

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2022. 18. 011

艾叶提取物对肺炎支原体感染小鼠模型血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平的影响*

徐 沙,李云芬,刘荣均,柴 琳[△]

云南中医药大学第三附属医院检验科,云南昆明 650011

摘 要:目的 探讨不同水平的艾叶提取物对肺炎支原体(MP)感染小鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的影响。方法 将 40 只无特定病原体(SPF)级健康 BALB/c 小鼠分为对照组、模型组、3 种不同水平(250.0、125.0、62.5 mg/mL)艾叶提取物组,总共 5 组,每组 8 只。采用滴鼻法建立 MP 感染小鼠模型。建模成功后不同水平艾叶提取物组用不同水平的艾叶提取物灌胃,对照组和模型组用等量的灭菌水灌胃,灌胃第 7 天后无菌提取小鼠肺部组织,采用苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺部组织病理变化;检测各组小鼠血清中 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的水平变化。结果 与对照组比较,模型组小鼠肺湿重指数和病理评分升高($P<0.05$)。与模型组比较,250.0、125.0、62.5 mg/mL 艾叶提取物组小鼠病理评分均降低($P<0.05$),肺湿重指数差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,模型组血清 IL-6 和 TNF- α 升高,IL-10 降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,250.0 mg/mL 艾叶提取物组血清 IL-6 和 TNF- α 水平降低,IL-10 水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);125.0 mg/mL 艾叶提取物组血清 IL-6 水平降低,IL-10 和 TNF- α 水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);62.5 mg/mL 艾叶提取物组血清 IL-6 水平降低($P<0.05$),IL-10 水平无明显变化($P>0.05$),TNF- α 水平升高($P<0.05$)。结论 MP 感染后小鼠肺部组织发生病理改变,不同水平艾叶提取物灌胃 MP 感染小鼠,对小鼠血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平的影响不一,对肺部组织起到不同程度的保护作用。

关键词:肺炎支原体; 艾叶提取物; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10; 肿瘤坏死因子- α

中图法分类号:R446.11;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)18-2495-04

Effects of Artemisia argyi extract on levels of serum IL-6, IL-10 and TNF- α in mice model infected with Mycoplasma pneumoniae*

XU Sha, LI Yunfen, LIU Rongjun, CHAI Lin[△]

Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different concentrations of Artemisia argyi extract on serum interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in the mice infected with Mycoplasma pneumoniae (MP). **Methods** Forty specific pathogen free (SPF) healthy BALB/c mice were divided into the control group, model group and three different doses (250.0, 125.0, 62.5 mg/mL) of Artemisia argyi extract groups, total 5 groups with 8 mice in each group. The mouse model of MP infection was established by nasal drip method. After successful mice modeling, different levels of Artemisia argyi extract were given by gavage, and the control group and model group were given the same amount of sterilized water by gavage. On 7 d after gavage, the lung tissues of mice were extracted aseptically, and the pathological changes of the lung tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The changes of serum IL-6, IL-10 and TNF- α levels in mice were detected. **Results** Compared with the control group, the lung wet weight index and pathological score in the model group were increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the pathological scores of mice in the 250.0, 125.0 and 62.5 mg/mL Artemisia argyi extract groups were all decreased ($P<0.05$), and the lung wet weight index difference was not statistically significant ($P>0.05$). Compared with the control group, the serum IL-6 and TNF- α levels in the model group were increased, the IL-10 was decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, serum IL-6 and TNF- α levels in the 250.0 mg/mL Artemisia argyi extract group were decreased, the level of IL-10 was increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The serum IL-6 level

* 基金项目:云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项[2018FF001-(035)]。

作者简介:徐沙,女,硕士,主要从事动物模型、机制相关研究。 [△] 通信作者, E-mail:1298004490@qq.com。

in the 125.0 mg/mL *Artemisia argyi* extract group was decreased, the IL-10 and TNF- α levels were increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); in the 62.5 mg/mL *Artemisia argyi* extract group, the serum IL-6 level was decreased ($P < 0.05$), the IL-10 level had no significant change ($P > 0.05$), and the TNF- α level was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** After MP infection, the pathological changes occur in the lung tissue of mice. The mice infected by MP are gavaged with different concentrations of *Artemisia argyi* extract, its effects on serum IL-6, IL-10 and TNF- α levels are different, which plays different degrees of protective role on lung tissues.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; *Artemisia argyi* extract; serum interleukin-6; interleukin-10; tumor necrosis factor- α

肺炎支原体(MP)肺炎是儿童社区获得性肺炎的主要原因^[1-2], 尽管迄今为止已经在动物和人类中发现了 200 多种支原体, 但 MP 是最常见的感染人类的支原体, 引发 20%~40% 的小儿肺炎, 影响儿童的生长发育。MP 感染主要病理表现为间质性肺炎和毛细支气管炎^[3]。目前临床治疗 MP 感染的首选药物为大环内酯类抗生素, 但其耐药率逐渐上升, 并有肠胃不适等不良反应发生, 临床疗效差^[4]。但使用抗生素后, MP 感染发病率并未下降, 因此如何有效地治疗 MP 成为研究的重点^[5]。细胞因子在 MP 感染中起着关键的作用^[6-7], 如白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[8], 可以促进炎症发生, 使炎症反应扩大化。自古艾叶被民间广泛用于消毒, 因为其具有抗菌、抗病毒的功效。已有研究报道, 艾叶提取物可以平喘止咳、散瘀驱寒, 其中尤以平喘作用最为显著^[9], 而 MP 感染主要表现为呼吸系统疾病^[10-11], 本研究团队前期体外药敏实验结果表明艾叶水提物具有抑制 MP 生长的作用, 然而其不同水平提取物对抗 MP 感染的差异尚不明确。据前期的研究结果显示, 体外抑菌实验表明艾叶粗提药液对 2 株 MP 菌株(ATCC29342、MP19 流行株)有一定的抑制作用(尚未发表), 但 MP 感染小鼠后艾叶的作用主要集中于免疫调节, 与体外抑菌实验不同, 因此本研究拟通过研究艾叶提取物对 MP 感染小鼠血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 的表达影响, 以及对肺部组织病理变化的影响, 为进一步研究艾叶相关性成分及临床应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体(SPF)4 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 体质量 10~20 g, 购自昆明医科大学实验动物中心, 饲养于温度为 25~26℃、相对湿度为 45%~55% 的环境中。本次研究中饲养及处理方法均遵守动物伦理原则。

1.2 方法

1.2.1 MP 培养 MP 菌株 ATCC29342、MP19(均由昆明医学生物学研究所赠送), 均由本实验室培养、传代和冻存, 培养基均为 *Pleuropneumonia-Like Organisms*(PPLo)培养基, 均于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 10~15 d, 传代过程中采用颜色改变单位法

(CCU)定量调整菌体浓度为 1×10^9 CCU/mL, -20℃冷冻保存备用。

1.2.2 艾叶提取物制备 取艾叶(批号: 2010003, 购自云南和合中药饮片有限公司)100 g, 采用二次煮沸法进行中药原液制备, 所得药液最终合并浓缩成 100 mL(1 mL 原液相当于中药材 1 g), 实验前用灭菌水在无菌条件下进行倍比稀释, 稀释终水平分别为 250.0、125.0、62.5 mg/mL, 配制好的药液均存放于 4℃冰箱保存备用。

1.2.3 小鼠分组与建模 选取 40 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、艾叶提取物不同水平组(250.0、125.0、62.5 mg/mL), 每组 8 只。除对照组外, 其余小鼠用乙醚进行麻醉, 鼻腔内接种 50 μ L 1×10^{10} CCU/L 菌液, 每天 1 次, 共滴鼻 5 d, 建立 MP 感染模型。对照组小鼠滴入等量的磷酸缓冲盐溶液(PBS), 实验过程重复 3 次。

1.2.4 小鼠灌胃 MP 感染小鼠 5 d 后, 不同水平艾叶提取物组采用不同稀释水平的艾叶混悬液对模型组小鼠灌胃, 每次 0.2 mL, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 期间称量小鼠体质量, 灌胃 7 d 后不禁食禁水。对照组与模型组小鼠用等量灭菌水灌胃, 之后处死用 75% 乙醇消毒解剖, 提取小鼠肺组织。分离小鼠左右两侧肺组织, 称取肺湿重, 计算肺湿重指数(肺湿重指数 = 肺质量/体质量 $\times 100\%$), -80℃储存备用。

1.2.5 苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理变化 取小鼠肺部组织, 4% 组织固定液固定 48 h, 洗涤, 置于不同的乙醇浓度梯度中脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切 4 μ m 厚片, 脱蜡, HE 染色, 二甲苯透明, 封片, 显微镜(Olympus, BX43)下观察, 采用组织评分系统进行病理评分。

1.2.6 细胞因子微球检测技术(CBA)检测血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平 摘取小鼠眼球取血, 静置 15 min, 3 000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清液, CBA 法检测血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平, 后续用流式细胞仪 BD Cnto2 的 FCAP Array V3 软件进行分析。IL-6、IL-10 和 TNF- α 检测试剂盒购于美国 BD 生物技术有限公司, 检测过程严格按照 CBA 试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6 统计软件

进行分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MP 感染后小鼠体质量、肺湿重指数、病理评分变化 MP19 感染后小鼠体质量 $[(13.85 \pm 0.01)g]$ 显著低于 ATCC29342 感染的小鼠 $[(19.36 \pm 0.01)g]$ 和对照组小鼠 $[(19.47 \pm 0.05)g]$ ($P < 0.05$),因此采用被 MP19 感染的小鼠进行后续试验。MP19 感染小鼠后,采用不同水平的艾叶提取物灌胃,结果发现:与对照组比较,模型组小鼠肺湿重指数和病理评分升高($P < 0.05$)。与模型组比较,250.0、125.0、62.5 mg/mL 艾叶提取物组小鼠病理评分均降低($P < 0.05$),肺湿重指数差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组小鼠肺组织病理变化 对 MP 感染后小鼠灌胃 1 周,提取的肺组织采用 HE 染色、高倍镜($\times 40$)下进行病理切片观察。模型组与对照组比较,模型组肺部结构中支气管周围的肺间质和肺泡腔的肺间质可见轻度水肿,并可见大量淋巴细胞浸润,支气

管周边淋巴细胞浸润更明显,支气管周围肺泡间隔可见纤维增生,间隔增宽,见图 1。当对 MP 感染小鼠用不同水平的艾叶提取物灌胃后,相对于模型组,250.0 mg/mL 艾叶提取物组的小鼠肺组织局灶肺泡间隔增宽伴淋巴细胞浸润,全肺组织肺泡腔无渗出,偶见散在的淋巴细胞浸润(图 1);125.0 mg/mL 艾叶提取物组的小鼠肺组织支气管和血管周围可见呈片状、实性的淋巴细胞聚集,余肺泡腔可见散在淋巴细胞浸润,无渗出液(图 1);62.5 mg/mL 艾叶提取物组的小鼠肺组织炎症较 250.0、125.0 mg/mL 艾叶提取物组重(图 1)。

表 1 各组小鼠肺湿重指数、病理评分情况($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	肺湿重指数(%)	病理评分(分)
对照组	8	0.15±0.02	7.02±1.23
模型组	8	0.20±0.08 [*]	15.15±1.54 [*]
250.0 mg/mL 艾叶提取物组	8	0.19±0.04	10.22±1.37 [#]
125.0 mg/mL 艾叶提取物组	8	0.20±0.04	13.02±0.85 [#]
62.5 mg/mL 艾叶提取物组	8	0.22±0.05	6.83±0.91 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

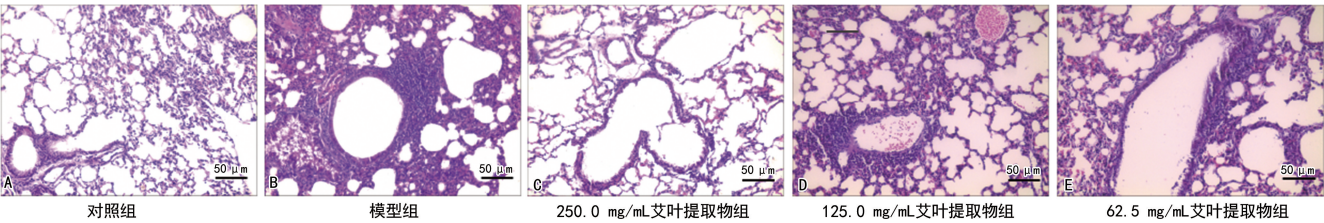


图 1 各组小鼠肺组织病理变化(HE 染色, $\times 40$)

2.3 各组血清 IL-6、TNF- α 、IL-10 水平比较 MP19 感染小鼠后,与对照组比较,模型组中 IL-6 和 TNF- α 水平升高,IL-10 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较:不同水平艾叶提取物组的血清 IL-6 水平均降低($P < 0.05$);250.0 mg/mL 艾叶提取物组和 125.0 mg/mL 艾叶提取物组的血清 IL-10 水平均升高($P < 0.05$),62.5 mg/mL 艾叶提取物组血清 IL-10 水平无明显变化($P > 0.05$);250.0 mg/mL 艾叶提取物组血清 TNF- α 水平降低($P < 0.05$),125.0 mg/mL 艾叶提取物组和 62.5 mg/mL 艾叶提取物组血清 TNF- α 水平均升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清 IL-6、TNF- α 、IL-10 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)				
组别	<i>n</i>	IL-6	IL-10	TNF- α
对照组	8	1.25±0.02	10.25±0.02	8.98±0.01
模型组	8	4.39±0.01 [*]	2.68±0.01 [*]	15.85±0.02 [*]
250.0 mg/mL 艾叶提取物组	8	1.43±0.04 [#]	8.05±0.04 [#]	9.84±0.04 [#]
125.0 mg/mL 艾叶提取物组	8	0.75±0.04 [#]	5.63±0.04 [#]	27.19±0.01 [#]
62.5 mg/mL 艾叶提取物组	8	1.88±0.02 [#]	3.49±0.1	56.26±0.01 [#]

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

3 讨 论

MP 是一种介于细菌与病毒之间的微生物^[12],为呼吸道疾病的重要病原体,尤其儿童容易感染且发病年龄较早,感染后肺外脏器官受严重损害,但 MP 感染具体的致病机制尚不清楚。而艾叶是有效的平喘、祛痰、镇咳的药物,已有研究发现艾叶的水提物对肺炎双球菌等有治疗作用,甚至对呼吸道病毒也有一定的治疗作用^[9],且艾叶提取物对小鼠炎症有一定的抗感染疗效^[9],因此研究艾叶对 MP 感染的治疗有重要意义。本研究初步发现 MP 感染后小鼠体质量下降,同时感染后小鼠肺湿重指数和肺组织病理评分升高,结果表明 MP 感染小鼠会对小鼠有相应的损伤。

已有研究报道 MP 感染小鼠后主要改变小鼠的肺部结构^[8],艾叶是否会减轻小鼠肺部组织炎症? 本研究观察 MP 感染小鼠的肺部组织病理结构,结果初步显示,小鼠受 MP 感染后,肺部组织病理结构发生不同程度的改变。为进一步探讨不同水平艾叶提取物对小鼠肺部组织的影响,在用 MP 感染小鼠 5 d 后,用不同水平的艾叶提取物灌胃,结果表明感染后,肺部组织炎症加重,经不同水平的艾叶提取物作用后,炎症相对于模型组都有所减轻,提示艾叶提取物对

MP 感染小鼠有一定的治疗作用,但本研究仅用了艾叶单味中药,具体的治疗机制需进一步探索。

有研究报道过度炎症反应在 MP 感染中发挥重要的作用^[10],MP 感染小鼠后会表达多个炎症因子参与炎症反应^[11],例如 IL-6、IL-10 和 TNF- α ,因此调节血清细胞炎症因子水平有助于减少炎症的发生,从而减轻免疫损伤^[13]。IL-6 作为重要的炎症因子之一,与免疫炎症反应密切相关^[14],通过检测 IL-6 水平可以有效判断炎症的损伤程度,因此 IL-6 也作为判断感染的指标之一^[15]。研究表明 IL-6 升高是判断出现炎症的指标^[16]。本研究结果显示,MP 感染小鼠后血清 IL-6 水平上调,当对 MP 感染小鼠用 62.5 mg/mL 艾叶提取物灌胃后,血清 IL-6 水平下调,病情好转。本研究结果显示血清 IL-6 水平与机体的感染有关,与其他研究报道结果一致^[8]。IL-10 是一种抑制性的淋巴因子,主要机制为抑制炎症反应,从而调节免疫细胞的分化与增殖^[17]。本研究结果显示,在受 MP 感染后,小鼠血清 IL-10 水平下调,但对 MP 感染小鼠用 62.5 mg/mL 艾叶提取物灌胃治疗后,血清 IL-10 水平上调,结果显示这可能与机体的免疫调节相关。临床研究证实,TNF- α 能准确评价和确定炎症的产生^[18]。本研究结果显示,在 MP 感染小鼠后,血清 TNF- α 水平急剧上升,在不同水平艾叶提取物作用后,250.0 mg/mL 艾叶提取物组血清 TNF- α 水平下调,125.0、62.5 mg/mL 艾叶提取物组血清 TNF- α 水平上调,表明不同水平的艾叶提取物对 TNF- α 的影响不同,但影响机制还需进一步研究。

综上所述,本实验通过建立 MP 感染小鼠模型,发现 MP 感染后小鼠肺部组织发生不同程度的改变,用不同水平的艾叶提取物灌胃小鼠后,小鼠血清中 IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平发生不同变化,影响不一,这为进一步探讨 MP 感染相关机制奠定了相应的理论基础,同时也初步表明不同浓度的艾叶提取物会对 MP 感染小鼠血清 IL-6、IL-10 和 TNF- α 产生不同程度的影响,这为后期探讨其相关机制和临床研发精准用药提供了相应的理论基础。

参考文献

[1] LEE H, YUN K W, LEE H J, et al. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16(1): 23-34.

[2] KUMAR S, ROY R D, SETHI G R, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection and asthma in children[J]. *Trop Doct*, 2019, 49(2): 117-119.

[3] 崔兆海, 廖国阳. 肺炎支原体感染流行病学及耐药状况的

研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33(2): 203-206.

[4] 谭丹, 姜之炎. 中医药治疗儿童肺炎支原体肺炎的机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(6): 1403-1406.

[5] 阚倩娜, 姜之炎. 中医中药抑制肺炎支原体机制的研究探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(3): 658-660.

[6] GOMES I A, DE CARVALHO O, DE MENEZES A F, et al. The role of interleukins in vitiligo: a systematic review[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2018, 32(12): 2097-2111.

[7] LUO H, HE J, QIN L, et al. *Mycoplasma pneumoniae* lipids license TLR-4 for activation of NLRP3 inflammasome and autophagy to evoke a proinflammatory response[J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 203(1): 66-79.

[8] 许益国. 血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 联合检测在小儿大叶性肺炎中临床意义的研究[J]. *甘肃中医药大学学报*, 2018, 35(1): 60-62.

[9] 曹玲, 于丹, 崔磊, 等. 艾叶的化学成分、药理作用及产品开发研究进展[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 918-923.

[10] 崔小健, 张嘉懿, 郭文伟, 等. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的临床特征和高危因素预测[J]. *重庆医学*, 2020, 49(17): 2905-2908.

[11] 李俊梅, 郑成中, 张曼, 等. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的临床特点及血清 IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 的变化分析[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(24): 4768-4772.

[12] 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.

[13] 尹延凤, 雷飞飞, 张刚, 等. 血清蛋白成分及炎症细胞因子与支原体肺炎患儿病情严重程度的相关性研究[J]. *实用预防医学*, 2019, 26(5): 528-532.

[14] MEDJO B, ATANASKOVIC-MARKOVIC M, NIKOLIC D, et al. Increased serum interleukin-10 but not interleukin-4 level in children with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *J Trop Pediatr*, 2017, 63(4): 294-300.

[15] 花元清. 阿奇霉素联合红霉素治疗小儿支原体肺炎的临床效果分析[J]. *中国妇幼保健*, 2019, 34(11): 2535-2536.

[16] 孙梦杰, 屠亚茹, 欧阳慧子, 等. 血必净注射液及其药代标示物对脓毒症大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 表达的影响[J]. *天津中医药大学学报*, 2018, 37(1): 13-15.

[17] 庞焕香, 乔红梅, 成焕吉, 等. 支原体肺炎患儿肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平检测及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(10): 808-810.

[18] TIAN F, CHEN L P, YUAN G, et al. Differences of TNF- α , IL-6 and Gal-3 in lobar pneumonia and bronchial pneumonia caused by *mycoplasma pneumoniae*[J]. *Technol Health Care*, 2020, 28(6): 711-719.

(收稿日期: 2022-01-10 修回日期: 2022-07-02)