

金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠 IFN- α 表达的影响

梁晓鑫, 戴启刚, 汪受传*, 李佳曦, 孙寒丹
(南京中医药大学中医儿科研究所, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨金欣口服液对呼吸道合胞病毒(RSV)感染 BALB/c 小鼠干扰素- α (IFN- α)表达的影响。**方法:**将 BALB/c 小鼠按 RSV 首次滴鼻至取标本时间分为三大组, 每组分别在 RSV 首次滴鼻后 24, 72, 144 h 后取支气管肺泡灌洗液(BALF), 用 ELISA 法检测 BALF 中所含 IFN- α 浓度, 观察金欣口服液对 IFN- α 表达的影响, 利巴韦林为阳性对照。**结果:**RSV 感染 24 h 后小鼠 BALF 中 IFN- α 的表达显著增高, 其中金欣预防组(385.38 ± 16.54) ng·L⁻¹能上调 IFN- α 的表达($P < 0.01$); RSV 感染 72 h 后小鼠 BALF 中 IFN- α 上调作用仍较显著, 但是较之于 24 h 时 IFN- α 的表达明显有所下降, 其中金欣治疗组(131.41 ± 6.96) ng·L⁻¹和金欣预防组(32.83 ± 4.77) ng·L⁻¹组均能上调 IFN- α 的表达($P < 0.01$), 且金欣治疗组上调作用更为明显($P < 0.01$); RSV 感染 144 h 后小鼠 BALF 中 IFN- α 的表达量显著减少($P < 0.01$), 金欣治疗组(14.21 ± 0.80) ng·L⁻¹下调 IFN- α 表达($P < 0.01$)。**结论:**在 RSV 感染早期, 金欣口服液预防组和治疗组能显著上调 BALB/c 小鼠 IFN- α 的表达; 随着感染时间延长, IFN- α 表达下降, 金欣口服液能进一步下调其表达水平, 以促进机体恢复。

[关键词] 金欣口服液; 呼吸道合胞病毒; BALB/c 小鼠; 干扰素- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0200-04

[doi] 10.11653/syjf2013120200

Regulation of Jinxin Oral Liquid on Expression of IFN- α in BALB/c Mice Infected by Respiratory Syncytial Virus

LIANG Xiao-xin, DAI Qi-gang, WANG Shou-chuan*, LI Jia-xi, SUN Han-dan

(Institute of Pediatrics of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate regulation of Jinxin oral liquid on expression of interferon- α (IFN- α) in BALB/c mouse infected by respiratory syncytial virus (RSV). **Method:** BALB/c mice were divided into

[收稿日期] 20121026(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072840); 江苏省研究生创新计划项目(CXZZ11_0773)

[第一作者] 梁晓鑫, 硕士研究生, 从事小儿呼吸系统疾病研究, E-mail: liangxx304@163.com

[通讯作者] *汪受传, 教授, 博士生导师, 从事小儿呼吸系统疾病研究, Tel: 025-86798182, E-mail: wscnj@126.com

- [7] 潘照斌, 李柒朝, 廖月娥, 等. 黄杞叶总黄酮对大鼠实验性脑缺血保护作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 223.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlsons, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84.
- [9] 于亚男, 李晓芳, 毕力夫, 等. 牛磺酸对大鼠视网膜缺血再灌注保护作用的实验研究[J]. 武警医学, 2006, 17(4): 276.
- [10] 李国栋, 姜德咏, 游志鹏, 等. 异博定对视网膜缺血再灌注损伤 ERG 的影响[J]. 实用医学杂志, 2004, 20 (4): 360.
- [11] 王应利, 孙乃学, 张磊, 等. 尼莫地平对兔视网膜缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 眼科新进展, 2004, 24(1): 30.
- [12] 荣华, 艾明, 邢怡桥, 等. 倍他洛尔对实验性视网膜缺血再灌注损伤后视神经的保护作用[J]. 中华眼底病杂志, 2005, 21(4): 249.
- [13] 贺玲, 万新顺, 韩丽英, 等. 葛根素对实验性视网膜缺血再灌注损伤后视神经的保护作用[J]. 眼科新进展, 2006, 26(12): 135.

[责任编辑] 聂淑琴

24, 72 h and 144 h groups, which were infected with RSV after 24, 72, 144 h respectively and then collected the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) to detect the content of IFN- α with Sandwich ELISA assay. **Result:** IFN- α expression (385.38 ± 16.54) ng \cdot L⁻¹ was increased significantly ($P < 0.01$) in BALF of RSV infected BALB/c mice after 24 h, Jinxin prevention group could increase the expression of IFN- α . After 72 h the increased IFN- α expression in Jinxin prevention group was still significant (32.83 ± 4.77) ng \cdot L⁻¹ ($P < 0.01$), but compared with 24 h group, the IFN- α expression was decreased obviously. Jinxin treatment group could increase IFN- α expression (131.41 ± 6.96) ng \cdot L⁻¹, ($P < 0.01$). In 144 h group IFN- α expression still had a higher expression, which was lowered significantly compared with 24, 72 h group. In 144 h group IFN- α expression (14.21 ± 0.80) ng \cdot L⁻¹ decreased in Jinxin treatment group ($P < 0.01$). **Conclusion:** In the early stages of BALB/c mice infected with RSV, Jinxin oral liquid prevention and treatment group can significantly increase IFN- α expression, and along with the infection prolonged, IFN- α expression was dropped, Jinxin oral liquid can further lower its expression level.

[**Key words**] Jinxin oral liquid; respiratory syncytial virus (RSV); BALB/c mouse; interferon- α (IFN- α)

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 为副黏病毒科肺炎病毒属的单股负链 RNA 病毒,是导致婴幼儿严重下呼吸道感染的最重要的病毒病原^[1]。RSV 感染后诱导呼吸道上皮细胞分泌炎症因子、细胞因子等炎性介质,引起支气管痉挛产生气道高反应,使机体免疫功能失衡,并影响疾病的临床过程,但目前尚未十分明确其致病机制^[2],且缺乏安全有效的疫苗及治疗手段^[3]。近年来对抗 RSV 主要研究集中在 I 型干扰素上,干扰素可通过抑制病毒复制、免疫调节起到抗病毒的作用^[4]。而中医治疗小儿呼吸道合胞病毒感染具有较好疗效,研究表明,中药单体成分可以促进干扰素的表达^[5],中药复方也表现出良好的抗 RSV 作用^[6],而且可调控干扰素的表达^[7-8]。实验显示,中药对包括干扰素在内的一系列血清分子的表达有明显的调控作用^[9-11]。

临床实践表明金欣口服液为治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎的有效方剂^[12],其具有开肺化痰解毒活血之效。本文通过研究金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠干扰素- α (IFN- α) 表达的影响,探讨金欣口服液抗 RSV 机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 BALB/c 小鼠 130 只,8~10 周龄,雌性,18~22 g,扬州医学院比较实验研究中心提供,动物许可证号 SCXK(苏)2007-0001。

1.2 细胞 HEp-2 细胞购自中科院上海细胞生物研究所,为第 5~10 代处于对数分裂期的细胞。

1.3 病毒 呼吸道合胞病毒 (RSV) A 亚型 (Long 株,购于武汉国家典型培养物保藏中心),保存于南京中医药大学第一临床医学院实验研究中心液氮

罐中。

1.4 药品与试剂 药物:金欣口服液(原名清肺口服液,由炙麻黄 3 g,苦杏仁 10 g,生石膏 20 g,黄芩 6 g,葶苈子 10 g,桑白皮 10 g,前胡 10 g,虎杖 12 g 8 味药物组成),由南京中医药大学植物药与新药开发研究中心(江苏省植物药深加工工程中心)制备和质控,含生药 1.351 g \cdot mL⁻¹,该药以麻黄中的麻黄碱、虎杖中的白藜芦醇的定性鉴别为质量控制标准。利巴韦林颗粒(新博林,四川百利药业有限责任公司,批号 110647);利巴韦林注射液(100 mg:1 mL,南京金陵药业股份有限公司,批号 091206);DMEM,0.25% (含 EDTA) 胰酶(美国 Gibco 公司),优级胎牛血清(德国 PAA 公司);IFN- α ELISA 检测试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.5 仪器 EXL800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),DMIL 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),5810R 型大容量高速冷冻离心机、面包式离心机(德国 Eppendorf 公司),MCO-20 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司),生物安全柜(苏州净化设备厂)。

2 方法

2.1 RSV 的扩增及组织半数感染量 (TCID₅₀) 测定 参考本课题组前期研究方法^[13]将冻存的 RSV 病毒株复苏后接种 Hep2 细胞增殖,对 RSV 进行培养测定,根据 Reed-Muench 公式计算病毒 TCID₅₀,测得 Hep2 中 RSV-A 亚型 (long 株) TCID₅₀ 为 10^{-4.385} / 50 μ L。

2.2 动物造模及给药 参照本题组前期研究成果^[13],将健康 BALB/c 小鼠常规饲养于无病原体环境中 3 d 后开始正式实验。将 BALB/c 小鼠按 RSV 首次滴鼻至取标本时间分为 24,72,144 h 三大组。

每组均设有正常组、RSV 模型组、利巴韦林组(给药剂量为 $46 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),24 h 组另设金欣预防组,72 h 组另设金欣预防组及金欣治疗组,144 h 组另设金欣治疗组,给药剂量均为 $276 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每小组 10 只小鼠。

给药方式:24 h 组提前连续给药 3 d,末次给药后 2 h 进行 RSV 50 μL 滴鼻,滴鼻 24 h 后,行气管插管取支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF);72 h 组金欣预防组提前连续给药 3 d 后同其余未给药组进行 RSV 滴鼻,RSV 滴鼻后 2 h 予以相应药物,滴鼻、给药各 3 d,末次滴鼻后 24 h (距离首次滴鼻 72 h)取 BALF;144 h 组 RSV 滴鼻后 2 h 予以相应的药物,共滴鼻 3 d,给药 5 d,所有组距离首次滴鼻后 144 h 取 BALF。每只小鼠 ig,每日 2 次(2 次给药间隔约 8 h 左右),每次 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,根据给药量制备相应浓度的药物,正常组和 RSV 模型组给予相同量的生理盐水。以小鼠出现进食少,鼻部分泌物增多,毛发呈束状,活动减少,聚集蜷卧为造模成功标志。

2.3 BALF 的采集 行气管插管后,以 2.3 mL DMEM 培养基分 3 次行支气管肺泡灌洗,每只小鼠大约可回收灌洗液 1.8 ~ 2.0 mL,4 $^{\circ}\text{C}$,4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 15 min,取上清分装保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.4 BALF 中 IFN- α 的含量检测 严格按照试剂盒说明操作,采用双抗体夹心 ELISA 法检测各组样本中 IFN- α 的含量。

2.5 统计方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 SPSS 17.0 统计软件。采取多组间单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 RSV 感染 24 h 小鼠 BALF 中 IFN- α 表达的调控作用 RSV 感染 BALB/c 小鼠 24 h 后 BALF 中 IFN- α 的表达显著增高($P < 0.01$),金欣预防组各组均能上调 IFN- α 的表达,其中以高预防组的上调作用更明显($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 RSV 感染 72 h 小鼠 BALF 中 IFN- α 表达的调控作用 RSV 感染 BALB/c 小鼠 72 h 后 BALF 中 IFN- α 上调作用仍较显著(与正常组相比, $P < 0.01$),但是较之于 24 h 时 IFN- α 的表达明显有所下降;金欣治疗组仍上调 IFN- α 的表达($P < 0.01$),金欣预防组 IFN- α 表达虽仍高于正常组,但较 RSV 模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)及治疗组($P < 0.01$)下降。见表 1。

3.3 对 RSV 感染 144 h 小鼠 BALF 中 IFN- α 表达的调控作用 RSV 感染 BALB/c 小鼠 144 h 后 BALF 中 IFN- α 的表达量仍有较高表达(与正常组相比 $P < 0.01$),但较 24,72 h 组明显下降;金欣治疗组 IFN- α 表达量仍较高($P < 0.01$),但较 24,72 h 组下降。见表 1。

表 1 金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠 24,72,144 h 后 BALF 中 IFN- α 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	组别	药物剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IFN- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
RSV 首次 滴鼻后 24 h	正常	-	8.68 ± 0.18
	RSV 模型	-	219.91 ± 23.87
	利巴韦林	46×10^{-3}	$219.90 \pm 43.97^{1)}$
RSV 首次 滴鼻后 72 h	金欣预防	276	$385.38 \pm 16.54^{1,2)}$
	正常	-	8.68 ± 0.37
	RSV 模型	-	$57.86 \pm 18.19^{1)}$
RSV 首次 滴鼻后 144 h	利巴韦林	46×10^{-3}	$49.28 \pm 19.01^{1)}$
	金欣治疗	276	$131.41 \pm 6.96^{1,2)}$
	金欣预防	276	$32.83 \pm 4.77^{1,3)}$
RSV 首次 滴鼻后 144 h	正常	-	9.11 ± 0.28
	RSV 模型	-	29.31 ± 1.30^1
	利巴韦林	46×10^{-3}	$17.41 \pm 1.67^{1,2)}$
	金欣治疗	276	$14.21 \pm 0.80^{1,2)}$

注:与同期正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同期 RSV 模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与同期治疗组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

纵观上表 RSV 感染 BALB/c 小鼠 24,72,144 h 后 BALF 中 IFN- α 表达变化趋势,可见在 3 个时间段内不同处理组 BALF 中 IFN- α 的表达变化,其趋势为在感染早期 IFN- α 表达明显增加,随着时间的推移,IFN- α 的表达逐渐下降。

4 讨论

干扰素最早是由 Isaacs 和 Lindermann 于 1957 年发现的主要由多种有核细胞分泌的具有广谱抗病毒及免疫调节作用的糖蛋白。机体感染 RSV 后,多通过活化 Toll 样受体,通过一系列信号转导激活 IRF3(和/或 IRF7)转录活性,进而促进 IFN 表达,IFN 表达过量后亦可通过相应负反馈机制减少 IFN 表达^[14]。有报道称 I 型干扰素包括 IFN- α 和 IFN- β 在呼吸道病毒感染中具有非常重要的作用,并且能在病毒感染早期在一定程度上抑制病毒的复制,是自然免疫重要的组成部分^[15]。但 Plata 等通过研究发现,RSV 感染后的机体难以产生干扰素,而且抗病毒效应也会下降^[16]。因此,如何促使机体在 RSV 感染后增加 IFN 的表达,成为抗 RSV 研究的重要方

向之一。

金欣口服液是著名中医儿科专家汪受传教授的有效方药,以开肺涤痰、解毒活血为大法。曾进行 5 个中心 206 例小儿病毒性肺炎痰热闭肺证随机对照临床研究,金欣口服液治疗组疗效显著优于利巴韦林注射液对照组 ($P < 0.01$),表明其能够有效改善小儿病毒性肺炎痰热壅肺证的症状和体征,治疗效果良好^[12]。该方前期研究表明:该方不仅具有直接抗病毒的效果,还能提高自身机体免疫力来达到治疗效果^[17]。

本研究体内实验表明在 RSV 感染小鼠早期 IFN- α 表达量升高,金欣口服液等效预防组及高效预防组能明显提高 IFN- α 以起到早期抗 RSV 作用,随时间延长 IFN- α 下降,但金欣口服液等效及高效治疗组均能明显提高 IFN- α 的表达,持续起到抗病毒效应。病毒感染性疾病后期,干扰素表达减少表明疾病向愈^[18],在 144 h 是各组 IFN- α 均较前进一步下降,表明金欣口服液能促进 RSV 感染痊愈。由此推测金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠早期促进 IFN- α 的分泌,后期减少 IFN- α 的分泌,这也许是金欣口服液抗 RSV 感染的作用机制之一,但其中调控确切的作用机制仍需要做进一步的研究。

[参考文献]

[1] 汪天林,陈志敏,汤宏峰,等. 小儿肺炎的病毒性病原学研究[J]. 浙江大学学报:医学版,2005,34(6):566.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 田硕,徐晨,姚文斌,等. 长效干扰素研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2010,30(5):122.

[5] 徐晓娅,郭晓聪,李作孝,等. 白芍总苷对实验性变态反应性脑脊髓炎大鼠血清 Th1 型细胞分子的影响

[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):185.

[6] 肇丽梅,张岩,韩国柱. 清热合剂体外抗呼吸道合胞病毒作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(1):53.

[7] 袁颖,郭忻,金素安,等. 黄芪-当归配伍对气道变应性炎症大鼠 IFN- γ , IL-4, STAT6, STAT4 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):223.

[8] 王力宁,王英,黄小琪,等. 六味地黄丸对哮喘大鼠气道炎症及对肺组织干扰素- γ 信使 RNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):108.

[9] 雷波,刘长征. 四君子汤对慢性疲劳综合征模型大鼠 NK 细胞活性及血清细胞因子水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):195.

[10] 付萍,杨铭,陈颖丽,等. 抗病毒滴丸抗病毒作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(6):46.

[11] 邹琳,胡久略. 小青龙汤对支气管哮喘小鼠肺泡灌洗液中炎性细胞及 IL-4、IFN- γ 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):265.

[12] 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.

[13] 李佳曦,汪受传,徐建亚. 白藜芦醇对 RSV 感染 BALB/c 小鼠肺泡灌洗液 TNF- α , IL-1 β , IL-6 表达的调控趋势[J]. 中国中药杂志,2012,37(10):1451.

[14] 余东游,李卫芬. I 型干扰素诱生机理的研究进展[J]. 中国预防兽医学报,2010,32(10):824.

[15] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001:475.

[16] Plata A G, S Baron, Poas J S, et al. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental Infections[J]. J Virol,2005,79(16):10190.

[17] 李江全,任现志,汪受传. 清肺口服液对免疫功能影响的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(4):47.

[18] 杨生海,殷宏,刘永生,等. 干扰素- γ 研究进展[J]. 生物技术通报,2010,8(8):29.

[责任编辑 聂淑琴]