

9种中药益生菌复方抗病毒性炎症功效的比较

郭丽娜¹, 朱佳仪², 郑康帝², 张 召², 罗艳雯³, 莫丽仪³, 林东子^{3*} (1. 广东省中医院临床营养科, 广东广州 510120; 2. 广东省人体微生态工程技术研究中心, 广东广州 510535; 3. 佛山市南海区第四人民医院检验科, 广东佛山 528211)

摘要: **目的** 了解9种中药益生菌复方抗病毒性炎症的能力。**方法** MTT实验评估9种中药益生菌复方的生物安全性; 利用聚基胞苷酸[poly(I:C)]诱导巨噬细胞RAW 264.7发生炎症反应, 检测细胞上清液中白细胞介素6(IL-6)水平。Poly(I:C)诱导绿色荧光蛋白标记中性粒细胞的斑马鱼鱼鳃发生炎症反应, 统计鱼鳃处中性粒细胞水平。**结果** 9种中药益生菌复方中, 复方8和9号对poly(I:C)诱导RAW264.7细胞发生炎症反应表现出剂量依赖性的抗炎功效, 复方4和7号仅在高剂量时可抑制细胞炎症反应($P<0.01$ 或 0.05)。高剂量6、8号复方及中高剂量9号复方斑马鱼鱼鳃处中性粒细胞个数均少于模型对照组($P<0.01$ 或 0.05)。**结论** 9种中药益生菌复方中9号复方的抗炎效果最好, 对poly(I:C)诱导RAW 264.7细胞释放炎症因子IL-6抑制率最高, 并且在poly(I:C)诱导的斑马鱼炎症模型中能显著阻断中性粒细胞向鱼鳃处迁徙, 具有较高的抗病毒性炎症功效。

关键词: 中药; 益生菌; 病毒性炎症

中图分类号: R 735

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 02-0128-07

Comparison of the anti-viral-inflammatory of 9 kinds of traditional Chinese medicine probiotics

GUO Li-na¹, ZHU Jia-yi², ZHENG Kang-di², ZHANG Zhao², LUO Yan-wen³, MO Li-yi³, LIN Dong-zi^{3*} (1. Department of Clinical Nutrition, Guangdong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. Guangdong Human Microecology Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510535, China; 3. Department of Clinical Laboratory, The Fourth People's Hospital of Nanhai District, Foshan 528211, China)

Abstract: **Objective** To compare the anti-viral-inflammatory ability of 9 kinds of traditional Chinese medicine probiotics, and select the most effective anti-viral-inflammatory traditional Chinese medicine probiotics for the treatment of viral-inflammation. **Methods** The cytotoxicity and biocompatibility of 9 kinds of traditional Chinese medicine probiotics were compared by using MTT methods. Poly(I:C) was used to induce macrophage RAW 264.7 to initiate an inflammatory response. The concentration of inflammatory marker interleukin-6 (IL-6) in the cell supernatant was detected to evaluate the anti-inflammatory efficacy of the traditional Chinese medicine probiotics at the cellular level. In animal experiments, 9 kinds of traditional Chinese medicine probiotics were pretreated, and then poly(I:C) was injected into zebrafish labeled with green fluorescent protein neutrophils as inducer, and the inflammation model of zebrafish swim bladder was constructed. The number of neutrophils in the swim bladder was observed and counted by fluorescence microscope. **Results** Among the 9 kinds of Chinese herbal probiotic compounds, Compound 8 and 9 showed dose-dependent anti-inflammatory effect on RAW264.7 cells induced by poly(I:C), while compound 4 and 7 inhibited cell inflammatory response only at high doses ($P<0.01$ or 0.05). The number of neutrophils in the swim bladder of zebrafish in high-dose compound 6 and 8 and medium-high-dose compound 9 were lower than those in model control group ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** Among the 9 kinds of traditional Chinese medicine probiotics, No.9 had the highest efficiency for anti-inflammatory, and the highest inhibitory rate on the release of inflammatory factor IL-6 from RAW 264.7 cells induced by poly(I:C), and significantly blocked the migration of neutrophils to the swim bladder in zebrafish inflammation mode, showing a highly effective anti-inflammatory effect.

Key words: traditional Chinese medicine; probiotics; viral inflammation

收稿日期: 2023-10-31

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(82003786), 广东省科技厅基础与应用基础研究基金(2019A1515110338), 广东省医学科研基金(A2023262)

作者简介: 郭丽娜(1982-), 女, 硕士, 副主任营养师, E-mail: gln408@163.com

通信作者: 林东子(1981-), 男, 博士, 主任技师, E-mail: dongzi_001@163.com

呼吸道病毒引起的区域性或世界性流行病频繁发生,病毒性肺炎对全球公共卫生构成重大威胁^[1-3]。病毒表现出高度的遗传变异和复杂的致病机制,阻碍了疫苗和抗病毒药物的开发^[4]。我国传统中药制剂在临床治疗及基础研究中均展现出良好的抗病毒性炎症功效,中药抗炎已发展成为一个重要的研究领域^[5-6]。近年来,人们对药食同源的理论越来越推崇,药食同源药材的抗炎功效研究也越来越全面^[7]。其中,桔梗是常见的药食同源中药,具有抗炎、祛痰、抗溃疡、抗过敏及增强人体免疫力等广泛的药理作用。研究表明,桔梗对脂多糖诱导的炎症展现出较强的抗炎功效,其抗炎机制是可控炎症因子B细胞核因子(NF- κ B)的活性及基因表达。甘草是一味传统药食同源中药材,其提取物如甘草酸、甘草次酸、甘草多糖等在抗病毒、抗炎方面均呈现较强的作用。益生菌可激活巨噬细胞,吞噬和杀灭多种病原微生物,同时诱导其释放肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素6(IL-6),抵抗机体的炎症反应^[8-9]。许多中药能够促进益生菌的生长,调节肠道菌群紊乱。同时益生菌反馈将促进中药成分的转化,提高中药疗效,改变药性,减少毒副作用及节约药材资源等^[10-11]。药食同源中药与益生菌有机结合具有独特的配伍协同优势,已在多种疾病的临床治疗中得到验证。本研究通过比较不同配方的中药益生菌在抗病毒性炎症方面的功效优劣,以期筛选出安全性高、抗炎效果好的抗炎中药益生菌,为临床抗病毒性炎症的治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器包括:细胞计数仪、二氧化碳培养箱、多功能酶标仪、五层单排独立养殖单元、显微注射仪、倒置荧光显微镜。主要仪器包括:DMEM培养基、胎牛血清、聚基胞苷酸、吡啶美辛、IL-6酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒、PCR转录试剂盒。9种中药益生菌复方见表1,药材由广东省中医院提供。

1.2 细胞与动物

RAW 264.7:巨噬细胞,培养于添加10%胎牛血清与1%青链霉素的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

动物:Tg(mpx:EGFP)转基因斑马鱼,饲养于五层单排独立养殖单元中。

1.3 细胞毒性检测

取对数生长期细胞RAW 264.7接种于96孔板,

表1 9种中药益生菌复方中中药及益生菌含量 (%)

编号	中药			益生菌	
	桔梗	甘草	茯苓	副干酪乳杆菌	格氏乳杆菌
复方1号	10	10	0	0	0
复方2号	10	10	0	0.5	0
复方3号	10	10	0	0	0.5
复方4号	10	10	0	0.5	0.5
复方5号	10	10	10	0	0
复方6号	10	10	10	0.5	0
复方7号	10	10	10	0	0.5
复方8号	10	10	10	0.5	0.5
复方9号	10	10	10	1	1

细胞密度为8 000/孔,待细胞贴壁后,加入不同质量浓度的9种中药益生菌溶液(7.5、15、30 mg/L分别对应低、中、高剂量),在细胞培养箱中孵育24 h后。每孔加入20 μ L二苯基四氮唑溴盐(MTT)溶液(5 g/L)继续培养4 h,利用酶标仪测定各孔溶液在490 nm处的吸收值(A_{490 nm}),根据公式计算细胞的存活率:细胞存活率(%)=[(A_{实验}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})] $\times$ 100%。

1.4 ELISA检测RAW 264.7细胞释放炎症因子IL-6水平

取对数生长期的RAW 264.7细胞接种于6孔细胞培养板中,每孔1 $\times$ 10⁶细胞,加2 mL DMEM培养基混匀,置于二氧化碳培养箱中孵育。实验设置空白对照组、模型对照组、阳性对照组和中药益生菌组(7.5、15和30 mg/L)。待RAW 264.7细胞生长到50%时,弃旧培养基,每孔加入2 mL新配制的实验溶液。空白对照组加入DMEM培养基;模型对照组加入50 mg/L poly(I:C)溶液;阳性对照组加入最终质量浓度为50 mg/L poly(I:C)和6 mg/L吡啶美辛混合液;中药益生菌组加入最终质量浓度为50 mg/L poly(I:C)和7.5、15、30 mg/L中药益生菌混合液。将细胞培养板置于二氧化碳培养箱中继续孵育48 h。1 000 r/min离心5 min,收集各组的培养基上清液,用于后续IL-6含量测定。按照ELISA试剂盒说明书检测IL-6含量。

1.5 斑马鱼模式生物抗病毒性炎症功效评价

随机挑选3 dpf(days-post fertilization)发育正常的Tg(mpx:EGFP)转基因斑马鱼置于6孔细胞培养板中,15尾/孔。设置空白对照组、模型对照组、阳性对照组和中药益生菌组。空白对照组加入E3 Water;阳性对照组加入31.25 g/L吡啶美辛;中药益生菌组分别加入31.25、62.50 g/L中药益生菌溶液,置于28℃生化培养箱中孵育48 h,24 h更换新配制对应各组样品溶液。

孵育48 h后,用0.02%三卡因将斑马鱼幼鱼麻醉

并转移到1%琼脂糖凝胶上,显微注射1 g/L poly(I:C)溶液2 nL到斑马鱼的鱼鳃处(空白对照组注射PBS溶液)。显微注射结束后,将斑马鱼转移回对应的溶液中继续孵育,4 h后在荧光显微镜下观察斑马鱼幼鱼鱼鳃处中性粒细胞情况,拍照记录,统计斑马鱼鱼鳃处中性粒细胞数量。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 8 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中药益生菌复方对RAW264.7 细胞活性的影响

各处理组对RAW264.7 细胞活性均无明显影响($P > 0.05$),见图1。

2.2 中药益生菌复方对poly(I:C) 诱导的RAW264.7 细胞内炎症因子IL-6 水平的影响

与空白对照组相比,模型对照组细胞上清液中促炎因子IL-6 的含量显著增加($P < 0.001$);与模型对照组相比,阳性对照组细胞上清液中促炎因子IL-6 的含量显著降低($P < 0.01$)。9 种中药益生菌对poly(I:C) 诱导RAW 264.7 细胞炎症反应展现出不同的影响,其中复方4、7号在高剂量时细胞上清液中促炎因子IL-6 的含量显著降低($P < 0.01$),表现出较强的抗炎活性,其对poly(I:C) 诱导RAW 264.7 细胞发生炎症反应的抵抗作用与抗炎药物吡哌美辛相当($P > 0.05$)。复方8、9号细胞上清液中促炎因子IL-6 的含量随复方剂量的增加而降低($P < 0.05$),对poly(I:C) 诱导RAW 264.7 细胞发生炎症反应表现出剂量依赖性的抗炎功效,中

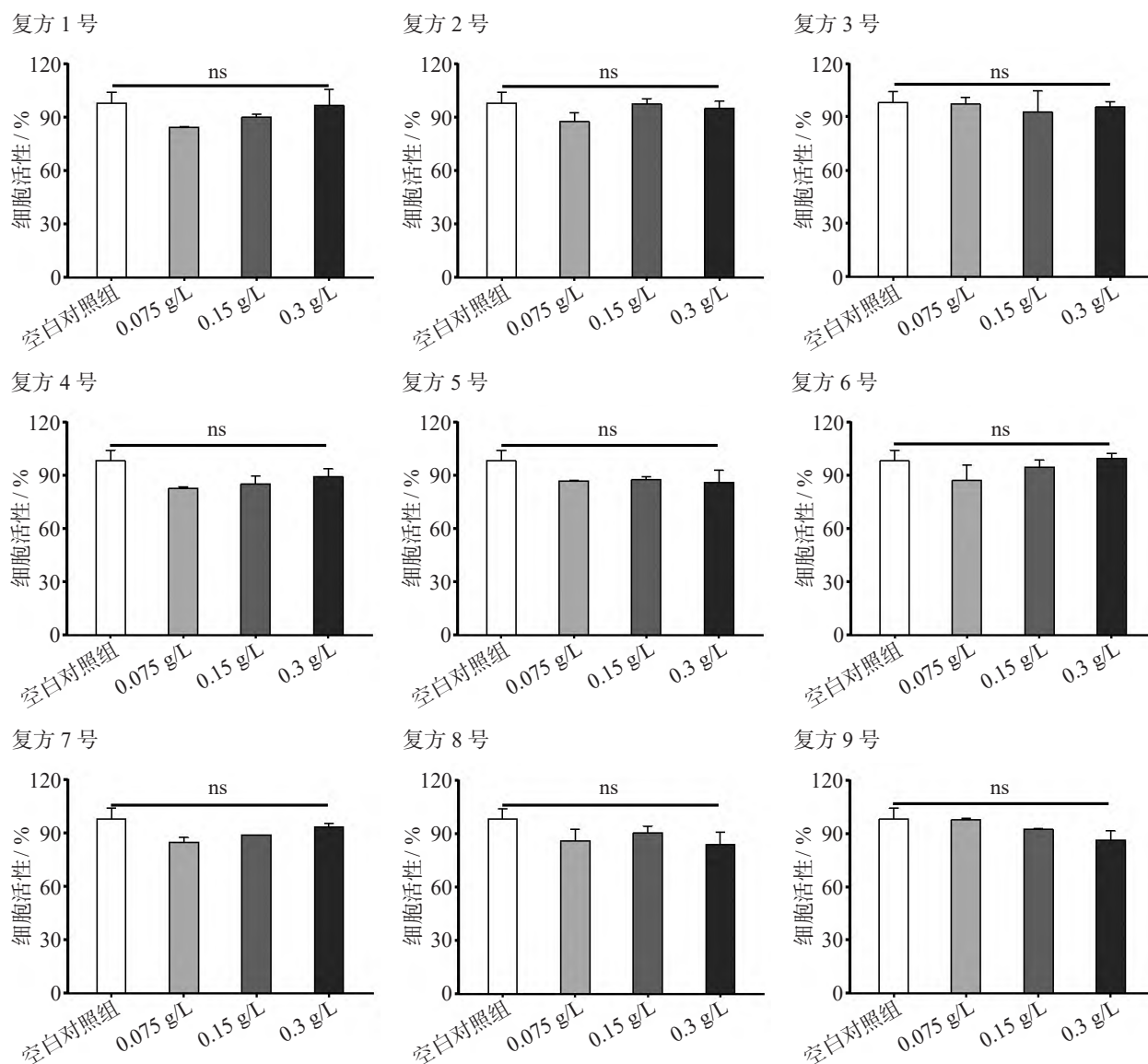


图1 9种中药益生菌复方对RAW264.7 细胞活性影响(ns: 组间比较均 $P > 0.05$)

剂量抵抗炎症反应的作用与抗炎药物吡哌美辛相当 ($P>0.05$), 高剂量抵抗炎症反应的能力比抗炎药物吡哌美辛更强 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 中药益生菌复方对斑马鱼病毒性炎症反应的影响

如图 3 所示, 与空白对照组相比, 模型对照组绿色荧光蛋白标记的中性粒细胞向斑马鱼鱼鳃处聚集, 斑马鱼鱼鳃处绿色荧光信号显著增加。与模型对照组相比, 阳性对照组斑马鱼鱼鳃处绿色荧光信号显著降低。复方 6、8、9 号处理的斑马鱼鱼鳃处荧光强度明显降低。高剂量复方 6、8 号及中、高剂量复方 9 号斑马鱼鱼鳃处中性粒细胞个数均少于模型对照组 ($P<0.01$ 或 0.05), 见图 4。

3 讨论

肺部炎症是呼吸系统疾病中的常见疾病, 发病率高, 并伴有多种并发症, 严重时危及生命健康, 而病毒感染是诱发肺部炎症的主要途径。研究表明, 肺炎患者多伴有肠道菌群失调, 而益生菌可通过“肠-肺轴”影响肺部炎症的发生、发展^[12]。由于中药具有多成分、多靶点、多通路等特点, 常被用于复杂疾病的治疗。近年来, 许多研究表明中药在治疗肺炎过程中具有改善肠道微生态的作用, 肠道菌群结构被视为中药治疗肺炎过程中的关键靶点。随着中药益生菌概念的提出, 中药联合益生菌在很多疾病的治疗中展现出优越的治疗效果及良好的生物安全性^[8]。然而, 在病毒

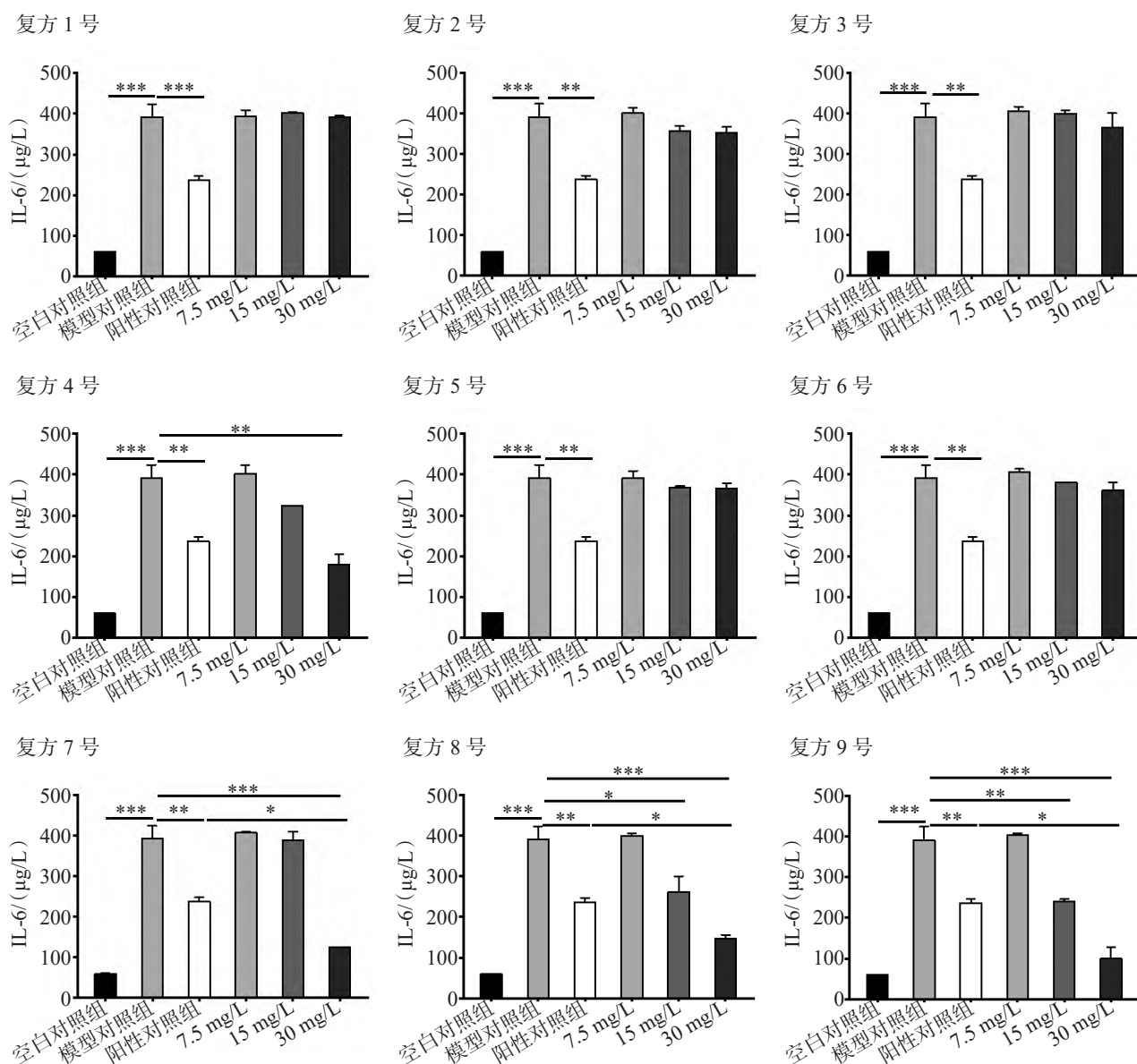


图 2 9 种中药益生菌复方对 poly(I:C) 诱导的 RAW264.7 细胞内炎症因子 IL-6 水平的影响 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

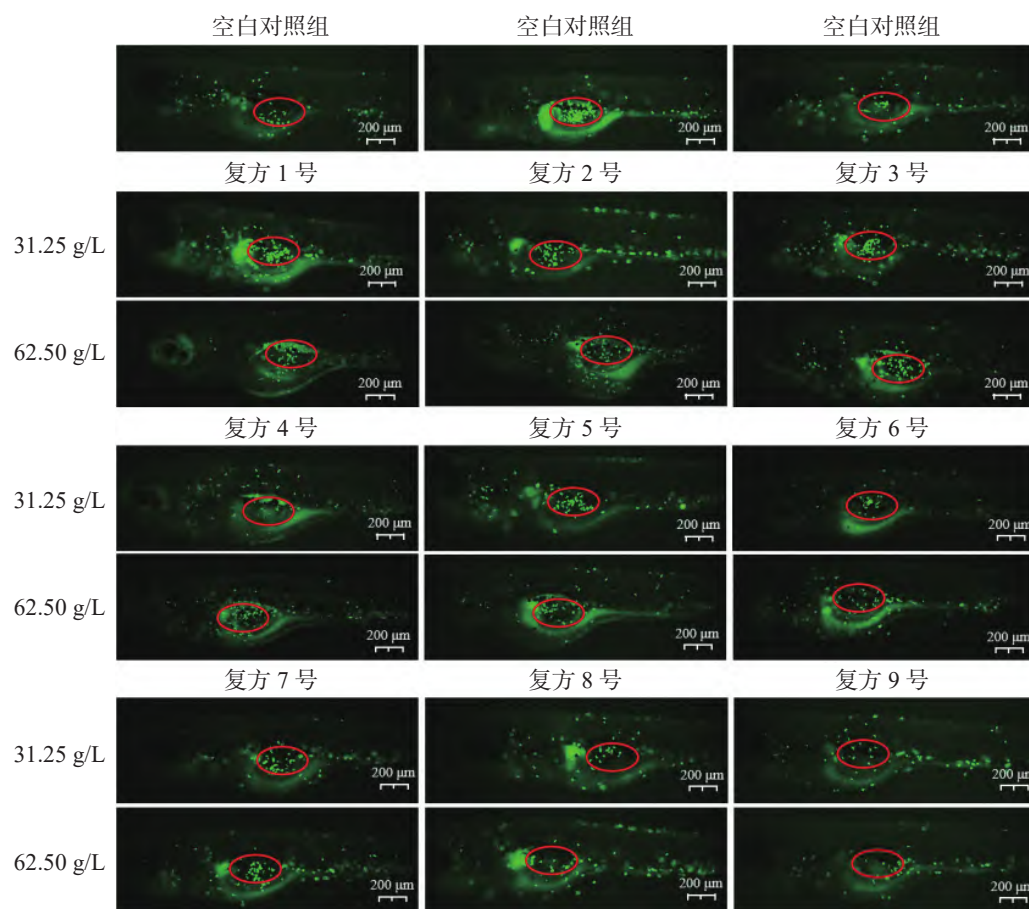


图3 9种中药益生菌复方对poly(I:C)诱导的斑马鱼鱼鳃处中性粒细胞浸润情况的影响

性肺炎的治疗中中药益生菌的报道相对较少。

本研究选择常用抗炎中药材桔梗、甘草和茯苓作为中药成分,并添加具有抗炎功效的益生菌副干酪乳杆菌和格氏乳杆菌制作成9种中药益生菌复方,对比了9种中药益生菌复方在细胞水平及斑马鱼模式动物水平抑制poly(I:C)诱导的炎症反应的能力。采用MTT法探究中药益生菌复方对RAW 264.7细胞的活性影响,结果表明0.3 g/L的中药益生菌复方对RAW 264.7细胞的活性影响均很小,相比空白对照组,中药益生菌对细胞活性的影响均可忽略不计。

RAW 264.7细胞是研究炎症和筛选抗炎活性物质最常用的体外研究模型^[13]。在诱导剂[如poly(I:C)、脂多糖(LPS)等]的作用下,RAW 264.7细胞会模拟炎症反应,释放或上调多种炎症介质如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6等^[14]。本研究结果发现,相比空白对照组,模型对照组细胞上清液中促炎因子IL-6的含量显著增加($P<0.001$),表明poly(I:C)可诱导RAW 264.7细胞发生炎症反应,促进细胞释放促炎因子IL-6;与模型对照组相比,阳性对照组细胞上清液中促炎因子IL-6的含量显著降低($P<0.01$),表明抗炎药

物吡喹酮可以抵抗poly(I:C)诱导RAW 264.7细胞发生炎症反应,同时poly(I:C)诱导RAW 264.7细胞炎症模型可用于抗炎活性药物的筛选。9种中药益生菌对poly(I:C)诱导RAW 264.7细胞炎症反应展现出不同的影响,仅由中药材组成的复方1、5号,对poly(I:C)诱导的细胞炎症因子IL-6水平几乎没有影响;而添加益生菌后复方4、7号在高剂量时可有效抑制poly(I:C)诱导的细胞炎症因子IL-6水平;复方8、9号进一步增加了中药及益生菌含量,其对poly(I:C)诱导RAW 264.7细胞发生炎症反应表现出剂量依赖性的抗炎功效。

斑马鱼与人类基因同源性高达85%,相比其他脊椎动物模型更易于进行遗传操作,基因编辑技术及各种细胞生物学技术在斑马鱼模型中发展成熟,为以斑马鱼为模型的研究提供了巨大的便利^[15]。通过特异性基因启动子控制下游的荧光蛋白在特定的器官或者细胞中表达而建立的斑马鱼转基因系,可实现对某一特定器官或细胞的追踪^[16]。目前已开发和利用标记中性粒细胞和巨噬细胞的转基因斑马鱼品系,实现了炎症情况下细胞反应的可视化,使得在活体内三维环境中

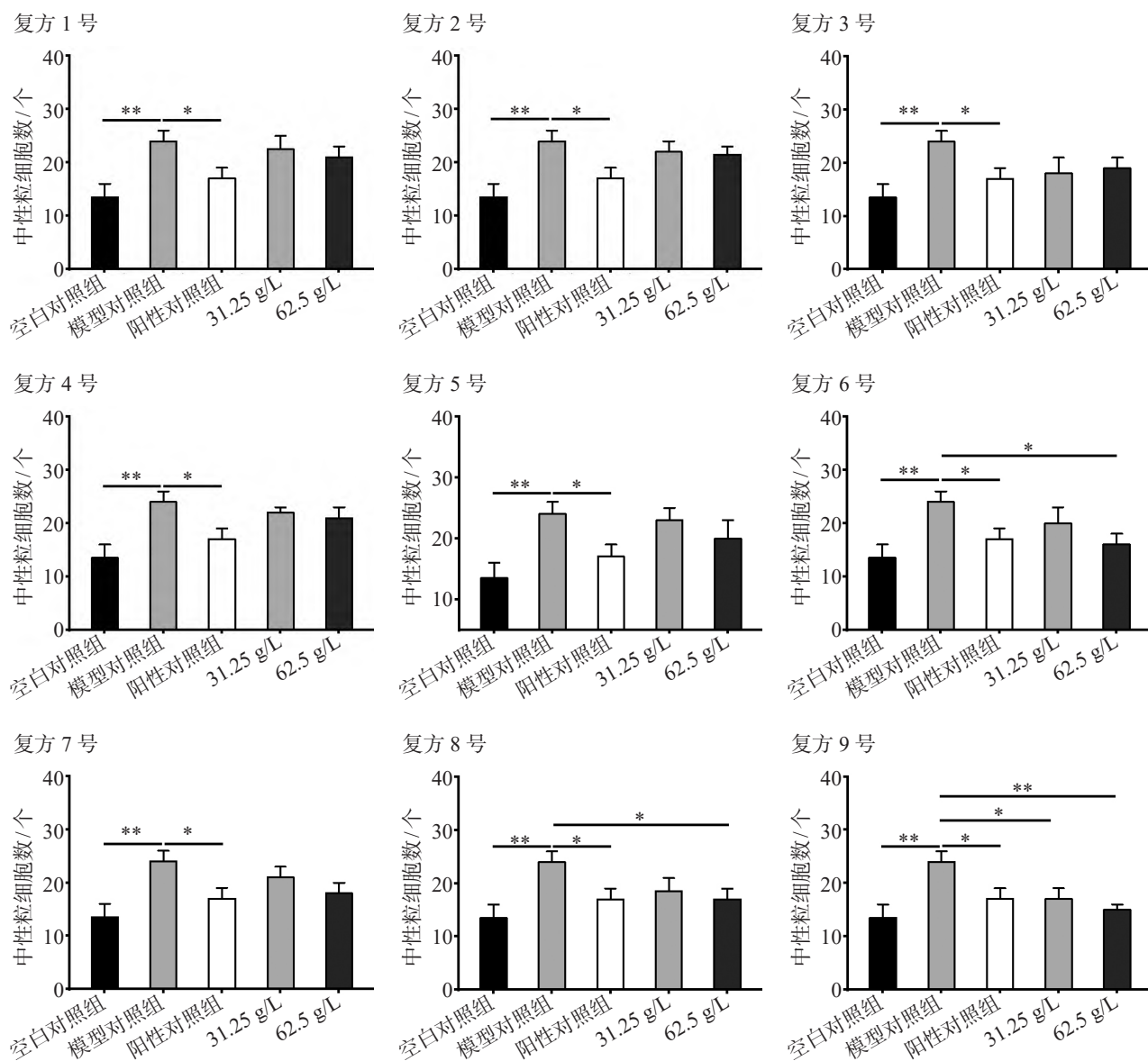


图 4 9 种中药益生菌复方处理后 poly(I:C) 诱导斑马鱼体鱼鳃处中性粒细胞浸润数 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

追踪中性粒细胞和巨噬细胞的迁移成为可能,为观察炎症反应提供了独特视角^[17-18]。

免疫细胞向炎症部位异常迁移、聚集是炎症反应的主要病理过程,抑制免疫细胞向炎症部位迁移、聚集是抵抗和治疗炎症的关键,也是抗炎药物筛选评价的重要方向。中性粒细胞特异性表达 eGFP 荧光的转基因斑马鱼实现了炎症情况下免疫细胞反应的可视化研究。本研究利用中性粒细胞特异性表达 eGFP 荧光的转基因斑马鱼,探究 9 种中药复方对 poly(I:C) 诱导的斑马鱼炎症部位中性粒细胞聚集行为的影响。与空白对照组相比,模型对照组斑马鱼鱼鳃处绿色荧光信号显著增加,结果表明 poly(I:C) 可诱导斑马鱼发生炎症反应,促进绿色荧光蛋白标记的中性粒细胞向斑马鱼鱼鳃处聚集;与模型对照组相比,阳性对照组斑马鱼

鱼鳃处绿色荧光信号显著降低,提示抗炎药物叫噪美辛可以消除 poly(I:C) 诱导斑马鱼发生炎症反应,同时 poly(I:C) 诱导斑马鱼炎症模型可用于抗炎活性药物的筛选。复方 6、8、9 号在 poly(I:C) 诱导的斑马鱼炎症模型中均表现出一定的抗炎功效,其中中、高剂量复方 9 号处理后,经 poly(I:C) 诱导的斑马鱼鱼鳃处中性粒细胞明显低于模型对照组,对 poly(I:C) 诱导的斑马鱼炎症表现出显著的抑制作用,表明中药益生菌复方对病毒性炎症具有较为明显的抗炎作用。

综上所述,中药益生菌复方对病毒性炎症具有良好的抗炎作用,尤其是复方 9 号在细胞水平和斑马鱼模式动物水平均展现出显著的抗炎功效。研究结果为中药益生菌的临床病毒性炎症治疗提供了重要的实验数据参考。基于此,研究人员未来可以进一步开发

更具临床转化潜力的中药联合益生菌治疗方案,同时也为今后中药联合益生菌药物开发提供重要的借鉴意义。

参考文献:

- [1] CUI H, WANG Y, YU B, et al. Jian-Ti-Kang-Yi decoction alleviates poly(I:C)-induced pneumonia by inhibiting inflammatory response, reducing oxidative stress, and modulating host metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 139: 79400.
- [2] NING Q, WU D, WANG X, et al. The mechanism underlying extrapulmonary complications of the coronavirus disease 2019 and its therapeutic implication [J]. *Signal Transduction Targeted Ther*, 2022, 7(1): 57.
- [3] TIECCO G, STORTI S, DEGLI ANTONI M, et al. Omicron genetic and clinical peculiarities that may overturn SARS-CoV-2 pandemic: A literature review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 1987.
- [4] GOMEZ-RIAL J, RIVERO-CALLE I, SALAS A, et al. Role of monocytes/ macrophages in Covid-19 pathogenesis: Implications for therapy [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2485-2493.
- [5] CHEN F, QU F, JIA Y, et al. Xiao-chai-hu decoction ameliorates Poly (I:C)-induced viral pneumonia through inhibiting inflammatory response and modulating serum metabolism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1240242.
- [6] ZHAO G, ZHUO Y Z, CUI L H, et al. Modified Da-chai-hu Decoction regulates the expression of occludin and NF- κ B to alleviate organ injury in severe acute pancreatitis rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 355-362.
- [7] 杨璐, 陈又华, 杨明明, 等. 中药汤对病毒性肺炎患儿血清免疫蛋白、T淋巴细胞亚群和炎症因子的影响[J]. *吉林中医药*, 2019, 39(5): 665-668.
- [8] 徐镠粤. 复方中药、益生菌对肠道菌群失调流感小鼠肺中免疫细胞 TLR7/NF- κ B 信号通路的影响[D]. 广州: 暨南大学, 2021.
- [9] 王倩雯. 缓解呼吸道病毒感染的益生菌筛选和机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [10] 熊艳霞, 刘文君, 肖秋萍, 等. 浅析益生菌联合中药治疗肠道疾病的疗效[J]. *发明与创新(职业教育)*, 2019, 764(7): 76-77, 80.
- [11] 王静涵, 张斯童, 滕利荣, 等. 益生菌发酵中药的研究现状及产品开发[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 337-343, 348.
- [12] 黄缘璧, 张惠芸, 李龙泉, 等. 益生菌在新型冠状病毒肺炎治疗中的前景[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2020, 46(2): 76-81, 88.
- [13] WANG Y, XIE J, WANG N, et al. *Lactobacillus casei* zhang modulate cytokine and toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I:C-induced immune responses in RAW264. 7 macrophages [J]. *Microbiol Immunol*, 2013, 57(1): 54-62.
- [14] HWANG J H, KIM K J, RYU S J, et al. Caffeine prevents LPS-induced inflammatory responses in RAW264. 7 cells and zebrafish [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 24: 81-87.
- [15] GARCIA G R, NOYES P D, TANGUAY R L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 161: 11-21.
- [16] ROSOWSKI E E. Determining macrophage versus neutrophil contributions to innate immunity using larval zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(1): dmm041889.
- [17] BUCHAN K D, PRAJSNAR T K, OGRYZKO N V, et al. A transgenic zebrafish line for in vivo visualisation of neutrophil myeloperoxidase [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215592.
- [18] GARCIA-LOPEZ J P, VILOS C, FEIJOO C G. Zebrafish, a model to develop nanotherapeutics that control neutrophils response during inflammation [J]. *J Controlled Release*, 2019, 313: 14-23.

(责任编辑: 李 晓)