



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116473979 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202310407222.4

(22) 申请日 2023.04.14

(71) 申请人 遵义医科大学珠海校区

地址 519041 广东省珠海市金湾区金海岸碧湾路

申请人 遵义市第一人民医院(遵义医学院第三附属医院)

(72) 发明人 刘代顺 龚玲 王虹苹 崔国祯

韦涛 徐杭 刘惊跃

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有

限公司 44205

专利代理师 林坤华

(51) Int.Cl.

A61K 31/56 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

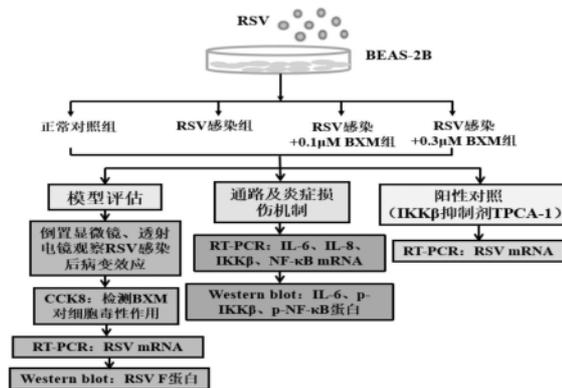
权利要求书1页 说明书7页 附图9页

(54) 发明名称

甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的应用

(57) 摘要

本发明属于医药技术领域,提供了甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的应用,本发明通过建立RSV感染细胞和小鼠模型,用倒置显微镜观察BEAS-2B细胞感染RSV后的病变效应,CCK8方法检测甲基巴多索隆的细胞毒性和抗病毒效应,逆转录聚合酶链式反应检测RSV、IL-6、IL-8、IKKβ和NF-κB mRNA表达,蛋白免疫印迹检测RSV F、p-IKKβ、p-NF-κB、IL-6蛋白的表达,首次证实甲基巴多索隆通过IKKβ/NF-κB通路缓解RSV感染所致肺部炎症损伤的药效学,甲基巴多索隆可用于制备抑制呼吸道合胞病毒感染的药物。



1. 甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染的药物中的应用。
2. 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染的药物中的应用。
3. 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒炎症因子表达的药物中的应用。
4. 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染以及呼吸道合胞病毒炎症因子表达的药物中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述甲基巴多索隆的浓度为0.01-20mg/Kg/d。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述甲基巴多索隆的浓度为0.1-10mg/Kg/d。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述甲基巴多索隆的浓度为1-5mg/Kg/d。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述甲基巴多索隆的浓度为1-3mg/Kg/d。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述甲基巴多索隆的浓度为2.5-3mg/Kg/d。
10. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述药物的剂型为片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、注射剂、口服液体中的至少一种。

甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,更具体地,涉及甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的应用。

背景技术

[0002] 呼吸道合胞病毒(Respiratory Syncytial Virus,简称RSV)是呼吸道最常见的病毒病原体之一,在全球范围内广泛传播。RSV是导致早产儿和婴幼儿支气管炎和肺炎的主要原因,约占全球学龄前儿童的60%,估计全球每年有94600-149400名5岁以下儿童死于RSV感染。RSV也是65岁以上老年人和免疫力低下人群呼吸道感染的重要病原体。据世界卫生组织统计,全球每年约3300万感染者,其中340多万严重感染者需要住院治疗,住院患者中10-31%需入住重症监护病房,3-17%需机械通气。RSV感染目前尚缺乏成熟的疫苗和有效治疗措施。因此,深入研究治疗RSV感染的药物和机制显得尤为重要。前期通过临床标本及体外实验发现:RSV感染介导了Toll样受体3(TLR3)和Toll样受体7(TLR7)的先天性免疫损伤,通过刺激NF- κ B信号通路,产生大量炎症介质,如IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-32、TNF- α 等,炎症因子增加,肺部损伤加重。

[0003] RSV虽已发现60余年,但治疗手段非常有限。到目前为止,被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)认证的RSV防治药物仅两种:吸入型利巴韦林和帕利珠单抗。利巴韦林为一种核苷类似物,是广谱的抗病毒药物。早期研究表明,它可快速地清除RSV感染,减轻患者症状和缩短住院时间,但有其它观点认为利巴韦林并没有降低RSV感染后死亡率和减少重症患者机械通气时间。此外,利巴韦林会导致溶血、先天致畸、心血管毒性等药物毒副作用,这使得它的使用受到了越来越多的质疑。帕利珠单抗是针对呼吸道合胞病毒融合蛋白(RSV F)的人源小鼠单克隆抗体,仅适用于预防RSV所致儿童严重下呼吸道感染,它能明显减少住院次数、住院时间及死亡率,但因代谢快,每半年需重新注射,价格昂贵,而且在我国没有上市。

[0004] 目前RSV感染尚缺乏成熟的疫苗和有效治疗措施,因此,亟需开发一种有效的治疗RSV感染的方法。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少解决上述现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提出甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的应用,本发明通过用倒置显微镜观察BEAS-2B细胞感染RSV后的病变效应,通过CCK8方法检测甲基巴多索隆的细胞毒性和抗病毒效应,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测RSV、IL-6、IL-8、IKK β 和NF- κ B mRNA表达,蛋白免疫印迹(Western blot)检测RSV F、p-IKK β 、p-NF- κ B、IL-6蛋白的表达发现甲基巴多索隆抗RSV感染的分子机制与IKK β /NF- κ B通路相关,证实了甲基巴多索隆通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染以及抑制呼吸道合胞病毒炎症因子表达。

[0006] 本发明的第一方面提供甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染药物中的

应用。

[0007] 具体地,甲基巴多索隆在制备抑制呼吸道合胞病毒感染的药物中的应用。

[0008] 甲基巴多索隆(Bardoxolone Methyl,简称BXM)是一种新型小分子化合物,是半合成的三萜类齐墩果酸衍生物,其CAS号为218600-53-4,具有抗氧化应激、抗炎、抗增殖、抗癌等作用。甲基巴多索隆直接作用靶点有Keap1和IKK β ,它与Keap1结合破坏了半胱氨酸残基,导致Nrf2释放,Nrf2释放可出现抗氧化、抗炎反应。甲基巴多索隆还能直接与IKK β 激活环中的Cys-179结合,抑制NF- κ B激活,从而抑制下游促炎通路。

[0009] 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染的药物中的应用。

[0010] 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒炎症因子表达的药物中的应用。

[0011] 甲基巴多索隆在制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染以及呼吸道合胞病毒炎症因子表达的药物中的应用。

[0012] 优选地,所述甲基巴多索隆的浓度为0.01-20mg/Kg/d。

[0013] 进一步优选地,所述甲基巴多索隆的浓度为0.1-10mg/Kg/d。

[0014] 进一步优选地,所述甲基巴多索隆的浓度为1-5mg/Kg/d。

[0015] 更优选地,所述甲基巴多索隆的浓度为1-3mg/Kg/d。

[0016] 更优选地,所述甲基巴多索隆的浓度为2.5-3mg/Kg/d。

[0017] 优选地,所述药物的剂型为片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、注射剂、口服液体中的至少一种。

[0018] 相对于现有技术,本发明的有益效果如下:

[0019] (1)本发明提出甲基巴多索隆可用于制备抑制呼吸道合胞病毒感染的药物,目前尚无甲基巴多索隆对RSV感染治疗及炎症损伤分子机制的相关研究,本发明通过建立RSV感染细胞和小鼠模型,用倒置显微镜观察BEAS-2B细胞感染RSV后的病变效应,通过CCK8试剂(Cell Counting Kit-8)检测甲基巴多索隆的细胞毒性和抗病毒效应,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测RSV、IL-6、IL-8、IKK β 和NF- κ B mRNA表达,蛋白免疫印迹(Western blot)检测RSV F、p-IKK β 、p-NF- κ B、IL-6蛋白的表达,首次证实甲基巴多索隆通过IKK β /NF- κ B通路缓解RSV感染所致肺部炎症损伤的药效学,甲基巴多索隆可用于制备抑制呼吸道合胞病毒感染的药物,以为临床诊治RSV提供有希望的药物、治疗靶点及策略;

[0020] (2)本发明利用甲基巴多索隆制备通过抑制IKK β /NF- κ B通路来抑制呼吸道合胞病毒感染以及呼吸道合胞病毒炎症因子表达的药物,通过对甲基巴多索隆的浓度控制可调控治疗效果,其中甲基巴多索隆施加量为1mg/Kg/d的治疗效果可达到与利巴韦林施加量40mg/Kg/d相当的水平,甲基巴多索隆施加量为3mg/Kg/d时对RSV感染小鼠的治疗效果最佳。

附图说明

[0021] 图1为体外实验的实验方法示意图;

[0022] 图2为体内实验的分组及技术路线示意图;

[0023] 图3为通过扫描电镜观察RSV感染Hep-2细胞图;

- [0024] 图4为通过显微镜观察RSV感染Hep-2和BEAS-2B细胞图；
- [0025] 图5为甲基巴多索隆在BEAS-2B细胞中通过抑制IKK β /NF- κ B通路对RSV的抑制效应图；
- [0026] 图6为TPCA-1对BEAS-2B细胞中的RSV感染的作用效果图；
- [0027] 图7为不同分组中小鼠体重变化图；
- [0028] 图8为不同分组中小鼠肺组织的苏木精-伊红染色(HE染色)图；
- [0029] 图9为不同分组中小鼠肺组织病理评分图；
- [0030] 图10为不同分组中小鼠肺组织病毒滴度测定结果图；
- [0031] 图11为甲基巴多索隆在小鼠中通过抑制IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染及相关炎症因子产生图。

具体实施方式

[0032] 为了让本领域技术人员更加清楚明白本发明所述技术方案,现列举以下实施例进行说明。需要指出的是,以下实施例对本发明要求的保护范围不构成限制作用。

[0033] 以下实施例中所用的原料、试剂或装置如无特殊说明,均可从常规商业途径得到,或者可以通过现有已知方法得到。

[0034] 一、实验方法

[0035] 1、细胞实验:

[0036] 以探究甲基巴多索隆是否可抑制RSV感染,以及甲基巴多索隆是否通过IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染导致的炎症损伤为目的,建立了RSV感染细胞模型,研究甲基巴多索隆通过IKK β /NF- κ B通路抗RSV感染的作用及分子机制。

[0037] (1) BEAS-2B(人支气管上皮细胞)、Hep-2(人喉癌上皮细胞,RSV扩增载体)细胞均购于American Type Culture Collection(ATCC),细胞株为第2-3代。

[0038] (2) 细胞RSV感染模型的制备:

[0039] 复苏BEAS-2B和Hep-2细胞并进行传代,在Hep-2细胞中进行RSV扩增,测定扩增的TCID₅₀,然后以500TCID₅₀ RSV感染BEAS-2B。

[0040] (3) 探讨IKK β /NF- κ B通路相关的分子机制:

[0041] ①以BEAS-2B细胞为实验对象,按图1分为:正常对照组、500TCID₅₀ RSV感染组、500TCID₅₀ RSV+0.1 μ M甲基巴多索隆组、500TCID₅₀ RSV+0.3 μ M甲基巴多索隆组,共4组。用倒置显微镜观察BEAS-2B细胞感染RSV后的病变效应;通过CCK8方法检测甲基巴多索隆的细胞毒性和抗病毒效应;通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测RSV、IL-6、IL-8、IKK β 和NF- κ B mRNA表达;通过蛋白免疫印迹(Western blot)检测RSV F、p-IKK β 、p-NF- κ B、IL-6蛋白的表达。

[0042] ②以IKK β 特异性抑制剂TPCA-1与甲基巴多索隆进行对照实验,实验分为:正常对照组、500TCID₅₀ RSV感染组、500TCID₅₀ RSV+0.3 μ M甲基巴多索隆组、500TCID₅₀ RSV+0.3 μ MTPCA-1组,通过RT-PCR检测RSV mRNA表达,证明不是所有的IKK β 抑制剂都可以通过IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染。

[0043] 2、动物实验

[0044] (1) 小鼠RSV感染模型制备:

[0045] ①将健康、雌性SPF级BALB/c小鼠(6-8周龄,体重20-25g)按图2随机分为:野生型组(即未经任何处理的小鼠,为空白对照)、RSV感染组、BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/d)组、RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组(利巴韦林RIB,作为阳性对照),共6组,每组小鼠6只,用苦味酸给每组小鼠编号。适应性饲养5天后开始实验,小鼠用乙醚麻醉后开始滴鼻造模,RSV感染组、RSV感染+低剂量BXM组、RSV感染+高剂量BXM组、RSV感染+利巴韦林阳性对照组中每只小鼠滴入RSV病毒原液100 μ L,野生型组及BXM组滴入等体积的生理盐水,连续滴鼻3日,从第4日开始给予腹腔注射药物,连续腹腔注射给药3日后,第7日处理小鼠。每天同一时间检测小鼠体重,密切观察小鼠精神、进食、饮水及活动状态(炸毛、弓背、流涕、咳嗽等)。

[0046] ②肺组织进行匀浆,利用TCID₅₀检测病毒的载量。

[0047] ③取出每只小鼠的右肺,进行充气,并用4%中性缓冲甲醛固定。将固定的组织包埋在石蜡中并切成5 μ m的切片。然后将玻片用HE染色,通过光学显微镜检查组织学变化,根据组织炎症、水肿和细支气管周围炎症的程度评估组织病理学变化。

[0048] ④肺组织病理评分

[0049] 根据肺组织病理评分体系对肺组织HE病理切片进行评分(如表1),总分=A+3×(B+C)+D+E,总分0-26分。

[0050] 表1.肺组织病理评分

项目	A	B	C	D	E
[0051] 分值	细支气管周围和支气管周围炎症浸润	支气管和细支气管炎性渗出物	肺泡浸润,肺泡壁增厚	血管周围浸润及血管充血	实质肺炎
0	0	0	0	0	0
[0052] 1	<25%	<25%	轻	<10%	中
2	25-75%	25-75%	中	10-50%	重
3	>75%	>75%	重	大于50%	/

[0053] (2)探讨IKK β /NF- κ B通路相关的分子机制:

[0054] 利用Western blot检测RSV F、p-IKK β 、p-NF- κ B、IL-6蛋白的表达。

[0055] 3、实验结果

[0056] (1)扫描电镜验证RSV在Hep-2细胞中扩增

[0057] Hep-2细胞适用于多种病毒的培养和增殖。因此,通过扫描电镜观察RSV感染Hep-2细胞后的变化情况,以评估RSV感染后的病毒增殖模型是否构建成功(图3)。结果显示:图3A为正常Hep-2细胞,图3B是RSV感染后的Hep-2细胞,图3B中RSV感染后的Hep-2细胞可见融合病变形成(箭头所指),证明RSV感染细胞模型成功。

[0058] (2)RSV感染Hep-2和BEAS-2B细胞后产生细胞病变效应

[0059] Hep-2细胞为RSV病毒扩增时所需的细胞,BEAS-2B细胞为实验对象,两种均为贴壁

生长的细胞。采用显微镜观察Hep-2和BEAS-2B细胞,结果如图4所示,正常Hep-2细胞呈不规则多角形(图4A),而正常BEAS-2B细胞呈长梭形(图4B)。RSV感染Hep-2及BEAS-2B细胞后均产生了细胞病变效应(Cytopathic Effect,CPE),其中Hep-2表现为细胞变圆、脱落、聚集等,部分细胞边界消失,细胞膜发生融合(图4C);而BEAS-2B表现为细胞被拉长、伸展,部分细胞被拉长后成丝状,细胞与细胞之间间隙增宽(图4D)。

[0060] (3) 甲基巴多索隆在BEAS-2B细胞中通过抑制IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染及相关炎症因子产生

[0061] 为了验证甲基巴多索隆(Bardoxolone Methyl,简称BXM)在BEAS-2B细胞中毒性作用,用不同浓度药物分别处理BEAS-2B细胞72小时。结果如图5所示,图5A为甲基巴多索隆在BEAS-2B细胞中的细胞毒性及对RSV抑制效应图,图5B和图5C分别为BXM通过IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染图及感染导致的相关炎症因子表达图。其中,图5中,Cytotoxicity为细胞毒性,Inhibition为抑制作用,Relative expression of mRNA为mRNA的相对表达,Relative protein expression为相对蛋白质表达。

[0062] 通过CCK8检测发现,当甲基巴多索隆浓度为0.4 μ M以下时,BEAS-2B细胞存活率达85%以上,而甲基巴多索隆浓度大于0.8 μ M以上时,显微镜下观察贴壁细胞有不同程度的皱缩、变形及脱落,计算得到CC₅₀(图5A),根据上述测得安全范围,选取0.025、0.05、0.1、0.2和0.3 μ M的甲基巴多索隆,来测定不同剂量的甲基巴多索隆对RSV感染BEAS-2B细胞的EC₅₀(图5A)。RSV感染介导了多条免疫调节通路,通过激活NF- κ B信号通路,产生大量炎症介质,引起反复感染加重疾病进程,而甲基巴多索隆是IKK β 抑制剂,因此本发明探讨了甲基巴多索隆是否可通过抑制IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染。

[0063] 通过RT-PCR检测发现,RSV感染BEAS-2B细胞24小时后RSV、NF- κ B、IKK β 、IL-6、IL-8mRNA表达增加,但当加入甲基巴多索隆后,RSV、NF- κ B、IKK β 、IL-6、IL-8mRNA表达下降(*p<0.05,**p<0.01为500TCID₅₀RSV感染组与正常对照组相比,#p<0.05,##p<0.01为500TCID₅₀RSV+(0.1/0.3 μ M)甲基巴多索隆组与500TCID₅₀RSV感染组相比)(图5B)。

[0064] 通过Western blot检测发现,BEAS-2B细胞经RSV感染后,RSV F、IL-6、p-NF- κ B和p-IKK β 蛋白表达增加,但当加入甲基巴多索隆后,RSV F、IL-6、p-NF- κ B和p-IKK β 蛋白表达降低。说明甲基巴多索隆可能通过抑制IKK β /NF- κ B通路来达到抑制RSV感染及炎症因子表达的效果(*p<0.05,**p<0.01为500TCID₅₀RSV感染组与正常对照组相比,#p<0.05,##p<0.01为500TCID₅₀RSV+(0.1/0.3 μ M)甲基巴多索隆组与500TCID₅₀RSV感染组相比)(图5C)。

[0065] (4) 其他IKK β 特异性抑制剂对经RSV感染后BEAS-2B细胞的作用

[0066] 以IKK β 特异性抑制剂TPCA-1与甲基巴多索隆进行对照实验,处理BEAS-2B细胞24小时。

[0067] 结果表明:BEAS-2B细胞经RSV感染后,RSV mRNA表达明显增加(**P<0.01),甲基巴多索隆作为IKK β 抑制剂可以抑制RSV mRNA表达(##P<0.01)(图6,其中图6中Relative expression of mRNA为mRNA的相对表达),而IKK β 特异性抑制剂TPCA-1不能抑制RSV mRNA表达(P>0.05)。以上结果表明并非所有IKK β 抑制剂都可抑制RSV mRNA表达。

[0068] (5) 小鼠体重变化

[0069] 将SPF级BALB/c雌性小鼠按图2方法进行分组(共6组,分别为野生型组(即未经任何处理的小鼠,为空白对照)、RSV感染组、BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/

d)组、RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组)及处理。每日同一时间将小鼠进行称重,结果如图7所示,观察发现,野生型组及BXM组小鼠毛色顺滑、行为活泼、进食及饮水正常,BXM组小鼠起初体重略有下降,而后体重逐渐保持平稳,但精神行为和饮食无明显变化。RSV感染组小鼠进行滴鼻实验后均出现体重逐渐下降、毛发干枯紊乱、精神差、不活泼、喜欢聚堆,而且进食量和饮水量均减少。RSV感染+低/高剂量BXM组小鼠起初表现与RSV感染组相似,但从第5天开始,经甲基巴多索隆和利巴韦林处理的RSV感染组小鼠的体重逐渐上升,精神行为异常逐渐改善,在RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)改善最明显,RSV感染+低剂量BXM组(1mg/Kg/d)与RSV感染+利巴韦林组(40mg/Kg/d)结果较为接近。说明甲基巴多索隆能抑制RSV感染小鼠,当BXM的剂量为3mg/Kg/d时效果最为显著,当BXM的剂量为1mg/Kg/d时的效果可以达到与阳性对照利巴韦林相当的水平。其中图7中,Virus为RSV感染,Drugs为施用甲基巴多索隆,Treat为治疗,Weight of Mice为小鼠的重量。

[0070] (6) 小鼠肺组织病理变化及评分

[0071] 将SPF级BALB/c雌性小鼠按图2中的实验方法进行分组(野生型组、RSV感染组、BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/d)组、RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组)及处理。第7天处死小鼠,取小鼠右肺下叶以4%多聚甲醛固定48h后进行HE染色,结果如图8所示,其中图8A为正常对照组,图8B为RSV感染组,图8C为RSV感染+低剂量BXM组(1mg/Kg/d),图8D为RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d),图8E为RSV感染+利巴韦林阳性对照组(40mg/Kg/d),图8F为BXM组(3mg/Kg/d),各组上层图片放大倍数为200,下层图片放大倍数为400。

[0072] 图8结果显示:野生型组和BXM组小鼠肺组织、肺泡间隔正常(图8A、图8F)。RSV感染组与野生型组相比,RSV感染组肺组织明显炎症细胞浸润、有核细胞增多、肺泡间隔增厚、肺泡壁断裂损伤、支气管小血管炎症细胞浸润、支气管伴渗出(图8B)。而RSV感染+低/高剂量BXM组与RSV感染组相比,肺组织炎症细胞浸润减少、肺泡壁完整、肺泡间隔增厚减少、支气管小血管炎症浸润减少,在RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)缓解效果最为明显(图8D),而RSV感染+低剂量BXM组(1mg/Kg/d)(图8C)较RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)(图8D)效果欠佳。在RSV感染+利巴韦林阳性对照组(40mg/Kg/d)也存在炎症缓解表现(图8E),但较RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)效果稍欠佳。

[0073] 此外,还进行了肺组织病理评分(表1、图9),统计可见RSV感染+低/高剂量BXM组和RSV感染+利巴韦林阳性对照组一样,可明显降低小鼠肺组织炎症情况(感染组与正常组比较,** $p < 0.01$;药物组与感染组比较,^{###} $p < 0.01$),而且RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)较RSV感染+低剂量BXM组(1mg/Kg/d)效果更加明显(^{▲▲} $p < 0.01$)。其中图9中Histology score of lung tissue为肺组织的组织学评分。

[0074] (7) 小鼠肺组织病毒载量

[0075] 进一步检测了小鼠肺组织中RSV病毒滴度变化情况,通过TCID₅₀方法测定肺组织病毒滴度。结果显示:RSV感染组中肺组织RSV病毒滴度最高,经甲基巴多索隆和利巴韦林药物处理后病毒滴度明显下降(药物组包括:RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/d)组、RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组、RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组,药物组与RSV感染组对比,[#] $p < 0.05$,^{###} $p < 0.01$),RSV感染+高剂量BXM组(3mg/Kg/d)的病毒滴度比RSV感染+低剂量

BXM组(1mg/Kg/d)下降更为明显(** $p < 0.01$) (图10,其中Virus Titer为病毒滴度)。

[0076] (8) 甲基巴多索隆在小鼠中通过抑制IKK β /NF- κ B通路抑制RSV感染及相关炎症因子产生

[0077] 病毒入侵机体后产生大量炎性介质使机体损伤,在细胞实验中本发明已验证甲基巴多索隆可抑制RSV感染并通过抑制IKK β /NF- κ B通路抑制炎症因子产生。因此,本发明进一步在RSV感染小鼠模型中提取小鼠肺组织通过Western blot检测RSV F、p-IKK β 、p-NF- κ B及IL-6蛋白的表达情况。结果显示:RSV感染组的RSV F蛋白表达水平较野生型组升高(图11A和11C,** $p < 0.01$);RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/d)组和RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组能明显抑制RSV F蛋白表达水平(图11A和11C,## $p < 0.01$),而RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组虽较RSV感染组RSV F蛋白表达有所下降,但无统计学意义(图11A和11C, $p > 0.05$),表明甲基巴多索隆在体内也能抑制RSV感染。本发明进一步检测IKK β /NF- κ B通路相关蛋白表达,结果显示:RSV感染组与野生型组相比,p-IKK β 、p-NF- κ B及IL-6的蛋白表达水平明显升高(图11A-11B,图11D-11F,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$),野生型组和BXM组的p-IKK β 、p-NF κ B及IL-6蛋白表达水平一致,但感染后RSV感染+低剂量BXM(1mg/Kg/d)组、RSV感染+高剂量BXM(3mg/Kg/d)组和RSV感染+利巴韦林(40mg/Kg/d)阳性对照组处理的p-IKK β 、p-NF- κ B及IL-6的蛋白表达水平较RSV感染组明显下降(图11A-11B,图11D-11F,# $p < 0.05$,## $p < 0.01$)。以上结果说明,甲基巴多索隆在小鼠中通过抑制IKK β /NF- κ B通路以达到抑制RSV感染及相关炎症因子表达的效果(图11中,Relative protein expression为相对蛋白质表达)。其中图11中Relative protein expression为相对蛋白质表达。

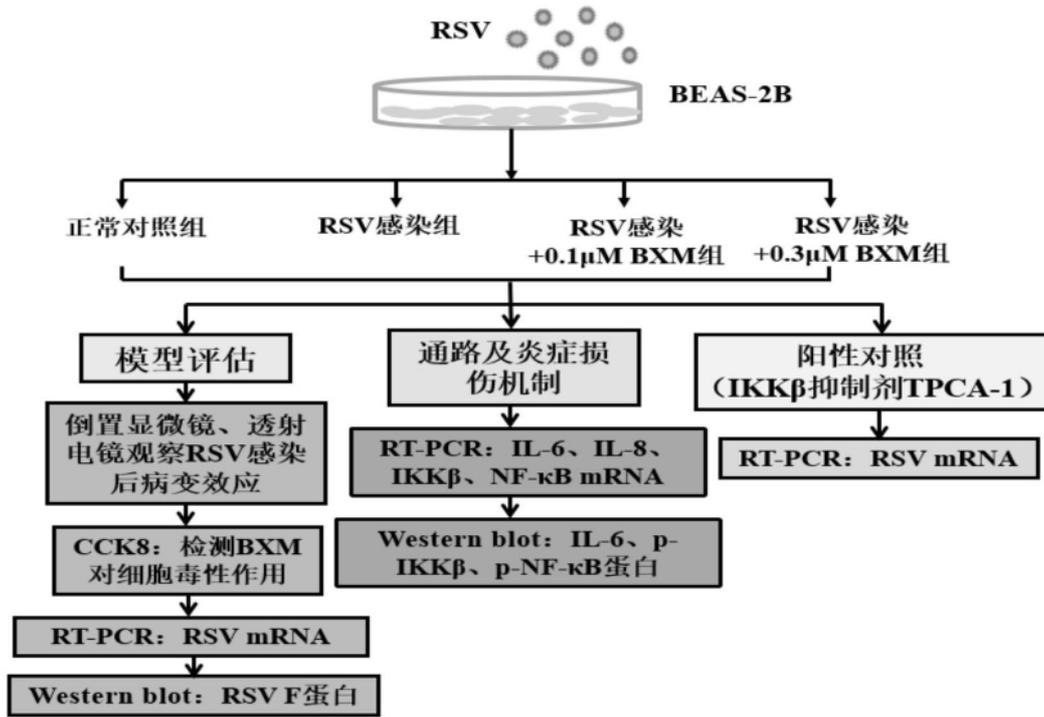


图1

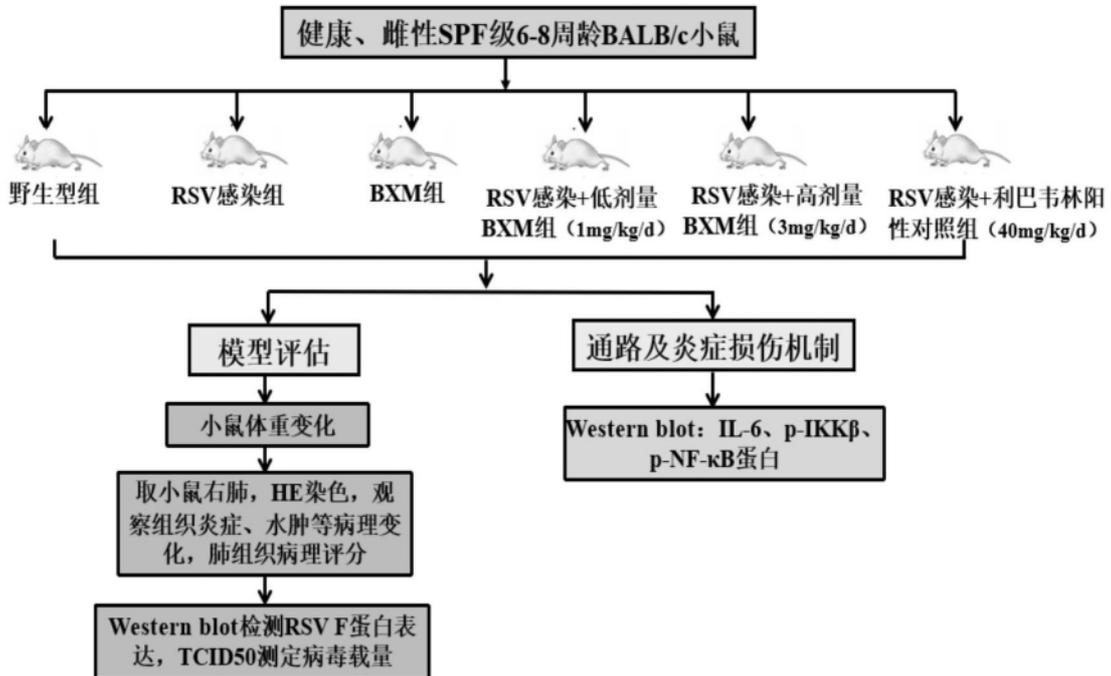


图2

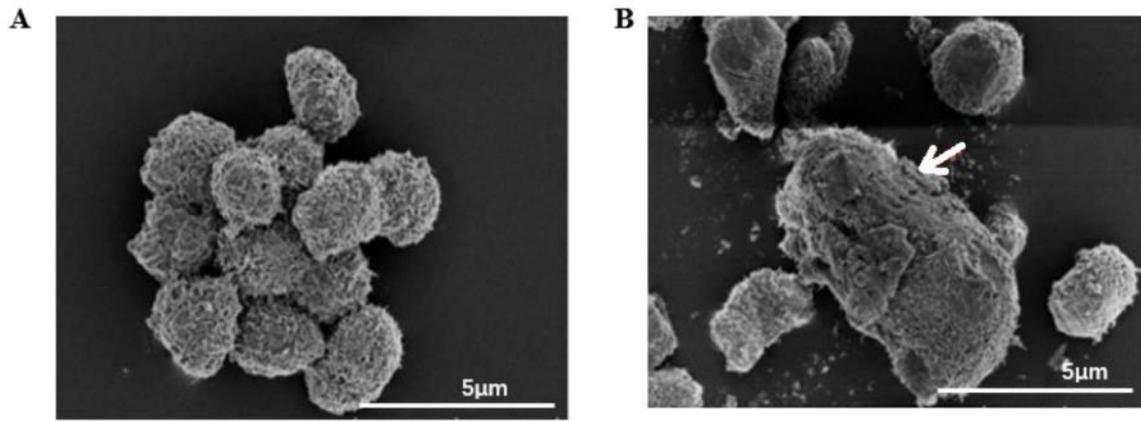


图3

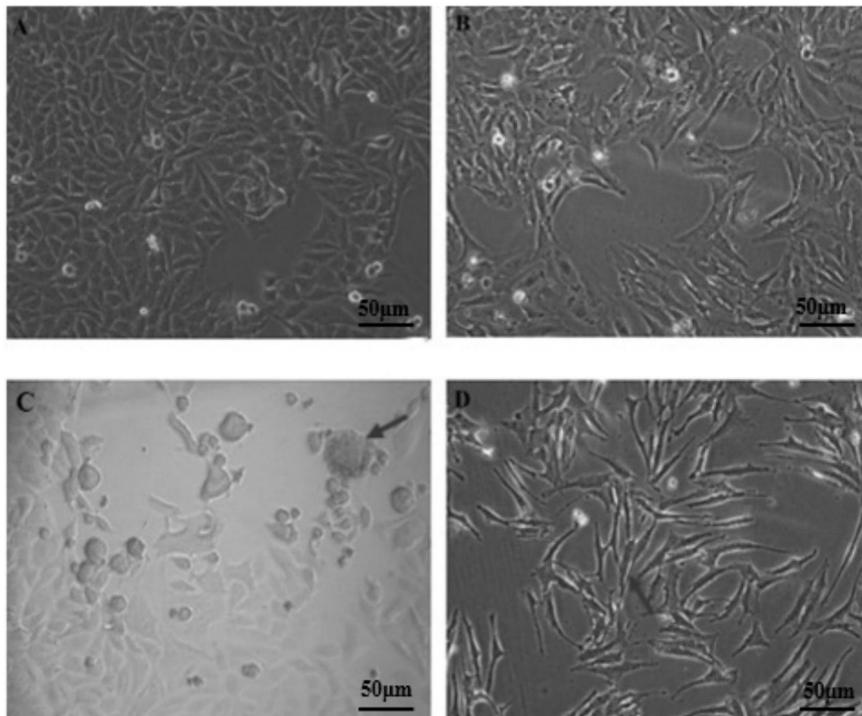
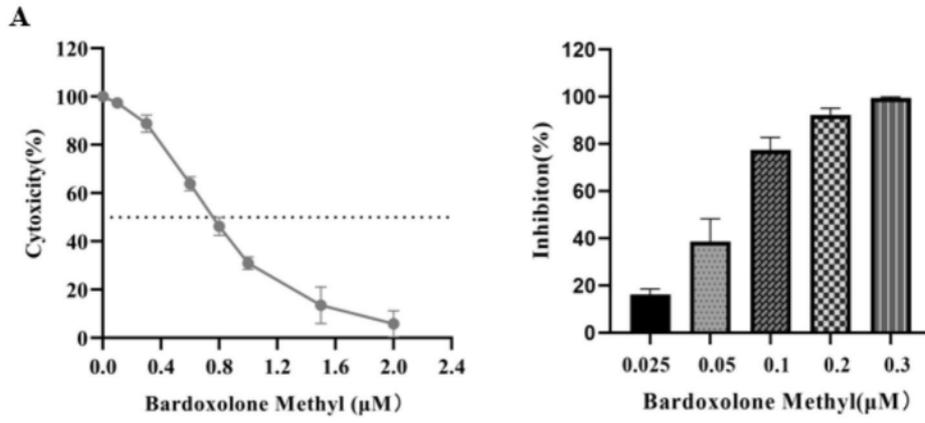


图4



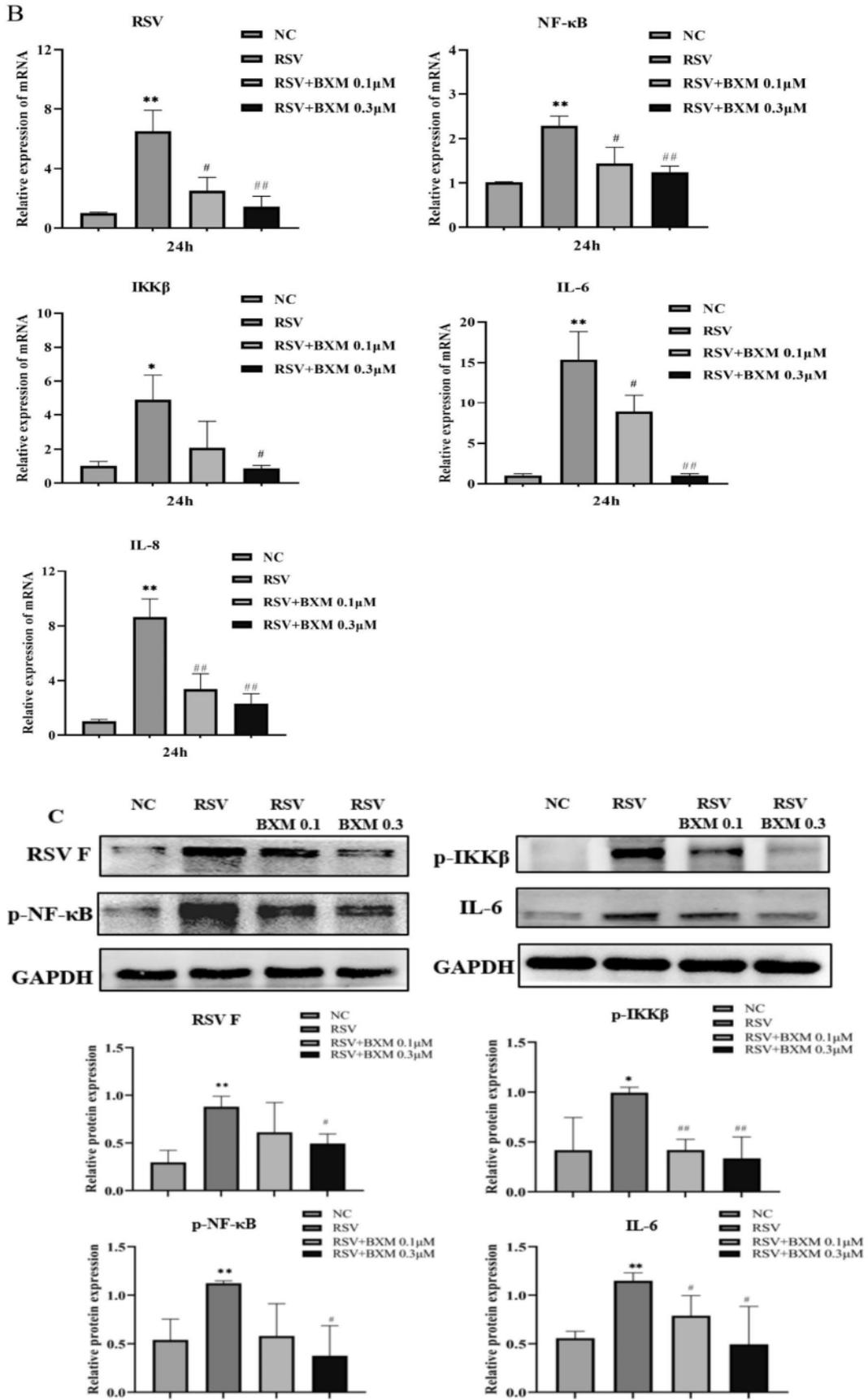


图5

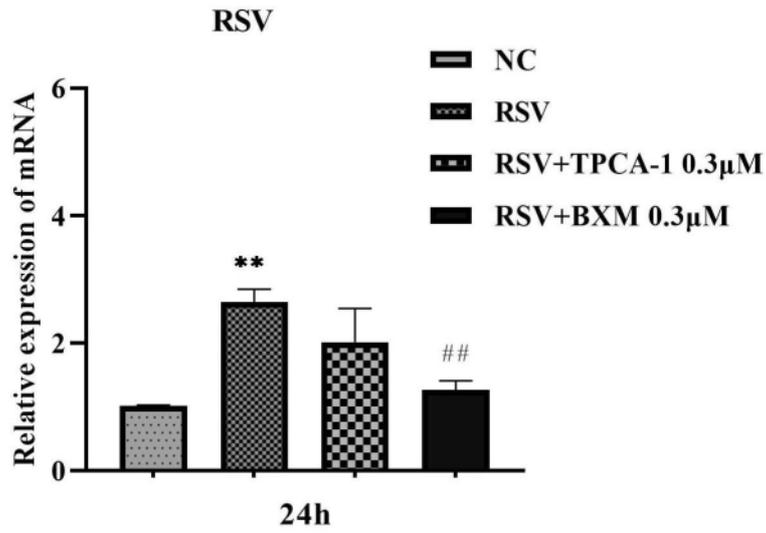


图6

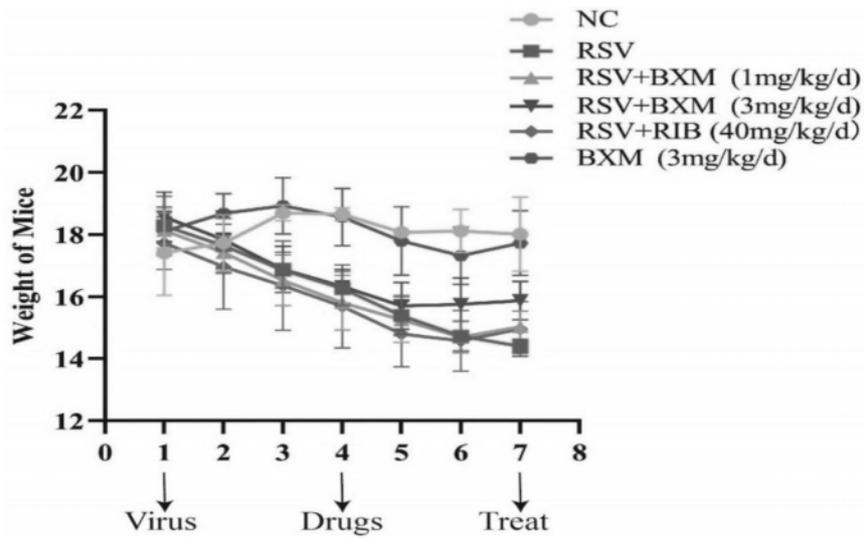
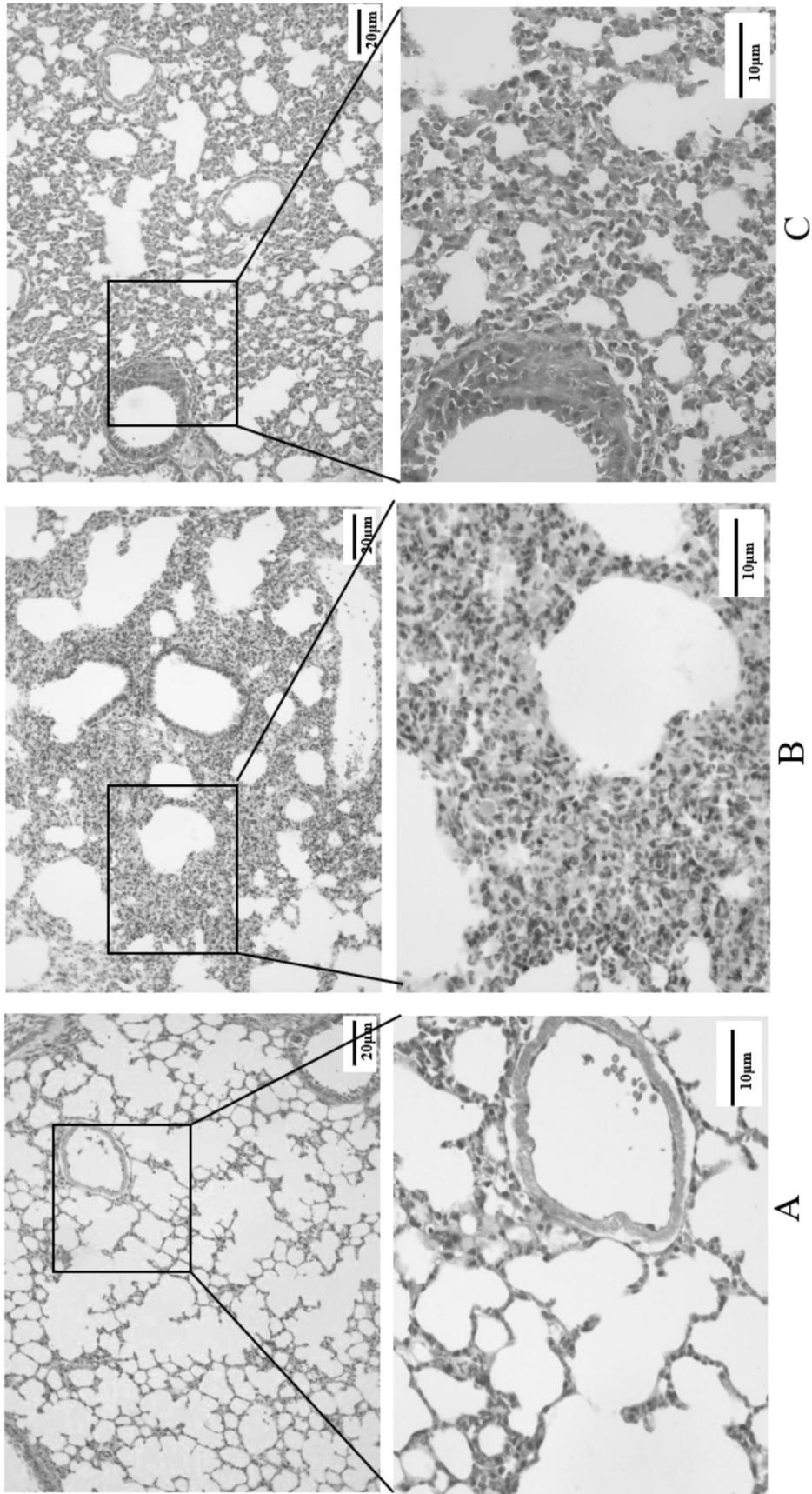


图7



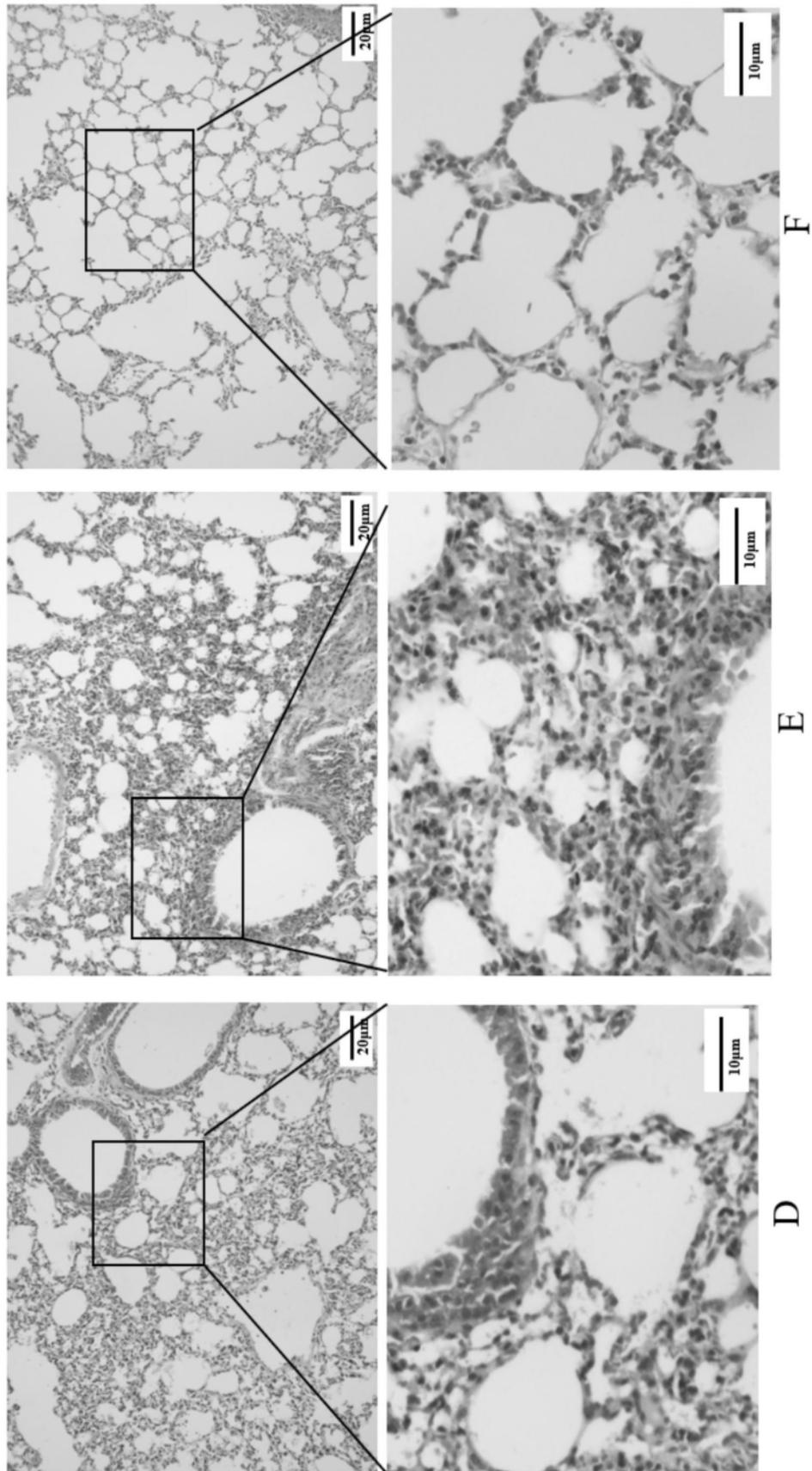


图8

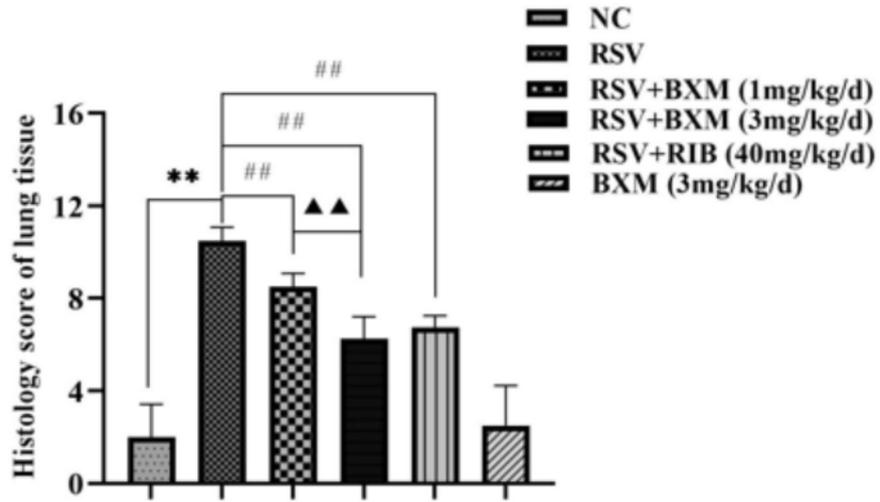


图9

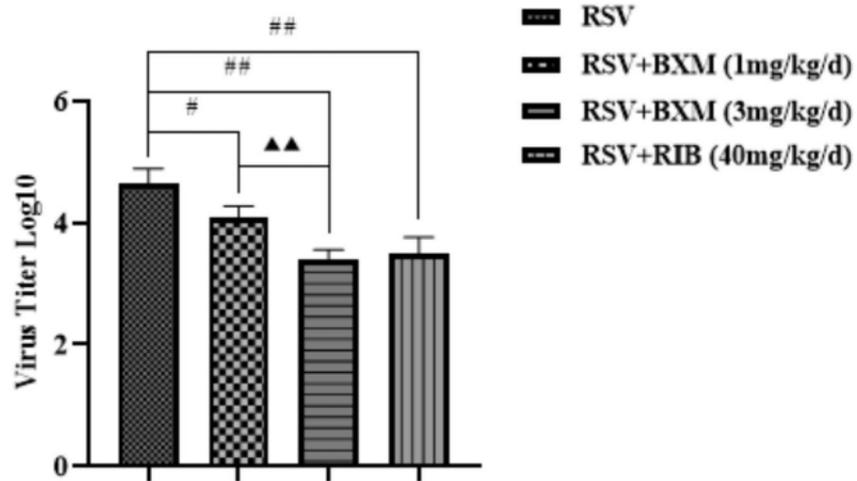


图10

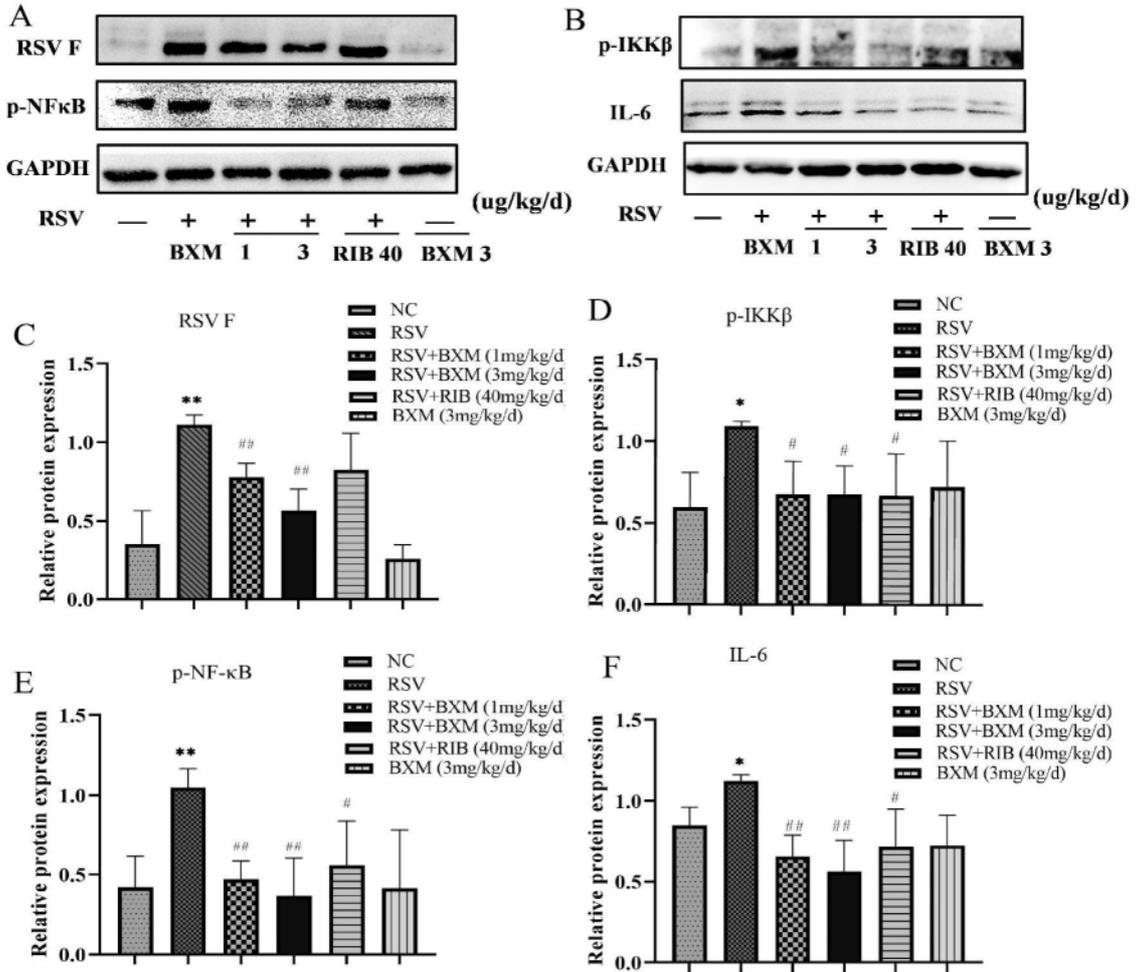


图11