

清燥救肺汤“润燥”作用的分子机制

吴振起^{1*}, 韩冬阳², 王贵帮², 李晓菲², 张聪聪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:**观察清燥救肺汤(QJT)对肺炎支原体(MP)感染小鼠肺组织超微结构,细胞毒素 MPN372,水通道蛋白5(AQP5),肺表面活性物质相关蛋白-A(SP-A)表达水平的影响,探讨其“润燥”作用的分子机制。**方法:**将96只SPF级BABL/c随机分成正常组,模型组,QJT(0.3 mL/只)组,阿奇霉素(0.3 mL/只)组,每组24只,除正常组外,其余3组进行MP感染模型处理,于造模后第3,7,10,14天取材,对小鼠肺组织病理炎症程度评分,并计算肺指数及干湿比,于电镜下观察肺组织超微结构,采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测小鼠肺组织中MPN372,SP-A mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫组织化学方法检测AQP5蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,MP感染后,小鼠肺组织病理评分、肺指数升高,干湿比降低,炎症表现第7天最重;电镜下观察发现第7天肺泡Ⅱ型细胞表面微绒毛脱落,线粒体肿胀,肺泡间隔增厚;小鼠肺组织中MPN372 mRNA明显升高,AQP5蛋白及SP-A mRNA表达明显降低($P < 0.05$),第7天均为极值。与模型组比较,QJT干预后,肺组织炎症得到控制,电镜下炎性改变有所减轻;MPN372 mRNA表达明显减少,SP-A mRNA及AQP5蛋白表达明显升高($P < 0.05$);QJT组与阿奇霉素组于第14天在SP-A与AQP5表达上差异显著($P < 0.05$)。**结论:**QJT通过减轻肺部炎症、降低MP毒素含量、增加肺组织活性物质含量体现“润燥”作用。

[关键词] 清燥救肺汤;润燥;肺炎支原体;水通道蛋白;肺表面活性物质

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0092-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181128

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1017.038.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 14:45

Molecular Mechanism of Qingzao Jiufei Tang for Moistening Dryness

WU Zhen-qi^{1*}, HAN Dong-yang², WANG Gui-bang², LI Xiao-fei², ZHANG Cong-cong²

(1. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;*

2. Graduate School of Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Qingzao Jiufei Tang (QJT) on the ultrastructure and the expression of cytotoxin MPN372, aquaporin 5 (AQP5) and pulmonary surfactant related protein-A (SP-A) in lung tissue of mice infected with mycoplasma pneumoniae (MP), and explore its molecular mechanism on ‘moistening dryness’. **Method:** Totally 96 SPF BABL/c mice were randomly divided into normal group, model group, QJT group (0.3 mL/mice) and Azithromycin group (0.3 mL/mice), $n = 24$ in each group. Except the normal group, the the mice in other 3 groups were induced into MP infection models. On day 3, 7, 10, 14 after modeling, the degree of pathological inflammation in lung tissue of mice was scored; the lung index and ratio of wet and dry was calculated; the ultrastructure of lung tissue was observed by electron microscope; the mRNA expression levels of MPN372 and SP-A in lung tissue were detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and the protein expression of AQP5 was detected by immunohistochemical method and Western blot method. **Result:** After MP infection, lung pathology score and lung index were increased; the ratio of dry and wet was reduced, and the inflammation was the most serious on day 7 as compared with the normal group; on day

[收稿日期] 20171207(027)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373687);辽宁省科技厅项目(2014020044)

[通信作者] * 吴振起, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治感染性疾病研究, E-mail: zhenqiwu@163.com

7, microvilli fell off, mitochondria swollen, and alveolar septum thickening could be observed by electron microscope; the mRNA expression of MPN372 in lung tissue of mice was increased and reached the peak on the seventh day, while AQP5 protein expression and the SP-A mRNA expression were decreased and reached the valley on the seventh day ($P < 0.05$). As compared with the model group, the inflammation of lung tissue could be controlled; the inflammatory changes under the electron microscope were relieved; the mRNA expression of MPN372 was decreased, AQP5 protein expression and SP-A mRNA expression were increased after treatment with QJT ($P < 0.05$); SP-A and AQP5 expression levels were significantly different between QJT group and Azithromycin group on day 14 ($P < 0.05$). **Conclusion:** QJT can embody the effect of “moistening dryness” by reducing the inflammation of the lung, reducing the content of the toxin and increasing the content of the active substance in the lung tissue.

[**Key words**] Qingzao Jiufei Tang; moistening dryness; mycoplasma pneumoniae; aquaporin; pulmonary surfactant

清燥救肺汤(Qingzao Jiufei Tang, QJT)为治疗燥邪伤肺的经典方剂,为清代医家喻嘉言搏“秋伤于湿”为“秋伤于燥”,首次提出“秋燥为病”之论,并创QJT以补外燥治方之遗。QJT方具宣清降润之制,法含祛邪扶正之治。近年有关QJT的研究提示,其于动物实验中能够抑制荷CT26小鼠结肠癌细胞增殖及侵袭转移^[1-2],可增强小鼠机体防御能力,减轻被动吸烟对小鼠呼吸系统的损害^[3];于临床研究中能够预防胸外手术肺部并发症的发生^[4]、对于阴虚燥热型慢咳疗效确切^[5]。笔者临床和实验中发现,QJT具有抗肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)感染作用。MP感染具有燥邪致病的特征,恰燥邪伤肺,MP感染后典型的干咳证合燥邪致咳特点。恰喻嘉言:“燥气先伤上焦华盖”,因“燥胜则干”,故可引起肺部津液失于布输,肺失通调,以至肺泡内细胞的内外液体传输失于稳态,可致肺部炎症改变,气道黏膜损伤难以修复及慢性炎症^[6-7]。本研究从MP感染小鼠肺组织炎症、超微结构及水通道蛋白及肺表面活性物质表达变化从而探讨QJT“润燥”作用的分子机制。

1 材料

1.1 MP菌株及动物 MP标准株FH,由中国医科大学王桂珍教授惠赠,于辽宁中医药大学附属医院病毒室培养。SPF级BALB/c小鼠96只,体质量(20±2)g,雌雄各半,购买于辽宁长生生物技术有限公司,生产合格证号SCXK(辽)2013-0009,使用合格证号SYXK(辽)2015-0001。实验动物的开展取得了辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准[编号2015CS(DW)-003-01]。

1.2 药物及试剂 QJT由桑叶90g,石膏75g,人参20g,甘草30g,亚麻子30g,阿胶24g,麦冬36g,

苦杏仁20g,枇杷叶30g组成,中药饮片购于辽宁中医药大学附属医院门诊药局,经辽宁中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为正品,符合2015年版《中国药典》规范。药液的配制:石膏水煎浓缩,阿胶烱化,药液备用;余药以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,制成含生药1g·mL⁻¹混悬液;阿奇霉素分散片(东北制药,批号4170201),配成6g·L⁻¹药液。羊抗鼠水通道蛋白5(AQP5)一抗,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,ECM II蛋白免疫印迹法(Western blot)检测试剂盒浓缩型兔免疫球蛋白(Ig)G二抗,DAB显色试剂盒,BCA蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为287487,971335616,12I08A,12I12B22,P0010);trizol总RNA提取试剂(美国Invitrogen公司,批号1304078);焦碳酸二乙酯(DEPC),PrimeScript™ RT reagent,SYBR.Premix Ex Taq™[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为BB109I6S03,BK2001,BK9106]。所用引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3 仪器 TP1020型自动组织脱水处理机,EG1150型石蜡包埋机,RM2135型病理精密轮转切片(德国Leica公司);BX50F4型显微镜(日本Olympus公司);HITACHI H-600型电子显微镜(日本日立公司);LC II型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士罗氏公司);BIOFUGE 28RS型低温高速离心机(德国Heraeus公司);IM71型酶标仪,PowerPac Universal型电泳仪,Trans-Blot SD型半干转印系统(美国Bio-Rad公司);FlourChem Q型蛋白印记成像系统(美国Proteinsimple公司);H-7650型透射电镜(日本株式会社)。

2 方法

2.1 分组、模型制备及给药 将 96 只 BALB/c 小鼠按随机数字表法分为 4 组,正常组,模型组,QJT 组,阿奇霉素组,每组 24 只,随机将每组小鼠标记、称质量、记录。将正常组小鼠置于温度、湿度适宜的无菌空间,正常组每只小鼠均滴鼻蒸馏水 0.1 mL。其余 3 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⁻¹ 的 MP 菌液,0.1 mL/只,连续滴鼻 3 d^[6]。而后,QJT 组给予 0.3 mL/只的 QJT 药剂进行灌胃(ig),1 次/d;阿奇霉素组给予 0.3 mL/只阿奇霉素药液 ig,1 次/d,连续 3 d,停药 4 d,2 个循环;正常、模型组、阿奇霉素组(停药期间)给予 0.3 mL/只蒸馏水 ig,连续 14 d。

2.2 标本制备 各组分别于造模后第 3,7,10,14 天,给药后禁食、禁水 4 h 后取材。称质量,颈椎脱臼处死,于无菌操作台将小鼠仰卧位固定,无菌操作,打开胸腔,取出整个肺脏,称取肺重,计算肺指数(肺重/体质量×100%)。其中左肺上叶用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,苏木素-伊红(HE)染色。行肺组织病理学评分^[10]。左肺下叶单独称质量,置于 37 ℃ 恒温箱中 48 h 后,再次称质量,计算干湿比(干重/湿重)。右肺组织存于离心管中,于 -80 ℃ 冰箱冻存。第 7 天处死小鼠后迅速取其右肺上叶组织,2.5% 戊二醛预固定,1% 锇酸固定,环氧树脂浸透和包埋,Leica 超薄切片机制片,乙酸双氧铀、枸橼酸铅双层染色,置 H-7650 型透射电镜下观察肺组织超微结构的变化。

2.3 Real-time PCR 检测 MPN372, SP-A mRNA 表达 将各组小鼠肺组织取出,制备肺匀浆液,用 trizol 提取细胞总 RNA。MPN372^[8](243 bp):上游引物 5'-CAGAAACACCCACAGCTATT-3';下游引物 5'-CACGTTGATACGCAAAGGAAGT-3'。SP-A^[9](1 414 bp):上游引物 5'-GTGGACAAGTGGACGGCATCC-3';下游引物 5'-GCAACATTTAAGCTTTCCAGGGTC-3'。内参是 GAPDH(528 bp);上游引物 5'-ACCACCATGGAAAGGCTGG-3';下游引物 5'-CTCAGTGTAGCCCAGGATGC-3'。分析 RNA 的纯度及完整性,检测 RNA 质量合格后,反转录合成 cDNA,以反转录产物为模板,加入 MPN372,SP-A 的引物,两步法 PCR 扩增标准程序为 95 ℃ 预变性 30 s,20 ℃·s⁻¹,1 个循环。PCR 反应条件为 95 ℃ 5 s,20 ℃·s⁻¹,60 ℃ 20 s,20 ℃·s⁻¹,40 个循环。进行 Real-time PCR 检测。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 MPN372,SP-A mRNA 表达水平。

2.4 Western blot 检测 AQP5 蛋白的表达 称取肺组织提取总蛋白,BAC 试剂盒进行蛋白定量。取样品 25 μg,12% SDS-PAGE 电泳分离,半干电转移到 PVDF 膜,5% 奶粉液封闭 2 h,加入 AQP5 一抗(1:250),4 ℃ 过夜。加入二抗(1:5 000),孵育 1 h 后,用化学发光法显色。以 GAPDH 为内参。胶片经扫描后,用软件 Quantity One 对蛋白条带进行定量分析,计算目的蛋白条带与 GAPDH 条带的灰度比值,作为各目的蛋白的相对表达水平。

2.5 免疫组织化学 SP 法检测 AQP5 蛋白的表达 取肺组织石蜡切片,肺组织石蜡切片-脱蜡至水,灭活,抗原修复,封闭,孵育一抗(1:200),SABC 三步法,孵育生物素化二抗(1:200)-孵育 SABC,显色,复染,封片,均按照试剂盒说明进行。采用 BI2000 医学图像分析系统对阳性结果进行分析,统一参数设定保持基线一致,测定平均积分吸光度 IA,作半定量分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MP 感染小鼠肺组织 MPN372 mRNA 表达情况水平的影响 MP 感染后,小鼠肺组织中 MPN372 mRNA 表达持续升高,于第 7 天达峰值,之后降低;与模型组比较,QJT 治疗后,MPN372 mRNA 表达水平下调,呈递减状态,且第 7,10,14 天作用均显著($P < 0.05$),阿奇霉素组 MPN372 mRNA 表达水平持续下调($P < 0.05$);与阿奇霉素组比较,QJT 在第 3 天有显著性差异($P < 0.05$),而在第 7,10,14 天差异无显著性。见表 1。

3.2 对 MP 感染小鼠肺表面活性物质 SP-A mRNA 表达情况水平的影响 小鼠被感染后,SP-A 表达水平降低,于第 7 天达最低值,之后有所升高但始终低于正常组($P < 0.05$);与模型组比较,QJT 组第 7 天升高明显,之后呈上升趋势,逐渐接近正常值($P < 0.05$),阿奇霉素干预后 SP-A 表达水平逐步回升($P < 0.05$);与阿奇霉素组比较,QJT 组 SP-A 表达水平恢复较快,于第 14 天差异显著($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对 MP 感染小鼠肺组织中 AQP5 表达及肺组织结构改变的影响 MP 感染后,小鼠肺组织中 AQP5 的表达逐渐降低,于第 10 天出现谷值之后有所回升($P < 0.05$);与模型组比较,QJT 组 AQP5 表达水平显著升高,以第 10 天升高最为显著($P <$

表 1 QJT 对 MP 感染小鼠肺组织 MPN372 mRNA 表达情况水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of QJT on expression of MPN372 mRNA in lung tissues of mice infected with MP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
正常	-	-	-	-	-
模型	-	1	1.24 ± 0.08	0.97 ± 0.02	0.89 ± 0.02
QJT	15	0.92 ± 0.06 ²⁾	0.61 ± 0.20 ¹⁾	0.38 ± 0.09 ¹⁾	0.29 ± 0.07 ¹⁾
阿奇霉素	0.09	0.60 ± 0.04 ¹⁾	0.42 ± 0.26 ¹⁾	0.36 ± 0.22 ¹⁾	0.22 ± 0.32 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05;与阿奇霉素组比较²⁾P < 0.05。

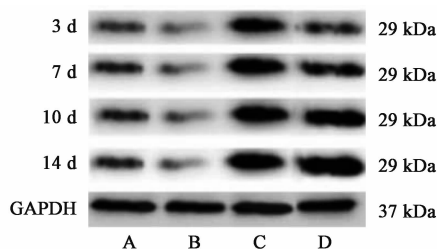
表 2 QJT 对 MP 感染小鼠肺表面活性物质 SP-A mRNA 表达情况水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of QJT on expression of SP-A mRNA in lung tissues of mice infected with MP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
正常	-	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.06	1.02 ± 0.01
模型	-	0.97 ± 0.04	0.54 ± 0.05 ¹⁾	0.61 ± 0.03 ¹⁾	0.73 ± 0.11 ¹⁾
QJT	15	0.98 ± 0.03	0.76 ± 0.01 ²⁾	0.93 ± 0.11 ²⁾	1.05 ± 0.01 ^{2,3)}
阿奇霉素	0.09	0.98 ± 0.08	0.89 ± 0.01 ²⁾	0.90 ± 0.03 ²⁾	0.94 ± 0.02 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05;与阿奇霉素组比较³⁾P < 0.05(表 3 ~ 5 同)。

0.05),阿奇霉素组 AQP5 表达水平升高 ($P < 0.05$);与阿奇霉素组比较,QJT 组间差异无显著性,见图 1,表 3。在光镜下观察,正常组气管管壁无水肿、充血现象,肺泡间隔正常,血管未见扩张充血及明显的炎性浸润;模型组病变的区域出现了肺泡间隔明显增宽并同时伴有大量的炎性细胞浸润,血管扩张充血,气管管壁及其周围间质明显充血水肿,并伴有炎性浸润,肺泡腔中有渗出液;QJT 组、阿奇霉素组病变部位炎症改变明显减轻。见图 2。经 SP 处理后,光镜下正常组,QJT 组,阿奇霉素组可见 AQP5 蛋白阳性表达多位于肺泡膜边缘部位,为棕色颗粒状,而模型组炎性细胞大量浸润,AQP5 蛋白表达较少,颜色普遍偏浅。见图 3。其炎症表现与光镜下病理改变类似。与正常组比较,各时间点模型组小鼠肺组织 AQP5 阳性表达率均下降 ($P < 0.05$);QJT 组、阿奇霉素组与模型组的阳性表达率



A. 正常组;B. 模型组;C. QJT 组;D. 阿奇霉素组(图 2 ~ 4 同)

图 1 QJT 对小鼠肺组织中 AQP5 蛋白的影响

Fig. 1 Effect of QJT on expression of AQP5 protein in lung tissues of mice infected with MP

从造模后第 7 天开始上升,并逐渐趋近于正常,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,QJT 干预后其阳性表达率升高明显 ($P < 0.05$),阿奇霉素组 AQP5 阳性表达率升高明显 ($P < 0.05$);与阿奇霉素组比较,QJT 组 AQP5 蛋白阳性表达率恢复迅速,第 14 天差异具有显著性 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 QJT 对 MP 感染小鼠肺组织中 AQP5 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of QJT on expression of AQP5 protein in lung tissues of mice infected with MP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
正常	-	0.57 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.57 ± 0.02
模型	-	0.43 ± 0.02 ¹⁾	0.39 ± 0.03 ¹⁾	0.35 ± 0.04 ¹⁾	0.37 ± 0.02 ¹⁾
QJT	15	0.80 ± 0.01 ^{2,3)}	0.79 ± 0.03 ²⁾	0.76 ± 0.03 ²⁾	0.73 ± 0.01 ²⁾
阿奇霉素	0.09	0.84 ± 0.03 ²⁾	0.82 ± 0.04 ²⁾	0.79 ± 0.04 ²⁾	0.76 ± 0.01 ²⁾

3.4 对 MP 感染小鼠肺指数、干湿比及病理评分的影响 MP 感染后,各时间点小鼠肺指数、肺组织炎

症病理评分均升高,于第 7 天达峰值,而后降低但始终高于正常组 ($P < 0.05$);小鼠肺组织干湿比于感

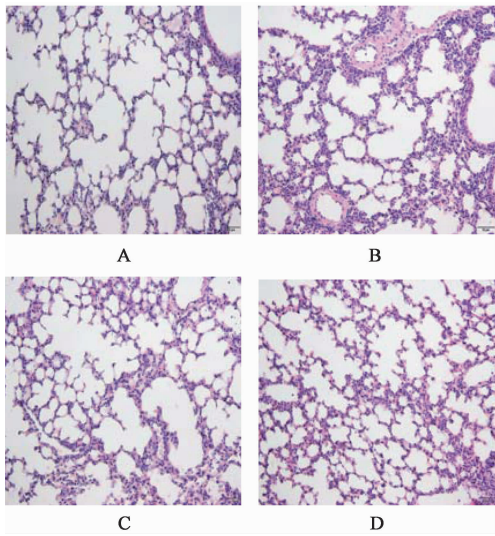


图 2 QJT 对 MP 感染小鼠肺组织结构改变的影响 (HE, ×400)
Fig.2 Effect of QJT on pathological changes of lung tissue under light microscope of mice infected with MP(HE, ×400)

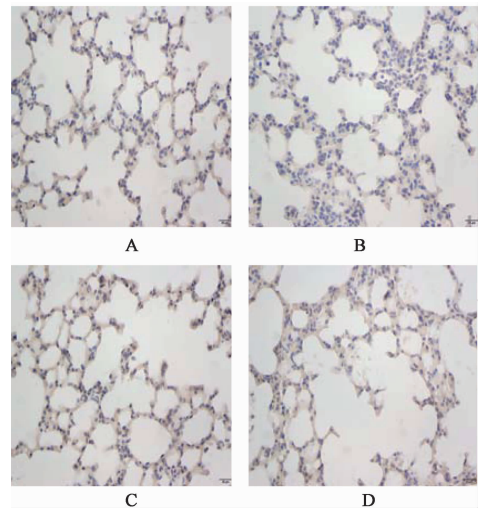


图 3 QJT 对 MP 感染小鼠肺组织 AQP5 免疫组化表达的影响 (免疫组化, ×400)
Fig.3 Effect of QJT on AQP5 expression of immunohistochemistry in lung tissues of mice infected with MP(IHC, ×400)

表 4 QJT 对 MP 感染小鼠肺组织 AQP5 阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天	%
正常	-	9.83 ± 0.82	9.83 ± 2.32	9.67 ± 2.16	9.50 ± 1.87	
模型	-	8.28 ± 0.72 ¹⁾	4.40 ± 0.04 ¹⁾	5.01 ± 0.18 ¹⁾	6.43 ± 0.09 ¹⁾	
QJT	15	8.14 ± 0.63	6.52 ± 0.02 ²⁾	8.69 ± 0.08 ²⁾	9.43 ± 0.12 ^{2,3)}	
阿奇霉素	0.09	8.15 ± 0.54	6.42 ± 0.04 ²⁾	8.54 ± 0.03 ²⁾	9.11 ± 0.09 ²⁾	

染后降低,第 7 天为最低值,之后增高但始终低于正常组 ($P < 0.05$);QJT 干预后,肺指数、肺组织病理评分降低,干湿比升高 ($P < 0.05$),效果于第 7 天最

为显著;经阿奇霉素治疗后小鼠各项指标均趋近于正常;QJT 组与阿奇霉素组比较差异无显著性。见表 5。

表 5 QJT 对 MP 感染小鼠肺指数、干湿比及病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	时间	肺指数/%	干湿比	病理评分/分
正常	-	第 3 天	0.53 ± 0.05	0.280 ± 0.007	-
		第 7 天	0.56 ± 0.06	0.275 ± 0.007	-
		第 10 天	0.55 ± 0.06	0.278 ± 0.009	-
		第 14 天	0.54 ± 0.03	0.278 ± 0.007	-
模型	-	第 3 天	0.87 ± 0.08 ¹⁾	0.222 ± 0.015 ¹⁾	7.83 ± 0.41
		第 7 天	0.95 ± 0.19 ¹⁾	0.215 ± 0.009 ¹⁾	14.83 ± 1.17
		第 10 天	0.92 ± 0.14 ¹⁾	0.236 ± 0.016 ¹⁾	8.17 ± 0.75
		第 14 天	0.85 ± 0.18 ¹⁾	0.237 ± 0.017 ¹⁾	13.67 ± 1.21
QJT	15	第 3 天	0.68 ± 0.03 ²⁾	0.239 ± 0.019 ²⁾	6.67 ± 0.82 ²⁾
		第 7 天	0.69 ± 0.05 ²⁾	0.278 ± 0.009 ²⁾	7.83 ± 0.75 ²⁾
		第 10 天	0.67 ± 0.09 ²⁾	0.276 ± 0.008 ²⁾	4.83 ± 0.75 ²⁾
		第 14 天	0.61 ± 0.05 ²⁾	0.278 ± 0.009 ²⁾	3.50 ± 1.05 ²⁾
阿奇霉素	0.09	第 3 天	0.66 ± 0.05 ²⁾	0.230 ± 0.020	6.71 ± 0.95 ²⁾
		第 7 天	0.68 ± 0.66 ²⁾	0.260 ± 0.022 ²⁾	7.57 ± 0.30 ²⁾
		第 10 天	0.63 ± 0.07 ²⁾	0.272 ± 0.018 ²⁾	5.14 ± 0.38 ²⁾
		第 14 天	0.59 ± 0.04 ²⁾	0.274 ± 0.017 ²⁾	4.33 ± 1.63 ²⁾

3.5 对 MP 感染小鼠肺超微结构的影响 正常小鼠 II 型肺泡上皮细胞结构完整,细胞膜表面微绒毛丰富,血管内皮细胞及基膜完整。MP 感染小鼠 II 型肺泡细胞微绒毛大量脱落,核染色质凝集成块状,板层小体增多,胶原纤维化增加,血管肿胀。QJT 治疗后,细胞游离面微绒毛存在,胶原纤维增多,但少于模型组,II 型肺泡上皮细胞形态较正常,细胞核形态正常,表面微绒毛较丰富,间质内见少量的胶原纤维。阿奇霉素干预后,II 型肺泡上皮细胞形态较正常,细胞膜表面少量微绒毛,核染色质凝集成块状与核周,板层小体增多,胶原纤维化增加较模型组少。见图 4。

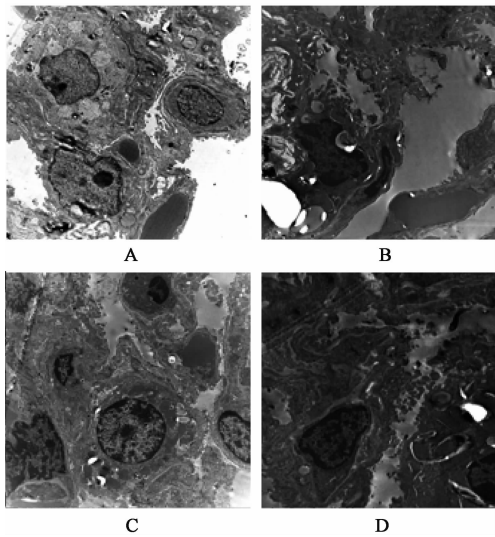


图 4 QJT 对 MP 感染小鼠肺超微结构的影响(电镜扫描,×8 000)
Fig. 4 Effect of QJT on pathological changes of lung tissue in mice infected with MP(SEM, ×8 000)

4 讨论

燥为秋令之主气。秋季阳明燥金主令,久晴少雨,天气肃敛,气候干燥,故易形成燥邪。肺为娇脏,不耐寒热燥湿诸邪;其位居上为华盖,与秋金之气相通,故燥邪最易先伤肺。肺主气,司呼吸,开窍于鼻,外合皮毛,故燥邪伤人,多从口鼻而入,耗伤肺津,影响肺的宣降功能。《黄帝内经·素问·玄机原病式》:“诸涩枯涸,干劲皴揭,皆属于燥”,故临床多表现为口鼻干燥,干咳少痰或黏稠难咳,呼吸不利。燥邪袭肺,肺失宣肃,导致体内气机不畅,津液生成、运输障碍,引起肺内水液平衡紊乱,肺部充血、水肿出现急性炎症表现,MP 感染后也会出现相似改变。MP 感染后可引起肺部急性炎症病变,干咳是其特征性症状,可出现在疾病的整个过程中,这与燥邪伤肺的特点相似。前期研究中发现 MP 感染类似于燥邪治

病,同时在临床实践中以“润燥”为法,从燥论治 MP 感染取得了较好的疗效^[11-12],研究发现 QJT 可以减轻 MP 感染后造成的肺部炎症表现及气道损伤^[6-7]。MP 一直被认为不能分泌细胞毒素,但 Kannan 等^[13]于 2006 年在实验中发现了 MP 相关致病因子 MPN372,因其结构与百日咳毒素的 S1 亚单位相类似,可引起哺乳动物细胞广泛的空泡样变性甚至死亡,引发与百日咳相似的临床症状,同时肺炎支原体肺炎患者血清中也检测到大量的 MPN372,这也证明 MPN372 可在人体内合成并具有强抗原表位。故 MP 感染时,除了直接黏附宿主细胞外,还利用 MPN372 袭击靶细胞,主要是通过 MPN372 可与 SP-A 结合的机制穿过宿主屏障并定植到具有 SP-A 受体的靶细胞(肺泡巨噬细胞、肺泡 II 型上皮细胞及其他肺内外组织细胞)导致肺内出现炎症样改变及气道损伤^[14]。恰如“燥性干涩,易伤津液”,燥邪侵袭人体影响津液的输布和代谢。水通道蛋白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,AQP5 是肺内水通道蛋白的一种,研究发现其表达影响肺泡间的水液运转,同时也是肺部病变的重要因子,感邪后 AQP5 失活导致肺内水液平衡紊乱,肺泡水肿形成^[15-16]。同样,SP-A 是肺表面活性物质的主要成分^[17],能够调节肺泡表面张力、维护肺泡稳定性、阻止肺泡毛细血管中液体向肺泡内渗入并使肺泡保持相对“干燥”的状态,研究发现 SP-A 除能加强免疫细胞活性外,其自身也具有杀菌作用。MP 感染减少了肺内 SP-A 分泌^[18],导致肺泡瘀血、水肿明显,肺泡毛细血管内皮水肿。

本研究发现,MP 感染后各时间点小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分均升高、干湿比降低,分别于第 7 天达最高值和最低值。小鼠肺组织中出现急性肺损伤及炎症改变,观察小鼠肺组织超微结构发现,II 型肺泡细胞微绒毛大量脱落,线粒体明显肿胀,肺泡间隔成纤维细胞增生明显,胞质内胶原纤维增多。同期检测到肺组织内 MPN372 mRNA 表达水平升高,于第 7 天最为显著,其后逐渐回落。AQP5 表达逐渐降低,于第 10 天出现谷值后有所回升,SP-A 基因表达于感染后出现降低,在第 7 天达到谷值。经 QJT 治疗后,与模型组比各时间点小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分均降低、干湿比升高,逐渐接近于正常。肺泡 II 型上皮细胞形态恢复正常,间质内见少量的胶原纤维。肺组织内 MPN372 mRNA 表达于第 3 天开始逐渐降低;AQP5 表达逐渐增加以第 10 天最为显著,SP-A 基因表达在感染后降低,于第 7 天

出现低谷之后逐渐上升并趋近于正常;QJT 组与阿奇霉素组于第 14 天在 SP-A 与 AQP5 表达上差异显著。本次实验结果表明,QJT 治疗 MP 感染时除可以减轻其炎症表现外,也可以改善肺内超微结构损伤、清除肺炎支原体毒素,升高 AQP5 表达,增加肺表面活性物质含量。

《黄帝内经·素问·至真要大论》“燥者润之”,“润”乃治燥之大法,肺系居上为华盖,上连口鼻、外合皮毛,故外邪侵袭,首先犯肺。《难经·第十四难》:“损其肺者益其气”,肺气受损,治节失权,肺失宣降,气机自凝,故燥邪犯肺,皆应补肺气、调宣降。土为金之母,子痛则母虚,用温补清润之品分补脾胃,可助肺气,诸症得愈。肺者,最易感受燥邪,“诸气膈郁,皆属于肺”,古之学者治气郁者皆欲用辛香走窜之品,然“气有余便是火”,过用辛香则更伤肺阴,故本方另辟蹊径,开以润治郁之先河,从其性、顺其意,通其宣降,诸症自愈。“诸痿喘呕,皆属于上”,痿者津不养筋也,肺失宣降,津液失布,燥象乃生,故治燥须用甘寒濡润之品合辛凉之品,宣通行散,畅通郁滞滋阴以达润燥。宣郁佐以滋阴润燥之品,防止伤阴耗液之弊,滋阴佐以芳香辛凉之品,防止滋腻。此为“润燥”是也。QJT 为治诸气膈郁、诸痿喘呕皆属于肺之燥者第一方,其配伍具有“清宣”、“降润”之意,祛邪扶正共施而奏其效。方以经霜之桑叶为君,得金气而柔润不调、散燥邪而肺气得畅。“热者寒之”,臣以甘寒之石膏肃清肺热,量轻而不碍桑叶之轻宣;“燥者润之”臣以甘寒之麦冬润燥生津,量半而不防主君之外散;苦杏仁、枇杷叶肃降肺气能令气升降自调。阿胶养阴润肺而使肺治节有权;肺与大肠相表里,苦杏仁、亚麻子肃肺润肠而调肺阴;金乃中土之化生,人参、甘草培土生金而补肺气,诸药共奏清、润之功,以达“润燥”之效,可谓之“培土生金补肺气,甘缓凉润滋肺阴”。QJT 能清燥润肺、养阴益气,具有抗 MP 感染的作用,其“润燥”作用的机制可能与减轻肺部炎症、降低 MPN372 含量、增加肺组织中 AQP5 和 SP-A 含量以调节水液平衡有关。

[参考文献]

[1] 谢斌,谢雄,余功,等.清燥救肺汤对结肠癌侵袭转移相关蛋白 NF- κ B, VEGF, VEGFR-1, MMP-9 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):110-114.
[2] 谢斌,谢雄,朱卫丰,等.清燥救肺汤对结肠癌增殖侵袭相关蛋白 c-Myc, EGF, ICAM-1, MMP2, TGF- α 表达的影响[J].广州中医药大学学报,2017,34(1):86-90.

[3] 王元耕,刘明慧,李宪东,等.清燥救肺汤对被动吸烟小鼠呼吸系统的保护作用[J].山东中医药大学学报,2015,39(4):365-367.
[4] 张俊杰.清燥救肺汤应用于胸外术后预防肺部并发症疗效观察[J].陕西中医,2017,38(8):1010-1011.
[5] 王红玉.加减清燥救肺汤治疗阴虚燥热型慢性咳嗽 46 例[J].河南中医,2015,35(4):823-824.
[6] 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(1):1-4,97.
[7] 张磊,陈杰,骆伟,等.清燥救肺汤加减联合西药治疗对反复呼吸道感染患儿血清免疫球蛋白及症状积分的影响[J].四川中医,2017,35(6):78-81.
[8] 郭东星,胡文娟,李丹,等.荧光定量聚合酶链反应检测肺炎支原体方法的建立[J].传染病信息,2016,29(1):52-56.
[9] 时令,王友亮,程莹,等.表面活性蛋白 A 启动子指导 Cre 重组酶在转基因小鼠 II 型肺上皮细胞中表达[J].生物技术通讯,2005,16(5):482-484.
[10] 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(9):1338-1340.
[11] 吴振起,刘光华,王子.从燥论治儿童肺炎支原体肺炎临床经验[J].中国中西医结合儿科学,2012,4(6):508-510.
[12] 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.
[13] Kannan T R, Baseman J B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(17):6724-6729.
[14] 丁建中,倪圣,张六通,等.桑杏汤对温燥模型小鼠肺呼吸膜超微结构、表面活性物质及炎症细胞因子的影响[J].中医杂志,2016,57(12):1057-1060.
[15] 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.
[16] 周建龙,邓青南,郭振辉.清气化痰汤对急性肺损伤小鼠水通道蛋白 5 表达的影响[J].中华中医药学刊,2011,29(6):1303-1305.
[17] Kim J H, Cho T S, Moon J H, et al. Serial changes in serum eosino-phil-associated mediators between atopic and non-atopic children after Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2014, 6(5):428-433.
[18] 黄霞,赵德育,王全,等.肺炎支原体肺炎与肺表面活性物质相关蛋白 A 的相关性研究[J].南京医科大学学报:自然科学版,2017,37(6):719-722.

[责任编辑 周冰冰]