

桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠肺组织 SP-A 的影响

隋美娇¹, 姚琳^{1,2}, 隋文霞², 王伟明^{1*}

(1. 黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**通过研究桔梗总皂苷对肺炎支原体(MP)感染大鼠肺部组织中肺表面活性蛋白 A(SP-A)表达的影响,探讨其对肺炎支原体感染大鼠肺部组织可能的修复机制。**方法:**60只Wistar大鼠,雌雄各半,体重80~100g,随机分为6组,每组10只。分别为空白组、模型组、阳性药(阿奇霉素)组(第1天为45 mg·kg⁻¹,第2~5天为22.5 mg·kg⁻¹)、桔梗总皂苷高、中、低(56,28,14 mg·kg⁻¹)剂量组。采用肺炎支原体滴鼻法造模1次。造模后第2天开始ig给药,阿奇霉素给药5d,桔梗总皂苷给药10d后采集大鼠左肺及右肺组织中叶,常规HE染色,显微镜下观察肺组织病理改变,逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)检测肺组织中SP-A mRNA的表达水平,采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析。**结果:**病理结果显示:模型组与空白组比较,肺组织可见明显的肺间质炎症($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药组、桔梗总皂苷高、中、低剂量组的肺组织炎症较模型组明显减轻($P < 0.05$);肺组织中SP-A mRNA的表达水平显示:与空白组比较,模型组的肺组织SP-A mRNA表达明显下调($P < 0.01$),与模型组比较,阳性药组、桔梗总皂苷高、中剂量组SP-A mRNA表达上调($P < 0.05$)桔梗总皂苷低剂量组无显著差异。**结论:**桔梗总皂苷能够改善MP感染大鼠肺部组织的炎症,且对肺部的修复作用可能是通过上调SP-A表达实现的。

[关键词] 桔梗总皂苷;肺炎支原体;肺表面活性蛋白A

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0156-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090156

Effect of *Platycodon grandiflorum* Total Saponins on SP-A Expression in Lung Tissue of Rats Infected by *Mycoplasmal pneumonia* SUI Mei-jiao¹, YAO Lin^{1,2}, SUI Wen-xia², WANG Wei-ming^{1*} (1. Heilongjiang Academy of Sciences of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the lung tissue infected by mycoplasma repair mechanism by investigating the influence of *Platycodon grandiflorum* total saponins on pulmonary surfactant protein A (SP-A) express in lung tissue of rats infected by mycoplasma. **Method:** Sixty Wistar rat with half males and half females were divided randomly into 6 groups, blank group, model group, positive (azithromycin) group (45 mg·kg⁻¹ (first day), 22.5 mg·kg⁻¹ (the next day to the fifth day), the high (56 mg·kg⁻¹), middle (28 mg·kg⁻¹) and low (14 mg·kg⁻¹) dose group of *P. grandiflorum* total saponins. the model was established with the method of nasal intubation drop of *Mycoplasmal pneumonia* (MP). The second day after modeling, azithromycin is given for 5 d, *P. grandiflorum* total saponins is given for 10 d. the lung tissue was collected after 10 days to observe the inflammation of lung tissue by HE staining and to detection of the SP-A mRNA expression level in lung tissue. Using SPSS 17.0 software to analysis data. **Result:** The pathological results showed that compared with blank group, the interstitial pneumonia of model group was obvious ($P < 0.01$). Compared with model group, the inflammation of lung tissue of positive medicine group, the high, middle and low dose group of *P. grandiflorum* total saponins significantly decreased ($P < 0.05$). The SP-A mRNA expression level in lung tissue showed that compared with blank group, the SP-A mRNA expression of model group significantly lowered ($P < 0.01$). Compared with model group, the SP-A mRNA expression of positive medicine group, the high and middle dose group of *P. grandiflorum* total saponins obviously up-regulated ($P < 0.05$), the SP-A mRNA expression of the low

[收稿日期] 20141028(004)

[基金项目] 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(2012RFQYS041)

[第一作者] 隋美娇,在读硕士,从事中药制剂及新药研究工作,Tel:15104532170,E-mail:suimeijiao880302@163.com

[通讯作者] *王伟明,博士,研究员,从事中药新药开发,Tel:0451-55665478,E-mail:342201601@qq.com

dose group of *P. grandiflorum* total saponins had no significant difference. **Conclusion:** *P. grandiflorum* total saponins can improve the lung tissue infected by mycoplasma, and the improving effect of lung function could be realized by raising SP-A expression.

[**Key words**] *Platycodon grandiflorum* total saponins; *Mycoplasma pneumoniae*; SP-A

肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 是维持肺泡功能的主要物质,其主要成分为磷脂 (90%) 和 PS 特有的肺表面活性物质结合蛋白 (pulmonary surfactant associated proteins, SP)。肺表面活性蛋白 A (surfactant protein A, SP-A) 为肺表面活性蛋白 (surfactant protein, SP) 中最早发现及含量最丰富者,是肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 中最重要的蛋白成分,它能降低肺泡的液-气界面表面张力,防止肺泡在低肺容量时塌陷,对维持肺的正常功能至关重要^[1-2],在 PS 结构、功能的维持及代谢,肺的免疫防御及炎症反应等方面有重要作用^[3]。近年来,人们已经认识到 SP-A 的含量的变化已经在很多肺部损伤或疾病中被发现,因此有关 SP-A 的研究已逐渐受到重视。

桔梗为桔梗科桔梗属植物 *Platycodon grandiflorum* 的干燥根,具有宣肺,利咽,祛痰,排脓的功效^[4]。现代药理学研究表明,桔梗具有抗炎镇痛、祛痰镇咳、抗肿瘤、免疫调节等广泛的药理作用^[5-6]。近年研究表明,桔梗总皂苷具有较强的抗体外肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 作用,最小抑菌浓度 (MIC) 值为 16 ~ 64 mg·L⁻¹^[7]。因此,本文以桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠模型进行治疗,通过观察肺组织病理改变,研究桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠的肺的治疗作用,并运用逆转录聚合酶链反应法 (RT-PCR) 检测肺组织中 SP-A mRNA 的表达水平,探讨其对肺炎支原体感染大鼠肺部修复作用的机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 60 只,体重 80 ~ 100 g,雌雄各半,长春亿斯实验动物技术有限公司提供,SPF 级,合格证号 SCXK(吉)2011-0004。

1.2 试剂与试药 TRIzol 试剂 (美国 Ambion, 批号 66211), Transcriptor first strand cDNA Synthesis Kit (Roche 公司, 批号 1485422), FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 公司, 批号 10277200), SP-A 引物 (批号 G84462), beta-actin 引物 (批号 G84464), 均为哈尔滨博仕生物技术有限公司。桔梗 (安国市奉义中药饮片有限公司, 批号 20130122, 经黑龙江省中医药科学院王伟明研究员

鉴定符合 2010 年版《中国药典》一部有关规定), 桔梗总皂苷纯度为 84.83%; 阿奇霉素胶囊 (北京四环制药有限公司, 批号 30130603)。试药均在给药前研磨成粉, 溶解, 涡旋混匀。

1.3 仪器 MDF-382E 型 -80 °C 低温冰箱 (日本三洋公司), Milli-Q Reference System 型自动双重纯水蒸馏器 (MILLI-Q), Sorva II ST16 型低温离心机 (Thermo 公司), DP72 型显微镜 (Olympus 公司), Infinite M200 Pro 型酶标仪 (Tecan 公司), 9600 型荧光定量 PCR 仪 (杭州博日有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 60 只 80 ~ 100 g 大鼠, 雌雄各半, 随机分为 6 组, 每组 10 只。分别为空白组、模型组、阳性药组、桔梗总皂苷高、中、低剂量组。

2.2 造模、给药及标本采集 饲养 1 周后, 大鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉, 除空白组外, 将含 10⁶ CCU/mL MP 培养液 50 μL 缓缓滴入鼻孔内, 空白组滴入等量不含 MP 培养液。感染后第 2 天开始 ig 给药, 每日 1 次, 空白组和模型组 ig 等容积生理盐水, 阳性药组 ig 阿奇霉素 (第 1 天为 45 mg·kg⁻¹, 第 2 ~ 5 天为 22.5 mg·kg⁻¹), 连续给药 5 d, 桔梗总皂苷高、中、低 (56, 28, 14 mg·kg⁻¹, ig) 剂量组, 每日 1 次。造模第 11 天给药后 1 h, 1% 戊巴比妥钠麻醉, 剪取左肺组织 4% 甲醛固定, 用于病理组织学观察; 剪取右肺组织中叶, 放入装有保存液的无 RNA 酶的微量离心管中, 放入液氮罐内; -80 °C 保存, 用于 PCR 检测。

2.3 指标检测

2.3.1 对肺组织病理变化的影响 取甲醛固定的肺组织, 用乙醇梯度脱水, 二甲苯中透明 2 次, 放入石蜡内进行包埋。蜡块修好后固定于石蜡切片机上切片, 将完全展开的蜡片贴附于清洁载玻片上, 常规 HE 染色, 显微镜下观察肺组织病理改变。

组织病理学评分: 来自于动物的左肺的组织全部被检玻片均随机化检测。评分系统由 1 个 0 ~ 26 分范围的可数评分组成, 每张切片, 5 个分类评价系统由管腔周围浸润而致的细支气管和支气管的数目、管腔周围浸润的程度、管腔内渗出的严重度、血管周围浸润的频度、实质性肺炎的严重度合并后记分, 每张切片选择 5 个视野评分。

组织病理学评分系统^[8]: A. 细支气管周围/支气管浸润(部位的比例) 0 = 无, 1 = 少许 (< 25%), 2 = 许多 (25% ~ 75%), 3 = 所有 (> 75%)。B. 细支气管/支气管周围浸润的定性 0 = 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; 1 = 轻度不正常, 常常伴有间断的环; 2 = 中度, 完整的环或新月形的环, 伴有 < 5 个细胞的厚度; 3 = 严重, 完全的环, 伴有 5 ~ 10 个细胞厚度。C. 细支气管/支气管腔渗出: 0 = 无; 1 = 轻度, $\leq 25\%$ 腔闭合; 2 = 重度, $\geq 25\%$ 腔闭合。D. 血管周围浸润, (部位的百分率): 0 = 无; 1 = 少 (< 10%); 2 = 许多 (20% ~ 50%); 3 = 大多数 (> 50%)。E. 实质性肺炎: 0 = 无; 1 = 轻度, 斑状实质性浸润; 2 = 重度, 斑和融合的实质性浸润。分数的计算 = A + 3(B + C) + D + E = 0 ~ 26 分。

2.3.2 肺组织 SP-A mRNA 表达检测 提取 RNA, 用酶标仪对 RNA 纯度及浓度进行测定, 根据 RNA 浓度调整总 RNA 的体积, 使各样品逆转录体系所含的 RNA 量相同, 将 RNA 逆转录为 cDNA, 以逆转录合成的 cDNA 为模板, 进行聚合酶链反应, PCR 反应引物如下: SP-A 正向引物 5'-TAAGTGCTGCCC-TCTGACCT-3', 反相引物 5'-AGGAGCCATAC-ATGCCAAAC-3'; β -actin 正向引物 5'-CGTTGACA-TCCGTAAGAC-3', 反向引物 5'-TGGAGGTGGA-CAGTGAG-3'。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 复性 60 s, 共 40 个循环。

2.4 数据分析及处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

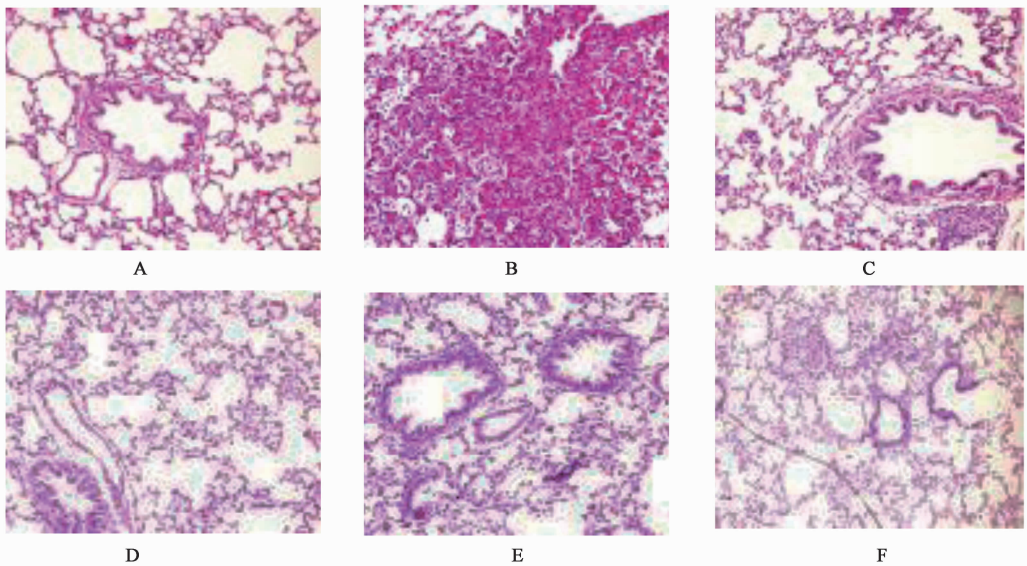
3.1 对肺炎支原体感染大鼠肺组织病理变化的影响 与空白组比较, 模型组可见明显炎症 ($P < 0.01$), 炎症反应包括气管支气管周围的炎性细胞浸润, 气管支气管管腔内的炎性细胞渗出, 偶有充血, 血管周围的炎性细胞浸润和间质性肺炎, 以上均不同程度的存在。与模型组比较, 阳性药组、桔梗总皂苷高、中、低剂量组的肺组织炎症较模型组明显减轻 ($P < 0.05$)。由此可见, 桔梗总皂苷能够改善 MP 感染大鼠肺部组织的炎症, 见表 1, 图 1。

表 1 肺组织的组织学评分 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Histological score of lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	组织学评分 /分
空白	-	0.8 ± 0.8 ²⁾
模型	-	17.8 ± 1.3
阿奇霉素	22.5 ³⁾	5.6 ± 1.5 ¹⁾
桔梗总皂苷	56	5.8 ± 1.3 ²⁾
	28	9.2 ± 1.3 ²⁾
	14	14.4 ± 1.1 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$. ³⁾ 首日剂量(表 2 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 阿奇霉素 45 mg·kg⁻¹ (第 1 天), 22.5 mg·kg⁻¹ (第 2 ~ 5 天) 组; D. 桔梗总皂苷 56 mg·kg⁻¹ 组; E. 桔梗总皂苷 28 mg·kg⁻¹ 组; F. 桔梗总皂苷 14 mg·kg⁻¹ 组

图 1 桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠肺组织病变的影响 (HE, ×20)

Fig.1 Effect of *P. grandiflorum* total saponins on pulmonary pathological changes in lung tissue of rats infected by *M. pneumoniae*

3.2 桔梗总皂苷对肺炎支原体感染大鼠肺组织中 SP-A mRNA 表达的影响 SP-A mRNA 的表达以 SP-A mRNA 与 β -actin mRNA 表达量的比值表示,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行统计,模型组的 SP-A mRNA 表达与空白组比较明显下降 ($P < 0.01$),与模型组比较,阳性药组、桔梗总皂苷高、中剂量组 SP-A mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05$),桔梗总皂苷低剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。说明桔梗总皂苷对 MP 感染大鼠肺组织的 SP-A mRNA 表达起到上调作用,见表 2。

表 2 肺组织中 SP-A mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 SP-A mRNA expression level in lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/mg·kg ⁻¹	SP-A/ β -actin
空白	-	0.980 ± 0.029 ²⁾
模型	-	0.263 ± 0.005
阿奇霉素	22.5 ³⁾	0.560 ± 0.077 ¹⁾
桔梗总皂苷	56	0.765 ± 0.016 ¹⁾
	28	0.440 ± 0.037 ¹⁾
	14	0.332 ± 0.049

4 讨论

肺炎支原体肺炎(MPP)是由 MP 引起的肺部炎症,是一种常见的儿童获得性肺炎。感染 MP 时,肺泡 II 型上皮细胞结构被破坏^[9]。肺泡 II 型上皮细胞(alveolar epithelial cell type II, AEC-II)是肺泡上皮的干细胞,是合成和分泌肺泡表面活性物质及其相关蛋白的主要细胞,AEC-II 损伤后,可诱导上皮通透性增加,降低 SP-A 的合成和分泌^[10]。本实验结果显示大鼠感染肺炎支原体时,SP-A 表达减少,证明 MPP 后肺泡 II 型上皮细胞结构被破坏,肺表面活性物质中 SP-A 分泌降低,从而加速肺泡表面活性物质磷脂水解,导致肺泡表面张力增加,肺泡萎陷,最终导致大鼠肺部损伤。

目前临床上对于 MP 感染的治疗主要应用大环内酯类抗生素,往往只注重了抗菌却忽视了肺组织的修复,并且该类抗生素不良反应大、副作用强,在杀灭支原体的同时也对患者的机体造成一定的

损伤。本实验结果表明桔梗总皂苷能够明显减轻肺炎支原体所致的肺损伤程度和炎症反应,上调肺组织 SP-A 表达,提示桔梗总皂苷对 MPP 的作用机制可能是通过增加 SP-A 的分泌和表达实现的。对 SP-A 的调节作用机制是通过何种途径表达的尚不清楚,还有待更进一步的研究。

[参考文献]

[1] Janssen W J, McPhillips K A, Dickinson M G, et al. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(2): 158-167.

[2] Whitsett J A, Wert S E, Weaver T E. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease[J]. Annu Rev Med, 2010, 61:105-119.

[3] Kavita R, Jeanne M. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond [J]. FASEB J, 2001, 15(1): 59-69.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:259.

[5] 付文卫, 窦德强, 裴月湖. 桔梗的化学成分和生物活性进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(3): 184-190.

[6] 金在久. 桔梗的化学成分及药理和临床研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(2):506-509.

[7] 张俊威, 姚琳, 蒙艳丽, 等. 桔梗总皂苷体外抗肺炎支原体作用实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(4):868-870.

[8] 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.

[9] 徐雪峰. 肺炎支原体感染对人肺上皮细胞蛋白表达的影响[D]. 杭州:浙江大学, 2007.

[10] Ahmad I M, Britigan B E, Abdaila M Y. Oxidation of thiols and modification of redox-sensitive signaling in human lung epithelial cells exposed to Pseudomonas pyocyanin[J]. Toxicol Environ Health A, 2011, 74(1):43-51.

[责任编辑 聂淑琴]