论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1924-04

白藜芦醇对呼吸道合胞病毒感染小鼠肺部病毒滴度及其气道炎症的影响

臧 娜[1],谢晓虹[2],邓 昱[2],李思敏[1],倪 科[1],罗 艳[1],王莉佳[1],刘恩梅[2] (400014 重庆,重庆医科大学:儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[1],附属儿童医院呼吸一病房[2])

[摘要] **目的** 研究白藜芦醇(resveratrol, RES)对呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染小鼠肺部病毒滴度及其所致气道炎症的影响。**方法** 6~8周龄雌性BALB/c小鼠,环磷酰胺100 mg/kg腹腔注射后,随机分为对照组、RSV感染组、白藜芦醇腹腔注射组、白藜芦醇雾化组,每组8只。环磷酰胺处理5 d后,给予RSV滴鼻建立RSV感染模型,并在RSV感染1 h后给予白藜芦醇30 mg/(kg·d)腹腔注射和雾化吸入。5 d后检测小鼠清醒状态下气道阻力,处死小鼠研究肺部RSV病毒滴度、肺泡灌洗液(BALF)中细胞计数、肺部病理组织炎症及评分。**结果** 白藜芦醇不同方式给药,干预组肺部RSV病毒滴度均显著低于RSV感染组($P<0.01$),BALF中细胞总数白藜芦醇干预组明显低于RSV感染组($P<0.05$),而白藜芦醇干预组与对照组相比差异无显著性;肺组织炎症病理评分:白藜芦醇干预组明显低于RSV感染组($P<0.01$),白藜芦醇干预组清醒状态小鼠气道高反应(吸入乙酰甲胆碱浓度12.5~50.0 mg/ml时)较单纯RSV感染组明显减轻($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇不同方式给药均能够减轻RSV诱发的肺部炎症及气道高反应,其机制可能是通过抑制RSV感染后肺部病毒滴度,减少RSV在体内的复制。

[关键词] 白藜芦醇;RSV;气道炎症;气道高反应

[中图法分类号] R282.71;R373.1;R560.5 [文献标志码] A

Effect of resveratrol on pulmonary vurus titer and airway inflammation in mice infected with respiratory syncytial virus

Zang Na[1], Xie Xiaohong[2], Deng Yu[2], Li Simin[1], Ni Ke[1], Luo Yan[1], Wang Lijia[1], Liu Enmei[2] ([1]Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood of Ministry of Education, [2]Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of resveratrol (RES) on pulmonary virus titer and airway inflammation in mice infected with respiratory syncytial virus (RSV). **Methods** Twenty-four female BALB/c mice at the age of 6-8 weeks, treated with intra-abdominal cyclophosphamide (CYP) at the dose of 100 mg/kg, were randomly divided into control group, RSV infection group, and RES treatment group (8 in each group). Five days after CYP treatment, a RES infection model was induced by intranasal drip of RES. One hour after RES infection, the mice received intraperitoneal injection of RES or inhaled it at the dose of 30mg/(kg·d). Five days later, airway hyper-response (AHR) in lucid mice was detected. The mice were then killed to detect the pulmonary RSV titers in the lung, the number of cells in bronchoalevolar lavage fluid (BALF), inflammation in lung tissue and its score. **Results** The pulmonary RSV titer, the number of cells in BALF, the score of inflammation in lung tissue, and the airway AHR were significantly lower in RES treatment group than in RSV infection group ($P<0.01$). However, no significant difference was observed between RES treatment group and control group. **Conclusion** Differenly administrated RES can relieve RSV-induced inflammation and AHR by reducing pulmonary titer and inhibiting RSV replication *in vivo*.

[**Key words**] resveratrol; respiratory syncytial virus; inflammation; airway hyper-response

Supported by the Key Program of Chongqing Medical University (XBZD 200808), the New Century Excellent Talents Program from Ministry of Education (NCET-06-0775), and the Second Program for Excellent Talents from High Colleges and Universities of Chongqing. Corresponding author: Liu Enmei, Tel: 86-23-63635286, E-mail: emliu186@hotmail.com

[基金项目] 重庆医科大学校办重点课题项目(XBZD200808);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0775);重庆市第二批高等学校优秀人才支持计划

[通信作者] 刘恩梅,E-mail: emliu186@hotmail.com

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)是世界范围内引起婴幼儿时期下呼吸道感染最常见和最重要的病毒病原,也是年幼儿童因呼吸道感染致病住院的首要原因[1]。1岁以内婴儿有70%曾经感染RSV,到2岁时基本上所有婴幼儿有RSV感染的病史[2]。在美国,每年因RSV感染的住院儿童达15 000例,并且用于治疗RSV感染的费用高达12亿美元[3]。

婴幼儿时期RSV感染与儿童反复喘息和气道高反应性密切相关,但其机制尚不完全清楚。目前,临床上仍然没有有效疫苗预防RSV感染,RSV感染后也尚无有效治疗药物。白藜芦醇是蓼科植物根茎的提取物,大约70多种植物都可以产生这种物质,用以抵御真菌和细菌等病原体攻击。白藜芦醇作为一种非甾体类天然抗氧化剂,除了具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、免疫调节的作用外,近年来整体水平和细胞水平研究均发现其可抑制病毒如A型流感病毒、巨细胞病毒和水痘-带状疱疹病毒的蛋白的表达以及病毒诱导的各类转录因子活化发挥抗病毒作用[4-6]。本课题组前期体外实验发现白藜芦醇能够抑制RSV在9HTEo细胞中的病变,减轻RSV感染后上皮细胞炎症反应(如降低RSV感染后气道上皮细胞IL-6的产生)[7]。本研究拟通过白藜芦醇不同方式给药干预RSV感染的BALB/c小鼠,观察白藜芦醇对RSV病毒复制的抑制作用,阐明白藜芦醇对RSV感染后诱导的气道炎症和气道高反应的作用,为临床治疗RSV感染提供新药物。

1 材料与方法

1.1 RSV病毒繁殖

呼吸道合胞病毒A2标准株接种于Hep-2细胞株,37 ℃条件下培养于终浓度含2%胎牛血清的DMEM培养基中,细胞出现80%以上病变时收取病毒悬液,12 000 r/min,离心10 min,收集上清,空斑实验进行病毒滴度测定,病毒液-80 ℃保存备用。

1.2 实验动物及分组

SPF级雌性BALB/c小鼠32只,6~8周龄,购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于重庆医科大学实验动物中心SPF条件下。饲养2 d后,给予环磷酰胺100 mg/kg[8]腹腔注射后的小鼠随机分为对照组、RSV感染组、白藜芦醇腹腔注射组(RSV+RES-ip组)及白藜芦醇雾化组(RSV+RES-ih组),每组8只。环磷酰胺注射后第5天,10%水合氯醛麻醉,RSV 4.5×10^6 PFU/ml 100 μl滴鼻,RSV感染1~2 h后,白藜芦醇腹腔注射组给予白藜芦醇30 mg/(kg·d)腹腔注射,白藜芦醇雾化组给予白藜芦醇30 mg/(kg·d)[9]雾化,给药连续5 d后,所有小鼠进行气道高反应性检测,并取肺泡灌洗液及肺组织。

1.3 气道高反应性测定

小鼠清醒状态下,用全身体积描述器(emka, France,新桥医院呼吸研究所提供)检测气道高反应性。小鼠暴露于不同浓度乙酰甲胆碱溶液(0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/ml;Sigma)3 min,休息2 min,放入体描箱进行检测。用呼吸曲线Penh值代表气道高反应性。

1.4 肺泡灌洗液细胞计数

RSV感染后第5天,给予小鼠脱颈处死,肺泡灌洗,灌洗液细胞计数,2 500 r/min离心5 min,上清-80 ℃保存。

1.5 肺组织匀浆检测病毒滴度

按10 ml/g加入组织平衡液,研磨肺组织,4 ℃ 10 000 r/min离心5 min,取上清-80 ℃保存,用RSV空斑实验检测病毒滴度[10]。

1.6 HE染色观察肺部炎症

肺组织10%中性甲醛固定24 h,脱水及石蜡包埋,切片5 μm,进行HE染色。组织形态学评分表示肺部炎症程度,参照Myou等[11]的方法进行组织学评分。

1.7 肺组织RSV mRNA表达

RNApure高纯总RNA快速提取试剂盒(BioTeke,北京)提取肺组织总RNA,定量后取4 μg RNA逆转录(TaKaRa试剂盒,大连宝生物),逆转录后取cDNA产物进行RT-PCR(RealMasterMix SYBR Green;天根,北京)检测RSV-G蛋白基因的表达。RSV引物序列:P1为5′-TGGGACACTCTTAATCAT-3′,P2为5′-TGATTCCAAGCTGAGGAT-3′,P3为5′-GTTGTATGGTGTGTTTC-3′,反应条件:95 ℃预变性5 min,扩增33个循环,95 ℃ 1 min,50 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,最后72 ℃延伸10 min,扩增产物为250 bp;β-actin引物序列正义链:5′-TGGCATTGTTACCAACT-GGGAC-3′,反义链:5′-TCACGGTTGGCCTTAGGGTTC-3′,反应条件:94 ℃预变性2 min,扩增33个循环,94 ℃ 1 min,57 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,最后72 ℃延伸10 min,扩增产物为150 bp。上述引物均由上海生物工程公司(Invitrogen)合成。

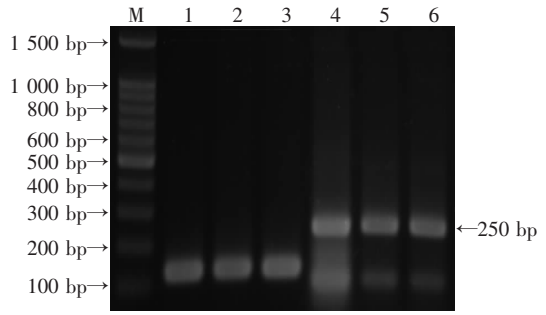
1.8 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用Graphpad Prism 5.03统计软件,两组间均数比较采用t检验;多个样本均数比较采用方差分析,以SNK-q检验进行均数间多重比较;多个样本率的比较采用χ^2检验。

2 结果

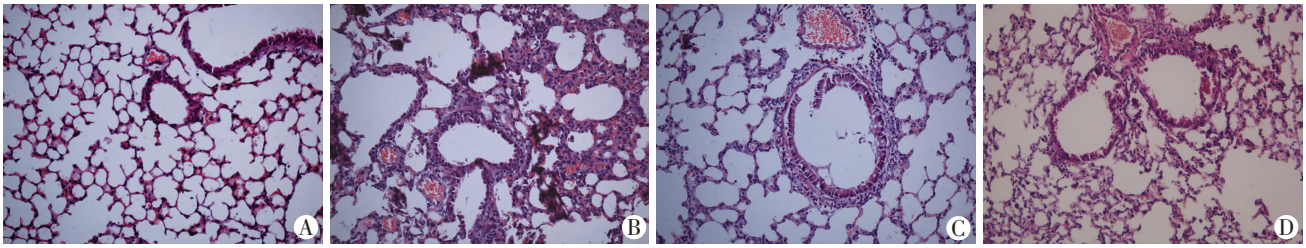
2.1 BALB/c小鼠肺部感染RSV mRNA表达

RSV感染BALB/c小鼠第5天,RT-PCR检测小鼠肺组织RSV mRNA表达情况,图1显示各组小鼠肺组织均有RSV mRNA表达。



M:标准;1:RSV组内参;2:RSV+RES-ip组内参;3:RSV+RES-ih组内参;4:RSV组基因表达;5:RSV+RES-ip组基因表达;6:RSV+RES-ih组基因表达

图1 RT-PCR检测各组小鼠肺组织RSV mRNA表达



A:对照组;B: RSV 组;C: RSV + RES-ip 组;D: RSV + RES-ih 组

图2 各组小鼠肺组织病理学表现 (HE ×200)

2.2 白藜芦醇对 RSV 在体内复制的影响

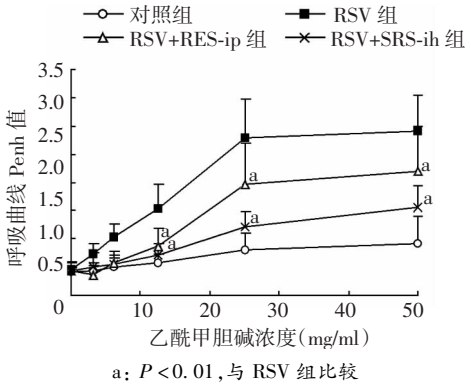
白藜芦醇处理小鼠5 d后,空斑实验检测小鼠肺组织匀浆病毒滴度。RSV 组病毒滴度为(3.845 ± 0.315) × 10^4 PFU/g,RSV + RES-ip 组病毒滴度为(1.429 ± 0.554) × 10^4 PFU/g,差异具有显著性(P < 0.05);RSV + RES-ih 组病毒滴度为(0.688 ± 0.475) × 10^4 PFU/g,和 RSV 组相比具有显著性差异(P < 0.01);RSV + RES-ih 组和 RSV + RES-ip 组相比没有显著差异(P > 0.05),提示两种方式给予白藜芦醇均能够降低 RSV 体内复制。

2.3 白藜芦醇对 RSV 引起的气道炎症的影响

RSV 感染小鼠5 d后,RSV 组小鼠肺泡灌洗液细胞计数明显增多(3.475 ± 0.232) × 10^6/ml,腹腔注射和雾化白藜芦醇处理5 d,小鼠肺泡灌洗液细胞计数分别是(1.306 ± 0.221) × 10^6/ml、(0.795 ± 0.288) × 10^6/ml,和 RSV 组比较有显著性差异(P < 0.01)。RSV 感染后大量的炎症细胞浸润肺组织,以淋巴细胞浸润为主,给予白藜芦醇后浸润肺组织白细胞明显减少(图2)。腹腔注射和雾化白藜芦醇处理后,肺组织炎症评分较单纯 RSV 感染组显著降低(对照组 0.175 ± 0.050, RSV 组 2.208 ± 0.240, RSV + RES-ip 组 1.090 ± 0.070, RSV + RES-ih 组 1.068 ± 0.090)(P < 0.01),提示白藜芦醇能够减轻 RSV 引起的气道炎症。

2.4 白藜芦醇对 RSV 引起的气道高反应性的影响

单纯 RSV 感染组小鼠在吸入乙酰甲胆碱浓度 12.5 ~ 50 mg/ml 时,气道阻力呈明显增高;腹腔注射和雾化白藜芦醇处理小鼠5 d,在吸入乙酰甲胆碱浓度 12.5 ~ 50 mg/ml 时,气道阻力较 RSV 组有所降低,两者和 RSV 组相比有显著性差异(P < 0.01)。提示白藜芦醇能够缓解 RSV 诱导的气道高反应,尽管给药方式不同(图3)。



a: P < 0.01,与 RSV 组比较

图3 白藜芦醇对 RSV 诱导的各组小鼠气道高反应的影响

3 讨论

RSV 是婴幼儿下呼吸道感染的主要病原体之一,与儿童哮喘的发生密切相关,但 RSV 感染致气道炎症和气道高反应的机制尚不清楚。由于 RSV 感染的严重性,30年前世界卫生组织就将开发 RSV 疫苗列为重要发展计划,但是当时疫苗的应用不但没有预防效应,反而加重了病情[12]。目前临床上较为广泛应用的抗 RSV F 蛋白单克隆抗体(palivizumab)只能用于预防早产儿、有基础疾病等高危儿在 RSV 流行季节的 RSV 感染,对已经感染 RSV 的患儿无治疗作用,对病毒本身有一定作用,但不能控制炎症反应[13-14]。因此抗 RSV 病毒感染的同时进行抗炎治疗十分重要。

白藜芦醇作为一种非甾体类天然抗氧化剂,研究表明其在调理机体生理病理学反应中具有重要作用,如抗癌症、抗突变及抗动脉粥样硬化等。白藜芦醇除了具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、免疫调节、减轻缺血再灌注损伤的作用外[15-17],近年来整体水平和细胞水平研究均发现白藜芦醇可抑制病毒如 A 型流感病毒、巨细胞病毒和水痘-带状疱疹病毒的蛋白的表达以及病毒诱导的各类转录因子活化发挥抗病毒作用[4-6]。

本研究结果显示白藜芦醇通过不同方式干预 RSV 感染的小鼠后,能够降低感染小鼠肺组织匀浆 RSV 病毒滴度,说明白藜芦醇在一定程度上能够抑制 RSV 在小鼠肺组织的复制,与本课题组前期体外实验结果相一致[7],提示白藜芦醇对 RSV 具有抗病毒作用。研究报道白藜芦醇通过抑制 NF-κB 通路激活、EGFR 活性、PKC 活性和晚期病毒蛋白的翻译,分别对1-型单纯疱疹病毒、2-型单纯疱疹病毒、人类巨细胞病毒及 A 型流感病毒起抗病毒作用;白藜芦醇通过抑制病毒 DNA 合成从而抑制多瘤病毒属在体外复制[18]。但白藜芦醇抑制 RSV 复制是否通过对 RSV 蛋白、蛋白产生的某种酶起作用,需要进一步证实。本研究进一步发现两种方式给予白藜芦醇均能够减少 RSV 感染后小鼠 BALF 中细胞总数及淋巴细胞比例,并且能

够升高巨噬细胞比例,减轻RSV感染后肺组织病理炎症,降低RSV感染后小鼠气道阻力,提示白藜芦醇能够减轻RSV感染后小鼠气道炎症和气道高反应性,可能与白藜芦醇能够抑制RSV体内复制,对RSV起到抗病毒作用有关。

本研究用腹腔注射和雾化两种方式给药,初步揭示了白藜芦醇对小鼠体内RSV感染的抑制作用,为白藜芦醇作为中药单体的开发应用提供了科学依据,亦有利于临床治疗呼吸道合胞病毒感染新药物的开发。

参考文献:

[1] Numata M, Chu H W, Dakhama A, *et al*. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(1): 320-325.

[2] Mejias A, Chavez-Bueno S, Jafri H S, *et al*. Respiratory syncytial virus infections: old challenges and new opportunities[J]. Pediatr Infect Dis J, 2005, 24(11 Suppl): S189-S197.

[3] Storey S. Respiratory syncytial virus market[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(1): 15-16.

[4] Palamara A T, Nencioni L, Aquilano K, *et al*. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol[J]. J Infect Dis, 2005, 191(10): 1719-1729.

[5] Evers D L, Wang X, Huong S M, *et al*. 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling[J]. Antiviral Res, 2004, 63(2): 85-95.

[6] Docherty J J, Sweet T J, Bailey E, *et al*. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication *in vitro*[J]. Antiviral Res, 2006, 72(3): 171-177.

[7] Xie X H, Law H K, Wang L J, *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.

[8] Kong X, Hellermann G R, Patton G, *et al*. An immunocompromised BALB/c mouse model for respiratory syncytial virus infection[J]. Virol J, 2005, 2: 3.

[9] Lee M, Kim S, Kwon O K, *et al*. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(4): 418-424.

[10] 臧娜, 王莉佳, 陈伟超, 等. 呼吸道合胞病毒空斑检测方法的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(2): 192-195.

[11] Myou S, Leff A R, 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.

[12] Castilow E M, Olson M R, Varga S M. Understanding respiratory syncytial virus (RSV) vaccine-enhanced disease[J]. Immunol Res, 2007, 39(1/3): 225-239.

[13] Kauvar L M, Harcourt J L, Haynes L M, *et al*. Therapeutic targeting of respiratory syncytial virus G-protein[J]. Immunotherapy, 2010, 2(5): 655-661.

[14] 周娟, 崔玉霞, 杨锡强, 等. 特异性反义寡核苷酸抗小鼠呼吸道合胞病毒感染的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 112-116.

[15] 任俊伟, 杨琴, 范层层, 等. 白藜芦醇减轻脑缺血再灌注损伤及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2586-2590.

[16] 王贵琴, 郑湘予, 吴成富, 等. 白藜芦醇对裸鼠胃癌移植瘤组织中人程序化死亡分子5 mRNA表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(4): 569-572.

[17] 李晓芳, 柴雅玫, 文小岗, 等. 白藜芦醇对BGC-823细胞人程序化死亡分子5表达及凋亡的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 45(6): 943-946.

[18] Campagna M, Rivas C. Antiviral activity of resveratrol[J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38(Pt 1): 50-53.

(**收稿**:2011-05-11;**修回**:2011-06-02)

(编辑 邓强庭)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由3所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从2007年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入ScienceDirect全文数据库,期刊网址http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31-1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000-1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各1份,照片提供3份。电子投稿E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供JPG或TIF格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038) **电话**:(023)68752782