

· 药理 ·

清肺口服液通过 ERK1/2 通路调控 RSV 所致 呼吸道炎症损伤的机制

邹亚, 郭盛, 景晓平*, 何丽*

(上海交通大学附属儿童医院, 上海市儿童医院, 上海 200040)

[摘要] 目的:通过研究清肺口服液对呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染后气道上皮细胞胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2)磷酸化蛋白及相关炎症因子表达的影响,探讨清肺口服液抗 RSV 感染及其继发炎症损伤的调节机制。方法:RSV 体外感染人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, 16-HBE)建立气道上皮炎症损伤模型,设置空白组,模型组(RSV),利巴韦林组(利巴韦林),清肺口服液高、中、低质量浓度组,共6组。其中空白组给予含2% FBS的 RPIM 1640 培养基进行培养,其余各组在空白组的基础上造模,模型组加入等量 RSV(MOI = 1),利巴韦林组加入等量利巴韦林注射液(0.2 mg·L⁻¹),清肺口服液组给予清肺口服液高、中、低质量浓度(200, 100, 50 mg·L⁻¹)进行干预。应用噻唑蓝(tetrazolium salt colorimetry, MTT)比色法检测清肺口服液对 RSV 感染 16-HBE 的毒性作用,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测清肺口服液对细胞中 RSV 复制的影响,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检验 ERK1/2 信号通路相关蛋白磷酸化表达变化,同时用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定细胞上清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6),白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)水平。结果:与空白组比较,模型组 RSV 大量增殖,16-HBE 出现典型的炎症损伤表现,ERK1/2 磷酸化蛋白水平显著提高($P < 0.01$),同时细胞上清中释放大量的炎症因子 IL-6, IL-8($P < 0.01$)。加入清肺口服液或利巴韦林后,16-HBE 中的 RSV 复制水平显著降低($P < 0.01$),且清肺口服液(200, 100 mg·L⁻¹)可显著下调 ERK1/2 磷酸化蛋白的表达($P < 0.01$),并显著降低细胞上清中炎症因子 IL-6, IL-8 的表达水平($P < 0.01$)。结论:清肺口服液能够抑制 RSV 病毒复制并减轻 RSV 感染所致的气道炎症损伤,其机制可能与下调 ERK1/2 磷酸化蛋白水平及降低气道炎症因子的表达有关。

[关键词] 清肺口服液; 呼吸道合胞病毒; 细胞外信号调节蛋白激酶; 白细胞介素-6; 白细胞介素-8

[中图分类号] R22; R24; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0086-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020086

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1830.018.html>

[网络出版时间] 2017-11-02 18:30

Mechanism of Qingfei Oral Liquid to Regulate Respiratory Inflammatory Damage Caused by RSV via ERK1/2 Pathway

ZOU Ya, GUO Sheng, JING Xiao-ping*, HE Li*

(Affiliated Shanghai Children's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China)

[Abstract] **Objective:** By studying the impact on extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) phosphorylated protein and the related inflammatory factor in respiratory epithelial cells with respiratory syncytial virus (RSV) infection, this paper aims to investigate the anti-RSV effect of Qingfei oral liquid and its regulatory mechanism on secondary inflammatory damages. **Method:** RSV-infected human bronchial epithelial cells (16-HBE) were used to establish respiratory epithelial inflammatory damage models *in vitro*. The blank group, model group (RSV), control group (ribavirin) and treatment groups (Qingfei oral liquid with high, middle and low

[收稿日期] 20170727(012)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81674020);上海交通大学“科技创新专项资金”多学科交叉项目(YG2014MS13)

[第一作者] 邹亚,在读硕士,从事中医药治疗小儿呼吸系统疾病研究, Tel:021-62474880, E-mail: zouyadoc@163.com

[通信作者] *何丽,博士,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;

*景晓平,博士,副主任医师,从事中医药治疗小儿肺、肾疾病研究, Tel:021-62474880, E-mail: xiaopingdoctor@126.com

dose). The blank group received RPIM 1640 medium containing 2% FBS, while other groups were infected with RSV to make models on the basis of blank group. The model group received equal volume of RSV (MOI = 1); the control group received equal volume of Ribavirin ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); and the treatment groups were intervened with Qingfei oral liquid (200, 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Tetrazolium salt colorimetry (MTT) was used to detect the toxicity effect of Qingfei oral liquid on RSV-infected 16-HBE. Real-time PCR was used to detect the replication of RSV in 16-HBE, and Western blot was used to examine the changes in phosphorylation of ERK1/2 signaling pathway related proteins. In addition, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to evaluate the levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in the supernatant. **Result:** As compared with blank group, RSV showed great proliferation in the model group; 16-HBE showed typical manifestation of inflammatory damages; ERK1/2 phosphorylated protein level was increased significantly ($P < 0.01$), and a large amount of inflammatory factors (IL-6, IL-8) were released in the cellular supernatant ($P < 0.01$). After adding Qingfei oral liquid or ribavirin, the replication of RSV was significantly inhibited in 16-HBE ($P < 0.01$), and the Qingfei oral liquid (200, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) can significantly down-regulate the expression of ERK1/2 phosphorylated protein ($P < 0.01$), and decrease the levels of IL-6 and IL-8 in cellular supernatant ($P < 0.01$). **Conclusion:** Qingfei oral liquid can inhibit the replication of RSV and alleviate the airway inflammatory damage caused by RSV, and its mechanism may be associated with down-regulating the expression of ERK1/2 phosphorylated protein and decreasing the inflammatory cytokines.

[Key words] Qingfei oral liquid; respiratory syncytial virus; extracellular signal-regulated kinases; interleukin-6; interleukin-8

支气管哮喘(bronchial asthma)是一种以慢性气道炎症和气道高反应性为主要特征的异质性疾病^[1],近年来在儿童中的患病率呈明显上升的趋势^[2],其中由呼吸道合胞病毒(RSV)感染导致的哮喘急性发作或加重在儿童门诊及住院患者中占有重要比例,长期以来一直是儿科呼吸专家关注的重点^[3]。RSV感染后引起气道上皮损伤,并在上皮细胞中增殖,释放大量的炎症介质,是RSV感染引起和加重哮喘急性发作的主要原因^[4],但目前尚缺乏有效的治疗药物和预防措施^[5]。研究发现RSV能够激活胞外信号调节激酶(ERK)1/2信号转导通路,介导广泛的生物学效应,其中包括促进细胞增殖,介导气道重塑和促进多种炎症因子,如白细胞介素(IL)-6,IL-8等,释放介导慢性炎症等^[6-7],ERK1/2信号通路的激活是RSV加重哮喘发作的重要机制之一。此外Dickey等^[8]还发现RSV灭活后依然具有上调ERK1/2磷酸化蛋白水平的作用,这可能是临床中抗病毒治疗对RSV感染的哮喘治疗效果欠佳的重要原因。近年来研究表明应用蛋白酶抑制剂可显著改善哮喘小鼠的气道炎症和气道高反应性^[9-10],已成为哮喘治疗的新方向。因此亟须开发新的ERK信号通路阻滞剂来指导哮喘的进一步治疗。清肺口服液能够通过多种途径发挥抗病毒和免疫调节作用^[11-12]。但尚缺乏对ERK1/2信号转导机制的相关研究。本课题组前期研究发现清肺口服液

能显著降低RSV感染哮喘小鼠气道炎症和气道高反应性^[13],其具体机制有待进一步深入研究。本实验拟从ERK1/2信号通路的角度,利用细胞和分子生物学技术探究清肺口服液调节RSV所致气道损伤的免疫机制,为利用中医药控制和改善RSV感染所致哮喘气道炎症损伤提供研究依据。

1 材料

1.1 细胞株及病毒 人支气管上皮细胞16-HBE购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;人喉癌上皮细胞Hep-2(编号ATCC® CCL-23™),RSV病毒Along株(编号ATCC® VR-26™)均购自美国ATCC公司。

1.2 药物及试剂 清肺口服液由桑白皮、黄芩、麻黄、虎杖、前胡、葶苈子、苦杏仁、石膏(生)等组成(以上药材均由上海中医药大学附属普陀医院药剂科提供,经该院中药师朱厚林鉴定为正品)。利巴韦林(中国麦克林公司,批号C10081874,纯度98%);DMEM培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(美国Hyclone公司,批号分别为AB10131152,AB10198566);RPIM 1640培养基(中国Solibore公司,批号20170301);胎牛血清(FBS),胰酶,Penicillin Streptomycin(美国Gibco公司,批号分别为1851479,1810640,1786396);噻唑蓝(MTT)试剂盒(上海威奥生物有限公司,批号WH117);BCA蛋白定量试剂盒,凝胶试剂盒(碧云天生物有限公司,

批号分别为 P0010S, P0012A); 蛋白酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche 公司, 批号分别为 15205300, 16565100); PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号 IPVH00010); trizol, 逆转录试剂盒和 PCR 反应液(日本 Takara 公司, 批号分别为 AKA5202, AK4002, AK5804); p-ERK, t-ERK, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(美国 CST 公司, 批号分别为 4370S, 9102S, 4970S), 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Abcam 公司, 批号 ab7090); Western ECL Substrate(美国 Bio-Rad 公司, 批号 170-5060); 白细胞介素(IL)-6, IL-8 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司, 批号分别为 852711, 446502); PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计及合成, RSV(250 bp): 上游 5'-TGCAGTTGCTCATGCAAAG-3', 下游 5'-CGGCC TTGTTTGTGGATAGT-3'; GAPDH(150 bp): 上游 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3', 下游 5'-AGGGGA GATTCAGTGTGGTG-3'。

1.3 仪器 HCB-900V 型超净工作台(中国 Hair 公司); Quintix224-1CN 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); 5427R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司); PICO17 型 Mini 离心机(美国 Thermo 公司); IMARK 型酶标仪, PowerPac 系列双向电泳系统、转膜仪, HMIAS-2000 型高清晰彩色医学图文分析系统(美国 Bio-Rad 公司); ABI7300 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); Wilovert 型倒置相差显微镜(德国 Hund 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人支气管上皮细胞 16-HBE 使用含有 10% FBS 的 RPIM 1640 培养基培养, 人喉癌上皮细胞 Hep-2 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基培养, 两者均在 37 °C 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行常规培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 RSV 扩增 采用 Lundin 等^[14]的方法, 将铺满瓶底的 Hep-2 细胞, 用 PBS 洗 2 遍, 加入 RSV 原液 500 μL, 37 °C 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h, 每隔 15 ~ 30 min 摇晃 1 次, 弃去未吸附的病毒, 加入含 2% FBS 的细胞维持液, 继续培养, 3 ~ 5 d 后细胞开始出现病变(形成串珠样的合胞体), 待合胞体完全融合后, 收获病毒, 利用病毒半数组织细胞感染量法(TCID₅₀)进行滴度测定, 测得 TCID₅₀ 为 1 × 10^{-4.8} 个/mL, 根据公式噬斑形成单位(PFU) = TCID₅₀ × 0.69 换算成感染复数。

2.3 药物的溶解和配置 利巴韦林, 将无水乙醇-

PBS 1:1 混合^[15], 用于溶解利巴韦林, 先配置成 10 g·L⁻¹ 母液, 之后用含 2% FBS 的 RPIM 1640 培养基稀释至 0.2 mg·L⁻¹, 0.22 μm 滤膜过滤备用。清肺口服液配置时先将桑白皮 147 g, 黄芩 84 g, 麻黄 42 g, 虎杖 175 g, 前胡 147 g, 葶苈子 140 g, 苦杏仁 147 g 等, 与 90% 乙醇 8 L 混合, 于加热套中进行回流提取, 经过滤合并、浓缩至干。再将石膏 315 g 单煎, 提取上清, 与加入水 8 L 的醇提制剂共混合, 再次回流提取、浓缩至干。使用时, 先将干粉加入 ddH₂O 中配置成 100 g·L⁻¹ 的母液, 之后分别用含 2% FBS 的 RPIM 1640 培养基稀释至 200, 100, 50 mg·L⁻¹, 0.22 μm 滤器过滤备用。

2.4 MTT 比色法检测 RSV 感染的 16-HBE 细胞活力 取处于对数生长期的 16-HBE 细胞, 加入含有 2% FBS 的 RPIM 1640 培养基调整细胞密度, 分别以每孔 3 × 10⁵ 个(培养 24 h 时)和每孔 2 × 10⁵ 个(培养 48 h 时)接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 加入含等量 RSV(MOI = 1)的(10, 40, 80, 160, 320, 640, 1 280, 2 560 mg·L⁻¹)清肺口服液, 分别培养 24, 48 h, 弃上清, 每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μL, 37 °C 避光孵育 4 h, 之后加入 DMSO 100 μL, 置摇床上低速振荡, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度 A, 实验重复 3 次。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 16-HBE 中 RSV 病毒的抑制作用 取 6 孔板中处于对数生长期的细胞, 设置空白组, 模型组(RSV), 利巴韦林组(利巴韦林), 清肺口服液组(清肺口服液 200, 100, 50 mg·L⁻¹), 共 6 组。其中空白组给予含 2% FBS 的 RPIM 1640 培养基进行培养, 其余各组在空白组的基础上造模, 模型组加入等量 RSV(MOI = 1), 利巴韦林组加入等量利巴韦林(0.2 mg·L⁻¹), 清肺口服液组予以清肺口服液(200, 100, 50 mg·L⁻¹)进行干预。作用 24 h 后, PBS 冲洗细胞表面, 加入 trizol 提取 RNA, 逆转录成 cDNA 后进行 PCR 反应, 反应条件为 95 °C 30 s 进行预变性, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s 反应 40 个循环, 数据采用 ABI 7300 SDS software 进行分析, 结果以 2^{-ΔΔCt} 表示, 实验重复 3 次。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ERK1/2 信号通路相关蛋白 p-ERK, ERK 表达 分组和处理方法同 2.5 项, 培养 24 h 后, 提取蛋白样本, BCA 法测定蛋白浓度, 以每孔 20 μg 的蛋白量进行上样、电泳、转膜和封闭, 再经过一抗 p-ERK(1:2 000), ERK(1:1 000), GAPDH(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST

洗膜,二抗羊抗兔 IgG(1:3 000)孵育,ECL 化学发光法对要检测的条带进行曝光,Image J 计算条带灰度值,实验重复 3 次。

2.7 ELISA 检测细胞上清中 IL-6,IL-8 含量 分组和处理方式同 2.5 项,作用 24 h,收集细胞上清,4 ℃,500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清。按照试剂盒说明书进行操作,检测细胞上清 IL-6,IL-8 的表达,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的 A,每组设 3 个复孔。

2.8 统计学分析 实验数据用 SPSS 18.0 软件包分析。统计学处理结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。各组均数间两两比较时采用 LSD 法,检验标准以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 清肺口服液对 RSV 感染 16-HBE 的毒性作用

采用清肺口服液处理 RSV 感染的 16-HBE 24 h,与模型组相比,10 ~ 1 280 mg·L⁻¹清肺口服液对细胞生长无明显影响,清肺口服液 2 560 mg·L⁻¹时,能显著降低细胞存活率($P < 0.01$),处理 48 h,与模型组相比,清肺口服液 10 ~ 320 mg·L⁻¹对细胞生长无明显影响,清肺口服液 > 320 mg·L⁻¹时,细胞存活率显著降低($P < 0.01$)。且同质量浓度下,清肺口服液(640,1 280,2 560 mg·L⁻¹)作用 48 h 较 24 h 对细胞的毒性作用更显著($P < 0.01$)。提示清肺口服液 50 ~ 200 mg·L⁻¹为作用安全范围,本研究选取 200,100,50 mg·L⁻¹质量浓度,作为清肺口服液后续实验。见表 1。

表 1 清肺口服液对 RSV 感染的 16-HBE 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1 Survival of Qingfei oral liquid on 16-HBE infected with RSV($\bar{x} \pm s$, $n = 9$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h	48 h
模型	-	100.00 ± 2.48	100.00 ± 0.34
清肺口服液	10	105.08 ± 2.98	99.51 ± 7.02
	20	109.02 ± 2.28	102.89 ± 2.12
	40	108.94 ± 3.40	98.07 ± 4.01
	80	110.37 ± 3.51	109.98 ± 3.43
	160	109.39 ± 5.92	101.99 ± 6.58
	320	105.24 ± 11.73	107.43 ± 3.70
	640	106.84 ± 4.84	89.79 ± 7.01 ^{1,2)}
	1 280	104.78 ± 5.18	70.95 ± 1.16 ^{1,2)}
	2 560	79.06 ± 5.45 ¹⁾	29.25 ± 4.65 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与清肺口服液同质量浓度 24 h 比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 清肺口服液对 16-HBE 中 RSV 复制的影响 与空白组比较,模型组细胞中 RSV 拷贝数显著增高

($P < 0.01$);与模型组相比,利巴韦林和清肺口服液组均能显著降低 RSV 的复制水平($P < 0.01$),其中清肺口服液对 RSV 的抑制呈一定的浓度依赖性,浓度越高对 RSV 的抑制作用越显著($P < 0.01$);与利巴韦林组相比,清肺口服液 50 mg·L⁻¹组对 RSV 增殖的影响与利巴韦林组无明显差异,清肺口服液 200,100 mg·L⁻¹时则表现出优于利巴韦林的抗病毒效果($P < 0.01$)。提示清肺口服液具有明显的抗病毒效应,能显著抑制 16-HBE 细胞内 RSV 的复制。见表 2。

表 2 清肺口服液对 16-HBE 细胞内 RSV 复制拷贝数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of Qingfei oral liquid on RSV replication in 16-HBE ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	RSV 复制拷贝数
空白	-	1.00 ± 0.00
模型	-	634.23 ± 102.49 ¹⁾
利巴韦林	0.2	193.88 ± 54.58 ^{1,2)}
清肺口服液	50	41.71 ± 7.74 ^{1,2,3)}
	100	61.78 ± 14.29 ^{1,2,3,4)}
	200	324.13 ± 51.5 ^{1,2,4)}

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组相比²⁾ $P < 0.01$;与利巴韦林组相比³⁾ $P < 0.01$;与清肺口服液 50 mg·L⁻¹组相比⁴⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)。

3.3 清肺口服液对 RSV 感染 16-HBE 中 p-ERK, ERK 蛋白表达的影响

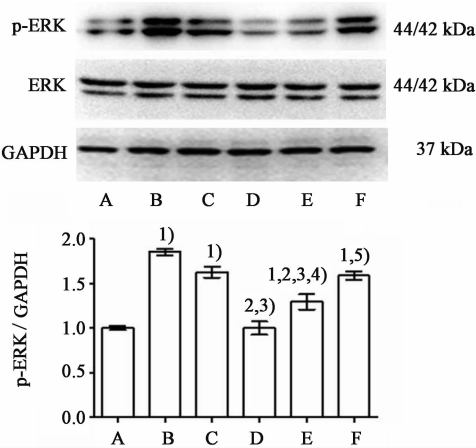
与空白组相比,模型组 RSV 能够显著激活 p-ERK($P < 0.01$);与模型组相比,加入利巴韦林对 p-ERK 蛋白表达无明显影响;清肺口服液 50 mg·L⁻¹组对 p-ERK 的作用不明显,清肺口服液(200,100 mg·L⁻¹)组能够显著抑制 p-ERK 蛋白表达($P < 0.01$)。各组 ERK 蛋白比较无统计学差异。见图 1。

3.4 清肺口服液对 16-HBE 细胞上清 IL-6,IL-8 含量的影响

与空白组相比,其余各组 IL-6,IL-8 的含量均显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,加入利巴韦林对细胞上清中 IL-6,IL-8 的含量无明显影响,清肺口服液能够明显抑制细胞上清中 IL-6,IL-8 含量($P < 0.01$),且浓度越高对细胞上清中 IL-6,IL-8 含量的抑制作用越明显。见图 2。

4 讨论

RSV 病毒是一种长链折叠 RNA 病毒,属于副粘病毒科肺炎病毒属,早期 RSV 感染易增加支气管哮喘的患病风险,并加重哮喘的急性发作^[16]。其致病机制可能与 RSV 感染引起宿主强烈的固有免疫和适应性免疫,激活多条信号通路,释放大量炎症介质,并诱导 T 细胞向 Th2/Th17 分化有关^[17-19]。



A. 空白组; B. 模型组; C. 利巴韦林组; D~F. 清肺口服液 (200, 100, 50 mg·L⁻¹) 组 (图 2 同); 与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.01$; 与利巴韦林组相比³⁾ $P < 0.05$; 与清肺口服液 50 mg·L⁻¹ 组相比⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$

图 1 清肺口服液对 ERK1/2 信号通路相关蛋白 p-ERK, ERK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Qingfei oral liquid on ERK1/2-related proteins p-ERK and ERK ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

血。诸药合用,可使肺气得以宣通,宿痰得以清化,外邪得以清解,共奏扶正祛邪之功,充分了体现中医标本兼治的思想。另外通过对单味药的药理研究发现麻黄能通过 β -肾上腺素能受体和相关信号通路发挥止咳平喘作用^[21];苦杏仁苷能显著降低小鼠的气道炎症浸润^[22];虎杖的有效成分白藜芦醇能够通过转化生长因子(TGF)- β /Smad 等信号通路改善哮喘的气道重塑^[23]。这些研究为清肺口服液减轻哮喘气道炎症损伤提供了依据。

ERK1/2 是一种细胞外信号调节激酶,属 MAPK 家族成员的一种,近年来被证实与哮喘的发生发展密切相关,既往研究发现抑制 ERK1/2 信号通路有助于减少细胞外基质沉积、抑制细胞增殖迁移来缓解哮喘的气道重塑^[24],同时能够抑制黏蛋白的表达和细胞因子的分泌改善气道炎症^[25]。IL-6, IL-8 可由多种细胞分泌,其中 IL-6 表达增多能够驱动原始 T 细胞向 Th17 分化,引起急性期炎症反应,并导致中性粒细胞的聚集,使哮喘对激素治疗不敏感^[26]。IL-8 能够激活 CXCR2, CXCR1, M-CSF 等多种趋化因子,形成强烈的免疫反应,加重哮喘气道重塑^[27]。本研究发现清肺口服液可显著抑制 RSV 在支气管上皮细胞内的复制,并显著降低细胞中 ERK1/2 磷酸化蛋白的表达和细胞上清中炎症因子 IL-6, IL-8 的表达水平。提示清肺口服液能够显著改善 RSV 感染所致的哮喘气道炎症损伤。

综上,清肺口服液应用于 RSV 感染诱发和加重的哮喘,能有效控制 RSV 在细胞内的复制,并减轻气道上皮的炎症反应,为中医药应用于 RSV 感染的哮喘治疗提供了依据。本实验是在前期临床和动物研究的基础上进行的细胞实验,所得结果需要进一步重复验证。RSV 感染诱发和加重的哮喘急性发作机制复杂,气道炎症损伤可能是其中的机制之一,所以本实验所得结果存在一定的局限性,本课题组将在后期的研究中,对清肺口服液在人体内的物质代谢及具体作用机制做更进一步的研究。

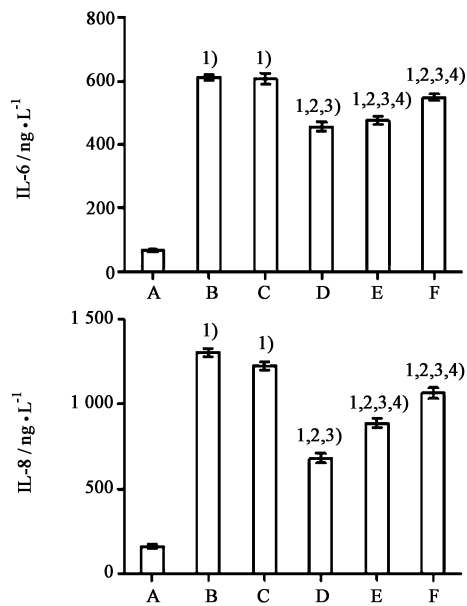


图 2 清肺口服液对细胞上清 IL-6, IL-8 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Qingfei oral liquid on expression of IL-6 and IL-8 in cellular supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

研究发现 RSV 感染的哮喘患儿易出现发热咳嗽、痰鸣气喘、息高声粗、胸闷胸痛等症状,并多表现为痰热闭肺的证型分布特征^[20],符合哮喘“内有伏痰”为外邪所引发的理论,治疗当以清肺化痰祛邪为主。清肺口服液是汪受传教授在总结前贤经验并结合多年临床实践的基础上,精心研制而成。方中麻黄开宣肺气,苦杏仁、前胡宣肺止咳,黄芩、石膏清宣肺热,葶苈子、桑白皮泄肺平喘,虎杖、丹参解毒活

[参考文献]

[1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南:2016 年版[J]. 中华儿科杂志, 2016,54(3):167-181.
[2] 刘传合,洪建国,尚云晓,等. 中国 16 城市儿童哮喘患病率 20 年对比研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2015,30(8):596-600.
[3] Teeratakulpisarn J, Pientong C, Ekalaksananan T, et al. Rhinovirus infection in children hospitalized with acute

- bronchiolitis and its impact on subsequent wheezing or asthma; a comparison of etiologies [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2014, 32(3):226-234.
- [4] Hosakote Y M, Brasier A R, Casola A, et al. RSV infection triggers epithelial HMGB1 release as a damage-associated molecular pattern promoting a monocytic inflammatory response [J]. *J Virol*, 2016, 90(21):9618-9631.
- [5] Modjarrad K, Giersing B, Kaslow D C, et al. WHO consultation on respiratory syncytial virus vaccine development report from a world health organization meeting held on 23-24 March 2015 [J]. *Vaccine*, 2016, 34(2):190-197.
- [6] QIN L, TAN Y, HU C, et al. Leptin is oversecreted by respiratory syncytial virus-infected bronchial epithelial cells and regulates Th2 and Th17 cell differentiation [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, 167(1):65-71.
- [7] Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, et al. Cytokine profiles, signaling pathways and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human foetal lung fibroblasts [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(4):326-39.
- [8] Dickey L L, Duncan J K, Hanley T M, et al. Decapping protein 1 phosphorylation modulates IL-8 expression during respiratory syncytial virus infection [J]. *Virology*, 2015, 481(7):199-209.
- [9] BI M, GUO A, ZHAO H, et al. Role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in the process of thrombin-promoting airway remodeling in ovalbumin-allergic rats [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 37(1):26-34.
- [10] Keränen T, Hömmö T, Moilanen E, et al. β_2 -receptor agonists salbutamol and terbutaline attenuated cytokine production by suppressing ERK pathway through cAMP in macrophages [J]. *Cytokine*, 2017, 94(2):1-7.
- [11] 董文阁, 袁斌, 周立华, 等. 清肺口服液对呼吸道合胞病毒感染小鼠内炎症细胞及 Treg/Th17 表达水平的影响 [J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(12):1242-1245.
- [12] 朱莹莹, 袁斌, 徐建亚, 等. 从 TH1/TH2 细胞平衡角度探讨清肺口服液对感染 RSV 小鼠内 T-bet、GATA3 水平的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(4):805-807, 830.
- [13] 景晓平, 程伟伟, 何丽. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(19):80-83.
- [14] Lundin A, Bergström T, Bendrioua L, et al. Two novel fusion inhibitors of human respiratory syncytial virus [J]. *Antiviral Res*, 2010, 88(3):317-324.
- [15] 张英. 1. 免疫层析法在流感疑似患者床旁检测中的临床应用 2. 常见呼吸道病毒的体外细胞培养与鉴定 3. 四种抗病毒药物体外抗流感病毒敏感性研究 [D]. 北京:中国协和医科大学, 2009.
- [16] Calderón A, Pozo F, Calvo C, et al. Genetic variability of respiratory syncytial virus A in hospitalized children in the last five consecutive winter seasons in Central Spain [J]. *J Med Virol*, 2016, 89(5):767-774.
- [17] Shrestha B, You D, Saravia J, et al. IL-4R α on dendritic cells in neonates and Th2 immunopathology in respiratory syncytial virus infection [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 102(1):153-161.
- [18] Lee J W, Kim Y I, Im C N, et al. Grape seed proanthocyanidin inhibits mucin synthesis and viral replication by suppression of AP-1 and NF- κ B via p38 MAPKs/JNK signaling pathways in respiratory syncytial virus-infected A549 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(22):4472-4483.
- [19] Ajamian F, WU Y, Ebeling C, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3 - dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease [J]. *Clin Exp Allergy*, 2015, 45(3):644-659.
- [20] 郑彬茹. 小儿 RSV 感染临床特点及其证型规律间相关因素的初步探讨 [D]. 山东:山东中医药大学, 2016.
- [21] JIA J J, ZENG X S, LI Y, et al. Ephedrine induced thioredoxin-1 expression through β -adrenergic receptor/cyclic AMP/protein kinase A/dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5):1194-1201.
- [22] 卫昊, 许栋, 姚东风, 等. 苦杏仁苷对变应性哮喘小鼠气道炎症的影响 [J]. *陕西中医*, 2016, 37(12):1691-1693.
- [23] Lee H Y, Kim I K, Yoon H K, et al. Inhibitory effects of resveratrol on airway remodeling by transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in chronic asthma model [J]. *Allergy Asthma Immunology Res*, 2017, 9(1):25-34.
- [24] Kim S H, PEI Q M, JIANG P, et al. Role of licochalcone A in VEGF-induced proliferation of human airway smooth muscle cells: implications for asthma [J]. *Growth Factors*, 2017, 35(1):39-47.
- [25] Buttari B, Profumo E, Domenici G, et al. Neuropeptide Y induces potent migration of human immature dendritic cells and promotes a Th2 polarization [J]. *Faseb J*, 2014, 28(7):3038-3049.
- [26] Halwani R, Sultana A, Vazquezello A, et al. Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma [J]. *J Asthma*, 2017, 3(2):1-12.
- [27] HUANG Z W, LIEN G S, LIN C H, et al. p300 and C/EBP β -regulated IKK β expression are involved in thrombin-induced IL-8/CXCL8 expression in human lung epithelial cells [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 7(121):33-41.