

金欣口服液对 RSV 感染 BALB/c 小鼠 TLR3 信号转导通路负调控因子 SOCS1 表达的调控作用

陈争光 汪受传 徐建亚 戴启刚

摘要 **目的** 研究金欣口服液对呼吸道合胞病毒(RSV)感染的 BALB/c 小鼠肺组织中 TLR3 信号转导通路负调控因子 SOCS1 不同时间点的表达趋势的调控作用。**方法** 75 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、利巴韦林组、金欣高剂量组和金欣等效剂量组,每组 15 只。每组分干预方式 I、II、III,每种干预方式 5 只小鼠。RSV 滴鼻感染 BALB/c 小鼠制备动物模型,予相应干预方式处理后处死取肺组织。Real time PCR 分别检测 RSV-M、SOCS1 和 IFN- β 在 mRNA 水平的表达情况,并采用 Western blotting 检测 SOCS1 在蛋白水平上的表达情况。**结果** 与正常组比较,模型组干预方式 I、II SOCS1、IFN- β mRNA 表达及 SOCS1 蛋白表达升高($P < 0.01$),干预方式 III 时 IFN- β mRNA 表达降低($P < 0.01$)。与模型组比较,金欣高、等效剂量组 3 种干预方式 RSV-M mRNA 表达均降低(均 $P < 0.01$),金欣高剂量组干预方式 I、III 及金欣等效剂量 3 种干预方式 SOCS1 mRNA 表达降低($P < 0.01$);金欣高剂量组干预方式 I、II 及金欣等效剂量组干预方式 I IFN- β mRNA 的表达降低($P < 0.01$),而金欣高剂量组和等效剂量组干预方式 III IFN- β mRNA 的表达升高($P < 0.01$);金欣高剂量组干预方式 I 及金欣等效剂量组的 3 种干预方式 SOCS1 蛋白表达明显降低,金欣高剂量组干预方式 III SOCS1 蛋白表达升高。与金欣高剂量组比较,金欣等效剂量组干预方式 I、II RSV-M mRNA 表达降低($P < 0.01$);金欣等效剂量组干预方式 I SOCS1 mRNA 表达降低($P < 0.01$);金欣等效剂量组干预方式 I IFN- β mRNA 的表达降低($P < 0.01$),但干预方式 II、III IFN- β mRNA 的表达升高(均 $P < 0.01$);金欣等效剂量组 3 种干预方式 SOCS1 蛋白表达降低。**结论** 金欣口服液等效剂量组在不同时间点均能抑制 RSV 感染 BALB/c 小鼠肺组织中 SOCS1 的表达,该调控作用可能与促进 I 型干扰素表达从而发挥抗 RSV 作用有一定关系。

关键词 金欣口服液;呼吸道合胞病毒;Toll 样受体 3;细胞因子信号传导抑制因子 1

Regulation of Jinxin Oral Liquid for the Expression of Negative Regulatory Factor of TLR3 Signaling Pathway SOCS1 in RSV Infected BALB/c Mice CHEN Zheng-guang, WANG Shou-chuan, XU Jian-ya, and DAI Qi-gang Research Institution of Chinese Medical Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease Nanjing (210029), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the regulation trend of Jinxin Oral Liquid (JXOL) on the expression of negative regulatory factor of TLR3 signaling pathway SOCS1 in the lung tissue of RSV infected BALB/c mice at different time points. **Methods** Totally 75 BALB/c mice were randomly divided into 5 groups, i.e., the normal control group, the model group, the ribavirin group, the high dose JXOL group, and the equivalent dose JXOL group, 15 in each group. Each group had 3 intervention ways (I, II, and III) with 5 mice treated in each group. BALB/c mice were nasally infected with respiratory syncytial virus (RSV), and treated by different intervention ways. After intervention, mice were killed and their lung tissues were sampled. mRNA expression levels of RSV-M, SOCS1, and IFN- β were detected by Real time PCR. The expression of SOCS1 at the protein level was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the mRNA expression level of SOCS1 and IFN- β , and the protein expres-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072840)

作者单位:南京中医药大学中医儿科研究所江苏江苏省儿童呼吸病(中医药)重点实验室(南京 210029)

通讯作者:汪受传, Tel: 025-86798182, E-mail: wscnj@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.12.1499

sion level of SOCS1 increased significantly in the model group intervened by intervention I and II (all $P < 0.01$), but the mRNA expression level of IFN- β decreased significantly in model group intervened by intervention III ($P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression level of RSV-M all significantly decreased in the high dose JXOL group and the equivalent dose JXOL group intervened by 3 intervention ways (all $P < 0.01$). The mRNA expression level of SOCS1 significantly decreased in the high dose JXOL group intervened by intervention I and III and the equivalent dose JXOL group intervened by 3 intervention ways (all $P < 0.01$). The mRNA expression level of IFN- β significantly decreased in the high dose JXOL group intervened by intervention I and II and the equivalent dose JXOL group intervened by intervention I (all $P < 0.01$), while it significantly increased in the high dose JXOL group intervened by intervention III and the equivalent dose JXOL group intervened by intervention III (all $P < 0.01$). The protein expression level of SOCS1 significantly decreased in the high dose JXOL group intervened by intervention I and the equivalent dose JXOL group intervened by 3 intervention ways (all $P < 0.01$), while it significantly increased in the high dose JXOL group intervened by intervention III (all $P < 0.01$). Compared with the high dose JXOL group, the mRNA expression level of RSV-M decreased significantly in the equivalent dose JXOL group intervened by intervention I and II ($P < 0.01$). The mRNA expression level of SOCS1 and IFN- β decreased significantly in the equivalent dose JXOL group intervened by intervention I ($P < 0.01$), but the mRNA expression level of IFN- β increased significantly in the equivalent dose JXOL group intervened by intervention II and III (all $P < 0.01$). The protein expression level of SOCS1 decreased significantly in the equivalent dose JXOL group intervened by 3 intervention ways (all $P < 0.01$). Conclusions JXOL could inhibit the expression of SOCS1 in the lung tissue of RSV infected BALB/c mice at different time points. Its regulatory effect might be associated with promoting the expression of interferon type I and further fighting against RSV.

KEYWORDS Jinxin Oral Liquid; respiratory syncytial virus; Toll-like receptor 3; suppressor of cytokine signaling 1

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)为副黏液病毒科肺炎病毒属,具有包膜非片段性的单股负链 RNA 病毒,RSV 基因组共编码 11 种蛋白质,包括:融合性 F 蛋白、吸附性 G 蛋白、小疏水性 SH 蛋白、核衣壳相关蛋白 N、P 和 L,基质蛋白 M (RSV-M)和 M2,非结构蛋白 NS1 和 NS2^[1]。RSV 是引起婴幼儿和老年人下呼吸道感染的主要病原,也是婴幼儿住院的首要原因,临床上主要表现为毛细支气管炎和支气管肺炎^[2],并与哮喘密切相关^[3]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是模式识别受体之一,是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,通过诱导宿主细胞转录 IFN 并激活抗病毒反应^[4,5]。目前,研究发现 TLRs 信号通路在抗 RSV 感染过程中发挥着一定作用^[6]。细胞因子信号传导抑制因子 1(suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)是一种重要的细胞因子信号转导的负调节因子,在调节宿主天然免疫反应和炎症反应方面有着重要作用,研究发现 SOCS1 能够多途径抑制 TLR3 信号转导通路从而调节宿主的抗病毒的作用,其重要机制是抑制 JAK/细

胞信号转录与激活(JAK/STAT),调节 IFN 等细胞因子介导的信号级联反应,避免过度的炎症反应对机体造成的损伤^[7,8]。

金欣口服液(原名清肺口服液)是南京中医药大学汪受传教授根据《伤寒论》“麻黄杏仁甘草石膏汤”加减而成,通过长期临床使用验证和临床研究证实该方治疗 RSV 肺炎具有显著疗效^[9]。本课题组前期实验研究也表明该方通过抑制 RSV 病毒融合、入侵 Hep-2 细胞,从而发挥抑制病毒对宿主细胞的侵袭^[10];抑制人胚肺成纤维细胞钙离子内流,从而抑制 RSV 感染细胞的凋亡^[11];并可以通过上调 RSV 感染人胚肺成纤维细胞 Bcl-2, Bax 等凋亡相关基因拮抗其抑制细胞凋亡的作用,从而影响进入细胞内病毒复制、增殖的过程,阻止病毒扩散^[12];调节大鼠体内 I 型干扰素的表达^[13]等发挥抗病毒作用。本实验从金欣口服液对 TLR3 信号转导通路负性调节因子 SOCS1 表达调控入手,进一步阐释金欣口服液的抗病毒机制。

材料与方法

1 动物与病毒 75 只 BALB/c 小鼠,雌性,6 ~

8 周龄,体重 18~22 g,SPF 级,扬州医学院比较实验研究中心提供,许可证号:SCXK(苏)2012-0004。RSV A 型 Long 株由武汉大学国家典型培养物保藏中心提供。

2 药物与试剂 利巴韦林颗粒:50 mg/包,四川百利药业有限责任公司,批号:080335。金欣口服液(原名:清肺口服液):炙麻黄、虎杖、苦杏仁、桑白皮、生石膏、前胡、黄芩、葶苈子组成,经江苏省植物药深加工工程中心制备和质控,含生药 1.351 g/mL。RNA iso plus 试剂盒:TAKARA 大连宝生物公司。RIPA 裂解液(强):碧云天生物科技研究所。逆转录试剂盒,TAKARA 大连宝生物公司。聚偏氟乙烯膜(Polyvinylidene Fluoride,PVDF 膜/0.45 μm),美国 Millipore 公司。实时荧光定量 PCR 试剂盒,TAKARA 大连宝生物公司。PMSF(苯甲基磺酰氟):碧云天生物科技研究所。兔抗 SOCS1 多克隆抗体,美国 Abcam 公司。抗 β -actin 抗体,美国 Abcam 公司。羊抗兔荧光二抗,美国 Abcam 公司。BCA 蛋白定量试剂盒,美国 Thermo 公司。Protein Marker(10~170KD)(预染蛋白分子量标准),生兴生物技术(南京)有限公司。ECL Western Blotting Substrate,美国 Thermo 公司。5 $\times$ Sample loading buffer(上样缓冲液),生兴生物技术(南京)有限公司。1:29 bis-Acr、10% SDS、APS,美国 Bio-Rad 公司。TRIS、Glycine(甘氨酸),北京索莱宝公司。脱脂奶粉,内蒙古伊利实业集团股份有限公司。BSA,美国 Sigma 公司。

3 仪器 实时荧光定量 PCR 仪,ABI7500 荧光定量 PCR 仪,美国 AB 公司;蛋白核酸分析仪,Bio-Photometer,德国 Eppendorf 公司;ImageQuant LAS4000 mini 超灵敏化学发光成像仪,美国 GE 公司。酶标仪,EXL800 型,美国 BioTek 公司;Trans-Blot-SD 半干转印槽,美国 Bio-Rad 公司;面包式离心机,德国 Eppendorf 公司;垂直电泳仪,PowerPac Basic,美国 Bio-Rad 公司;大容量高速冷冻离心机,5810R,德国 Eppendorf 公司。

4 病毒扩增与滴度测定 RSV 在 Hep-2 细胞中扩增,扩增后反复冻融 3 次制备成 RSV 悬液,通过 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀,本研究使用的 RSV-A 亚型(Long 株)TCID₅₀为 $10^{-4.385}/50 \mu\text{L}$ 。

5 分组及模型制备 将 75 只小鼠随机分为正常组、模型组、利巴韦林组、金欣高剂量组和金欣等效剂量组,每组 15 只。根据文献报道[14,15]制作 RSV 肺炎的动物模型,取乙醚 10 mL 倒入垫有脱脂

棉的广口瓶中,除正常组的其他各组小鼠放入广口瓶 30~60 s,观察小鼠无明显活动时将其快速取出,吸取 100 TCID₅₀ 的 RSV 悬液双侧鼻腔滴注,每侧鼻腔 25 μL ;正常组采用同种方法,给予等量的 DMEM 培养基。每日予小鼠称重、测体温,观察小鼠进食、活动和精神状况。造模成功标志:RSV 滴鼻后 24 h 即出现体温增高、进食减少、活动减少、精神萎靡等。

6 干预措施 参照文献报道[16]换算小鼠给药剂量,金欣等效剂量组为 27.6 g/(kg $\cdot$ d),相当于 2 岁儿童临床等效剂量;金欣高剂量组为 138 g/(kg $\cdot$ d)(相当于 2 岁儿童临床等效剂量 5 倍);利巴韦林组为 27.6 mg/(kg $\cdot$ d)(相当于 2 岁儿童临床等效剂量),正常组和模型组予同体积的生理盐水。每只小鼠每天灌胃给药 2 次,每次 0.2 mL/10 g。

每组分 I、II、III 3 种干预方式,每种干预方式 5 只小鼠。具体为:干预方式 I:正常组小鼠予 DMEM 滴鼻,每次滴鼻后 2 h 予生理盐水灌胃;模型组小鼠予 RSV 滴鼻,每次滴鼻后 2 h 予生理盐水灌胃;金欣高剂量、等效剂量组小鼠予 RSV 滴鼻,每次滴鼻后 2 h 予高剂量、等效剂量金欣口服液灌胃;利巴韦林组小鼠予 RSV 滴鼻,每次滴鼻后 2 h 予利巴韦林灌胃;滴鼻每天 1 次,灌胃给药每天 2 次,每次 0.2 mL/10 g,共进行 1 天。滴鼻后第 2 天处死取样本。干预方式 II:前 2 天处理方式同干预方式 I 滴鼻及灌胃给药,第 3 天正常组及模型组给予生理盐水灌胃,金欣高剂量、等效剂量组给予高剂量、等效剂量金欣口服液灌胃,利巴韦林组给予利巴韦林灌胃,每天 2 次。第 4 天处死小鼠取样本。干预方式 III:前 2 天处理方式同干预方式 I 滴鼻及灌胃给药,第 3~5 天正常组及模型组给予生理盐水灌胃,金欣高剂量、等效剂量组给予高剂量、等效剂量金欣口服液灌胃,利巴韦林组给予利巴韦林灌胃,每天 2 次。第 6 天处死小鼠取样本。动物实验过程中,模型组在干预方式 III 时有 1 只小鼠于第 5 天死亡,经解剖分析怀疑死于肺部的严重感染,其他实验组未见死亡。实验检测时,每干预方式按实验动物编号随机选取 3 个样本用来检测。

7 肺组织病理 剖取小鼠心后叶,4%多聚甲醛溶液固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片,HE 染色,由病理专业人员在光学显微镜下阅片。检查:(1)肺泡壁有无充血、水肿、炎细胞浸润,肺泡腔内有无水肿液,炎细胞渗出,(2)肺内支气管有无上皮细胞变性、坏死,管腔内有无渗出物等病变,支气管周围有无炎细胞浸润及浸润的炎细胞种类,(3)其他病变,如气肿等。根据病变由轻到重的程度标记为 0 分(基本正

常),0.5 分(轻微),1 分(轻度),2 分(中度),3 分(重度),累加所有分数,并计算出均分^[17]。

8 Real-time PCR 法检测小鼠肺组织目标分子 mRNA 表达情况 将肺组织放入液氮预冷的研钵内研末,肺组织每 100 mg 加入 RNA iso plus 1 mL,并按照试剂盒说明书提取总 RNA,蛋白核酸分析仪对 RNA 进行质量分析,按照 RT-PCR 试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA,SYBR Green II 实时荧光定量 PCR 法检测目标基因 mRNA 转录水平。引物由上海生工生物技术有限公司合成,见表 1。实时荧光定量 PCR 反应条件(采用两步法):95 ℃ 预变性 15 s,95 ℃ 变性 5 s,58 ℃ 退火 34 s,设置 40 个循环,同时做熔解曲线。以上实验独立重复 3 次。Real time RT-PCR 实验数据采用 2^{-ΔΔCt} 方法^[18] 进行计算,ΔΔCt=(Ct 样本-Ct 内参)_{实验组}-(Ct 样本-Ct 内参)_{对照组}。

9 Western blotting 法检测小鼠肺组织目标蛋白分子表达情况 将肺组织放入液氮预冷的研钵内研末,按照肺组织每 100 mg 加入 500 μL RIPA 及 5 μL PMSF,冰浴中超声匀浆至澄清,4 ℃,15 000 r/min

离心 30 min,取上清即为总蛋白。使用 BCA 法蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。根据总蛋白浓度,加入上样缓冲液,97 ℃ 变性 5 min。SDS-PAGE 凝胶电泳(80 V,30 min;100 V,1 h);半干转膜(25 V,10 min);洗膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h;洗膜,1β:1000 一抗孵育,4 ℃,过夜;洗膜,1:5 000 二抗孵育,室温,2 h;洗膜,ECL Western Blotting Substrate 显色;imageQuant LAS4000 mini 超灵敏化学发光成像仪成像。Western blotting 实验结果采用 Photoshop 软件进行灰度值计算。

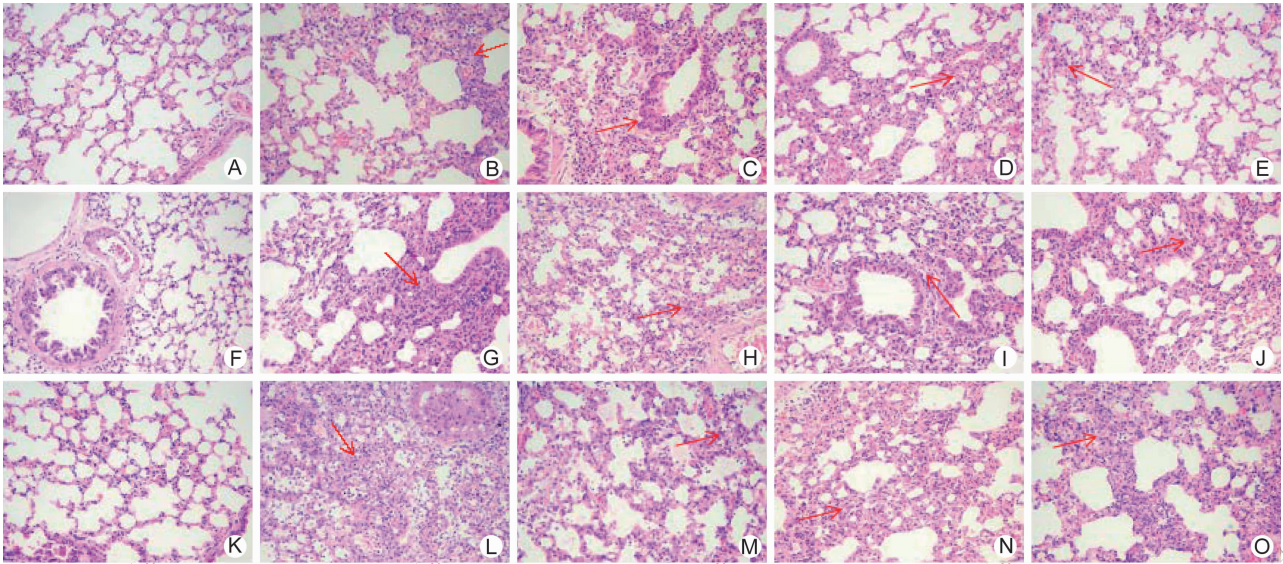
10 统计学方法 数据处理采用 EXCEL 和 SPSS 15.0 统计软件。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组肺组织病理结果比较(图 1,表 2) RSV 感染 BALB/c 小鼠后初期,肺组织内病变主要位于间质,表现为肺泡壁增厚、充血,有中等量中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润,局部肺泡有轻度或中度代偿性肺

表 1 目标基因引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物长度(bp)
TLR3	TGGAAACATACGTGAACAAGC	TGGCCGCTGAGTTTTGTTC	137
SOCS1	GTGAGATGCCTCCCACTTCT	CACAAGCTGCTACAACCAGG	108
IFN-β	CTGCGTTCCTGCTGTGCTTC	CGCCCTGTAGGTGAGGTTGAT	219
GAPDH	CGT GTT CCT ACC CCC AAT GT	TGT CAT ACT TGG CAG GTT TCT	178



注:A、F、K 为正常组,B、G、L 为模型组,C、H、M 为利巴韦林组,D、I、N 为金欣高剂量组,E、J、O 为金欣等效剂量组;A~E 为干预方式 I,F~J 为干预方式 II,K~O 为干预方式 III;箭头所指为典型变化处

图 1 各组小鼠不同干预方式肺组织病理图 (HE,×200)

性肺气肿,随着感染时间的推移,肺间质病变加重,同时炎症累及肺泡及小支气管,肺泡内及支气管腔可见明显坏死脱落的上皮细胞及炎性渗出物,特别是干预方式Ⅲ表现尤为明显。在病变程度评分上,与正常组比较,模型组 3 种干预方式评分均明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,利巴韦林组干预方式Ⅲ和金欣口服液各剂量组的 3 种干预方式均可改善肺部炎症,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组肺组织病变程度比较 (分, $\bar{x} \pm s$)			
组别	干预方式	<i>n</i>	病理组织评分
正常	I	3	0.70 ± 0.67 **
	II	3	1.70 ± 1.20 **
	III	3	1.50 ± 1.17 **
模型	I	3	3.60 ± 1.52
	II	3	4.90 ± 1.14
	III	3	6.80 ± 0.87
利巴韦林	I	3	3.00 ± 1.58
	II	3	4.20 ± 1.75
	III	3	5.30 ± 0.97 *
金欣高剂量	I	3	1.70 ± 0.76 *
	II	3	2.50 ± 1.00 **
	III	3	4.30 ± 1.64 *
金欣等效剂量	I	3	1.60 ± 0.42 *
	II	3	3.30 ± 0.97 *
	III	3	5.00 ± 0.61 **

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2 各组肺组织内 RSV-M mRNA 表达结果比较 (表 3) RSV-M mRNA 方面,与模型组相同干预方式比较,利巴韦林组、金欣高、等效剂量组 3 种干预方式均可降低 RSV-M mRNA 表达,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$);与利巴韦林组相同干预方式比较,金欣高剂量组干预方式 I、II 及金欣等效剂量组干预方式 II RSV-M mRNA 表达降低,而金欣高、等效剂量组干预方式 III RSV-M mRNA 表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与金欣高剂量组同种干预方式比较,金欣等效剂量组干预方式 I、II RSV-M mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 各组肺组织内 SOCS1 mRNA 表达结果比较 (表 3) SOCS1 mRNA 方面,与正常组相同干预方式比较,模型组干预方式 I、II SOCS1 mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与模型组相同干预方式比较,利巴韦林组和金欣高剂量组干预方式 I、III 及金欣等效剂量组 3 种干预方式 SOCS1 mRNA 的表达降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与利巴韦林组相同干预方式比较,金欣高剂量

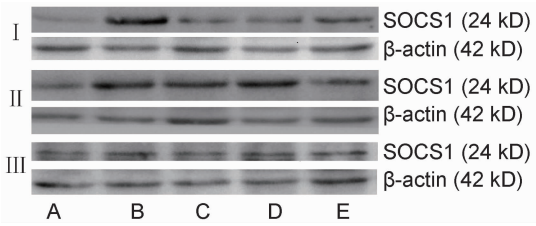
组干预方式 I SOCS1 mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),但金欣等效剂量组干预方式 I SOCS1 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与金欣高剂量组比较,金欣等效剂量组干预方式 I SOCS1 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

4 各组肺组织内 IFN-β mRNA 表达结果比较 (表 3) IFN-β mRNA 方面,与正常组相同干预方式比较,模型组干预方式 I、II IFN-β mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),但模型组干预方式 III IFN-β mRNA 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相同干预方式比较,利巴韦林组和金欣高剂量组干预方式 I、II 及金欣等效剂量组干预方式 I IFN-β mRNA 的表达降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),而金欣高剂量组和等效剂量组干预方式 III IFN-β mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与利巴韦林组相同干预方式比较,金欣高剂量组 3 种干预方式和金欣等效剂量组干预方式 II、III IFN-β mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),但金欣等效剂量组干预方式 I IFN-β mRNA 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与金欣高剂量组相比,金欣等效剂量组干预方式 I IFN-β mRNA 的表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),但金欣等效剂量组干预方式 II、III IFN-β mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠肺组织内 RSV-M、SOCS1 和 IFN-β mRNA 的表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	干预方式	<i>n</i>	RSV-M mRNA 相对表达量	SOCS1 mRNA 相对表达量	IFN-β mRNA 相对表达量
正常	I	3	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	II	3	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
	III	3	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	I	3	1.00 ± 0.00	11.68 ± 0.85 *	84.81 ± 0.92 *
	II	3	1.00 ± 0.00	2.75 ± 0.20 *	1.57 ± 0.12 *
	III	3	1.00 ± 0.00	0.92 ± 0.04	0.17 ± 0.01 *
利巴韦林	I	3	0.72 ± 0.03 [△]	6.84 ± 0.40 [△]	35.18 ± 0.73 [△]
	II	3	0.16 ± 0.01 [△]	2.60 ± 0.15	0.26 ± 0.02 [△]
	III	3	0.83 ± 0.04 [△]	0.66 ± 0.07 [△]	0.22 ± 0.01
金欣高剂量	I	3	0.89 ± 0.04 ^{△▲}	9.17 ± 0.13 ^{△▲}	58.42 ± 0.40 ^{△▲}
	II	3	0.45 ± 0.01 ^{△▲}	2.41 ± 0.29	1.01 ± 0.10 ^{△▲}
	III	3	0.48 ± 0.05 ^{△▲}	0.62 ± 0.04 [△]	0.45 ± 0.04 ^{△▲}
金欣等效剂量	I	3	0.74 ± 0.01 ^{△○}	5.86 ± 0.67 ^{△▲○}	24.93 ± 0.67 ^{△▲○}
	II	3	0.26 ± 0.01 ^{△○}	2.01 ± 0.28 [△]	1.44 ± 0.08 ^{△○}
	III	3	0.55 ± 0.04 ^{△▲}	0.69 ± 0.08 [△]	0.52 ± 0.06 ^{△▲○}

注:与正常组同种干预方式比较,* $P < 0.01$;与模型组同种干预方式比较,△ $P < 0.01$;与利巴韦林组同种干预方式比较,▲ $P < 0.01$;与金欣高剂量组同种干预方式比较,○ $P < 0.01$

5 各组肺组织内 SOCS1 蛋白表达水平比较(图 2,表 4) 与正常组相同干预方式比较,模型组干预方式 I、II SOCS1 蛋白表达明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);与模型组相同干预方式比较,利巴韦林组干预方式 I、II、金欣高剂量组干预方式 I 及金欣等效剂量组的 3 种干预方式 SOCS1 蛋白表达明显降低,利巴韦林组及金欣高剂量组干预方式 III SOCS1 蛋白表达升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与利巴韦林组比较,金欣等效剂量组干预方式 I、II 及金欣高剂量组干预方式 I、III SOCS1 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与金欣高剂量组比较,金欣等效剂量组 3 种干预方式 SOCS1 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为利巴韦林组;D 为金欣高剂量组;E 为金欣等效剂量组

图2 各组小鼠肺组织内 SOCS1 蛋白表达的显影图

表 4 各组小鼠肺组织内 SOCS1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	干预方式	n	SOCS1/β-actin
正常	I	3	0.88 ± 0.02
	II	3	1.09 ± 0.01
	III	3	0.70 ± 0.01
模型	I	3	2.41 ± 0.07 *
	II	3	1.62 ± 0.12 *
	III	3	0.77 ± 0.02
利巴韦林	I	3	0.88 ± 0.03 △
	II	3	1.06 ± 0.03 △
	III	3	0.82 ± 0.01 △
金欣高剂量	I	3	1.41 ± 0.11 ▲▲▲
	II	3	1.63 ± 0.05
	III	3	0.94 ± 0.02 ▲▲▲
金欣等效剂量	I	3	1.01 ± 0.08 ▲▲○
	II	3	1.18 ± 0.05 ▲▲○
	III	3	0.64 ± 0.03 △○

注:与正常组同种干预方式比较,* $P < 0.01$;与模型组同种干预方式比较,△ $P < 0.01$;与利巴韦林组同种干预方式比较,▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$;与金欣高剂量组同种干预方式比较,○ $P < 0.01$

讨 论

金欣口服液是我国著名中医儿科专家汪受传教授结合临床经验在麻黄杏仁甘草石膏汤的基础上加减而

成,由炙麻黄、杏仁、生石膏、桑白皮、葶苈子、前胡、虎杖、黄芩组成。炙麻黄辛温,开宣肺气以平喘、开腠解表以散邪;生石膏清辛甘大寒,清泻肺热以生津、辛散解肌以透邪;杏仁味苦,降利肺气而平喘咳;加前胡宣肺止咳、桑白皮肃肺平喘、葶苈子泻肺涤痰、虎杖解毒活血、黄芩清肺解毒,诸药相合具有宣肺开闭、清热解毒、化痰止咳之功效。本方经过临床观察和实验研究证实在治疗小儿 RSV 肺炎方面具有显著疗效^[9-13]。

SOCS 蛋白家族是一类由细胞产生并反馈性阻断细胞因子信号转导过程的负性调节因子,由 8 个成员组成:CIS 和 SOCS 1-7^[19]。SOCS 蛋白家族成员在结构上有相似性,均含有一个保守的 Src 同源序列 SH2,在 C 端含有一个稀有的羧基模序,成为 SOCS 框(SOCS box)^[21]。SOCS1 是 SOCS 蛋白家族的重要成员,是炎症反应的重要负调控因子^[19]。目前研究认为 SOCS1 通过以下 4 种方式对细胞因子信号通路进行调节:(1)通过其 SH2 结构域与靶蛋白磷酸化的酪氨酸残基结合,使 JAK 激酶的 N 末端失活而抑制信号转到;(2)SOCS1 的 N 末端含有激酶抑制区(KIR),可直接抑制 JAK 酪氨酸激酶的活性;(3)SOCS1 启动子含有 STAT 的结合位点,从而可抑制 STAT 与受体位点的结合;(4)通过 SOCS 盒可与 elonginB、elonginC、cullin-5 和 RING-box-2(RBX2)相互作用,募集 E₂ 泛素转移酶,进而促进所结合蛋白通过蛋白酶体依赖途径而降解^[20,21]。

SOCS1 多位点负调控 TLRs,SOCS1 能够靶向结合 Mal 并使其泛素化降解,从而直接调控 TLR2、TLR3 和 TLR4 介导的信号通路^[22];SOCS1 对 TLR3 通路的负调控,主要通过对 IRF3 的泛素化降解实现^[7,8]。

RSV 感染 BALB/c 小鼠后,在病毒 F 蛋白和病毒复制过程中产生的 dsRNA 刺激下,经过 TLRs 信号通路产生的 I 型干扰素(IFN-α/IFN-β)与细胞表面的细胞因子受体结合,激活 JAK-STAT 信号转导通路引起抗病毒的蛋白和细胞因子表达,发挥抗病毒作用。而细胞因子激活 SOCS 家族通过阻断 JAK-STAT 信号激活抑制抗病毒蛋白的表达^[20,21]。

通过肺组织病理结果可知,RSV 感染小鼠后可引起肺间质充血、水肿以及炎症细胞的浸润,而随着时间的延长其病理变化逐渐加重;金欣口服液具有明显的抗炎作用。测定 RSV 的基质蛋白 M 基因 mRNA 的表达情况,证实 RSV 感染的小鼠模型造模成功,并测定不同时间点 RSV-M mRNA,证实利巴韦林和金欣口服液不同剂量均有明显的抗病毒作用。RSV 感染 BALB/c 小鼠后,其肺组织中 SOCS1 的表达显著上调,但随着

时间推移,其表达水平逐渐下降,5d 后基本恢复至正常水平。RSV 感染 1d 后,利巴韦林和金欣不同剂量组均能够降低 SOCS1 的表达,与利巴韦林组和金欣高剂量组相比,金欣等效剂量组能够显著降低 SOCS1 的高表达;RSV 感染 3 天后,SOCS1 的表达仍显著增加,但与 RSV 感染后 1 天相比其表达量明显降低;利巴韦林组和金欣高剂量组对其高表达有一定下调作用,但无统计学意义,但在蛋白水平上,利巴韦林组对其高表达有显著下调作用;金欣等效剂量对 SOCS1 的高表达有显著下调作用。RSV 感染后 5 天,SOCS1 表达量基本降至正常水平,在 mRNA 水平,利巴韦林和金欣不同剂量组均可显著下调 SOCS1 的表达;在蛋白水平上,利巴韦林和金欣高剂量能上调 SOCS1 的表达量,但金欣等效剂量组能够下调 SOCS1 的表达。这种 mRNA 水平和蛋白水平的表达不一致,可能与转录后调节有关,其具体机制有待进一步研究。

RSV 感染 BALB/c 小鼠后,其肺组织中 IFN- β mRNA 的表达随着时间推移,呈先增高后降低的趋势,5 天后下降至正常水平以下。RSV 感染 BALB/c 小鼠 1 天后 IFN- β mRNA 呈明显高表达,利巴韦林和金欣不同剂量组均可显著降低这种高表达,其中金欣等效剂量组尤明显。RSV 感染 BALB/c 小鼠 3 天后 IFN- β mRNA 仍呈高表达,但与 RSV 感染后 1 天相比表达明显下降,利巴韦林和金欣高剂量组均可显著下调 RSV 诱导的高表达,但金欣等效剂量组下调作用不明显。RSV 感染 BALB/c 小鼠 5 天后 IFN- β mRNA 呈低表达,利巴韦林对 RSV 诱导的 IFN- β mRNA 低表达无明显调节作用,但金欣不同剂量组对 IFN- β mRNA 低表达有显著上调作用,金欣等效剂量组尤明显。

通过以上研究表明,RSV 感染初期,由于病毒激活 TLR3 导致 IFN- β 的高表达,但同时由于炎症因子的高表达诱导了 SOCS1 的高表达以防止炎症因子的过度表达造成的炎症损伤。利巴韦林和金欣口服液均能抑制 SOCS1 的高表达,从而减轻 SOCS1 对 IFN- β 抗病毒效应的抑制。在 RSV 感染后期,金欣口服液又能进一步降低 SOCS1,从而促使 IFN- β 的表达。但 RSV 感染早期,尽管利巴韦林和金欣口服液不同剂量组均下调了 SOCS1 的下调,但 IFN- β 表达量也有明显降低,这两者的表达趋势不一致,可能宿主机体对炎症因子的调控还存在其他途径,有待进一步研究。

综上所述,由于 SOCS1 能够抑制 TLR3 信号转导通路的活化,而金欣口服液等效剂量组对 SOCS1 的调控呈现下调的趋势,因此,金欣口服液的该调控作用可能与稳定调节干扰素表达有关,通过该调节效应

可以促进 I 型干扰素的稳定表达从而产生抗病毒作用。

参 考 文 献

- [1] Collins PL, Murphy BR. New generation live vaccines against human respiratory syncytial virus designed by reverse genetics[J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, 2(2): 166-173.
- [2] 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.
- [3] Hansbro NG, Horvat JC, Wark PA, et al. Understanding the mechanisms of viral induced asthma: New therapeutic direction[J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(3): 313-353.
- [4] Eisenbarth SC, Flavell RA. Innate instruction of adaptive immunity revisited: the inflammasome[J]. EMBO Mol Med, 2009, 1(2): 92-98.
- [5] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675-680.
- [6] 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.
- [7] Pothlicher J, Chiquard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-1/IFNAR1-dependent pathway[J]. J Immunol, 2008, 180(4): 2034-2038.
- [8] Saito T, Tun-Kyi A, Ryo A, et al. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1[J]. Nat Immunol, 2006, 7(6): 598-605.
- [9] 汪受传,韩新民,任现志,等.小儿病毒性肺炎痰热闭肺证治疗方法研究[J].南京中医药大学学报,2004,20(2): 72-75.
- [10] 廖辉,汪受传,徐建亚,等.金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒黏附、膜融合影响的实验研究[J].实用中西医结合临床,2008,8(1): 3-4.
- [11] 陈彩霞,汪受传.金欣口服液对呼吸道合胞病毒感染人胚肺成纤维细胞胞内钙离子的影响[J].江西中医学院学报,2009,21(2): 52-54.
- [12] 赵霞,汪受传,胡钰,等.金欣口服液含药血清对呼吸道合胞病毒感染细胞早期凋亡的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(2): 225-227.
- [13] 赵霞,汪受传,张沛,等.金欣口服液对呼吸道合胞病毒感染大鼠 I 型干扰素表达的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(7): 1508-1510.

- (收稿:2013-07-31 修回:2014-09-01)

中国中西医结合学会大肠肛门病专业委员会