

## 清肺口服液黄酮类成分对呼吸道合胞病毒感染小鼠坏死性凋亡的影响

凌晓颖, 丁雅荔, 陶嘉磊, 袁 斌\*

南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

**摘要:**目的 研究清肺口服液黄酮类成分对呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染小鼠坏死性凋亡的影响。方法 将BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组及黄酮类成分低、高剂量(30、60 mg/kg)组和利巴韦林(46 mg/kg)组,建立RSV感染的小鼠模型,给药4d后,苏木素-伊红(HE)染色法观察肺组织病理学变化;qRT-PCR检测肺组织中白细胞介素-6(interleukin-6, *IL-6*)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )和*RSV-F* mRNA表达;流式细胞术检测肺组织细胞坏死性凋亡率;ELISA法检测小鼠肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和高迁移率族蛋白B1(high mobility group protein B1, HMGB1)水平;Western blotting检测肺组织受体相互作用蛋白激酶1(receptor-interacting protein 1, RIP1)、RIP3、混合系列蛋白激酶样结构域(mixed lineage kinase domain-like, MLKL)、磷酸甘油酸变位酶5(phosphoglycerate mutase 5, PGAM5)、动力相关蛋白1(dynammin-related protein 1, DRP1)蛋白表达;免疫荧光检测肺组织RIP1和RIP3的共定位以及p-MLKL与上皮细胞的共定位。结果 与模型组相比,黄酮类成分组小鼠肺组织病理损伤减轻;肺组织中*IL-6*、*TNF- $\alpha$* 和*RSV-F* mRNA表达水平降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );肺组织细胞坏死性凋亡率下降( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );BALF中HMGB1和LDH水平降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );肺组织RIP1、RIP3、MLKL、PGAM5、DRP1蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05$ 、 $0.01$ );肺组织RIP1/RIP3坏死复合物的形成减少,肺上皮细胞中p-MLKL的荧光表达降低。结论 清肺口服液黄酮类成分可能通过调节RIP1/RIP3/MLKL/PGAM5/DRP1信号通路,抑制坏死性凋亡,改善RSV感染的小鼠肺部炎症损伤。

**关键词:**清肺口服液;黄酮类成分;呼吸道合胞病毒;坏死性凋亡;受体相互作用蛋白激酶1;受体相互作用蛋白激酶3;混合系列蛋白激酶样结构域;磷酸甘油酸变位酶5;线粒体动力相关蛋白1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-4019-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.015

## Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on necroptosis in RSV-infected mice

LING Xiao-ying, DING Ya-li, TAO Jia-lei, YUAN Bin

Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

**Abstract: Objective** To explore the effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid (清肺口服液) on necroptosis in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, flavonoids low-, high-dose (30, 60 mg/kg) groups and ribavirin (46 mg/kg) group. RSV-infected mice model was established. After continuous administration for 4 d, HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue; qRT-PCR was used to detect interleukin-6 (*IL-6*), tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) and *RSV-F* mRNA expressions in lung tissue; Flow cytometry was used to detect necroptosis rate of lung tissue cell; ELISA assay was used to detect lactate dehydrogenase (LDH) and high mobility group protein B1 (HMGB1) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice; Western blotting was used to detect protein expressions of receptor-interacting protein 1 (RIP1), RIP3, mixed lineage kinase domain-like (MLKL), phosphoglycerate mutase 5 (PGAM5), dynammin-related protein 1 (DRP1) in lung tissue; Immunofluorescence was used to detect the co-localization of RIP1 and RIP3, co-localization of p-MLKL with epithelial cells. **Results** Compared with model group, pathological damage of lung tissue in flavonoids group was alleviated; *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  and *RSV-F* mRNA expressions in lung tissue were decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); Necroptosis rate of lung tissue cells was decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); HMGB1 and LDH levels in BALF were decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); RIP1, RIP3, MLKL, PGAM5 and DRP1 protein expressions

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 国家中医药管理局项目(2019XZZX-ek003); 国家自然科学基金资助项目(81873340); 国家自然科学基金资助项目(82174436); 江苏省研究生实践创新计划项目(KYCX21\_1647)

作者简介: 凌晓颖, 博士研究生。E-mail: 295047667@qq.com

\*通信作者: 袁 斌, 教授, 主要从事中医药防治小儿肺系疾病的研究。E-mail: yfy0045@njucm.edu.cn

in lung tissue were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ); Formation of RIP1/RIP3 necrotic complex in lung tissue was decreased, fluorescence expression of p-MLKL in lung epithelial cells was decreased. **Conclusion** Flavonoids in Qingfei Oral Liquid may inhibit necroptosis by regulating RIP1/RIP3/MLKL/PGAM5/DRP1 signaling pathway, and improve lung inflammation in RSV-infected mice.

**Key words:** Qingfei Oral Liquid; flavonoids; respiratory syncytial virus; necroptosis; receptor-interacting protein 1; receptor-interacting protein 3; mixed lineage kinase domain like pseudokinase; phosphoglycerate mutase 5; dynamin-related protein 1

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是全球婴幼儿、老年人和免疫功能低下人群病毒性肺炎最常见的病原体之一。据估计, RSV 感染每年导致超过 300 万人住院和近 6 万人死亡, 主要发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。婴幼儿早期 RSV 感染还与随后发生反复喘息及哮喘的风险密切相关<sup>[2]</sup>。目前 RSV 感染的防治方式有限, 尚无安全有效的抗病毒药物及批准用于临床的疫苗<sup>[3]</sup>。

细胞凋亡并不能引起或加重炎症反应, 而坏死则会释放过多的细胞因子和趋化因子, 进一步放大炎症风暴和肺损伤。坏死性凋亡是近年来发现的一种不依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cysteine-aspartate protease, Caspase) 活化的新型细胞程序性坏死, 它具有典型的坏死样形态: 细胞体积增大, 细胞器肿胀, 细胞膜穿孔, 之后为细胞崩解, 内容物释放, 导致大量的炎症细胞浸润和激活<sup>[4]</sup>。越来越多研究表明, 坏死性凋亡在 RSV 的发病机制中扮演着重要的角色, 抑制坏死性凋亡不仅能降低 RSV 感染小鼠肺部病毒载量, 还能减轻肺部炎症<sup>[5]</sup>。因此, 靶向坏死性凋亡可能是防治 RSV 感染的新方向。

RSV 肺炎可归属于中医儿科学“肺炎喘嗽”的范畴, 急性期以痰热闭肺证最为多见<sup>[6]</sup>。全国名中医汪受传教授结合其证候特点, 在经方麻杏石甘汤基础上, 加宣肺止咳之前胡, 肃肺平喘之桑白皮, 泻肺涤痰之葶苈子, 解毒活血之虎杖等, 组方制成以开肺化痰、解毒活血为主要功效的清肺口服液<sup>[7]</sup>。清肺口服液临床运用多年, 随机对照试验证实其治疗 RSV 肺炎安全有效<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现, 黄酮类成分是清肺口服液的主要药效物质, 能够显著抑制 RSV 复制, 减轻肺组织的病理损伤<sup>[9]</sup>, 但对坏死性凋亡的调控作用还尚未可知。因此本研究建立 RSV 感染小鼠模型, 探究清肺口服液黄酮类成分抑制坏死性凋亡的作用机制, 也为清肺口服液的推广应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 病毒

RSV A2 型 long 株, 购自中国典型培养物保藏中心, RSV 在 Hep-2 细胞上扩增, 收集病毒备用。

### 1.2 动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~20 g, 购自 SIPEIFU 生物科技有限公司, 合格证号 SCXK(京)2019-0010。动物于室温 (23±2)°C, 相对湿度 40%~70%, 昼夜交替照明的环境中饲养, 自由进食饮水。动物实验经南京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 201805A019)。

### 1.3 药品与试剂

清肺口服液按原比例配制: 炙麻黄 4 g, 生石膏 24 g, 杏仁 10 g, 桑白皮 10 g, 葶苈子 6 g, 紫花前胡 10 g, 虎杖 12 g, 拳参 12 g, 制僵蚕 6 g, 丹参 6 g, 以上药材由江苏省中医院提供, 经南京中医药大学中药鉴定教研室刘圣金副教授鉴定均符合《中国药典》2020 年版规定。取药材 5 kg 粉碎, 加 12 倍量 85%乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 滤过, 滤液合并, 减压浓缩、冷冻干燥, 获得冻干粉 600 g, 经聚酰胺树脂纯化后, 减压浓缩、冷冻干燥获得黄酮类成分冻干粉, 转移率为 78.7%, 并采用 UPLC-MS/MS 技术, 定量检测出儿茶素、木犀草素等 26 种黄酮类化合物<sup>[10]</sup>。

利巴韦林购自源叶生物有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染料购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液、Tris-Glycine SDS 电泳缓冲液、快速转膜液购自苏州新赛美公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海碧云天公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix、HiScript III RT SuperMix for qPCR、细胞/组织 RNA 提取试剂盒、Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 试剂盒购自南京诺唯赞公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) ELISA 试剂盒、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) ELISA 试剂盒购自南京谨庭公司; 受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, RIP1) 抗体购自美国 CST 公司; RIP3、磷酸甘油酸变位酶 5 (phosphoglycerate mutase 5, PGAM5) 抗体购自 Abmart 公司; 混合系列蛋白激酶样结构域 (mixed lineage kinase domain-like, MLKL) 抗体、动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1) 抗体、钙

黏蛋白 E (E-cadherin) 抗体购自 Proteintech 公司; p-MLKL 抗体购自英国 Abcam 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Affinity 公司。

#### 1.4 仪器

蛋白核酸分析仪 (德国 Eppendorf 公司); Quant Studio 7 Flex PCR System (Life technologies 公司); 化学发光成像仪 (Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (BD 公司); 酶标仪 (Tecan 公司); 光学显微镜、荧光显微镜 (Carl Zeiss 公司)。

### 2 方法

#### 2.1 模型的建立和给药

将小鼠随机分为对照组、模型组及黄酮类成分低、高剂量 (30、60 mg/kg/d) 组和利巴韦林 (46 mg/kg) 组, 每组 6 只。小鼠适应性饲养 1 周后, 按照本课题组前期已建立的造模方法<sup>[10]</sup>, 除对照组外, 其余小鼠于实验第 0 天, 在异氟烷麻醉状态下予滴度为  $1 \times 10^7$  PFU/mL 的 RSV 病毒液 80  $\mu$ L 滴鼻。小鼠感染后, 各给药组 ig 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 的相应药物, 对照组和模型组 ig 0.5% CMC-Na, 1 次/d, 连续 4 d。末次给药后禁食不禁水, 次日处死小鼠, 取样备用。

#### 2.2 肺组织 HE 染色

取各组小鼠肺组织, 于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋、切片、脱蜡, 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察肺组织炎症情况。

#### 2.3 qRT-PCR 检测肺组织白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和 RSV-F mRNA 表达

取各组小鼠肺组织, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA。使用蛋白核酸分析仪测定 RNA 浓度, 根据 HiScript III RT SuperMix for qPCR 的说明, 依次进行基因组 DNA 去除、配制逆转录反应体系, 加热得到 cDNA。按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明配制体系, 加样上机, 使用 QuantStudio 7 Flex 系统进行扩增, 数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算分析, 以  $\beta$ -actin 为内参进行标准化, 相关基因的引物序列见表 1。

#### 2.4 流式细胞仪检测肺组织坏死性凋亡情况

取各组小鼠肺组织, 制备肺组织单细胞悬液, 使用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测细胞死亡形式, 右上象限 Annexin V (+) 和 PI (+) 双阳性被定

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F: GTATCCTGACCCTGAAGTACC R: TGAAGGTCTCAAACATGATCT
<i>IL-6</i>	F: CTCCCAACAGACCTGTCTATAC R: CCATTGCACAACCTCTTTTCTCA
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: ATGTCTCAGCCTCTTCTCATT R: GCTTGTCACCTCGAATTTGAGA
<i>RSV-F</i>	F: TGAAAGTCCACCTCCTTACAGA R: CCGGATAAAAAGAGTACGCTGG

义为坏死性凋亡。

#### 2.5 ELISA 检测肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 LDH 和 HMGB1 水平

取各组小鼠 BALF, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 LDH 和 HMGB1 水平。

#### 2.6 Western blotting 检测肺组织 RIP1、RIP3、MLKL、PGAM5 和 DRP1 蛋白表达

取各组小鼠肺组织 20 mg, 加入 200  $\mu$ L RIPA 裂解液和 20  $\mu$ L 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液混匀, 研磨组织匀浆, 提取肺组织的总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 等量蛋白加样, 依次进行电泳、转膜、封闭。分别加入 RIP1 抗体 (1:1000)、RIP3 抗体 (1:1000)、MLKL 抗体 (1:1000)、PGAM5 抗体 (1:1000)、DRP1 抗体 (1:1000) 和 GAPDH 抗体 (1:3000), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗涤后, 加入相应二抗室温孵育 1 h, 使用 ECL 发光液对目的条带进行成像与分析。

#### 2.7 免疫荧光检测肺组织 RIP1、RIP3、p-MLKL 和 E-cadherin 蛋白表达

取各组小鼠肺组织石蜡切片, 依次脱蜡、抗原修复、封闭; 分别加入 RIP1 抗体 (1:200)、RIP3 抗体 (1:200)、p-MLKL 抗体 (1:200) 和 E-cadherin 抗体 (1:200), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 清洗后, 滴加荧光标记的二抗, 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗后, DAPI 染核; 用抗荧光淬灭剂封片, 于荧光显微镜下观察并拍照。

#### 2.8 统计分析

采用 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析和作图, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Tukey 检验。

### 3 结果

#### 3.1 小鼠一般情况和体质量变化

对照组小鼠精神、毛发和活动程度等无明显异常变化。RSV 感染小鼠出现饮水进食减少、蜷缩少

动、搔毛等现象，而给药组小鼠的精神状态、毛发和食量均逐渐恢复，其中以黄酮类成分高剂量组恢复最好。RSV造模后每天监测小鼠体质量，如图1所示，除对照组外，其余各组小鼠的体质量均明显降低，提示模型制备成功。小鼠在造模后第1天体质量最低 ( $P < 0.01$ )，给药后略有促进体质量恢复趋势，但无统计学意义。

### 3.2 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠肺部炎症和病毒复制的影响

HE染色用于评估清肺口服液黄酮类成分对RSV感染小鼠肺组织病理的影响，如图2-A所示，与对照组相比，RSV感染的小鼠肺组织充血、水肿，可见明显的炎症细胞浸润；而黄酮类成分及利巴韦林均能明显改善上述病理特征，且黄酮类成分高剂

量组疗效优于利巴韦林。

IL-6和TNF- $\alpha$ 是重要的促炎介质，能促进RSV诱导的肺部炎症进展<sup>[11]</sup>。因此使用qRT-PCR检测了肺组织中上述炎症因子的表达水平，如图2-B、C所示，模型组肺组织IL-6和TNF- $\alpha$  mRNA表达水平较对照组显著升高 ( $P < 0.01$ )，而不同剂量的黄酮类成分均能有效降低上述炎症因子mRNA表达水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，提示黄酮类成分有较好的抗炎作用。RSV感染后，小鼠肺组织中可以检测到特异性核酸，与模型组相比，不同剂量的黄酮类成分均可抑制RSV-F的mRNA表达水平 (图2-D,  $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。以上结果表明，清肺口服液黄酮类成分能够改善RSV感染小鼠肺组织病理损伤，减轻肺部炎症，抑制病毒复制。

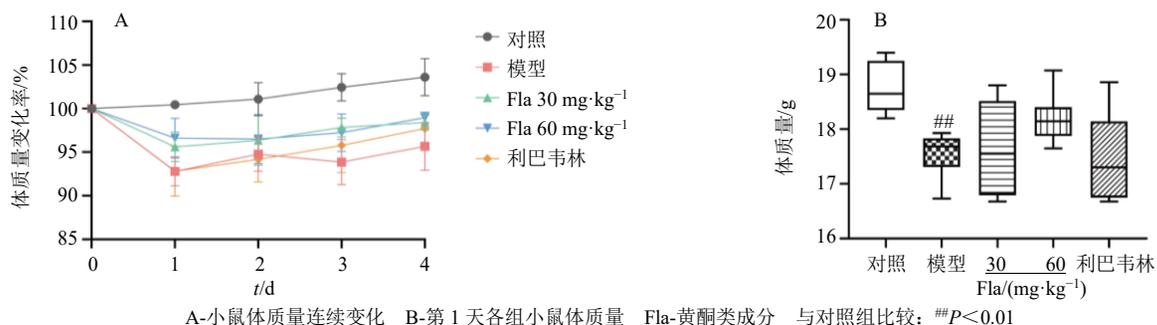


图1 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
A-continuous changes in body weight of mice B-body weight of mice in each group on day 1 Fla-flavonoids ## $P < 0.01$  vs control group

图1 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 1 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on body weight of RSV-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

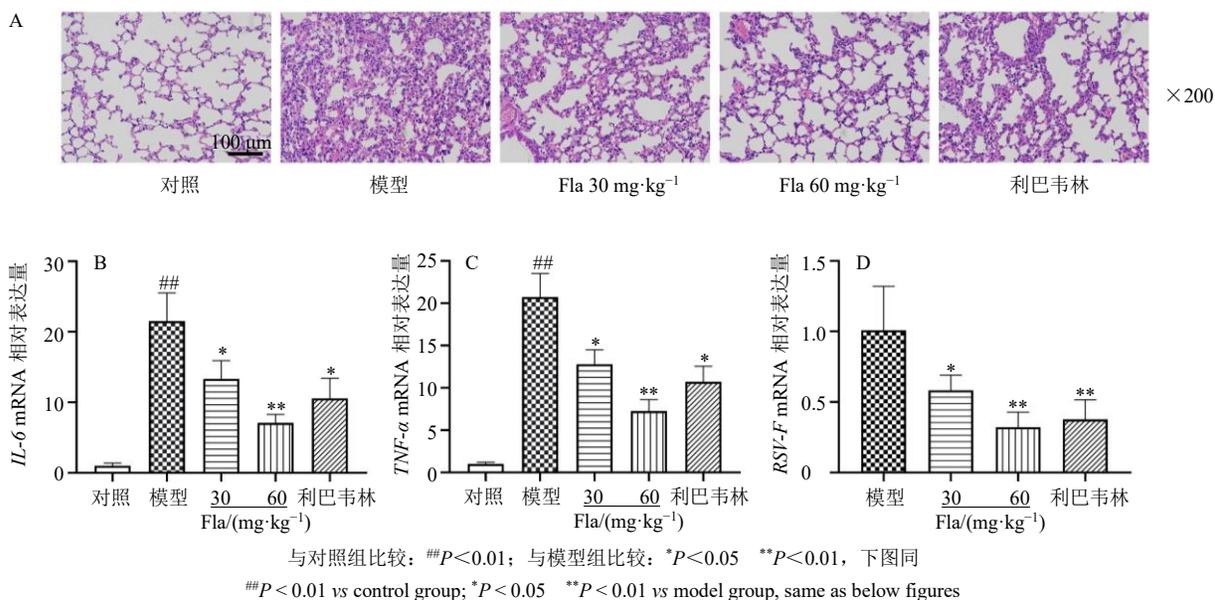


图2 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠肺组织病理(A)以及肺组织IL-6(B)、TNF- $\alpha$ (C)和RSV-F(D)mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

图2 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on lung histopathology (A) and mRNA levels of IL-6 (B), TNF- $\alpha$  (C), RSV-F (D) in lung tissue of RSV-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.3 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织坏死性凋亡的影响

坏死性凋亡是 RSV 感染中常见的细胞死亡方式之一。使用 Annexin V/PI 染料标记肺组织单细胞混悬液,如图 3-A、B 所示,RSV 可以显著增加 Annexin V 和 PI 双阳性率 ( $P < 0.01$ ),提示 RSV 感染增加了肺组织细胞的坏死性凋亡,而黄酮类成分可以降低 RSV 感染后的坏死性凋亡 ( $P < 0.05$ 、

0.01)。

不同于凋亡,坏死性凋亡通常伴随着严重的炎症反应、HMGB1 的释放以及细胞膜的破坏<sup>[12]</sup>。如图 3-C 所示,RSV 诱导 HMGB1 大量释放到 BALF 中 ( $P < 0.01$ ),而黄酮类成分抑制了这一过程 ( $P < 0.05$ 、0.01)。LDH 可用于检测细胞质膜的破坏,如图 3-D 所示,黄酮类成分显著降低 RSV 感染的小鼠 BALF 中 LDH 水平 ( $P < 0.01$ )。

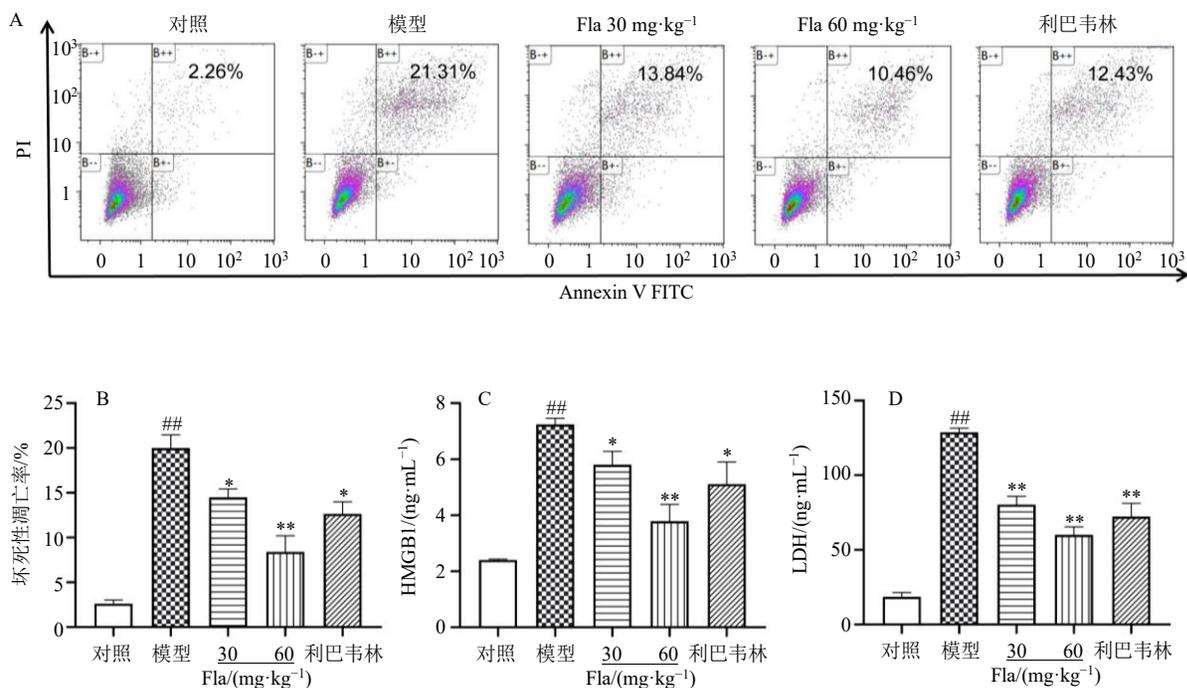


图 3 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织细胞坏死性凋亡率 (A、B) 及 BALF 中 HMGB1 (C)、LDH (D) 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on necroptosis rate of lung tissue cells (A, B) and levels of HMGB1 (C) and LDH (D) in BALF of RSV-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织 RIP1/RIP3/MLKL 通路蛋白表达的影响

尽管坏死性凋亡的分子机制尚未完全阐释清楚,但 RIP1/RIP3/MLKL 已被证实是坏死性凋亡信号通路中的关键靶点<sup>[13]</sup>。为进一步阐述清肺口服液黄酮类成分抑制坏死性凋亡的具体机制,对上述蛋白进行检测。Western blotting 结果(图 4)显示,与对照组相比,RSV 感染后肺组织中 RIP1、RIP3、MLKL 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ )。进一步证实了 RSV 感染通过激活坏死性凋亡的关键靶点,促进肺组织细胞的坏死性凋亡,而黄酮类成分通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL 通路减轻了 RSV 诱导的坏死性凋亡 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

### 3.5 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织 RIP1/RIP3 坏死复合物的影响

通过免疫荧光对肺组织中 RIP1 和 RIP3 的相互作用进行检测,如图 5 所示,RIP1 和 RIP3 的共定位提示 RSV 促进了坏死复合物的形成,而黄酮类成分的干预降低了它们的共定位,抑制了 RIP1 和 RIP3 的相互作用。

### 3.6 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺上皮细胞 p-MLKL 蛋白表达的影响

MLKL 磷酸化是细胞坏死性凋亡通路中不可或缺的步骤<sup>[14]</sup>,免疫荧光结果(图 6)显示,RSV 感染的小鼠肺组织中 p-MLKL 阳性绿色信号明显增加,黄酮类成分处理显著抑制了 p-MLKL 的表达。

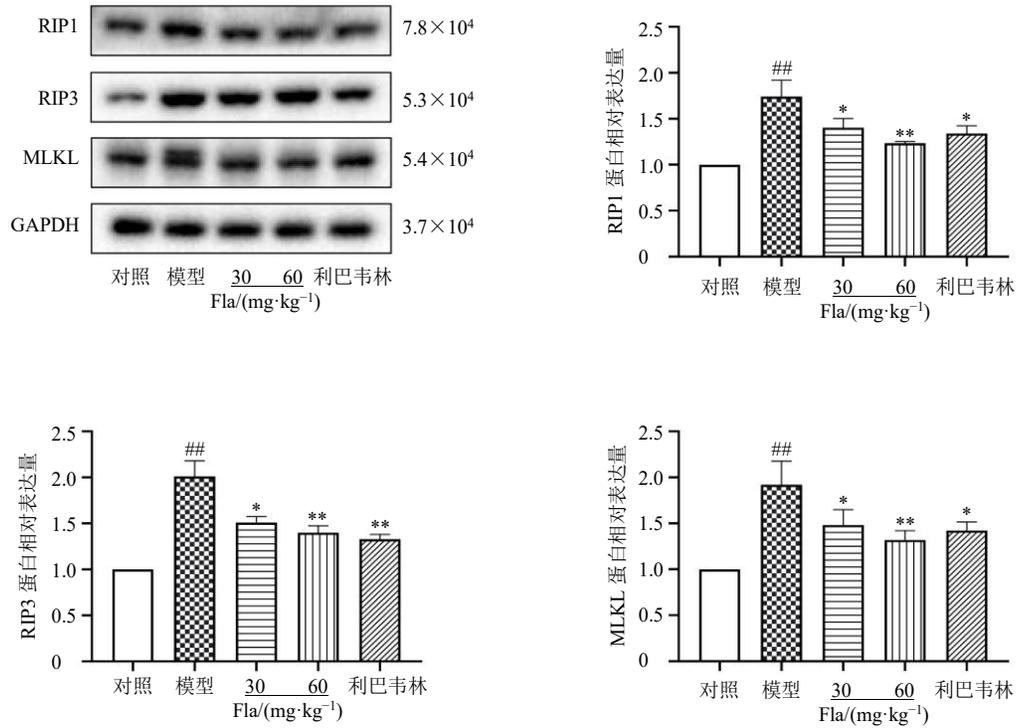


图 4 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织 RIP1、RIP3 和 MLKL 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on RIP1, RIP3 and MLKL protein expressions in lung tissue of RSV-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

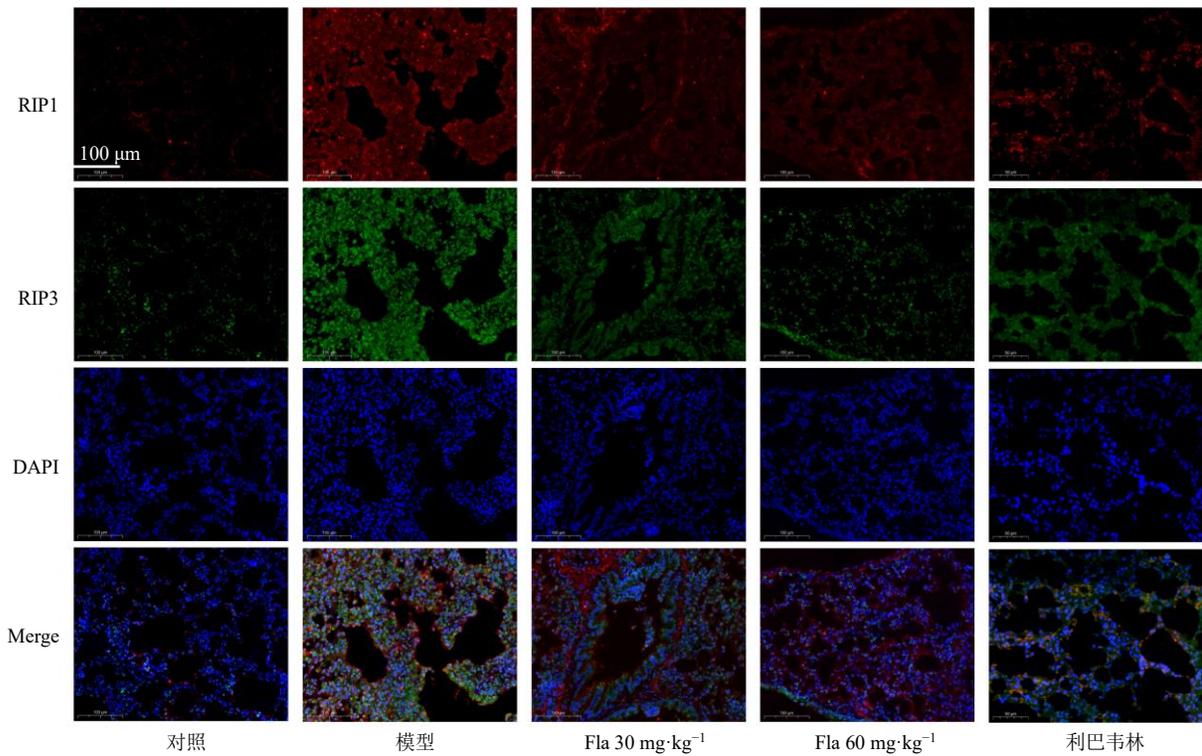


图 5 清肺口服液黄酮类成分对 RSV 感染的小鼠肺组织中 RIP1/RIP3 坏死复合物形成的影响 (×400)

Fig. 5 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on necrotic complex consisting of RIP1/RIP3 in lung tissue of RSV-infected mice (×400)

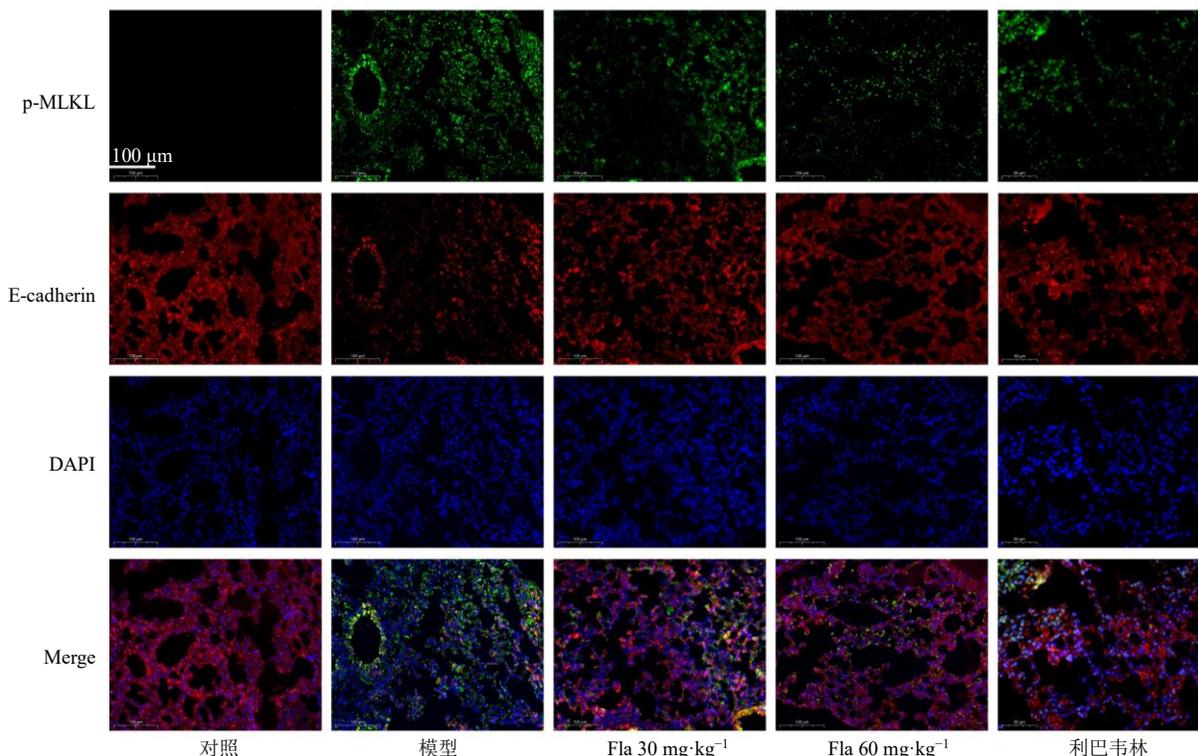


图6 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠肺组织p-MLKL蛋白表达的影响(×400)

Fig. 6 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on p-MLKL protein expression in lung tissue of RSV-infected mice (× 400)

肺上皮细胞是RSV感染的主要靶细胞,增加的p-MLKL染色主要与E-cadherin(上皮细胞的标记物)共定位,这表明黄酮类成分降低了肺上皮细胞中p-MLKL的表达。

### 3.7 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠肺组织PGAM5/DRP1蛋白表达的影响

RIP1/RIP3形成的坏死复合物可能通过诱导线粒体功能紊乱引起坏死性凋亡,这种紊乱涉及多种机制,如激活PGAM5和DRP1<sup>[15]</sup>。PGAM5被激活并移动到线粒体外膜,继而激活DRP1,导致线粒体裂变。PGAM5和DRP1在调节坏死性凋亡和线

粒体功能中都发挥着重要作用。进一步检测参与坏死性凋亡的线粒体蛋白PGAM5和DRP1,如图7所示,与对照组相比,RSV导致小鼠肺组织中PGAM5和DRP1蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01$ ),给予黄酮类成分干预后PGAM5和DRP1蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ),提示黄酮类成分可能通过抑制PGAM5/DRP1减轻坏死性凋亡,改善线粒体功能。

## 4 讨论

RSV严重威胁人类健康,尤其是对婴幼儿、老年人及免疫功能缺陷患者,每年造成巨大的经济损

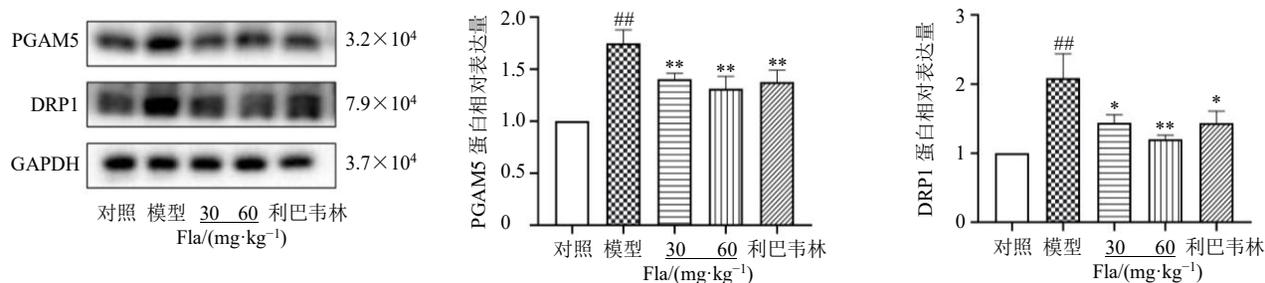


图7 清肺口服液黄酮类成分对RSV感染的小鼠肺组织PGAM5和DRP1蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Effect of flavonoids in Qingfei Oral Liquid on PGAM5 and DRP1 protein expressions in lung tissue of RSV-infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

失。目前批准用于 RSV 预防和治疗的药物分别为帕利珠单抗和利巴韦林<sup>[16]</sup>。但两者均仅适用于 RSV 感染的高危患者,在疗效和安全性方面存在争议<sup>[17-18]</sup>。多项临床研究试验证明清肺口服液治疗 RSV 肺炎取得了显著疗效,具有独特的优势<sup>[8,19]</sup>。本研究发现,RSV 感染的小鼠肺组织中检测出病毒特异性核酸,肺组织病理充血水肿,炎性细胞因子水平明显升高,提示该模型构建成功;经清肺口服液黄酮类成分治疗后,RSV-F、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达水平明显降低,肺组织中炎性浸润减轻,说明清肺口服液黄酮类成分对 RSV 导致的肺部炎症具有改善作用。

坏死性凋亡通常导致大量炎症因子释放<sup>[4]</sup>,是一种新型细胞死亡方式,在 RSV 肺炎的发生与发展中扮演着重要的角色。坏死性凋亡表现为 Annexin V 和 PI 双阳性染色,伴随着 HMGB1 的释放以及细胞膜的破坏,而 LDH 释放是细胞质膜破坏的标志<sup>[12]</sup>。越来越多研究显示黄酮类成分具有减轻坏死性凋亡的作用,芦丁能够通过抑制氧化应激和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)通路改善镉诱导的肝脏损伤和坏死性凋亡<sup>[20]</sup>;橙皮苷能够通过抑制 RIP3/MLKL 介导的坏死性凋亡,改善肠道上皮屏障损伤,从而缓解葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎<sup>[21]</sup>;槲皮素通过调控信号转导和转录激活子 1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)和 NF- $\kappa$ B 通路来抑制大鼠脊髓损伤后小胶质细胞极化为 M1 表型,从而减少突胶质细胞的坏死性凋亡<sup>[22]</sup>。在本研究中,RSV 诱导了肺组织细胞的坏死性凋亡,并导致 HMGB1 和 LDH 释放到 BALF 中,而清肺口服液黄酮类成分可以减轻 RSV 感染后肺组织细胞的坏死性凋亡,并降低 BALF 中 HMGB1、LDH 水平。

坏死性凋亡通路是由 RIP1 激活启动的,随后 RIP1 和 RIP3 形成坏死复合物,募集并磷酸化 MLKL 蛋白,损伤细胞膜,最终导致细胞死亡<sup>[13]</sup>。MLKL 的磷酸化和膜易位是坏死性凋亡的最终执行者。RIP1 抑制剂 Nec-1 可以减轻 RSV 诱导的上皮细胞坏死性凋亡以及 HMGB1 释放<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,清肺口服液黄酮类成分能够减少 RSV 感染后肺组织中 RIP1、RIP3、MLKL 的表达,同时减少坏死复合物的形成,说明清肺口服液黄酮类成分可以参与调节 RIP1/RIP3/MLKL 信号通路。肺上皮细胞是

RSV 感染的主要靶细胞,p-MLKL 与上皮细胞标志物 E-cadherin 的荧光共定位提示,清肺口服液黄酮类成分主要抑制了肺上皮细胞的坏死性凋亡。以上结果说明清肺口服液黄酮类成分可以通过调控 RIP1/RIP3/MLKL 减轻 RSV 感染后肺上皮细胞的坏死性凋亡。

坏死性凋亡伴随着细胞器的损伤,包括线粒体形态和功能障碍。线粒体蛋白 PGAM5 和 DRP1 激活后导致的线粒体裂变也促进了坏死性凋亡<sup>[15]</sup>。抑制或敲低 PGAM5 表达可以通过抑制 DRP1 减少心肌细胞的坏死性凋亡,改善线粒体膜电位和活性氧,从而缓解心肌缺血/再灌注损伤<sup>[24]</sup>。本研究中,清肺口服液黄酮类成分可以降低 RSV 感染后小鼠肺组织中 PGAM5 和 DRP1 蛋白的表达,提示清肺口服液黄酮类成分可以通过调控 PGAM5/DRP1,减轻 RSV 诱导的坏死性凋亡和线粒体功能紊乱。

综上所述,本研究发现清肺口服液黄酮类成分可能通过抑制 RIP1/RIP3/MLKL/PGAM5/DRP1 介导的坏死性凋亡,从而减轻 RSV 导致的肺部炎症损伤,也为清肺口服液的临床应用提供了依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Nair H, Nokes D J, Gessner B D, *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.
- [2] Coutts J, Fullarton J, Morris C, *et al*. Association between respiratory syncytial virus hospitalization in infancy and childhood asthma [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(5): 1104-1110.
- [3] Hu M J, Bogoyevitch M A, Jans D A. Impact of respiratory syncytial virus infection on host functions: Implications for antiviral strategies [J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(4): 1527-1594.
- [4] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation [J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 311-320.
- [5] Santos L D, Antunes K H, Muraro S P, *et al*. TNF-mediated alveolar macrophage necroptosis drives disease pathogenesis during respiratory syncytial virus infection [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57(6): 2003764.
- [6] 赖建敏. 住院儿童呼吸道合胞病毒肺炎中医证候特征分析 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [7] 汪受传, 朱先康, 李江全, 等. 开肺化痰解毒法治疗小儿病毒性肺炎的研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2001, 28(7): 410-412.

- [8] 袁斌, 任现志, 孙轶秋, 等. 清肺口服液治疗小儿呼吸道合胞病毒肺炎 166 例多中心单盲对照临床观察 [J]. 中医杂志, 2009, 50(3): 221-223.
- [9] 李渐坝. 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路探究清肺口服液黄酮类成分抗 RSV 的效应机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [10] 陶嘉磊. 基于 I 型干扰素信号通路探讨清肺口服液类黄酮组分抗 RSV 研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [11] Brown P M, Schneeberger D L, Piedimonte G. Biomarkers of respiratory syncytial virus (RSV) infection: Specific neutrophil and cytokine levels provide increased accuracy in predicting disease severity [J]. *Paediatr Respir Rev*, 2015, 16(4): 232-240.
- [12] Weinlich R, Oberst A, Beere H M, *et al.* Necroptosis in development, inflammation and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(2): 127-136.
- [13] Christofferson D E, Yuan J Y. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 263-268.
- [14] Murphy J M, Czabotar P E, Hildebrand J M, *et al.* The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism [J]. *Immunity*, 2013, 39(3): 443-453.
- [15] Wang Z G, Jiang H, Chen S, *et al.* The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways [J]. *Cell*, 2012, 148(1/2): 228-243.
- [16] Griffiths C, Drews S J, Marchant D J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30(1): 277-319.
- [17] Hebert M F, Guglielmo B J. What is the clinical role of aerosolized ribavirin? [J]. *DICP*, 1990, 24(7/8): 735-738.
- [18] Resch B. Product review on the monoclonal antibody palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(9): 2138-2149.
- [19] 张程, 袁斌, 徐建亚, 等. 清肺口服液对 RSV 肺炎患儿血清中 IL-6 及 TNF- $\alpha$  表达水平的影响 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1216-1217.
- [20] Liu L L, Zhao L Y, Liu Y, *et al.* Rutin ameliorates cadmium-induced necroptosis in the chicken liver via inhibiting oxidative stress and MAPK/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(4): 1799-1810.
- [21] Zhang J X, Lei H B, Hu X, *et al.* Hesperetin ameliorates DSS-induced colitis by maintaining the epithelial barrier via blocking RIPK<sub>3</sub>/MLKL necroptosis signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 873: 172992.
- [22] Fan H, Tang H B, Shan L Q, *et al.* Quercetin prevents necroptosis of oligodendrocytes by inhibiting macrophages/microglia polarization to M1 phenotype after spinal cord injury in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 206.
- [23] Simpson J, Loh Z, Ullah M A, *et al.* Respiratory syncytial virus infection promotes necroptosis and HMGB1 release by airway epithelial cells [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201(11): 1358-1371.
- [24] She L, Tu H, Zhang Y Z, *et al.* Inhibition of phosphoglycerate mutase 5 reduces necroptosis in rat hearts following ischemia/reperfusion through suppression of dynamin-related protein 1 [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2019, 33(1): 13-23.

[责任编辑 李亚楠]