

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.22.003

臭灵丹提取物对肺炎支原体感染小鼠血清细胞因子的影响^{*}

赵若莲,李云芬,徐 沙,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 探讨臭灵丹提取物对肺炎支原体感染小鼠血清细胞因子白细胞介素(IL)-6、IL-10 和 IL-4 水平的影响。方法 将 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、低浓度组、中浓度组和高浓度组,总共 5 组,每组 8 只。除对照组以外的其他组采用滴鼻法建立肺炎支原体感染小鼠模型。建模成功后对低浓度组、中浓度组和高浓度组分别灌胃不同浓度(62.5、125.0、250.0 mg/mL)的臭灵丹提取物,对照组和模型组灌胃等量的生理盐水。测量体质量及肺湿重指数,苏木精-伊红(HE)染色法观察肺组织病理变化,流式微球阵列法(CBA)检测小鼠血清 IL-6、IL-10 和 IL-4 水平。与对照组比较,模型组小鼠体质量减轻($P<0.05$),肺湿重指数增加($P<0.05$);与模型组比较,高、低浓度组小鼠体质量增加($P<0.05$),低、中、高浓度组肺湿重指数减低($P<0.05$)。模型组、低浓度组、中浓度组、高浓度组血清 IL-6 水平较对照组升高($P<0.05$),IL-4 和 IL-10 水平较对照组降低($P<0.05$);经不同浓度的臭灵丹提取物作用后,低、中浓度组 IL-6 水平较模型组降低($P<0.05$),低、中、高浓度组 IL-4 水平较模型组增高($P<0.05$),低、高浓度组 IL-10 水平较模型组增高($P<0.05$)。结论 臭灵丹能缓解肺炎支原体感染引起的肺组织炎性病变及过量促炎性细胞因子 IL-6 的释放,增加抗炎性细胞因子 IL-4 和 IL-10 的表达,使 Th1 和 Th2 的细胞免疫达到平衡,抑制过度免疫反应,减轻免疫病理损伤。

关键词:肺炎支原体; 臭灵丹; 免疫病理损伤; 肺湿重指数; 细胞因子

中图法分类号:R563

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)22-3034-04

Effect of extracts of *Laggetera pterodonta* on serum cytokines of mycoplasma pneumoniae-infected mice^{*}

ZHAO Ruolian, LI Yunfen, XU Sa, CHAI Lin[△]

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

Abstract: **Objective** To investigate the effects of extracts of *Laggetera pterodonta* on serum cytokines interleukin (IL)-6, IL-10 and IL-4 in mycoplasma pneumoniae-infected mice. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, low concentration group, medium concentration group, high concentration group, 5 groups with 8 mice in each group. The mice model of mycoplasma pneumoniae infection in all groups except for the control group was established by nasal drop method. After the modeling, mice in low concentration group, medium concentration group, high concentration group were gavaged with different concentrations of *Laggetera pterodonta* extract (62.5, 125.0, 250.0 mg/mL), and the control group and model group were gavaged with the same amount of normal saline. Body weight and lung wet index were measured, and pathological changes of lung tissues were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The serum levels of IL-6, IL-10 and IL-4 in mice were detected by Cytometric Bead Array (CBA). **Results** Compared with the control group, the body weight in the model group decreased ($P<0.05$), and the lung wet weight index increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the body weight in the high and low concentration groups increased ($P<0.05$), and the lung wet weight index in the low, medium and high concentration groups decreased ($P<0.05$). The serum IL-6 levels in model group, low concentration group, medium concentration group and high concentration group were higher than those in control group ($P<0.05$), while the levels of IL-4 and IL-10 were lower than those in control group ($P<0.05$). After being treated with different concentrations of *Laggetera pterodonta* extract, the level of IL-6 in the low, middle and high concentration groups was lower than that in the model group ($P<0.05$), the level of IL-4 in the low, middle and high concentration groups was higher than that in the model group ($P<0.05$), and the level of IL-10 in the low and high concentration groups was higher than that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** *Laggetera pterodonta* could alleviate the inflammatory lesions in lung tissues caused by mycoplasma pneumoniae infection and the release of

^{*} 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:赵若莲,女,副主任技师,主要从事临床生化及免疫学检验研究。 [△] 通信作者, E-mail:1298004490@qq.com。

excessive proinflammatory cytokine IL-6, increase the levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, balance the cellular immunity of Th1 and Th2, inhibit the excessive immune response, and alleviate the immune pathological damage.

Key words: mycoplasma pneumoniae; *Lagdera pterodonta*; immune pathological damage; lung wet index; cytokines

肺炎支原体(MP)是一种主要引起上、下呼吸道感染病原体,其已成为社区获得性肺炎的首要致病菌之一。MP 感染除了引起肺炎支原体肺炎(MPP)外,也可通过免疫机制形成肺外并发症,可伴发多系统、多器官的损害^[1]。MPP 的发病机制尚未十分清楚,目前其免疫学机制一直是研究重点。异常的免疫反应及免疫炎症风暴是造成重症肺炎和肺外并发症的主要病因。尤其是细胞因子在 MP 感染中的作用越来越受到重视,有研究表明,细胞因子参与了 MPP 的发病过程^[2]。本课题组前期的研究发现臭灵丹在体外对 MP 具有抑制作用,因此本研究拟通过研究臭灵丹对 MP 感染小鼠血清细胞因子的作用,探讨臭灵丹在体内对抗 MP 感染的作用及其可能机制,为深入研究及中医药制剂研发提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源 实验动物为 SPF 级 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠,40 只,体质量 10~20 g,购自昆明医科大学实验动物中心。许可证号 SCXK(粤)2014-0035,饲养于温度 25~26 ℃、相对湿度 45%~55%的环境中。本研究中饲养及处理方法遵守动物实验伦理原则。

1.2 仪器与试剂 美国贝克曼库尔特公司离心机,山东新华医疗器械有限公司电热蒸汽压力灭菌器,力康生物医疗科技控股有限公司电热恒温培养箱,美国 BD 公司 Canto 2 流式细胞仪及配套 BD(CBA)Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit,日本奥林巴斯公司 BX43 显微镜。

1.3 方法

1.3.1 MP 培养 MP 菌株 ATCC29342、MP19(均由昆明医学生物学研究所赠送),以上菌体均由本实验室培养、传代和冻存,培养基为 PPLO 培养基,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(CCU)法定量调整菌体浓度为 1×10^8 CCU/mL, -20 ℃ 冷冻保存备用。

1.3.2 臭灵丹提取物制备 取臭灵丹(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,稀释终浓度分别为 62.5、125.0、250.0 mg/mL,配制好的药液均存放于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 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、低浓度、中浓度和高浓度

组,共 5 组,每组 8 只。除对照组外,其余组小鼠用乙醚进行麻醉,鼻腔内滴入 1×10^8 CCU/mL 菌液 50 μ L,1 次/天,共滴鼻 5 d,建立 MP 感染模型。对照组小鼠同等条件下滴入等量生理盐水。

造模后,低浓度组、中浓度组、高浓度组分别用 62.5、125.0、250.0 mg/mL 浓度的臭灵丹提取液灌胃,每次 0.2 mL,1 次/天,连续给药 7 d。对照组与模型组小鼠灌胃等量生理盐水。

1.3.4 标本采集 灌胃 7 d 后,于第 8 天称量小鼠体质量,之后处死小鼠。处死后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。摘小鼠眼球取血,静置 15 min,3 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清,-80 ℃ 储存备用。

1.3.5 苏木精-伊红(HE)染色法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,显微镜下观察。

1.3.6 流式微球阵列法(CBA)检测血清细胞因子白介素(IL)-6、IL-10 和 IL-4 水平 CBA 检测小鼠血清细胞因子 IL-6、IL-10 和 IL-4 水平,严格按照美国 BD 公司(CBA)Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit 说明书进行操作。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析,经正态性检验各组数据是否符合正态分布,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、肺湿重指数比较 与对照组比较,模型组小鼠体质量减轻($P < 0.05$),肺湿重指数增加($P < 0.05$);与模型组比较,高、低浓度组小鼠体质量增加($P < 0.05$),低、中、高浓度组肺湿重指数减低($P < 0.05$)。见图 1、2。

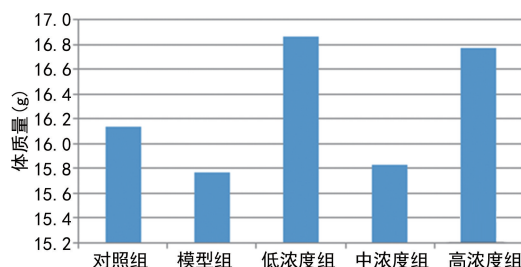


图 1 各组小鼠体质量比较

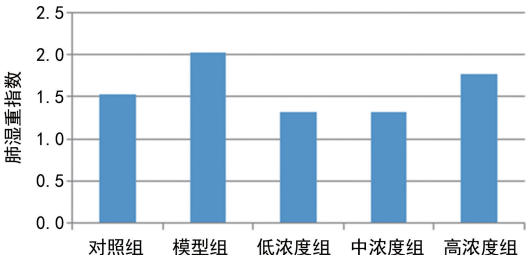
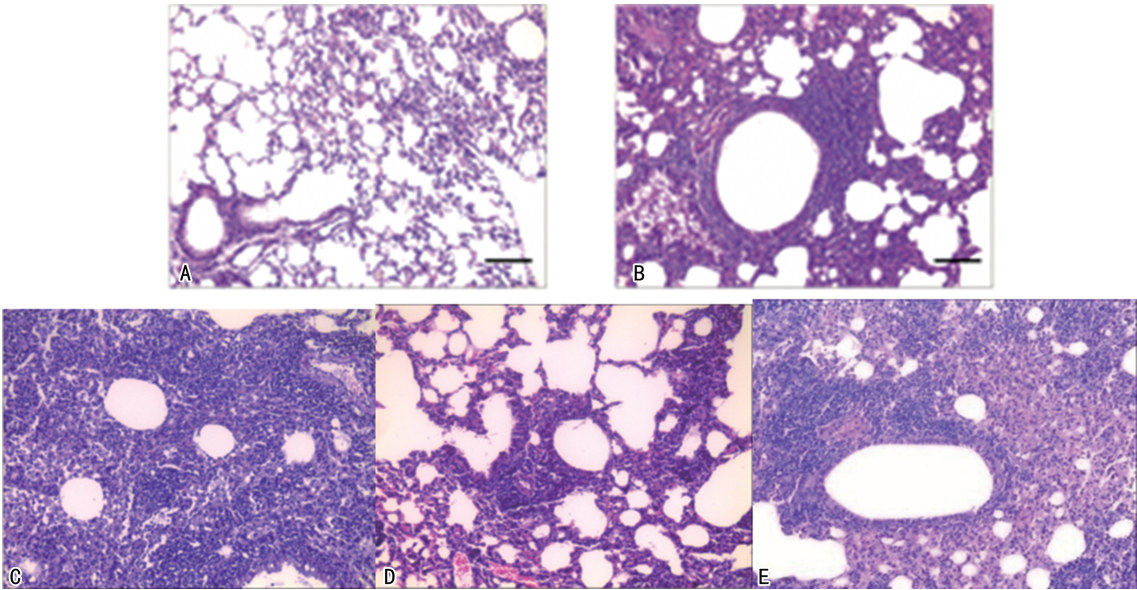


图 2 各组小鼠肺湿重指数比较

2.2 各组小鼠肺组织病理情况 对照组肺泡结构清晰,肺泡内无渗出。模型组肺部结构中支气管周围的肺间质和/或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为明

显、更重,支气管周围肺泡间隔可见纤维增生,间隔增宽。中浓度组和高浓度组肺组织炎症浸润明显减轻。见图 3。

2.3 各组小鼠血清细胞因子水平比较 MP 感染小鼠后,模型组、低浓度组、中浓度组、高浓度组血清 IL-6 水平较对照组升高($P<0.05$),IL-4 和 IL-10 水平较对照组降低($P<0.05$);经不同浓度的臭灵丹提取物作用后,低、中浓度组 IL-6 水平较模型组降低($P<0.05$);低、中、高浓度组 IL-4 水平较模型组增高($P<0.05$);低、高浓度组 IL-10 水平较模型组增高($P<0.05$)。见表 1。



注:A~E 分别为对照组、模型组、低浓度组、中浓度组、高浓度组病理情况。

图 3 各组小鼠肺组织病理情况($\times 40$)

表 1 各组小鼠血清 IL-4、IL-6 和 IL-10 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-6	IL-4	IL-10
对照组	8	0.88±0.05	5.59±1.10	41.90±21.90
模型组	8	4.53±1.27	3.12±0.27	6.40±2.13
低浓度组	8	3.65±0.89	4.28±0.89	10.41±0.04
中浓度组	8	1.60±0.46	3.61±0.30	1.95±1.29
高浓度组	8	6.20±1.96	4.05±0.06	12.26±8.13

3 讨 论

MP 感染后宿主免疫系统存在 Th1 和 Th2 的细胞免疫失衡^[3],过量炎症因子释放,继而诱发过度免疫反应,从而出现炎症反应风暴,激发免疫病理损伤。细胞因子刺激机体产生的免疫反应越强,临床症状越重,脏器损伤越明显。有研究显示,患难治性 MPP 的患者,其血清中干扰素- γ (IFN- γ)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平明显升高^[4]。

臭灵丹 Laggrapterodonta (DC.) Benth. 为菊科

六棱菊属植物,是云南民间特色药用植物,有抗菌、抗炎、镇痛、祛痰、抗肿瘤的作用,应用广泛^[5]。本课题组前期的研究发现臭灵丹提取物在体外对 MP 具有抑制作用,而对于其在体内抗 MP 感染的作用鲜见报道,因此本研究拟通过观察臭灵丹对 MP 感染的小鼠肺部病理改变及血清细胞因子水平的影响来探讨其对抗 MP 感染的作用及其可能的机制。

小鼠感染 MP 后体质量减轻,肺湿重指数升高,肺部组织出现水肿,淋巴细胞浸润,纤维增生,间隔增宽等炎性病变。经臭灵丹提取物作用后低浓度组和高浓度组体质量增加,中浓度组体质量变化不明显,但 3 组肺湿重指数均较模型组降低,中浓度组和高浓度组肺组织炎症浸润明显减轻。表明不同浓度臭灵丹对小鼠体质量的作用可能不同,其效应和机制有待进一步研究。

IL-6 是机体重要的促炎性细胞因子。IL-6 在抗感染免疫反应中发挥重要作用,是炎症反应过程中出现最早、最重要的炎性介质,能诱导 B 细胞分化和产生抗体,并诱导 T 细胞活化增殖、分化,参与机体的免

疫应答,是炎症反应的促发剂,其升高水平与感染的严重程度相一致^[6]。ZHAO 等^[7]的研究发现,血清 IL-6 水平在 MPP 的发病及发展过程中起重要作用,且与感染程度呈正相关。杨璐等^[8]和黄梅青等^[9]的研究发现,MP 感染小鼠模型血清 IL-6 水平增高,而清燥救肺汤和石仙桃多糖能有效降低 IL-6、TNF- α 和 INF- γ 等促炎性细胞因子水平,有助于缓解小鼠肺组织中的炎症反应。本研究结果显示,模型组小鼠感染 MP 后血清 IL-6 水平升高,经臭灵丹提取物作用后,低浓度组和中浓度组血清 IL-6 水平降低,而高浓度组 IL-6 水平升高,表明臭灵丹能减低 MP 感染引起的过量促炎性细胞因子的释放,缓解免疫病理损伤,但臭灵丹对 MP 感染小鼠的血清 IL-6 水平抑制作用存在有效浓度范围(中、低浓度),而超过此范围的高浓度可能对机体有一定的损伤,该结论有待进一步研究证实。

促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子相互影响,且在感染发展过程中相互影响,对感染的发展方向 and 结果有重要影响。IL-4 和 IL-10 是为数不多的抗炎性细胞因子,由 Th2 分泌,对机体有免疫抑制作用^[10]。IL-4 能下调促炎性细胞因子的分泌,诱导人 B 淋巴细胞增殖、分化,促进 B 淋巴细胞合成并分泌免疫蛋白介导体液免疫^[11-12]。IL-10 作为抗炎性细胞因子重要成员之一,是强免疫抑制因子,对免疫应答起抑制作用,主要由单核巨噬细胞, T、B 淋巴细胞等多种细胞分泌。IL-10 主要抑制单核细胞介导的促炎性细胞因子释放,如 IL-6、IL-8、TNF- α 等来阻止组织器官受损^[13-14]。XU 等^[15]的研究显示, MPP 患者血清 IL-4、IL-10 水平降低,且二者水平与间质性肺炎相关。本研究中,模型组小鼠感染 MP 后血清 IL-4 和 IL-10 水平降低,经臭灵丹提取物作用后低浓度组、中浓度组、高浓度组 IL-4 水平均升高,表明臭灵丹能通过上调抗炎性细胞因子 IL-4 水平,抑制过量免疫反应及相关炎症反应,从而减轻机体免疫损伤。低浓度组和高浓度组 IL-10 水平升高,中浓度组 IL-10 水平降低,表明臭灵丹对 IL-10 水平的作用不遵循线性的“作用-剂量关系”,其效应和机制有待扩大样本量,严格控制实验条件进一步研究。

综上所述,本研究表明 MP 感染后宿主免疫系统存在 Th1 和 Th2 的细胞免疫失衡,臭灵丹能缓解 MP 感染引起的肺组织炎性病变及过量促炎性细胞因子 IL-6 释放,增加抗炎性细胞因子 IL-4 和 IL-10 的表达,使 Th1 和 Th2 的细胞免疫达到平衡,抑制过度免疫反应,减轻免疫病理损伤,这为研发抗 MP 感染的相关制剂提供了理论依据和新的思路。

参考文献

[1] 薛冠华,闫超,赵汉青,等. 2015 上半年与 2016 上半年儿童肺炎支原体感染流行及分子特征分析[J]. 中华微生物

学和免疫学杂志,2017,37(10):729-733.
 [2] CHAUDHRY R, GHOSH A, CHANDOLIA A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*; an update[J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(1): 7-16.
 [3] SARAYA T, KURAI D, NAKAGAKI K, et al. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications[J]. Front Microbiol, 2014, 5: 410-428.
 [4] SHI S, ZHANG X, ZHOU Y, et al. Immunosuppression reduces lung injury caused by *Mycoplasma pneumoniae* infection[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7147-7154.
 [5] ISHIGURO N, KOSEKI N, KAIHO M, et al. Therapeutic efficacy of azithromycin, clarithromycin, minocycline and tosufloxacin against macrolide-resistant and macrolide-sensitive *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients[J]. PLoS One, 2017, 12(3): 854-876.
 [6] ROSE-JOHN S. Interleukin-6 family cytokines[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(2): 1055-1074.
 [7] ZHAO J, LI Y, ZHANG W. The clinical significance of IL-6 and IL-27 in bronchoalveolar lavage fluids from children with *mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 331-337.
 [8] 杨璐,吴振起. 清燥救肺汤对肺炎支原体感染小鼠 NL-RP3 炎性小体相关因子表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(4): 318-324.
 [9] 黄梅青,朱燕华,赵世元. 石仙桃多糖对肺炎支原体感染模型小鼠 Th1/Th2 细胞因子表达的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(8): 15-19.
 [10] PRATIMA M, ARUN K, RUBY A, et al. Association of pro-and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia[J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(4): 2037-2047.
 [11] 陈青,刘文娥,张婉妮,等. 盆炎丸对解脲支原体感染小鼠血清 IL-2、IL-4 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(2): 26-30.
 [12] DMITRY V, GLEB E, SERGEI V, et al. Oxylin profiles as functional characteristics of acute inflammatory responses in astrocytes pre-treated with IL-4, IL-10, or LPS[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1780-1794.
 [13] JEREMIE J, CHE-CHUNG Y, ERIKA W, et al. Activation of CB-1R promotes lipopolysaccharide-induced IL-10 secretion by monocytic myeloid-derived suppressive cells and reduces acute inflammation and organ injury[J]. J Immunol, 2020, 204(12): 3339-3350.
 [14] WANG X, WONG K, OUYANG W, et al. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2019, 11(2): 1248-1278.
 [15] XU X, SHENG Y, YANG L, et al. Immunological features of pediatric interstitial pneumonia due to *mycoplasma pneumoniae* [J]. Front Pediatr, 2021, 9(1): 1487-1508.