

• 实验研究 •

芩百清肺浓缩丸对支原体肺炎小鼠肺组织上皮间质转化的影响

蒙艳丽, 姜焱[#], 雷敏瑞, 王晓溪, 王萍, 王欣, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要: **目的** 探讨芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺上皮间质转化的影响。**方法** 将 Balb/c 小鼠随机分为对照组、模型组、阿奇霉素 (0.03 g/kg) 组及芩百清肺浓缩丸高、中、低剂量 (4.6、2.3、1.15 g/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠进行支原体滴鼻, 每只滴入 20 μ L 1×10^7 CCU 肺炎支原体菌液, 建立肺炎支原体感染模型。支原体肺炎模型建立成功后各组分别 ig 给予小鼠相应药物, 连续 ig 14 d。实验结束后取出小鼠肺组织, 显微镜下观察各组小鼠肺组织苏木精-伊红 (HE) 染色、Masson 染色以及免疫组化的肺组织变化。RT-PCR 法检测各组小鼠肺组织 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 和波形蛋白 (Vimentin) mRNA 表达量。**结果** 与模型组相比, 芩百清肺浓缩丸组小鼠肺组织结构明显得到改善, 结构清晰, 组织形态规整。与模型组比较, 芩百清肺浓缩丸组小鼠肺组织 E-cadherin mRNA 及蛋白表达增高; TGF- $\beta 1$ 、Vimentin mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 芩百清肺浓缩丸能够降低肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、Vimentin 的表达, 增加 E-cadherin 的表达, 从而抑制上皮间质转化。

关键词: 芩百清肺浓缩丸; 肺炎支原体肺炎; E-钙黏蛋白; 转化生长因子- $\beta 1$; 波形蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)03-0493-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.001

Effect of Qinbai Qingfei Concentrated Pills on epithelial interstitial transformation of lung tissue in mice with mycoplasma pneumonia

MENG Yan-li, JIANG Yan, LEI Min-rui, WANG Xiao-xi, WANG Ping, WANG Xin, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Qinbai Qingfei Concentrated Pills on pulmonary epithelial interstitial transformation in mice with mycoplasma pneumoniae pneumonia. **Methods** Balb/c mice were randomly divided into control group, model group, azithromycin (0.03 g/kg) group and Qinbai Qingfei Concentrated Pills high, medium, and low-dose (4.6, 2.3, 1.15 g/kg) groups, with 10 mice in each group. Except the control group, mice in other groups received mycoplasma nasal drops, each of which was injected with 20 μ L 1×10^7 CCU mycoplasma pneumoniae solution to establish mycoplasma pneumoniae infection model. After the successful establishment of mycoplasma pneumonia model, mice in each group were given corresponding drugs intragastrically and intragastrically for 14 d. At the end of the experiment, the lung tissues of mice were taken out, and the changes of the lung tissues with hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were observed under the microscope. After the experiment, the lung tissues of mice were taken out, and the changes of hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining, and immunohistochemical lung tissue were observed under the microscope. The mRNA expressions of E-cadherin, TGF- $\beta 1$, and Vimentin in lung tissues of mice in each group were detected by Real-time PCR. **Results** Compared with model group, the lung tissue structure of mice in Qinbai Qingfei Concentrated Pills group was obviously improved, with clear structure and regular morphology. Compared with model group, mRNA and protein expression of E-cadherin in lung tissue of mice in Qinbai Qingfei Concentrated Pills group were increased. The mRNA and protein expressions of TGF- $\beta 1$ and Vimentin were significantly decreased ($P < 0.05$). Qinbaiqingfei concentrated pills can decrease the expression of TGF- $\beta 1$ and Vimentin, and increase the expression of E-cadherin in lung tissue, so as to inhibit the epithelial

收稿日期: 2022-11-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82174060); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2021H074); 黑龙江省卫生健康委科研课题 (20210202040011)

作者简介: 蒙艳丽, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为新药研发。E-mail: mengyanli2021@126.com

*通信作者: 王伟明 E-mail: wangweiming475@yahoo.com

#共同第一作者: 姜焱, 男, 硕士, 中药学专业。E-mail: 1102479353@qq.com

mesenchymal transformation. **Conclusion** Qinbai Qingfei Concentrated Pills can decrease the expression of TGF- β 1 and Vimentin, and increase the expression of E-cadherin in lung tissue, so as to inhibit the epithelial mesenchymal transformation.

Key words: Qinbai Qingfei Concentrated Pills; mycoplasma pneumonia; E-cadherin; TGF- β 1; Vimentin

肺炎支原体肺炎多发生在 1~6 岁儿童身上, 约占肺炎总数的 1/3, 因儿童免疫力低, 所以会容易引起混合感染。肺炎支原体肺炎是间质性肺炎, 是以肺炎支原体引起的以肺间质纤维沉积为主要病理改变的呼吸道感染性肺炎^[1]。肺纤维沉积是正常肺组织不断被成纤维细胞或胶原组织取代的病理过程^[2-3]。随着病程的延长, 过度沉积的胶原蛋白将会使肺组织变厚、肺泡的通气量下降, 最终导致器官功能障碍和衰竭。传统观点认为成纤维细胞来源于肺内固有的间充质细胞, 但新近研究表明肌成纤维细胞除了来源于肺内固有的间充质细胞外, 还能由支气管肺泡上皮细胞通过上皮-间质转变(EMT)而来^[4-5]。上皮生长因子(EGF)和转化生长因子- β (TGF- β)在 EMT 转变中起关键作用^[6]。上皮及间质标记物上皮细胞钙黏蛋白 E(E-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)是检测 EMT 指标。TGF- β 1 是研究最多的促纤维化因子之一, 在肺纤维化进程中起到了至关重要的作用^[7-8]。Vimentin 是成纤维细胞、内皮细胞和白细胞的主要成分之一, 当其表达过多时, 会促使上皮细胞转化为扁平而细长的间充质细胞, 从而促进细胞纤维化。

中医治疗肺炎支原体肺炎有较好的效果, 肺炎支原体肺炎在中医属于“肺痿”的范畴, 为肺脏的慢性虚损性疾病, 临床以咳吐浊唾涎沫为症状, 发病机制为肺脏虚损, 伤津耗气, 因肺燥津伤, 燥盛则干, 肺叶弱而不用则痿。本课题组在临床研究的基础上研制出芩百清肺浓缩丸, 用于治疗肺炎支原体肺炎, 是国家食品药品监督管理局批准的第 1 个用于临床观察明确治疗小儿支原体肺炎的中药^[9]。本研究利用支原体感染后的小鼠肺组织, 通过 RT-PCR、免疫组化、苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色等方法考察了 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin 表达量的变化, 进一步阐明了芩百清肺浓缩丸的作用机制, 并为中医药治疗肺纤维化提供了重要的参考依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠, 雌雄各半, 体质量(20 $\pm$ 2) g, 购买于哈尔滨医科大学实验动物学部, 生产许可证号 SCXK(黑)2019-001, 动物实验伦理批

号 SY3R-2021014。

1.2 药物与试剂

芩百清肺浓缩丸(批号 CXZS1000045)购自天合力药业有限公司。阿奇霉素分散片(批号 274150404)购自石药集团欧意药业有限公司。胎牛血清(批号 11011-8611)购自浙江天杭生物科技股份有限公司。兔超敏免疫组化试剂盒(批号 PV-9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒(批号 15322、17122)购自江苏康为世纪生物科技有限公司。肺炎支原体(批号 ATCC15531)购自美国 Type Culture Collection 公司。

1.3 主要仪器

Line Gene 9600 Real-Time PCR 仪(杭州博日科技有限公司); Infinite M200 PRO 酶标仪(奥地利 Tecan 公司); DP72 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 德国 Leica 3K-30Z 型高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司)。

2 方法

2.1 肺炎支原体肺炎模型的建立

小鼠自适应饲养 7 d 后随机分为对照组、模型组、阿奇霉素(0.03 g/kg)组及芩百清肺浓缩丸高、中、低剂量(4.6、2.3、1.15 g/kg)组, 每组 10 只。7 d 后对小鼠进行造模, 除对照组外, 其他各组小鼠用乙醚进行麻醉, 从鼻腔中滴入 20 μ L 1×10^7 CCU 肺炎支原体培养液, 连续 3 d^[1]。支原体肺炎模型成功后各组小鼠分别 ig 给予相应药物, 连续 ig 14 d。

2.2 小鼠肺组织病理学检测

实验结束后取出小鼠肺组织, 左肺组织用 4% 甲醛固定, 用于病理学检测, 显微镜下观察各组肺组织 HE 染色、Masson 染色的肺组织变化情况。

2.3 免疫组化方法检测各组肺组织 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin 的表达

将提前包埋好的右肺蜡块组织提前进行冷冻, 然后进行切片、制片。将切好的片子在二甲苯和不同浓度的乙醇进行脱蜡处理, 用 PBS 缓冲液进行冲洗, 然后将片子在装有柠檬酸的高压锅中进行抗原修复处理, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。H₂O₂ 阻断内源性过氧化氢酶, PBS 洗 3 次, 在湿盒中敷一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次, 滴加反应增强液, 室温放置 25

min, 之后用 PBS 冲洗 3 次, 滴加二抗, 湿盒内孵育 2 h, PBS 洗 3 次, DAB 染色, 再用滤过后的苏木素染色 90 s, 再用碳酸锂溶液染色进行返蓝, 然后用水冲洗片子, 用不同浓度梯度乙醇进行脱水, 在二甲苯中放置 5 min, 封片。电子显微镜 20 倍镜下观察组织 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin 表达。

2.4 免疫组织化学 (IHC) 评分标准

在电子显微镜下观察各组组织 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin 的染色情况, 每张切片分别在不同的位置选取 3 个视野, 以着色深浅程度及面积进行评分, 浅色为弱阳性为 1 分, 棕黄色为中等阳性为 2 分, 褐色为强阳性为 3 分; 着色细胞面积数在 25% 以下为 1 分, 在 25%~49% 为 2 分, 在 50% 以上为 3 分。最终以二者相乘的综合积分计量, 若 ≤ 3 为阴性, 若 ≥ 4 为阳性, 若 ≥ 6 为强阳性^[1]。

2.5 RT-PCR 法检测各组肺组织 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin mRNA 表达

取右肺组织, 用于提取 RNA, 然后用酶标仪测定各组 RNA 浓度。按照 one-step reverse transcription PCR kit 实验过程扩增并检测 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin mRNA 的表达。E-cadherin 正向引物: 5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3', 反向引物: 5'-CACAAACCAATCAACAACACA-3'; TGF- β 1 正向引物: 5'-AGAAACGAGCAGAGGATTGAGC-3', 反向引物: 5'-CTGAAAGTGTGGCAGGGACA-3'; Vimentin 正向引物: 5'-AATGGCTCGTCACC TTCG-3', 反向引物: 5'-CTAGTTTCAACCGTCTT

AATCAG-3'。将试剂加入联排微型 EPE 管中, 常温下 500 r/min 离心 60 s, 然后在 PCR 扩增仪进行扩增。37 °C、15 min 1 个循环; 95 °C、10 min 1 个循环; 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 72 °C、30 s, 40 个循环; 采样模式为单次。溶解曲线起始 72 °C, 恒温 10 s, 采样模式: 台阶, 目标 95 °C, 台阶温度 0.5 °C, 时间 129 min。

2.6 统计学方法

Gel-Pro 4.0 Software 分析结果, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用独立实验样本 t 检验比较组间数据。

3 结果

3.1 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织病理学影响

如图 1 所示, 对照组小鼠肺组织结构比较完整, 肺泡组织排列规则。模型组小鼠肺泡结构受损, 肺泡腔闭塞、肺泡壁塌陷使肺组织呈片状密度增高的硬性结构, 与正常肺组织有明显的分界, 有炎性细胞浸润。阿奇霉素及芩百清肺浓缩丸各剂量组肺组织结构相对清晰, 边缘清楚, 特别是芩百清肺浓缩丸 4.6 g/kg 组肺组织结构清晰, 仅少量的炎性细胞。

3.2 芩百清肺浓缩丸对支原体肺炎小鼠肺组织纤维沉积的影响

如图 2 所示, 对照组的肺组织无细状纤维沉积, 模型组肺组织有大量的纤维沉积, 在毛细血管和支气管壁周围也大量存在, 阿奇霉素及芩百清肺浓缩丸各剂量组的纤维沉积有明显的减少, 仅在很少部分能看到细丝状。

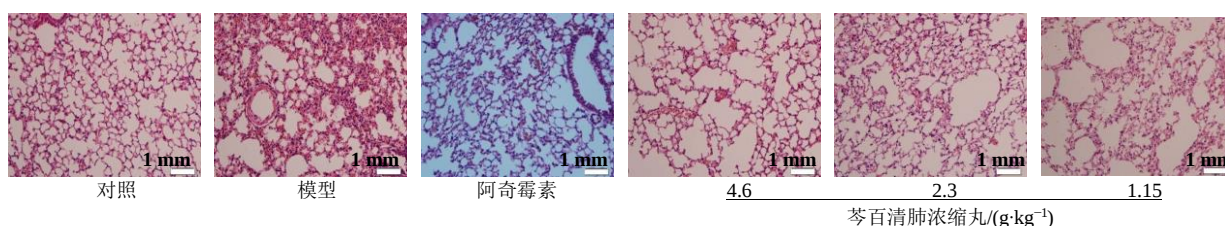


图 1 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织病理学的影响 (HE, $\times 20$)

Fig. 1 Effect of Qinbai Qingfei Concentrated Pills on lung histopathology of mice with mycoplasma pneumoniae pneumonia (HE, $\times 20$)

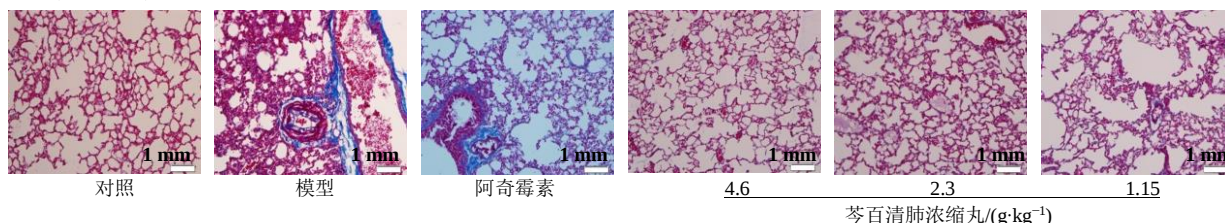


图 2 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织纤维沉积的影响 (Masson, $\times 20$)

Fig. 2 Effect of Qinbai Qingfei Concentrated Pills on pulmonary fiber deposition in mice with mycoplasma pneumoniae pneumonia (Masson, $\times 20$)

3.3 免疫组化法检测芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织中 E-cadherin、TGF- β 1、Vimentin 蛋白表达的影响

结果如图 3A 所示,模型组 E-cadherin 蛋白染色相对比较浅, IHC<3 分, 芩百清肺浓缩丸 4.6、2.3 g/kg 组颜色相对比较深, IHC 评分>3。统计学分析显示,与对照组比较,模型组 IHC 评分显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,阿奇霉素及芩百清肺浓缩丸 4.6、2.3 g/kg 组 IHC 评分显著增高 ($P<0.05$)。

结果如图 3B、C 所示,对照组和各给药组 TGF- β 1、Vimentin 蛋白表达均较低,其中芩百清肺浓缩丸 4.6g/kg 组 TGF- β 1 和 Vimentin 的 IHC 评分<3,结果为阴性。模型组染色相对较深, IHC 评分>6,为强阳性。统计分析结果显示,与对照组比较,模型组 TGF- β 1 和 Vimentin IHC 评分显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,阿奇霉素及芩百清肺浓缩丸 4.6、2.3 g/kg 组 TGF- β 1 IHC 评分显著降低,芩百清肺浓缩丸 4.6、2.3 g/kg 组 Vimentin IHC 评分显著降低 ($P<0.05$)。

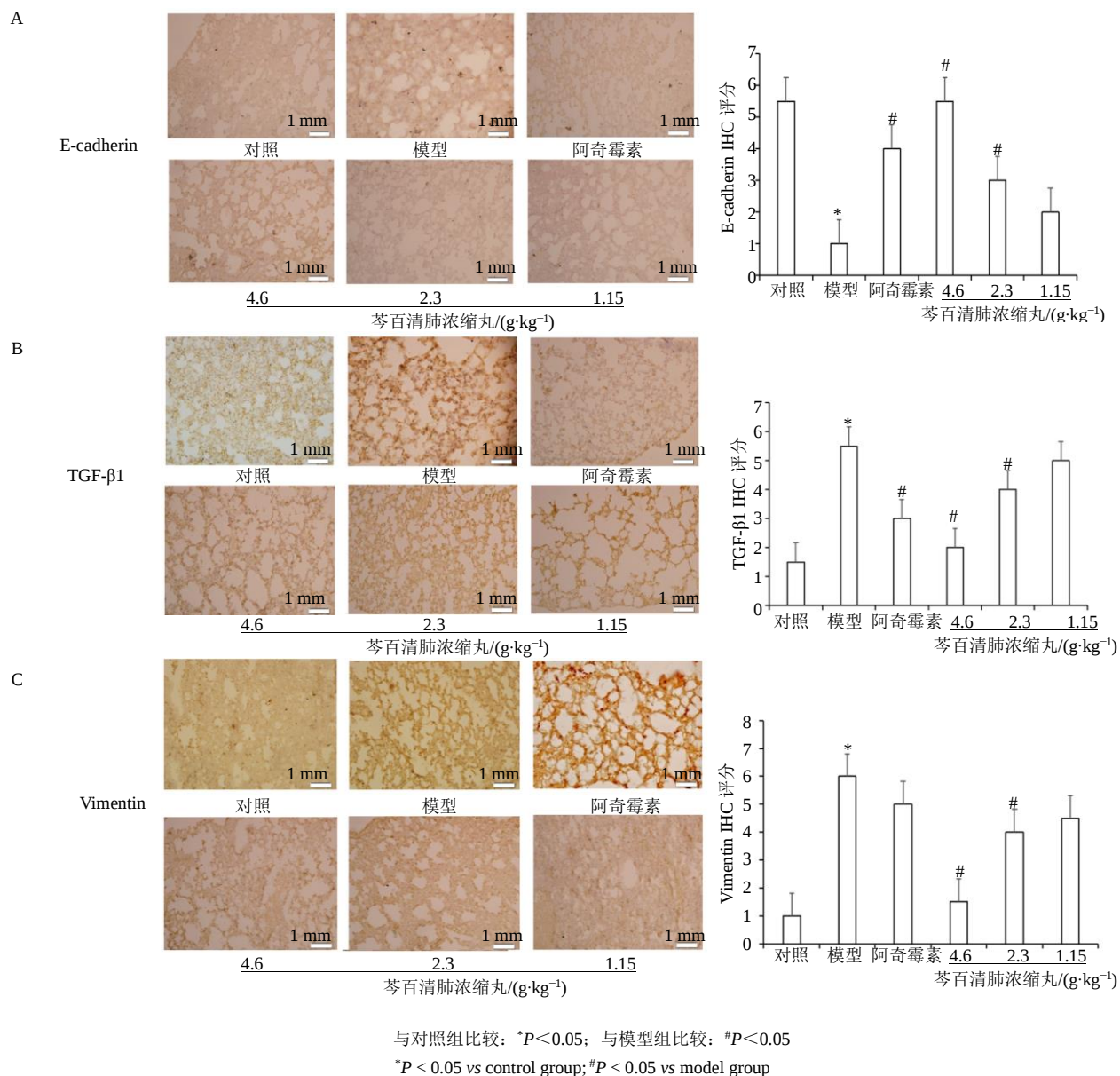


图 3 免疫组化检测芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织中 E-cadherin (A)、TGF- β 1 (B)、Vimentin (C) 蛋白表达的影响 ($\times 20$)

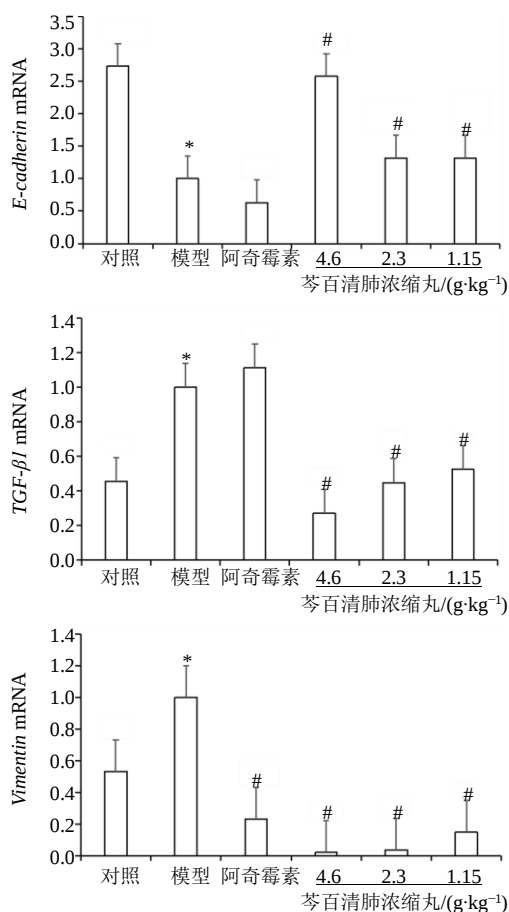
Fig. 3 Effect of Qinbai Qingfei Concentrated Pills on E-cadherin (A), TGF- β 1 (B), and Vimentin (C) protein expression in lung tissue of mice with mycoplasma pneumoniae pneumonia detected by immunohistochemistry ($\times 20$)

3.4 RT-PCR 检测芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织内 *E-cadherin*、*TGF-β1*、*Vimentin* mRNA 表达的影响

结果如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肺组织 *E-cadherin* mRNA 表达显著降低, *TGF-β1* mRNA 和 *Vimentin* mRNA 表达量显著增高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 芩百清肺浓缩丸各剂量组肺组织内 *E-cadherin* mRNA 表达均显著增加 ($P < 0.05$); 阿奇霉素组和芩百清肺浓缩丸各剂量组小鼠肺组织内 *TGF-β1*、*Vimentin* mRNA 表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

cadherin 为钙黏附蛋白, 一方面在细胞黏附中



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 4 RT-PCR 检测芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织内 *E-cadherin*、*TGF-β1*、*Vimentin* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 4 Effect of Qinqi Lung Concentrated Pills on expression of *E-cadherin*, *TGF-β1*, and *Vimentin* mRNA in lung tissues of mice with *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* detected by RT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

扮演着重要的角色, 另一方面对维持上皮细胞的表型也具有重要的作用。其细胞质可以与多种细胞骨架相连接, 在调控上皮细胞发育中起重要作用。进一步使细胞、器官以及组织间形成黏附连接^[10]。本研究中模型组 *E-cadherin* 的表达水平较对照组显著降低; 而与模型组比较, 在给予芩百清肺浓缩丸后小鼠肺组织中 *E-cadherin* 的表达水平显著升高。这说明芩百清肺浓缩丸可促进 *E-cadherin*、上皮增殖表达, 抑制上皮向间质转化。

Vimentin 为波形蛋白, 是成纤维细胞、内皮细胞和白细胞的主要成分之一, 通过细胞骨架、细胞外黏附以及膜张力之间的相互协调平衡共同维持细胞正常的形态与结构, 可以介导细胞内的信号传导^[10]。有研究表明, 当 *Vimentin* 的表达缺失时, 细胞会发生一定的化学改变, 成纤维细胞的增殖相对减少, *TGF-β1* 的分泌量也降低; 当 *Vimentin* 的表达过多时, 会促使上皮细胞转化为扁平而细长的间充质细胞, 从而促进细胞纤维化^[10]。本研究模型组 *Vimentin* 的表达水平较对照组升高, 而通过给予芩百清肺浓缩丸后小鼠肺组织中 *Vimentin* 的表达水平降低。通过实验数据推测, 芩百清肺浓缩丸可能通过抑制 *Vimentin* 的表达降低肺纤维化程度, 降低纤维素沉积。

TGF 分为 *TGF-α* 和 *TGF-β*, *TGF-α* 可诱导上皮细胞发育, *TGF-β* 可以与细胞表面丝氨酸、苏氨酸激酶受体结合, 研究显示, *TGF-β1* 信号能上调间质样标志物 α -SMA 的表达, 促使肺组织纤维化^[1]。本研究发现, 模型组的 *TGF-β1* 表达水平较对照组升高。而在给予芩百清肺浓缩丸后, 与模型组比较, 小鼠肺组织中 *TGF-β1* 的表达水平降低。由此可以推测芩百清肺浓缩丸可能通过抑制 *TGF-β1* 的表达降低肺纤维化的程度, 降低纤维素沉积。

综上所述, 芩百清肺浓缩丸抗纤维化机制可能与抑制 *TGF-β1*、*Vimentin* 表达, 促进 *E-cadherin* 的表达, 延缓上皮间质转化有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蒙艳丽, 徐慧星, 王晓溪, 等. 芩百清肺浓缩丸对肺炎支原体肺炎小鼠 β -catenin、 α -SMA 表达影响 [J]. 中药材, 2019, 42(7): 1635-1639.
- [2] Brown R J, Nguipodop-Djomo P, Zhao H, et al. *Mycoplasma pneumoniae* Epidemiology in England and Wales: A national perspective [J]. *Front Microbiol*, 2016,

- 7: 157.
- [3] 王斯楚, 孙一, 王晓溪, 等. 汉黄芩素对肺炎支原体肺炎小鼠肺组织中肺上皮间质形成因子表达的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 172-180.
- [4] Luo Q, Cai Z, Tu J, *et al.* Total flavonoids from *Smilax glabra* Roxb blocks epithelial-mesenchymal transition and inhibits renal interstitial fibrosis by targeting miR-21/PTEN signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3861-3873.
- [5] Chen S, Chen X, Li W, *et al.* Conversion of epithelial-to-mesenchymal transition to mesenchymal-to-epithelial transition is mediated by oxygen concentration in pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(4): 107.
- [6] 徐明杭, 蒙艳丽, 王晓溪, 等. 黄芩苷对肺纤维化小鼠组织中纤维化因子 TGF- β 1 及 mmp2, timp2 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5738-5744.
- [7] 王慧慧, 蒙艳丽, 杨志敏, 等. 地龙对肺纤维化小鼠肺组织中纤维化因子 TGF- β 1 及 α -SMA 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5473-5478.
- [8] Li L C, Kan L D. Traditional Chinese medicine for pulmonary fibrosis therapy: Progress and future prospects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 45-93.
- [9] 魏文峰, 刘焘, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析大鼠口服芩百清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1115-1122.
- [10] 曾仁凤. 辛伐他汀对纤维化大鼠肺组织 Snail1、E-钙粘素、波形蛋白表达的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2014.

[责任编辑 高源]