

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.16.015

实验研究

清肺口服液早期抗呼吸道合胞病毒肺炎的作用机制

陈传喆¹, 袁 斌^{2*}, 徐建亚¹, 周立华³, 邹建东²

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市鼓楼区汉中路 282 号, 210029; 2. 南京中医药大学附属医院; 3. 南京中医药大学基础医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81341086); 南京中医药大学附属医院院级课题 (Y12049)

摘要 **目的** 探讨清肺口服液早期抗呼吸道合胞病毒肺炎的作用机制。 **方法** 将 45 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型组、利巴韦林组 [利巴韦林颗粒 0.05 g/(kg·d)] 和清肺低剂量组 [清肺口服液 37 g/(kg·d)]、清肺高剂量组 [清肺口服液 111 g/(kg·d)], 每组 9 只。除空白组外, 其余各组均给予呼吸道合胞病毒 (RSV) 50 μl/只滴入鼻孔造模, 造模 48 h 后开始给药。24 h 后观测肺组织病理改变程度, 检测肺组织中 γ 干扰素 (IFN-γ)、T-bet、GATA3 蛋白水平及脾组织中 Th1/Th2 细胞平衡水平。 **结果** 与空白组比较, 模型组肺组织病理评分显著增高、IFN-γ 水平降低、Th1/Th2 水平下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 利巴韦林组、清肺高剂量组肺组织病理评分显著下降、IFN-γ 水平升高、Th1/Th2 水平升高 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组 T-bet 水平降低而 GATA3 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 T-bet 水平升高而 GATA3 水平下降 ($P < 0.01$)。 **结论** 早期采用清肺口服液干预呼吸道合胞病毒肺炎可抑制炎症变化, 其机制可能与降低肺组织 GATA3 水平, 升高 T-bet 水平, 诱导 IFN-γ 表达, 从而达到 Th1/Th2 细胞平衡相关。

关键词 清肺口服液; 呼吸道合胞病毒; 炎症因子; 转录因子

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial viral, RSV) 是一种常见的可以导致呼吸道感染的病毒, 在儿童急性病毒性呼吸道疾病中发病率较高。大部分患儿在感染后仅发生轻微上呼吸道感染症状, 只有少部分会发展为严重的下呼吸道感染, 例如毛细支气管炎、肺炎, 甚至死亡。有研究称, 1 岁以内 70% 左右的婴幼儿, 以及大多数 2~3 周岁的幼儿呼吸道感染是由 RSV 引起的^[1-2]。因此, 尽早用药控制 RSV 感染, 对于疾病的预后与转归具有重要的临床意义。本实验观察早期使用清肺口服液干预感染 RSV 小鼠 24 h 对体内相关细胞因子的影响, 来探讨其治疗 RSV 感染的免疫学机制。

1 材料与方法

1.1 动物

45 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 体重 (20.0 ± 2.0) g, 购于扬州大学比较医学中心。实

验动物合格证号: SCINK (苏) 2007-0001。

1.2 药物

清肺口服液: 由麻黄 4 g, 苦杏仁 10 g, 桑白皮 10 g, 葶苈子 6 g, 生石膏 24 g, 丹参 6 g, 紫花前胡 10 g, 拳参 12 g, 僵蚕 6 g, 虎杖 12 g 组成, 上药按《中华人民共和国药典 (2010 年版)》^[3] 中制剂要求, 经蒸馏收取、煎煮浓缩、乙醇浸泡回收等工艺制成。用生理盐水配成浓度相当于生药 1.23 g/ml (相当于小儿临床等效剂量) 和 3.7 g/ml (相当于小儿临床等效量 3 倍) 两种水煎剂。利巴韦林颗粒: 由山东仁和制药有限公司生产, 规格: 50 mg × 18 袋, 国药准字: H20056707。配成浓度为 0.0025 g/ml 溶液。

1.3 试剂

全蛋白抽提试剂盒 (上海生工生物工程有限公司, 批号: BSP003); Bradford 蛋白含量检测试剂盒 (上海圻明生物科技有限公司, 批号: P0006); β-Actin (Abcam 公司, 批号: ab185055), 二抗

* 通讯作者: yuanbin68358@163.com, 13851463308

(羊抗兔 IgG-HRP) (Jackson 公司), 小鼠 Th1/Th2 流式细胞检测试剂盒 (美国 BD Pharmingen 公司, 批号: 560758)。

1.4 实验仪器

EXL800 型酶标仪: 美国伯腾仪器有限公司; 164-5051 型 Western 电泳仪: 美国伯乐公司; SH03014 型高速冷冻离心机: 美国科俊仪器公司; C6 Flow Cytometer® System 流式细胞仪: 美国 BD Pharmingen 公司)。

1.5 分组及造模

将 45 只小鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、利巴韦林组和清肺低、高剂量组, 每组 9 只。在清洁级实验动物房适应性饲养 1 周后, 除空白组外其余各组小鼠置于密封容器内均以乙醚吸入性麻醉, 然后给予 RSV 病毒 [A 亚型 (Long 株), 由武汉国家典型培养物保藏中心提供] 50 μ l/只滴入鼻孔 (正常组以 50 μ l 生理盐水刺激) 制备模型^[4]。造模 48 h 后, 利巴韦林组予利巴韦林颗粒 0.05 g/(kg·d); 清肺低、高剂量组分别给予清肺口服液 37 g/(kg·d)、111 g/(kg·d); 空白组和模型组予 0.9% 生理盐水 1 ml/kg。各组均灌胃给药, 每日 1 次, 给药 24 h 后处死。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 小鼠肺组织病理分析 实验结束剖取小鼠肺后叶, 经 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规取材, 脱水, 石蜡包埋, 制片, HE 染色, 由病理专业人员在 200 倍光学显微镜下阅片。同时参照文献 [5] 进行肺组织病理学指数评分。评分标准: 肺泡壁 (充血、水肿、炎细胞浸润各 1 分); 肺气肿 1 分; 肺泡腔渗出 1 分; 肺内支气管 (上皮变性、腔内渗出各 1 分)。

1.6.2 肺泡灌洗液 (BALF) γ 干扰素 (IFN- γ) 表达 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗小鼠肺脏, 并移至 5 ml 离心管中, 2 500 xg 离心 5 min, 取上清。依据酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (上海联硕生物科技有限公司, 批号: AE900224Mu) 说明书, 检测 BALF IFN- γ , 于酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值。

1.6.3 脾脏 Th1/Th2 细胞平衡水平检测 将刚摘取的小鼠脾脏加入 PBS 研磨成为单细胞悬液, 每管抽取 200 μ l 左右。根据流式细胞检测试剂盒操作流程进行染色、渗透及固定, 最后上流式仪器检测。

1.6.4 肺组织 T-bet、GATA3 蛋白表达检测 取各组小鼠肺组织, 将样本用裂解缓冲液稀释相同浓

度, 取等量上样缓冲液于试管中, 蛋白量为 70 μ g, 并于 95 ~ 100℃ 5 min 后冰上冷却上样。进行 T-bet、GATA3 蛋白表达检测。用 Bio-Rad 公司提供的 Quantity One 进行灰度值分析, 以条带平均灰度值与内参条带平均灰度值比值作为蛋白的相对含量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 结果以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 组间两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理变化

空白组小鼠肺组织未见异常变化; 模型组小鼠肺组织出现肺泡壁轻度或中度充血、水肿, 致肺泡壁增厚, 肺内支气管上皮变性; 利巴韦林组小鼠肺内支气管上皮细胞排列较整齐, 腔内无明显炎性渗出物; 清肺低剂量组小鼠肺组织出现少量中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润; 清肺高剂量小鼠肺组织未见明显细胞坏死, 管腔内未见渗出物, 支气管周围无明显水肿或炎细胞浸润。表 1 示, 与空白组比较, 模型组肺组织病理评分显著增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 利巴韦林组、清肺高剂量组肺组织病理评分显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠肺组织病理评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肺组织病理评分
空白组	9	0.11 $\pm$ 0.55
模型组	9	5.00 $\pm$ 1.41*
利巴韦林组	9	4.20 $\pm$ 1.10▲▲
清肺低剂量组	9	5.20 $\pm$ 0.45▲
清肺高剂量组	9	4.20 $\pm$ 1.30▲▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.2 各组小鼠 BALF 中 IFN- γ 、脾脏 Th1/Th2 水平比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 IFN- γ 及 Th1/Th2 均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 利巴韦林组和清肺高剂量组 IFN- γ 及 Th1/Th2 显著升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠 IFN- γ 、Th1/Th2 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ (OD 值)	Th1/Th2
空白组	9	15.69 $\pm$ 2.13	27.99 $\pm$ 8.32
模型组	9	5.32 $\pm$ 0.38*	10.0 $\pm$ 0.74*
利巴韦林组	9	11.15 $\pm$ 0.08▲	14.45 $\pm$ 2.26▲
清肺低剂量组	9	4.44 $\pm$ 0.18	4.56 $\pm$ 1.92
清肺高剂量组	9	10.57 $\pm$ 3.21▲	19.14 $\pm$ 1.28▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.01$

2.3 各组小鼠肺组织 T-bet、GATA3 蛋白表达水平比较

表 3 及图 1 示, 与空白组比较, 模型组 T-bet 蛋白降低, GATA3 蛋白升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组 T-bet 蛋白表达均显著增加, GATA3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠 T-bet、GATA3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T-bet	GATA3
空白组	9	0.84 ± 0.0007	0.37 ± 0.0133
模型组	9	0.45 ± 0.0001*	2.01 ± 0.0749*
利巴韦林组	9	0.58 ± 0.0005▲	0.82 ± 0.0592▲
清肺低剂量组	9	1.06 ± 0.0008▲	1.45 ± 0.0002▲
清肺高剂量组	9	0.42 ± 0.0006▲	0.85 ± 0.0006▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, ▲ $P < 0.01$

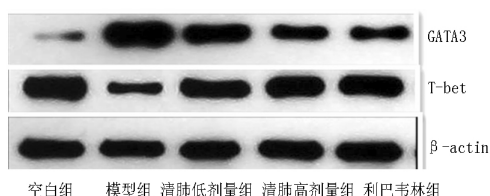


图 1 各组小鼠肺组织 T-bet、GATA3 蛋白电泳图

3 讨论

呼吸道合胞病毒肺炎属中医学“肺炎喘嗽”, 其病因主要为外感风热毒邪, 内袭于肺, 证属痰热闭肺, 肺失宣肃, 治法当以开肺化痰、解毒活血为主。清肺口服液是在麻杏甘石汤的基础上, 结合临床上多年来抗病毒治疗经验改良而成。方中炙麻黄、苦杏仁宣肺止咳平喘; 生石膏清泻肺热, 止咳平喘; 葶苈子、桑白皮泻肺平喘; 紫花前胡降气化痰; 僵蚕散风热化痰; 丹参活血通络; 虎杖清热泻肺, 止咳化痰, 活血通络; 拳参清热解毒。全方通过宣肃肺气、清热解毒、化痰泄浊、活血通络以达到治疗目的^[9]。

现代医学研究表明, RSV 感染呼吸道后通过诱导上皮细胞分泌炎症介质, 从而引起气管痉挛导致气道高反应^[10]。因此, RSV 肺炎的本质是终末气道、肺泡及肺间质的炎症反应, 而气道炎症发生的基础是由于 Th1 功能不足与 Th2 功能亢进引起^[8], 即 Th1/Th2 平衡失调所造成。亦有研究表明, 人体感染病毒后, Th1/Th2 平衡会出现多种形式的改变, 如 Th1 向 Th2 漂移、Th1 向 Th0 漂移等反应^[9]。其中 T-bet 转录因子只出现于 Th1 细胞系, 并通过启动 Th1 遗传程序在 Th1 细胞的发育中起重要作用, 同时具有抑制 Th2 细胞因子的合成,

它通过激活 IFN- γ 的基因转录, 诱导自身表达, 并通过细胞因子诱导 Th0 向 Th1 细胞分化, 甚至在其转录因子协同下, T-bet 可将分化中的 Th2 和已分化完全的 Th2 型细胞逆转为 Th1 型细胞, 同时伴随大量 IFN- γ 产生^[11]; GATA3 则是 Th2 细胞特异性转录因子^[11]。相关研究报道, GATA3 是通过白细胞介素 4 (IL-4) 基因启动子上的两个 GATA3 结合位点直接激活 IL-4, 而激活 IL-4 又促进了 Th2 细胞的增殖及分化^[12-13]。

本研究选取感染 RSV 早期给予清肺口服液干预 24 h, 以观察 T-bet、GATA3、IFN- γ 的表达水平变化。感染 RSV 肺炎病理图片表明, 小鼠肺组织均有不同程度的炎症渗出, 并且导致了细胞内 Th1/Th2 水平减弱, 使感染小鼠体内 GATA3 表达增强, T-bet 表达降低, 很大程度上抑制了抗炎因子 IFN- γ 的生产。清肺口服液不但可以提高感染小鼠体内 T-bet 的表达 ($P < 0.01$), 诱导血清中 IFN- γ 含量, 同时可以抑制 GATA3 表达 ($P < 0.01$), 最终达到 Th1/Th2 细胞平衡。因此, 尽早运用清肺口服液可使机体有效调动体内细胞因子来对抗感染, 并且实验中还发现, 高剂量清肺口服液对于肺炎的炎症渗出的改善及细胞因子调控可达到利巴韦林的治疗水平, 这也从侧面印证了清肺口服液的有效性。

参考文献

- [1] Staat MA. Respiratory syncytial virus infections in children [J]. Semin Respir Infect, 2002, 17(5): 15-20.
- [2] 汪受传, 王霖, 陈超, 等. 清肺口服液含药血清对呼吸道合胞病毒抑制作用的实验研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(1): 25-27.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2010 年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 15.
- [4] 戴启刚, 汪受传, 徐建亚, 等. 金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠 TLRTmRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(6): 1304-1307.
- [5] Martin RJ, Chu HW, Honour JM, et al. Airway inflammation and bronchial hypersponsiveness after mycoplasma pneumoniae infection in a murine model [J]. J Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(5): 577-582.
- [6] 袁斌, 任现志, 孙秋秋, 等. 清肺口服液治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎 166 例多中心单盲对照临床观察 [J]. 中医杂志, 2009, 50(3): 221-223.
- [7] Ghildyal R, Ho A, Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection [J]. FEMS

Microbiol Rev, 2006, 30(5) : 692-705.

蓝丹, 檀卫平, 夏焱, 等. T-bet 基因转染对哮喘小鼠脾脏 Th1/Th2 平衡的影响 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(1) : 74-78.

姚金晶, 陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13) : 2597-2600.

肖玲莉, 杨毅. Th1/Th2 免疫应答失衡及其影响因素 [J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(3) : 399-402.

刘智多, 孙兵, 转录因子 GATA3 在 Th2 细胞分化过程中的作用 [J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(6) : 749-753.

蒋红, 钟小芳, 雷春莲, 等. 呼吸道合胞病毒引起的下呼吸道感染中血清 IL-4、IL-12 水平的相关性 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2002, 12(2) : 135-136.

张春霞, 任少敏. T-bet/GATA3 与疾病 [J]. 基础医学与临床, 2008, 28(3) : 286-288.

Mechanism of Qingfei Oral Liquid for Early Respiratory Syncytial Virus Pneumonia

CHEN Chuangzhe¹, YUAN Bin², XU Jianya¹, ZHOU Lihua³, ZOU Jiandong²

(1. The First Clinical Medical School of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province 210029; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine; 3. Basic Medical School of Nanjing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the mechanism of Qingfei Oral Liquid for early respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia. **Methods** Totally 45 BALB/c mice were randomized into the blank group, model group, ribavirin group (0.05 g/kg of ribavirin granules), Qingfei low-dose group (37 g/kg · d Qingfei Oral Liquid) and Qingfei high-dose group (111 g/kg · d Qingfei Oral Liquid), with 9 in each. Each mouse was given 50 ul RSV intranasally to make model in all groups except the blank group. The administration was started 48 hours after modeling. The pathological changes in the lung tissue were observed 24 hours later. The levels of interferon- γ (IFN- γ), T-bet, GATA3 and Th1/Th2 were detected. **Results** Comparing with the blank group, the pathological scores were significantly increased but the levels of IFN- γ and Th1/Th2 were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the pathological scores were significantly decreased but the levels of IFN- γ and Th1/Th2 were significantly increased in the ribavirin group and Qingfei high-dose group ($P < 0.01$). Comparing with the blank group, the T-bet level was significantly decreased but the GATA3 level was significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the T-bet level was significantly increased but the GATA3 level was significantly decreased in the ribavirin group and Qingfei groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Qingfei Oral Liquid is effective for early RSV pneumonia. It can inhibit inflammatory changes, which maybe relevant to reducing GATA3 level, increasing T-bet level, inducing IFN- γ expression and achieving Th1/Th2 balance.

Keywords Qingfei Oral Liquid; respiratory syncytial virus; inflammatory cytokines; transcription factor

(收稿日期: 2014-01-15; 修回日期: 2014-04-22)

编辑: 洪 涛

朝阳胶囊、固肾安胎丸“安汀医药杯”征文通知

为促进中医药在肝炎领域的研究与应用, 交流朝阳胶囊(丸)在治疗慢性肝炎的最新理念, 促进临床合理、科学、有效、安全的用药; 交流固肾安胎丸在妇产科的临床合理用药与临床研究新进展, 针对该品种的临床应用进行评估。北京安汀医药公司与《中医杂志》联合举办“安汀杯”有奖征文活动。

1. 征文内容: 朝阳胶囊(丸): (1) 朝阳胶囊(丸)对于脾肝同治的理论和实践探索; (2) 朝阳胶囊(丸)对于肝纤维化、肝硬化各期的治疗研究; (3) 朝阳胶囊(丸)对于药物性肝炎(抗结核、抗精神病、化疗药物等)的保肝作用; (4) 朝阳胶囊(丸)对于酒精性肝炎的保肝作用; (5) 朝阳胶囊(丸)联合西药(抗病毒药、降转氨酶药等)治疗各种原因导致的慢性肝炎; (6) 朝阳胶囊(丸)与同类中成药的临床疗效比较; (7) 典型病例和病案讨论。固肾安胎丸: (1) 固肾安胎丸改善卵巢储备功能的临床应用; (2) 固肾安胎丸改善妇科内分泌功能的临床应用; (3) 固肾安胎丸改善子宫内膜厚度的临床研究; (4) 固肾安胎丸提高试管婴儿成功率的临床研究; (5) 典型病例和病案讨论。2. 征文对象: 临床使用过朝阳胶囊(丸)或固肾安胎丸的医生和药师、从事相关药物研究以及临床诊疗工作的临床专家、其他专业人士。3. 投稿邮箱: 将电子版发至 2432656243@qq.com, 邮件主题请注明“安汀杯+药品名称”字样。4. 征文时间: 2014 年 7 月 1 日-2015 年 6 月 30 日。5. 征文评审: 主办单位将组织著名专家对来稿进行评选, 将推荐部分优秀论文在核心期刊及省级专业期刊发表并给予相关奖励。6. 征文奖项: (1) 特别感谢奖: 4 名, 古徽州之旅; (2) 一等奖: 6 名, 国家级会议费赞助; (3) 二等奖: 20 名, 价值 1980 元的礼品; (4) 潜力奖: 40 名, 纯阳山胎菊礼盒; (5) 参与奖: 若干名, 精美纪念品。征文咨询电话: 010-64913427。