

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.08.005

甜橙黄酮通过调节 AMPK/mTOR 信号通路改善呼吸道合胞病毒感染大鼠的肺组织损伤 *

龙 苏¹ 袁 媛¹ 禹文峰² 杨国辉³ 刘晓娴^{3Δ}

(1 贵州医科大学附属医院急诊科 贵州 贵阳 550002; 2 贵州医科大学基础医学院 贵州 贵阳 550025;

3 贵州医科大学附属医院内科 ICU 贵州 贵阳 550002)

摘要 目的:探讨甜橙黄酮通过 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路对呼吸道合胞病毒(RSV)感染大鼠肺组织损伤的改善作用。**方法:**将 30 只雄性 Wistar 大鼠分为对照组、模型组、甜橙黄酮低剂量组(14 mg/kg)、甜橙黄酮中剂量组(28 mg/kg)、甜橙黄酮高剂量组(56 mg/kg)、甜橙黄酮高剂量+AICAR 组(56 mg/kg+500 mg/kg 的 AMPK 激活剂 AICAR),计算大鼠肺指数。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法测定肺组织 RSV 病毒载量,酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠肺泡灌洗液炎症因子水平,HE 染色测定肺组织病理,蛋白免疫印迹(Western blot)法测定 AMPK/mTOR 通路蛋白表达。**结果:**与对照组相比,模型组大鼠肺组织存在炎性浸润,排列松散,肺指数、肺组织 RSV 病毒载量、肺泡灌洗液白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平、炎症评分、p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组相比,甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组大鼠肺组织损伤减轻,大鼠肺指数、肺组织 RSV 病毒载量、肺泡灌洗液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、炎症评分、p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达降低($P<0.05$);与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量+AICAR 组大鼠肺组织损伤加重,肺指数、肺组织 RSV 病毒载量、肺泡灌洗液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、炎症评分、p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论:**甜橙黄酮可能通过抑制 AMPK/mTOR 信号通路发挥对 RSV 诱导的大鼠抗炎、抗病毒、抗肺部损伤作用。

关键词:甜橙黄酮;呼吸道合胞病毒;肺组织损伤;AMPK/mTOR 信号通路

中图分类号:R-33;R373.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)08-1424-06

Sinensetin Improve Lung Tissue Damage in Rats Infected with Respiratory Syncytial Virus by Regulating AMPK/mTOR Signaling Pathway*

LONG Su¹, YUAN Yuan¹, YU Wen-feng², YANG Guo-hui³, LIU Xiao-xian^{3Δ}

(1 Department of Emergency, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550002, China;

2 Basic Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550025, China;

3 Internal Medicine ICU, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the ameliorating effect of Sinensetin on lung tissue damage in rats infected with respiratory syncytial virus (RSV) through AMP-dependent protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods:** 30 male Wistar rats were grouped into control group, model group, low-dose Sinensetin group (14 mg/kg), medium-dose Sinensetin group (28 mg/kg), high-dose Sinensetin group (56 mg/kg), high-dose Sinensetin combined AICAR group (56 mg/kg combined 500 mg/kg of AMPK activator AICAR), the lung index of rats was calculated. The viral load of RSV in lung tissue was determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The levels of inflammatory factors in alveolar lavage fluid of rats were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lung histopathology was determined by HE staining, and Western blot was used to measure the expression of AMPK/mTOR pathway proteins. **Results:** Compared with the control group, the lung tissue of the model group had inflammatory infiltration, and was loosely arranged, the lung index, RSV viral load in lung tissue, levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid, inflammation score, expression of p-AMPK/AMPK and mTORC1 protein increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the rats of the low-dose Sinensetin group, the medium-dose Sinensetin group, and the high-dose Sinensetin group had reduced lung tissue damage, the lung index of rats, RSV viral load in lung tissue, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in bronchoalveolar lavage fluid, inflammation score, expression of p-AMPK/AMPK, and mTORC1 decreased ($P<0.05$). Compared with the high-dose Sinensetin group, the lung tissue damage of the rats of the high-dose Sinensetin combined AICAR group was aggravated, the lung index, RSV viral load in lung tissue, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α in bronchoalveolar

* 基金项目:贵阳市科技计划项目([2020]-16-8 号);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwjkj2020-1-024)

作者简介:龙苏(1985-),女,本科,住院医师,从事急诊、呼吸病学方向的研究,E-mail: longsu3708@163.com

Δ 通讯作者:刘晓娴(1983-),女,硕士,副主任医师,从事重症医学、呼吸病学方向的研究,E-mail: 346642031@qq.com

(收稿日期:2022-10-21 接受日期:2022-11-16)

lavage fluid, inflammation score, expression of p-AMPK/AMPK and MTORC1 increased ($P<0.05$). **Conclusion:** Sinensetin may play anti-inflammatory, anti-viral and anti-lung injury effects on RSV-induced rats by inhibiting the activation of AMPK/mTOR signaling pathway.

Key words: Sinensetin; Respiratory syncytial virus; Lung tissue damage; AMPK/mTOR signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R373.14 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)08-1424-06

前言

呼吸道合胞病毒(RSV)是副黏病毒科的肺病毒属中的一种病毒,可引发婴幼儿毛细支气管炎和肺炎等下呼吸道感染或鼻炎、感冒等上呼吸道感染,且传染性较强,其引发肺部感染的原因可能与婴幼儿免疫功能低下有关,给婴幼儿的生存质量带来挑战^[1,2]。中药在病毒性感染的治疗中具有独特优势,耐药性低,不良反应少,多种中药被证实对病毒性感冒引发的肺炎疗效良好^[3-5]。寻找治疗 RSV 引发的肺炎治疗药物是临床热点。甜橙黄酮是提取自柑橘属植物的果实,具有抗菌消炎、防治心血管疾病、抗氧化、抗病毒、抗癌等药理功效^[6]。研究显示,甜橙黄酮可降低甲型流感病毒引发的炎症反应^[7],关于甜橙黄酮是否能抑制 RSV 引发的肺炎损伤还未见研究。Gao Y^[8]等人的实验指出 AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路在肺损伤中发挥了重要作用。本研究主要探讨甜橙黄酮能否经由 AMPK/mTOR 通路改善 RSV 诱导的大鼠肺损伤,为临床 RSV 感染的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂、仪器

30 只雄性 Wistar 大鼠,3 周龄,体重 50~70g,由贵州医科大学提供,许可证号:[SYXK(黔)2021-0007]。RSV 购自中国科学院武汉病毒研究所,甜橙黄酮购自上海源叶生物科技有限公司,AICAR 购自美国 MCE 公司,ECL 化学发光试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、BCA 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,白细胞介素(IL)-1 β ELISA 试剂盒、IL-6 ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒购自上海酶联科技生物有限公司,兔抗 p-AMPK、AMPK、mTOR、GAPDH、HRP 标记的羊抗兔购自美国 abcam 公司。PCR 仪购自上海迈程医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物建模、分组与干预方法 将 30 只雄性大鼠分为对照组、模型组、甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组、甜橙黄酮高剂量+AICAR 组,每组 5 只大鼠,造模过程中未见大鼠死亡。除对照组大鼠生理盐水滴鼻外,其余各组大鼠均由乙醚麻醉后,给予 10 倍半数组织培养感染剂量(TICD50)的 RSV 100 μ L 滴鼻,连续 3 天^[9]。甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组在造模后 2 h 后,分别经腹腔注射 14 mg/kg、28 mg/kg、56 mg/kg 剂量的甜橙黄酮,溶剂为 DMSO,连续给药 7 d;甜橙黄酮高剂量+AICAR 组除给予 56 mg/kg 的甜橙黄酮外,腹腔一次注射 500 mg/kg 的 AMK 激活剂 AICAR,对照组与模型组以等量 DMSO 代替。

1.2.2 肺指数测定 待给药结束后,称量并记录大鼠体重,

戊巴比妥钠麻醉后将大鼠断头处死,分离大鼠肺组织,计算肺指数,肺指数=肺重/体重 $\times 100\%$ 。将左肺组织、右肺组织分离,右肺组织生理盐水清洗,收集肺泡灌洗液、右肺组织、左肺组织待后续检测。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)法测定肺组织 RSV 病毒载量 分离一部分肺组织,提取总核糖核酸(RNA),并将一部分 RNA 反转录为 cDNA,通过 qRT-PCR 试剂盒进行扩增,程序设定为 95 $^{\circ}$ C 预处理 2 min,(95 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 10 s) $\times 40$ 次。以 Ct 值代表 RSV 病毒载量。RSV 上游引物:5'-GTTGGAACTGCACCTCATCC-3',下游引物:5'-ATCGAGGTGAACACTAATGG-3';GAPDH 上游引物:5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3',下游引物:5'-TG-GAAATTGTGAGGGAGATGC-3'。

1.2.4 酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠肺泡灌洗液炎症因子水平 收集肺泡灌洗液后离心并收集上清液,严格按照 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 试剂盒说明书操作步骤,通过 ELISA 法测定收集到的上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

1.2.5 HE 染色测定肺组织病理 将肺组织固定在 4%多聚甲醛中,然后将它们包埋在石蜡中并切成 5 μ M 的切片,切片进行苏木精-伊红染色。乙醇梯度脱水,封片,观察切片大鼠肺组织病理,并对炎症细胞浸润进行评分,0 分、1 分、3 分、5 分分别代表无炎症细胞浸润、轻度浸润、中度浸润、重度浸润。

1.2.6 蛋白免疫印迹(Western blot)法测定 AMPK/mTOR 通路蛋白表达 裂解并提取肺组织总蛋白。BCA 试剂盒定量蛋白,将等量的蛋白质样品经电泳、转膜、封闭后,加入一抗 p-AMPK、AMPK、mTOR,均为 1:1000 稀释,并以 GAPDH 作为内参(1:5000),在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,然后加入 HRP 偶联的羊抗兔二抗在常温下孵育 1 h,通过 ECL 化学发光试剂盒观察蛋白显色情况,通过 Image J 软件分析蛋白质条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 对本研究的数据进行统计学分析,所有结果均表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。两组比较采用独立样本 t 检验,多组间(对照组、模型组、甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组)比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 SNK-q 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甜橙黄酮对肺指数、RSV 病毒载量的影响

与对照组相比,模型组大鼠肺指数、RSV 病毒载量升高($P<0.05$);与模型组相比,甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组大鼠肺指数、RSV 病毒载量依次降低($P<0.05$);与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量+AICAR 组大鼠肺指数、RSV 病毒载量升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肺指数比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of lung index of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Lung index(%)	RSV viral load(1×10^5)
Control group	5	0.58 $\pm$ 0.09	0
Model group	5	1.37 $\pm$ 0.12 ^a	188.72 $\pm$ 20.35 ^a
Low-dose Sinensetin group	5	1.10 $\pm$ 0.19 ^b	103.78 $\pm$ 13.41 ^b
Medium-dose Sinensetin group	5	0.84 $\pm$ 0.10 ^{bc}	84.52 $\pm$ 8.70 ^{bc}
High-dose Sinensetin group	5	0.61 $\pm$ 0.06 ^{bcd}	31.64 $\pm$ 3.27 ^{bcd}
High-dose Sinensetin combined AICAR group	5	0.75 $\pm$ 0.07 ^c	55.38 $\pm$ 3.61 ^c
F		33.593	211.132
P		<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^b $P < 0.05$. Compared with the low-dose Sinensetin group, ^c $P < 0.05$. Compared with the medium-dose Sinensetin group, ^d $P < 0.05$. Compared with the high-dose Sinensetin group, ^e $P < 0.05$.

2.2 甜橙黄酮对大鼠肺泡灌洗液炎症因子水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠肺泡灌洗液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高($P < 0.05$);与模型组相比,甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组大鼠肺泡灌洗液 IL-1 β 、

IL-6、TNF- α 水平依次降低($P < 0.05$);与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量 +AICAR 组大鼠肺泡灌洗液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠肺泡灌洗液炎症因子情况($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Inflammatory factors in alveolar lavage fluid of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (ng/mL)
Control group	5	14.57 $\pm$ 1.61	10.52 $\pm$ 1.16	73.46 $\pm$ 8.16
Model group	5	89.38 $\pm$ 9.93 ^a	74.93 $\pm$ 8.32 ^a	271.68 $\pm$ 30.18 ^a
Low-dose Sinensetin group	5	74.32 $\pm$ 8.50 ^b	58.71 $\pm$ 6.52 ^b	222.19 $\pm$ 24.62 ^b
Medium-dose Sinensetin group	5	52.34 $\pm$ 5.81 ^{bc}	34.60 $\pm$ 3.84 ^{bc}	175.59 $\pm$ 20.73 ^{bc}
High-dose Sinensetin group	5	34.69 $\pm$ 3.85 ^{bcd}	28.76 $\pm$ 3.19 ^{bcd}	140.35 $\pm$ 15.59 ^{bcd}
High-dose Sinensetin combined AICAR group	5	61.94 $\pm$ 6.88 ^c	43.67 $\pm$ 4.85 ^c	190.74 $\pm$ 21.17 ^c
F		59.358	74.751	293.234
P		<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$. Compared with the model group, ^b $P < 0.05$. Compared with the low-dose Sinensetin group, ^c $P < 0.05$. Compared with the medium-dose Sinensetin group, ^d $P < 0.05$. Compared with the high-dose Sinensetin group, ^e $P < 0.05$.

2.3 甜橙黄酮对大鼠肺组织病理和炎症评分的影响

对照组大鼠肺组织排列整齐,结构完整;模型组大鼠肺组织存在炎症浸润,排列松散,肺泡壁变厚;与模型组相比,甜橙黄酮低、中、高剂量组大鼠肺组织炎症浸润减轻,排列逐渐紧密;与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量 +AICAR 组大鼠肺损伤加重,见图 1。

与对照组相比,模型组大鼠肺组织炎症评分升高($P < 0.05$);与模型组相比,甜橙黄酮低剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组大鼠肺组织炎症评分依次降低($P < 0.05$);与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量 +AICAR 组大鼠肺组织炎症评分升高($P < 0.05$),见表 3。

2.4 甜橙黄酮对大鼠 AMPK/mTOR 通路蛋白的影响

与对照组相比,模型组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达升高($P < 0.05$);与模型组相比,甜橙黄酮低

剂量组、甜橙黄酮中剂量组、甜橙黄酮高剂量组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达依次降低($P < 0.05$);与甜橙黄酮高剂量组相比,甜橙黄酮高剂量 +AICAR 组大鼠肺组织 p-AMPK/AMPK、mTORC1 蛋白表达升高($P < 0.05$),见表 4、图 2。

3 讨论

RSV 是引发婴幼儿肺部感染的常见病原体,具有较强感染力,可诱导肺组织炎症,引发肺部损伤^[10-12]。婴幼儿免疫系统弱,肺气不足,外染风寒,经由口鼻、皮肤接触 RSV,入侵肺部,致使肺部受损,咳嗽不止,经久不愈^[13-15]。临床中主要通过广泛抑炎与免疫抑制治疗肺炎疾病,常用的治疗西药为糖皮质激素,对机体免疫有重要调节作用,但其对病毒性肺炎的疗效有争议,且副作用明显^[16-18]。通过中药或中药提取物治疗 RSV 引发的肺部损伤是可行方案之一,也是迫切的临床需求。

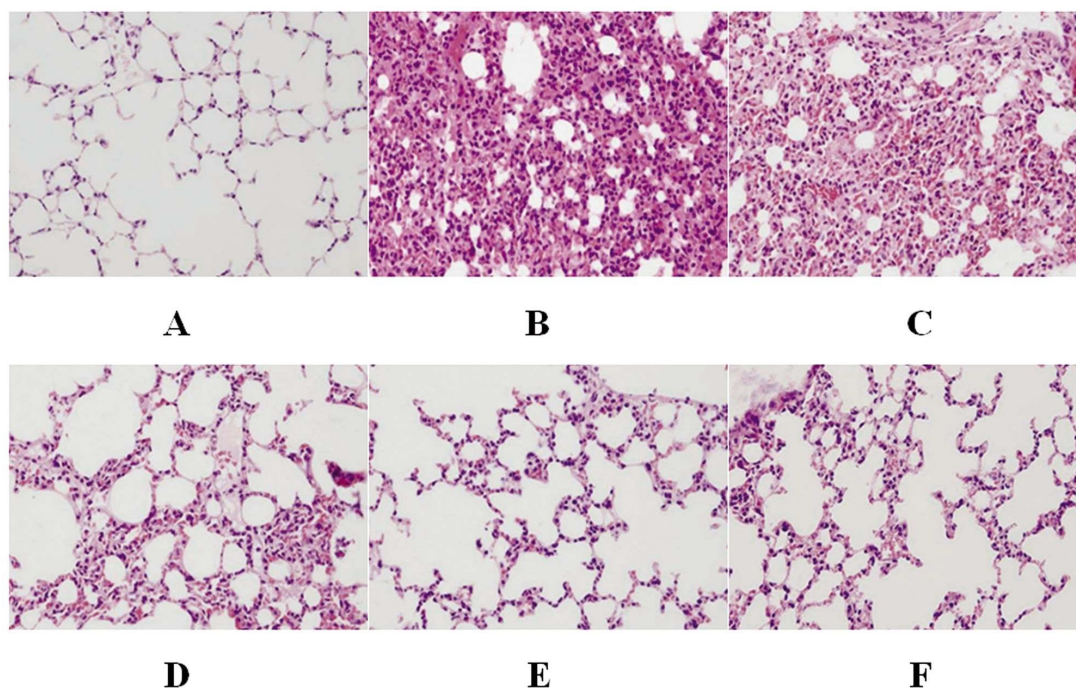
图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色图($\times 100$)

Fig.1 HE staining of lung tissue of rats in each group

Note: A: Control group; B: Model group; C: Low-dose Sinensetin group; D: Medium-dose Sinensetin group; E: High-dose Sinensetin group; F: High-dose Sinensetin combined AICAR group.

表 3 各组大鼠肺组织炎症评分情况($\bar{x} \pm s$, 分)Table 3 Lung inflammation score of rats in each group($\bar{x} \pm s$, scores)

Groups	n	Inflammation score
Control group	5	0
Model group	5	3.56 ± 0.21^a
Low-dose Sinensetin group	5	3.01 ± 0.18^b
Medium-dose Sinensetin group	5	2.77 ± 0.14^{bc}
High-dose Sinensetin group	5	2.45 ± 0.11^{bcd}
High-dose Sinensetin combined AICAR group	5	2.79 ± 0.30^e
F		42.148
P		<0.001

Note: Compared with the control group, $^aP < 0.05$. Compared with the model group, $^bP < 0.05$. Compared with the low-dose Sinensetin group, $^cP < 0.05$. Compared with the medium-dose Sinensetin group, $^dP < 0.05$. Compared with the high-dose Sinensetin group, $^eP < 0.05$.

表 4 各组大鼠肺组织 AMPK/mTOR 通路蛋白表达

Table 4 Expression of AMPK/mTOR pathway protein in lung tissue of rats in each group

Groups	n	p-AMPK/AMPK	mTORC1
Control group	5	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Model group	5	1.02 ± 0.09^a	1.32 ± 0.14^a
Low-dose Sinensetin group	5	0.76 ± 0.08^b	1.01 ± 0.11^b
Medium-dose Sinensetin group	5	0.62 ± 0.06^{bc}	0.85 ± 0.09^{bc}
High-dose Sinensetin group	5	0.53 ± 0.05^{bcd}	0.61 ± 0.06^{bcd}
High-dose Sinensetin combined AICAR group	5	0.66 ± 0.07^e	0.88 ± 0.09^e
F		44.361	40.871
P		<0.001	<0.001

Note: Compared with the control group, $^aP < 0.05$. Compared with the model group, $^bP < 0.05$. Compared with the low-dose Sinensetin group, $^cP < 0.05$. Compared with the medium-dose Sinensetin group, $^dP < 0.05$. Compared with the high-dose Sinensetin group, $^eP < 0.05$.

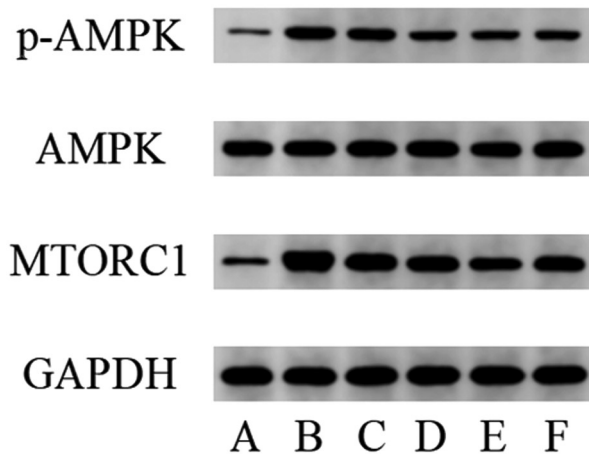


图2 各组大鼠肺组织 p-AMPK、AMPK、mTORC1 Western blot 图

Fig.2 Western blot of p-AMPK, AMPK and mTORC1 in lung tissue of rats in each group

Note: A: control group. B: Model group. C: Low-dose Sinensetin group.

D: Medium-dose Sinensetin group. E: High-dose Sinensetin group.

F: High-dose Sinensetin combined AICAR group.

甜橙黄酮广泛存在于柑橘属植物果实与果皮或陈皮等中药材中,作为多甲氧基黄酮中的一种,其具有极性较小,易通过细胞膜等特点^[19,20]。甜橙黄酮具有广泛的抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤能力作用^[6,21]。报道显示,甜橙黄酮通过抑制 NF- κ B 信号传导发挥抗炎作用^[7,22]。Laavola 等^[23]研究显示,甜橙黄酮可抑制炎症基因表达与 STAT1 激活。Li 等^[7]研究显示,甜橙黄酮可降低甲型流感病毒引发的炎症反应。以上结果均显示,甜橙黄酮对抑制炎症、抗病毒有功效,其是否对 RSV 诱导的肺炎有效仍未知。本研究通过 RSV 滴鼻大鼠模拟患者 RSV 感染,发现模型大鼠肺指数升高,肺组织结构破坏,大量炎性细胞浸润,肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、RSV 病毒载量升高,表明模型大鼠肺炎反应增强,肺部损伤严重。经不同剂量甜橙黄酮腹腔注射后,大鼠肺指数降低、RSV 病毒载量降低,肺泡灌洗液内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平降低,肺组织损伤程度减轻,炎症评分降低,且各组间存在剂量依赖性,提示甜橙黄酮可有效抑制 RSV 复制,降低大鼠肺部炎症水平,进而减轻肺组织损伤。

AMPK 是调控能量稳态的重要激酶,维持细胞生理活动,同时参与多种信号传导^[24,26]。当细胞处于低能量状态时,AMPK 被激活^[25]。近年来,研究发现 AMPK 在抗炎方面作用显著。潘宁波等^[27]研究显示,AMPK 激活剂 AICAR 可显著降低 TNF- α 、IL-6 水平表达,并伴随肺组织损伤减轻。mTORC1 是 AMPK 的关键下游,在脂多糖 (LPS) 诱导的细胞或动物损伤模型中,mTORC1 活性被抑制^[28,29];而在呼吸机引起的肺损伤中,mTORC1 活性升高^[30]。以上研究均说明,AMPK/mTOR 通路在炎症反应中发挥重要作用。本研究中,模型大鼠 p-AMPK/AMPK、mTORC1 水平升高,提示 AMPK/mTORC1 通路激活可能与大鼠的炎症反应、肺部损伤有关。经甜橙黄酮治疗后,大鼠肺组织 AMPK、mTORC1 蛋白表达降低。为验证甜橙黄酮是否通过 AMPK/mTOR 通路发挥抗炎、抗病毒、抗肺部损伤的能力,本研究在甜橙黄酮高剂量组基础上添加 AMPK

激活剂 AICAR,发现甜橙黄酮对模型大鼠的肺部保护作用被逆转,提示甜橙黄酮可能通过抑制 AMPK/mTOR 激活发挥对 RSV 诱导的大鼠肺部损伤的保护作用。

综上所述,甜橙黄酮可能通过抑制 AMPK/mTOR 通路发挥对 RSV 诱导的大鼠抗炎、抗病毒、抗肺部损伤作用。本研究仍存在一定不足之处,RSV 诱导的大鼠肺损伤是多通路进展的疾病,本研究仅从 AMPK/mTOR 通路入手分析了甜橙黄酮对大鼠的肺部保护作用,甜橙黄酮参与大鼠肺部保护作用的相关机制仍有待进一步探讨。

参考文献 (References)

- [1] Rocca A, Biagi C, Scarpini S, et al. Passive Immunoprophylaxis against Respiratory Syncytial Virus in Children: Where Are We Now? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3703
- [2] Verwey C, Nunes MC, Dangor Z, et al. Pulmonary function sequelae after respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in children: A systematic review [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55 (7): 1567-1583
- [3] 孙亚磊,袁斌. 4 种中药注射液治疗病毒性肺炎的疗效分析:一项网状 Meta 分析研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(7): 113-120, 264
- [4] 李玲,吴佳敏,欧阳建军,等. 抗流感病毒性肺炎的有效中药复方筛选及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(8): 1168-1173
- [5] 李楠,张英博,王曼莉,等. 宣肺止咳方加减治疗小儿病毒性肺炎痰热闭肺证疗效观察[J]. *河北中医*, 2021, 43(3): 395-398, 403
- [6] Han Jie L, Jantan I, Yusoff SD, et al. Sinensetin: An Insight on Its Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 553404
- [7] Li J, Jie X, Liang X, et al. Sinensetin suppresses influenza a virus-triggered inflammation through inhibition of NF- κ B and MAPKs signalings [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 135
- [8] Gao Y, Fan X, Gu W, et al. Hyperoside relieves particulate matter-induced lung injury by inhibiting AMPK/mTOR-mediated autophagy deregulation [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 167: 105561
- [9] 熊美燕,李俊玉,唐翔宇,等. 柴胡对呼吸道合胞病毒感染大鼠肺组织病毒载量的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(8): 811-815
- [10] Ptascinski C, Lukacs NW. Early Life Respiratory Syncytial Virus Infection and Asthmatic Responses [J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2019, 39(3): 309-319
- [11] Coultas JA, Smyth R, Openshaw PJ. Respiratory syncytial virus (RSV): a scourge from infancy to old age [J]. *Thorax*, 2019, 74(10): 986-993
- [12] Nam HH, Ison MG. Respiratory Syncytial Virus [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2021, 42(6): 788-799
- [13] 代丽,王薇,舒俊华,等. 婴幼儿呼吸道合胞病毒肺炎潮气呼吸肺功能变化[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(5): 757-761
- [14] Perk Y, Özdi M. Respiratory syncytial virus infections in neonates and infants [J]. *Turk Pediatri Ars*, 2018, 53(2): 63-70
- [15] Haddadin Z, Beveridge S, Fernandez K, et al. Respiratory Syncytial Virus Disease Severity in Young Children [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(11): e4384-e4391
- [16] Kalergis AM, Soto JA, Gálvez NMS, et al. Pharmacological management of human respiratory syncytial virus infection [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(18): 2293-2303

- [17] 陈霞, 曲书强. 婴幼儿呼吸道合胞病毒感染的治疗[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(23): 4549-4551, 4596
- [18] 梅玉霞. 抗生素联合糖皮质激素治疗重症支原体肺炎对患儿临床症状、炎症指标和细胞免疫的影响 [J]. 河北医药, 2016, 38(6): 883-885
- [19] 姚旭, 邴萍, 顾青. 4 种甜橙皮黄酮类化合物体外抗氧化活性及降糖降脂功能研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(1): 49-57
- [20] Yang D, Yang R, Shen J, et al. Sinensetin attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced neurotoxicity by MAPK pathway in human cerebral microvascular endothelial cells [J]. J Appl Toxicol, 2022, 42(4): 683-693
- [21] 董杨, 季光, 曹爱丽, 等. 甜橙黄酮对人胃癌 AGS 细胞增殖和凋亡的作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 790-794
- [22] Shin HS, Kang SI, Yoon SA, et al. Sinensetin attenuates LPS-induced inflammation by regulating the protein level of $I\kappa B-\alpha$ [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(4): 847-849
- [23] Laavola M, Nieminen R, Yam MF, et al. Flavonoids eupatorin and sinensetin present in Orthosiphon stamineus leaves inhibit inflammatory gene expression and STAT1 activation [J]. Planta Med, 2012, 78(8): 779-786
- [24] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(2): 121-135
- [25] Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status[J]. Cell Metab, 2018, 27(2): 299-313
- [26] Aslam M, Ladilov Y. Emerging Role of cAMP/AMPK Signaling[J]. Cells, 2022, 11(2): 308
- [27] 潘宁波, 张旭阳, 张玉, 等. AMPK 激动剂预处理对肝缺血再灌注损伤大鼠模型的影响及相关机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(5): 1152-1157
- [28] 张迪. CD36/FAK/mTORC1 通路在 LPS 诱导的人乳腺上皮细胞炎症因子表达中的作用及机制[D]. 内蒙古医科大学, 2019
- [29] Freundt K, Herzmann C, Biedziak D, et al. Surfactant Protein A Enhances the Degradation of LPS-Induced TLR4 in Primary Alveolar Macrophages Involving Rab7, β -arrestin2, and mTORC1 [J]. Infect Immun, 2022, 90(2): e0025021
- [30] Lee H, Fei Q, Streicher A, et al. mTORC1 is a mechanosensor that regulates surfactant function and lung compliance during ventilator-induced lung injury[J]. JCI Insight, 2021, 6(14): e137708

(上接第 1404 页)

- [25] Harbury PB Z T, Kim PS, Alber T. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants[J]. Science, 1993, 262(5138): 1401-1407
- [26] World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [M]. 1st ed. Geneva: World Health Organization, 2011: 121
- [27] Bosch B J, Bodewes R, de Vries R P, et al. Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus infection in ferrets[J]. J Virol, 2010, 84(19): 10366-10374
- [28] Wei C J, Xu L, Kong W P, et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus[J]. J Virol, 2008, 82(13): 6200-6208
- [29] Chen J, Wang J, Zhang J, et al. Advances in Development and Application of Influenza Vaccines [J]. Front Immunol, 2021, 13: 12
- [30] Weldon W C, Wang B Z, Martin M P, et al. Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin[J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12466
- [31] Holtz K, Anderson K D, Cox M M J. Production of a Recombinant Influenza Vaccine Using the Baculovirus Expression Vector System [J]. BioProcessing Journal, 2003, 2: 65-73