

韩红,陈旭霞,逯建立,等. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨重组 BPI 对肺炎支原体感染小鼠肺炎反应的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 90-97.

Han H, Chen XX, Lu JL, et al. The effect of recombinant BPI on pneumoniae in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae* and the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 90-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.012

基于 TLR4/NF- κ B 信号通路探讨重组 BPI 对肺炎支原体感染小鼠肺炎反应的影响

韩红¹, 陈旭霞², 逯建立¹, 韩艳珺^{1*}

(1. 邢台市人民医院儿一科, 河北 邢台 054000; 2. 秦皇岛市第一医院儿科, 河北 秦皇岛 066000)

【摘要】 目的 探讨重组 BPI 对肺炎支原体感染小鼠肺炎反应及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响。 **方法** 67 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、肺炎支原体 (MP) 模型组和重组 BPI 蛋白高、中、低剂量组。除正常对照组外对其余小鼠连续 4 d 鼻滴 1×10^6 CCU/mL (100 μ L) 的 MP 菌液建立 MP 模型。造模成功后, 重组 BPI 蛋白各治疗组小鼠腰静脉注射 1.5 mL 浓度分别为 0.45、0.3 和 0.15 mol/L 的重组 BPI 蛋白溶液, 空白对照组和模型组腰静脉给予等量生理盐水注射, 所有小鼠均采用不同方法干预 4 周。末次给药收集小鼠肺组织和血清, 计算小鼠肺指数和干湿比; HE 染色法观察各组小鼠肺组织病理改变并进行肺组织病理评分; ELISA 法检测血清炎症因子水平; RT-PCR 检测肺组织中 mRNA 表达; Western blot 检测肺组织蛋白表达。 **结果** 与 MP 模型组比较, 重组 BPI 蛋白各组小鼠肺指数降低 ($P < 0.05$), 干湿比增加 ($P < 0.05$), 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低 ($P < 0.05$); 与 MP 模型组比较, 重组 BPI 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$), I- κ B mRNA 及蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$)。 **结论** 重组 BPI 蛋白可能通过调控 TLR/NF- κ B 信号通路抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的产生, 从而起到减轻小鼠肺部炎症反应的作用。

【关键词】 重组 BPI; 肺炎支原体; 炎症; NF- κ B p65; 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0090-08

The effect of recombinant BPI on pneumoniae in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae* and the TLR4/NF- κ B signaling pathway

HAN Hong¹, CHEN Xuxia², LU Jianli¹, HAN Yanjun^{1*}

(1. Department of Pediatrics, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China.

2. Department of Pediatrics, Qinhuangdao First Hospital, Qinhuangdao 066000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of recombinant BPI on the inflammatory response and TLR4/NF- κ B signaling pathway in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae*. **Methods** BALB/c mice ($n = 67$) were randomly divided into the control group, *M. pneumoniae* (MP) model group and high-, medium- and low-dose groups of recombinant BPI protein. The MP model was established by nasal drip of 1×10^6 CCU/mL (100 μ L) MP bacteria solution for 4 days. After successful modeling, mice in each treatment group were injected with 1.5 mL of recombinant BPI protein solution with concentrations of 0.45, 0.3 or 0.15 mol/L through the lumbar vein. Mice in the control group and model group were

[作者简介] 韩红 (1983—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 小儿消化感染。E-mail: 1070566562@qq.com

[通信作者] 韩艳珺 (1964—), 女, 本科, 主任医师, 研究方向: 小儿消化感染方面。E-mail: hyj.1964@163.com

injected with the same amount of normal saline through the lumbar vein. All mice were treated for 4 weeks. The lung tissue and serum of mice was collected at the last administration, and the lung index and dry wet ratio were calculated; the pathological changes of lung tissue were observed by HE staining method and the pathological score of lung tissue was determined. Serum inflammatory factors were detected by ELISA and the mRNA expressions in lung tissue were detected by RT-PCR; Western blot was used to detect the expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β . **Results** Compared with the MP model group, the BPI protein group showed a decreased lung index ($P < 0.05$), increased dry wet ratio ($P < 0.05$), and decreased serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$). Compared with MP model group, the mRNA and protein expressions of TLR4 and NF- κ B p65 in lung tissue of mice in recombinant BPI group were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and the mRNA and protein expressions of I- κ B α were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** Recombinant BPI protein may inhibit the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by regulating the TLR/NF- κ B signaling pathway, so as to reduce the pulmonary inflammatory response in mice.

【Keywords】 recombinant BPI; mycoplasma pneumoniae; inflammation; NF- κ B p65; signal pathway

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染多发于童和青少年,其致病率高、易于流行,临床可引发咳嗽、发热,并可导致多器官、多系统的肺外损害,严重影响人体健康^[1-2]。肺炎支原体肺炎(*mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP)由 MP 感染引起,发病机制与上皮细胞凋亡和机体过度免疫应答有关^[3-4]。近年来的研究证实,“TLR4/NF- κ B”信号通路与机体抗炎免疫机制密切相关。TLR4 是首个发现的 Toll 样受体 TLRs (toll-like receptor, TLR),其参与支原体肺炎发病进程,介导炎症反应^[5]。当 TLRs 识别外源性刺激危险信号后,核因子 κ B(nuclear factor- κ B)被激活,从而启动炎症免疫相关细胞因子的分泌^[6]。

杀菌、通透性增加蛋白(bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)是机体在免疫反应中释放的免疫分子,可特异性地中和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),对革兰氏阴性菌具有强烈的细胞毒性效应^[7],在机体免疫中发挥重要作用。有研究表明^[8],BPI 具有抑制促炎因子 IL-6 的表达,促进抗炎因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)表达的作用,能有效减轻机体炎症反应,同时还具有增效抗生素杀菌的作用^[9],但重组 BPI 在支原体感染小鼠肺部炎症中的作用还尚不清楚。因此,本研究通过建立支原体感染小鼠模型,给予重组 BPI 干预,研究重组 BPI 对 MPP 小鼠炎症反应及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响,为研究重组 BPI 在 MP 的抗病机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4~6 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 鼠 67 只,体重

14~18 g,购于河北省实验动物中心[SCXK(冀)2018-004],饲养于河北医科大学实验动物公共服务平台[SYXK(冀)2020-002],单笼饲养,饲养温度控制在 25℃~26℃,相对湿度为 50%~60%,充足光照,饲养 1 周后进行试验。实验过程遵守减少、替代、优化的 3R 原则,所有动物实验经我院实验动物伦理委员会审批(IACUC-2019-0356)。

1.2 主要试剂与仪器

肺炎支原体(ATCC15331)FH 标准株(上海佰泰科技有限公司);兔抗鼠 TLR4 抗体、兔抗鼠 NF- κ B p65 抗体、重组 BPI 蛋白及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);RIPA 裂解液、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂及 MP 核酸检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司);HRP 标记羊抗兔 IgG(武汉博士德公司);HE 染色试剂盒(北京中山生物技术公司);TRIzol 总 RNA 提取试剂及 RNA 反转录试剂盒(Invitrogen 公司)。

ELX88 型酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器有限公司);CKX41 倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司);2720 Thermal cycler PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystem 公司);UV-3 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);实时荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);RM2335 石蜡切片机、Histostar 石蜡包埋机、TP1020 型自动组织脱水仪(德国 leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 研究路线

本文研究路线图如图 1 所示。

1.3.2 动物分组及模型制备

适应性饲养 1 周后,根据样本量计算公式 $\varphi^2 =$

$(\sum si^2/g)/[\sum (xi-x)^2/(g-1)]$ 计算得出本研究单组小鼠的最小样本量为 9.27, 采用随机数字表法将小鼠分为正常对照组 (15 只)、肺炎支原体 (MP) 模型组 (13 只) 和重组 BPI 蛋白高、中、低剂量组 (各 13 只)。按照文献^[10]中的方法对除正常对照组外的小鼠建立 MP 模型, 1% 戊巴比妥钠 (0.05 mL) 腹腔注射麻醉小鼠, 鼻滴 100 μ L 浓度为 1×10^6 CCU/mL 的 MP 菌液, 完成后将小鼠头部后仰 30~45°, 保持 1 min, 使 MP 菌液经鼻腔到达下呼吸道, 对照组以等量不含 MP 的培养液滴鼻, 连续滴鼻 4 d。次日对小鼠进行核酸检测, 阳性结果提示造模成功。造模过程中 MP 模型组死亡两只小鼠, 其余造模小鼠核酸检测结果均呈阳性, 造模成功。

1.3.3 药物处理

除正常对照组和 MP 模型组, 其余组小鼠开始药物治疗, 重组 BPI 蛋白各治疗组小鼠腰静脉注射 0.45、0.3 和 0.15 mol/L 重组 BPI, 注射量为 1.5 mL, 每 3 d 注射 1 次, 空白对照组和模型组腰静脉给予等量生理盐水注射, 所有小鼠均采用不同方法干预 4 周。

1.3.4 小鼠肺指数、干湿比测定

末次给药后禁食 12 h 后, 将小鼠麻醉后进行称重, 无菌解剖, 分离小鼠双侧肺组织并称重, 计算肺湿重指数, 肺指数 = 肺重/体重 $\times 100\%$ 。

取右中肺叶组织置于锡箔纸上, 采用洁净滤纸吸干肺组织表面水分置于玻璃瓶中精确称湿重 (W), 然后将肺组织连同锡箔纸置于 80℃ 恒温箱中

烘烤 72 h 后测定肺组织干重 (D), 记录并计算出肺组织 W/D 重比值。

1.3.5 HE 染色观察肺组织病理变化

将小鼠麻醉处死后取左肺上叶, 在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后转移至 75% 的乙醇中, 脱水、透明处理, 石蜡包埋后 5 μ m 切片, 水浴展开, 捞片, 沥干, 置于烘箱中烤 2 h, HE 染色, 显微镜下观察小鼠肺组织病理学改变。

1.3.6 肺组织病理评分

由两位主治医师采用双盲法阅片, 并根据肺组织病理变化进行肺组织病理学评分, 每张切片通过 5 个分类评价系统进行评分, 评分标准见表 1^[11]。总评分计算公式为: 总分 = A + 3(B + C) + D + E。

1.3.7 ELISA 检测炎症因子水平

小鼠眼眶静脉丛取血, 离心分离血清 (3000 r/min, 15 min), ELISA 检测 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β 水平。

1.3.8 RT-PCR 检测肺组织 TLR4、NF- κ B p65 和 I- κ B α mRNA 相对表达量

小鼠基因引物序列由上海生工合成, 见表 2。取小鼠肺组织并粉碎, TRIzol 提取总 RNA, 紫外分光光度计分析 RNA 纯度。合成 cDNA, PCR 扩增, RT-PCR 检测肺组织 TLR4、NF- κ B p65 和 I- κ B α mRNA 表达水平。反应体系: SYBR Green PCR Master Mix (2 $\times$) 15 μ L; Primer A 0.5 μ L; Primer B 0.5 μ L, 加超纯水至 30 μ L。扩增程序: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 50 s, 共 40 个循环。反应均以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法计算 mRNA 相对表达量。



图 1 研究路线图

Figure 1 Research roadmap

1.3.9 Western blot 检测蛋白表达

采用 RIPA 细胞裂解液裂解小鼠肺组织,离心 (12000 r/min, 10 min) 收集上清。取样 30 μ L, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,浸入封闭液中孵育 1 h,加入一抗室封闭过夜。次日加入二抗孵育 1 h,凝胶成像系统成像,以 GAPDH 为内参,计算蛋白表达。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 版,采用 Graphpad 5.0 绘图,计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺指数、W/D 及病理评分

与对照组比较,MP 模型组小鼠肺指数及肺组织病理学评分显著增加 ($P<0.05$),不同剂量重组 BPI 干预后,小鼠肺指数、组织病理学评分有所降低,除重组 BPI 低剂量组肺指数与模型组比较无统计学意义外,其余组别肺指数及肺组织病理学评分与模型组比较,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$); 各组 W/D 比差异均无统计学差异 ($P>0.05$),见表 3、表 4。

表 1 肺组织病理评分标准

Table 1 Lung tissue pathology scoring standard

评价类别 Evaluation category	0	1	2	3
A	无 Nothing	少许 (<25%) Few	许多 (25%~75%) Many	所有 (>75%) All
B	无 (偶见轻微的浸润,或支气管周围 淋巴样细胞团块见于正常动物) Nothing (slight infiltration or peribronchial lymphoid cell mass was occasionally seen in normal animals)	轻 (不正常,常伴 有间断的环) Mild (Abnormal, often with intermittent rings)	中度 (完整的环或新月形的环, 伴有<5个细胞的厚度) Moderate (Complete ring or crescent ring with < 5 cell thickness)	严重 (完全的环,伴有 5~10个细胞厚度) Severe (Complete ring with 5~10 cell thickness)
C	无 Nothing	轻度 ($\leq 25\%$ 腔闭合) Mild ($\leq 25\%$ cavity closure)	重度 ($\geq 25\%$ 腔闭合) Severe ($\geq 25\%$ cavity closure)	/
D	无 Nothing	少 (<10%) Less	许多 (10%~50%) Many	大多数 (>50%) Majority
E	无 Nothing	轻度 (斑状实质性润) Light (patchy parenchyma)	重度 Severe	/

注:A:细支气管/支气管腔周围浸润的数目;B:细支气管/支气管腔周围浸润的程度;C:细支气管/支气管腔内渗出的严重度;D:血管周围浸润的频度;E:实质性肺炎的严重度。

Note. A, Number of infiltrates around bronchioles/bronchioles. B, Degree of infiltration around bronchioles/bronchioles. C, Severity of exudation in bronchioles/bronchioles. D, Frequency of perivascular infiltration. E, Severity of parenchymal pneumonia.

表 2 RT-PCR 基因序列

Table 2 RT-PCR gene sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增产物大小 Amplification product size
TLR4-F	5'-GCCGGAAGTTATTGTGCTGGT-3'	356 bp
TLR4-R	5'-ATGGGTTTTAGGCCGACAGTTT-3'	
NF- κ B-F	5'-GCCGATCCAGACCAACAATAAC-3'	425 bp
NF- κ B-R	5'-GCCGAAGCTGCATGGACACT-3'	
I- κ B α -F	5'-TACGCCCCAGCATCTCCACTCCG-3'	400 bp
I- κ B α -R	5'-CTCCACGATGCCAGGTAGCCAT-3'	
β -actin-F	5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3'	375 bp
β -actin-R	5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'	

2.2 小鼠肺组织病理学改变

对照组小鼠肺组织肺泡清晰正常,无炎性物渗出,周围血管未见炎性细胞浸润;MP 模型组小鼠肺泡结构不完整,见大量渗出物,毛细血管扩张,气管管壁及周围间质充血,肺泡间质见炎性细胞浸润;重组 BPI 高、中、低剂量组肺部炎症较轻,渗出物和炎性细胞浸润较少,并呈出剂量依赖性,见图 2。

2.3 各组小鼠血清炎症因子水平

MP 模型组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平较对照组显著增加 ($P<0.05$),与 MP 模型组比较,重组 BPI 各剂量组小鼠血清炎症因子水平均降低 ($P<0.05$),其中重组 BPI 治疗组炎症细胞因子水平随给药量的增加而下降,呈现出剂量依赖性,见表 5。

2.4 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 和 I- κ B α mRNA 的表达水平

RT-PCR 检测结果显示,与正常对照组比较,

MP 模型组小鼠肺组织 TLR4 mRNA、NF- κ B p65 mRNA 表达明显上调 ($P<0.05$);重组 BPI 各组小鼠肺组织 TLR4 mRNA、NF- κ B p65 mRNA 表达与 MP 模型组比较明显下调 ($P<0.05$);MP 模型组 I- κ B α mRNA 表达较对照组明显下调 ($P<0.05$),重组 BPI 各组小鼠肺组织 I- κ B α mRNA 表达与 MP 模型组比较明显上调 ($P<0.05$),见表 6。

2.5 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B p65 和 I- κ B α 蛋白表达水平

与正常对照组比较,MP 模型组小鼠肺组织中 NF- κ B p65、TLR4 蛋白表达明显上调,I- κ B α 蛋白表达明显下调;与 MP 模型组比较,重组 BPI 各组蛋白表达明显下调,而 I- κ B α 蛋白表达明显上调 ($P<0.05$),见图 3。

表 3 各组小鼠肺指数、W/D 比较

Table 3 Comparison of lung index and W/D of mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	肺指数 (%) Lung index	W/D 比值 W/D ratio
正常对照组 Normal control group	15	0.54 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.01
MP 模型组 MP model group	11	0.85 $\pm$ 0.18 [*]	0.24 $\pm$ 0.02
重组 BPI 高剂量组 Recombinant BPI high dose group	13	0.61 $\pm$ 0.05 [#]	0.28 $\pm$ 0.01
重组 BPI 中剂量组 Recombinant BPI medium dose group	13	0.65 $\pm$ 0.06 [#]	0.26 $\pm$ 0.02
重组 BPI 低剂量组 Recombinant BPI low dose group	13	0.76 $\pm$ 0.17	0.27 $\pm$ 0.02

注:与正常对照组比较, * $P<0.05$;与 MP 模型组比较, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal control group, * $P<0.05$. Compared with MP model group, # $P<0.05$.

表 4 各组小鼠肺组织病理学评分

Table 4 Lung histopathological scores of mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	细支气管/ 支气管腔周围 浸润的数目 Number of infiltration around bronchioles/ bronchioles	细支气管/ 支气管腔 周围浸润的程 Periluminal infiltration of bronchioles/ bronchioles	细支气管/ 支气管腔内 渗出的严重度 Severity of intraluminal exudation in bronchioles/ bronchioles	血管周围 浸润的频率 Frequency of perivascular infiltration	实质性肺炎 的严重度 Severity of parenchymal pneumonia	总分 Total score
正常对照组 Normal control group	15	0.17 $\pm$ 0.41	0.17 $\pm$ 0.41	0.17 $\pm$ 0.41	0.33 $\pm$ 0.52	0.00 $\pm$ 0.00	1.50 $\pm$ 2.74
MP 模型组 MP model group	11	1.85 $\pm$ 0.89 [*]	1.50 $\pm$ 0.56 [*]	1.37 $\pm$ 0.56 [*]	1.43 $\pm$ 1.13	1.17 $\pm$ 0.81 [*]	11.97 $\pm$ 3.54 [*]
重组 BPI 高剂量组 Recombinant BPI high dose group	13	1.00 $\pm$ 0.00 [*]	1.00 $\pm$ 0.00 [*]	0.33 $\pm$ 0.52 [#]	0.33 $\pm$ 0.74	0.17 $\pm$ 0.38 [#]	5.50 $\pm$ 2.45 ^{**}
重组 BPI 中剂量组 Recombinant BPI medium dose group	13	1.68 $\pm$ 0.51 [*]	1.50 $\pm$ 0.56 [*]	1.00 $\pm$ 0.00 [*]	0.17 $\pm$ 0.41 [#]	0.83 $\pm$ 0.42 [*]	9.17 $\pm$ 1.42 [*]
重组 BPI 低剂量组 Recombinant BPI low dose group	13	1.17 $\pm$ 0.41 [*]	1.50 $\pm$ 0.55 [*]	1.33 $\pm$ 0.52 [*]	0.83 $\pm$ 0.41	0.83 $\pm$ 0.41 [*]	10.33 $\pm$ 2.34 [*]

注:与正常对照组比较, * $P<0.05$;与 MP 模型组比较, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with normal control group, * $P<0.05$. Compared with MP model group, # $P<0.05$.

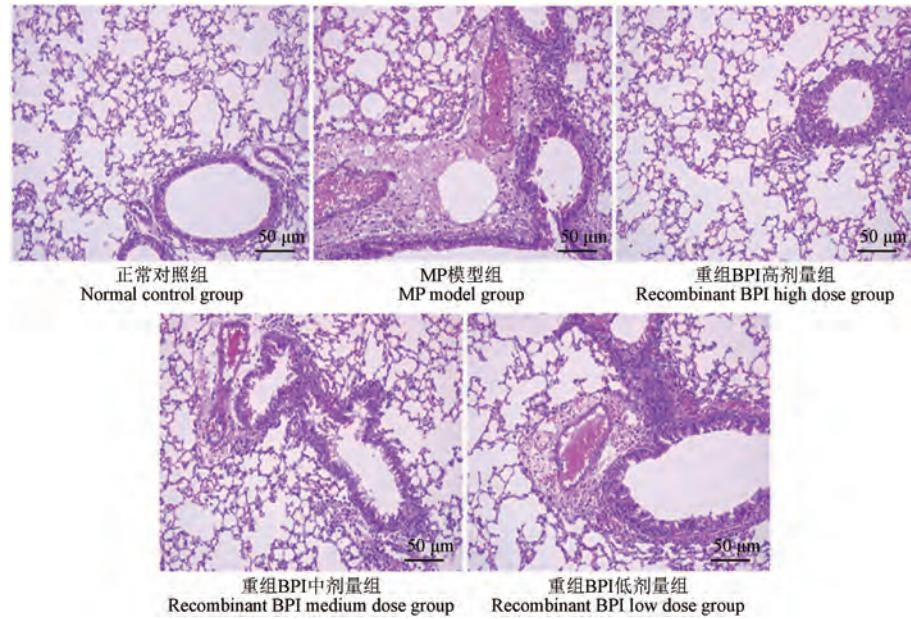


图 2 各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色)

Figure 2 Pathological changes of lung tissue of mice in each group(HE staining)

表 5 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较 (ng/L)

Table 5 Comparison of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in serum of mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组 Normal control group	15	52.96 $\pm$ 13.98	28.77 $\pm$ 4.17	14.66 $\pm$ 1.76
MP 模型组 MP model group	11	253.21 $\pm$ 12.34 [*]	142.92 $\pm$ 21.10 [*]	86.50 $\pm$ 18.29 [*]
重组 BPI 高剂量组 Recombinant BPI high dose group	13	88.20 $\pm$ 11.28 [#]	49.27 $\pm$ 11.72 [#]	29.87 $\pm$ 8.26 [#]
重组 BPI 中剂量组 Recombinant BPI medium dose group	13	113.81 $\pm$ 12.26 [#]	69.33 $\pm$ 13.02 [#]	38.37 $\pm$ 16.51 [#]
重组 BPI 低剂量组 Recombinant BPI low dose group	13	162.28 $\pm$ 15.48 [#]	110.31 $\pm$ 18.02 [#]	65.12 $\pm$ 17.58 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与 MP 模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal control group, * $P < 0.05$. Compared with MP model group, [#] $P < 0.05$.

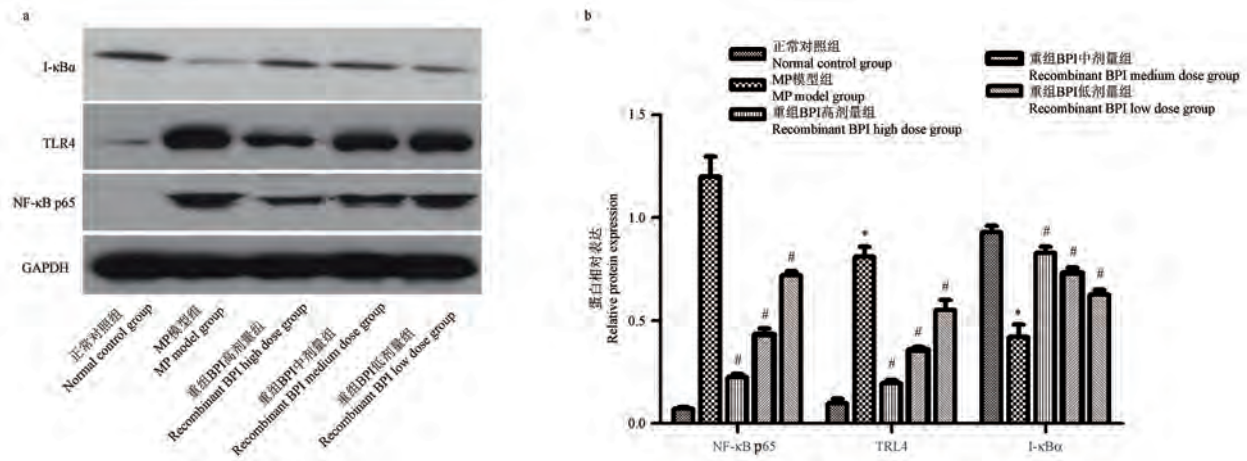
表 6 各组小鼠肺组织 NF- κ B p65、TLR4、p-I κ B mRNA 表达变化

Table 6 Expression changes of NF- κ B p65, TLR4 and p-I κ B mRNA in lung tissue of mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	NF- κ B p65	TLR4	I- κ B α
正常对照组 Normal control group	15	1.07 $\pm$ 0.09	1.46 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.00
MP 模型组 MP model group	11	5.12 $\pm$ 0.05 [*]	4.10 $\pm$ 0.09 [*]	0.42 $\pm$ 0.04 [*]
重组 BPI 高剂量组 Recombinant BPI high dose group	13	1.73 $\pm$ 0.07 [#]	1.80 $\pm$ 0.05 [#]	0.86 $\pm$ 0.05 [#]
重组 BPI 中剂量组 Recombinant BPI medium dose group	13	2.35 $\pm$ 0.10 [#]	2.11 $\pm$ 0.10 [#]	0.75 $\pm$ 0.04 [#]
重组 BPI 低剂量组 Recombinant BPI low dose group	13	2.86 $\pm$ 0.05 [#]	2.56 $\pm$ 0.245 [#]	0.65 $\pm$ 0.09 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与 MP 模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal control group, * $P < 0.05$. Compared with MP model group, [#] $P < 0.05$.



注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MP 模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组小鼠肺组织 NF-κB p65、TLR4、I-κBα 蛋白表达水平

Note. Compared with normal control group, * $P < 0.05$. Compared with MP model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Protein expression levels of NF-κB p65, TLR4 and I-κBα in lung tissue of mice in each group

3 讨论

MPP 是一种主要由肺炎支原体感染引起的急性呼吸道感染疾病,易在儿童群体中爆发流行,但目前关于支原体肺炎致病的具体机制尚不完全明确。临床研究多认为其与上皮细胞损伤和免疫学机制有关^[12-13]。BPI 是一种阳离子膜结合型抗菌蛋白,广泛分布于小鼠、人皮肤及粘膜上皮细胞中,具有抑制炎症介质生成及杀灭革兰氏阴性菌的作用,并且不易产生抗性,在机体免疫防御系统中起着重要作用^[14]。与常规抗生素不同,BPI 可通过与脂多糖结合抑制免疫系统的过度激活^[15]。近年来,人们对 BPI 的天然蛋白及重组蛋白进行了系统的研究。早期研究发现^[16],在狒狒大肠杆菌脓毒症模型中,静脉注射重组 BPI 后能减少细菌量并缓解器官衰竭,胡伶俐^[17]等通过体外抑菌试验证明重组 BPI 具有抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的生物活性。基于以上研究结果,本研究将重组 BPI 蛋白应用于肺炎支原体感染小鼠的治疗中。

MP 感染后机体免疫功能紊乱,促进炎症浸润和炎症细胞因子释放。TNF-α 可通过促进中性粒细胞释放诱导炎症反应,与 MP 发病有关^[18-19],MP 感染患者的 TNF-α 水平较正常者明显增加^[20]。IL-6 是炎症反应的重要媒介,在肺部炎症反应和机体免疫防御中起重要作用^[21],研究发现 MP 感染小鼠肺泡灌洗液中 IL-6 水平与炎症程度呈正相关^[22]。本研究中,MP 感染小鼠血清炎症细胞因子水平与对照组显著升高,提示 MP 感染可影响炎症细胞因子

水平,从而引发机体炎症反应。重组 BPI 干预后,MP 小鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平均降低,HE 染色结果显示,重组 BPI 干预后的 MP 小鼠肺组织炎症细胞浸润较少,肺泡渗出减轻,表明重组 BPI 能有效减轻 MP 感染肺炎炎症反应。

Toll 样受体 (TLRs) 是具有天然免疫和获得性免疫的识别受体,TLR4 是其家族成员之一,能介导机体的抗病毒固有免疫,促进获得性免疫的产生^[23],被证实与肺部感染性疾病密切相关,NF-κB 是一种很重要的转录因子,位于 TLR 下游信号通路的枢纽位置,当细胞内 TLR 被激活后,通过髓系分化蛋白 MyD88 激活 NF-κB,正常情况下,NF-κB 通过其抑制剂 IκB 蛋白在细胞质中整合处于未激活状态,当受到致病菌刺激时 I-κBα 被磷酸激酶磷酸化,导致其蛋白酶体降解和 NF-κB p65 的激活和释放,从而激活炎症细胞因子,调控机体免疫功能^[24-26]。本研究结果显示,MP 模型组小鼠肺组织 TLR4 和 NF-κB p65 mRNA 及蛋白表达均较正常对照组明显上调,I-κBα mRNA 及蛋白表达均较对照组明显下调,提示 MP 感染可激活 TLR/NF-κB 信号通路,引起炎症反应。重组 BPI 各给药组肺组织中 TLR4 和 NF-κB 蛋白表达明显降低,TLR4 和 NF-κB mRNA 活性被显著抑制,提示重组 BPI 蛋白可能通过 TLR/NF-κB 信号通路抵抗 MP 感染造成的肺部炎症反应和损伤。

综上所述,重组 BPI 蛋白能够减轻 MP 小鼠肺部损伤,推测这一作用是通过调控 TLR/NF-κB 信号通路从而抑制 TNF-α、IL-1β、IL-6 的产生,为肺炎支

原体引起的肺炎治疗提供了新的思路。本研究尚存在不足之处,TLR/NF- κ B 相关通路分子和基因表达网络还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 肖肖英,丁燕玲.血清淀粉样蛋白 A 检测在肺炎支原体肺炎中的诊断价值[J].中国医药导报,2020,17(7):168-171.
- [2] 王子,王雪峰,吴振起.清肺透邪汤介导 NLRP3 炎性小体抑制 NF- κ B 信号通路改善肺炎支原体小鼠炎性反应[J].中国实验动物学报,2020,28(4):470-477.
- [3] Li G, Fan L, Wang Y, et al. High co-expression of TNF- α and CARDS toxin is a good predictor for refractory *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Mol Med, 2019, 25(1): 38.
- [4] 李向峰,陈文霞.鱼腥草总黄酮对肺炎支原体感染小鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J].中国免疫学杂志,2020,36(14):1695-1699.
- [5] 郭沙沙. TLR-MYD88-NF- κ BP65 依赖信号通路在支原体肺炎小鼠肺组织中的作用[D].青岛:青岛大学,2017.
- [6] Tworek D, Heroux D, O'Byrne SN, et al. Toll-like receptor-induced expression of epithelial cytokine receptors on haemopoietic progenitors is altered in allergic asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2017, 47(7): 900-908.
- [7] 姚楠,白杰,张雪梅,等.牛杀菌/通透性增加蛋白对脂多糖介导的炎性细胞因子表达的影响[J].生物工程学报,2015,31(2):195-205.
- [8] 郭海英,沈文,陈冬梅,等.杀菌性/通透性增加蛋白对感染绵羊肺炎支原体的盘羊杂交羊的免疫调节作用研究[J].中国预防兽医学报,2015,37(6):481-485.
- [9] Gan L, Zhang X, Xu X, et al. spd1672, a novel *in vivo*-induced gene, affects inflammatory response in a murine model of *Streptococcus pneumoniae* infection [J]. Can J Microbiol, 2018, 64(6): 401-408.
- [10] 严春霞,何国产,闻人庆,等.解毒清肺合剂对肺炎支原体感染大鼠肺组织 NF- κ B 和 p38 MAPK 通路的影响[J].中国病理生理杂志,2019,35(5):926-932.
- [11] 魏巍,王雪峰,吴振起,等.清肺透邪方对肺炎支原体肺炎小鼠 Notch 信号通路的影响[J].广州中医药大学学报,2020,37(5):915-922.
- [12] 岑凯莹,王海颖.鱼腥草、地龙、桑白皮提取物对肺炎支原体感染小鼠模型 IL-6 和 IFN- γ 表达的影响[J].中国中医急症,2018,27(7):1140-1143.
- [13] 余丽丽,赵德育.肺炎支原体肺炎发病机制研究进展[J].中国实用儿科杂志,2017,32(3):234-238.
- [14] Miguel MA, Mingala CN. Screening of pig (sus scrofa) bactericidal permeability-increasing protein (BPI) gene as marker for disease resistance [J]. Anim Biotechnol, 2019, 30(2): 146-150.
- [15] 王晶晶,袁文杏,张向民,等.地塞米松联合重组 BPI 蛋白干预对肺炎支原体感染小鼠的肺功能及 AEC-II 细胞超微结构和血清 sB7-H3, sPD-1 水平的影响[J].标记免疫分析与临床,2020,27(3):508-512.
- [16] 郭海英.重组 BPI 蛋白对感染绵羊支原体肺炎的盘羊杂交羊的免疫调节及治疗效果研究[D].石河子:石河子大学,2015.
- [17] 胡伶俐.牛杀菌-通透性增加蛋白和防御素基因融合质粒的构建及其在大肠杆菌中表达[D].武汉:华中农业大学,2010.
- [18] 谢晓虹,王崇杰,张光莉,等.肺炎支原体肺炎患儿支气管肺泡灌洗液细胞因子特点及相关性分析[J].临床儿科杂志,2020,38(12):884-890.
- [19] 钱凯,邱慧明,童涌.腺病毒肺炎和肺炎支原体肺炎患儿肺部炎症细胞因子的表达差异研究[J].中国妇幼保健,2020,35(12):2265-2267.
- [20] 程秀芳,陈俊松.肺炎支原体感染对支气管哮喘病儿外周血 1、9、17 型辅助性 T 细胞及相关细胞因子水平的影响[J].安徽医药,2019,23(6):1210-1214.
- [21] Hu X, Liu S, Zhu J, et al. Dachengqi decoction alleviates acute lung injury and inhibits inflammatory cytokines production through TLR4/NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 8956-8964.
- [22] He JE, Qu H, Gao CY. Association between inflammation factors and *Mycoplasma pneumoniae* in children: Protocol for a systematic review [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(15): e15118.
- [23] 平静,王思源,董丹,等.双表法对流感病毒感染小鼠肺组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的调控作用[J].西部中医药,2020,33(5):18-22.
- [24] 李超,宋伟,彭冰,等.养阴清热化痰方对急性放射性肺炎大鼠 TLR-4/NF- κ B 信号通路的影响[J].陕西中医,2020,41(7):864-867.
- [25] Ni B, Huang X, Xi Y, et al. Neferine inhibits expression of inflammatory mediators and matrix degrading enzymes in IL-1 β -treated rat chondrocytes via suppressing MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Inflammation, 2020, 43(4): 1209-1221.
- [26] Cao C, Yin C, Shou S, et al. Ulinastatin protects against LPS-induced acute lung injury by attenuating TLR4/NF- κ B pathway activation and reducing inflammatory mediators [J]. Shock, 2018, 50(5): 595-605.

[收稿日期]2021-09-28