

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.18.009

菊花总黄酮对 RSV 感染 A549 细胞趋化因子的影响 *

周春晶 刘玉凤 李宏宇 李 军 孙秀英

(辽宁中医药大学附属第四医院 辽宁 沈阳 110032)

摘要 目的:探讨菊花总黄酮对小儿 RSV 感染 A549 细胞诱导 RANTES 及 MCP-1 释放作用影响。**方法:**实验分为细胞对照组,病毒对照组,菊花总黄酮组和病毒唑组。在 Hep-2 细胞和 A549 细胞分别加入菊花总黄酮和病毒唑的含药维持液,测定上述两种药物的最大无毒浓度;RSV 病毒感染 Hep-2 细胞,观察药物对 RSV 的病毒抑制作用;RSV 感染 A549 细胞,ELISA 法测细胞趋化因子 RANTES 及 MCP-1 含量。**结果:**菊花总黄酮 50 % 有效率优于病毒唑组,差异有统计学意义($P < 0.05$);RANTES 及 MCP-1 释放抑制作用比较中,菊花总黄酮组 RANTES、MCP-1 明显降低,优于病毒唑组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**菊花总黄酮能够抑制 RSV 病毒活性,明显降低 A549 细胞释放 RANTES、MCP-1,缓解患儿的呼吸道症状,对临床具有指导意义,值得临床推广。

关键词: 菊花总黄酮;RSV 感染;A549 细胞趋化因子;RANTES;MCP-1

中图分类号: R725;R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)18-3435-03

Effects of Chrysanthemum Decoction on Chemokine of RSV Infection in A549 Cells*

ZHOU Chun-jing, LIU Yu-feng, LI Hong-yu, LI Jun, SUN Xiu-ying

(Fourth Hospital Affiliated to Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning, 110032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of chrysanthemum Decoction on RANTES and MCP-1 release induced by RSV infection in A549 cells. **Methods:** The experiment was divided into control group, virus control group, chrysanthemum Decoction group and ribavirin group. Chrysanthemum Decoction and Ribavirin were added in Hep-2 cells and A549 cells containing maintenance medium. The maximum non-toxic concentration of the two drugs was determined; after RSV infected Hep-2 cells, chrysanthemum Decoction and virus of Polish containing maintenance solution was respectively added, and to observe the inhibitory effects of this drug for A549 cells infected with RSV. Using ELISA method, the level of cell chemokine RANTES and MCP-1 was detected. **Results:** Total flavonoids in chrysanthemum had an efficiency of 50 %, which was superior to ribavirin group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); RANTES and MCP-1 decreased significantly in Chrysanthemum group, and the difference was statistically significant compared with that of the ribavirin group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Chrysanthemum decoction could inhibit RSV virus activity, reduce the release of RANTES and MCP-1 in A549 cells.

Key words: Chrysanthemum Decoction; RSV infection; A549 cell chemotactic factor; RANTES; MCP-1

Chinese Library Classification(CLC): R725; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)18-3435-03

前言

小儿 RSV 感染是由于呼吸道合胞病毒感染而引起的一种间质性肺炎及毛细支气管炎性疾病^[1]。临床表现为鼻塞、咳嗽、发热,严重者可发展为呼吸喘憋、口唇发紫、鼻扇及三凹征^[2]。多发于婴幼儿,男女比例约为 1.5-2:1^[3]。据调查统计^[4],我国小儿 RSV 感染患儿的发病率 1 到 6 月的婴幼儿占 83 %,男:女为 4.5:1。研究发现^[5],菊花总黄酮能够起到抗病毒的作用。本研究观察菊花总黄酮对 RSV 增殖抑制作用及对 RSV 感染 A549 引发的趋化因子 RANTES、MCP-1 释放的影响,来探究菊花总黄酮治疗小儿呼吸道合胞病毒感染呼吸道的分子学机理。

1 材料与方法

1.1 实验材料

A549 细胞株由中山大学动物实验室提供;Hep-2 细胞由广州中医药大学热带医学研究所病毒室提供;RSV 病毒由广州中医药大学热带研究所提供;菊花总黄酮(QL70334)购自安徽省蚌埠市药品检验所;阳性对照药病毒唑由湖北医工所提供(批号:020804);二甲基亚砜(DMSO)由天津市凯力达化工贸易有限公司生产;MEM、胰蛋白酶由上海诚凛生物科技有限公司提供;新生小牛血清由上海源叶生物科技有限公司提供;注射用青霉素钠由华北制药股份有限公司提供;注射用硫酸链霉素由上海索普进出口有限公司提供;实验器械医用净化工作台由苏州市亿达净化实验室设备有限公司提供;瑞士帝肯酶标仪 Infinite F50 由迪奥生物科技有限公司提供;96 孔板由 CONIG 公司提供;CSW-X20CCL 倒置显微镜深圳市科视威光学仪器

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30192101)

作者简介:周春晶,女,主治医师,主要研究方向:小儿哮喘、支气管肺炎、腹泻等

(收稿日期:2014-12-25 接受日期:2015-01-16)

有限公司提供;三足式普通离心机由张家港市润星机械厂提供。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞株培养 用含 10 %FCS MEM (青霉素 100 g/mL、链霉素 100 g/mL)做培养基,以 1×10^5 /mL 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 5 % CO₂ 36 °C 培养箱中培养,2 天后换液,待细胞长至基本融合状态时应用于实验。设立正常对照组、病毒对照组、病毒唑组与菊花总黄酮组。

1.2.2 A549 及 Hep-2 细胞毒性测定 采用 TCID₅₀ 微量法,病毒为 100 TCID₅₀/0.1 mL。四甲基偶氮砷盐(MTT)方法检测细胞毒性,将 A549 细胞消化,加入 96 孔板中,24 h 后弃上清,每孔滴入 200 μg 菊花总黄酮,浓度分别为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、160 μg/mL、320 μg/mL、640 μg/mL、800 μg/mL、1600 μg/mL,重复 4 孔,置于 5 % CO₂ 36 °C 培养箱中,48-72 h 后判断结果,测定菊花总黄酮对 Hep-2 细胞的毒性。

1.2.3 RSV 生物合成抑制率测定 用 Hep-2 细胞调整至 2×10^5 /mL,将细胞接种于 100 μL100 TCID₅₀RSV 病毒后,置于 36 °C 温箱内吸附 90 min 后弃上清,每孔加入 0.2 mL 菊花总黄酮,浓度分别为 2 μg/mL、4 μg/mL、8 μg/mL、16 μg/mL、32 μg/mL、64 μg/mL、128 μg/mL。隔天换液。记录 CPE 结果:"果"表示无 CPE;"+"表示 25 % CPE;"++"表示 50 % CPE;"+++"表示 75

% CPE;"++++"表示 100 % CPE。病毒对照组出现 "+++-++++"时弃上清,用 MTT 法监测病毒抑制率。

1.2.4 RSV 感染 A549 细胞对 RANTES 及 MCP-1 释放作用的影响 正常组细胞不进行干预,另外 3 组将细胞接种 RSV 病毒,病毒唑组加入 200 μg 病毒唑,菊花总黄酮组加入 200 μg 菊花总黄酮药液进行干预,置于 5 % CO₂ 36 °C 培养箱中,48 小时后,采用酶联免疫吸附分析(ELISA)测定细胞 RANTES 和 MCP-1 含量。

1.3 统计学方法

采用软件 SPSS17.0 进行统计学处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菊花总黄酮对 Hep-2 及 A549 细胞毒性作用

菊花总黄酮对 Hep-2 及 A549 细胞的毒性作用表现为:细胞粘连、脱落、变圆、胞浆内颗粒增加、吸光度下降,将不同浓度菊花总黄酮和病毒唑作用于 Hep-2 和 A549 细胞,对 Hep-2 最大无毒浓度比较中,病毒唑组最大无毒浓度较高,差异具有统计学意义,P<0.05;A549 细胞比较中,菊花总黄酮无毒浓度较高,差异具有统计学意义,P<0.05。结果如表 1。

2.2 菊花总黄酮对 RSV 的抑制作用

表 1 菊花总黄酮对 Hep-2 和 A549 细胞毒性作用的最大无毒浓度比较

Table 1 Comparison of maximum non-toxic concentration of Chrysanthemum Decoction and Ribavirin on Hep-2 and A549 cell toxicity

Group	n	Hep-2 (μg/mL)	A549 cell (μg/mL)
Chrysanthemum Decoction group	24	248.7*	230.4*
Ribavirin group	24	356.4	173.5

Note: *P<0.05, compared with Ribavirin group.

根据上述结果,选择无毒浓度 <160 μg/mL 进行抗 RSV 实验,由表 2 可知,增加菊花总黄酮的浓度,药物抗病毒活性增强,病变减弱,病毒抑制率上升。菊花总黄酮 50 %有效率优于

病毒唑组,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 菊花总黄酮对 RSV 感染 A549 诱导趋化因子释放的影响

表 2 菊花总黄酮抗 RSV 的作用比较(%)

Table 2 Comparison of anti RSV effect of different concentration of chrysanthemum Decoction and Ribavirin (%)

Group	Virus inhibitory rate of Different concentration							50 % efficiency (IC50)	X ²	P
	2	4	8	16	32	64	128			
Chrysanthemum Decoction group	2.9	6	17.8	20.2	34.4	40.2	58.2	96.60 %	44.520	0.001
Ribavirin group	3.2	5.1	10.2	11.5	13.3	36.2	100.1	65.10 %		

与正常组比较,病毒对照组、菊花总黄酮组及病毒唑组 MCP-1 与 RANTES 明显升高,差异具有统计学意义(P<0.05);与病毒对照组比较,病毒唑组与菊花总黄酮组的两个指标均降低,差异具有统计学意义(P<0.05);与病毒唑组比较,菊花总黄酮组 MCP-1 与 RANTES 明显降低,差异具有统计学意义(P<0.05)。结果见表 3。

3 讨论

RANTES 由正常 T 细胞表达分泌,主要功能是趋化细胞

迁移,细胞沿着趋化因子浓度增加的信号向趋化因子多的地方迁移,从而完成免疫反映^[11-14]。RANTES 可引起嗜酸粒细胞、单核细胞、巨噬细胞等炎症细胞的趋化激活,但对中性粒细胞的作用较小^[15]。RANTES 不仅可以活跃自然杀伤细胞的迁徙能力,还能激活记忆 T 细胞^[16]。MCP-1 是趋化因子 CC (chemokine CC subfamily)亚家族中的一员,能够趋化嗜酸性粒细胞和单核细胞^[17]。

本实验结果显示,正常 A549 细胞分泌一定量 RANTES 及 MCP-1,当受到 RSV 病毒感染时,RANTES 和 MCP-1 释放则

表 3 菊花总黄酮对 RSV 感染 A549 细胞诱导 RANTES 及 MCP-1 释放的影响

Table 3 Effects of Chrysanthemum Decoction on RANTES and MCP-1 release induced by RSV infected A549 cells

Group	n	MCP-1 (μg/mL)	RANTES (μg/mL)
Control group	24	1.45± 0.96	5.78± 3.57
Virus control group	24	3.25± 1.16 [#]	41.68± 12.02 [#]
Ribavirin group	24	3.11± 0.87 ^{**}	28.82± 10.32 ^{**}
Chrysanthemum Decoction group	24	2.18± 1.02 ^{#*△}	20.32± 7.65 ^{#*△}

Note: #P<0.01, compared with control group; *P<0.05, compared with Virus control group; △P<0.05, compared with Ribavirin group.

显著增加(P<0.05)。结果提示,RSV 病毒可以刺激 A549 细胞产生 RANTES 及 MCP-1,诱导大量炎性细胞生成,如嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞在气道中聚集,引起严重的呼吸道反应^[18]。体外实验研究结果提示,菊花总黄酮具有直接抗 RSV 的作用,随着菊花总黄酮浓度增加,则抗病毒活性增强,病毒毒性减弱,病毒抑制率升高,且菊花总黄酮的安全范围大^[19]。本实验结果显示,菊花总黄酮可使 RANTES 和 MCP-1 明显降低,明显优于病毒唑组(P<0.05)。说明菊花总黄酮治疗小儿 RSV 肺炎不仅可以抗病毒,而且能在一定程度上抑制 RANTES 和 MCP-1 释放,改善患儿的病情,且效果优于病毒唑,具有良好的临床效果^[20]。

综上所述,菊花总黄酮不仅能抗病毒,还可以抑制上皮细胞释放 RANTES 和 MCP-1,减轻呼吸道症状,改善呼吸功能,提高临床治疗效果。

参考文献(References)

- [1] Chen J, Liu Z, Hong MM, et al. Proangiogenic Compositions of Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115316
- [2] Zhang RL, Zhang JP, Wang QQ. Recombinant Treponema pallidum Protein Tp0965 Activates Endothelial Cells and Increases the Permeability of Endothelial Cell Monolayer [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115134
- [3] Vilahur G, Cubedo J, Padró T, et al. Intake of cooked tomato sauce preserves coronary endothelial function and improves apolipoprotein A-I and apolipoprotein J protein profile in high-density lipoproteins [J]. Transl Res, 2014, [Epub ahead of print]
- [4] Oskeritzian CA, Hait NC, Wedman P, et al. The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, [Epub ahead of print]
- [5] Song Z, Bai J, Zhang L, et al. Effects of telmisartan on inflammation and fibrosis after acute myocardial infarction in rats [J]. National Medical Journal of China, 2014, 94(33): 2628-2633
- [6] Frenay AR, Yu L, Velde AR, et al. Pharmacological inhibition of galectin-3 protects against hypertensive nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, [Epub ahead of print]
- [7] Lu W, Zhang Z, Fu C, et al. Intermediate Monocytes Lead to Enhanced Myocardial Remodelling in STEMI Patients With Diabetes [J]. Int Heart J, 2014, [Epub ahead of print]
- [8] Meijerink H, Indrati A, Soedarmo S, et al. Heroin use in Indonesia is associated with higher expression of CCR5 on CD4+ cells and lower ex-vivo production of CCR5 ligands[J]. AIDS, 2014, [Epub ahead of print]
- [9] Oskeritzian CA, Hait NC, Wedman P, et al. The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell-dependent acute allergic responses[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, [Epub ahead of print]
- [10] Nilsen NJ, Vladimer GI, Stenvik J, et al. A Role for the Adaptor Proteins TRAM and TRIF in Toll-Like Receptor 2 Signaling [J]. J Biol Chem, 2014, 289(11): 778-781
- [11] Kaul D, Arora M, Garg A, et al. MALT1 induced immune response is governed by miR-2909 RNomics[J]. Mol Immunol, 2015, 64(1):210-217
- [12] Sanpui P, Zheng X, Loeb JC, et al. Single-walled carbon nanotubes increase pandemic influenza A H1N1 virus infectivity of lung epithelial cells[J]. Part Fibre Toxicol, 2014, 11(1): 66
- [13] Zapó r L. Evaluation of the Toxic Potency of Selected Cadmium Compounds on A549 and CHO-9 Cells [J]. Int J Occup Saf Ergon, 2014, 20(4): 573-581
- [14] Zhao M, Zhang Y, Zhang H, et al. Hypoxia-induced cell stemness leads to drug resistance and poor prognosis in lung adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2014, 12(14):490-495
- [15] Ilori TO1, Blount MA, Martin CF, et al. Urine concentration in the diabetic mouse requires both urea and water transporters [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(1): F103-111
- [16] Cai Q, Nelson SK, McReynolds MR, et al. Vasopressin increases expression of UT-A1, UT-A3, and ER chaperone GRP78 in the renal medulla of mice with a urinary concentrating defect [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(4): F712-719
- [17] Yi JL, Wang Y, Jing H, et al. Buzhong yiqi decoction containing serum reversed resistance of A549/DDP to cisplatin and its effect on the expression of survivin: an experimental research [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2014, 34(10): 1250
- [18] Lee YG, Jeong J, Raftis J, et al. Determination of adsorption affinity of nanoparticles for interleukin-8 secreted from a549 cells by in vitro cell-free and cell-based assays [J]. J Toxicol Environ Health A, 2015, 78(3): 185-195
- [19] Luyen BT, Tai BH, Thao NP, et al. Anti-inflammatory components of Chrysanthemum indicum flowers [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 11(27): 235-239
- [20] Xia X, Shao Y, Jiang J, et al. Gene expression profiles responses to aphid feeding in chrysanthemum (Chrysanthemummorifolium) [J]. BMC Genomics, 2014,15(1): 1050