人参提取物对 I 型干扰素及下游基因表达的调节作用

边 帅， 孙 雪， 韩小伟， 赵大庆， 王佳雯*
(长春中医药大学，吉林省人参科学研究院，吉林 长春 130117)

摘要：目的 探讨人参提取物对 I 型干扰素及下游基因表达的调节作用。**方法** 培养 THP-1 细胞并加入人参提取物后，ELISA 检测干扰素-α、干扰素-β 分泌水平，Real-time PCR 检测 BST-2、APOBEC3G 表达。**结果** 与空白组比较，人参提取物组干扰素-α 分泌水平显著提高（$P<0.01$），但对干扰素-β 无明显影响（$P>0.05$）；与对照 siRNA 组比较，该组 BST-2、APOBEC3G 表达显著提高（$P<0.01$），并与干扰素-α 诱导呈正相关。**结论** 人参提取物可通过 Toll 样受体途径诱导单核细胞分泌干扰素-α，从而提高抗病毒因子表达。

关键词：人参提取物；I 型干扰素；下游基因
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)01-0051-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.01.011

Regulatory effects of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract on the expressions of type I interferons and downstream genes

BIAN Shuai, SUN Xue, HAN Xiao-wei, ZHAO Da-qing, WANG Jia-wen*
(*Jilin Provincial Research Institute for Ginseng, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

ABSTRACT: AIM To explore the regulatory effects of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract on expressions of type I interferons and downstream genes. **METHODS** After the addition of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract into cultured THP-1 cells, the detection of interferon-α, interferon-β secretion levels and BST-2, APOBEC3G expressions by ELISA and Real-time PCR were practiced, respectively. **RESULTS** *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract group exhibited significantly increased interferon-α secretion level ($P<0.01$) without obvious effect on that of interferon-β ($P>0.05$) when compared with the blank group; and it also demonstrated markedly increased BST-2, APOBEC3G expressions ($P<0.01$), showing a positive correlation with interferon-α induction when compared with siRNA control group. **CONCLUSION** *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract can induce interferon-α secretion of monocytes via Toll-like receptor pathway and thus improve the antiviral factors expressions.

KEY WORDS: *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract; type I interferons; downstream genes

目前，已知人体产生的干扰素共有 13 种，分为 I 型、II 型、III 型三大家族，其中 I 型干扰素以干扰素-α、干扰素-β 为主，由先天性免疫细胞（单核细胞和淋巴细胞）分泌，是参与抗病毒免疫的重要效应分子；II 型干扰素为干扰素-γ，主要由活化后的 T 细胞分泌产生；III 型干扰素为几种干扰素-λ，其已知的分布与功能都比较有限[1]。Toll 样受体及维甲酸诱导基因 I 样受体途径是机体感染后产生 I 型干扰素的两大主要途径，可利用胞内信号分子传递来激活转录因子 IRF3/7，从而启动 I 型干扰素基因表达[2]。另外，干扰素可通过促进下游一些干扰素刺激基因表达来达到抑制病毒复制的能力，这些基因所编码的蛋白包括 Mx1 蛋白、BST-2 蛋白、APOBEC 家族蛋白、TRIM 蛋白等[3]。

近年来，对人参提取物及皂苷抗病毒的研究有了初步进展，发现人参提取物及人参皂苷对多种病

收稿日期：2018-01-12
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81503324）；中国博士后科学基金资助项目（2017M621181）
作者简介：边 帅（1991—），女，博士生，研究方向为中药化学。E-mail：328130803@qq.com
*通信作者：王佳雯，女，助理研究员。E-mail：wangjiawen1229@163.com

毒的感染及病毒感染后的细胞炎症或凋亡有一定抑制作用，其中人参皂苷 Re、Rf、Rg_2 能抑制柯萨奇病毒 CVB3、人鼻病毒 HRV3、肠道病毒 EV71 感染[4]；Rb_1、Rg_1 处理细胞后显著降低猫杯状病毒 FCV 和人甲肝病毒 HAV 的感染率[5-6]；Rg3 能通过刺激 TRAF6/TAK1 降解和抑制 JNK/AP-1 信号通路来影响人乙肝病毒 HBV 复制[7]；Rb_2、Rg_3 能保护新生小鼠免受轮状病毒的感染[8]。同时，人参提取物作用于细胞时，可减少 H9N2 型流感病毒感染所带来的细胞凋亡和 DNA 损伤[9]；对细胞进行人参提取物的预处理可降低鼠诺如病毒 MNV 和 FCV 的感染[10]；红参对 HIV-1 患者生存期具有一定的延长作用[11]，这可能是通过调控一种或多种宿主抗病毒蛋白来完成，如广谱抗病毒的 APOBEC3G（A3G）、BST-2 等因子，从而限制了多种病毒的感染。

本实验以人参提取物为对象，通过考察其对 THP-1 细胞的作用来检测Ⅰ型干扰素表达和分泌变化，同时测定下游抗病毒因子表达，在分子水平上研究其抗病毒具体机制。

1 材料

1.1 细胞和试剂 人单核细胞 THP-1（编号 TIB-202）、HEK293T（编号 CRL-11268）（ATCC 细胞库）；DMEM 高糖培养基（编号 SH30022.01）、1640 培养基（编号 SH30809.01）、双抗（编号 SV30010）（美国 Hyclone 公司）；胎牛血清（美国 Gibco 公司，16000-044）；DMSO（北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，编号 77H00150）；Trizol（美国 Thermo Fisher Scientfic 公司，编号 15596026）；转染试剂 X-tremeGENE siRNA（瑞士 Roche 公司，编号 04476093001）；ELISA 试剂盒（美国 Cloud-Clone Corp 公司，编号 SEA033Hu、SEA222Hu）；反转录试剂盒（日本 TaKaRa 公司，编号 RR037 A）；siRNA（上海吉玛制药技术有限公司）；PCR 引物（长春华大中天生物技术有限公司）。

1.2 仪器 二氧化碳细胞培养箱（美国 Thermo 公司）；生物安全柜（苏州净化设备有限公司）；Infinite© 200 Pro 多功能微孔板分析仪（瑞士 Tecan 公司）；Real-Time PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 人参提取物制备 干燥人参根（产地吉林抚松）粉碎-煎煮-浓缩-喷雾干燥-粉碎-过筛。然后，取 100 mg 成品（约为 10 g 生药材）溶于 1 mL 无菌水中，37 ℃下助溶，测得人参总皂苷含有量≥10%。

2.2 干扰素分泌水平检测 THP-1 细胞接种于 24 孔板中，加入人参提取物（终质量浓度 0.5 mg/mL），48 h 后收集细胞培养液，离心去除细胞，取上清液，通过 ELISA 法检测干扰素-α、干扰素-β 分泌情况。操作过程如下：（1）各组分和样品置于室温下；（2）稀释对照品；（3）将样品和对照品分别加入孔板中，37 ℃下孵育 2 h；（4）移除液体，加入稀释过的一抗，37 ℃下孵育 1 h；（5）移除液体，洗涤 3 次；（6）加入稀释过的二抗，37 ℃下孵育 0.5 h；（7）移除液体，洗涤 5 次；（8）加入显色液，37 ℃下孵育 10～20 min，避光；（9）加入终止液，450 nm 波长下检测，根据标准曲线计算干扰素-α、干扰素-β 浓度。

2.3 基因表达检测 THP-1 细胞接种于 24 孔板中，加入人参提取物，24 h 后收集细胞，Trizol 法提取 RNA 并检测其浓度，通过逆转录酶及 Oligo（dT）进行逆转录 PCR，获得 cDNA。然后，应用荧光标记试剂和特异性引物，通过荧光定量 PCR 仪进行扩增，收集数据，分析相对 mRNA 量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

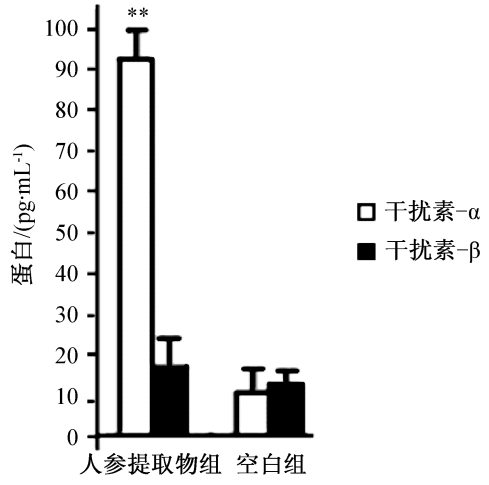
引物	序列
BST-2F	CTGCAACCACACTGTGATG
BST-2R	ACGCGTCCTGAAGCTTATG
A3GF	TTACCTGCTTCACCTCCTGG
A3GR	TCATCTAGTCCATCCCAGGG
GAPDH F	GTCCACTGGCGTCTTCACCA
GAPDH R	GTGGCAGTGATGG CATGGAC

2.4 细胞培养和转染 THP-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中，培养温度 37 ℃，CO_2 体积分数 5%；HEK293T 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，培养温度 37 ℃，CO_2 体积分数 5%。然后，使用 X-tremeGENE siRNA 转染试剂，按照使用说明书进行细胞转染。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，样本率比较采用卡方检验，样本均数比较采用成组设计的方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人参提取物对Ⅰ型干扰素的诱导作用 图 1 显示，与空白组比较，人参提取物组干扰素-α 分泌水平显著提高（$P<0.01$），达到（92±7）pg/mL 左右，但对干扰素-β 无明显影响（$P>0.05$）。



注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$

图 1 人参提取物对干扰素-α、干扰素-β 分泌水平的影响

Fig. 1 Effects of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract on interferon-α and interferon-β secretion levels

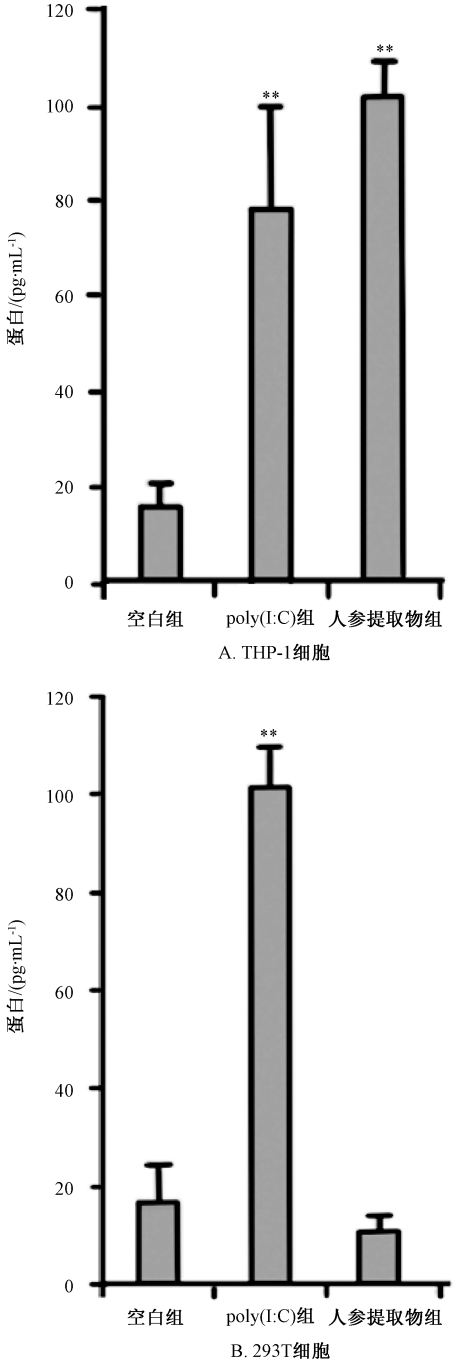
3.2 人参提取物对干扰素-α 的诱导途径 图 2 显示，与空白组比较，在 THP-1、293T 细胞中加入Ⅰ型干扰素诱导剂 poly（I：C）后，培养上清中干扰素-α 分泌水平均显著提高（$P<0.01$）；人参提取物在 THP-1 细胞中能显著诱导其表达（$P<0.01$），但在 293T 细胞中不明显（$P>0.05$）。

3.3 干扰素-α 下游基因表达 图 3 显示，与空白组比较，人参提取物组 BST-2、APOBEC3G 表达显著提高（$P<0.01$）。

3.4 沉默干扰素-α 对 BST-2、APOBEC3G 表达的影响 图 4 显示，转染靶向干扰素-α 的 siRNA 后干扰素-α 表达显著下降（$P<0.01$）；加入人参提取物后，BST-2、APOBEC3G 表达显著提高（$P<0.01$）；但沉默干扰素-α 后，即使再加入人参提取物两者表达也无明显提高（$P>0.05$）。

4 讨论

干扰素作为一种广谱抗病毒剂，并不能直接杀伤或抑制病毒，而是通过一系列细胞信号通路产生多种抗病毒蛋白，从而抑制多种病毒复制，同时它还可增强 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞活力，起到免疫调节的作用，并增强机体免疫力，目前正应用于病毒性肝炎、手足口病、HPV 感染等多种疾病的治疗中[12-15]。研究表明，多种中药提取物具有提高机体内源性干扰素表达的能力，其中人参作为一种使用广泛的中药材，被认为具有提高机体免疫力的作用[16-17]。本实验发现，人参提取物具有较强的诱导 THP-1 细胞产生干扰素-α 作用，但对干扰素-β 无诱导效果。

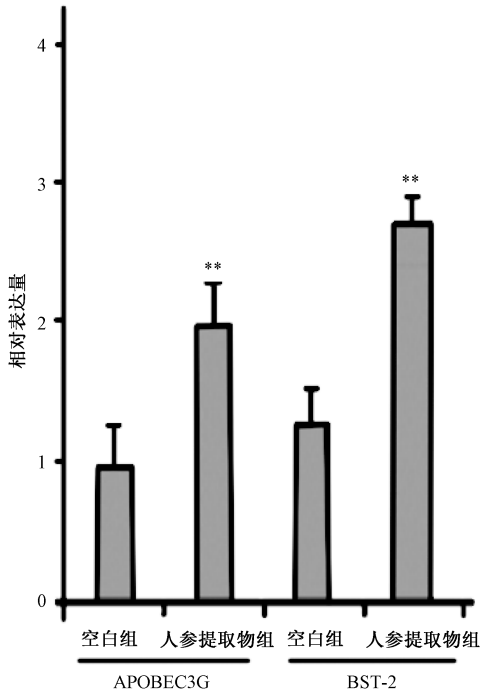


注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$

图 2 人参提取物对 THP-1、293T 细胞中干扰素-α 分泌水平的影响

Fig. 2 Effects of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract on interfeton-α secretion levels in THP-1 and 293T cells

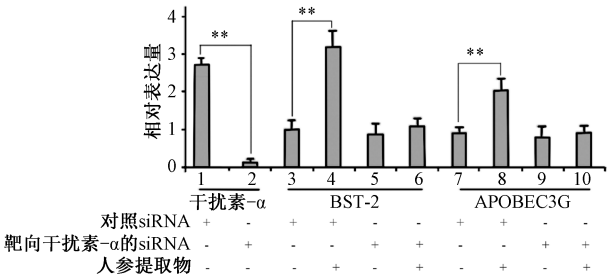
干扰素-α 主要通过 Toll 样受体及维甲酸诱导基因Ⅰ样受体途径来进行表达和分泌，但在 293T 细胞中仅存在后一种途径诱导方式[18]，故通过该细胞可判断诱导方式是否与维甲酸诱导基因Ⅰ样



注：与空白组比较，** $P<0.01$

图 3 人参提取物对 BST-2、APOBEC3G 表达的影响

Fig. 3 Effects of *Ginseng Radix* et *Rhizoma* extract on BST-2 and APOBEC3G expressions



注：与序号 1、3、7 比较，**$P<0.01$。-表示未加入，+表示加入

图 4 沉默干扰素-α 对 BST-2、APOBEC3G 表达的影响

Fig. 4 Effects of silenced interferon-α on BST-2 and APOBEC3G expressions

受体途径相关。本实验发现，人参提取物无法激活 293T 细胞内源性干扰素-α 分泌，表明人参皂苷对干扰素-α 的诱导是通过 Toll 样受体途径所致。

BST-2、APOBEC3G 是干扰素激活的 2 种重要广谱抗病毒因子[19-20]，加入人参提取物后可提高两者表达。但对干扰素-α 实施基因沉默技术后两者表达均受到抑制，说明诱导得到的干扰素具备正常的激活抗病毒因子功能，也提示人参提取物可能提高多种其他抗病毒因子表达，并激活免疫细胞的活力，一定程度上揭示了人参提高免疫力的分子机制。

参考文献：

[1] Le Page C, Génin P, Baines M G, *et al*. Interferon activation and innate immunity[J]. *Rev Immunogenet*, 2000, 2(3): 374-386.

[2] Brennan K, Bowie A G. Activation of host pattern recognition receptors by viruses[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(4): 503-507.

[3] Fernández-Suárez X M, Rigden D J, Galperin M Y. The 2014 nucleic acids research database issue and an updated NAR online molecular biology database collection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D1): D1-D6.

[4] Song J H, Choi H J, Song H H, *et al*. Antiviral activity of ginsenosides against coxsackievirus B3, enterovirus 71, and human rhinovirus 3[J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(3): 173-179.

[5] Lee M H, Seo D J, Kang J H, *et al*. Expression of antiviral cytokines in Crandell-Reese feline kidney cells pretreated with Korean red ginseng extract or ginsenosides[J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 70: 19-25.

[6] Lee M H, Lee B H, Lee S, *et al*. Reduction of hepatitis A virus on FRhK-4 cells treated with Korean red ginseng extract and ginsenosides[J]. *J Food Sci*, 2013, 78(9): M1412-M1415.

[7] Kang L J, Choi Y J, Lee S G. Stimulation of TRAF6/TAK1 degradation and inhibition of JNK/AP-1 signalling by ginsenoside Rg3 attenuates hepatitis B virus replication[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(11): 2612-2621.

[8] Yang H, Oh K H, Kim H J, *et al*. Ginsenoside-Rb2 and 20(*S*)-ginsenoside-Rg3 from Korean red ginseng prevent rotavirus infection in newborn mice[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(3): 391-396.

[9] Chan L Y, Kwok H H, Chan R W, *et al*. Dual functions of ginsenosides in protecting human endothelial cells against influenza H9N2-induced inflammation and apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1542-1546.

[10] Lee M H, Lee B H, Jung J Y, *et al*. Antiviral effect of Korean red ginseng extract and ginsenosides on murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus[J]. *J Ginseng Res*, 2011, 35(4): 429-435.

[11] Cho Y K, Kim J E. Effect of Korean Red Ginseng intake on the survival duration of human immunodeficiency virus type 1 patients[J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(1): 222-226.

[12] 葛迎春. 恩替卡韦联合长效干扰素治疗乙肝的临床研究[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(9): 202-203.

[13] 黄 蓉. 核黄素磷酸钠联合干扰素治疗小儿疱疹性咽峡炎的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(2): 186-189.

[14] 方 燕. 丙种球蛋白及干扰素治疗手足口病并发病毒性脑炎疗效观察[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2015, 18(15): 30-31.

[15] 袁建丽, 夏 阳. 扶正解毒祛湿汤联合重组人干扰素治疗宫颈 HPV 感染 45 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(12): 61-62.

[16] 丁刘刚, 郭晓蕾, 马忠华, 等. 人参辅酶 Q10 复配制剂增强

小鼠免疫力的实验研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(2): 225-227.
[17] 高文芹, 贾 力, 赵余庆. 人参的抗癌作用及其机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 53-58.
[18] Guo F, Mead J, Aliya N, *et al*. RO 90-7501 enhances TLR3 and RLR agonist induced antiviral response[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e42583.
[19] Trapp S, Derby N R, Singer R, *et al*. Double-stranded RNA analog poly (I∶C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G[J]. *J Virol*, 2009, 83(2): 884-895.
[20] Van D N, Goff D, Katsura C, *et al*. The interferon-induced protein BST-2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by HIV-1 Vpu[J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(4): 245-252.

30 种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性的筛选

郝 悦[1,2], 焦安妮[3], 于 敏[2], 高金芝[1], 何 鑫[2], 张梦鹊[1], 焦连庆[2*], 张 晶[1*]
(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012; 3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130121)

摘要: 目的 筛选 30 种黄酮抑制黄嘌呤氧化酶活性。**方法** 改良的 HPLC 法测定各黄酮抑制率, 以筛选活性成分。腹腔注射氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠模型后, 磷钨酸法检测血清尿酸水平, 分光光度法检测血清黄嘌呤氧化酶水平, 脲酶法检测血清尿素氮水平, 肌氨酸氧化酶法测血清肌酐水平。**结果** 12 种黄酮在 120 μmol/L 浓度下、9 种黄酮在 60 μmol/L 浓度下对黄嘌呤氧化酶有抑制作用, 以木犀草素、槲皮素、芹菜素、山柰酚作用最强, IC_{50} 值分别为 42.02、120.22、135.98、184.36 μmol/L。与模型组比较, 木犀草素组 (20、40、80 mg/kg)、芹菜素组 (200 mg/kg)、山柰酚组 (150、300 mg/kg) 尿酸、黄嘌呤氧化酶、尿素氮、肌酐水平显著降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 3 种黄酮 (木犀草素、山柰酚、芹菜素) 可明显抑制黄嘌呤氧化酶活性, 从而呈现出降尿酸作用。

关键词: 黄酮; 黄嘌呤氧化酶; 高尿酸血症
中图分类号: R966 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-1528(2019)01-0055-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.01.012

Activity screening of thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase

HAO Yue[1,2], JIAO An-ni[3], YU Min[2], GAO Jin-zhi[1], HE Xin[2], ZHANG Meng-hu[1], JIAO Lian-qing[2*], ZHANG Jing[1*]
(*1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Institute for Plant Chemistry, Jinlin Provincial TCM Academy, Changchun 130012, China; 3. School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130121, China*)

ABSTRACT: AIM To screen thirty flavonoids on the inhibition of xanthine oxidase activity. **METHODS** Modified HPLC was adopted in the inhibition rate determination of various flavonoids for active constituents screening. After the induction of hyperuricemia mouse models by intraperitoneal injection of oteracil potassium, the serum levels of uric acid, xanthine oxidase, urea nitrogen, creatinine were detected by methods of phosphotungstic acid, spectrophotometry, urease, and sarcosine oxidase, respectively. **RESULTS** Twelve flavonoids at the concentration of 120 μmol/L, and nine flavonoids at the concentration of 60 μmol/L exhibited inhibitory effects on xanthine oxidase, among which luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol with IC_{50} values of 42.02, 120.22, 135.98, 184.36 μmol/L, respectively were found to be the strongest. Compared with the model group, luteolin

收稿日期: 2018-03-01
作者简介: 郝 悦 (1992—), 女, 硕士生, 从事天然药物化学研究。Tel: 15764317120, E-mail: 1252293335@qq.com
***通信作者**: 焦连庆 (1965—), 博士, 主任药师, 从事天然药物化学及代谢研究。Tel: 18686602593, E-mail: jlq51@tom.com
张 晶 (1971—), 博士, 教授, 从事天然药物化学研究。Tel: 13353144693, E-mail: zhjing0701@163.com