

## 孟鲁司特抑制呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞所致炎症的药理机制

江敏时<sup>1</sup>, 檀卫平<sup>2</sup>, 陈小平<sup>1</sup>, 姚海魂<sup>1</sup>

(1. 广州市中西医结合医院, 广东 广州 510800; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨孟鲁司特抑制炎症过程中的药理机制。【方法】构建呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞(16HBEC)炎症模型, 分别用qPCR和Western-blot方法检测核因子NF-E2相关因子(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO-1)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)的mRNA水平和蛋白水平, 荧光探针DCFH-DA法检测细胞活性氧化物(ROS)的产生。进一步通过合成Nrf2小干扰RNA(Nrf2 siRNA), 下调Nrf2的表达后, 探究炎症指标的变化情况。【结果】孟鲁司特显著降低RSV感染后炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达( $P < 0.05$ )及细胞中ROS水平( $P < 0.05$ ), 增加细胞炎症模型中Nrf2、HO-1、NQO-1、GST的基因与蛋白表达( $P < 0.05$ ), 且高剂量的孟鲁司特效果越显著。下调Nrf2的表达后, 炎症因子IL-6、TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 表达量上升( $P < 0.05$ )及活性氧ROS含量明显升高( $P < 0.05$ ), Nrf2、HO-1、NQO-1、GST的基因与蛋白表达量下降( $P < 0.05$ )。【结论】孟鲁司特能抑制呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞所致的炎症, 其作用机制可能是影响Nrf2/ARE信号通路。

**关键词:** 孟鲁司特; 呼吸道合胞病毒感染; 炎症; Nrf2/ARE信号通路

中图分类号: R373.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)05-0676-09

## Montelukast Inhibits the Inflammation of Human Bronchial Epithelial Cells Infected by Respiratory Syncytial Virus

JIANG Min-shi<sup>1</sup>, TAN Wei-ping<sup>2</sup>, CHEN Xiao-ping<sup>1</sup>, YAO Hai-hun<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Hospital of Integrated Traditional and West Medicine, Guangzhou 510800, China;

2. SUN Yat-sen Memorial Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Corresponding to: TAN Wei-ping; E-mail: weiptan@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the pharmacological mechanism of montelukast in the inhibition of inflammation. 【Methods】 Respiratory syncytial virus-infected human bronchial epithelial cell (16HBEC) inflammatory cell model was established, and mRNA and protein expressions of Nuclear factor NF-E2 related factor (Nrf2), heme oxygenase (HO-1), quinone oxidoreductase (NQO-1), and glutathione transferase (GST) were determined by qPCR and Western-blot, and production of cellular reactive oxygen species (ROS) was measured by DCFH-DA fluorescent probe method. Nrf2 siRNA was further synthesized to reduce the expression of Nrf2, to investigate the change of inflammatory index. 【Results】 Montelukast significantly reduced the expressions of inflammatory cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ) on respiratory syncytial virus-infected 16HBEC, and the ROS level in inflammatory cell model was decreased ( $P < 0.05$ ), increased the mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST ( $P < 0.05$ ), with a more significant effect at higher dose. After the down-regulation of Nrf2, the expressions of inflammatory cytokines IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  were increased ( $P < 0.05$ ), and ROS level was significantly increased ( $P < 0.05$ ), mRNA and protein expressions of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST were decreased ( $P < 0.05$ ). 【Conclusion】 Montelukast inhibits the inflammation of human bronchial epithelial cells infected by respiratory syncytial virus (RSV), and the potential mechanism may involve its effect on the Nrf2/ARE signaling pathway.

**Key words:** montelukast; respiratory syncytial virus infection; inflammation; Nrf2/ARE signaling pathway

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(5): 676-684]

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 广东省医学科研基金(B2013120)

作者简介: 江敏时, 硕士研究生, 主治医师, 儿科学, E-mail: 151308391@qq.com; 檀卫平, 通信作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: weiptan@163.com

病毒性细支气管炎是导致2岁以下儿童住院的首要疾病,以呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)最为常见<sup>[1]</sup>,前驱期出现鼻咽部卡他症状及低热,继而出现干咳以及较多的支气管分泌物,炎症常可累及肺泡,肺泡壁和肺间质。急性期的主要表现为呼吸困难、咳嗽和喘憋,感染后易诱发喘息的反复发作,与婴幼儿哮喘的发病密切相关。近来对RSV感染婴儿与动物模型的研究表明,氧化应激参与RSV感染时炎症因子释放(包括白介素、白三烯、趋化因子)及组织炎性损伤过程<sup>[2]</sup>。氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡,导致中性粒细胞炎性浸润,蛋白酶分泌增加,产生大量氧化中间产物。核因子NF-E2相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)的激活因子,而Nrf2/ARE信号通路是目前已知的在细胞氧化应激反应中发挥着重要作用的信号通路,该信号通路在抗炎症、抗衰老、抗肿瘤、保护神经等各个方面已进行了广泛研究。孟鲁司特是目前持续性哮喘治疗的主要药物之一,特别对病毒感染相关性喘息具有较好的疗效。孟鲁司特治疗细支气管炎的药理机制未完全阐明。前期研究显示<sup>[3]</sup>,当机体被RSV感染后,体内分泌大量炎症因子,孟鲁司特作用后,炎症因子的表达量都得到一定的改善。本实验通过采用孟鲁司特对RSV感染的16HBEC细胞研究探讨孟鲁司特的药理机制及与Nrf2/ARE信号通路的作用关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验细胞及病毒

人支气管上皮细胞株(16HBEC)购自广州吉妮欧生物科技有限公司。RSV-Long病毒2型株购自中国预防医学科学院病毒学研究所。

### 1.2 实验试剂及分组

1.2.1 实验试剂 孟鲁司特钠购自默沙东公司; qPCR试剂盒购自日本东洋纺公司;血红素加氧酶1(hemoglobin oxidase, HO-1)单克隆抗体、谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase GST)单克隆抗体、醌氧化还原酶1(quinone oxidoreductase, NQO-1)单克隆抗体、Nrf2单克隆抗体、羊抗鼠IgG H&L(HRP)、羊抗兔IgG H&L(HRP)均购自美

国Abcam、内参GAPDH单克隆抗体均购自武汉博士德;白介素6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )ELISA试剂购自Elabscience公司,白介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )ELISA试剂购自NeoBioscience公司;干扰Nrf2表达的三条siRNA(命名为:Nrf2\_001 siRNA、Nrf2\_002 siRNA、Nrf2\_003 siRNA)以及阴性对照(NC siRNA)购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2.2 实验分组 ①孟鲁司特抑制呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞炎症反应实验:Control组,空白对照;Model组,细胞炎症模型;20  $\mu$ mol/L montelukast组,细胞炎症模型建立后加入20  $\mu$ mol/L montelukast;10  $\mu$ mol/L montelukast组,细胞炎症模型建立后加入10  $\mu$ mol/L montelukast;5  $\mu$ mol/L montelukast组,细胞炎症模型建立后加入5  $\mu$ mol/L montelukast;Ribavirin组,Ribavirin阳性对照组。Ribavirin是广谱强效的抗病毒药物,其副作用少,不良反应发生率低,能间接抑制5-磷酸盐脱氢酶活性降低细胞内GTP水平,常作为药物抗病毒实验的阳性对照<sup>[4]</sup>。②孟鲁司特抑制呼吸道合胞病毒感染人支气管上皮细胞炎症反应药理机制研究:Control + NC siRNA组,正常人支气管上皮细胞加入NC siRNA;Control + siRNA组,正常人支气管上皮细胞加入Nrf2 siRNA;Model + NC siRNA组,细胞炎症模型建立后加入NC siRNA;Model + siRNA组,细胞炎症模型建立后加入Nrf2 siRNA;Montelukast + NC siRNA组,细胞炎症模型建立后同时添加20  $\mu$ mol/L Montelukast与NC siRNA;Montelukast + siRNA组,细胞炎症模型建立后同时添加20  $\mu$ mol/L Montelukast与Nrf2 siRNA。

### 1.3 实验方法

1.3.1 RSV诱导16HBEC细胞炎症模型的建立 培养16HBEC细胞,细胞密度长至80%左右,更换含有RSV病毒的培养基培养细胞,收集细胞上清,检测IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6炎症因子指标。

1.3.2 酶联免疫吸附法(ELISA)检测炎症因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达水平 将收集保存于-80 $^{\circ}$ C的细胞上清液取出于4 $^{\circ}$ C冰箱中解冻。IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 检测ELISA检测试剂盒说明书进行。

1.3.3 实时荧光定量PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)检测 Nrf2/ARE信号通路相关基因

Nrf2、HO-1、NQO-1、GST的表达水平 使用Primer Preinier 5.0 专业软件完成本次实验所需的引物设计,而引物合成工作于上海生工生物工程股份有限公司完成,具体信息见表1。按照逆转录试剂盒的说明书配制反应体系,根据DBI Bestar® Sybr Green qPCR master Mix 的说明书配制qPCR扩增的反应体系。用ABI7500实时荧光定量PCR仪进行荧光定量PCR实验。

表1 实验所需的PCR引物设计  
Table 1 PCR primers of the experiment required

Testing Gene	Primers Sequence	Size/ bp
GAPDH	5'-TGGCGTCTTCACCACCAT-3'	475
	5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
Nrf2	5'-CTTTTGGCGCAGACATTCCC-3'	120
	5'-GACTGGGCTCTCGATGTGAC-3'	
HO-1	5'-CAGTGCCAACCAAGTTCAAGC-3'	112
	5'-GTTGAGCAGGAACGCAGTCTT-3'	
NQO-1	5'-GGTTTGGAGCGAGTGTTCATAGG-3'	129
	5'-GCAGAGAGTACATGGAGCCAC-3'	
GST	5'-GTACCAGTCCAATACCATCCTGC-3'	102
	5'-ACGCCGTCATTCACCATGT-3'	

1.3.4 蛋白印迹法(Western-blot)检测 Nrf2/ARE信号通路相关蛋白Nrf2、HO-1、NQO-1、GST的表达水平 收集细胞,提取蛋白,蛋白裂解液进行凝胶电泳,将其转膜到硝酸纤维素薄膜上,加入封闭液体对其进行封闭,与一定比例稀释的一抗、二抗后孵育,加入发光显色剂进行显色,将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统(Image-Pro Plus 6.0)分析条带净光密度值。

1.3.5 活性氧(ROS)检测 首先吸取20  $\mu$ L DCFH-DA,按照1:1 000用无血清培养液稀释,使终浓度为10  $\mu$ mol/L。胰酶消化生长状况良好的16HBEC细胞,重悬细胞于稀释好的DCFH-DA液体中,按 $1 \times 10^5$ /孔接种到24孔板中,每孔各加入1 mL细胞培养液,置于细胞培养箱中孵育20 min。移除培养板中的培养液,用无血清细胞培养液洗涤细胞三次,洗涤后,每孔再加入1 mL的细胞培养液。在酶标仪下,使用激发波长为488 nm,发射波长为525 nm的条件检测OD值。

1.3.6 siRNA转染及筛选 0.5  $\mu$ L去核酸酶水加入试管中,震荡10 s,溶解脂状物,转染管中加入

无血清培养基。然后加MyoD或者EGFP的DNA,震荡后在加转染试剂,再次震荡,将混合物在室温放置10~15 min。吸去培养板中的培养基,用PBS或者无血清培养基清洗一次,加入混合物,将细胞放回培养箱中培养1 h。然后加入完全培养基培养24~48 h。qPCR方法筛选合适的siRNA。

1.3.7 统计学分析 每个实验重复3次,数据结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,统计学分析采用SPSS19.0统计分析软件进行处理,多组之间数据比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组组间对比采用LSD检验,取检验水平为0.05。

## 2 结果

### 2.1 孟鲁司特对RSV感染16HBEC细胞炎症反应的影响

RSV感染16HBEC细胞后,炎症因子IL-1 $\beta$ (图1 A)、TNF- $\alpha$ (图1 B)、IL-6(图1 C)表达急剧上升,与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ),细胞中活性氧含量成相同趋势(图1 D)。而孟鲁司特处理炎症细胞后,炎症因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6及活性氧含量降低(图1)。

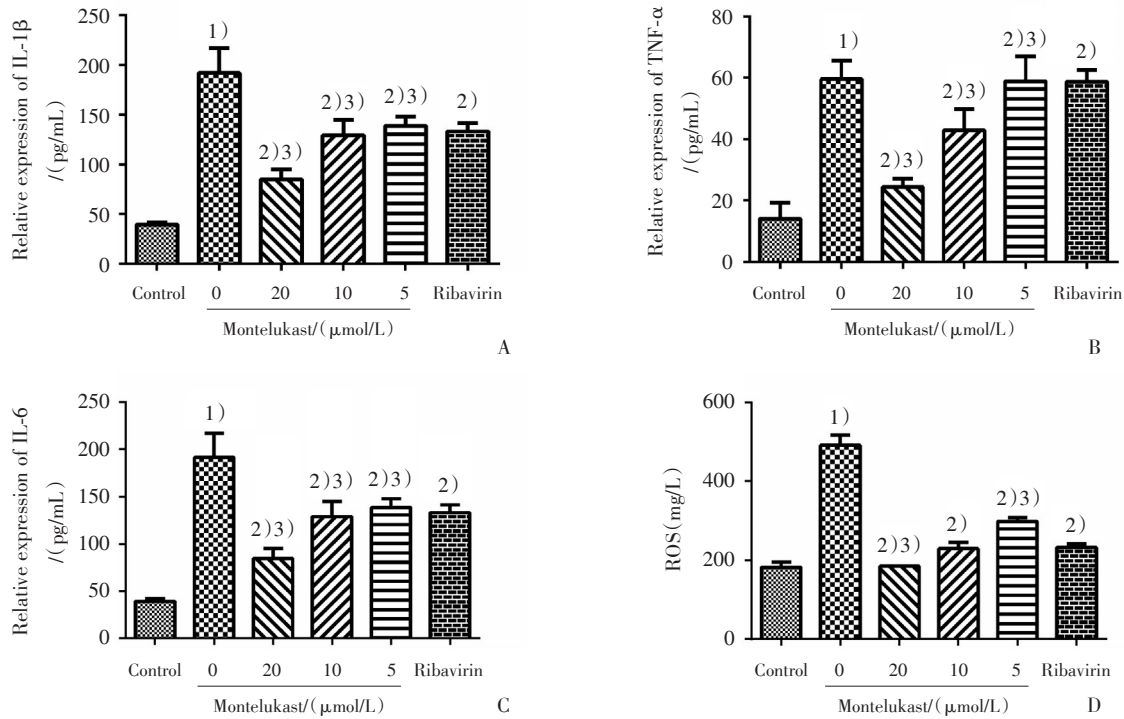
### 2.2 孟鲁司特对RSV感染16HBEC细胞Nrf2/ARE信号通路的影响

2.2.1 Nrf2/ARE信号通路中Nrf2、HO-1、NQO-1、GST基因的表达 RSV感染16HBEC细胞后,Nrf2(图2 A)、HO-1(图2 B)、NQO-1(图2 C)、GST(图2 D)表达急剧下降,与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。而孟鲁司特处理炎症细胞后,Nrf2、HO-1、NQO-1、GST含量上升(图2)。

2.2.2 Nrf2/ARE信号通路中Nrf2、HO-1、NQO-1、GST蛋白的表达 RSV感染16HBEC细胞后,Nrf2、HO-1、NQO-1、GST表达急剧下降(图3 A),与空白对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。而孟鲁司特处理炎症细胞后,Nrf2、HO-1、NQO-1、GST蛋白表达量上升(图3 B)。

### 2.3 Nrf2 siRNA干扰效率验证

干扰实验结果显示同一浓度下NALP3\_001 siRNA的干扰效果是三条siRNA中最弱的,而NALP3\_003 siRNA则最强,表达量最低( $P < 0.05$ ),故后续实验选择100 nmol/L的Nrf2\_003 siRNA开展。不同浓度的siRNA的干扰率见表2。



Effects of different concentrations of montelukast on inflammatory cell models. A: The expression of IL-1β was detected by ELISA, B: The expression of TNF-α was detected by ELISA, C: The expression of IL-6 was detected by ELISA, (F = 160.325, P = 0.000). D: The content of ROS was detected by DCFH-DA fluorescent probe method (F = 35698.079, P = 0.000), 1) P < 0.05 vs Control; 2) P < 0.05 vs Model; 3) P < 0.05 vs Ribavirin. Data was presented as mean±SD (n = 3).

图1 孟鲁司特对RSV感染16HBEC细胞炎症反应及活性氧水平的影响

Fig.1 The effect of inflammatory response and ROS level when montelukast deal with 16HBEC which was infected by RSV

表2 不同浓度的siRNA的干扰率

Table 2 The interference rate of different concentrations of siRNA

	NC siRNA	NALP3_001 siRNA	NALP3_002 siRNA	NALP3_003 siRNA
50 nmol/L	1.110 ± 0.046	0.820 ± 0.010 <sup>1)</sup>	0.790 ± 0.002 <sup>1)</sup>	0.340 ± 0.022 <sup>1)</sup>
100 nmol/L	1.100 ± 0.035	0.790 ± 0.024 <sup>1)</sup>	0.640 ± 0.013 <sup>1)</sup>	0.280 ± 0.010 <sup>1)</sup>
200 nmol/L	1.040 ± 0.036	0.780 ± .0.039 <sup>1)</sup>	0.640 ± 0.004 <sup>1)</sup>	0.110 ± .0018 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>P < 0.05 vs NC

2.4 降低Nrf2表达后,RSV所致16HBEC细胞炎症反应的影响

降低Nrf2表达后,炎症因子IL-1β(图4 A)、TNF-α(图4 B)、IL-6(图4 C)表达急剧升高,与NC siRNA相比差异显著(P < 0.05),细胞中活性氧含量呈相同趋势(图4 D)。

2.5 降低Nrf2表达后,RSV所致16HBEC细胞Nrf2/ARE信号通路的影响

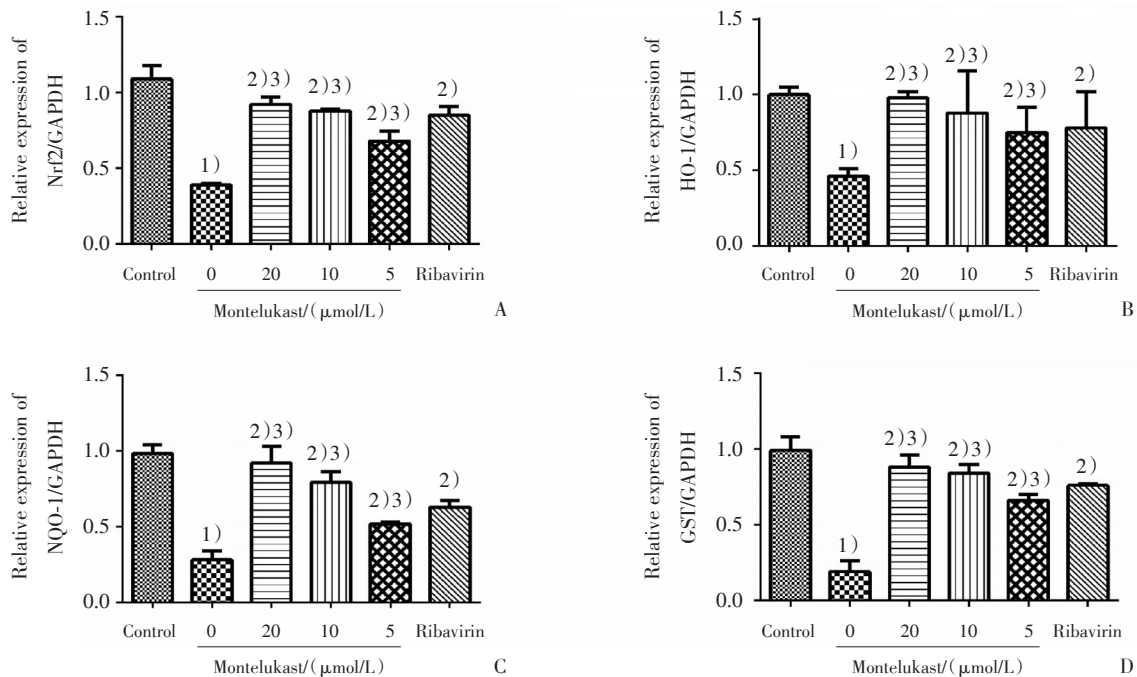
2.5.1 Nrf2/ARE信号通路中Nrf2、HO-1、NQO-1、GST基因的表达 降低Nrf2表达后,Nrf2(图5 A)、HO-1(图5 B)、NQO-1(图5 C)、GST(图5 D)

基因表达急剧下降,与NC siRNA相比差异显著(P < 0.05)。

2.5.2 Nrf2/ARE信号通路中Nrf2、HO-1、NQO-1、GST蛋白的表达 降低Nrf2表达后,Nrf2、HO-1、NQO-1、GST(图6)蛋白表达急剧下降,与NC siRNA相比差异显著(P < 0.05)。

3 讨论

孟鲁司特钠是一种选择性半胱氨酰白三烯受体(CysL1R)拮抗剂,兼具抗炎与支气管舒张作



Effects of different concentrations of montelukast on the expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST genes in the inflammatory cell model. A: The expression of Nrf2 was detected by qPCR, B: The expression of HO-1 was detected by qPCR. C: The expression of NQO-1 was detected by qPCR. D: The expression of GST was detected by qPCR. Data was presented as mean±SD ( $n = 3$ ). 1)  $P < 0.05$  vs Control; 2)  $P < 0.05$  vs Model; 3)  $P < 0.05$  vs Ribavirin ( $F = 95.217$ ,  $P = 0.000$ )

图2 孟鲁司特对RSV感染16HBEC细胞Nrf2、HO-1、NQO-1、GST基因表达的影响

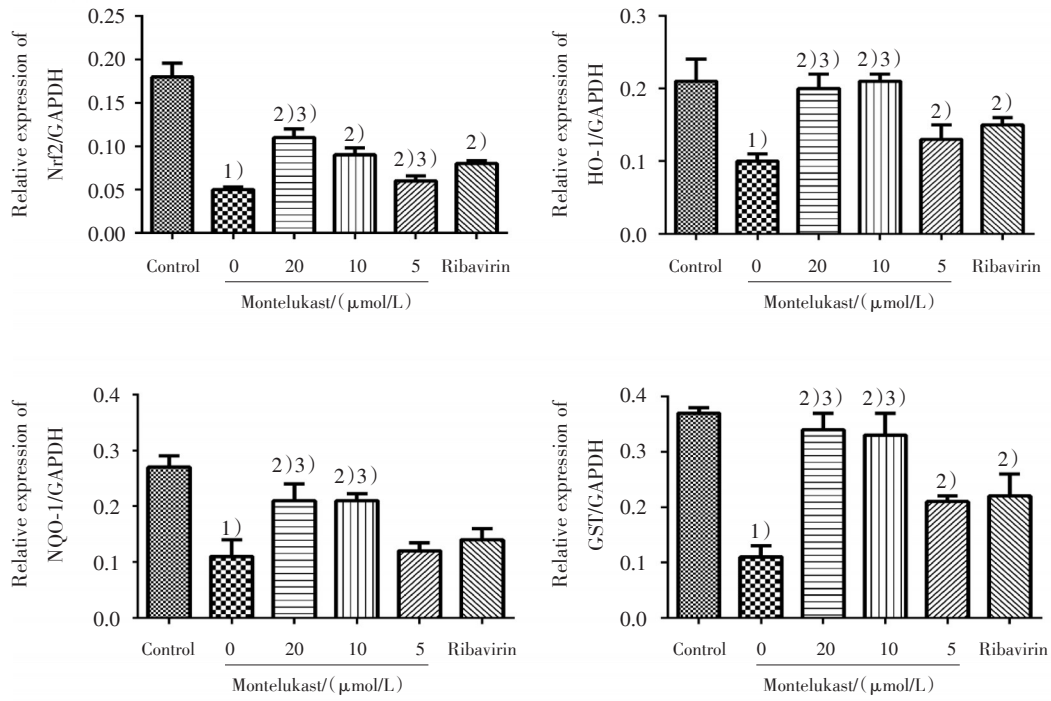
Fig.2 The gene expression effect of Nrf2, HO-1, NQO-1, and GST when montelukast deal with 16HBEC which was infected by RSV

用,是目前治疗哮喘的主要药物之一。有关孟鲁司特钠在呼吸道合胞病毒感染性细支气管炎中的作用机制尚未明了,有研究发现孟鲁司特钠具有非CysL1R依赖性的更加广谱的抗炎性,可作用于免疫活性细胞如嗜酸粒细胞,嗜碱粒细胞,中性粒细胞等<sup>[5]</sup>。Nrf2/ARE是机体抗氧化应激炎症系统中重要的一条信号通路<sup>[6]</sup>。

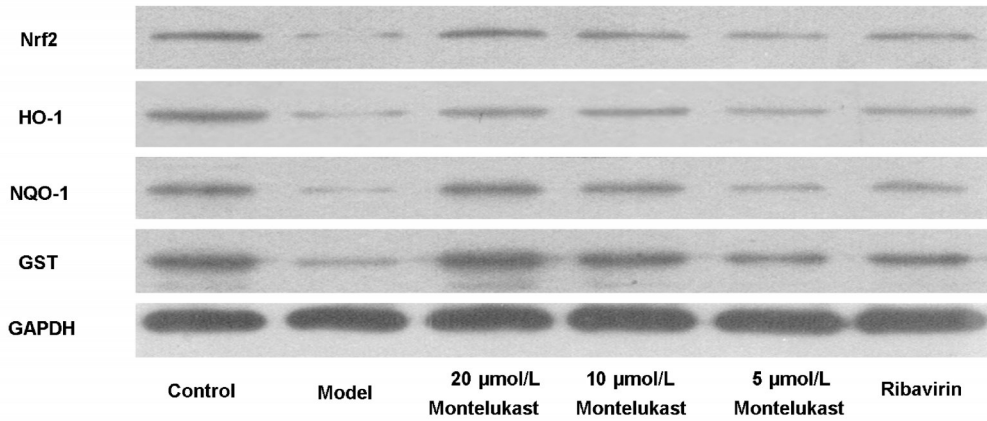
本实验选择稳定性较好的细胞炎症模型<sup>[7]</sup>开展研究。在前期的建模<sup>[3]</sup>实验中及本实验发现孟鲁司特钠对RSV感染引起的各种炎症因子及活性氧的升高有明显的抑制作用,以及通过RNA干扰技术抑制Nrf2基因的表达,阻断Nrf2/ARE信号通路,探索孟鲁司特在治疗细支气管炎的分子机制。实验发现孟鲁司特钠对RSV感染引起的各种炎症因子升高有明显的抑制作用,并且对Nrf2/ARE信号通路也有明显的上调作用。在抑制基因表达方面,siRNA高效性和特异性都优于其他方法,故被广泛运用于哺乳动物细胞株研究基

因的功能<sup>[8]</sup>。本实验使用Nrf2-siRNA后,明显降低了Nrf2的表达。转染Nrf2-siRNA抑制Nrf2后,孟鲁司特钠抗炎作用被阻断,进一步说明孟鲁司特钠治疗细支气管炎可能与Nrf2/ARE信号通路有关。

支气管上皮细胞分泌抗氧化剂对气道具有保护作用,RSV感染诱发机体氧化应激反应,氧代谢的中间衍生物活性氧簇(ROS)的水平显著升高,氧化还原平衡失调,导致肺部炎症损伤<sup>[9]</sup>。以往研究发现,RSV感染的气道上皮细胞分泌大量IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6、巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)-1 $\alpha$ 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF)- $\alpha$ 以及其他促炎症因子等<sup>[10-11]</sup>。本实验结果显示RSV感染16HBECs细胞后,细胞内的ROS明显升高,炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6表达也明显升高。而用孟鲁司特钠处理细胞炎症模型,细胞内的ROS含量及炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-6表达明显降低,说明孟鲁



A



B

Effects of different concentrations of montelukast on the protein expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST in the inflammatory cell model. A: The relative intensity of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST. B: The expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST was detected by WB. Data was presented as mean±SD ( $n = 3$ ). 1)  $P < 0.05$  vs Control; 2)  $P < 0.05$  vs Model; 3)  $P < 0.05$  vs Ribavirin ( $F = 76.544, P = 0.000$ ).

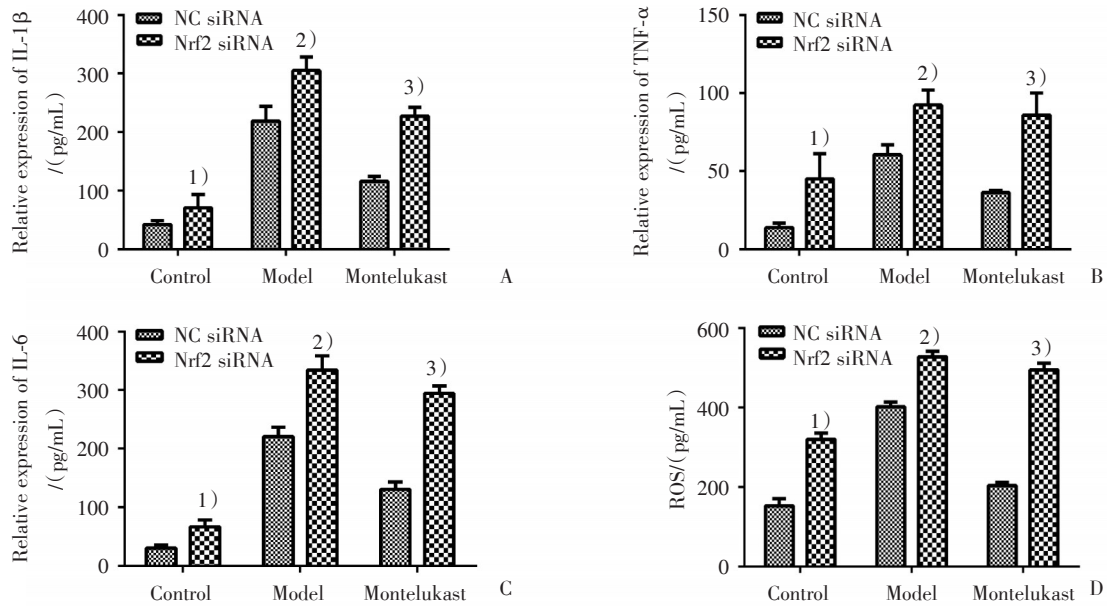
图3 孟鲁司特对RSV感染16HBEC细胞Nrf2 HO-1 NQO-1 GST蛋白表达的影响

Fig.3 The protein expression effect of Nrf2,HO-1, NQO-1, and GST when montelukast deal with 16HBEC which was infected by RSV

司特钠能够减轻炎症反应。

Nrf2/ARE 信号系统是细胞氧化应激反应的关键传导通路<sup>[12]</sup>,当外界有害物质进入呼吸道,进入细胞核与抗氧化反应元件(ARE)结合,通过Nrf2-ARE信号传导,调控下游细胞内的抗氧化酶等。这些具有机体保护作用的酶,主要包括超

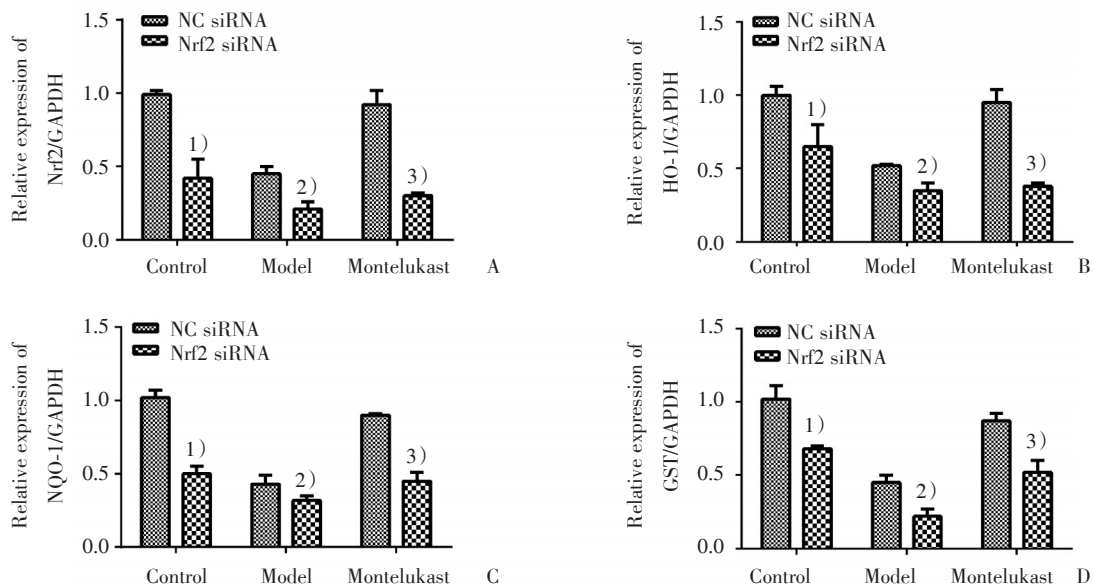
氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、醌氧化还原酶1(NQO-1)、以及血红素加氧酶1(HO-1)<sup>[13]</sup>等。Nrf2是该信号传导通路中最重要的调节因子之一,当Nrf2基因被激活,Nrf2/ARE信号将进一步传导到HO-1,增加一氧化碳(CO)的含量,进而控制巨噬细胞的炎症因子分泌,起到



The inflammatory cell model were dealt with montelukast or not in the presence or absence of Nrf2 siRNA. A: The expression of IL-1 $\beta$  was detected by ELISA. B: The expression of TNF- $\alpha$  was detected by ELISA. C: The expression of IL-6 was detected by ELISA ( $F = 29210.816, P = 0.000$ ). D: The content of ROS was detected by DCFH-DA fluorescent probe method ( $F = 14762.404, P = 0.000$ ). 1)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+control; 2)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+model; 3)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+ Montelukast. Date was presented as mean $\pm$ SD ( $n = 3$ ).

图4 转染 siRNA 后细胞炎症反应及活性氧水平

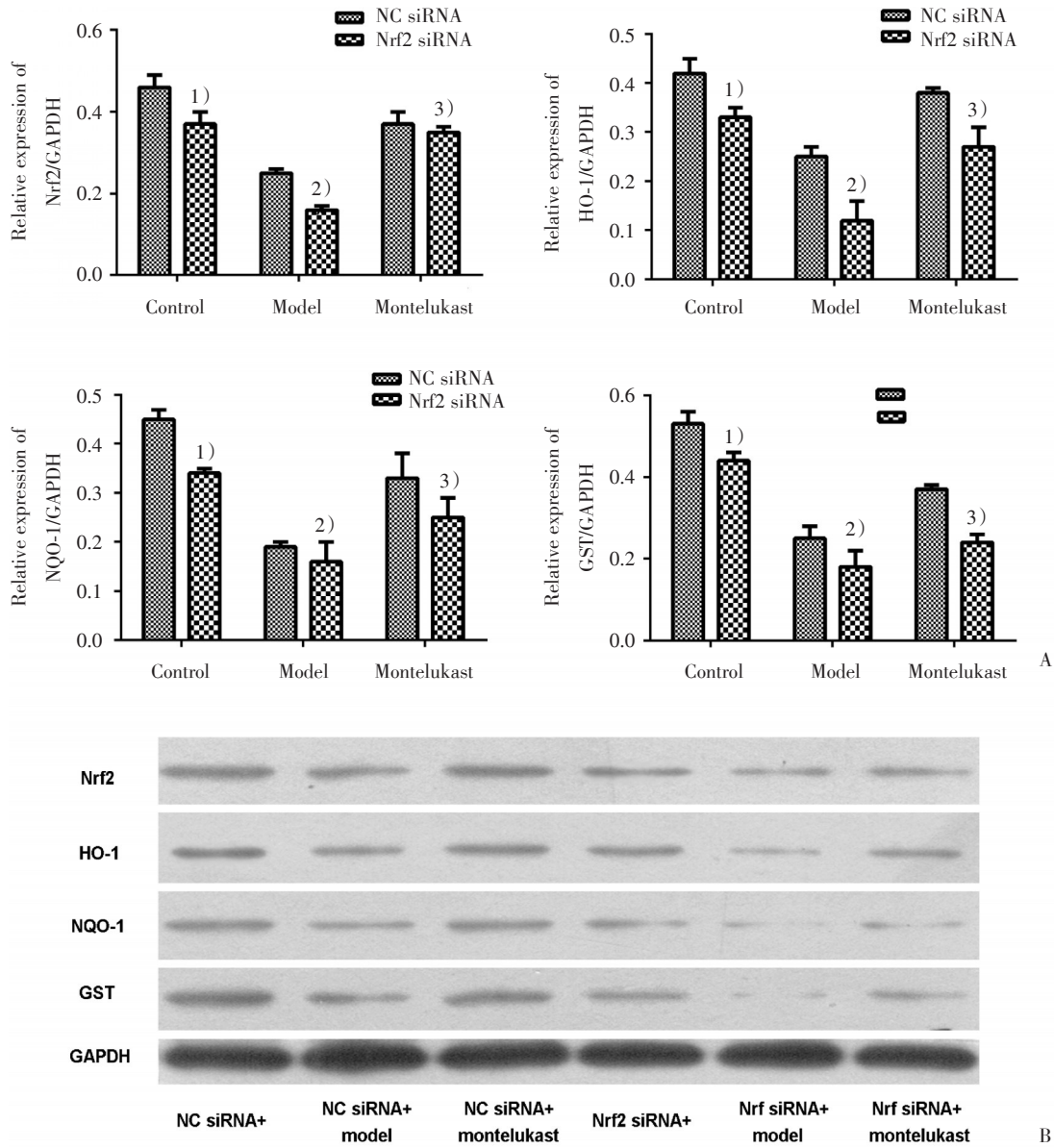
Fig.4 Cell inflammatory response and ROS level after transfected the siRNA



The mRNA levels of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST was detected by qPCR in inflammatory cell model were dealt with montelukast or not in the presence or absence of Nrf2 siRNA. A: The expression of Nrf2 was detected by qPCR. B: The expression of HO-1 was detected by qPCR. C: The expression of NQO-1 was detected by qPCR. D: The expression of GST was detected by qPCR. Date was presented as mean $\pm$ SD ( $n = 3$ ). 1)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+control; 2)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+model; 3)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+ Montelukast ( $F = 188.957, P = 0.000$ ).

图5 转染 siRNA 后细胞 Nrf2、HO-1、NQO-1、GST 基因表达的影响

Fig.5 The gene expression effect of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST after transfected the siRNA



The protein levels of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST was detected by qPCR in inflammatory cell model were dealt with montelukast or not in the presence or absence of Nrf2 siRNA. A: The relative intensity of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST. B: The expression of Nrf2, HO-1, NQO-1 and GST was detected by WB. Data was presented as mean±SD (n = 3). 1)  $P < 0.05$  vs. NC siRNA+control; 2)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+model; 3)  $P < 0.05$  vs NC siRNA+ Montelukast ( $F = 44.779$ ,  $P = 0.000$ ).

图6 转染 siRNA 后细胞 Nrf2、HO-1、NQO-1、GST 蛋白表达的影响

Fig.6 The protein expression effect of Nrf2, HO-1, NQO-1, and GST after transfected the siRNA

抗炎的效果<sup>[14]</sup>。Yu等<sup>[15]</sup>在兔子模型研究中发现,通过电针激活 Nrf2/ARE 通路,出现高表达的HO-1,可显著降低内毒素引起的急性肺损伤严重程度,表明该通路在对抗感染引起的急性肺损伤中的作用。另有研究发现<sup>[16]</sup>,木犀草素能上调 Nrf2 基因表达,引起下游HO-1与NQO-1的基因与蛋白水平的升高,细胞内ROS的分泌降低,增强机体

抗氧化应激能力,对由H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引发的人支气管上皮(16HBECS)细胞损伤起到修护作用。我们的结果也证实了Nrf2可以提升机体抗氧化能力,且孟鲁司特钠可以通过升高Nrf2的表达降低细胞的炎症反应,当Nrf2被抑制后,孟鲁司特钠的抗炎作用减弱。

综上所述,我们成功构建了细胞炎症模型,

同时发现孟鲁司特钠可以通过 Nrf2/ARE 信号通路抑制 RSV 感染所致 16HBEc3 细胞的炎症反应,为孟鲁司特钠治疗细支气管炎提供了理论依据。但此实验仅限于细胞实验,未在动物模型中试验过,在机体内孟鲁司特钠是否通过 Nrf2/ARE 信号通路抑制 RSV 感染所致的炎症反应需进行进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Murata Y. Respiratory syncytial virus vaccine development [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2009, 29(4): 725-739.
- [2] 吕伟伟. 呼吸道合胞病毒感染人肺上皮细胞诱导氧化应激对 TLR3 表达的影响 [D]. 安徽医科大学, 2013: 9-10.  
Lv WW. Effects of oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection on expression of TLR3 [D]. *Anhui Med Univ*, 2013: 9-10.
- [3] 江敏时, 檀卫平, 郭奕文, 等. 孟鲁司特抑制 RSV 感染人支气管上皮细胞所致炎症作用的研究 [J]. *中国现代药物应用*, 2017, 11(8): 148-149.  
Jiang MS, Tan WP, Guo YW, et al. The role of Montelukast in inhibit inflammation caused by RSV infection on human bronchial epithelial cells [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2017, 11(8): 148-149.
- [4] 牛亚奇. 重楼克感滴丸抗病毒实验研究 [D]. 北京中医药大学, 2012: 16-18.  
Niu YQ. The research on the antiviral activity of Chongloukangan drop pill [D]. *Beijing Univ Chin Med*, 2012: 16-18.
- [5] 钟慧, 洪建国. 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂孟鲁司特的研究进展 [J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 31(19): 362-366.  
Zhong H, Hong JG. Research progress of cysteinyl leukotriene antagonist Montelukast [J]. *Int J Resp*, 2011, 31(19): 362-366.
- [6] de Benedictis FM, Vaccher S, De BD. Montelukast sodium for exercise-induced asthma [J]. *Drugs of Today*, 2008, 44(11): 845-855.
- [7] 蓝丹, 檀卫平, 陈环, 等. 热毒宁对 RSV 感染人支气管上皮细胞分泌 TSLP 的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2011, 32(2): 203-207.  
Lan D, Tan WP, Chen H, et al. Reduning on thymic stromal lymphopoietin secretion in human bronchial epithelial cells infected by respiratory syncytial virus in vitro [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2011, 32(2): 203-207.
- [8] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9742-9747.
- [9] Vogt W, Hesse D. Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5 [J]. *Immunobiology*, 1994, 192(1-2): 1-9.
- [10] Neri T, Conti I, Cerri C, et al. Divergent effects of nitric oxide on airway epithelial cell activation [J]. *Biol Res*, 2010, 43(4): 467-473.
- [11] Noah TL, Ivins SS, Murphy P, et al. Chemokines and inflammation in the nasal passages of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis [J]. *Clin Immunol*, 2002, 104(1): 86-95.
- [12] Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 10074-10089.
- [13] Saw CL, Guo Y, Yang AY, et al. The berry constituents quercetin, kaempferol, and pterostilbene synergistically attenuate reactive oxygen species: Involvement of the Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72(8): 303-311.
- [14] Domej W, Oetl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD - implications and relevance for treatment [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014, 9(9): 1207-1224.
- [15] Yu JB, Shi J, Zhang Y, et al. Electroacupuncture ameliorates acute renal injury in lipopolysaccharide-stimulated rabbits via induction of HO-1 through the PI3K/Akt/Nrf2 pathways [C]// 中国中西医结合麻醉学会年会暨全国中西医结合麻醉学术研讨会、江苏省中西医结合学会麻醉专业委员会成立大会, 2015: e0141622.
- [16] Tan X, Jin P, Feng L, et al. Protective effect of luteolin on cigarette smoke extract-induced cellular toxicity and apoptosis in normal human bronchial epithelial cells via the Nrf2 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(4): 1855-1862.

(编辑 孙慧兰)