

·数字中医药·

本文引用:王平,马元荣,张会敏.基于网络药理学及体内外实验研究连翘不同提取液抗RSV作用[J].湖南中医药大学学报,2022,42(7):1121-1128.

基于网络药理学及体内外实验研究连翘 不同提取液抗RSV作用

王平^{1,2},马元荣^{3*},张会敏¹

(1.山东省中医药研究院,山东 济南 250014;2.天津大学精密测试技术及仪器国家重点实验室,天津 300072;

3.山东省济南市长清区平安街道社区卫生服务中心,山东 济南 250300)

【摘要】目的 探讨连翘不同提取液体内外抑制呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)的药理效果。**方法** 运用网络药理学,预测连翘抗RSV作用的具体成分以及可能的作用通路。采用细胞病变效应结合MTT法,评价连翘不同提取液对RSV的抑制活性。鼻腔接种法建立RSV感染小鼠模型,随机分为6组,每组10只。正常组和模型组给予等体积的生理盐水;利巴韦林组给予利巴韦林溶液(4 mg/mL);高剂量组、中剂量组、低剂量组分别给予连翘煎煮离心液4、2、1 g/kg。连续给药5 d后,检测血常规、肺指数,HE染色法观察肺组织的病理变化,免疫组化法检测TLR4、NF- κ B p65及p38 MAPK的表达水平。**结果** 获取21个潜在活性成分,抗RSV作用靶点129个,富集548个生物过程及112条信号通路,涉及癌症中的蛋白多糖、HIF-1信号通路、TNF信号通路等。体外实验显示,连翘不同提取液对RSV感染的A549细胞有不同程度的抑制作用,抑制效果较强的是连翘煎煮离心液。体内实验显示,与正常组相比,模型组白细胞(white blood cell, WBC)、淋巴细胞(lymphocyte, LYM)、单核细胞(monocyte, MON)计数及肺指数显著升高($P<0.05$),中性粒细胞(neutrophil, NEU)计数下降($P<0.05$);与模型组相比,利巴韦林组、高剂量组、中剂量组、低剂量组WBC、LYM、MON计数明显下降($P<0.05$),NEU计数升高($P<0.05$),肺指数显著下降($P<0.05$);与利巴韦林组相比,中剂量组、低剂量组WBC、LYM、MON计数升高($P<0.05$),NEU计数下降($P<0.05$),高剂量组WBC、LYM计数升高($P<0.05$),高剂量组、中剂量组、低剂量组肺指数升高($P<0.05$);与高剂量组相比,低剂量组WBC、LYM计数升高($P<0.05$),NEU计数下降($P<0.05$)。HE染色显示模型组肺组织增生,大量炎性细胞浸润,利巴韦林组、低剂量组、中剂量组、高剂量组肺组织病理损伤得到明显改善。与正常组相比,模型组TLR4、NF- κ B p65、p38 MAPK平均光密度值升高($P<0.05$);与模型组相比,利巴韦林组、高剂量组TLR4、p38 MAPK及NF- κ B p65平均光密度值下降($P<0.05$),中剂量组TLR4、p38 MAPK平均光密度值下降($P<0.05$)。**结论** 连翘通过多成分、多靶点、多通路发挥抗RSV作用。在体外,连翘不同提取液对RSV均有抑制效果,在体内,连翘煎煮离心液对RSV引起的肺炎有明显治疗作用。

【关键词】 连翘;网络药理学;呼吸道合胞病毒;抗病毒;信号通路;实验验证

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.07.011

Anti-RSV effect of different extracts of Forsythia suspensa based on network pharmacology and in vitro and in vivo experiments

WANG Ping^{1,2}, MA Yuanrong^{3*}, ZHANG Huimin¹

(1. Shandong Institute of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250014, China; 2. State Key Laboratory of Precision

Testing Technology and Instruments of Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Ping'an Street Community Health

Service Center, Changqing District, Jinan City, Shandong Province, Jinan, Shandong 250300, China)

【收稿日期】2021-08-10

【基金项目】山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1310,2020CXGC010505-04);山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心项目(CYLXTCX2020-04);山东省自然科学基金项目(ZR2020MH386,ZR2019MH134);国家重点研发计划项目(2019YFE0117800);泰山学者项目(ts201511074)。

【第一作者】王平,女,博士研究生,研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药药理学研究。

【通信作者】*马元荣,女,硕士,主管药师,E-mail:mayuanrong@163.com。

[Abstract] Objective To investigate the pharmacological effects of different extracts of *Forsythia suspensa* on inhibiting respiratory syncytial virus (RSV) in vitro and in vivo. **Methods** The specific components and possible pathways of *Forsythia suspensa* anti-RSV were predicted by network pharmacology. The inhibitory activity of different extracts of *Forsythia suspensa* on RSV was evaluated by cytopathic effect combined with MTT method. The infection model of RSV was established by nasal inoculation, they were randomly divided into six groups, with 10 rats in each group. Normal group and model group were given an equal volume of normal saline; ribavirin group was given ribavirin solution (4 mg/mL); the high-dose, middle-dose and low-dose groups of *Forsythia suspensa* were given the decoction centrifugal liquid of *Forsythia suspensa* (4, 2, 1 g/kg). After 5 d of continuous administration, blood routine and lung index were measured; the pathological changes of lung tissue was observed by HE staining method; the expression levels of TLR4, NF- κ B p65 and p38 MAPK were detected by immunohistochemistry. **Results** A total of 21 potential active components were obtained, involving 129 key anti-RSV targets, which were enriched in 548 biological processes and 112 signaling pathways, including proteoglycans in cancer, HIF-1 signaling pathway, TNF signaling pathway etc. In vitro experiments showed that different extracts of *Forsythia suspensa* had different degrees of inhibition on RSV infected A549 cells, and the decoction centrifugal liquid of *Forsythia suspensa* had stronger inhibition effect. In vivo experiments showed, compared with the normal group, the white blood cell (WBC), lymphocyte (LYM), monocyte (MON) count and lung index in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), neutrophil (NEU) count was decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, the WBC, LYM, and MON count of ribavirin group, high-dose group, middle-dose group, and low-dose group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the NEU count was increased ($P < 0.05$), the lung index was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the ribavirin group, WBC, LYM, and MON count were increased in the middle-dose group and low-dose group, while NEU count was decreased ($P < 0.05$), WBC and LYM count were increased in the high-dose group ($P < 0.05$), the lung index of high-dose group, middle-dose group and low-dose group was increased ($P < 0.05$); compared with the high-dose group, the WBC and LYM count increased ($P < 0.05$), and the NEU count was decreased in the low-dose group ($P < 0.05$). HE staining showed that tissue of the lung in the model group proliferated and a large number of inflammatory cells infiltrated, the pathological damage of the lung tissue in the ribavirin group, the low-dose group, the middle-dose group and the high-dose group was significantly improved. Compared with the normal group, the average optical density of TLR4, NF- κ B p65, and p38 MAPK in the model group were increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the average optical density of TLR4, p38 MAPK and NF- κ B p65 in the ribavirin group and the high-dose group were decreased ($P < 0.05$), and the average optical density of TLR4 and p38 MAPK in the middle-dose group were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Forsythia suspensa* plays an anti-RSV role through multi-ingredients, multi-target and multi-channel, the different extracts of *Forsythia suspensa* can inhibit RSV in vitro, and the decoction centrifugal liquid of *Forsythia suspensa* has obvious treatment effect on pneumonia caused by RSV in vivo.

[Keywords] *Forsythia suspensa*; network pharmacology; respiratory syncytial virus; anti-virus; signaling pathway; experimental test

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV) 隶属副黏液病毒科肺炎病毒属^[1],是诱发婴幼儿、老年人及免疫功能低下者呼吸道感染常见的RNA病毒^[2-3]。感染发病率高,以不同程度的发热、咳嗽、咽痛及呼吸急促为常见临床症状^[4],若病情未得到及时有效的控制,极易发生哮喘、急性呼吸衰竭及心力衰竭,甚至死亡^[5-8]。临床对RSV患者常给予利巴韦林、干扰素治疗^[9],但上述药物疗效有限,常出现发热、过敏等不良反应^[10-11]。目前RSV感染的流行趋势依旧严峻,至今尚无安全有效的疫苗和特效的防治方法。

中药防控病毒性感染有着数千年的临床实践经验^[12],除了直接杀灭病毒、抑制病毒复制、阻止病毒

致细胞损伤外,还能减轻严重的炎症反应、加强机体对病毒的免疫应答,同时具有毒副作用少、药源丰富、价格低廉及抗毒谱广等优势^[13-15]。中药连翘为中医中广泛应用的一种清热药,无毒,安全性高^[16]。《中华人民共和国药典》记载,连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实^[17]。《本草图经》中记载,连翘味苦,性微寒,归肺、心、小肠经,具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效,主要的药效物质为连翘酯苷、挥发油、连翘苷等^[18]。田文静等^[19]发现连翘水提液抗RSV活性存在明显的量效关系,而且在不同感染时间给药都能产生抑制作用。借助网络药理学系统地预测连翘抗RSV的活性成分、潜在靶点、信号通路,并结合体内外实验对

连翘不同提取液抗 RSV 活性进行初步验证,获得在体内外都有较好抗 RSV 效果的连翘提取物,为研发高效抗病毒单体奠定基础。

1 材料

1.1 主要的仪器设备

CKX41 型倒置显微镜(奥特光学仪器有限公司);IL-161CT 型 CO₂ 培养箱(施都凯仪器设备有限公司);SB5200DTS 型超声波双频清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Allegra X-30R 型全能高速冷冻离心机(美国贝克库曼尔特有限公司);TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品及主要试剂

连翘经山东省中医药研究院生药教研室鉴定;利巴韦林(批号:J1202A,大连美仑生物技术有限公司)。

磷酸盐 PBS 缓冲盐溶液(批号:0025018)、胎牛血清(批号:1842926)、2% DMEM 维持液(批号:0021019)均购自以色列 Biological Industries 公司;胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号:20190430)、青霉素/链霉素混合液(批号:20181211)均购自北京索拉比奥科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号:20180715,天津市富宇精细化工有限公司);噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(批号:715F0522,北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 实验细胞与病毒

人肺癌细胞(A549)由山东省医学科学院基础所微生物室惠赠,于山东中医药大学病原微生物实验室传代后使用。

RSV 由山东省医学科学院基础所微生物室惠赠,-80℃保存于山东中医药大学病原微生物实验室。

1.4 实验动物

BALB/c 小鼠 60 只,SPF 级,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物许可证号为 SCXK(鲁)2019-0003。

2 方法

2.1 连翘抗 RSV 的机制研究^[20]

2.1.1 活性成分的筛选及成分靶点的收集 搜集 TCMS 数据库,以“连翘”为检索词,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%且药物相似性(drug likeness, DL)≥0.18 为条件,初步筛选出活性成分。

活性成分输入 Open Babel 数据库,将其结构转化为 SMILES,导入 Swiss TargetPrediction 数据库,设置物种为“Homo sapiens”,移除非人源、不规矩及重复靶点,将数据库中靶点与化合物进行模拟对接,选取结果 Probability>0.5 的靶点建立数据库。

2.1.2 RSV 靶点预测及网络图构建 以“RSV”为关键词,在 GeneCards、GenCLiP3 和 NCBI 中搜索,删除重复靶点,建立 RSV 靶点库。将活性成分-RSV 靶点导入 Cytoscape 3.8.2,构建网络图。

2.1.3 富集分析 将连翘抗 RSV 的作用靶点输入 DAVID 6.8 数据库,进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。

2.2 连翘不同提取液抗 RSV 的体外实验研究

2.2.1 供试品制备 煎煮液:精密称取样品,加 6 倍量水,回流提取 2 h,滤过,得到浓度为 2 g/mL 的溶液。超声液:精密称取样品,加 10 倍量水,超声处理 30 min,滤过,得到浓度为 2 g/mL 的溶液。煎煮/超声离心液:吸取适量煎煮液及超声液,8000 r/min,离心 10 min(离心半径 18 cm)。煎煮/超声过滤液:吸取适量煎煮液及超声液,用 0.22 μm 滤膜过滤。利巴韦林溶液:精密称取利巴韦林粉末,用 PBS 配制成最终浓度为 4 mg/mL 的溶液。

2.2.2 A549 细胞的复苏和培养 将液氮罐内冻存的 A549 细胞在 37℃水浴锅内晃动 1 min,使其快速融化。1000 r/min 离心 5 min(离心半径 16 cm),弃掉上清液。加适量的 10% DMEM 培养液,反复吹匀,取适量悬液,转入培养瓶,补加培养液至 12 mL。放置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养,细胞长成单层后,加 1 mL 0.25%的胰酶消化,1:3 传代。

2.2.3 RSV 扩增和保存 RSV 接种于 A549 单层细胞上,1 h 后,加入 12 mL 含 2%胎牛血清的 DMEM 维持液,恒温培养。实时观察细胞病变情况,待细胞病变出现 80%以上时,取出后离心,1000 r/min 离心 5 min(离心半径 16 cm),收集上清液,定量分装,-80℃保存,备用。

2.2.4 病毒毒力测定 病毒液用 2% DMEM 维持液 10 倍比稀释成 8 个不同浓度梯度,依次接种在 96 孔板内单层细胞上,纵向重复 6 孔,设两列细胞对照。培养 3 d,每日观察细胞病变情况。培养结束前 4 h,弃废液。加入 10 μL MTT 和 100 μL PBS,置于恒温培养箱 4 h。弃废液,加 200 μL DMSO,490 nm 波长检测 OD 值。根据 Reed-Muench 公式,计算病毒液半数感染剂量(TCID₅₀)。

2.2.5 细胞毒性测定 连翘不同提取液用 2%

DMEM 维持液从原始浓度开始 2 倍比稀释成 10 个梯度;分别接种于 96 孔板内,接种量为 50 μL /孔,重复 4 孔,同设 2 列空白对照;于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养,每日观察细胞病变情况,持续 3 d。弃掉废液,加 100 μL PBS 和 10 μL MTT,培养箱内培养 4 h;弃上清染液,加 200 μL DMSO,490 nm 测定 OD 值,采用 Reed-Muench 方法计算药物半数毒性浓度 (TC_{50})。

2.2.6 抗 RSV 毒性测定^[21] 将配比好的连翘不同提取液及阳性药利巴韦林横向接种,50 μL /孔,重复 4 孔;除空白对照外,每孔接种 50 μL 病毒液;每日观察细胞病变情况,3 d 后,加入 100 μL PBS 和 10 μL MTT,培养箱内培养 4 h;弃染液,加 200 μL DMSO,490 nm 波长检测 OD 值。用 Reed-Muench 方法计算半数有效浓度 (EC_{50}) 及治疗指数 (TI)。

2.3 连翘煎煮离心液抗 RSV 的体内实验研究

2.3.1 建立 RSV 感染模型及给药 采用健康 BALB/c 小鼠,雌雄各半,胎龄 14 d,体质量 10~12 g。小鼠随机分成 6 个组,每组 10 只,为正常组、模型组、利巴韦林组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。连翘临床用量为 6~15 g,按不同种属动物间的剂量换算公式: $Db=Da\times\frac{Rb}{Ra}\times\left(\frac{Wa}{Wb}\right)^{\frac{1}{3}}$ (注:式中 Db 为欲求算的 b 动物的 kg 体质量剂量, Da 是已知 a 动物的 kg 体质量剂量, Ra 、 Rb 为体型系数, Wa 、 Wb 是已知动物体质量),计算各组小鼠用药剂量。高剂量组、中剂量组、低剂量组给药剂量分别为 4、2、1 g/(kg·d)。

小鼠每侧鼻腔内滴入 35 μL 病毒液 (100 个 TCID_{50}),正常组小鼠滴入等量的 DMEM 维持液^[22],待小鼠完全吸入后放入笼中继续观察,连续滴鼻 3 d,1 次/d^[23]。

滴鼻 3 h 后,观察小鼠是否死亡,并灌胃给药 0.2 mL/15 g,1 次/d,正常组和模型组给予等体积的生理盐水^[21]。连续灌胃 5 d,期间观察并记录小鼠的精神、活动、饮食等情况。

2.3.2 血常规测定 眼眶取血,血液滴入加有 EDTA-2K 的 EP 管,检测白细胞 (white blood cell, WBC)、淋巴细胞 (lymphocyte count, LYM)、单核细胞 (monocyte, MON)、中性粒细胞 (neutrophil, NEU) 计数。

2.3.3 肺指数测定 取血结束后,脱颈法处死小鼠,摘取完整肺组织并称量,计算出肺指数。肺指数=肺质量/体质量。随后将肺组织处理,进行病理学检测。

2.3.4 病理观察 取相同大小同一位置的左肺,制备石蜡切片行 HE 染色,显微镜观察肺部病变情况

并拍照记录。

2.3.5 肺组织免疫组化检测 石蜡切片行 DAB 染色,脱水封片,置于显微镜下镜检,计算平均光密度值。

2.3.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。多组之间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 连翘抗 RSV 的机制研究

筛选出 21 个活性成分,抗 RSV 潜在作用靶点 129 个,详见图 1。GO 分析得到 548 个条目,连翘参与的生物过程主要有基因表达的正调控、凋亡过程的负调控、药物的反应、DNA 模板转录的正向调节等;在细胞成分中,主要涉及胞质溶胶、质膜部分等;分子功能主要包括酶结合、转录因子结合等,详见图 2。KEGG 分析筛选出作用通路共 112 条,有癌症通路、癌症中的蛋白多糖、乙型肝炎、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路等相关通路,详见图 3。

3.2 连翘不同提取液抗 RSV 的体外实验研究

3.2.1 RSV 半数感染剂量 (TCID_{50}) 培养 72 h,根据病毒所致 A549 细胞病变情况,计算出 RSV 的 TCID_{50} 为 $10^{-3.77}$ 。

3.2.2 连翘不同提取液对 RSV 的抑制作用 体外连翘不同提取液抗 RSV 效果:煎煮离心液>超声离心液,超声液、煎煮液较前两者略差。详见表 1。

3.3 连翘煎煮离心液抗 RSV 的体内实验研究

3.3.1 各组小鼠血常规水平比较 与正常组相比,模型组 WBC、LYM、MON 计数升高,NEU 计数下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与模型组相比,利巴韦林组、高剂量组、中剂量组、低剂量组 WBC、LYM、MON 计数明显下降,NEU 计数升高,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与利巴韦林组相比,中剂量组、低剂量组 WBC、LYM、MON 计数升高,NEU 计数下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),高剂量组 WBC、LYM 计数升高,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与高剂量组相比,低剂量组 WBC、LYM 计数升高,NEU 计数下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。详见表 2。

3.3.2 各组小鼠肺指数比较 与正常组相比,模型组肺指数升高 ($P<0.05$),说明造模成功。与模型组相比,利巴韦林组、高剂量组、中剂量组、低剂量组肺指数下降 ($P<0.05$);与利巴韦林组相比,高剂量组、中

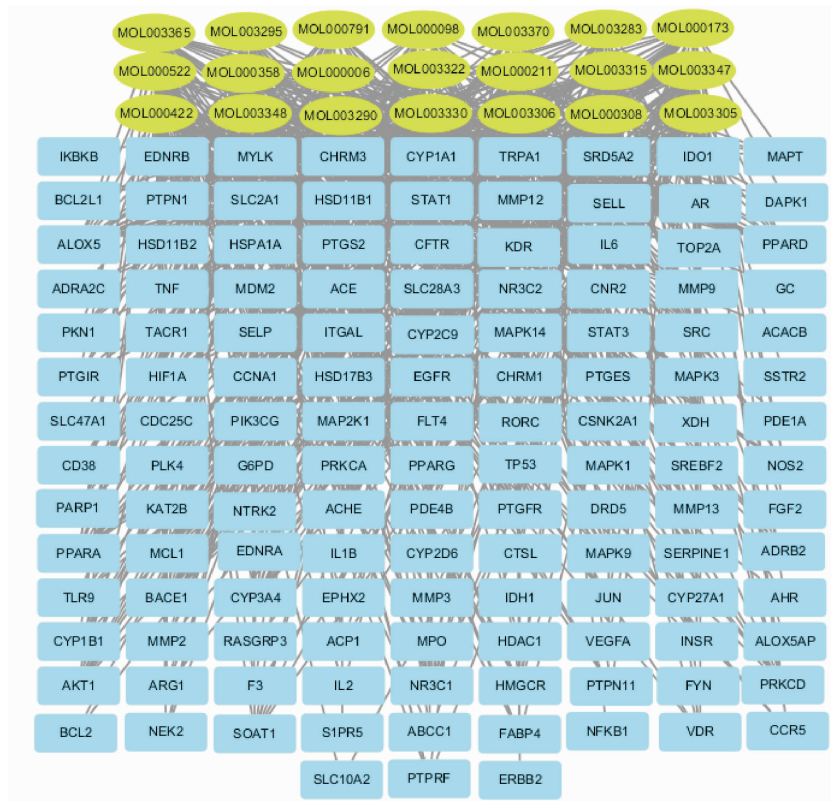


图1 连翘抗RSV靶点网络图

注:绿色表示成分,蓝色表示靶点。

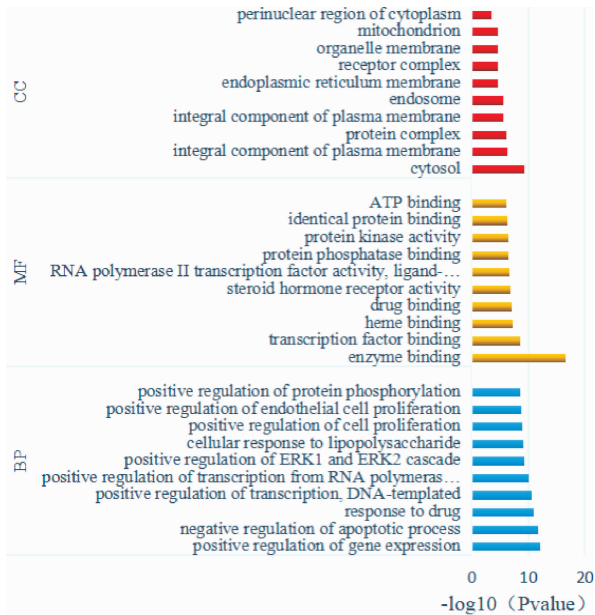


图2 GO 富集分析图

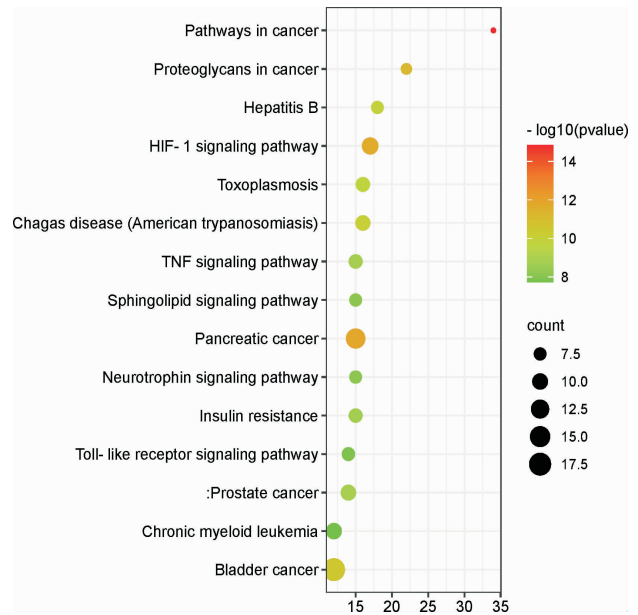


图3 KEGG 信号通路分析图

表1 连翘不同提取液对细胞的毒性和抗RSV活性

药物	TC ₅₀ /C	EC ₅₀ /C	TI
连翘煎煮液	0.418	0.022	19.00
连翘煎煮离心液	0.256	0.010	25.60
连翘煎煮过滤液	0.171	0.012	14.25
连翘超声液	0.453	0.023	19.70
连翘超声离心液	0.162	0.008	20.25
连翘超声过滤液	0.232	0.026	8.92
利巴韦林	0.514	0.004	128.50

注:C为药物原始浓度。

剂量组、低剂量组肺指数升高($P<0.05$);与高剂量组相比,中剂量组、低剂量组肺指数升高($P<0.05$)。详见表3。

3.3.3 各组小鼠感染RSV后肺组织的病理变化 正常组肺泡腔大小正常,泡壁完整、未见明显炎性细胞浸润,管腔无分泌物;模型组小鼠肺组织增生,间质内出现大量炎性细胞且分布均匀,支气管上皮增生、脱落,支气管周围慢性炎性细胞浸润,肺动脉上皮

表2 各组小鼠血常规检测结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	WBC/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	LYM/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	NEU/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	MON/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
正常组	2.31±0.02	1.39±0.01	0.80±0.02	0.04±0.01
模型组	2.42±0.02*	1.62±0.02*	0.60±0.02*	0.06±0.01*
利巴韦林组	2.32±0.01 [#]	1.40±0.02 [#]	0.80±0.01 [#]	0.04±0.01 [#]
高剂量组	2.34±0.01** [△]	1.42±0.01** [△]	0.79±0.01 [#]	0.04±0.01**
中剂量组	2.35±0.01** [△]	1.43±0.01** [△]	0.76±0.02** [△]	0.05±0.01** [△]
低剂量组	2.36±0.01** [△] [▽]	1.44±0.01** [△] [▽]	0.71±0.03** [△] [▽]	0.05±0.01** [△]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与利巴韦林组相比,[△] $P<0.05$;与高剂量组相比,[▽] $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠肺指数的结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	肺指数/%
正常组	0.66±0.03
模型组	1.37±0.02*
利巴韦林组	0.86±0.02* [#]
高剂量组	0.89±0.02** [△]
中剂量组	1.07±0.04** [△] [▽]
低剂量组	1.14±0.02** [△] [▽]

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与利巴韦林组相比,[△] $P<0.05$;与高剂量组相比,[▽] $P<0.05$ 。

增生显著;利巴韦林组小鼠个别支气管上皮轻度增生,肺泡大致正常;高剂量组小鼠个别支气管上皮轻度增生、脱落,肺泡间质轻度增生;中剂量组小鼠支气管周围轻度慢性炎性细胞浸润,部分上皮组织增生,间质部分肺泡充血;低剂量组小鼠肺泡壁增厚,支气管上皮细胞增生,脱落至管腔,间质细胞增生,肺泡腔可见充血,慢性炎性细胞浸润较明显。详见图4。

3.3.4 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65、p38 MAPK 表达比较 与正常组相比,模型组的 TLR4、NF- κ B p65、p38 MAPK 平均光密度值升高($P<0.05$),肺组织出现大量阳性细胞染色;与模型组相比,利巴韦林

组、高剂量组 TLR4、NF- κ B p65 及 p38 MAPK 平均光密度值下降($P<0.05$),中剂量组 TLR4、p38 MAPK 平均光密度值下降($P<0.05$);与利巴韦林组相比,中剂量组、低剂量组 NF- κ B p65 平均光密度值升高($P<0.05$);与高剂量组相比,中剂量组、低剂量组 NF- κ B p65 平均光密度值升高($P<0.05$)。详见表4,图5-7。

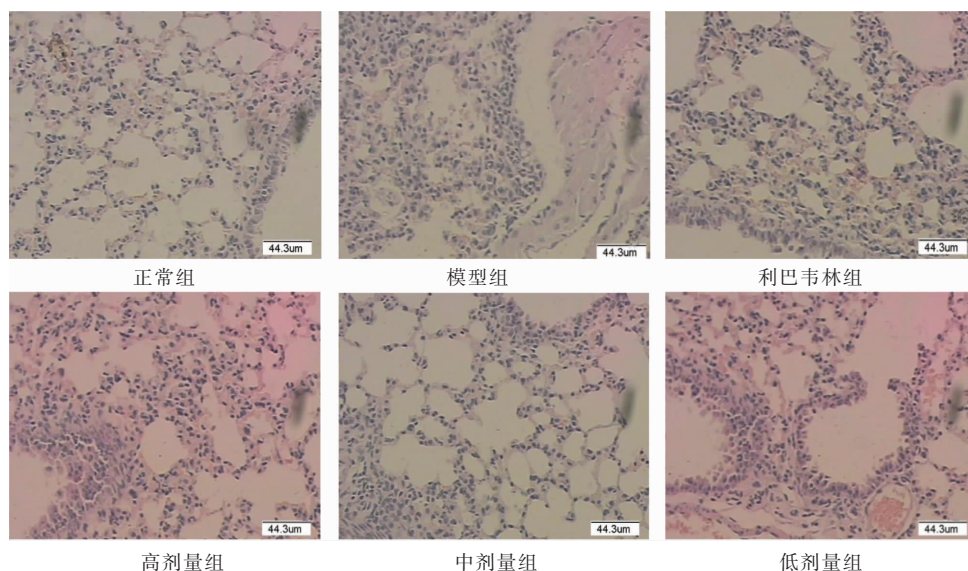
表4 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65、p38 MAPK 的平均光密度值比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	NF- κ B p65	TLR4	p38 MAPK
正常组	0.060±0.011	0.056±0.004	0.052±0.006
模型组	0.073±0.014*	0.062±0.006*	0.116±0.184*
利巴韦林组	0.062±0.008 [#]	0.056±0.004 [#]	0.049±0.004 [#]
高剂量组	0.064±0.007 [#]	0.055±0.004 [#]	0.048±0.004 [#]
中剂量组	0.071±0.016** [△] [▽]	0.057±0.007 [#]	0.055±0.013 [#]
低剂量组	0.072±0.010** [△] [▽]	0.058±0.010	0.067±0.009

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$;与利巴韦林组相比,[△] $P<0.05$;与高剂量组相比,[▽] $P<0.05$ 。

4 讨论

连翘是临床常用清热解毒药,目前研究较为充分的是连翘的不同化学成分抗病毒活性,但其抗病毒机制的研究却相对缺乏。本研究利用网络药理学的方法对连翘抗 RSV 的活性成分、作用靶点、相关通路等进行了探讨,筛选出槲皮素、连翘苷、木犀草素等 21 个活性成分,129 个抗 RSV 靶点,富集 548 个生物过程及 112 条信号通路。结果表明连翘多成分协同影响宿主自身 IL-1B、IL-2、IL-6 等细胞因子水平,干预 HIF-1、TNF 等信号通路,从而发挥抗 RSV 作用^[24-25]。借助网络药理学的方法证实连翘通过多成分、多靶点、多通路发挥抗 RSV 作用,但其方法预测药效机制有局限性。此外,本研究通过体外细胞实

图4 各组小鼠肺组织 HE 染色结果图($\times 200$)

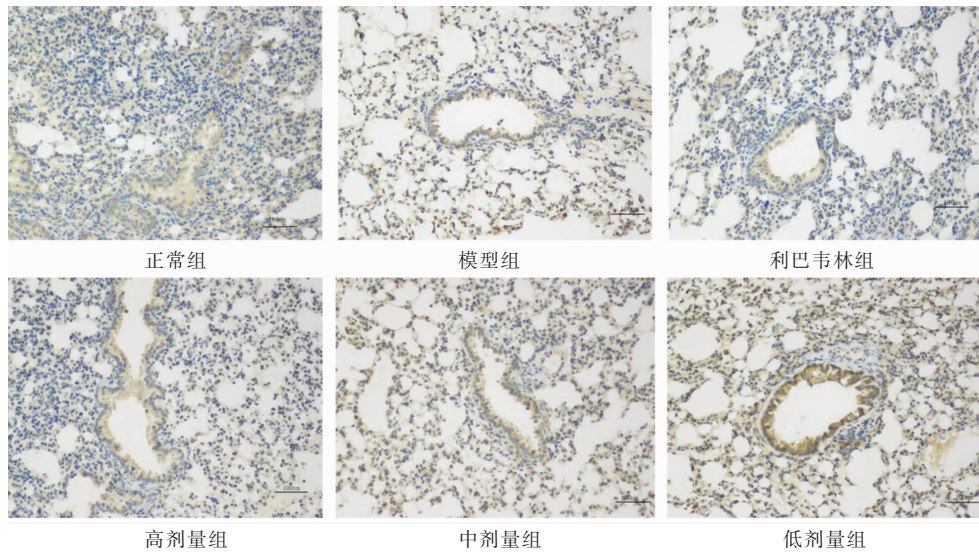


图 5 各组小鼠肺组织 TLR4 的免疫组化染色图(×200)

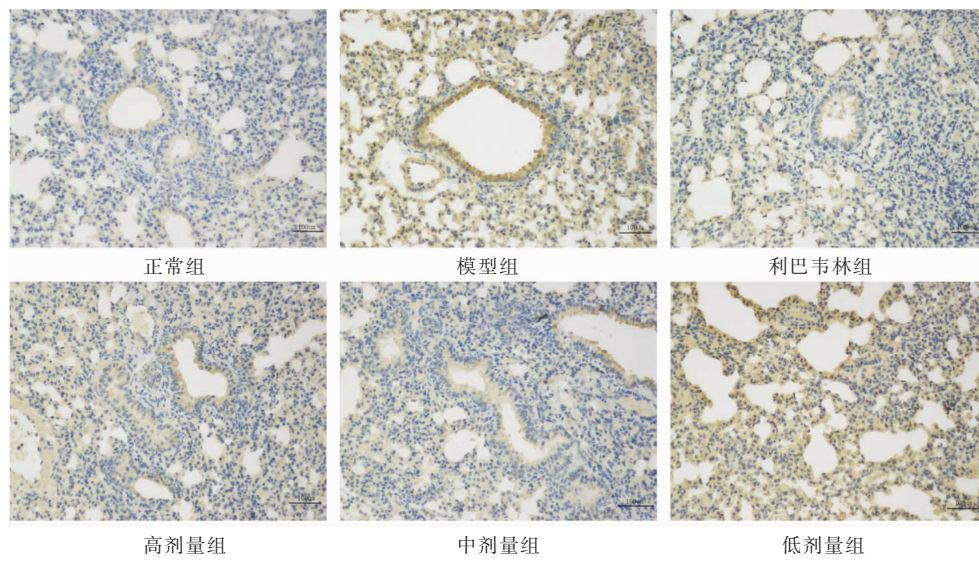


图 6 各组小鼠肺组织 NF-κB p65 的免疫组化染色图(×200)

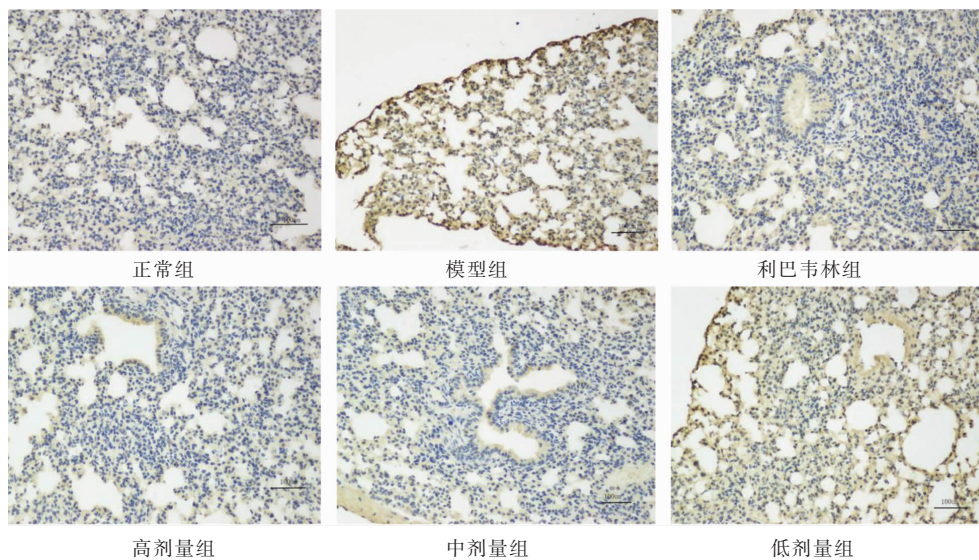


图 7 各组小鼠肺组织 p38 MAPK 的免疫组化染色图(×200)

验和体内动物实验验证了其抗 RSV 的活性。

在体外细胞水平上进行连翘抗 RSV 作用的验证,用预防给药的方法证明连翘不同提取液对 RSV 病毒有杀灭作用。但其不同方法的提取液抗 RSV 的效果差异较大,提示煎煮液经离心或过滤后,毒性杂质减少,活性成分的组成及含量增加。

体内实验从血常规、肺指数检测、HE 染色方面研究连翘煎煮离心液对 RSV 感染后的小鼠的影响,证实中剂量组、高剂量组对 RSV 引起的肺炎具有较好的调节作用。TLR4 是与 RSV 感染的密切受体之一,可通过识别病毒的 F 蛋白和细胞表面脂多糖,激活下游的 p38 MAPK 和 NF- κ B^[26-27]。干预调控 TLR4,可使得下游 NF- κ B p65 引发的炎性因子表达受阻,缓解 RSV 引起的肺部病理损伤。免疫组化结果推测连翘煎煮离心液可通过调动宿主免疫系统的功能,产生大量的免疫因子来阻止病毒的复制、繁殖,达到抗病毒的效果。RSV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群及 Th1、Th2 细胞因子呈现异常表达^[28],课题组可进一步研究连翘高剂量给药能否恢复 RSV 肺炎小鼠体内 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10 水平,从而发挥抗 RSV 作用。

参考文献

- [1] 褚丽敏,李彦珍,郝玲,等.呼吸道合胞病毒感染患儿临床特征及免疫功能分析[J].中国病原生物学杂志,2021,16(4):482-485.
- [2] 徐淑静,刘新泳,展鹏.呼吸道合胞病毒抑制剂研究新进展[J].药学学报,2020,55(4):597-610.
- [3] LEE E S, KIM K Y, JEONG K H, et al. Severe respiratory syncytial virus pneumonia in a kidney transplant Recipient with desensitization: Case report and comprehensive review of the literature[J]. Experimental and Clinical Transplantation, 2019, 9(24): 35-37.
- [4] 张英博,李楠,王曼莉,等.宣肺止咳方联合中药穴位贴敷治疗小儿病毒性肺炎的临床疗效[J].湖南中医药大学学报,2021,41(5): 760-764.
- [5] TAYMAZ T, ERGÖNÜL Ö, KEBAPÇI A, et al. Significance of the detection of influenza and other respiratory viruses for antibiotic stewardship: Lessons from the post-pandemic period[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2018, 77: 53-56.
- [6] 田佳梅,张云,唐燕,等.呼吸道合胞病毒感染致毛细支气管炎患儿 Th1/Th2 亚群的变化[J].江苏大学学报(医学版),2019,29(5): 425-429,435.
- [7] 张鑫,王孟清,罗银河,等.五虎汤对 RSV 诱导的哮喘小鼠模型树突细胞自噬和炎性因子 IL-17A 和 IL-17F 水平的影响[J].中草药, 2021,52(3):718-726.
- [8] 杜春燕,王春辉.不同剂量重组人干扰素 α 2b 注射液雾化吸入治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎疗效比较[J].陕西医学杂志,2020,49(1):105-108.
- [9] 陈余粮.不同剂量重组人干扰素治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎的疗效及对炎性因子的影响[J].临床合理用药杂志,2021,14(31): 102-104.
- [10] 马铭欣,崔振泽.呼吸道合胞病毒感染的代谢组学研究进展[J].国际儿科学杂志,2018,45(5):349-351.
- [11] 郭洁茹,张锦文,赵丽.1071 例利巴韦林不良反应/事件分析[J].药物流行病学杂志,2019,28(4):245-249.
- [12] 杨冬梅,彭莎,邓静,等.10 种主要病毒的流行病学特征及防控措施[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):805-811.
- [13] 郑海涛,闫永彬,任献青,等.中药抗人呼吸道合胞病毒感染的研究进展[J].中国药房,2020,31(10):1276-1280.
- [14] 王雅欣,崔晓兰,郭姗姗.中药防治呼吸道感染性疾病的研究进展[J].中国药物警戒,2021,18(6):592-596.
- [15] 陈鸿平,王福,尤强,等.中药抗病毒活性成分研究进展[J].中药与临床,2020,11(1):6-20.
- [16] 齐丽娜,陈炫好,金华,等.中药连翘化学成分及药理活性研究进展[J].天津中医药大学学报,2021,40(2):168-175.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:177.
- [18] 赵佩媛,韩立柱,汪芸兰,等.连翘的研究进展及质量标志物的预测分析[J].中华中医药学刊,2022,40(4):19-27.
- [19] 田文静,李洪源,姚振江,等.连翘抑制呼吸道合胞病毒作用的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2004,38(5):421-423.
- [20] 张秀英,王雪峰,赫昊,等.基于网络药理学探讨黄芩治疗呼吸道合胞病毒肺炎潜在有效成分及作用机制[J].世界中西医结合杂志,2021,16(8):1464-1468,1475.
- [21] 李思齐,吴世德,侯林,等.小儿解感颗粒体外抗呼吸道合胞病毒实验研究[J].山东中医杂志,2019,38(5):475-481.
- [22] 丁月文,曾丽娟,李润峰,等.莲花清瘟颗粒抗呼吸道合胞病毒感染 BALB/c 小鼠的药效作用研究[J].广州中医药大学学报,2016,33(4):540-544.
- [23] 王敏.桑皮止咳方对 RSV 诱导的感染后咳嗽小鼠 c-fos 及相关炎性因子表达的影响[D].沈阳:辽宁中医药大学,2020.
- [24] 陈元杰,诸杜明.病毒性肺炎的病原与宿主以及重症治疗[J].老年医学与保健,2021,27(5):903-905.
- [25] 谢嘉嘉,张立.基于网络药理学三叶汤治疗病毒性肺炎作用机制探讨[J].河南中医,2021,41(6):944-950.
- [26] 李天萍,黄霞飞,杨蕉,等.呼吸道合胞病毒感染性肺炎患儿的 TNF- α 和 IL-1 β 水平及 TLR4 信号通路作用初步探究[J].中华医院感染学杂志,2020,30(6):919-922.
- [27] 刘静,戴凤翠,李红敏,等.天然辅助细胞通过 p38 信号通路分泌 IL-13[J].中国实验诊断学,2020,24(2):299-303.
- [28] 尹蕾,梁淳,田伟,等.外周血 T 淋巴细胞亚群及 Th1、Th2 细胞因子在呼吸道合胞病毒感染患者中的检测价值探究[J].国际检验医学杂志,2021,42(19):2360-2363.

(本文编辑 周旦)