

银翘散通过 cGAS-STING-IRF3 分子通路影响巨噬细胞极化介导的单纯疱疹病毒性角膜炎

姚 宁,赵荣丽,杨雪梅,刘玉环,丁雅琴,戴 雁

引用:姚宁,赵荣丽,杨雪梅,等. 银翘散通过 cGAS-STING-IRF3 分子通路影响巨噬细胞极化介导的单纯疱疹病毒性角膜炎. 国际眼科杂志, 2025,25 (8):1227-1233.

基金项目:兰州市科技计划项目(No.23-B07)

作者单位:(730060)中国甘肃省兰州市,兰州石化总医院(甘肃中医药大学第四附属医院)眼科

作者简介:姚宁,女,本科,副主任医师,研究方向:白内障、玻璃体视网膜疾病、眼表疾病。

通讯作者:戴雁,男,本科,副主任医师,研究方向:白内障、青光眼、眼表疾病、眼视光. 18153628409@qq.com

收稿日期: 2024-09-24 修回日期: 2025-05-08

摘要

目的:探讨银翘散通过环状 GMP-AMP 合酶(cGAS)-干扰素基因刺激因子(STING)-干扰素调节因子 3(IRF3)分子通路影响巨噬细胞极化在单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)中的具体分子机制。

方法:将人角膜上皮细胞 HCE-T 分为对照组、HSK 组、HSK+银翘散组。将 M0 巨噬细胞分为 Ctrl 组、HSV-1 组、HSV-1+oe-cGAS 组、HSV-1+银翘散组、HSV-1+oe-cGAS+银翘散组。收集各组 M0 巨噬细胞条件培养基(CM)干预 HCE-T 细胞并且分为 Ctrl-CM 组、HSV-1-CM 组、HSV-1+oe-cGAS-CM 组、HSV-1+银翘散-CM 组。MTT 法检测细胞活力, TUNEL 法检测细胞凋亡, ELISA 法检测三组血清中 Arg-1、iNOS 水平, 蛋白质印迹法检测角膜组织 cGAS、STING、IRF3 相对蛋白表达。取 Balb/c 小鼠并将其分为对照组、模型组、药物组。模型组和药物组采用角膜划痕法将 HSV-1 接种于 Balb/c 小鼠角膜以构建 HSK 小鼠模型, 药物组使用银翘散干预治疗。对比三组建模后第 1、3、5、7、14 d 三组的发病情况和死亡率。

结果:与对照组相比, HSK 组 HCE-T 细胞活力降低、凋亡增加, 而银翘散干预则可逆转此结果。与 Ctrl 组相比, HSV-1 组细胞上清液中 Arg-1 浓度降低、iNOS 浓度增加, 细胞 cGAS、STING、IRF3 相对蛋白表达下降;与 HSV-1 组相比, HSV-1+oe-cGAS 组、HSV-1+银翘散组 Arg-1 浓度增加、iNOS 浓度降低, cGAS、STING、IRF3 蛋白表达增强, HSV-1+oe-cGAS+银翘散组得到相同结果。与 Ctrl-CM 组相比, HSV-1-CM 组 HCE-T 细胞活力降低、凋亡增加, 通过表达巨噬细胞中的 cGAS 或者使用银翘散干预逆转了这一结果。体内实验发现银翘散干预能够改善角膜炎病理进展。

结论:银翘散可能通过 cGAS-STING-IRF3 分子通路抑制巨噬细胞 M1 型极化, 从而延缓 HSK 进展。

关键词:银翘散; 环状 GMP-AMP 合酶-干扰素基因刺激因子-干扰素调节因子 3(cGAS-STING-IRF3); 巨噬细胞; 单纯疱疹病毒性角膜炎

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.8.03

Yinqiao Powder affects macrophage polarization – mediated herpes simplex keratitis through the cGAS – STING – IRF3 molecular pathway

Yao Ning, Zhao Rongli, Yang Xuemei, Liu Yuhuan, Ding Yaqin, Dai Yan

Foundation item: Science and Technology Plan Project of Lanzhou (No.23-B07)

Department of Ophthalmology, Lanzhou Petrochemical General Hospital (the Fourth Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine), Lanzhou 730060, Gansu Province, China

Correspondence to: Dai Yan. Department of Ophthalmology, Lanzhou Petrochemical General Hospital (the Fourth Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine), Lanzhou 730060, Gansu Province, China. 18153628409@qq.com

Received:2024-09-24 Accepted:2025-05-08

Abstract

• AIM: To investigate the specific molecular mechanism of Yinqiao Powder in affecting macrophage polarization in herpes simplex keratitis (HSK) through the cyclic GMP-AMP synthetase (cGAS) – stimulator of interferon genes (STING) – interferon regulatory factor 3 (IRF3) molecular pathway.

• METHODS: Human corneal epithelial cells (HCE-T) were divided into control, HSK, and HSK + Yinqiao Powder groups. M0 macrophages were grouped as Ctrl, HSV-1, HSV-1+oe-cGAS, HSV-1+Yinqiao Powder, and HSV-1+oe-cGAS+Yinqiao Powder. Conditional medium (CM) from each group of M0 macrophages was collected to intervene in HCE-T cells and divided into Ctrl-CM, HSV-1-CM, HSV-1+oe-cGAS-CM, and HSV-1+Yinqiao Powder-CM groups. Cell viability was detected by MTT assay, and apoptosis was detected by TUNEL assay. ELISA was used to detect the concentrations of Arg-1 and iNOS in cell supernatants, and Western blotting was used to detect the relative protein expressions of cGAS, STING, and IRF3. Balb/c mice were divided into control, model, and drug groups. The model and drug groups were inoculated with HSV-1 on the cornea of Balb/c mice using the corneal scratch method to construct an HSK mouse model, and the drug group was treated with Yinqiao Powder. The incidence and mortality of the three groups were compared on days 1, 3, 5, 7, and 14 after modeling.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the HCE-T cell viability in the HSK group was decreased but apoptosis was increased, which was reversed by YinQiao Powder intervention. Compared with the Ctrl group, the Arg-1 concentration in the cell supernatant of the HSV-1 group was decreased, the iNOS concentration was increased, and the protein expressions of cGAS, STING, and IRF3 were decreased. Compared with the HSV-1 group, the Arg-1 concentration was increased, the iNOS concentration was decreased, and the protein expressions of cGAS, STING, and IRF3 were enhanced in the HSV-1+oe-cGAS group and the HSV-1+YinQiao Powder group, and the same results were obtained in the HSV-1+oe-cGAS+YinQiao Powder group. Compared with the Ctrl-CM group, the HCE-T cell viability was decreased and apoptosis was increased in the HSV-1-CM group, which was reversed by overexpressing cGAS in macrophages or intervening with YinQiao Powder. *In vivo* experiments found that YinQiao Powder intervention could improve the pathological progression of keratitis.

• **CONCLUSION:** YinQiao Powder inhibits M1 polarization of macrophages through the cGAS-STING-IRF3 molecular pathway, thereby delaying the progression of HSK.

• **KEYWORDS:** YinQiao Powder; cyclic GMP-AMP synthetase - stimulator of interferon genes - interferon regulatory factor 3 (cGAS-STING-IRF3); macrophage; herpes simplex keratitis

Citation: Yao N, Zhao RL, Yang XM, et al. YinQiao Powder affects macrophage polarization-mediated herpes simplex keratitis through the cGAS-STING-IRF3 molecular pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(8):1227-1233.

0 引言

单纯疱疹病毒性角膜炎 (herpes simplex keratitis, HSK) 是由单纯疱疹病毒 (HSV) 引起的眼部疾病, 全球发病率较高, 每年患者可能超过 180 万人^[1]。在 HSV-1 感染过程中, 巨噬细胞极化失衡, 即 M1 和 M2 型巨噬细胞比例失调, 可能导致炎症持续或加剧, 影响疾病进程^[2]。中药注重整体观念和辩证论治, 可调节人体内部环境, 提高机体免疫力, 在治疗角膜炎的同时, 改善患者整体健康状况, 从根本上增强抵御疾病的能力。例如, 丁香酚作为丁香的主要成分, 能够明显改善镰刀菌诱导的小鼠真菌性角膜炎^[3]。而银翘散作为一种中药配方, 具有显著的抗炎、抗病毒作用, 已证实对流感、婴幼儿肺炎等具有治疗效果^[4-5], 相较于丁香酚等单体成分, 可能在治疗疾病方面更加全面且独特。银翘散配方中含有的甘草成分能够通过环状 GMP-AMP 合酶 (cyclic GMP-AMP synthetase, cGAS) - 干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 通路预防非酒精性脂肪性肝炎^[6]。鉴于巨噬细胞极化状态对 HSV-1 感染所引发的炎症及疾病发展影响重大, 且 cGAS-STING 通路在免疫调节中扮演着关键角色, 再结合银翘散所具有的抗炎、抗病毒特性以及其成分甘草对 cGAS-STING 通路的作用, 本研究推测: 银翘散或许能够借助对 cGAS-STING 通路的调节, 来纠正 HSV-1 感染时巨噬细胞极化的失衡状态, 最终对 HSV-1 感染产生影响。cGAS 在 HSV-1 感染中扮演核心角色, 其能够通

过识别病毒 DNA 并触发下游信号传导, 增强机体的抗病毒免疫反应^[7]。此外也有研究显示, 通过刺激巨噬细胞中的 GPR43 信号转导, 能够激活 cGAS-STING 轴, 从而在抗病毒免疫中发挥重要作用^[8]。干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 作为 cGAS-STING 通路的下游效应因子之一, 其活化水平与炎症反应密切相关^[9]。然而, 目前 cGAS-STING-IRF3 通路在 HSK 进展过程中的参与情况以及具体作用机制, 仍处于未知状态, 亟待深入研究。因此, 本研究旨在深入探讨银翘散是否能够通过调控 cGAS-STING-IRF3 分子通路, 影响巨噬细胞极化, 进而参与 HSK 的进展, 着重对“银翘散可能通过 cGAS-STING 通路调控巨噬细胞极化, 从而影响 HSV-1 感染”这一假设进行验证。

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c 小鼠与 SD 大鼠购自郑州大学 [河南省实验动物中心, 许可证号 SCXK(豫)2022-0001]; 人角膜上皮细胞 HCE-T、DMEM/F12 培养基、THP-1 人单核细胞、RPMI-1640 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (货号: CL-0743、PM150312、CL-0233、PM150110); 金银花、连翘、桔梗、薄荷、生甘草、竹叶、淡豆豉、牛蒡子、荆芥穗均购自北京同仁堂药店; 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 购自美国 MedChemExpress 公司 (货号: HY-P7050A); HSV-1 病毒来自中国科学院武汉病毒研究所; Lipofectamine® 3000 转染试剂、BCA 蛋白定量试剂盒、PVDF 膜购自美国赛默飞世尔科技公司 (货号: L3000015、23225、88518); MTT 检测试剂盒、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (红色荧光)、cGAS 抗体、STING 抗体、IRF3 抗体购自北京百奥来博科技有限公司 (货号: YT122、YT136、Z13238、Z27624、Z18963); 人与小鼠 Arg-1、iNOS 的 ELISA 试剂盒购自上海苗彩生物科技有限公司 (货号: ZC-33553、ZC-38342、ZC-35593、ZC-38979); HRP 标记的山羊抗兔购自英国 Abcam 公司 (货号: ab6721); 超敏 ECL 化学发光检测试剂盒购自武汉三鹰生物技术有限公司 (货号: PK10003); Alliance 凝胶图像分析仪购自无锡莱弗思生物实验器材有限公司 (型号: Alliance Q9)。

1.2 方法

1.2.1 药物 银翘散主要由金银花 15 g、连翘 15 g、桔梗 9 g、薄荷 6 g、生甘草 5 g、竹叶 6 g、淡豆豉 6 g、牛蒡子 6 g、荆芥穗 6 g 组成^[10]。将药材煎制浓缩为含生药的合剂, 保存在 4 °C 的条件下。按照之前的研究经验制备银翘散含药血清^[11]。之后选取 36 只 SD 大鼠分为对照组、病毒感染组 (HSK 组)、HSK+银翘散 (极低、低、中、高浓度) 组, 每组 6 只。其中 HSK 组用 HSV-1 病毒滴鼻, HSK+银翘散 (极低、低、中、高浓度) 组分别给予相应浓度银翘散 (0.25、0.5、1、1.5 g/mL) 溶液灌胃; 对照组和 HSK 组给予等量生理盐水, 每天灌胃 2 次, 每次 2 mL, 共 5 d。末次灌胃 1 h 后使用过量苯巴比妥钠麻醉大鼠, 无菌条件下经腹主动脉取血, 4 °C 静置 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min 分离含药血清, 同组血清混匀后 56 °C 水浴 30 min 灭活, 微孔滤膜过滤除菌, 冻存管分装后 -20 °C 保存备用。

1.2.2 细胞培养与处理 人角膜上皮细胞 HCE-T 培养在添加 15% FBS+5 μg/mL Insulin+10 ng/mL 人 EGF+1% P/S 的 DMEM/F12 培养基中。THP-1 人单核细胞培养在添加 10% FBS+0.05 mmol/L β-mercaptoethanol+1% P/S

的 RPMI-1640 培养基中。培养条件为 5% CO₂, 37 °C。M-CSF(20 ng/mL)持续刺激 THP-1 细胞 7 d, 诱导生成 M0 巨噬细胞^[12]。将 HCE-T 细胞接种至 12 孔板中, 生长至汇合状态后移除培养基, 并加入含有 HSV-1 病毒(MOI 为 0.1)接种物的培养基, 37 °C 孵育 1 h。去除含有病毒的培养基并使用 PBS 洗涤细胞, 向细胞中添加不同浓度银翘散(0.25、0.50、1.00、1.50 g/mL)制备得到的含药血清继续培养 24 h。

1.2.3 细胞转染 将处于对数生长期的 THP-1 细胞接种至 24 孔板中, 每孔 3×10^5 个细胞。待细胞融合度达 70% 时, 使用 Lipofectamine® 3000 转染试剂, 并根据其制造商说明要求, 将过表达 cGAS 的慢病毒载体转染进 THP-1 细胞中。

1.2.4 细胞及小鼠分组 将 HCE-T 细胞分组: 对照组(正常培养的 HCE-T 细胞)、HSK 组(MOI 为 0.1 的 HSV-1 病毒感染 HCE-T 细胞 1 h)、HSK+银翘散组(HSV-1 病毒感染, 并经过浓度为 1 g/mL 银翘散处理 24 h 的 HCE-T 细胞)。将 M0 巨噬细胞分组: Ctrl 组(正常培养的 M0 巨噬细胞)、HSV-1 组(HSV-1 病毒感染的 M0 巨噬细胞)、HSV-1+oe-cGAS 组(HSV-1 病毒感染并转染过表达 cGAS 慢病毒载体的 M0 巨噬细胞)、HSV-1+银翘散组(HSV-1 病毒感染并经过银翘散处理的 M0 巨噬细胞)、HSV-1+oe-cGAS+银翘散组(HSV-1 病毒感染、转染过表达 cGAS 慢病毒载体, 并经过银翘散处理的 M0 巨噬细胞)。收集各组 M0 巨噬细胞条件培养基(conditional medium, CM)干预 HCE-T 细胞并且分为 Ctrl-CM 组[Ctrl 组 CM 与 HCE-T 细胞共培养]、HSV-1-CM 组(HSV-1 组 CM 与 HCE-T 细胞共培养)、HSV-1+oe-cGAS-CM 组(HSV-1+oe-cGAS 组 CM 与 HCE-T 细胞共培养)、HSV-1+银翘散-CM 组(HSV-1+银翘散组 CM 与 HCE-T 细胞共培养)。将 Balb/c 小鼠分组: 对照组(接受麻醉、角膜划痕和泪膜吸干处理, 不接受 HSV-1 感染)、模型组(接受麻醉、角膜划痕、泪膜吸干与 HSV-1 感染处理)、药物组(接受麻醉、角膜划痕、泪膜吸干与 HSV-1 感染处理, 同时接受银翘散治疗)。

1.2.5 MTT 检测细胞活力 根据 MTT 试剂盒说明书要求, 将 25 mg MTT 溶解于 5 mL MTT 溶剂中, 配制成 5 mg/mL 的 MTT 溶液。收集各组细胞, 并调整细胞密度为 2×10^4 cells/mL, 然后将细胞接种至 96 孔板中, 每孔 100 μ L。12 h 后向每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 继续在培养箱中孵育 4 h, 加入 100 μ L Formazan 溶液, 混匀后孵育至紫色结晶完全溶解。在 570 nm 波长下测定吸光度, 评估细胞活力。

1.2.6 TUNEL 检测细胞凋亡 应用 TUNEL 一步法试剂盒对各组细胞凋亡进行检测, 取各组细胞样品并使用 PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 含 0.3% Triton X-100 的 PBS 重悬细胞, 室温孵育 5 min。按照每个样品中 TdT 酶: 荧光标记液为 5 μ L: 45 μ L 的比例配制 TUNEL 检测液。PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤细胞并悬浮, 荧光显微镜观察细胞凋亡情况。Cy3 的激发波长为 550 nm, 发射波长为 570 nm(红色荧光)。

1.2.7 ELISA 收集各组细胞样品, 以 1 000×g 转速离心 20 min, 获得细胞上清液。同时收集各组小鼠血清样本。按照 ELISA 试剂盒制造商要求检测上述样本中的 Arg-1、iNOS 浓度。

1.2.8 蛋白质印迹 使用含有蛋白酶抑制和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液从各组细胞样品和小鼠角膜组织中提取蛋白质样品, 并通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上, 并且封闭在含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 中。加入对应一抗: cGAS 抗体(1:1 000)、STING 抗体(1:1 000)、IRF3 抗体(1:1 000), 在 4 °C 下孵育过夜。TBST 洗膜后与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h。TBST 再次洗膜, 然后使用超敏 ECL 化学发光检测试剂盒显色, Alliance 凝胶图像分析仪成像, 并使用 ImageJ 图像分析软件进行图片处理, 分析细胞样品与角膜组织中目标蛋白表达情况。

1.2.9 动物实验 本次实验选用 120 只 6~8 周龄、体质量在 18~22 g 的 SPF 级 Balb/c 小鼠。所有小鼠在温度维持在 18~22 °C、相对湿度 50% 的 SPF 级环境中饲养, 并遵循 12 h 昼夜循环的节律。饲养 1 wk 后, 小鼠被随机分为三组: 对照组、模型组、药物组, 每组 40 只。在药物组中, 小鼠首先接受甲苯噻嗪(6.6 mg/kg)和氯胺酮(100 mg/kg)的麻醉处理。随后, 使用 25 号针头短暂划伤小鼠的两个角膜, 以创造轻微损伤并吸干泪膜。接着, 将 2 μ L 的 HSV-1 病毒(溶解于无菌 PBS 中)以每只眼睛 1×10^5 pfu 的剂量接种到角膜上, 构建 HSK 小鼠模型。泪液检查中测出有病毒复制即建模成功。从感染的第 1 d 开始, 每只小鼠接受 400 ng/mL 的银翘散水煎剂灌胃治疗, 每天 2 次, 连续治疗 14 d。模型组与药物组的处理过程相同, 但在局部治疗时, 将银翘散替换为双蒸水。对照组的小鼠同样接受麻醉、角膜划痕和泪膜吸干的处理, 但不接受 HSV-1 感染, 局部治疗时, 使用双蒸水代替银翘散。观察各组小鼠建模后第 1、3、5、7、14 d 的发病、死亡情况和临床特征。小鼠感染后 14 d, 使用过量戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉处死小鼠, 通过尾静脉采集血液样本, 同时分离角膜组织进行后续实验。

1.2.10 角膜疱疹疾病评分 使用 HSV-1 病毒以每眼 1×10^5 pfu 的剂量感染小鼠。从感染第 1 d 开始, 使用银翘散干预治疗。每隔 2 d 通过尼康 D7200 相机对小鼠眼部进行拍照, 评价角膜炎症和混浊的病理变化。角膜炎评分标准: 0 分: 无疾病; 1 分: 角膜混浊, 但一些虹膜细节可见; 2 分: 虹膜细节模糊; 3 分: 角膜完全不透明; 4 分: 角膜穿孔^[12]。睑缘炎评分标准: 0 分: 无疾病; 1 分: 眼睑浮肿; 2 分: 眼睑浮肿并伴随一些结痂; 3 分: 眼睛肿胀并伴有严重的结痂; 4 分: 眼睛完全肿胀闭合^[12]。

统计学分析: 通过 Graphpad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 进行正态分布检验, 符合正态分布的数据采用均数±标准差表达, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 单因素方差分析用于多组间数据的总体比较, 若差异具有统计学意义则进一步使用 LSD-t 检验进行两两比较; 多个时间点三组角膜炎和睑缘炎评分比较采用重复测量数据的方差分析, 若存在组间差异, 各时间点的组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银翘散抑制 HSV-1 病毒对 HCE-T 细胞的损伤作用

经过 MTT 检测发现, 对照组、HSK 组、HSK+0.25 g/mL 银翘散组、HSK+0.50 g/mL 银翘散组、HSK+1.00 g/mL 银翘散组、HSK+1.50 g/mL 银翘散组细胞活力分别为

(100.00 ± 11.93)%、(36.27 ± 4.35)%、(68.25 ± 8.19)%、(76.71 ± 9.21)%、(90.02 ± 10.80)%、(87.86 ± 10.54)%；与对照组相比,HSK 组中的 HCE-T 细胞活力显著降低,而银翘散干预则改善了细胞活力(均 $P < 0.05$)；实验结果显示,银翘散在 1.00 g/mL 浓度时,对 HCE-T 的改善效果最明显,因此后续继续使用此浓度。TUNEL 检测发现,对照组、HSK 组、HSK+银翘散组细胞凋亡率分别为(15.88 ± 1.81)%、(24.77 ± 2.82)%、(18.27 ± 2.08)%,差异有统计学意义($F = 12.254, P < 0.01$)；与对照组相比,HSK 组细胞凋亡增加,而与 HSK 组相比,HSK+银翘散组凋亡显著降低(均 $P < 0.05$),见图 1。

2.2 银翘散抑制巨噬细胞 M1 型极化并对 HCE-T 细胞产生保护作用 经过深入分析巨噬细胞在银翘散改善 HSK 进展中的作用机制,结果发现当 M0 巨噬细胞受到 HSV-1 病毒干预后,细胞上清液中的 Arg-1 浓度下降、iNOS 浓度显著上升;然而,在经过银翘散处理后,这些变化得到了有效逆转:Arg-1 浓度提升、iNOS 浓度下调(均 $P < 0.05$),见

表 1。分别收集 Ctrl 组、HSV-1 组和 HSV-1+银翘散组的 CM 并用于处理 HCE-T 细胞,结果显示相较于 Ctrl-CM 组,HSV-1-CM 组 HCE-T 细胞活力降低、凋亡增加;相较于 HSV-1+银翘散-CM 组 HCE-T 细胞活力提升,凋亡下降(均 $P < 0.05$),见表 2,图 2。

2.3 过表达 cGAS 逆转 HSV-1 对巨噬细胞极化及 HCE-T 细胞生物学行为的影响 过表达巨噬细胞中的 cGAS 并检测巨噬细胞极化标志物发现,相比于 Ctrl 组,HSV-1 组细胞相对 cGAS 蛋白表达降低(图 3),上清液中 Arg-1 浓度下降、iNOS 浓度明显增加;相比于 HSV-1 组,HSV-1+oe-cGAS 组与 HSV-1+银翘散组 cGAS 蛋白表达均增强,细胞上清液中 Arg-1 浓度增加、iNOS 浓度下调(均 $P < 0.05$),见表 3。收集各组细胞 CM 处理 HCE-T 发现,相比于 Ctrl-CM 组,HSV-1-CM 组 HCE-T 细胞活力降低、凋亡增加;而过表达 cGAS 或者使用银翘散干预则改善了细胞活力,并抑制了细胞凋亡(均 $P < 0.05$),见表 4,图 4。

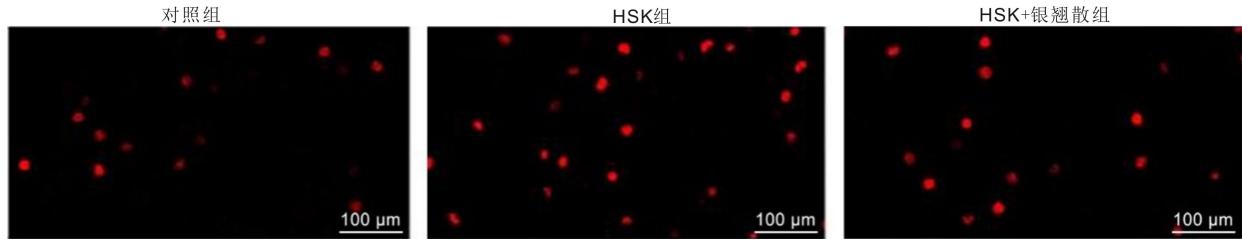


图 1 TUNEL 检测各组细胞凋亡结果。

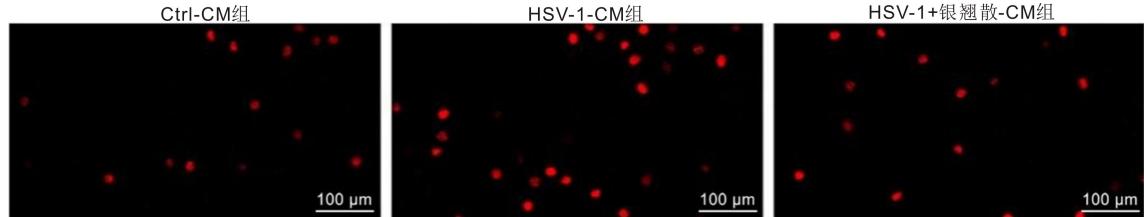


图 2 TUNEL 检测各组细胞凋亡结果。

表 1 各组细胞 Arg-1 和 iNOS 浓度检测

分组	$(\bar{x} \pm s, \text{ng/L})$	
	Arg-1	iNOS
Ctrl 组	39.36 ± 4.49	1.94 ± 0.22
HSV-1 组	11.78 ± 1.34^a	5.75 ± 0.66^a
HSV-1+银翘散组	32.73 ± 3.73^c	3.57 ± 0.41^c
<i>F</i>	52.003	50.431
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注: $^a P < 0.05$ vs Ctrl 组; $^c P < 0.05$ vs HSV-1 组。

表 2 各组细胞活力与凋亡率检测 $(\bar{x} \pm s, \%)$

分组	细胞活力	凋亡率
Ctrl-CM 组	100.00 ± 11.84	14.23 ± 1.62
HSV-1-CM 组	38.85 ± 4.66^a	26.16 ± 2.98^a
HSV-1+银翘散-CM 组	89.27 ± 10.71^c	16.98 ± 1.94^c
<i>F</i>	34.693	23.004
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注: $^a P < 0.05$ vs Ctrl-CM 组; $^c P < 0.05$ vs HSV-1-CM 组。

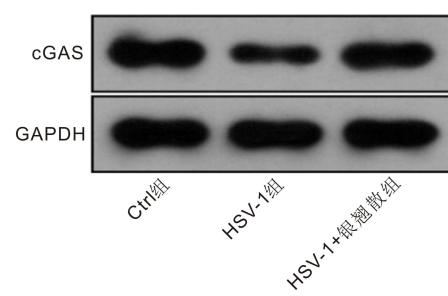


图 3 Western blot 检测各组细胞 cGAS 蛋白表达。

表 3 各组细胞相对 cGAS 蛋白表达、Arg-1、iNOS 浓度检测

分组	相对 cGAS 蛋白表达	$\bar{x} \pm s$	Arg-1(ng/L)	iNOS(ng/L)
Ctrl 组	0.71 ± 0.09		42.50 ± 4.85	2.07 ± 0.24
HSV-1 组	0.27 ± 0.03^a		7.45 ± 0.85^a	5.99 ± 0.68^a
HSV-1+oe-cGAS 组	0.59 ± 0.07^c		29.34 ± 3.34^c	3.69 ± 0.42^c
HSV-1+银翘散组	0.55 ± 0.06^c		30.11 ± 3.43^c	2.38 ± 0.27^c
<i>F</i>		46.124	54.033	49.561
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

注: $^a P < 0.05$ vs Ctrl 组; $^c P < 0.05$ vs HSV-1 组。

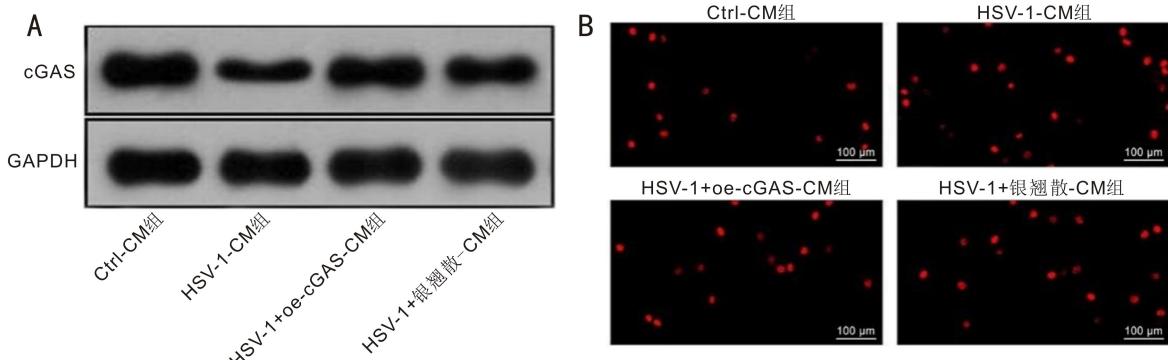


图4 各组细胞相对cGAS蛋白表达与凋亡检测结果 A: Western blot 检测各组细胞相对cGAS蛋白表达; B: TUNEL 检测各组细胞凋亡。

表4 各组细胞活力与凋亡个数检测 ($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	细胞活力	凋亡率
Ctrl-CM组	100.00±11.06	15.69±1.79
HSV-1-CM组	36.04±4.32 ^a	26.83±3.06 ^a
HSV-1+oe-cGAS-CM组	79.60±9.55 ^c	16.80±1.92 ^c
HSV-1+银翘散-CM组	83.40±10.01 ^c	17.13±1.95 ^c
F	26.894	16.058
P	<0.01	<0.01

注: ^aP<0.05 vs Ctrl-CM组; ^cP<0.05 vs HSV-1-CM组。

2.4 银翘散通过激活巨噬细胞中的cGAS调控STING-IRF3分子通路活化 相比于Ctrl组,HSV-1组巨噬细胞中cGAS、STING、IRF3蛋白表达均降低;相比于HSV-1组,HSV-1+oe-cGAS组、HSV-1+银翘散组cGAS、STING、IRF3蛋白表达均上调;相比于HSV-1+oe-cGAS组,HSV-1+oe-cGAS+银翘散组cGAS、STING、IRF3蛋白表达进一步增强(均P<0.05),见表5,图5。

2.5 银翘散改善小鼠HSK 对于对照组小鼠,观察期间共有10只小鼠在建模第1d出现轻微角膜充血症状,而后逐渐改善,直至实验结束没有小鼠死亡;而模型组所有小鼠在感染HSV-1后第1d就出现了发病症状,包括角膜充血、水肿,随时间推移,症状逐渐加重,第5d出现角膜混浊、溃疡、流泪等不适症状,第7d有5只小鼠出现死亡,至实验结束共有12只小鼠死亡;相比于模型组,药物组小鼠HSK病情进展较缓慢,不适症状较轻,所有小鼠在第1d出现角膜充血、水肿表现,第7d症状最严重,有4只小鼠死亡,之后其余小鼠角膜不适症状逐渐减轻,直至实验结束共有10只小鼠死亡。实验结束时模型组与药物组小鼠发病率均为100%,死亡率分别为30%和25%,差异无统计学意义(P>0.05)。

建模不同时间三组角膜炎和睑缘炎评分比较,差异有统计学意义(角膜炎评分:F_{组间}=15.23,P_{组间}=0.0003;F_{时间}=20.15,P_{时间}=0.00005;F_{组间×时间}=8.67,P_{组间×时间}=0.002;睑缘炎评分:F_{组间}=13.56,P_{组间}=0.0005;F_{时间}=18.32,P_{时间}=0.00008;F_{组间×时间}=7.23,P_{组间×时间}=0.003)。与对照组相比,模型组在第5、10、15、20、25、30d的角膜炎评分和睑缘炎评分显著升高(均P<0.05)。与模型组相比,药物组在第10、15、20、25、30d的角膜炎评分和睑缘炎评分显著降低(均P<0.05),见表6。ELISA检测血清中细胞因子水平结果显示,与对照组相比,模型组小鼠血清中

表5 各组细胞相对cGAS、STING、IRF3蛋白表达检测

分组	cGAS	STING	IRF3	$\bar{x} \pm s$
Ctrl组	0.82±0.10	0.71±0.09	0.73±0.09	
HSV-1组	0.18±0.02 ^a	0.12±0.02 ^a	0.22±0.03 ^a	
HSV-1+oe-cGAS组	0.48±0.05 ^c	0.38±0.05 ^c	0.49±0.06 ^c	
HSV-1+银翘散组	0.55±0.07 ^c	0.53±0.06 ^c	0.48±0.06 ^c	
HSV-1+oe-cGAS+银翘散组	0.62±0.07 ^c	0.65±0.08 ^c	0.68±0.08 ^c	
F	35.948	39.975	26.911	
P	<0.01	<0.01	<0.01	

注: ^aP<0.05 vs Ctrl组; ^cP<0.05 vs HSV-1组; ^cP<0.05 vs HSV-1+oe-cGAS组。

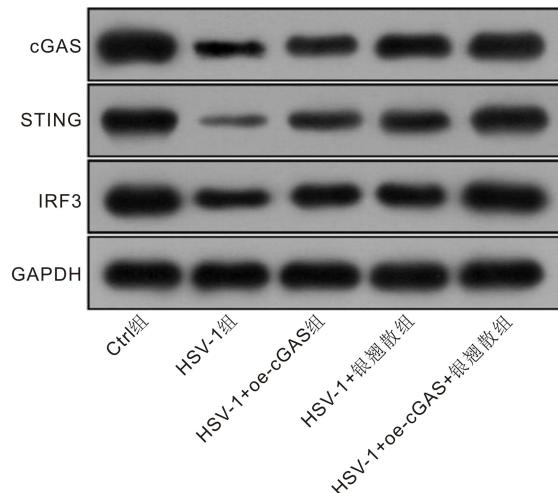


图5 Western blot检测各组细胞cGAS和STING及IRF3表达。

Arg-1浓度降低、iNOS浓度升高,经过银翘散治疗则降低了iNOS的浓度,并升高了Arg-1的浓度(均P<0.05)。蛋白质印迹法检测小鼠角膜组织中cGAS、STING与IRF3蛋白表达结果表明,相比于对照组,模型组角膜组织中cGAS、STING、IRF3蛋白表达水平明显下调,而经过银翘散治疗则升高了cGAS、STING、IRF3蛋白表达水平(均P<0.05),见表7,图6。

3 讨论

目前,HSK的研究领域正呈现出多元化的趋势,涵盖了发病机制、治疗手段和预防策略等多个层面。然而,由于HSV在全球范围内广泛分布,其潜伏特性与再激活作用状态使得疾病的快速检测与根治成为临床治疗中的难

表 6 建模不同时间各组小鼠角膜炎和睑缘炎评分比较

(x±s, 分)

时间	角膜炎评分			睑缘炎评分		
	对照组	模型组	药物组	对照组	模型组	药物组
第 1 d	1.33±0.52	1.50±0.55	1.33±0.82	0.83±0.75	1.33±0.52	1.17±0.75
第 5 d	1.17±0.41	2.00±0.89 ^a	1.50±0.55	1.00±0.63	2.00±0.89 ^a	1.67±0.82
第 10 d	0.83±0.75	2.67±1.03 ^a	2.00±0.89 ^c	0.83±0.98	2.33±1.03 ^a	2.17±0.98 ^c
第 15 d	0.67±0.52	3.17±0.75 ^a	2.33±0.52 ^c	1.00±0.89	2.50±1.05 ^a	2.33±1.03 ^c
第 20 d	0.50±0.55	3.50±0.84 ^a	2.17±0.41 ^c	0.83±0.75	3.17±0.75 ^a	2.00±0.89 ^c
第 25 d	0.33±0.52	3.00±0.89 ^a	1.83±0.41 ^c	0.67±0.52	3.33±0.82 ^a	1.83±0.75 ^c
第 30 d	0.17±0.41	2.50±1.05 ^a	1.25±0.55 ^c	0.83±0.41	3.00±0.63 ^a	1.83±0.98 ^c

注: ^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 模型组。

表 7 各组细胞 Arg-1、iNOS 浓度及相对 cGAS、STING、IRF3 蛋白表达检测

(x±s)

分组	Arg-1 (ng/L)	iNOS (ng/L)	cGAS	STING	IRF3
对照组	32.91±3.75	9.92±1.13	0.54±0.05	0.69±0.07	0.86±0.09
模型组	11.58±1.32 ^a	18.79±2.14 ^a	0.18±0.03 ^a	0.11±0.01 ^a	0.38±0.05 ^a
药物组	24.62±2.81 ^c	15.21±1.73 ^c	0.39±0.07 ^c	0.42±0.05 ^c	0.61±0.07 ^c
F	87.810	40.502	70.922	202.211	66.933
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

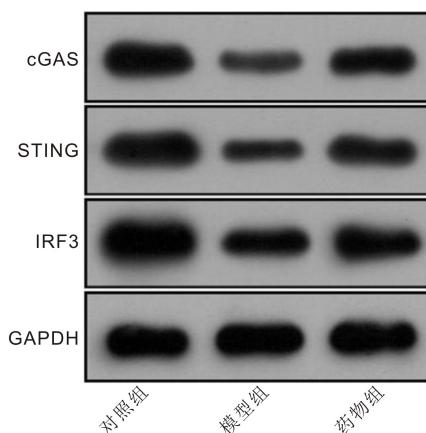
注: ^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs 模型组。

图 6 Western blot 检测各组角膜组织 cGAS 和 STING 及 IRF3 蛋白表达。

点^[13]。以往研究发现神经肽在病毒性角膜炎中扮演重要角色,能够调控病毒感染的病理过程,并通过多种作用参与病毒性角膜炎双眼角膜病变的进展,具有潜在的辅助诊断及治疗价值^[14]。而本研究在整合传统中药与现代分子生物学机制、揭示巨噬细胞极化在病毒性角膜炎中的新作用以及为治疗提供新思路等方面均表现出较高的新颖性。通过综合体外与体内实验,发现银翘散可能是治疗 HSK 的有效中药配方之一。进一步深入探究其作用机制,并合理推测银翘散可能通过调控 cGAS-STING-IRF3 分子通路,影响巨噬细胞的极化状态,从而对 HSK 发挥治疗作用。

本研究通过 MTT 和 TUNEL 检测结果发现,HSK 组 HCE-T 细胞活力降低、凋亡增加,银翘散干预可逆转这一结果,这显示银翘散能减轻 HSV-1 对 HCE-T 细胞的损伤,保护角膜上皮细胞,对维持角膜的正常生理功能具有重要意义。早期临床研究中,已发现银翘散对角膜炎具有显著的治疗效果,但这些研究主要聚焦于配方中药物如疏泻导滞、退红消肿、收泪止痛等中药作用的探讨^[15]。近年

来,随着研究的深入,逐渐认识到巨噬细胞在该疾病中扮演的重要角色。本研究结果发现,HSV-1 感染使巨噬细胞上清液中 Arg-1 浓度下降、iNOS 浓度上升,银翘散处理后可逆转。收集不同组巨噬细胞 CM 处理 HCE-T 细胞发现,银翘散能提升细胞活力、降低凋亡。说明银翘散抑制巨噬细胞 M1 型极化,改善细胞因子环境,减轻对 HCE-T 细胞的损伤,调节免疫炎症反应。研究表明,促进巨噬细胞从 M1 型向 M2 型的极化转变,有助于降低炎症反应并改善急性单纯疱疹性脑炎的病理改变,本研究中银翘散抑制巨噬细胞 M1 型极化,与之相符,证实了调节巨噬细胞极化在病毒感染性疾病中的积极作用^[16]。此外,巨噬细胞在 HSV-1 介导的角膜新生血管形成和炎症过程中也发挥着关键作用,可能通过释放特定的细胞因子和参与免疫调节来影响角膜的病理改变^[17]。此外,在流感病毒感染的巨噬细胞体外模型中,银翘散通过调节巨噬细胞展现出了显著的抗病毒作用^[18]。本研究也发现银翘散对 HSV-1 感染有治疗效果,说明银翘散在不同病毒感染模型中可能具有相似的调节巨噬细胞的抗病毒机制。

本研究中,HSV-1 感染巨噬细胞后,cGAS 表达明显降低,而过表达 cGAS 或者使用银翘散处理后,巨噬细胞 cGAS 蛋白表达增强,且能改善被 HSV-1 损伤的 HCE-T 细胞活力并抑制其凋亡。这说明 cGAS 表达的增加可能有助于对抗 HSV-1 感染。已有研究揭示,当病毒感染细胞时,cGAS 通过与 beclin-1 的相互作用,诱导病毒自噬过程,清除病毒 DNA,从而限制病毒在细胞内的复制和扩散^[19]。cGAS-STING 通路与 IRF3 的磷酸化是宿主细胞抗病毒免疫反应的关键环节,当 cGAS 的酶活性降低时,STING、TBK1 以及 IRF3 的磷酸化水平会下调,导致干扰素基因活化受到抑制,这使得 HSV 能够在宿主细胞内复制并持续存在^[20]。在本次实验中,HSV-1 组巨噬细胞中 cGAS、STING、IRF3 蛋白表达均降低,而 HSV-1+oe-cGAS 组、HSV-1+银翘散组 cGAS、STING、IRF3 蛋白表达均上调,这表明过表达 cGAS 或使用银翘散处理可激活 cGAS-

STING 通路,促进 IRF3 的磷酸化,进而活化干扰素基因,增强宿主细胞的抗病毒免疫反应,抑制 HSV-1 在细胞内的复制。此外,激活巨噬细胞中的 STING/IRF3 信号通路能有效减弱乙型肝炎病毒的感染^[21]。并且 STING/IRF3 信号通路在 HSK 中扮演着抗病毒和调节炎症反应的重要角色,该通路的激活能够增强 I 型干扰素的表达,从而抑制病毒复制,缓解炎症反应,减轻角膜炎的损伤^[22]。本研究进一步借助动物实验证实,银翘散干预的药物组小鼠 HSK 病情进展缓慢、症状较轻,虽发病率和死亡率与模型组无统计学差异,但能抑制角膜炎和睑缘炎程度,调节血清中 Arg-1 和 iNOS 浓度,提升角膜组织中 cGAS、STING、IRF3 蛋白表达水平,减轻眼部组织损伤。结合本研究的实验数据,过表达 cGAS 或使用银翘散处理后,促进了 cGAS-STING 通路的激活,上调了 IRF3 蛋白表达,推测这一过程增强了 I 型干扰素的表达,从而抑制炎症反应,减轻了 HSK 对眼部组织的损伤。在关于自身免疫性疾病的研究中,甘草被发现具有调控 STING/IRF3 信号通路的能力^[23]。提示中药在调节该通路方面具有潜在价值,而本次研究中银翘散同样可调控 cGAS-STING 通路,这为中药治疗 HSK 提供了新的理论依据和研究方向。综合来看,cGAS-STING 通路在 HSK 中通过抑制病毒复制、激活抗病毒免疫反应以及调节炎症反应等机制,对疾病的发生发展起到重要的调控作用。

尽管本研究取得了一定的成果,但仍存在一些局限性:(1)虽然本研究通过体内外实验发现银翘散可能对 HSK 具有治疗作用,但缺乏对实际临床转化潜力的分析,并且银翘散应用的稳定性和安全性有待进一步验证。(2)本研究主要聚焦于银翘散对 cGAS-STING-IRF3 通路的调节和巨噬细胞极化的影响,但 HSK 的发病机制可能涉及多个信号通路和细胞类型,因此未来的研究需要进一步探讨银翘散对其他通路和细胞的影响。银翘散成分复杂,意味着其可能作用于 cGAS-STING-IRF3 通路的多个靶点,但目前具体作用于哪些分子靶点尚不明确,未来的研究可以进一步分离和鉴定银翘散中的有效成分,并对其中的作用机制进行深入分析。

综上所述,本研究的结论与之前的研究类似,银翘散可能具有治疗 HSK 的潜力。然而本研究在前人研究的基础上,进一步分析了其中可能存在的分子机制,即银翘散能够调节 cGAS-STING-IRF3 分子通路的活性,影响巨噬细胞的极化状态,进而参与 HSK 的进展。本研究揭示了银翘散治疗 HSK 的新机制,可能为 HSK 治疗提供了新的候选药物和策略。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:姚宁论文选题与修改,初稿撰写;赵荣丽、杨雪梅、刘玉环、丁雅琴文献检索,数据分析;戴雁选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] McCormick I, James C, Welton NJ, et al. Incidence of herpes simplex virus keratitis and other ocular disease: global review and estimates. *Ophthalmic Epidemiol*, 2022, 29(4):353-362.
- [2] 张豪博, 张莹. 巨噬细胞极化在单纯疱疹病毒 1 型感染中的作用研究进展. 病毒学报, 2023, 39(6):1757-1767.
- [3] 丁辉, 胡施思, 杨镇朵, 等. 丁香酚通过 PI3K/AKT 信号通路减轻镰刀菌诱导的角膜炎症. 国际眼科杂志, 2024, 24(8):1194-1199.
- [4] Guo R, Zhao MF, Liu H, et al. Uncovering the pharmacological mechanisms of Xijiao Dihuang decoction combined with YinQiao powder in treating influenza viral pneumonia by an integrative pharmacology strategy. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 141:111676.
- [5] Fan YH, Liu W, Wan RH, et al. Efficacy and safety of YinQiao powder combined with western medicine in the treatment of pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Complement Ther Clin Pract*, 2021, 42:101297.
- [6] Luo W, Xu G, Song Z, et al. Licorice extract inhibits the cGAS-STING pathway and protects against non-alcoholic steatohepatitis. *Front Pharmacol*, 2023, 14:1160445.
- [7] Chen MX, Meng QC, Qin YF, et al. TRIM14 inhibits cGAS degradation mediated by selective autophagy receptor p62 to promote innate immune responses. *Mol Cell*, 2016, 64(1):105-119.
- [8] Wang G, Liu J, Zhang YN, et al. Ginsenoside Rg3 enriches SCFA-producing commensal bacteria to confer protection against enteric viral infection via the cGAS-STING-type I IFN axis. *ISME J*, 2023, 17(12):2426-2440.
- [9] Sakai C, Ueda K, Goda K, et al. A possible role for proinflammatory activation via cGAS-STING pathway in atherosclerosis induced by accumulation of DNA double-strand breaks. *Sci Rep*, 2023, 13(1):16470.
- [10] Fu YJ, Yan YQ, Qin HQ, et al. Effects of different principles of Traditional Chinese Medicine treatment on TLR7/NF- κ B signaling pathway in influenza virus infected mice. *Chin Med*, 2018, 13:42.
- [11] 霍炳杰, 常靓, 刘羽, 等. 银翘散在不同煎煮时间下体外抑制流感病毒及对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体及其下游信号转导通路的影响. 中华中医药学刊, 2016, 34(7):1581-1584.
- [12] Dhanushkodi NR, Srivastava R, Coulon PA, et al. Healing of ocular herpetic disease following treatment with an engineered FGF-1 is associated with increased corneal anti-inflammatory M2 macrophages. *Front Immunol*, 2021, 12:673763.
- [13] 储晨晨, 纪玲, 周文华. 聚类规则间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 系统用于单纯疱疹病毒治疗的研究进展. 中华检验医学杂志, 2023, 46(5):524-528.
- [14] 穆祎, 张弘. 角膜神经及 P 物质在病毒性角膜炎中的研究进展. 国际眼科杂志, 2023, 23(6):908-912.
- [15] 张春英, 王小玲, 祝艳妮. 中药薰洗治疗角膜炎的 43 只眼. 陕西中医, 2006, 27(5):533-534.
- [16] Song XW, Cao WY, Wang ZX, et al. Nicotinamide n-oxide attenuates HSV-1-induced microglial inflammation through sirtuin-1/NF- κ B signaling. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24):16085.
- [17] Filiberti A, Gmyrek GB, Berube AN, et al. An intact complement system dampens Cornea inflammation during acute primary HSV-1 infection. *Sci Rep*, 2021, 11(1):10247.
- [18] 毛钦, 马璐璐, 刘天怡, 等. 犀角地黄汤合银翘散通过促进流感病毒感染的小鼠巨噬细胞自噬而降低线粒体 ROS 水平. 中国病理生理杂志, 2022, 38(4):704-711.
- [19] Liang QM, Seo GJ, Choi YJ, et al. Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(2):228-238.
- [20] Jin XM, Wang WJ, Zhao XW, et al. The battle between the innate immune cGAS-STING signaling pathway and human herpesvirus infection. *Front Immunol*, 2023, 14:1235590.
- [21] Wu ZX, Zhao XM, Li RS, et al. The combination of Schisandrin C and Luteolin synergistically attenuates hepatitis B virus infection via repressing HBV replication and promoting cGAS-STING pathway activation in macrophages. *Chin Med*, 2024, 19(1):48.
- [22] Liu Z, Xia LK. E3 ligase RNF5 inhibits type I interferon response in herpes simplex virus keratitis through the STING/IRF3 signaling pathway. *Front Microbiol*, 2022, 13:944101.
- [23] Wen JC, Mu WQ, Li H, et al. Glabridin improves autoimmune disease in Trex1-deficient mice by reducing type I interferon production. *Mol Med*, 2023, 29(1):167.