

清燥救肺汤及其分解剂对肺炎支原体感染小鼠肺部炎症相关因子的影响

吴振起^{1,*}, 敏娜², 岳志军¹, 杨璐², 王雪峰¹, 杨慧²

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学研究生学院, 沈阳 110847)

【摘要】 目的 探讨清燥救肺汤(QJD)及其分解剂对肺炎支原体(MP)感染小鼠血清中TNF- α 、INF- γ 含量及肺组织中MPN372、P1、AQP5表达的影响,明确其抗MP感染的分子机制。**方法** 将144只SPF级BABL/c小鼠随机分成正常组(A组)、模型组(B组)、QJD组(C组)、QJD分解剂I组(D组)、QJD分解剂II组(E组)及阿奇霉素组(F组),每组24只。除A组外,对其余5组小鼠进行MP感染模型处理,造模后分别予对应分组药物灌胃治疗,于造模后第3、7、10、14天进行取材。镜下观察小鼠肺组织病理切片,对小鼠肺组织病理炎症程度进行评分;并计算小鼠肺指数及干湿比;采用qPCR法对MPN372、P1基因含量进行测定;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定各组小鼠血清TNF- α 、INF- γ 水平变化;Western blot法检测AQP5蛋白的表达。**结果** MP感染后,镜下可见肺泡间隔增厚,细支气管壁增厚,大量炎症细胞浸润;其肺指数升高,干湿比降低;TNF- α 、INF- γ 的含量呈升高趋势,并于第7天达到峰值;AQP5的蛋白表达呈回落趋势,于第14天开始逐渐升高;与B组比较,从第7天开始,C组能够下调MPN372、P1及TNF- α 的表达水平,上调INF- γ 、AQP5的表达水平;其中D组的作用主要表现在下调MPN372、P1、TNF- α 的表达,E组的作用主要表现在上调INF- γ 、AQP5的表达。**结论** QJD可以控制MP感染后肺部炎症,减少MP毒素MPN372的产生和P1黏附蛋白的表达;上调INF- γ 、AQP5蛋白表达,下调TNF- α 的表达,是其作用机制之一。

【关键词】 肺炎支原体;清燥救肺汤;细胞因子;免疫损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0120-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.019

Effect of Qingzao Jiufei decoction and its decomposing agent on lung inflammation-related factors in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae*

WU Zhenqi^{1,*}, MIN Na², YUE Zhijun¹, YANG Lu², WANG Xuefeng¹, YANG Hui²

(1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China.

2. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847)

Corresponding author: WU Zhenqi. E-mail: zhenqiwu@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Qingzao Jiufei Tang (QJD) and its decomposing agent on the levels of TNF- α , INF- γ levels of TNF- α of Qingo, P1 and AQP5 in lung tissue of mice infected with *Mycoplasma pneumoniae* (MP), and to clarify its molecular anti-infective mechanism. **Methods** One hundred-forty-four SPF grade BABL/c mice were randomly divided into the normal group (group A), model group (group B), QJD group (group C), QJD decomposition agent I group (group D), QJD decomposition group II Group (group E) and azithromycin group (group F), with 24 rats in each group. Besides the group A, the other 5 groups of mice were treated with MP infection. After the mod-

【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 81373687);辽宁省科技厅项目(No. 2014020044)。

Funded by National Natural Science Foundation, China (No. 81373687) and Liaoning Provincial Science and Technology Department Project (No. 2014020044).

【通信作者】 吴振起(1974-),男,医学博士,主任医师,硕士生导师,以中医药防治感染性疾病为研究方向。E-mail: zhenqiwu@163.com

eling, the mice were given corresponding drugs by gastric gavage, and samples were obtained on the days 3, 7, 10, 14 after the model was established. The lung tissue sections were examined by histopathology, and the degrees of inflammation in lung tissues in the mice were evaluated, and the lung index and the ratio of dry and wet lung weight ratio in the mice were calculated. The levels of MPN372 and P1 genes were determined by qPCR assay. The serum TNF- α and INF- γ levels in the mice were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of AQP5 protein was detected by Westernblot. **Results** After MP infection, the pathological examination revealed thickening of alveolar septum and bronchioles, and extensive inflammatory cell infiltration in the lung tissues. The lung index was increased and the ratio of dry and wet lung weight ($P < 0.05$). TNF- α and INF- γ cedd and was increased, and reached the peak on the seventh day. The expression of AQP5 protein showed a downward tendency, and began to gradually increase on the 14th day. Compared with the group B, the expression levels of MPN372, P1 and TNF- α in the group D were down-regulated, and the expression levels of INF- γ levein the group E were up-regulated from the 7th day. **Conclusions** QJD can control pulmonary inflammation in mice after MP infection. The decrease of production of MP toxin MPN372 and the expression of adhesion protein P1, the up-regulation of expression of INF- γ and AQP5 proteins, and down-regulation of TNF- α expression are one of the mechanisms of its action.

【Key words】 *Mycoplasma pneumoniae*; Qing Zao Jiu Fei Tang decoction; cytokines; immune damage

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 是一种介于病毒与细菌之间的非活性微生物,是儿童社区获得性肺炎的主要病原体,20%~40%的呼吸道感染均由 MP 感染所致^[1]。其致病机制主要是对气道上皮细胞的黏附作用,产生氧化应激并释放 CARDS 毒素,导致气道损伤^[2]。肺炎支原体肺炎 (MP pneumonia, MPP) 其临床特征性症状“干咳”,恰如燥邪伤肺所致,可见头痛身热,干咳无痰,气逆而喘,咽喉干燥等症。治燥经典名方清燥救肺汤 (Qingzao Jiufei decoction, QJD) 具有清肺润燥,益气养阴的功效,用于治疗临床上小儿 MP 感染后燥热伤肺之证,在临床上已取得较好的疗效^[3]。前期的实验研究已发现 QJD 具有抗 MP 作用^[4],为探寻 QJD 的起效组份,对其进行了拆方研究。根据药物的功效特点,将 QJD 拆解成含有“宣、清、降”法的分解 I 组和含有“润、补”法的分解 II 组,试图从炎症、细胞毒素、黏附蛋白表达及水通道蛋白等方面,来探讨 QJD 及其分解剂控制 MP 感染所致肺部炎症的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 144 只,体重 (20 \pm 2)g,雌雄各半,购于辽宁长生生物技术有限公司【SCXK(辽)2013-0009】,饲养于辽宁中医药大学实验动物中【SYXK(辽)2015-0001】。水和饲料经高温高压消毒后使用。饲养环境:室温 20~

22 $^{\circ}$ C,湿度 (50 \pm 2)%,12 h/12 h 明暗周期,分笼饲养。

1.1.2 病毒株

MP 标准株 FH,由辽宁中医药大学附属医院病毒室保存。

1.1.3 实验药品及制备

药物组成:QJD 全方组:人参 21 g、阿胶 21 g、麦门冬 36 g、杏仁 21 g、石膏 36 g、甘草 30 g、桑叶 90 g、枇杷叶 30 g、胡麻仁 30 g;分解剂 I 组:杏仁 21 g、石膏 36 g、桑叶 90 g、枇杷叶 30 g;分解剂 II 组:人参 21 g、阿胶 21 g、麦门冬 36 g、甘草 30 g、胡麻仁 30 g,由辽宁中医药大学附属医院门诊中草药局提供,经辽宁中医药大学中药分析教研室鉴定为正品。供试药液的配制:石膏水煎浓缩,阿胶烱化,药液备用;余药用 8 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 次,合并药液,回收溶剂并浓缩,分别制成含生药 1、0.61、0.39 g/mL 混悬液。阿奇霉素分散片(东北制药,批号:4170201),配成 6 mg/mL 药液。每组药液分别 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.4 试剂与仪器

Trizol 总 RNA 提取试剂 (Invitrogen, 1203406), RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa, Bk2701), DEPC (TaKaRa, BBI0916S03), DNA marker DL2000 (TaKaRa, CB3301), TNF- α ELISA 试剂盒 (BOSTER, 982354956), INF- γ ELISA 试剂盒 (BOSTER, 971335616), AQP5 (BOSTER, 287487), GAPDH (BOSTER, 14MA18), ECM II of Western Blotting 检测试剂盒浓缩型兔 IgG 二抗 (BOSTER, 12J27C),

TP1020 型自动组织脱水处理机 (Leica, 德国), EG1150 型石蜡包埋机 (Leica, 德国), RM2135 型精密轮转切片机 (Leica, 德国), BX50F4 型显微镜 (Olympus), 荧光定量 PCR 仪 (LC-II, 美国), IMark 型酶标仪 (Thermo, 美国), PowerPacTM Universal Power Supply 电泳通用型电源 (Bio-Rad, 美国), Trans-Blot SD 半干转印系统 (Bio-Rad, 美国), FlourChem Q 蛋白印记成像系统 (Proteinsimple, 美国), 低温高速离心机 (Heraeus, 德国)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

将 144 只 BALB/c 小鼠按随机数字表法分为 6 组, 正常组 (A 组)、模型组 (B 组)、清燥救肺汤组 (C 组)、分解剂 I 组 (D 组)、分解剂 II 组 (E 组) 及阿奇霉素组 (F 组), 每组 24 只, 对各组小鼠进行标记称重。

1.2.2 模型制备

除 A 组外, 每组小鼠均在乙醚轻度麻醉下, 用 1 mL 注射器缓慢向鼻腔中滴入 1×10^7 CCU/mL 的 MP 菌液 0.1 mL, 连续滴鼻 3 d。将正常组小鼠置于无菌同等房间, 滴鼻 0.1 mL 蒸馏水。

1.2.3 给药方法

造模后, C 组、D 组及 E 组均给予 0.3 mL/只的对应方剂进行灌胃, 1 次/日, 连续 14 d; F 组, 给予每只阿奇霉素 0.3 mL, 1 次/日, 灌胃, 连续 3d, 停药 4 d, 2 个循环, 停药期间蒸馏水灌胃; A 组、B 组每只给予 0.3 mL 蒸馏水灌胃。各组小鼠分别于造模后第 3、7、10、14 天, 给药后禁食、禁水 4 h 后取材。

1.2.4 光镜下病理组织学观察

用 4% 多聚甲醛固定的组织包埋成蜡块, 切片机切成薄片约 5 μ m, 苏木精-伊红 (HE) 染色后在光镜下观察肺组织病理学改变。病理变化程度计分方法依照文献^[5]。每个标本取 6 张切片, 每张切片随机取 3 个视野, 用高清晰度 Olympus BX50 系统生物显微镜采集图像, 根据计分方法进行分析。

1.2.5 qPCR 法 MPN372、P1 基因含量测定

引物根据文献设计^[6], P1 上游引物: 5'-TGGAT-TCTCATCCTCACC GCCACC-3'; 下游引物: 5'-CAAT-GCCATCACCCGCGCTTAAC C-3'; MPN372 上游引物: 5'-CAGAAACACCCACAGCTATT-3'; 下游引物: 5'-CACGTTGATACGCAAAGGAAGT-3'; 内参三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH), G1: 5'ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG 3', G2: 5'CTC AGT GTA GCC CAG

GAT GC 3'; 扩增特异片段长度为 528 bp, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。将各组小鼠肺组织取出, 制造细胞悬液, 用 Trizol 提取细胞总 RNA。分析 RNA 的纯度及完整性, 检测 RNA 质量合格后, 进行反转录, 以反转录产物为模板, 加入 MPN372、P1 的引物, 进行 qPCR 检测。

1.2.6 血清 TNF- α 、INF- γ 表达水平检测

于感染后第 3、7、10、14 天取材, 摘眼球取血, 离心, 取上清, 存于 EP 管放于 -80°C 冷冻以备用。采用双抗体夹心 ELISA 法, 测定小鼠血清中 TNF- α 、INF- γ 表达水平, 分别用小鼠 TNF- α 、INF- γ 的 ELISA 试剂盒。检测程序按照试剂盒说明书进行。

1.2.7 Western blot 法检测 AQP5 蛋白的表达

用总蛋白提取试剂提取总蛋白, 离心取上清液, -20°C 冰箱中保存。BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 用蒸馏水调整到统一浓度, 提取液中加入 $5 \times$ SDS 上样缓冲液, 100°C 变性 10 min, 蛋白上样每孔含 10 μ L, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜 30 min, 2% BSA 室温封闭 2 h。一抗室温孵育 2 h, 4°C 过夜, TBST 每次 10 min 洗膜 (3 次), 二抗室温孵育 1 h, TBST 每次 10 min 洗膜 (3 次)。ECL 发光, Fluor Chem Q 蛋白质印迹, 成像系统显色。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺指数、干湿比及病理评分

MP 感染后, 各时间点小鼠肺指数均升高、干湿比降低 ($P < 0.05$), 如表 1 所示。与 B 组比较, 第 3 天 C 组、F 组小鼠肺指数、病理评分降低, C 组干湿比升高 ($P < 0.05$); 第 7 天各组肺指数、病理评分均降低, 干湿比均升高 ($P < 0.05$); 第 10、14 天, C 组、D 组、F 组肺指数降低, 各组病理评分均降低, 干湿比均升高 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, 第 3 天 E 组肺指数, 第 7 天 D 组肺指数、干湿比, 第 10、14 天 D 组、E 组干湿比、病理评分, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。第 3 天与第 14 天比较, 各组病理评分差异均有显著性 ($P < 0.05$), 各组肺指数及干湿比差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺指数、干湿比及病理评分($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Lung index, ratio of dry and wet lung weight, and pathological scores in the mice of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组 Groups	肺指数(%) Pulmonary function index (%)	干湿比 Dry/Wet ratio	病理评分 Pathological scores	
A 组	3 d	0.53 ± 0.05	0.276 ± 0.007	—
	7 d	0.56 ± 0.06	0.275 ± 0.007	—
	10 d	0.55 ± 0.03	0.278 ± 0.009	—
	14 d	0.54 ± 0.03	0.278 ± 0.007	—
B 组	3 d	0.87 ± 0.08	0.215 ± 0.009	7.83 ± 0.41
	7 d	0.92 ± 0.19	0.222 ± 0.015	14.83 ± 1.17
	10 d	0.95 ± 0.14	0.953 ± 0.016	8.17 ± 0.75
	14 d	0.85 ± 0.18	0.237 ± 0.017	13.67 ± 1.21 [#]
C 组	3 d	0.68 ± 0.03 [*]	0.239 ± 0.019 [*]	6.67 ± 0.82 [*]
	7 d	0.69 ± 0.05 [*]	0.278 ± 0.009 [*]	7.83 ± 0.75 [*]
	10 d	0.67 ± 0.09 [*]	0.276 ± 0.008 [*]	4.83 ± 0.75 [*]
	14 d	0.61 ± 0.05 [*]	0.616 ± 0.009 [*]	3.50 ± 1.05 ^{*#}
D 组	3 d	0.74 ± 0.07	0.220 ± 0.016	7.33 ± 1.03
	7 d	0.71 ± 0.04 ^{*△}	0.237 ± 0.018 [△]	10.83 ± 0.75 [*]
	10 d	0.70 ± 0.04 [*]	0.255 ± 0.019 ^{*△}	6.33 ± 1.21 ^{*△}
	14 d	0.65 ± 0.06 [*]	0.261 ± 0.018 [*]	5.67 ± 1.21 ^{*△#}
E 组	3 d	0.83 ± 0.08 ^{*△}	0.222 ± 0.018	7.00 ± 0.63
	7 d	0.81 ± 0.08 [*]	0.242 ± 0.016 ^{*△}	8.33 ± 0.52 [*]
	10 d	0.85 ± 0.20	0.262 ± 0.019 ^{*△}	5.67 ± 0.82 ^{*△}
	14 d	0.80 ± 0.17	0.274 ± 0.018 ^{*△}	4.17 ± 1.33 ^{*△#}
F 组	3 d	0.66 ± 0.05 [*]	0.230 ± 0.020	6.71 ± 0.95 [*]
	7 d	0.68 ± 0.06 [*]	0.260 ± 0.022 [*]	7.57 ± 0.30 [*]
	10 d	0.63 ± 0.07 [*]	0.272 ± 0.018 [*]	5.14 ± 0.38 [*]
	14 d	0.59 ± 0.04 [*]	0.274 ± 0.017 [*]	4.33 ± 1.63 ^{*#}

注:与 A 组比较, $P < 0.05$; 与 B 组比较, $*P < 0.05$; 与 C 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

Note. Compared with the group A, $P < 0.05$; compared with the group B, $*P < 0.05$; compared with the group C, $^{\Delta}P < 0.05$. Comparison between 3-days and 14-days groups, $^{\#}P < 0.05$.

2.2 肺组织光镜病理组织学观察

正常组小鼠肺泡、肺泡囊、肺泡隔形态完整, 周围血管未见炎细胞浸润(图 1A)。模型组小鼠肺泡、肺泡囊、肺泡管、肺泡隔等结构消失, 肺泡间隔增厚, 细支气管壁增厚, 大量炎症细胞浸润, 肺泡壁毛细血管扩张(图 1B)。全方组小鼠肺泡内可见少量炎性细胞, 支气管粘膜上皮水肿明显减轻(图 1C)。分解剂 I 组小鼠可见少量炎性细胞浸润于肺组织, 并可见其背膜增厚(图 1D)。分解剂 II 组小鼠支气管粘膜上皮水肿明显, 较多嗜酸性粒细胞浸润于肺组织(图 1E)。阿奇霉素组小鼠可见少量炎性细胞, 与模型组相比, 炎细胞数量明显减少(图 1F)。

2.3 qPCR 检测 MPN372、P1 的 mRNA 水平

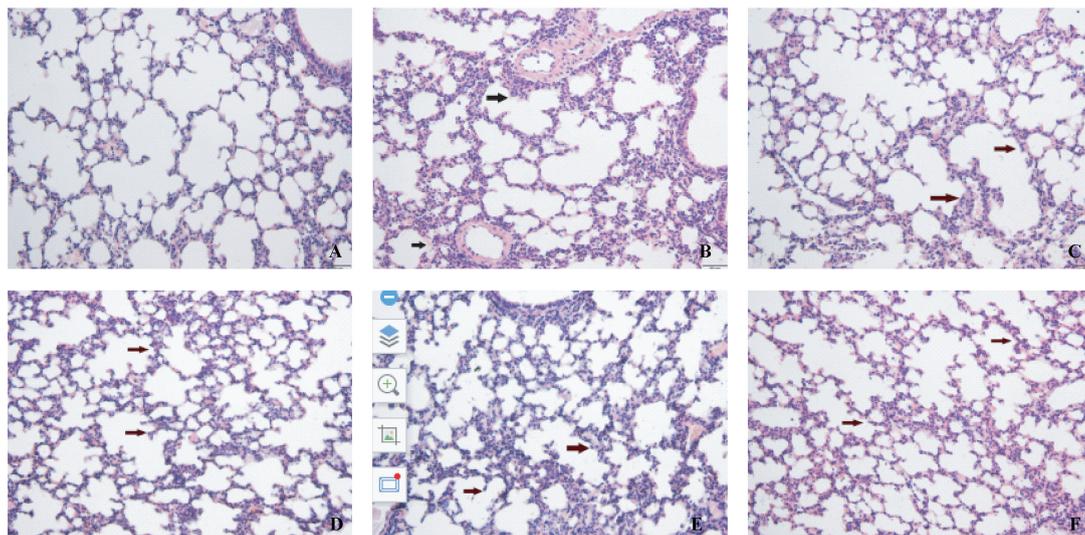
MP 感染后, 各时间点小鼠肺中 MPN372 含量均升高, 如图 2 所示。药物干预后, 与 B 组比较, 各用药组在第 3 天开始下降, 于第 7 天显著降低, 差异有显著性($P < 0.05$); 与 C 组比较, 在第 7 天时 D 组和 E 组差异有显著性($P < 0.05$), F 组差异无显著性

($P > 0.05$); 第 10 天开始 D 组和 F 组差异无显著性($P > 0.05$), E 组差异有显著性($P < 0.05$); 第 3 天与第 14 天比较, C、D、F 组差异有显著性($P < 0.05$), B 组、E 组差异无显著性($P > 0.05$)。

MP 感染后, 各时间点小鼠肺中 P1 含量均升高, 如图 3 所示。药物干预后, 与 B 组比较, 各用药组从第 7 天开始均有显著降低, 差异有显著性($P < 0.05$); 与 C 组比较, 在第 7 天时 D 组和 F 组差异无显著性($P > 0.05$), E 组差异有显著性($P < 0.05$); 第 14 天时, 各用药组之间差异均无显著性($P > 0.05$); 第 3 天与第 14 天比较, B 组差异无显著性($P > 0.05$), C、D、E、F 组差异有显著性($P < 0.05$)。

2.4 小鼠血清中 TNF- α 、INF- γ 含量检测

MP 感染后, 各时间点小鼠血清中 TNF- α 含量均显著增高($P < 0.05$), 如表 2 所示。且于第 7 天达到峰值, 差异有显著性($P < 0.05$); 药物干预后, 与 B 组比较, 各用药组于第 3 天改变不明显($P > 0.05$), 其中 E 组各时间点改变均不明显, 差异无显著性($P >$

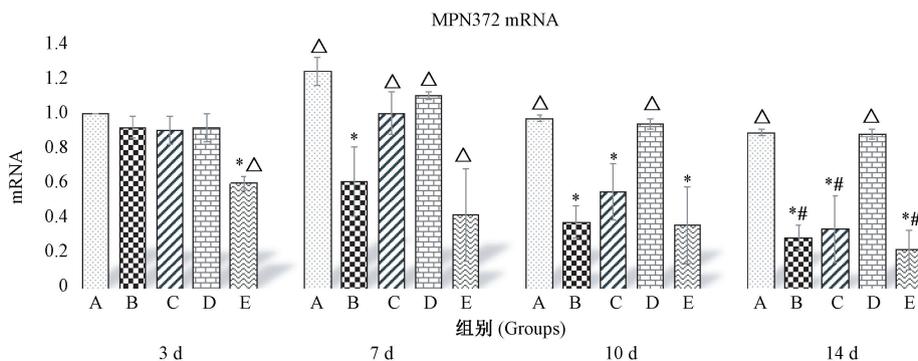


注: A. 正常组, B. 模型组, C. 全方组, D. 分解 I 组, E. 分解 II 组, F. 阿奇组。箭头所示: 炎症细胞浸润, 肺泡间隔增厚, 支气管壁增厚。

图 1 小鼠肺组织光镜病理改变

Note. A. Normal group. B. Model group. C. QJD group. D. QJD decomposition agent I group. E. QJD decomposition II group. F. Azithromycin group. Arrow: Inflammatory cell infiltration, alveolar septum thickening, bronchial wall thickening.

Fig. 1 Pathological changes in the lung tissues of the mice



注: A. 模型组, B. 全方组, C. 分解 I 组, D. 分解 II 组, E. 阿奇组。与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 QJD 对 MP 感染小鼠肺组织中 MPN372 mRNA 水平的影响

Note. A. Model group. B. QJD group. C. QJD decomposition agent I group. D. QJD decomposition agent II group. E. Azithromycin group. Compared with the group A, * $P < 0.05$; compared with the group B, $\Delta P < 0.05$. Comparison between the 3-day and 14-day groups, # $P < 0.05$.

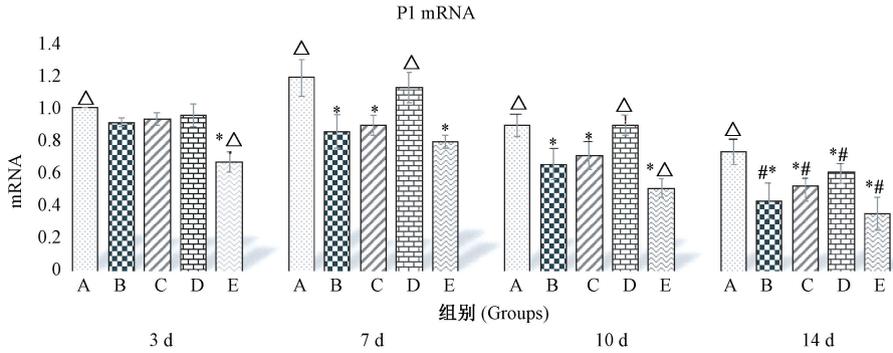
Fig. 2 Effect of QJD on the level of MPN372 mRNA in the lung tissues of MP-infected mice

0.05); C 组、D 组及 F 组均于造模后第 7 天开始明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 第 3 天与第 14 天比较, C 组、F 组差异无显著性 ($P > 0.05$), B、D、E 组差异有显著性 ($P < 0.05$)。

MP 感染后, 各时间点小鼠血清中 $\text{INF-}\gamma$ 含量出现一过性增高 ($P < 0.05$), 如表 3 所示。于第 7 天达峰值; 药物干预后, 与 B 组比较, 各用药组各时间点差异均有显著性 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, D 组、E 组、F 组各时间点差异均有显著性 ($P < 0.05$); 第 3 天与第 14 天比较, 各组差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

2.5 Western blot 检测 AQP5 蛋白表达水平

MP 感染后, 小鼠肺组织中 AQP5 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$), 如图 4~5 所示。与 A 组比较, B 组在第 3、7、10 天均有显著降低, 第 14 天时逐渐回升; 与 B 组比较, 各用药组各时间点均能上调 AQP5 蛋白表达 ($P < 0.05$); 与 C 组比较, 各时间点 D 组和 E 组均差异有显著性 ($P < 0.05$), 第 7 天开始, F 组差异无显著性 ($P > 0.05$); 第 3 天与第 14 天比较, B 组、C 组差异无显著性 ($P > 0.05$), D 组、E 组差异有显著性 ($P < 0.05$)。



注:A. 模型组, B. 全方组, C. 分解 I 组, D. 分解 II 组, E. 阿奇组。与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 QJD 对 MP 感染小鼠肺组织中 P1 mRNA 水平的影响

Note. A. Model group. B. QJD group. C. QJD decomposition agent I group. D. QJD decomposition agent II Group. E. Azithromycin group. Compared with the group A, * $P < 0.05$; compared with the group B, $\Delta P < 0.05$. Comparison between 3-day and 14-day groups, # $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of QJD on the level of P1 mRNA in lung tissues of the MP infected mice

表 2 各组小鼠血清 TNF- α 含量检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

Tab. 2 Detection result of TNF- α content in serum of the mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	3 d	7 d	10 d	14 d
A 组	18.76 \pm 2.25	18.62 \pm 0.98	17.72 \pm 0.71	18.34 \pm 0.75
B 组	24.83 \pm 1.75	44.22 \pm 1.46	40.38 \pm 1.65	35.56 \pm 1.50 [#]
C 组	24.15 \pm 1.35	32.34 \pm 1.45 [*]	28.43 \pm 1.24 [*]	26.12 \pm 1.51 [*]
D 组	24.53 \pm 1.70	39.02 \pm 1.44 ^{*Δ}	35.36 \pm 1.71 ^{*Δ}	31.41 \pm 1.94 ^{*Δ#}
E 组	24.80 \pm 1.55	43.36 \pm 2.06 Δ	39.42 \pm 1.94 Δ	35.26 \pm 1.36 Δ #
F 组	22.23 \pm 1.43 [*]	28.20 \pm 1.21 ^{*Δ}	25.26 \pm 1.51 ^{*Δ}	20.83 \pm 0.47 ^{*Δ}

注:与 A 组比较, $P < 0.05$; 与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the group A, $P < 0.05$; compared with the group B, * $P < 0.05$; compared with the group C, $\Delta P < 0.05$. Comparison between the 3-day and 14-day groups, # $P < 0.05$.

表 3 各组小鼠血清 INF- γ 含量检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

Tab. 3 Detection results of INF- γ content in serum of the mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6, \text{pg/mL}$)

组别 Groups	3 d	7 d	10 d	14 d
A 组	3.58 \pm 0.43	3.42 \pm 0.45	3.30 \pm 0.41	3.64 \pm 0.39
B 组	6.67 \pm 0.83	7.33 \pm 0.63	6.84 \pm 0.43	6.49 \pm 0.71
C 组	14.62 \pm 1.11 [*]	16.71 \pm 0.88 [*]	15.35 \pm 0.90 [*]	15.53 \pm 0.56 [*]
D 组	13.40 \pm 0.94 ^{*Δ}	15.62 \pm 0.76 ^{*Δ}	14.46 \pm 0.88 ^{*Δ}	14.36 \pm 0.82 ^{*Δ}
E 组	11.33 \pm 1.24 ^{*Δ}	12.32 \pm 1.35 ^{*Δ}	11.81 \pm 0.87 ^{*Δ}	10.96 \pm 0.76 ^{*Δ}
F 组	9.56 \pm 1.27 ^{*Δ}	11.01 \pm 0.81 ^{*Δ}	10.71 \pm 1.66 ^{*Δ}	10.54 \pm 0.97 ^{*Δ}

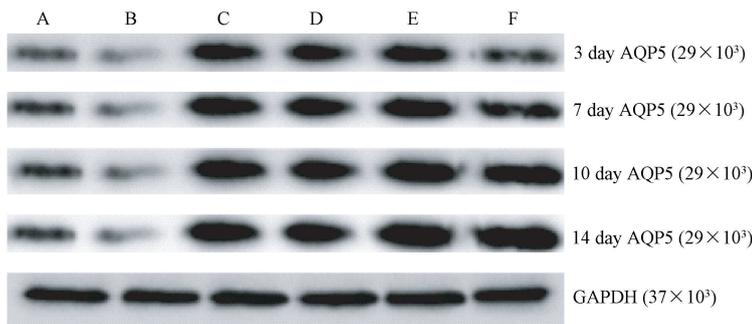
注:与 A 组比较, $P < 0.05$; 与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the group A, $P < 0.05$; compared with the group B, * $P < 0.05$; compared with the group C, $\Delta P < 0.05$. Comparison between the 3-day and 14-day groups, # $P < 0.05$.

3 讨论

MP 致病机制至今尚不完善, 目前主要包括毒素作用、上皮粘附及免疫功能紊乱等假说。近年来中药抗 MP 感染的机理研究主要侧重于 MPP 的发病机制, 包括直接抑制 MP、提高机体免疫力、保护上皮细胞、促进损伤修复等方面^[7]。Kannan 和 Baseman 在实验中发现了 MP 致病相关因子 MPN372, 又称为社区获得性呼吸窘迫综合征毒

素^[8], 可引起小鼠气管上皮细胞广泛的空泡变性直至死亡^[9]。由于 MP 自身缺乏细胞壁, 需通过其自身细胞膜上的黏附蛋白与宿主靶细胞膜紧密结合。这种黏附蛋白有很多类型, 其中最主要的是 P1 蛋白, 它不仅具有抗原性, 还有一定的变异性^[10]。P1 蛋白通过与呼吸道上皮细胞的神经氨酸受体相结合, 可使气道黏膜的完整性遭到破坏。这种黏附作用同时还表现为抑制呼吸道上皮的纤毛运动, 影响其细胞的新陈代谢, 并最终导致上皮细胞坏死^[11]。

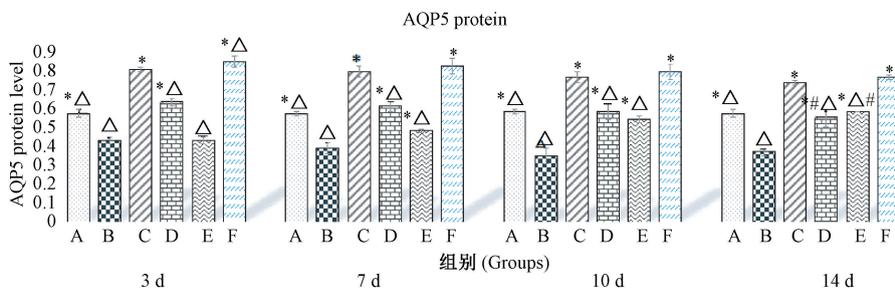


注:A. 正常组, B. 模型组, C. 全方组, D. 分解 I 组, E. 分解 II 组, F. 阿奇组。

图 4 QJD 对 MP 感染小鼠肺组织中 AQP5 蛋白水平的影响

Note. A. Normal group. B. Model group. C. QJD group. D. QJD decomposition agent I group. E. QJD decomposition agent II Group. F. Azithromycin group.

Fig. 4 Effect of QJD on the level of AQP5 protein in lung tissues of the MP-infected mice



注:A. 正常组, B. 模型组, C. 全方组, D. 分解 I 组, E. 分解 II 组, F. 阿奇组。与 A 组比较, $P < 0.05$; 与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$; 第 3 天与第 14 天比较, # $P < 0.05$ 。

图 5 QJD 对 MP 感染小鼠肺组织中 AQP5 蛋白水平的影响

Note. A. Normal group. B. Model group. C. QJD group. D. QJD decomposition agent I. E. QJD decomposition group II Group. F. Azithromycin group. Compared with the group A, $P < 0.05$; compared with the group B, * $P < 0.05$; compared with group C, $\Delta P < 0.05$. Comparison between 3-day and 14-day groups, # $P < 0.05$.

Fig. 5 Effect of QJD on the level of AQP5 protein in lung tissues of the MP-infected mice

MP 对上皮细胞的黏附可激活宿主的免疫反应, 可见淋巴细胞、免疫球蛋白的生成增多, 同时可释放 TNF- α , INF- γ 和各种白介素细胞 (包括 IL-2、IL-4、IL-8、IL-10)。TNF- α 作为早期的细胞因子之一, 可促使中性粒细胞释放, 诱导局部炎症反应, 其在气道炎症的产生及发展中起着重要作用^[12]。INF- γ 作用较广泛, 包括杀伤炎症细胞毒性、介导细胞的免疫应答和抑制 Th1 细胞增殖等^[13]。AQP5 作为水通道蛋白家族 (AQPs) 的主要成员, 是一组与水通透性有关并介导水分子跨膜转运的细胞膜转运蛋白, 同时也是肺部病变的重要因子, 感邪后 AQP5 失活易导致肺内水液平衡紊乱, 肺泡水肿形成^[14]。本研究发现, MP 感染后小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分均升高、干湿比降低; MPN372、P1 表达和 TNF- α 、INF- γ 含量升高, 而 AQP5 表达降低。QJD 治疗后, 小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分均降低、干湿比升高,

INF- γ 和 AQP5 表达逐渐升高, MPN372、P1、TNF- α 降低。QJD 分解剂 I 可下调 MPN372、P1、TNF- α 的表达; QJD 分解剂 II 对 AQP5 的表达逐渐增加。本次实验结果表明 QJD 可明显减轻小鼠肺部的炎症损伤, 正向调节了炎症因子; 其中分解剂 I 的作用表现为抑制细胞毒素 MPN372 和粘附蛋白 P1 的产生, 抑制炎症因子 TNF- α 、INF- γ 的释放; 分解剂 II 的作用表现为上调 AQP5 表达, 改善燥邪对肺部的损伤。

QJD 是治疗温燥伤肺的常用方, 主治外感燥火伤肺, 身热头痛, 气逆而喘, 咳嗽不止, 甚则引动胃气, 呕吐痰涎, 脉虚大而数。《医门法律》认为本方所治应属秋令气候干燥, 外感温燥伤肺之重证。方中重用桑叶色青入肝, 禀大寒之性, 清宣肺燥, 透邪外出, 为君药。温者属热宜清, 燥胜则干宜润, 故臣以石膏辛甘而寒, 清泄肺热; 麦冬甘寒, 养阴润肺。石膏虽沉寒, 但用量轻于桑叶, 则不碍君药之轻宣;

麦冬虽滋润,但用量不及桑叶之半,则不妨君药之外散。人参益气生津,合甘草以培土生金补肺气;胡麻仁、阿胶助麦冬养阴润肺。再加少量杏仁、枇杷叶苦降肺气;甘草调和诸药。诸药相配,燥邪得宣,气阴得复,共奏清燥救肺之功。QJD 以“宣、清、降、润、补”为立法,清中有润,润中寓补,对于燥热所致肺部损伤均有疗效。其中分解剂 I 组内含“宣、清、降”三法,由杏仁、石膏、桑叶、枇杷叶组成,具有清热宣肺,肃降肺气的作用;分解剂 II 组内含“润、补”二法,由人参、阿胶、麦门冬、甘草、胡麻仁组成,具有补益气血,养阴润燥的作用。本研究发现,QJD 既能够抑制过度的炎症反应,又能提高免疫因子含量,而依“法”分组的分解剂 I 和分解剂 II,即不同的药物组份配伍,所起的作用和靶位不同。QJD 及其分解剂能够控制 MP 感染后肺部炎症,减少 MPP1、TNF- α 的表达和毒素 MPN372 的产生,其中分解剂 I 起主要作用;QJD 能够上调 INF- γ 、AQP5 蛋白表达,其中分解剂 II 起主要作用;

QJD 具有清肺润燥,益气养阴的功效,能够抗 MP 感染,表现为抑制炎症因子的释放,减少 MP 细胞毒素的产生及其黏附蛋白的表达,同时可以修复 MP 对肺部的损伤,也间接证实了外感燥邪和感染 MP 在致病机制上可能存在一定的相似性。

参 考 文 献(References)

[1] Tao LL, Hu BJ, He LX, et al. Etiology and antimicrobial resistance of community-acquired pneumonia in adult patients in China [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(17): 2967-2972.

[2] Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: An update [J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(1): 7.

[3] 吴振起,刘光华,王雪峰. 从燥论治肺炎支原体感染 [J]. 中医杂志,2012, 53(21): 1879-1880.

Wu ZQ, Liu GH, Wang XF. The treatment of Mycoplasma pneumoniae infection from dryness [J]. Chin Med J, 2012, 53(21): 1879-1880.

[4] 吴振起,刘光华,岳志军,等. 清燥救肺汤抗肺炎支原体感染大鼠作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(01): 1-4, 97.

Wu ZQ, Liu GH, Yue ZhJ, et al. Experimental study on the effect of Qingzao Jiufei Decoction against Mycoplasma pneumoniae infection in rat [J]. Chin Pediatr Integr Tradit Western Med, 2013, 5(01): 1-4, 97.

[5] 刘晓红,辛德莉,侯安存,等. 小鼠肺炎支原体肺炎模型的建立及组织病理学评分方法的应用 [J]. 重庆医学, 2004, 33(09): 1338-1340.

Liu XH, Xin DL, Hou AC, et al. The establishment of Mycoplasma pneumoniae pneumonia model in mice and the application

of histopathological scoring method [J]. Chongqing Med, 2004, 33(09): 1338-1340.

[6] 麻粉莲,李引乾,郑丽舒,et al. 人甲型流感病毒 H1N1 亚型 NS1 蛋白的原核表达及纯化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(03): 221-225.

Ma FL, Li YY, Zheng LS, et al. Prokaryotic expression and purification of NS1 protein of human influenza A virus H1N1 subtype [J]. Chin J Biologicals, 2009, 22(03): 221-225.

[7] 王英岩,蒙艳丽,钱锋,等. 中药抗肺炎支原体作用的研究进展 [J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(05): 65-67.

Wang YY, Meng YL, Qian F, et al. Research progress on the effect of traditional Chinese medicine on Mycoplasma pneumoniae [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2015, 44(05): 65-67.

[8] Kannan TR, Krishnan M, Ramasamy K, et al. Functional mapping of community-acquired respiratory distress syndrome (CARDS) toxin of Mycoplasma pneumoniae, defines regions with ADP-ribosyltransferase, vacuolating and receptor-binding activities [J]. Mol Microbiol, 2014, 93(3): 568-581.

[9] 罗浩荡,游晓星,吴移谋. 肺炎支原体致炎的分子机制研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2017, 33(7): 639-644.

Luo HD, You XX, Wu YM. Research progress in molecular mechanism of Mycoplasma pneumoniae induced inflammation [J]. Immunol J 2017, 33(7): 639-644.

[10] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of Mycoplasma pneumoniae infections [J]. Future Microbiol, 2008, 3(6): 635-648.

[11] 张晓娟,沈伊娜. 小儿肺炎支原体肺炎发病机制的研究进展 [J]. 安徽医学, 2016, 37(1): 111-113.

Zhang XJ, Shen YN. Research progress on the pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children [J]. Anhui Med J, 2016, 37(1): 111-113.

[12] 魏东,刘英,贾宁,等. H9N2 亚型猪流感病毒诱导小鼠急性肺损伤中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 的变化和作用 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 72-74.

Wei D, Liu Y, Jia N, et al. Changes and effects of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in acute lung injury induced by H9N2 subtype swine influenza virus in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(2): 72-74.

[13] 朱华,张扬清,涂新明,等. 严重急性呼吸综合征动物模型中血清因子的检测 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 35(s1): 10-12.

Zhu H, Zhang YQ, Tu XM, et al. Detection of serum factors in animal models of severe acute respiratory syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 35(s1): 10-12.

[14] 丁建中,张六通,李军川,等. 水通道蛋白 1、4、5 在外燥小鼠肺表达的意义 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 764-765.

Ding JZ, Zhang LT, Li JC, et al. The significance of water channel proteins 1, 4, 5 in the lung expression of mice with external dryness [J]. Zhonguo Nat Med, 2012, 23(3): 764-765.