

· 药理 ·

清肺口服液对 RSV 感染哮喘急性发作小鼠肺组织炎症及气道反应性的影响

景晓平, 程伟伟, 何丽*

(上海市儿童医院, 上海交通大学附属儿童医院, 上海 200040)

[摘要] **目的:**探讨清肺口服液对呼吸道合胞病毒(RSV)感染哮喘急性发作小鼠模型肺组织炎症及气道反应性的影响。**方法:**60只雄性6~8周龄Balb/C小鼠,每组10只,随机分为正常组,模型组,清肺口服液高、中、低剂量组(2.34, 1.17, 0.59 g·kg⁻¹·d⁻¹),利巴韦林组(0.1 g·kg⁻¹·d⁻¹),共6组,卵细胞(OVA)致敏及雾化激发哮喘模型,经RSV隔日滴鼻连续3次感染,获得RSV感染哮喘模型;治疗组予清肺口服液分高、中、低剂量ig;正常予等量生理盐水ig;阳性药组给予利巴韦林注射液ip。末次激发24h后,用Buxco RC系统检测小鼠气道反应性;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)进行嗜酸细胞分析;肺组织经HE染色,PAS染色,VG染色评估炎症反应。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠BALF中嗜酸粒细胞比例(EOS%)明显升高,气道反应性较正常组明显增高(P<0.01),模型组小鼠肺组织呈现哮喘合并感染典型改变,组织充血水肿,分泌物显著增多;气道周围炎性细胞浸润、胶原增生显著;与模型组比较,清肺口服液低剂量组BALF中EOS%明显降低,清肺口服液及利巴韦林干预均可显著改善气道高反应性(P<0.05),其中中剂量清肺口服液效果尤为显著,气道功能与正常组相比差异无显著性,清肺口服液低剂量可以明显减轻小鼠肺组织充血水肿及炎性细胞浸润,气道分泌物及气道周围胶原增生较模型组明显改善。**结论:**中剂量清肺口服液可以明显减轻RSV感染哮喘急性发作小鼠肺组织炎症及气道高反应性。

[关键词] 清肺口服; 呼吸道合胞病毒; 哮喘; 气道炎症; 气道高反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190080

Qingfei Oral Liquid Reduced Airway Inflammation and Hypersensitivity in Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infected Murine Asthma Model JING Xiao-ping, CHEN Wei-wei, HE Li* (Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Qingfei oral liquid on airway inflammation and hypersensitivity in a respiratory syncytial virus (RSV) infected murine asthma model. **Method:** Sixty 6-8-week-old male Balb/C mice were equally divided into six groups by random: the normal group (CON), model group (RSV + OVA), Qingfei oral liquid group [high dose (HD), middle dose (MD), low dose (LD)], and ribavirin group (LB). The asthma model was reproduced by sensitization and nebulizer inspired OVA, followed by repeated inhalation of RSV for three consecutive times to obtain RSV-infected asthma model (1.0 × 10⁶ PFU/mL in 50 μL). Qingfei oral liquid groups were administered with different doses. The normal control group was administered with normal saline. LB group received ribavirin injection ip 24 h after of the last administering, Buxco RC system was used to detect airway hyperresponsiveness, ESO cells infiltration were measured in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) fluid, and inflammation was assessed in lung tissue by HE staining, PAS staining, VG staining. **Result:** The proportion of BALF's eosinophils (EOS%) in model group was significantly higher than that in the normal group (P<0.05). Airway hyperresponsiveness in model group was significantly higher than that in normal group (P<0.01). Qingfei oral liquid and Ribavirin cleared RSV's infection and significantly improved airway

[收稿日期] 20150329(014)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81303005);上海市自然科学基金项目(12ZR1425700)

[第一作者] 景晓平, 博士, 主治医师, 从事中医药治疗小儿肾脏及呼吸系统疾病研究, Tel: 021-62474880, E-mail: xiaopingjdoctor@126.com

[通讯作者] *何丽, 博士, 副主任医师, 从事中医药治疗小儿呼吸系统疾病研究, Tel: 021-62475103, E-mail: heli29@126.com

hyperresponsiveness compared with the model group ($P < 0.05$), among which Qingfei oral liquid middle-dose group had the most significant effect. There was no significant difference in airway functions compared with normal group. Qingfei oral liquid middle-dose group significantly reduced lung tissue edema and inflammatory cell infiltration, airway secretions and collagen hyperplasia around airway compared with model group. **Conclusion:** Qingfei oral liquid middle-dose group can significantly reduce inflammation of lung tissues and airway hyperresponsiveness in RSV infected murine asthma model.

[Key words] Qingfei oral liquid; respiratory syncytial virus; asthma; airway inflammation; airway hypersensitivity

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染是婴幼儿呼吸道感染首要病原体之一^[1],流行病学资料显示婴幼儿反复感染RSV后的数年或数十年均有出现哮喘的风险^[2]。RSV感染也可引发哮喘急性发作和肺功能损害,同时也是导致哮喘持续发作、肺纤维化等慢性肺部疾病患者病情加重甚至死亡的重要原因。RSV感染后呼吸道上皮细胞分泌炎性因子及炎性介质介导的气道炎症及高反应是影响疾病转归的重要因素^[3]。目前针对RSV感染尚缺乏安全有效的治疗手段^[4]。近年来研究显示中医药在抗RSV感染中具有独特的优势^[5-7]。清肺口服液是儿科名中医汪受传教授治疗“痰热闭肺证”的经验方,由麻黄、黄芩、虎杖、杏仁、葶苈子等药物组成,临床应用治疗病毒性肺炎疗效显著^[8]。本研究拟以RSV感染Balb/C小鼠哮喘急性发作模型为研究对象,从气道炎症和气道高反应性两方面探讨清肺口服液抗RSV感染致哮喘急性发作的机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 Balb/C小鼠,SPF级,雄性,体重18~22g,6~8周龄,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(沪)2008-0016。RSV A2细菌株(美国ATCC公司),HEp-2细胞(中国科学院上海细胞库)。

1.2 药物及试剂 清肺口服液由上海中医药大学附属普陀中心医院制剂室提供,主要有炙麻黄、苦杏仁、生石膏、黄芩、葶苈子、桑白皮、前胡、虎杖组成(生药质量浓度 $4.86\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。卵蛋白(OVA, V级,美国Sigma公司,批号A5503-10A),氢氧化铝分析纯(美国Sigma公司,批号030M1549),戊巴比妥钠(上海化学试剂公司,批号860901),乙酰甲胆碱(上海化学试剂公司,批号TM007302),HE, PAS, VG染色液(上海化学试剂公司,批号分别为050108,116302,DC0046)。

1.3 仪器 RM2235型切片机(德国Leica公司),

402AI型超声雾化器(上海鱼跃医疗设备有限公司),DFC320型显微镜(德国Leica公司),Buxco RC型系统小鼠呼吸机(美国Buxco公司)。

2 方法

2.1 细胞与病毒培养 HEp-2细胞在含10%胎牛血清的DMEM中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养,细胞长满单层后,将RSV接种HEp-2细胞。继续在含2%灭活胎牛血清的DMEM的维持液中培养,3~5d出现细胞病变。待病变达100%时收获病毒,将病毒冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,反复冻融2次,5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$,30min),取上清备用。参照文献[9]的方法,采用空斑形成试验测定病毒滴度,以空斑形成单位(PFU)表示,取 1×10^6 PFU备用。

2.2 动物分组及模型建立 60只小鼠,随机分为6组,每组10只。参照孙婧^[10]的方法并改良建立哮喘模型。模型组:分别于第1,7,14天 ip OVA致敏液 0.2 mL [OVA 20mg + Al(OH) 2mg,溶于PBS, pH 7.2],休息1周,第21天起将小鼠置于透明密闭容器中以1%OVA(V级)溶液30mL雾化吸入,每次30min,每日1次,连续雾化激发7d,雾化过程中出现了较明显的头面抓痒,前肢缩抬,弓背,呼吸加深加快,安静少动等哮喘急性发作症状;第28,30,32天隔日给予 1×10^6 PFU RSV鼻腔滴入($50\text{ }\mu\text{L}$ /次),共3次;第29,31,33天隔日上午予相同上述OVA隔日雾化,下午予 0.5 mL 生理盐水 ig ;治疗组:第25,26,27,29,31,33天隔日下午予清肺口服液高剂量($2.34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 0.5 mL),中剂量($1.17\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 0.5 mL),低剂量($0.59\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 0.5 mL) ig ;阳性药组:第29,31,33隔日下午予利巴韦林注射液($0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) ip ;正常组:以PBS代替OVA致敏、激发、鼻腔滴入、生理盐水 ig ,激发频次、剂量、时间同上。所有实验经上海市儿童医院动物伦理委员会审核同意,在生物安全2级实验室进行。

2.3 肺泡灌洗液(BALF)进行嗜酸细胞比例(EOS)分析 每次注入1mL预冷无菌PBS液,按0.4,

0.3, 0.3 mL 反复灌洗 3 次, 回收支气管肺泡灌洗液, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 细胞沉淀用 1 mL PBS 液重悬后进行检测。

2.4 气道反应性测定 末次诱喘后 24 h, 1.5% 戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ ip 麻醉动物, 仰卧固定于实验台, 按操作说明植入小鼠呼吸机。依次注射不同剂量乙酰甲胆碱 (MCh) 3.125, 6.25, 9.375, 12.50 mg·L⁻¹, 每次间隔 4 min, 观察不同剂量 MCh 激发后大鼠的气道阻力变化情况。

2.5 肺组织病理学检查 摘取右肺下叶组织, 以 4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h 后经脱水、石蜡包埋, 制备厚 4 μm 的标准切片, 按操作常规行 HE 染色观察气道周围炎症细胞浸润; 过碘酸-雪呔 (PAS) 染色观察气道黏液分泌; Van Gieson (VG) 染色观察气道周围胶原增生情况。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析, 计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RSV 与 HEp-2 细胞孵育后的变化 HEp-2 细胞培养板中贴壁生长, 形成单层细胞镜下可见细胞铺满底壁, 排列规则紧密, 互相嵌合成多边形, 呈铺路石状, RSV A2 感染细胞后, 出现典型的融合病变, 镜下可见细胞界线不清, 病变细胞相互发生融合而呈“多核巨细胞”的合胞体。

3.2 对小鼠 BALF 中 EOS 的影响 与正常组比较, 模型组小鼠 BALF 中 EOS 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清肺口服液中、低剂量组 BALF 中 EOS 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.3 对小鼠肺功能气道反应性的影响 与正常组比较, 模型组小鼠气道反应性明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清肺口服液中、低剂量组肺功能明显改善 ($P < 0.05$)。见图 1。

3.4 对小鼠肺组织病理学的影响 模型组鼠肺组织出现典型哮喘伴肺间质性炎症改变, 肺泡腔明显狭窄, 炎性细胞浸润明显, 毛细血管扩张充血, 清肺口服液中剂量组较模型组有明显改善, 在改善炎症细胞浸润上与利巴韦林相当, 病理损害显著改善, 与正常组差别不明显, 清肺口服液高、低剂量组略有改善。见图 2。

3.5 对小鼠气道黏液分泌的影响 模型组可见大量的黏液分泌物, 清肺口服液中剂量组气道黏液分泌明显减少与正常组及利巴韦林组相当, 清肺口服液高、低剂量组略有改善。见图 3。

表 1 清肺口服液对小鼠 BALF 中 EOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Qingfei oral liquid on EOS in BALF of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EOS/%
正常	-	0.00 ± 0.00
模型	-	46.30 ± 4.55 ²⁾
清肺口服液	2.34	45.48 ± 6.24
	1.17	24.18 ± 3.20 ⁴⁾
	0.59	38.86 ± 5.82 ³⁾
利巴韦林	0.1	28.36 ± 7.82 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (图 1 同)。

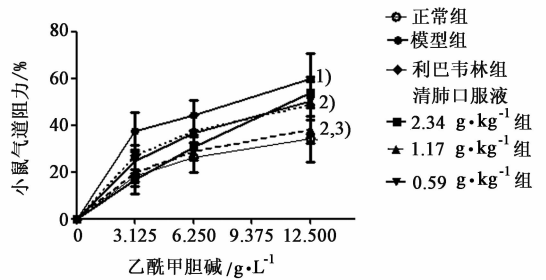
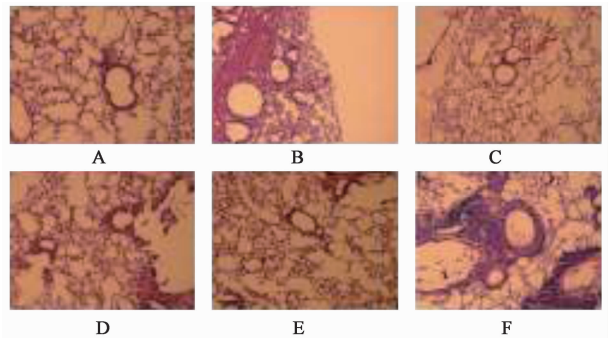


图 1 清肺口服液对小鼠肺功能气道反应性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of Qingfei oral liquid on airway reactivity of lung function in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)



A. 正常组; B. 模型组; C. 利巴韦林组; D. 清肺口服液 2.34 g·kg⁻¹ 组; E. 清肺口服液 1.17 g·kg⁻¹ 组; F. 清肺口服液 0.59 g·kg⁻¹ 组 (图 3~4 同)

图 2 清肺口服液对小鼠肺组织病理学的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effects of Qingfei oral liquid on pulmonary histopathology in mice (HE, ×100)

3.6 对小鼠气道周围胶原增生的影响 模型组气道可见气道周围及间质胶原增生明显, 清肺口服液中剂量组气道黏液分泌明显减少, 与正常组及利巴韦林组相当, 清肺口服液高、低剂量组略有改善。见图 4。

4 讨论

全国儿科哮喘协作组调查提示我国儿童哮喘的患病率呈显著上升趋势^[11], 严重威胁儿童的健康, 且可导致哮喘急性发作及严重喘息的并发症^[12]。

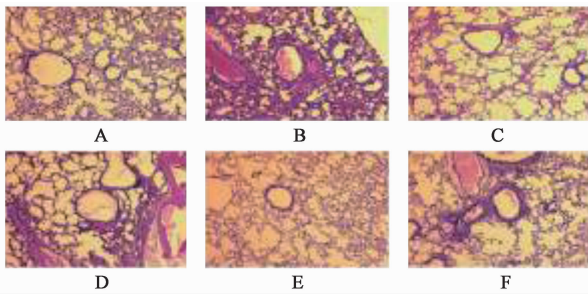


图 3 清肺口服液对小鼠气道黏液分泌的影响(PAS, ×100)

Fig.3 Effects of Qingfei oral liquid on airway mucus secretion in mice(PAS, ×100)

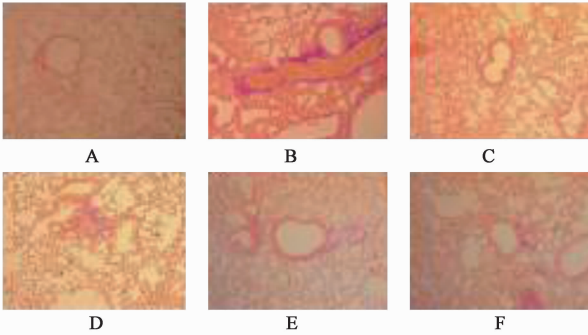


图 4 清肺口服液对小鼠气道周围胶原增生的影响(VG, ×100)

Fig.4 Effects of Qingfei oral liquid on around collagen hyperplasia of airway in mice (VG, ×100)

RSV 感染诱发的儿童哮喘急性发作,符合中医学有关“宿痰”为外邪引发而致喘的观点。临床上呼吸道合胞病毒感染致哮喘发作时多表现为:发热烦躁,唇红面赤,哮喘发作时声高息粗,喉中痰鸣,咳痰黄稠,口渴喜冷饮,舌红苔黄腻,脉滑数,证属中医学痰热壅肺证,证治以清肺化痰祛邪法可使肺气得宣通,宿痰得以清化,外邪得以清解。治疗以清肺化痰解郁祛邪为主要治则,清肺口服液以炙麻黄开宣肺气,杏仁、前胡宣肺止咳,生石膏、黄芩清宣肺热,桑白皮、葶苈子泄肺平喘,虎杖、丹参解毒活瘀,用治“宿痰”为外邪引发,证属“痰热壅肺”的哮喘。既针对痰热内盛是本证的关键,又重点祛除外邪,达到标本兼顾的特点。本实验研究发现清肺口服液中剂量组能明显减轻哮喘小鼠肺泡灌洗液中嗜酸粒细胞。肺功能是反应气道高反应性的金指标,本实验用美国小鼠呼吸机检测实验小鼠肺功能,也提示清肺口服液中剂量能较好的减轻小鼠气道高反应性,这一结果可能符合中医学关于开肺理气治疗“痰热壅肺”气急喘促的病理机制。既往研究显示黄芩提取物黄芩苷^[10],虎杖提取物白藜芦醇^[13]均有减轻 RSV 感染后哮喘动物模型气道炎症和呼吸道高反应性,与本方的组方单味药物有一致性,同时也为揭示本方制剂的有效性提供了客观依据。本实验病理组

织研究发现清肺口服液中剂量组能明显减轻哮喘小鼠肺组织肺间质炎性细胞浸润,同时明显减少气道黏液分泌物、气道周围胶原增生;低剂量组也有一定的效果,但不如中剂量组改善明显。高剂量组未能达到治疗效果,可能与高剂量本身一定的毒副作用有关,这将在后期的实验中进一步研究。

综上所述,清肺口服液能明显减轻 RSV 感染所致哮喘小鼠急性发作肺组织炎症反应,可以明显改善哮喘小鼠气道高反应性。

[参考文献]

[1] El Omari K, Dhaliwal B, Ren J, et al. Structures of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein from two crystal forms; details of potential packing interactions in the native helical form[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011, 67(Pt 10): 1179-1183.

[2] Wu P, Hartert T V. Evidence for a causal relationship between respiratory syncytial virus infection and asthma [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9(9): 731-745.

[3] 刘小红. 呼吸道合胞病毒感染发病机制和药物治疗进展[J]. 中国临床医生, 2011, 39(3): 8-12.

[4] 何金生, 付远辉, 洪涛. 呼吸道合胞病毒载体疫苗研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1): 92-96.

[5] 臧娜, 谢晓虹, 邓昱, 等. 白藜芦醇对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺部病毒滴度及其气道炎症的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(18): 1924-1927.

[6] 张玉英, 罗思宁, 杨军, 等. 姜辛夏方对哮喘大鼠气道重建中 HIF-1 α 及 VEGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 131-134.

[7] 梁晓鑫, 戴启刚, 汪受传, 等. 金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠 IFN- α 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 200-203.

[8] 汪受传. 中医药治疗小儿病毒性肺炎的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(5): 338-341.

[9] 臧娜, 王莉佳, 刘恩梅, 等. 呼吸道合胞病毒空斑检测方法的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 192-195.

[10] Sun J, Li L L, Dong J C, et al. Effects of baicalin on airway remodeling in asthmatic mice [J]. Planta Med, 2013, 79(3/4): 199-206.

[11] 全国儿科哮喘协作组, 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查 [J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 729-735.

[12] 吴让琼, 陈宇宁. 儿童哮喘发作与呼吸道合胞病毒感染关系研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2014, 21(6): 277-280.

[13] 李佳曦, 汪受传, 徐建亚, 等. 金欣口服液含药血清及其有效单体白藜芦醇对 RSV 的 RNA 聚合酶转录活性的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 27(1): 36-39.

[责任编辑 周冰冰]