

· 博士之窗 ·

清肺口服液对 3I、7b 型腺病毒感染人胚肺成纤维细胞转化生长因子- β_1 和血小板衍生生长因子-BB 蛋白表达的影响

王文革 陈四文 汪受传

摘要 **目的** 探讨清肺口服液含药血清对腺病毒 3 I、7b 感染的人胚肺成纤维细胞之转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB) 蛋白表达的影响。**方法** 细胞分为正常细胞组、病毒对照组、空白血清组、利巴韦林组和含药血清组,除正常细胞组外,其余 4 组均以 3 I、7b 型腺病毒分别攻击之,并分别加入相应药物至各组细胞中;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测各组细胞上清液中 TGF- β_1 、PDGF-BB 的含量。**结果** 病毒对照组较正常细胞组细胞中 TGF- β_1 、PDGF-BB 含量均明显增多($P < 0.01$),含药血清组比病毒对照组的细胞 TGF- β_1 、PDGF-BB 含量显著降低($P < 0.01$)。**结论** (1)腺病毒感染可使人胚肺成纤维细胞 TGF- β_1 、PDGF-BB 蛋白表达增高;(2)清肺口服液可降低 TGF- β_1 、PDGF-BB 细胞因子的蛋白表达,这可能是其抗病毒作用的机制之一。

关键词 清肺口服液;人胚肺成纤维细胞;腺病毒;转化生长因子- β_1 ;血小板衍生生长因子-BB

Effect of Qingfei Oral Liquid on Protein Expression of Transforming Growth Factor- β_1 and Platelet Derived Growth Factor-BB of Adenovirus Type 3 I, 7b Induced Human Embryonic Lung Fibroblast Cells WANG Wen-ge, CHEN Si-wen, and WANG Shou-chuan *Department of Pediatrics, Nanjing TCM University, Nanjing (210029)*

Abstract **Objective** To explore the effect of Qingfei oral liquid (QOL) contained serum on protein expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) of adenovirus type 3 I, 7b induced human embryonic lung fibroblast cells. **Methods** The cells were divided into 5 groups, the normal cells group (NCG), the virus control group (VCG), the blank serum group (BSG), the ribavirin group (RVG) and the QOL contained serum group (QSG). All the cells except those in the NCG were challenged by adenovirus type 3 I, 7b and treated with correspondent medicine. The contents of TGF- β_1 and PDGF-BB in the supernatant of cell culture were monitored by ELISA and compared among groups. **Results** Contents of TGF- β_1 and PDGF-BB in VCG were significantly higher, while those in QSG were significantly lower than those in VCG ($P < 0.01$). **Conclusion** Adenovirus infection can increase the protein expression of TGF- β_1 and PDGF-BB of human embryonic lung fibroblast cells. QOL can decrease the protein expression of these cytokines, which maybe one of the mechanisms of its antiviral effect.

Key words Qingfei oral liquid, human embryonic lung fibroblast cells, adenovirus, transforming growth factor- β_1 , platelet derived growth factor-BB

清肺口服液是临床治疗小儿病毒性肺炎的有效药物,前期的药效学研究已显示其具有抗病毒、调节免

疫、解热、止咳、化痰及体外抑菌等作用^[1]。在此基础上我们采用血清药理学方法,用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)研究清肺口服液对腺病毒攻击后细胞转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)和血小板衍生生长因子-BB(platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB)蛋白水平的影响,进一步阐明清肺口服液治疗病

基金项目:国家自然科学基金项目(No.30171171)

作者单位:南京中医药大学儿科(南京 210029)

通讯作者:王文革,现在山西省儿童医院(太原 030013),Tel:0351-3360748, E-mail:wwg824@yahoo.com.cn

病毒性肺炎的分子生物学机制。

材料与方 法

1 材 料

1.1 动物 健康大耳白兔 10 只,雌雄各半,体重 2.5~3kg,由南京中医药大学实验动物中心提供。

1.2 细胞 人胚肺成纤维细胞 CCC-HPF-1,由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。本实验采用第 5~30 代细胞。

1.3 病毒 腺病毒 3I、7b 两型,由白求恩医科大学第一临床医学院儿科提供,南京医科大学微生物中心在人胚肾细胞上增殖活化。

1.4 药物与试剂 清肺口服液:由麻黄、葶苈子、虎杖、生石膏、杏仁、丹参、僵蚕、前胡、桑白皮、拳参组成,每剂含生药 1mg/ml,南京中医药大学附属医院制剂室负责制剂和质量控制。RPMI-1640 培养基(含终浓度青霉素、链霉素各 100U/ml,20%新生牛血清):由美国 GIBICO 公司提供。利巴韦林注射液:华北制药有限公司生产,规格为 100mg/ml,批号 020244。新生牛血清:由杭州四季青公司提供。胰蛋白酶:由美国 GIBICO 公司提供。人 TGF-β₁、PDGF-BB ELISA 测定试剂盒:由上海森雄公司提供。

2 方 法

2.1 含药血清的制备 将动物随机分为两组,A 组灌服清肺口服液,给药剂量 25g/kg,分两次给予(相当于临床等效剂量);B 组给相应体积的生理盐水,连续给药 3 天,末次给药后禁食(12h)不禁水,再灌服 1 天的量,1h 后,动物在清醒状态下行颈动脉分离插管采血,血液静置 30min 后,离心取血清,56℃ 水浴 30min 灭活,在超净工作台上过滤除菌,分装于 1.5ml EP 管,-70℃ 冰箱保存备用。A 组为清肺口服液含药血清,B 组为空白血清。

2.2 细胞分组 共分 3I 型、7b 型腺病毒两大组,每一大组又分 5 个小组:正常细胞组、病毒对照组、利巴韦林组、含药血清组、空白血清组。

2.3 细胞培养 将复苏后的人胚肺成纤维细胞 CCC-HPF-1 以 1×10⁶/ml 接种于 25ml 培养瓶中,加入 3mlRPMI-1640 培养基,置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。待细胞基本长满瓶壁后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。细胞每次传代后,培养 72h。

2.4 半数细胞感染量(TCID₅₀)的确立 将病毒 10 倍依次稀释,共稀释 7 个浓度,接种于 96 孔板上,每日观察细胞病变,以最高稀释度不再出现新病变时

为终点,计算 TCID₅₀。结果腺病毒 3I 型 TCID₅₀ 为 10^{-3.17},腺病毒 7b 型 TCID₅₀ 为 10^{-3.75}。

2.5 最大无毒浓度的测定 利巴韦林对倍稀释 12 个浓度,含药血清稀释 3 个浓度,接种于 96 孔板上,每日观察细胞病变,以最高稀释度不再出现新病变时为终点,确定各自的最大无毒浓度。

2.6 细胞培养上清液的收集 除正常细胞组外,各组均给予 100 倍 TCID₅₀ 病毒攻击,之后分别给 2% 1640 维持液、利巴韦林(浓度 1mg/ml)、含药血清(浓度 1:9)、空白血清(浓度 1:9)各 3ml。24h 后收集不同组上清液,每组 1 瓶,共 10 瓶,并重复 9 次,-70℃ 保存备测。

2.7 TGF-β₁ 和 PDGF-BB 检测 将收集好的标本于检测当天解冻,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法。用抗人 TGF-β₁ 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 TGF-β₁ 与单抗结合,加入生物素化的抗人 TGF-β₁ 抗体,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物邻苯二胺(OPD)出现黄色,加终止液硫酸,颜色变深,在 492nm 处测 OD 值,TGF-β₁ 浓度与 OD 值成正比,通过绘制标准曲线求出标本中的 TGF-β₁ 浓度。PDGF-BB 的检测方法同 TGF-β₁,只是 TGF-β₁ 的标本需要预先激活。

3 统计学方法 应用 SPSS 11.5 统计分析软件对实验数据进行统计学处理,采用单因素方差分析进行各组间比较。

结 果

腺病毒 3I、7b 两型攻击体外培养的人胚肺成纤维细胞后,与正常细胞组比较,病毒对对照组细胞上清液中的 TGF-β₁、PDGF-BB 含量均明显升高(P<0.01);与病毒对照组比较,利巴韦林组及含药血清组 TGF-β₁、PDGF-BB 均显著降低(P<0.01),但二者比较差异无显著性。与空白血清组比较,含药血清组和利巴韦林组差异有显著性(P<0.05 或 P<0.01),病毒对对照组差异无显著性(见表 1)。

表 1 两种腺病毒攻击后各组细胞 TGF-β₁、PDGF-BB 含量测定结果比较 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	3I 型		7b 型	
		TGF-β ₁	PDGF-BB	TGF-β ₁	PDGF-BB
正常细胞	9	4.35±0.24	5.64±0.49	4.72±0.11	5.74±0.40
病毒对照	9	5.70±0.29*	9.78±0.83*	6.45±0.91*	9.93±0.62*
空白血清	9	5.77±0.44	8.78±0.30	6.12±0.15	7.66±1.09
利巴韦林	9	4.33±0.17△△▲	4.33±0.54△▲	4.50±0.15△△▲	3.26±0.29△△▲
含药血清	9	4.25±0.23△△▲	6.09±0.22△▲	4.61±0.23△△▲	4.29±0.35△△▲

注:与正常细胞组比较,*P<0.01;与空白血清组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与病毒对照组比较,▲P<0.01

讨 论

肺部疾病如哮喘、急性肺损伤等大部分都存在着细胞因子网络的失衡及某些细胞因子、黏附因子的高表达,细胞因子在肺炎发病中的作用早已被人们所认识。目前研究表明,多种生长因子参与肺的炎症反应,其中 TGF- β_1 、PDGF-BB、成纤维细胞生长因子(FGF)等对调控肺成纤维细胞分裂、增殖及胶原蛋白的合成与降解起十分重要的作用^[2]。另有研究显示 TGF- β_1 对肺组织和细胞类型有调节作用,从支气管肺灌洗液中发现高水平的 TGF- β_1 及在肺中 TGF- β_1 mRNA 和蛋白的表现强烈支持 TGF- β 家族在肺的生理及病理活动中起重要作用^[3]。TGF- β_1 mRNA 的高度表达可激发肺泡炎症,它在肺泡急性炎症及间质性肺炎中发挥重要作用^[4]。PDGF-BB 对成纤维细胞和平滑肌细胞等具有强效的趋化和致有丝分裂作用,在许多有纤维化病变疾病的发病机制中具有重要作用;TGF- β_1 、PDGF-BB 不仅分别在纤维化疾病中起作用,而且具有协同作用。PDGF-BB 和 TGF- β_1 一起必将加重炎症反应与细胞过度增殖及各种细胞因子和炎症介质的释放,促进肺炎及肺纤维化形成^[5]。目前 TGF- β_1 、PDGF-BB 和肺疾病关系的研究热点是它们与肺纤维化、放射性肺损伤、矽肺、慢性阻塞性肺病及哮喘等与组织增生、纤维化有关的疾病,而二者和病毒性肺炎的关系,以及它们是否参与了病毒性肺炎发生发展的病理过程,尚未见文献报道。

腺病毒肺炎的主要病理改变为支气管炎和肺泡间质炎,重者可致肺纤维化、肺不张,其病理过程与肺纤维化、慢性阻塞性肺病、哮喘等与 TGF- β_1 和 PDGF-BB 密切相关的疾病又有许多相似之处。因此,TGF- β_1 和 PDGF-BB 很可能在腺病毒肺炎的发病中发挥着某种调节作用。TGF- β_1 和 PDGF-BB 是否参与了病毒性肺炎的病理过程,并在其中发挥着怎样的作用尚未见文献报道。

腺病毒肺炎以间质受累为主,而成纤维细胞占肺间质细胞的 35%~40%,因此本实验选用人胚肺成纤维细胞作为研究的靶细胞进行体外实验,进而阐明腺病毒肺炎的病理过程以及药物作用途径。本研究通过酶联免疫吸附实验检测表明,腺病毒 31、7b 型攻击人胚肺成纤维细胞后其 TGF- β_1 和 PDGF-BB 蛋白表达增强,提示腺病毒可刺激肺成纤维细胞合成在炎症反应和气道重建过程中有重要作用的细胞因子 TGF- β_1 和 PDGF-BB,表明肺成纤维细胞在病毒性肺炎发病中

有重要作用,TGF- β_1 和 PDGF-BB 可能参与了腺病毒肺炎的发病过程。我们推测 TGF- β_1 、PDGF-BB 参与腺病毒肺炎的免疫病理过程如下:病毒自呼吸道入侵,引起肺泡巨噬细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞等合成释放多种致炎性细胞因子,如 TNF、IL-1、IL-6、单核细胞趋化肽及促进成纤维细胞增殖分化,调节细胞外基质代谢的 TGF- β 、PDGF 和胰岛素样生长因子等。在 TNF 的作用下,启动炎性反应。同时促纤维细胞生长因子如 TGF- β 、PDGF、IGFs 等启动成纤维细胞的增殖分裂,导致胶原蛋白的大量合成,最终形成肺间质的胶原沉积,血管壁增厚闭合,即纤维化的组织病理学改变。但是病毒性肺炎的发病是复杂的,是多种细胞因子共同作用的结果,二者在其中究竟通过何种途径起作用尚需要更多的实验加以阐明。

清肺口服液含药血清可使病毒攻击过的人胚肺成纤维细胞上清液中 TGF- β_1 和 PDGF-BB 含量下降,说明其可以通过对 TGF- β_1 和 PDGF-BB 的影响,从蛋白质水平对细胞因子加以干预,阻断病毒性肺炎的发病过程,这可能是它抗病毒作用的机制之一。

参 考 文 献

- 1 汪受传,朱先康,韩新民,等. 小儿病毒性肺炎中医证治规律的初步研究. 中国医药学报 2003;18(12):694.
Wang SC, Zhu XK, Han XM, et al. Preliminary research on rules of syndrome differentiation and treatment of children's virus pneumonia in treatment of traditional chinese medicine. Chin J TCM Pharm 2003;18(12):694.
- 2 Matsuse T. Growth factors in the process of inflammation and fibrosis in the lung. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 1998;36(5):413-420.
- 3 彭文鸿,毛宝龄,邹霞英. 转化生长因子 β 对肺细胞调节的研究进展. 广东医学 1995;16(1):57-58.
Peng WH, Mao BL, Zou XY. Progress in transforming growth factor- β on regulating pneumocyte. Guangdong Med 1995;16(1):57-58.
- 4 张志琴,呼海燕,司军强. TGF- β 在肺纤维化中的作用. 农垦医学 2002;24(6):435.
Zhang ZQ, Hu HY, Si JQ. The action of TGF- β in pulmonary fibrosis. Agricultural Med J 2002;24(6):435.
- 5 Hoyle GW, Li J, Finkelstein JB, et al. Emphysematous lesions, inflammation and fibrosis in the lungs of transgenic mice over-expressing platelet-derived growth factor. Am J Pathol 1999;154(6):1763-1775.

(收稿:2004-10-20 修回:2004-12-15)