

· 论 著 ·

黄芩苷抗呼吸道合胞病毒作用的研究*

詹铀超¹, 秦 珊^{2△}, 陈 富²

(1. 广州医科大学附属第五医院检验科, 广州 510700; 2. 广东省中医院检验科, 广州 510120)

摘要: 目的 研究黄芩苷对呼吸道合胞病毒(RSV)感染的 BALB/c 小鼠干扰素(IFN)- α 及 IFN- β 表达的干预作用, 探讨其抗病毒机制。方法 建立 BALB/c 小鼠呼吸道合胞病毒感染模型, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测小鼠肺组织 IFN- α 及 IFN- β 的水平。结果 黄芩苷能明显增加 RSV 感染 BALB/c 小鼠的 IFN- α 及 IFN- β 的表达。结论 黄芩苷在小鼠体内可以通过调控 IFN 的表达来发挥抗 RSV 的作用。

关键词: 黄芩苷; 抗病毒; 呼吸道合胞病毒; 干扰素- α ; 干扰素- β

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.14.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)14-1907-03

Study on effect and mechanism of baicalin on antiviral effects about respiratory syncytial virus*

ZHAN Youchao¹, QIN Shen^{2△}, CHEN Fu²

(1. Department of Clinical Laboratory, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510700, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To research the effect of the baicalin to the expression of interferon(IFN)- α and IFN- β in the BALB/c mouse infected by respiratory syncytial virus(RSV), and discussed the antiviral mechanism. **Methods** To establish the BALB/c mouse model of RSV, the effects of IFN- α and IFN- β in the BALB/c mouse infected by RSV were detected by ELISA. **Results** The IFN- α and IFN- β in the BALB/c mouse infected by RSV could be evaluated significantly by Baicalin. **Conclusion** The Baicalin regulates the level of IFN in the BALB/c mouse infected by RSV.

Key words: baicalin; antiviral; respiratory syncytial virus; interferon- α ; interferon- β

目前全球范围内, 呼吸道病毒感染是导致儿童死亡的主要原因之一^[1-2], 近年来, 病毒感染在呼吸道病毒感染的病因所占的比例越来越大^[3]。呼吸道合胞病毒(RSV)属于副黏科的单股负链 RNA 病毒, 是成人哮喘急性发作, 以及婴幼儿和老年人下呼吸道感染的主要病因^[4-6]。黄芩为清热解毒类中药, 其药理作用有抗病毒、抗炎及抗菌等^[7], 黄芩苷为黄芩的药效成分, 占总水平的 5.4%^[8], 本研究拟通过实验明确黄芩苷抗 RSV 病毒的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 BALB/c 种小鼠 60 只, 雌性, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 广东省医学动物实验中心提供, 生产许可证号: SCXK(粤)20160503。

1.2 药物 RSV(A 亚型 Long 株)购于武汉国家典型培养物保藏中心, 黄芩苷宜城百草植物工贸有限公司, 其水平大于或等于 98%, 批号: 20160304。

1.3 仪器与试剂 利巴韦林注射液(无锡市第七制药有限公司, 批号: 20151005), 改良型苏木素(北京康维世纪生物科技有限公司, 批号: 20160302), 二甲苯(北京化学试剂公司, 批号: 20150804), 无水乙醇(北京化学试剂公司, 批号: 20150503), 小鼠 IFN- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司, 批号: 201603), 小鼠 IFN- β ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司, 批号: 201603)。2235 型石蜡切片机(德国徕卡公司), 显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司)。

1.4 给药 将 60 只健康 BALB/c 小鼠按体质量随机分为空

白组、模型组, 利巴韦林组(给药剂量为 $46 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 为临床等效剂量), 黄芩苷高剂量组(给药剂量为 $1\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 黄芩苷中剂量组(给药剂量为 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 为临床等效剂量), 黄芩苷低剂量组(给药剂量为 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只。各组小鼠常规饲养于无病原体环境中 3 d, 采用皮下注射每天给药 1 次, 连续给药 3 d, 空白组和模型组给予等量生理盐水, 在第 3 天给予 RSV 滴鼻感染, 感染病毒 2 h 后给药, 造模及给药各进行 3 d, 末次造模 24 h 后(即距离首次造模 72 h)处死动物, 取肺组织, 具体操作步骤严格按照干扰素(IFN)- α 及 IFN- β ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.5 造模方法 小鼠用乙醚进行轻度麻醉, 除空白组外, 其余每组小鼠每侧鼻腔进行 RSV50 μL 滴鼻, 空白组用等量生理盐水滴鼻, 每日 1 次, 小鼠出现活动及进食减少, 鼻部分泌物增加, 精神萎靡等症状表明造模成功。

1.6 肺组织病理切片的处理

1.6.1 标本固定 标本固定、脱水、包埋: 将小鼠新鲜左肺组织用 4% 甲醛溶液固定 24 h 以上, 取出置于包埋盒中, 采用自动脱水机脱水, 脱水完成后, 取出标本石蜡包埋成组织蜡块, 4 °C 保存标本。

1.6.2 切片及染色 修整蜡块后, 用切片机将组织蜡块切成 4~5 μm 厚的切片, 放在涂有多聚赖氨酸的玻片上, 放置 60 °C 烤箱内过夜, 使石蜡充分溶化后, 进行苏木精-伊红(HE)染色, 具体操作步骤如下: 二甲苯 I 脱蜡 5 min, 二甲苯 II 脱蜡 10

* 基金项目: 广东省中医药局基金资助项目(20152126)。

作者简介: 詹铀超, 男, 主管技师, 主要从事临床检验研究。 △ 通信作者, E-mail: qinshen1978@163.com。

min, 100% 乙醇 3 min, 95% 乙醇 2 min, 75% 乙醇 3 min, 自来水冲洗 5 min, 苏木素染色 8~10 min, 盐酸酒精浸泡 3~5 s, 自来水冲洗 2 min, 饱和碳酸锂浸泡 3 s, 自来水冲洗 5 min, 95% 乙醇浸泡 1 min, 伊红染色 1~2 min, 自来水冲洗 5 min, 95% 乙醇浸泡 30 s, 无水乙醇浸泡 10 s, 无水乙醇浸泡 10 s, 无水乙醇浸泡 10 s, 干燥后中性封片。

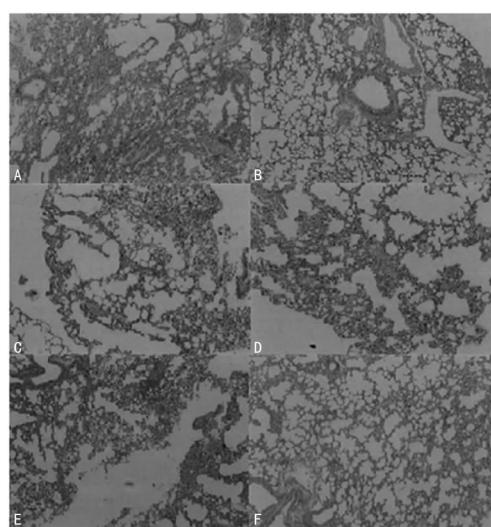
1.6.3 组织形态分析 在光学显微镜下观察肺组织受损及炎症浸润情况, 参照 Myou 等^[9] 的方法进行评分并得出总的病理评分结果。验证评分标准: 正常 0 分, 少量炎性细胞 1 分, 炎性细胞环 1 细胞层 2 分, 炎性细胞环 2~4 细胞层 3 分, 炎性细胞环大于 4 细胞层 4 分。

1.7 IFN- α 及 IFN- β 的测定 将试剂盒平衡至室温, 将肺组织加入适量生理盐水, 冰水浴条件下研磨, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测各组样本中 IFN- α , IFN- β 的水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理及统计学分析, 呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 F 检验, 多组间中的 2 组间比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RSV 感染后小鼠肺组织切片 HE 染色及评分 各组小鼠肺组织切片 HE 染色组织结构均保持完好, 细胞形态正常, 支气管壁均存在炎性细胞浸润现象, 见图 1。对各组小鼠肺组织 HE 染色炎症评分进行比较, 其中, 与空白组相比, 模型组评分明显升高 ($P < 0.05$), 说明模型成功。与模型组相比, 黄芩苷高剂量组及利巴韦林组评分低于模型组 ($P < 0.05$)。黄芩苷中、低剂量组评分均略低于模型组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。黄芩苷中、低剂量组评分稍低于模型组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为黄芩苷高剂量组; D 为黄芩苷中剂量组; E 为黄芩苷低剂量组; F 为利巴韦林组。

图 1 各组小鼠肺组织切片 HE 染色

2.2 RSV 感染后小鼠肺组织 IFN 水平 RSV 感染 BLAB/c 小鼠后, 模型组 IFN- α , IFN- β 水平明显高于空白组; 利巴韦林组, 黄芩苷高、中、低剂量组 IFN- α , IFN- β 水平明显高于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 黄芩苷高、中剂量组与利巴韦林组 IFN- α , IFN- β 水平明显高于黄芩苷低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。利巴韦林组 IFN- α , IFN- β 水平稍高

于黄芩苷中剂量组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 黄芩苷对 RSV 感染小鼠肺部病理切片评分的影响

| 组别 | n | 剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) | 评分($\bar{x} \pm s$, 分) |
|---------|----|--|--------------------------|
| 空白组 | 10 | 0 | 1.5 ± 0.59 |
| 模型组 | 10 | 0 | 2.2 ± 0.48* |
| 黄芩苷高剂量组 | 10 | 1 000 | 1.7 ± 0.53# |
| 黄芩苷中剂量组 | 10 | 500 | 1.8 ± 0.56 |
| 黄芩苷低剂量组 | 10 | 250 | 1.8 ± 0.73 |
| 利巴韦林组 | 10 | 46 | 1.7 ± 0.37# |

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

表 2 黄芩苷对 RSV 感染小鼠肺部 IFN- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) | IFN- α ($\mu\text{g/L}$) | IFN- β ($\mu\text{g/L}$) |
|---------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| 空白组 | 0 | 9.27 ± 3.22 | 98.54 ± 14.60 |
| 模型组 | 0 | 21.33 ± 11.84* | 118.66 ± 11.34* |
| 黄芩苷高剂量组 | 1 000 | 42.73 ± 11.54#△ | 139.47 ± 16.07#△ |
| 黄芩苷中剂量组 | 500 | 36.68 ± 10.62#△ | 131.51 ± 15.11#△ |
| 黄芩苷低剂量组 | 250 | 32.52 ± 10.72# | 127.38 ± 14.39 |
| 利巴韦林组 | 46 | 38.76 ± 12.56#△ | 138.93 ± 18.56#△ |

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与低剂量组比较, △ $P < 0.05$ 。

3 讨 论

RSV 感染为全球性疾病, 目前临幊上尚无抗 RSV 病毒的特效药^[10], 且至今没有能有效预防 RSV 感染的疫苗出现^[11~12], 利巴韦林是美国食品和药品管理局批准用于治疗 RSV 感染的唯一化学疗法药物^[13~14], 为临幊常用治疗 RSV 感染药物, 故本研究将其作为阳性对照药。

抗 RSV 药物在中国的研制工作尚处于起步阶段^[15], 中药相比于西药, 具有选择性多、价格低廉、不良反应少等优点^[16], 临床研究及实验研究证明黄芩苷是抗 RSV 感染的有效中药, 为了探究黄芩苷抗 RSV 机制, 本研究采用治疗方式给药, 检测给药后 RSV 感染小鼠肺部组织中 IFN 的表达, 来验证黄芩苷抗 RSV 的作用机制。

1957 年 IFN 被发现^[17], 其具有广谱抗病毒的作用, 也有抗肿瘤、调节免疫功能和抗血管生成等生物活性^[18]。有报道称 I 型 IFN 主要为 IFN- α 及 IFN- β 两种免疫调节因子, 该因子可在病毒感染早期一定程度上抑制对病毒的复制, 在机体抗呼吸道病毒感染中扮演着重要角色, 是自然免疫重要的组成部分^[19]。有研究发现, 机体在受 RSV 感染后难以产生 IFN, 并且抗病毒能力也随之降低。因此, 促使机体在 RSV 感染后增加 IFN 的表达, 成为研发抗 RSV 病毒的重点思路之一^[20]。

肺为 RSV 感染时主要受累器官, 故本课题采用 RSV 病毒感染 BALB/c 小鼠模型, 选取给药 3 d 后造模, 并继续给药 3 h, 模拟 RSV 感染早期阶段, 并对肺组织进行表观及相关因子的研究, 所得的数据在一定程度上可以反映机体受 RSV 感染引起病变状况的真实性^[21]。

RSV 感染细胞的过程包括病毒的吸附、穿入和病毒在细胞内复制增殖, 最终出现细胞病变。抑制其中任何一个过程,

都能抑制 RSV 对细胞的损伤。RSV 对活化诱导 Toll 样受体 (TLR) 信号转导通路影响重大^[22], 人体中已经发现 11 个 TLR, 其中 TLR4 作为病毒包膜糖蛋白的识别对象^[23], 其通过引起脂多糖(LPS)介导的白细胞介素(IL)-6 反应而起重要作用, 这与 RSV 感染的症状吻合^[24]。稳态下, 机体存在 TLR 的复性调节, 适时终止 TLR 信号通路^[25], 避免过强的免疫反应。如可溶性 TLR4(sTLR4) 竞争相应的配体、细胞因子信号传导抑制因子(SOSCI) 通过抑制人受体相关激酶(IRAk)活性, 加速 MyD88 样转接蛋白(Mal, 也称 TIRAP)的降解、胞浆锌脂蛋白(A20)将 TRAF6 去泛素化等途径调控 TLR4 的信号通路。TRAF6 活化转化生长因子 β 活化激酶(TAK1), 后者激活 IKB 激酶(IKKs, 包括 IKK α 、IKK β 、IKK γ), 进而活化 NF-KB。当 NF-KB 进入核内, 从而促进 TNF-α、IL-6、IL-8、IL-12 等细胞因子的表达。笔者推测本研究中, 黄芩苷可能通过调控 RSV 诱导活化的 TLR 信号通路来间接发挥抗病毒作用, 起作用靶点可能存在与 TLR 或其信号通路中, TAK1 是其信号通路中重要的衔接蛋白之一, 从而发挥抗 RSV 感染所致的炎症反应。

肺部组织中 IFN 水平结果表明, 受 RSV 感染小鼠在给予黄芩苷后, 肺部 IFN-α、IFN-β 水平有明显提高($P < 0.05$), 表明肺部在受 RSV 病毒感染后, 病毒激活信号通路导致 IFN-α 及 IFN-β 高表达。利巴韦林组, 黄芩苷高、中、低剂量组 IFN-α、IFN-β 水平明显高于模型组; 黄芩苷高、中剂量组与利巴韦林组 IFN-α、IFN-β 水平明显高于黄芩苷低剂量组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。表明黄芩苷可促使机体表达 IFN-α 及 IFN-β 而发挥抗病毒及抗炎的作用。

综上所述, 黄芩苷能通过明显提高 RSV 感染小鼠早期(3 d)IFN-α 及 IFN-β 的表达量来发挥抗 RSV 的作用, 其中调控确切的作用机制可能与诱生中间丝蛋白(IFB)相关的蛋白通路有关, 将进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 盛金峰, 姜宠华. 炎琥宁治疗小儿急性上呼吸道感染的应用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 4(1): 319-332.
- [2] 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.
- [3] 孙丽红, 陈爱欢, 吴婕羽, 等. 美敏伪麻黄溶液治疗小儿急性上呼吸道感染的临床疗效观察[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 25(9): 746-748.
- [4] Ghildyal R, Adeline H, Jans DA. Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection[J]. Fems Microb Rev, 2006, 30(5): 692-705.
- [5] 揭志军, 冯净净, 宋志刚, 等. 呼吸道合胞病毒对干扰素信号通路 STAT 蛋白核转移的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(3): 277-282.
- [6] Katze MG, He Y, Gale MJ. Viruses and interferon: a fight for supremacy[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 29(2): 675-687.
- [7] 宋琳莉, 孟庆刚. 黄芩的药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(8): 1676-1678.
- [8] 王宏志, 喻春皓, 高钧, 等. HPLC 分析比较炮制和提取方法对黄芩活性成分的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16): 1637-1640.
- [9] Myou S, Leff AR, Myo S, et al. Blockade of inflammation and airway hyperresponsiveness in immune-sensitized mice by dominant-negative phosphoinositide 3-kinase-TAT[J]. J Exp Med, 2003, 198(10): 1573-1582.
- [10] Fleming DM, Elliot AJ. Respiratory syncytial virus: a sleeping giant? [J]. Eur Respir J, 2007, 30(6): 1029-1031.
- [11] Power UF. Respiratory syncytial virus(RSV) vaccines—two steps back for one leap forward[J]. J Clin Virol, 2008, 41(1): 38-44.
- [12] England J. In search of a vaccine for respiratory syncytial virus: the saga continues[J]. J Infect Dis, 2005, 191(7): 1036-1039.
- [13] 谢蒙, 李维禧. 利巴韦林抑制呼吸道合胞病毒诱导的 A459 细胞凋亡[J]. 武汉大学学报(医学版), 2016, 5(3): 377-380.
- [14] Turner TL, Kopp BT, Paul G, et al. Respiratory syncytial virus: current and emerging treatment options[J]. Clinico-econ Outcomes Res, 2014, 6: 217-225.
- [15] 何金生. 人呼吸道合胞病毒活疫苗研究进展[J]. 中国科学, 2011, 41(1): 1-12.
- [16] 朱莹莹. 中医药对小儿 RSV 感染的研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 2(38): 227-232.
- [17] Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference: I—the interferon[J]. Proc R Soc Lond, 1957, 147(927): 258-267.
- [18] 冯盼盼. 干扰素的药理研究进展[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 781-783.
- [19] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 475.
- [20] Plata AG, Baron S, Poas JS, et al. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumo virus experimental infections[J]. J Virol, 2005, 79(16): 10190-10199.
- [21] 梁晓鑫. 金欣口服液对 RSV 活化诱导的 TLR-7、IFR-7、IFN-α 的调控作用[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013, 6.
- [22] Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, et al. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease[J]. Nat Med, 2009, 15(1): 34-41.
- [23] Janssen R, Pennings J, Hodemaekers H, et al. Hosttranscription profiles upon primary respiratory syncytial virus infection[J]. J Virol, 2007, 81(11): 5958-5967.
- [24] Xie XH, Law HK, Wang LJ, et al. Lipopolysaccharide induces IL-6 production in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells through the toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. Pediatr Res, 2009, 65(2): 156-162.
- [25] 王海坤, 韩代书. Toll 样受体的信号转导与免疫调节[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(9): 820-827.