胞浸润和渗出物减少，肺组织病理学评分降低 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见表 3、图 1。

3.5 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺组织 H1N1 病毒载量的影响 与对照组比较，模型组大鼠肺组织中 H1N1 病毒载量升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，奥司他韦组和壮宣饮各剂量组大鼠肺组织中 H1N1 病毒载量降低 ($P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见表 4。



各剂量组大鼠肺组织 TLR3、p-I κ B α 蛋白表达和 p-TAK1/TAK1、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 比值降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，I κ B α 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，并呈剂量依赖性，见图 2、表 5。

表 4 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺组织 H1N1 病毒载量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	H1N1 病毒拷贝数/cop
对照组	1.43±0.19
模型组	234 562.18±27 682.52**
奥司他韦组	68 357.41±10 857.08##
壮宣饮高剂量组	67 534.32±10 260.43##
壮宣饮中剂量组	113 580.60±16 428.75##
壮宣饮低剂量组	176 045.53±20 541.96##

注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

4 讨论

流感病毒性肺炎属中医“疫病”范畴，病变重心在肺，可累及脾胃。外邪侵肺，肺失宣肃，导致发热、咳嗽等症状，湿热郁阻中焦，脾胃运化失司，气机郁滞，可见呕吐、腹泻^[13-14]。因此，驱邪同时应兼以清热化湿、扶正补虚。

表 5 壮宣饮对流感病毒性肺炎大鼠肺组织 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

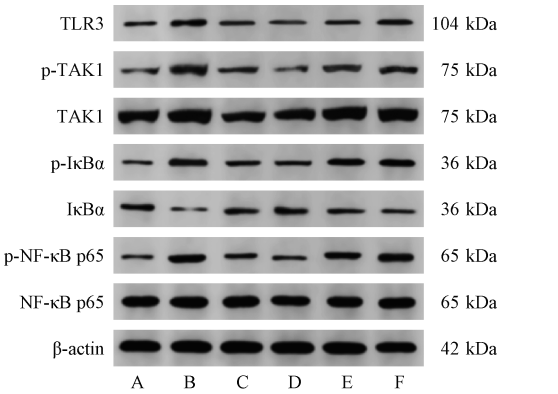
组别	TLR3	p-TAK1/TAK1	p-IκBα	IκBα	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	0.10±0.01	0.15±0.02	0.12±0.02	0.54±0.06	0.23±0.03
模型组	0.37±0.04**	0.60±0.07**	0.49±0.05**	0.16±0.03**	0.85±0.09**
奥司他韦组	0.19±0.03##	0.34±0.05##	0.25±0.04##	0.40±0.04##	0.46±0.06##
壮宣饮高剂量组	0.16±0.02##	0.31±0.04##	0.21±0.03##	0.42±0.05##	0.43±0.05##
壮宣饮中剂量组	0.24±0.03##	0.41±0.05##	0.30±0.04##	0.31±0.04##	0.59±0.07#
壮宣饮低剂量组	0.30±0.04##	0.50±0.06#	0.39±0.05##	0.24±0.03#	0.73±0.08#

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

壮宣饮是在壮药龙盘止咳方基础上结合临床经验及参考多部医书古籍研制而成。方中龙脷叶润肺止咳；盘龙参清热毒、止咳化痰；陈皮理气健脾、燥湿化痰；法半夏燥湿化痰、降逆止呕，共为主药通气道，调谷道，使之药直达咪钵（肺）；鱼腥草清热解毒、排脓消痈；不出林清热毒、除湿毒；炙麻黄宣肺平喘；五味子敛肺滋肾、益气生津，与麻黄合用可宣肺祛邪、补肺益阴；白术补气健脾；炒麦芽行气消食、健脾开胃，共为帮药。柿子叶通龙路；甘草调和诸药，共为带药。诸药合用奏扶正补虚、清热宣肺、化痰止咳之功。临床研究表明，壮宣饮对呼吸系统急性感染性肺部炎症、咳嗽、咯痰等症状有显著疗效，可促进肺部炎症吸收。课题组前期研究表明，龙盘止咳方对甲型流感病毒感染肺炎小鼠有保护作用^[10]。

过度炎症浸润、病毒诱导的组织破坏和继发性细菌合并感染是与流感病毒感染相关的高发病率和死亡率的重要因素^[15]。TNF-α、IFN-γ 和 IL-6 是流感感染过程中重要促炎细胞因子，其上调可能导致患者气道炎症和肺组织破坏^[16]。TNF-α 抑制剂依那西普可提高小鼠存活率并抑制炎症细胞因子过度产生，减少肺损伤^[17]。本研究发现，H1N1 感染大鼠肺组织中炎症因子水平升高，肺湿/干重比增加，出现严重肺水肿，且肺泡腔内存在大量炎性细胞浸润和渗出物，表明 H1N1 感染引发大鼠肺部炎症反应。本研究结果显示，壮宣饮可降低 H1N1 感染大鼠肺组织中促炎细胞因子水平，减轻肺水肿和肺部炎症反应。

NF-κB 是应对损伤和感染的免疫和炎症过程的主要调



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为奥司他韦组，D~F 为壮宣饮高、中、低剂量组。

图 2 各组大鼠肺组织 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路相关蛋白条带

节因子^[18]。TLR3 是 RNA 病毒的主要先天免疫模式识别受体，通过转录因子 NF-κB 触发炎症反应^[19]。据报道，TLR3 识别并结合 dsRNA，导致 TLR3 表达增强，TLR3 通过募集 TRIF 和 TRAF6，促进 TAK1 活化，TAK1 磷酸化将与核因子 κB 激酶 β (IKKβ) 的抑制剂结合，导致 IκBα 磷酸化降解，随后 NF-κB 核易位激活炎症细胞因子的转录^[20]。本研究结果显示，H1N1 感染后大鼠肺组织中 TLR3 蛋白表达、IκBα 和 TAK1 的磷酸化水平均升高，同时 NF-κB p65 活化增加，表明 H1N1 感染后 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路的活化增强。给予壮宣饮干预后，H1N1 感染大鼠肺组织中 TLR3 蛋白表达、IκBα、TAK1 和 NF-κB p65 的磷酸化均降低，表明壮宣饮对 H1N1 诱导的肺炎大鼠促炎细胞因子释放的抑制作用可能是由于壮宣饮对 TLR3 过表达和 TAK1 磷酸化的抑制。

综上所述，壮宣饮可降低促炎细胞因子的释放，减轻 H1N1 流感病毒性肺炎大鼠的肺损伤，可能与抑制 TLR3/TAK1/NF-κB 信号通路有关。

参考文献：

[1] Murillo-Zamora E, Trujillo X, Huerta M, *et al.* Survival in influenza virus-related pneumonia by viral subtype: 2016-2020 [J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 112: 288-293.

[2] Chen L, Han X D, Li Y L, *et al.* Severity and outcomes of influenza-related pneumonia in type A and B strains in China, 2013-2019[J]. *Infect Dis Poverty*, 2020, 9(1): 42.

[3] Ling L J, Lu Y, Zhang Y Y, *et al.* Flavonoids from *Houttuynia cordata* attenuate H1N1-induced acute lung injury in mice *via*

inhibition of influenza virus and Toll-like receptor signalling[J]. *Phytomedicine*, 2020, 67: 153150.

[4] Huo C Y, Jin Y, Zou S M, *et al.* Lethal influenza A virus preferentially activates TLR3 and triggers a severe inflammatory response[J]. *Virus Res*, 2018, 257: 102-112.

[5] Guo Z H, Liu P P, Wang H, *et al.* Inhibitory effects of luteolin on TLR3-mediated inflammation caused by TAK/NF-κB signaling in human corneal fibroblasts[J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(3): 371-379.

[6] Ramu S, Calvén J, Michaeloudes C, *et al.* TLR3/TAK1 signalling regulates rhinovirus-induced interleukin-33 in bronchial smooth muscle cells[J]. *ERJ Open Res*, 2020, 6(4): 00147-2020.

[7] Huang K, Zhang P, Zhang Z H, *et al.* Traditional Chinese Medicine (TCM) in the treatment of COVID-19 and other viral infections; Efficacies and mechanisms [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107843.

[8] 邹 敏, 韦 杏, 农志飞, 等. 壮药龙盘止咳方对急性气管-支气管炎幼鼠模型 IL-4/IFN-γ 和基质金属蛋白酶的影响 [J]. 山西中医药大学学报, 2021, 22(6): 414-419.

[9] 韦 杏, 邹 敏, 李崇进, 等. 壮药龙盘止咳方通过调控 p38 MAPK/NF-κB/NLRP3 通路减轻急性支气管炎小鼠肺损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(10): 1828-1837.

[10] 邹 敏, 谢彩英, 甘 娜, 等. 壮药龙盘止咳方治疗小鼠甲型流感病毒 H1N1 肺炎的作用及机制[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(3): 526-534.

[11] 谷 秀, 刘宏博, 李胜岐. 甲型流感病毒对于在体大鼠肺泡上皮液体清除的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(6): 422-424.

[12] Liu W, Ren X J, Wang Q, *et al.* Pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase by olaparib ameliorates influenza-virus-induced pneumonia in mice [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2021, 40(1): 159-167.

[13] 刘丽婷, 李 杰, 彭桂英, 等. 基于中医理论探索传染性非典型性肺炎、甲型 H1N1 流感和新型冠状病毒肺炎证治异同[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(1): 208-212.

[14] 石克华, 折 哲, 孙永顺, 等. 基于“祛邪为第一要义”从清热化湿论治新型冠状病毒肺炎[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(8): 9-15.

[15] 王 超, 刘 洋, 秦波音, 等. 甲型流感病毒 H1N1pdm09 与 PR8 感染 C57BL/6 小鼠诱发特异性 CD8⁺T 细胞免疫应答的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 561-570.

[16] Alagarasu K, Kaushal H, Shinde P, *et al.* TNFA and IL10 polymorphisms and IL-6 and IL-10 levels influence disease severity in influenza A (H1N1) pdm09 virus infected patients [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(12): 1914.

[17] Shi X L, Zhou W, Huang H, *et al.* Inhibition of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha with etanercept provides protection against lethal H1N1 influenza infection in mice[J]. *Crit Care*, 2013, 17(6): R301.

[18] 赵 新. 汉黄芩苷对糖尿病大鼠肾组织炎症因子表达及 TLR4/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(8): 2166-2169.

[19] Unniyampurath U, Crisci A, Krishnan M N. Loss of function genetic screen identifies ATM kinase as a positive regulator of TLR3-mediated NF-κB activation [J]. *iScience*, 2020, 23(8): 101356.

[20] Guo Z H, Liu P P, Wang H, *et al.* Inhibitory effects of luteolin on TLR3-mediated inflammation caused by TAK/NF-κB signaling in human corneal fibroblasts[J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(3): 371-379.