

银翘散对呼吸道合胞病毒感染小鼠呼吸系统的作用研究

覃黎葵¹, 张奉学², 黄笑娟¹, 宋鸿¹, 龚文亮¹

1. 广州中医药大学祈福医院, 广东 广州 511495; 2. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 511006

[摘要] 目的: 探讨银翘散对呼吸道合胞病毒感染小鼠呼吸系统的治疗效果以及作用机制。方法: 小鼠随机分为6组, 每组9只, 分别是正常组、模型组、银翘散高剂量组、银翘散中剂量组、银翘散低剂量组、利巴韦林组。除正常组外, 其他各组小鼠用乙醚浅麻后, 以浓度TCID₅₀呼吸道合胞病毒(RSV)液50 μL滴鼻感染小鼠。银翘散高、中、低剂量组分别给予600、300、150 mg/(kg·d)银翘散灌胃, 利巴韦林组给予150 mg/(kg·d)利巴韦林灌胃。银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组于感染前1天开始灌胃给药, 连续5天, 正常组、模型组给予等容积蒸馏水灌胃。通过称量小鼠体质量和肺重量计算肺指数。HE染色检测小鼠鼻黏膜和肺组织炎性细胞浸润等病理形态学的改变。酶联免疫吸附法测定检测小鼠肺泡灌洗液中白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)以及白细胞介素-6(IL-6)的表达水平。实时荧光定量PCR和Western blot检测肺组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(NALP3)炎性体、凋亡相关微粒蛋白(ASC)和半胱天冬酶-1(caspase-1)的表达。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠肺指数显著升高, 肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β和IL-6表达显著升高, 肺组织NALP3、ASC、caspase-1 mRNA和蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺指数显著降低, 肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β、IL-6表达显著降低, 肺组织NALP3、ASC、caspase-1 mRNA和蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银翘散中剂量组小鼠肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β表达较高, 肺组织NALP3和caspase-1 mRNA表达较高; 银翘散低剂量组小鼠肺指数较高, 肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β、IL-6表达较高, 肺组织NALP3、ASC、caspase-1 mRNA和蛋白表达较高; 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 银翘散能够改善呼吸道合胞病毒感染所致的呼吸道系统炎症, 其作用机制与抑制NALP3炎性体的激活和炎症因子的分泌相关。

[关键词] 银翘散; 呼吸道合胞病毒; 利巴韦林; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(NALP3); 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R373.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2018)05-0024-07

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.05.006

Yinqiao Powder Has Effect on Respiratory System of Mice Infected with Respiratory Syncytial Virus

QIN Likui, ZHANG Fengxue, HUANG Xiaojuan, SONG Hong, GONG Wenliang

Abstract: **Objective:** To discuss the clinical effect of Yinqiao powder on respiratory system of mice model infected with respiratory syncytial virus and its mechanism. **Methods:** Mice were divided into 6 groups randomly, namely the normal group, the model group, the group of low-dose Yinqiao powder, the group of medium-dose Yinqiao powder, the group of high-dose Yinqiao powder and the ribavirin group, 9 mice in each group. Except the normal group, mice in other groups were infected with 50 μL nasal drops of TCID₅₀ respiratory syncytial virus (RSV) fluid after received light anesthesia with ether. The group of low-dose Yinqiao powder, the group of medium-dose Yinqiao powder and the group of high-dose Yinqiao powder were respectively given 600 mg/(kg·d), 300 mg/(kg·d) and 150 mg/(kg·d) of Yinqiao powder by gavage, while the ribavirin group was given 150 mg/(kg·d) of ribavirin by gavage. The group of low-dose Yinqiao powder, the group of medium-dose Yinqiao powder, the group of high-dose Yinqiao powder and the ribavirin group began to receive medication by gavage one day before infection, continuously lasting for 5 days, while the normal group and the model group were given equal volume of distilled water by gavage. Lung indexes were calculated by weighing body mass and lung weight of mice. HE staining was used to detect the pathological changes in the nasal mucosa and inflammatory cells infiltration in the lung tissue

[收稿日期] 2017-07-07

[作者简介] 覃黎葵(1975-), 男, 副主任医师, 研究方向: 中医药对病毒性疾病的诊治研究。

of mice. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in alveolar lavage fluid were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expressions of NALP3 inflammasome, apoptosis-associated microparticles(ASC) and caspase-1 in lung tissue were detected by real-time quantitative PCR and Western blot. **Results:** Compared with those in the normal group, the lung indexes of the model group were increased significantly, the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in alveolar lavage fluid was increased evidently, and the expression of NALP3, ASC, caspase-1 mRNA and protein in lung tissue were obviously increased, differences being significant($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the lung indexes of mice in the groups of Yinqiao powder and the ribavirin group were evidently decreased, the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in alveolar lavage fluid was significantly decreased, and the expression of NALP3, ASC, caspase-1 mRNA and protein in lung tissue was obviously decreased, differences being significant($P < 0.05$). Compared with those in the ribavirin group, the expression of TNF- α and IL-1 β in the alveolar lavage fluid of mice in the group of medium-dose Yinqiao powder was higher, and the expression of NALP3 and caspase-1 mRNA in lung tissue were higher, while the lung indexes of mice in the group of low-dose Yinqiao powder were higher, the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the alveolar lavage fluid was higher, and the expression of NALP3, ASC, caspase-1 mRNA and protein in lung tissue were higher, differences being significant($P < 0.05$). **Conclusion:** Yinqiao powder can improve respiratory system inflammation resulting from infection of respiratory syncytial virus, and its mechanism is related to the inhibition of the activation of NALP3 inflammasome and the secretion of inflammatory cytokines.

Keywords: Yinqiao powder; Respiratory syncytial virus; Ribavirin; Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3(NALP3); Animal experiment; Mice

呼吸道合胞病毒(RSV)感染引起的小儿呼吸系统疾病是世界范围的一个主要公共健康问题^[1]。RSV 感染是导致婴幼儿下呼吸道感染、细支气管炎和肺炎最主要的病原体,也是世界范围内儿童流行性呼吸道疾病的主要感染因素之一^[2-3]。目前仍没有令人信服的安全的针对该病毒的疫苗,也没有行之有效的抗病毒治疗手段^[4-5]。在长期的实践中,中医在防治 RSV 方面积累了丰富的经验。现代医学研究发现银翘散有抗菌、抗病毒、抗炎的作用^[6]。本研究建立 RSV 感染小鼠呼吸系统动物模型,通过对肺指数进行测定,HE 染色观察肺组织和鼻黏膜组织的炎性浸润等病理形态学改变,检测炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的表达,实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测肺组织 NALP3 炎性体(NALP3)、凋亡相关微粒蛋白(ASC)和半胱天冬酶-1(caspase-1)的表达,从体内水平分析银翘散治疗 RSV 感染的疗效及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞和动物 健康 BALB/c 小鼠 54 只,6~8 周龄,体质量为 18~20 g,雌雄各半,由广东省实验动物中心提供,许可证号: SCXK(粤)

2003-0002,粤监证字 2008A023。HEp-2 细胞系(人喉癌上皮细胞)购自中科院上海细胞库。RSV-Long 毒株购自中国预防医学科学院病毒学研究所。实验在暨南大学动物实验中心进行。

1.1.2 实验药物 银翘散配方:连翘、金银花各 30 g,苦桔梗、牛蒡子、薄荷各 18 g,竹叶、荆芥穗各 12 g,淡豆豉、芦根、生甘草各 15 g,中药饮片均购于北京同仁堂。金银花、桔梗粉碎成细粉,过五号筛,为成分 I;薄荷、荆芥提取挥发油,为成分 II,蒸馏后的水溶液另用容器收集,为成分 III;药渣与余 6 味药加 10 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,滤过,合并滤液,为成分 IV。合并成分 I~IV,混匀,制成 2.42 g(生药)/mL 药液,冷冻干燥,3 天后回收 71.34 g 褐色粉末,置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。给药时用蒸馏水配制成相应的浓度。利巴韦林片购自江西汇仁药业有限公司,批号 1302009,给药时用蒸馏水配制成相应的浓度。

1.1.3 主要试剂及仪器 高糖型 DMEM 培养基(GIBCO);胎牛血清(FBS, Hyclone);琼脂糖(上海生化试剂公司);Trizol(Takara)。RT-PCR 试剂, DBI 公司产品;DEPC,美国 Sigma 公司产品;RNasin,美国 Promega 公司产品;逆转录试剂盒, DBI 公司产品。抗 NALP3 抗体、抗 ASC 抗体和抗 caspase-1 抗

体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司；二抗 HRP Goat anti-Rabbit IgG 购自 BOSTER。Tris-base、Glycine、SDS(十二烷基硫酸钠)，上海生工生物工程有限公司。酶联免疫吸试剂盒(ELISA)购于 TaKaRa 公司，丙烯酰胺、双丙烯酰胺、苯甲基磺酰氟、溴酚蓝购于 Genebase。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、过硫酸铵、TWEEN-20(吐温)、二硫代苏糖醇、NaCl 购自威佳科技。BSA 购于 Amresco；四甲基乙二胺购自晶欣生物科技有限公司；蛋白定量试剂盒购于 Thermo；PVDF 膜购于 Millipore；医用 X-光片，广西巨星医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组、建模及干预 BALB/c 小鼠随机分为 6 组，每组 9 只，分别是正常组、模型组、银翘散高剂量组、银翘散中剂量组、银翘散低剂量组、利巴韦林组。银翘散高、中、低剂量组分别给予 600 mg/(kg·d)、300 mg/(kg·d)、150 mg/(kg·d) 银翘散灌胃，利巴韦林组给予 150 mg/(kg·d) 利巴韦林灌胃，给药体积均为 0.1 mL/10 g。各组小鼠用乙醚浅麻醉后，以浓度 TCID₅₀ (TCID₅₀=10^{-7.5}/mL) RSV 病毒液 50 μL 滴鼻感染小鼠。银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组于感染前 1 天开始灌胃给药，连续 5 天，正常组、模型组给予等容积蒸馏水灌胃。

1.2.2 肺重及肺指数的测定 感染后第 5 天，称量每只小鼠的体质量并记录，杀死并解剖小鼠，取出鼠肺，详细记录病变程度，将鼠肺放在盛有生理盐水的平碟中洗 2 次，用吸水纸吸干表面水分，称量肺重，计算出肺指数，肺指数=(小鼠肺重/小鼠体质量)×100%。

1.2.3 肺组织病理检查 取部分肺组织放入液氮速冻，然后转入 -80℃ 冰箱保存，取鼻黏膜及部分肺组织放入 4% 甲醛固定。常规病理组织脱水后，石蜡包埋切片并行 HE 染色，镜下镜检拍照检查病理变化情况。

1.2.4 ELISA 法检测炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 取肺泡灌洗液，使用 ELISA 检测炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平。

1.2.5 qPCR 法检测 NALP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 的表达 取肺组织，qPCR 检测 NALP3、ASC 和 caspase-1 的表达。利用 Trizol 规范提取组织 RNA，-80℃ 储存备用。计算 RNA 的纯度及浓度，以 2 μg 总 RNA 为模板，按照逆转录试剂盒说明书配

制逆转录反应体系，进行逆转录，合成 cDNA 第一链，收集备用。根据 DBI Bestar[®] Sybr Green qPCRmasterMix 的说明书配制 qPCR 扩增的反应体系，PCR 反应条件：94℃ 2 min，94℃ 20 s，58℃ 20 s，72℃ 20 s，40 个循环。融解曲线分析：温度 62℃ ~ 95℃。每个样重复 3 次，使用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验。引物序列见表 1。

结果按照 2^{-ΔΔCt} 方法来计算，利用 qPCR 技术通过 2^{-ΔΔCt} 方法分析相对基因表达差异。其中，ΔCt=(目的基因 Ct- 内参基因 Ct)的平均值 ± 标准偏差；ΔΔCt=(待测样品中目的基因 ΔCt- 参照样品中目的基因 ΔCt)的平均值 ± 标准偏差(若无参照样品则选择 Ct 最大的样品为参照进行计算)；相对样品初始模板量=(2^{-ΔΔCt})的平均值 ± 标准偏差。

表1 引物序列

基因	引物序列	大小
GAPDH	5'-TGGCGTCTTCACCACCAT-3'	475 bp
	5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
NALP3	5'-CTGTGTGTGGGACTGAAGCAC-3'	544 bp
	5'-GCAGCCCTGCTGTTTCAGCAC-3'	
ASC	5'-CACGAGATGCCATCCTGGAC-3'	526 bp
	5'-AAGGCCTCAAGGAACAAGT-3'	
Caspase 1	5'-TGGAAGGTAGGCAAGACT-3'	149 bp
	5'-ATAGTGGGCATCTGGGTC-3'	

1.2.6 Western blot 检测 NALP3、ASC 和 caspase-1 蛋白的表达 取肺组织检测 NALP3、ASC 和 caspase-1 蛋白的表达。配制相应试剂，取 50 ~ 100 mg 肺组织样本提取总蛋白，置于 -80℃ 冰箱保存，绘制标准曲线，根据所测样品的吸光值及标准曲线回归方程，计算总蛋白含量。将目的蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜和孵育抗体，接着将抗体孵育后的 PVDF 膜蛋白面朝上放在保鲜膜上，滴加适量混合液，包好，进行化学发光、显影、定影，最后将胶片进行扫描，用凝胶图象处理系统(Image-Pro Plus 6.0)分析条带净光密度值。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件分析，计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，多组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠肺指数比较 见表 2。与正常组比较，

模型组小鼠肺指数显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺指数显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银翘散低剂量组小鼠肺指数较高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组小鼠肺指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺指数(%)
正常组	9	0.62 ± 0.32
模型组	9	1.52 ± 0.42 ^①
利巴韦林组	9	0.82 ± 0.24 ^②
银翘散低剂量组	9	1.22 ± 0.39 ^③
银翘散中剂量组	9	1.06 ± 0.31 ^②
银翘散高剂量组	9	0.89 ± 0.37 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与利巴韦林组比较, ③ $P < 0.05$

2.2 各组小鼠鼻黏膜病理形态结果比较 见图1。正常组小鼠表现为纤毛排列十分整齐, 而且纤毛粗细均匀一致, 并未观测到明显的脱落缺失现象, 在固有层没有检测到明显嗜酸性粒细胞浸润。模型组可见大量的纤毛结构脱落, 排列散乱, 同时组织严重水肿, 并且发现鼻黏膜充血十分严重, 黏膜上皮下的固有层有明显的嗜酸性粒细胞浸润。与模型组比较, 利巴韦林组可见黏膜上皮细胞受损显著减轻, 组织水肿和鼻黏膜充血明显减轻, 嗜酸性粒细胞的浸润显著减少。银翘散低剂量组可见组织严重水肿, 鼻黏膜充血现象略有减少, 黏膜上皮固有层出现嗜酸性粒细胞浸润; 银翘散中剂量组部分可见少量黏膜上皮细胞脱落, 鼻黏膜充血现象明显减轻; 银翘散高剂量组部分可见少量上皮细胞脱落, 鼻黏膜充血现象明显减轻, 组织水肿及嗜酸粒细胞浸润显著减少。

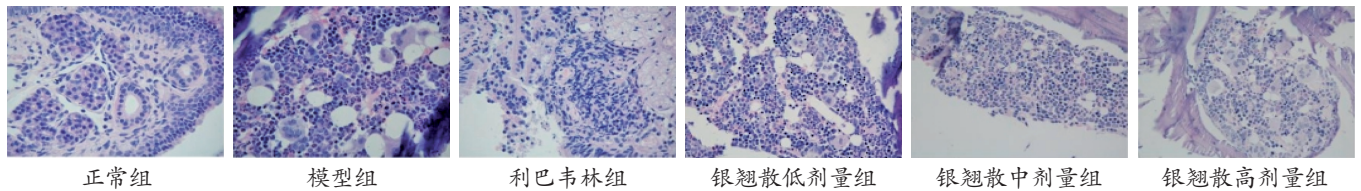


图1 各组小鼠鼻黏膜病理形态结果比较 (×400)

2.3 各组小鼠肺组织病理形态结果比较 见图2。正常组小鼠肺组织支气管与细支气管周围无炎性细胞浸润, 管腔内无炎性细胞及其他分泌物渗出; 肺泡隔厚度均匀, 未见增粗增厚及肺实变表现, 未见毛细血管扩张充血、出血及炎性细胞浸润, 肺泡腔内无水肿液及炎性细胞等异物。模型组小鼠肺组织支气管与细支气管周围大量淋巴细胞浸润, 管腔内大量单核细胞与淋巴细胞及其他分泌物渗出; 肺泡隔显著增宽, 薄厚不均, 部分表现有肺泡壁毛细血管扩张充血、出血, 大量炎性细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 存在肺实变表现, 肺泡腔狭窄或完全被炎性细胞堵塞, 腔内可见红细胞及淡红色透明水肿液。与模型组比较, 利巴

韦林组肺泡间隔明显变薄, 间质血管扩张、充血以及水肿现象显著减轻, 炎性细胞的渗出明显减少。银翘散低剂量组肺泡间隔明显变薄, 血管扩张充血略有减轻。银翘散中剂量组病变肺组织减少, 病变不明显。银翘散高剂量组肺泡腔的大小十分均匀, 肺泡壁完整没有缺失, 腔内可见少量红细胞及淡红色透明水肿液。

2.4 各组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子表达水平比较见表3。与正常组比较, 模型组小鼠肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺泡灌洗液中TNF- α 、

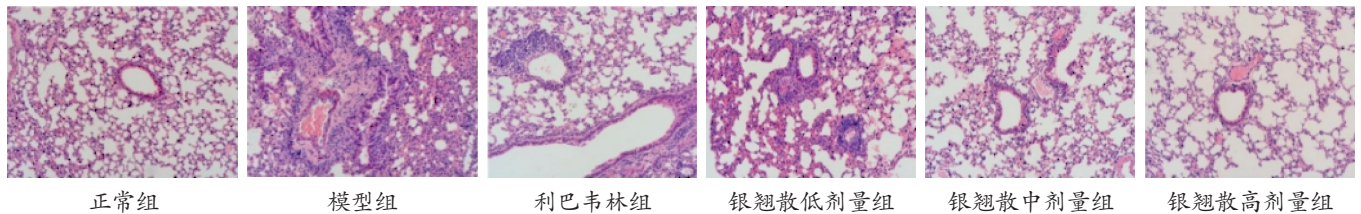


图2 各组小鼠肺组织病理形态结果比较 (×100)

IL-1 β 、IL-6 表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银翘散中剂量组小鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 表达较高, 银翘散低剂量组小鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表3 各组小鼠肺泡灌洗液中炎症因子表达水平比较($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	n	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组	9	24.07 \pm 4.52	33.94 \pm 16.13	45.09 \pm 16.17
模型组	9	78.71 \pm 4.40 ^①	134.49 \pm 23.74 ^①	305.31 \pm 22.82 ^①
利巴韦林组	9	39.39 \pm 4.39 ^②	55.32 \pm 7.89 ^②	70.40 \pm 22.61 ^②
银翘散低剂量组	9	53.21 \pm 9.05 ^{②③}	94.39 \pm 12.77 ^{②③}	127.26 \pm 15.36 ^{②③}
银翘散中剂量组	9	48.49 \pm 3.93 ^{②③}	78.81 \pm 17.16 ^{②③}	92.32 \pm 9.57 ^②
银翘散高剂量组	9	43.45 \pm 7.02 ^②	66.38 \pm 11.89 ^②	85.98 \pm 14.25 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与利巴韦林组比较, ③ $P < 0.05$

2.5 各组小鼠肺组织 NALP3 mRNA 及蛋白表达水平比较 见表4、图3。与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 NALP3 mRNA、NALP3 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺组织 NALP3 mRNA、NALP3 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银翘散低剂量组小鼠肺组织 NALP3 mRNA、NALP3 蛋白表达较高, 银翘散中剂量组小鼠肺组织 NALP3 mRNA 表达较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠肺组织 ASC mRNA 及蛋白表达水平比较 见表5、图4。与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 ASC mRNA、ASC 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺组织 ASC mRNA、ASC 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银翘散低剂量组小鼠肺组织 ASC mRNA、ASC 蛋白表达较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.7 各组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平比较 见表6、图5。与正常组比较, 模型组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA、caspase-1 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 银翘散高、中、低剂量组、利巴韦林组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA、caspase-1 蛋白表达显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与利巴韦林组比较, 银

表4 各组小鼠肺组织 NALP3 mRNA 及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NALP3 mRNA 表达	NALP3 蛋白表达
正常组	9	1.08 \pm 0.05	0.16 \pm 0.03
模型组	9	4.19 \pm 0.22 ^①	0.25 \pm 0.02 ^①
利巴韦林组	9	1.94 \pm 0.17 ^②	0.15 \pm 0.03 ^②
银翘散低剂量组	9	2.69 \pm 0.05 ^{②③}	0.17 \pm 0.01 ^{②③}
银翘散中剂量组	9	2.62 \pm 0.07 ^{②③}	0.13 \pm 0.05 ^②
银翘散高剂量组	9	1.52 \pm 0.03 ^②	0.10 \pm 0.03 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与利巴韦林组比较, ③ $P < 0.05$

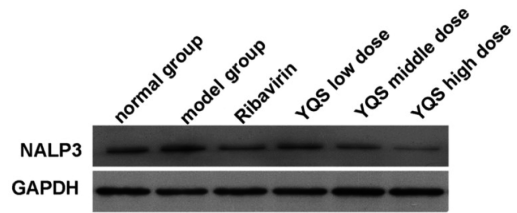


图3 各组小鼠肺组织 NALP3 蛋白表达结果

注: normal group、model group、Ribavirin、YQS low dose、YQS middle dose 和 YQS high dose 分别表示正常组、模型组、利巴韦林组、银翘散低剂量组、银翘散中剂量组、银翘散高剂量组。

表5 各组小鼠肺组织 ASC mRNA 及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ASC mRNA 表达水平	ASC 蛋白表达水平
正常组	9	0.98 \pm 0.06	0.15 \pm 0.02
模型组	9	3.28 \pm 0.16 ^①	0.27 \pm 0.03 ^①
利巴韦林组	9	1.42 \pm 0.11 ^②	0.15 \pm 0.03 ^②
银翘散低剂量组	9	2.02 \pm 0.07 ^{②③}	0.21 \pm 0.01 ^{②③}
银翘散中剂量组	9	1.79 \pm 0.01 ^②	0.16 \pm 0.03 ^②
银翘散高剂量组	9	1.63 \pm 0.04 ^②	0.18 \pm 0.04 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与利巴韦林组比较, ③ $P < 0.05$

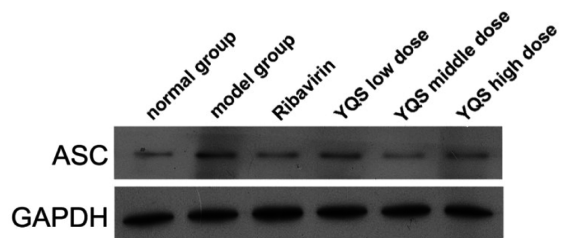


图4 各组小鼠肺组织 ASC 蛋白表达结果

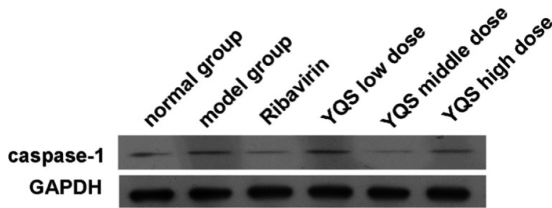
注: normal group、model group、Ribavirin、YQS low dose、YQS middle dose 和 YQS high dose 分别表示正常组、模型组、利巴韦林组、银翘散低剂量组、银翘散中剂量组、银翘散高剂量组。

翘散中剂量组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA 表达较高, 银翘散低剂量组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA 和蛋白表达较高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 6 各组小鼠肺组织 caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	caspase-1 mRNA 表达水平	caspase-1 蛋白表达水平
正常组	9	1.00 ± 0.05	0.21 ± 0.012
模型组	9	2.46 ± 0.05 ^①	0.37 ± 0.056 ^①
利巴韦林组	9	1.12 ± 0.04 ^②	0.22 ± 0.049 ^②
银翘散低剂量组	9	2.18 ± 0.28 ^{②③}	0.34 ± 0.041 ^{②③}
银翘散中剂量组	9	1.75 ± 0.17 ^{②③}	0.21 ± 0.011 ^②
银翘散高剂量组	9	1.38 ± 0.24 ^②	0.23 ± 0.043 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与利巴韦林组比较, ③ $P < 0.05$



注: normal group、model group、Ribavirin、YQS low dose、YQS middle dose 和 YQS high dose 分别表示正常组、模型组、利巴韦林组、银翘散低剂量组、银翘散中剂量组、银翘散高剂量组。

图5 各组小鼠肺组织 caspase-1 蛋白表达结果

3 讨论

目前可供临床选用治疗 RSV 的药物较少, 一直以来, 西药方面治疗 RSV 感染的药物主要有抗病毒药物、支气管扩张剂、激素类抗炎药和免疫调节剂等, 但是这些药物都存在比较严重的毒副作用。与西药相比, 中药的毒副作用小, 药源丰富, 可通过调整机体的免疫状态来增强机体抵抗流感病毒的免疫力。

银翘散为中药复方, 是中医辛凉解表法的代表方, 是临床辨证治疗风热型流感的主要方剂; 对流行性感、肺炎、支气管炎、扁桃体炎、腮腺炎等属于中医温热病范畴的病毒性感染疾病有切实疗效。其配方由连翘、金银花、桔梗、薄荷、竹叶、生甘草、荆芥穗、淡豆豉、牛蒡子、芦根 10 味药物组成, 其中金银花、连翘既有辛凉透邪、清热之功, 又具芳香辟秽解毒之效; 薄荷、牛蒡子辛凉, 疏风清热而利咽喉。荆芥穗、淡豆豉辛温, 助君药开皮毛而逐邪, 芳香辟秽。竹叶可清上焦热; 芦根可清热生津; 桔梗可

宣肺止咳。甘草既可调和诸药, 护胃安中, 又可合桔梗清利咽喉。

RSV 感染常常导致免疫损伤和炎症的出现。在活化炎症因子的过程中, NALP3 炎性体有不可或缺的作用。NALP3 炎性体是 NOD 样受体蛋白家族成员, 是体内免疫系统对病原体的感受器, 可识别病原体并产生相应的免疫应答反应。NALP3 炎性体由 NOD 样受体家族成员 3、ASC、以及半胱天冬酶 caspase-1 组成。当配体与 NALP3 结合后促进炎症小体的形成, 并对 caspase-1 进行自身激活, 导致 IL-1 β 和 IL-18 等各种炎性因子的成熟及分泌, 引起各种免疫炎症反应^⑥。

肺指数是指肺重占机体体质量的百分率, 通常以肺指数值的大小表示肺炎性疾病病变的严重程度, 用肺指数可以作为药物作用的检验指标, 发挥定量的作用, 客观的反应肺病变的程度。HE 染色观察鼻黏膜组织上皮细胞受损程度、水肿程度以及嗜酸性粒细胞浸润能够间接表明银翘散的治疗效果。同时采用 HE 染色观测肺组织病理形态变化, 观察肺组织肺泡形态、间质血管、水肿以及炎性细胞渗出情况可以间接判断银翘散的治疗效果。RSV 感染能够导致炎症的发生, 导致一些因子如细胞间黏附因子-1(ICAM-1)、细胞因子、趋化因子和其他炎症介质等发挥宿主防御功能, 启动抗病毒和炎症反应^{⑦-⑩}, 所以检测炎症因子可以间接反映银翘散的治疗效果。另外, 研究表明^⑥, NALP3 炎性小体是细胞内负责免疫和炎症过程的蛋白复合物, 其由 NALP3、ASC 及 caspase-1 组成, NALP3、ASC 和 caspase-1 的表达和炎症因子的表达密切相关, 肺组织 NALP3、ASC 和 caspase-1 表达水平可以作为银翘散疗效的间接指标。

采用银翘散治疗 RSV 感染小鼠可以降低肺指数, 抑制 NALP3、ASC 和 caspase-1 的表达水平, 从而抑制炎症小体 NALP3 的形成, 降低 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达, 显著减轻鼻黏膜上皮细胞受损情况、组织水肿以及鼻黏膜充血的程度, 显著减少嗜酸性粒细胞浸润以及阻止肺泡间隔变薄, 减轻间质血管扩张、充血、水肿, 减少炎性细胞渗出。银翘散高、中剂量组的治疗效果和利巴韦林相似, 强于银翘散低剂量组, 所以建议采用高、中剂量银翘散进行 RSV 感染治疗。

本研究选择小鼠建立 RSV 感染模型, 虽然技术

成熟且应用广泛,但由于其缺乏临床症状的表达且为慢效应模型,加之小鼠并不是RSV感染的唯一宿主,炎症反应可能不显著,影响药物效果的观察,因此具有一定的局限性,在今后的研究中需寻求更理想、更稳定、更可靠的模型。中药具有成分复杂、副作用少、药源丰富、价格低廉且作用靶点多的特点,本研究重视病毒-机体-中药三者的关系,通过动物实验评价了银翘散对RSV感染所致呼吸系统炎症的改善作用,但关于该药的有效成分以及药理活性研究还有待考察。下一步课题组将应用现代技术手段深入研究银翘散抗RSV的主要活性成分,并通过临床实验进一步探讨银翘散抗RSV感染相关疾病的临床应用价值,为中药走向世界提供更为科学的理论依据。

[参考文献]

- [1] Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet*, 2010, 375(9725): 1545-1555.
- [2] Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(6): 588-598.
- [3] Resch B. Burden of respiratory syncytial virus infection in young children[J]. *World J Clin Pediatr*, 2012, 1(3): 8-12.
- [4] Schickli JH, Dubovsky F, Tang RS. Challenges in developing a pediatric RSV vaccine[J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5(9): 582-591.
- [5] Murphy BR, Hall SL, Kulkarni AB, et al. An update on approaches to the development of respiratory syncytial virus (RSV) and parainfluenza virus type 3 (PIV3) vaccines[J]. *Virus Res*, 1994, 32(1): 13-36.
- [6] Chen M, Wang H, Chen W, et al. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(5): 549-554.
- [7] Monick MM, Powers LS, Hassan I, et al. Respiratory syncytial virus synergizes with Th2 cytokines to induce optimal levels of TARC/CCL17[J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1648-1658.
- [8] Feng J, Hu Y, Song Z, et al. Interleukin-23 facilitates Th1 and Th2 cell differentiation in vitro following respiratory syncytial virus infection[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(4): 708-715.
- [9] Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, et al. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1733-1740.
- [10] Satkunanathan S, Kumar N, Bajorek M, et al. Respiratory syncytial virus infection, TLR3 ligands, and proinflammatory cytokines induce CD161 ligand LLT1 expression on the respiratory epithelium[J]. *J Virol*, 2014, 88(5): 2366-2373.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)