

清燥救肺汤及其拆方对肺炎支原体感染小鼠 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的影响

吴振起¹, 杨璐², 敏娜², 岳志军¹, 贾晓儒²

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032

2. 辽宁中医药大学研究生学院, 辽宁 沈阳 110847

摘要: 目的 探讨清燥救肺汤(QJD)及其拆方对肺炎支原体(MP)感染小鼠肺组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 凋亡蛋白表达的影响。方法 将 Balb/c 小鼠随机分成对照组、模型组、QJD 组、QJD 拆方 I 组、QJD 拆方 II 组、阿奇霉素组。除对照组小鼠外, 其余 5 组采用滴鼻法对实验 Balb/c 小鼠进行 MP 感染。透射电镜观察肺组织超微结构改变和细胞凋亡, 运用免疫组织化学 SP 法和 Western blotting 法检测肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达, 并采用 qRT-PCR 法检测 Caspase-3 mRNA 的表达。结果 MP 感染后, 小鼠肺组织出现炎症改变, 肺泡壁增厚、肺泡上皮细胞破坏、细胞浸润, 并发现凋亡的特征改变。MP 感染后的小鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达明显升高, 但是 Bcl-2/Bax 的值明显下降; 与模型组相比, QJD 组、QJD 拆方 I 组及阿奇霉素组的 Bcl-2 的表达升高, Bcl-2/Bax 的值也明显升高, Bax、Caspase-3 的表达下降; QJD 拆方 II 组与模型组比较各蛋白表达差异不明显。Caspase-3 mRNA 检测结果显示, QJD 组、QJD 拆方 I 组及阿奇霉素组表达较模型组降低, QJD 拆方 II 组的改变不明显。结论 QJD 能够抑制 MP 感染诱导的细胞凋亡, Bax、Bcl-2 可能为其效应靶点之一, 其中 QJD 拆方 I 起主要作用。

关键词: 清燥救肺汤; 肺炎支原体; 凋亡; Bax; Bcl-2; Caspase-3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0389-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.019

Effect of Qingzao Jiufei Decoction and its decomposing agent on MP infection Bax, Bcl-2, and Caspase-3

WU Zhen-qi¹, YANG Lu², MIN Na², YUE Zhi-jun¹, JIA Xiao-ru²

1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China

2. School of Graduate, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: Objective To explore the effect of Qingzao Jiufei Decoction (QJD) and its decomposing agent on the expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 apoptosis protein in MP infection, in order to determine the effect target of QJD and its decomposing agent. **Methods** A total of 120 balb/c mice were randomly divided into normal group (group A), model group (group B), QJD group (group C), QJD group I decomposition agent (Group D), QJD group II decomposition agent (Group E), and azithromycin group (Group F), 20 rats in each group. Except the normal group, the other five groups were infected with MP by using the nose drop method. The ultrastructure and apoptosis of lung tissue were observed by transmission electron microscope. The expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in lung tissue was detected by Immunohistochemical SP and Western blot method. The expression of Caspase-3 m-RNA was detected by qPCR method. **Results** After MP infection, inflammation changes can be observed in the lung tissue of mice, thickening of the alveolar wall, destruction of alveolar epithelial cells, cell infiltration, and changes in the characteristics of apoptosis. The expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein in the lung tissue of mice infected with MP was significantly increased, but the ratio of Bcl-2/Bax decreased significantly. Compared with the group B, the expression of Bcl-2 in group C, D, and F increased, the ratio of Bcl-2/Bax increased significantly, and the expression of Bax and Caspase-3 decreased. The difference of expression between group E and group B was not obvious. The results of Caspase3 mRNA detection showed that the expression of group C, group D and group F was lower than that of model group, and the change of group E was not obvious. **Conclusion** QJD can inhibit the cell apoptosis induced by MP infection, and Bax, Bcl-2 were one of its effect target, in which I decomposition agent plays a major role.

Key words: Qingzao Jiufei Decoction; mycoplasma pneumoniae; apoptosis; Bax; Bcl-2; Caspase-3

收稿日期: 2017-12-06

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)

作者简介: 吴振起(1974—), 男, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 以中医药防治感染性疾病为研究方向。

Tel: 18102456617 E-mail: zhenqiwu@163.com

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 是一种介于细菌和病毒之间、能够独立生存并能进行自我复制的原核微生物, 广泛分布于自然界, 主要经呼吸道飞沫传播, 可引起散发的呼吸道感染或小流感^[1]。MP 目前已经成为社区获得性肺炎的主要病原体, 并且肺炎支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP) 已经成为了儿童呼吸道感染疾病的高发病种。对于儿童 MPP 的治疗主要采用对生长发育危害较大的大环内酯类药物, 但是大环内酯类药物长期使用的过程中已出现胃肠道反应、血管刺激等副作用, 从而导致依从性较差。中医药治疗 MP 感染方面具有一定优势, 其中医整体观念和辨证论治针对性强, 中药方剂可以通过多路径、多靶点发挥作用, 从“燥”论治 MP 感染取得了较好的临床疗效^[2]。清燥救肺汤 (Qingzao Jiufei Decoction, QJD) 为润燥的经典名方, 源于清代医家喻昌所著的《医门法律》, 其组成为桑叶、石膏、人参、甘草、胡麻仁、阿胶、麦冬、杏仁、枇杷叶。根据方中药物的功效作用等特点, 将全方拆解具有“宣、清、降”作用的拆方 I 和具有“润、补”作用的拆方 II。细胞的死亡和更新是机体整个生命过程中不可或缺的环节, 可及时地清除机体内多余和受损的细胞^[3]。细胞凋亡, 又称细胞程序性死亡^[4], 是机体细胞死亡的重要途径, 其凋亡的过程是受机体严格调控的, 以维持这个生命过程的稳态。但是当凋亡调控失衡时, 可引起过度凋亡, 造成机体的损伤^[5]。本课题探究 Bax、Bcl-2、Caspase-3 凋亡蛋白的变化情况, 试图从凋亡蛋白的角度探讨“从燥论治”MP 感染机制, 明确 QJD 及其拆方的效应靶点。

1 材料

1.1 菌株

MP 标准株 FH 由辽宁中医药大学附属医院病毒室保存。将冻存的 MP 接种至液体培养基中, 并在 37 °C, 含 5% CO₂、饱和氮的厌氧培养箱中孵育, 培养液颜色由红变黄时进行连续传代, 取第 3 代。以培养基由红色变为黄色时的最高稀释度作为颜色改变单位 (colour change unite, CCU), 采用 CCU/mL 方法测定 MP 浓度, 取菌液浓度 1×10^7 CCU/mL 备用。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 体质量 (20±2) g, 雌雄各半, 购于辽宁长生生物技术有限公司 (辽宁省

实验动物资源中心), 生产合格证号 SCXK (辽) 2013-009, 使用合格证号 SYXK (辽) 2015-0001。

1.3 药物与主要试剂

QJD 组方药材由辽宁中医药大学附属医院门诊中草药局提供, 参照《中国药典》2015 年版标准, 由辽宁中医药大学中药分析教研室李峰教授鉴定, 均为正品。QJD 全方组成: 桑叶 90 g、石膏 36 g、人参 21 g、甘草 30 g、胡麻仁 30 g、阿胶 21 g、麦冬 36 g、杏仁 21 g、枇杷叶 30 g; QJD 拆方 I 组成: 杏仁 21 g、石膏 36 g、桑叶 90 g、枇杷叶 30 g; QJD 拆方 II 组成: 人参 21 g、阿胶 21 g、麦冬 36 g、甘草 30 g、胡麻仁 30 g。阿奇霉素分散片 (东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 批号 4170201)。兔免疫球蛋白 (IgG)-免疫组化试剂盒 (批号 12I08A)、兔抗小鼠 Bcl-2 多抗 (批号 196841)、兔抗小鼠 Bax 单抗 (批号 13CM400A)、兔抗小鼠 Caspase-3 单抗 (批号 ZP4126BP26)、DAB 显色试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒, 均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 主要仪器

ABI PRISM 7700XL DNA 测序仪 (ABI 公司); DU-600 蛋白-核酸分析仪 (美国 Beckman 公司); PE-9600PCR 仪 (美国 Perkin Elmer 公司); 倒置显微镜 (德国 Leica); LKB-V 超薄切片 (德国 Leica 公司); LCII 实时荧光定量 PCR 仪 (罗氏公司); HITACHI H-600 电子显微镜 (日本 HITACHI 公司); 低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司); 酶标仪 (Bio-mark 公司); AR2140 电子分析天平 (上海奥豪斯公司); EPS-300 电泳仪及天能凝胶分析系统 (上海天能科技有限公司); H-7650 型透射电镜 (日本株式会社)。

2 方法

2.1 供试药液的配制

QJD 全方、拆方 I、拆方 II 按组方比例称取适量药材, 石膏水煎浓缩, 阿胶烱化, 药液备用; 余药用 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。QJD 全方、拆方 I 与拆方 II 分别制成含生药 1.00、0.61、0.39 g/mL 混悬液。QJD 全方中含有苦杏仁苷、绿原酸和甘草酸铵 2.596、3.035、6.602 mg/g。阿奇霉素分散片配成 6 mg/mL 药液。

2.2 动物分组、造模及给药

将 144 只 Balb/c 小鼠随机分成对照组、模型组、

QJD 全方组、QJD 拆方 I 组、QJD 拆方 II 组、阿奇霉素组, 每组 24 只。除对照组外, 其余各组小鼠用乙醚轻度麻醉后, 用 1 mL 注射器缓慢向鼻腔中滴入 1×10^7 CCU/mL 的 MP 菌液, 每只 0.1 mL, 接种后持小鼠呈 45° 静置 30 s, 以利于 MP 菌液的充分吸入并防止小鼠窒息, 连续滴鼻 3 d, 对照组在同等条件下接种等量生理盐水。接种后观察记录各组小鼠的体质量、进食、大便、活动度等情况的变化。滴鼻 3 d 造模后开始给药, QJD 各组均 ig 给予相应的药液, QJD 全方组、QJD 拆方 I 组、QJD 拆方 II 组的剂量分别为 15、9.15、5.85 g/kg (相当于临床应用等效量), 每天 1 次, 连续 14 d; 阿奇霉素组 ig 给予阿奇霉素 0.09 g/kg, 每天 1 次, 连续 3 d, 停药 4 d, 2 个循环, 停药期间 ig 等量蒸馏水; 对照组和模型组 ig 等量蒸馏水, 每天 1 次, 连续 14 d。

2.3 样本采集

分别在给药第 3、7、10、14 天进行取材 (给药后禁食、禁水 4 h 后取材), 各组随机处死 6 只小鼠, 取出整个肺脏, 其中左肺用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μ m。右肺组织 -80°C 冻存。

2.4 肺组织超微结构观察

给药第 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 超薄切片机切片, 乙酸双氧铀、枸橼酸铅双层染色, 置 H-7650 型透射电镜下观察各组小鼠肺组织超微结构的变化。

2.5 免疫组织化学 SP 法检测肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达

取肺组织石蜡切片, 采用 SP 免疫组化法检测目的蛋白的表达, 分别滴加 Bcl-2、Bax、Caspase-3 一抗 (1:500、1:300、1:500), 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色。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, 测定平均吸光度值, 进行半定量分析。

2.6 qRT-PCR 法检测肺组织 Caspase-3 mRNA 的表达

Caspase-3 上游引物: 5'-GTGTCCATGCTCACGAAAGA-3'; 下游引物: 5'-CCAGGAGGACCGTCAGATTA-3', 产物长度 304 bp; 内参 GAPDH, 上游引物: 5'-ACCACCATGGAG-AAGGCTGG-3', 下游引物: 5'-CTCAGTGTAG-CCCAGGATGC-3', 扩增特异片段长度为 528 bp。所用引物由北京六合华大基因科技股份有限公司

合成。将各组小鼠肺组织取出, 制备细胞悬液, 用 Trizol 提取细胞总 RNA。分析 RNA 的纯度及完整性, 检测 RNA 质量合格后, 进行反转录, 以反转录产物为模板, 加入 Caspase-3 的引物, 进行 qRT-PCR 检测。

2.7 Western blotting 法检测肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达

称取肺组织提取总蛋白, BCA 试剂盒进行蛋白定量。取 25 μ g 样品, 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 Bcl-2、Bax、Caspase-3 一抗 (稀释倍数同 SP 法), 4°C 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。

2.8 统计分析

采用 SPSS 17.0 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, 时间点差异比较采用重复测量资料方差分析。

3 结果

3.1 小鼠肺组织超微结构的观察

电镜观察结果: 对照组肺泡壁完整, 游离面可见少量微绒毛, 胞质均匀, 核膜完整; 模型组细胞膜膨出, 异染色体凝聚在膜周边, 细胞核切迹清除, 肺泡 II 型上皮细胞突起膨大, 出现凋亡特征。与模型组比较, QJD 全方组肺泡 II 型上皮细胞形态较正常, 板层小体增多, 异染色体聚集成块, 表面微绒毛存在, 可见脱落, 间质内见少许的胶原纤维; QJD 拆方 I 组肺泡 II 型上皮细胞减少, 细胞核凸出, 核内异染色体聚集成粗块, 表面微绒毛存在, 血管肿胀, 可见间质胶原纤维堆积; QJD 拆方 II 组肺泡 II 型上皮细胞数量减少, 核规则, 核染色质凝集, 板层小体减少, 肺泡间隔狭窄, 少许细胞微绒毛存在, 可见大量的血管肿胀; 阿奇霉素组 II 型肺泡细胞增多, 核及核仁形态完整, 细胞内板层小体形态规整, 细胞游离面微绒毛较丰富, 间质内见胶原纤维。结果见图 1。

3.2 肺组织 Caspase-3 mRNA 表达的变化

给药第 3、7、10、14 天, 小鼠肺组织中 Caspase-3 mRNA 水平显著升高 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 造模第 3 天阿奇霉素组 Caspase-3 mRNA 表达下调 ($P < 0.01$), 其他用药组影响不明显; QJD 全方组、

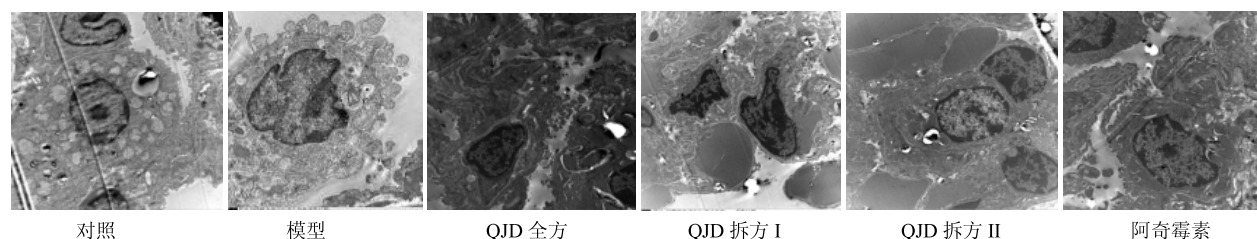


图 1 各组小鼠肺组织超微结构的改变

Fig. 1 Changes of ultrastructure in lung tissue of MP infected mice in each group

阿奇霉素组于造模第 7 天开始 Caspase-3 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$, 0.01); QJD 拆方 I 组与 QJD 全方组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

3.3 肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达比较

MP 感染后, 小鼠肺组织中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达在重复测量比较中, 不同时间点之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 感染与时间的交互作用

差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bax 蛋白和 Caspase-3 蛋白的表达在不同时间点差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Caspase-3 蛋白表达感染与时间的交互作用差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2 和表 2。药物干预后, 与模型组比较, QJD 全方组、QJD 拆方 I 组和阿奇霉素组可下调 Bax 和 Caspase-3 的表达; QJD 全方组、QJD 拆方 I 组、QJD 拆方 II 组、及阿奇霉素组均可上调 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 Caspase-3 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 1 Comparison on mRNA expression of Caspase-3 in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Caspase-3 mRNA 表达量			
		第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	—	9.66 ± 0.98**	9.98 ± 1.24**	9.63 ± 1.75**	9.52 ± 0.64**
QJD 全方	15	8.96 ± 0.62	7.85 ± 1.01 [#]	6.27 ± 0.99 ^{##}	5.98 ± 1.04 ^{##}
QJD 拆方 I	9.15	8.46 ± 1.21	8.46 ± 0.97	7.29 ± 0.21 [#]	5.97 ± 1.07 ^{##}
QJD 拆方 II	5.85	9.28 ± 1.40	9.20 ± 0.97	8.12 ± 1.12	8.24 ± 0.66
阿奇霉素	0.09	6.81 ± 0.42 ^{##▲}	6.10 ± 0.21 ^{##▲}	5.21 ± 1.86 ^{##}	5.08 ± 0.53 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 QJD 全方组比较: [▲] $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs QJD group

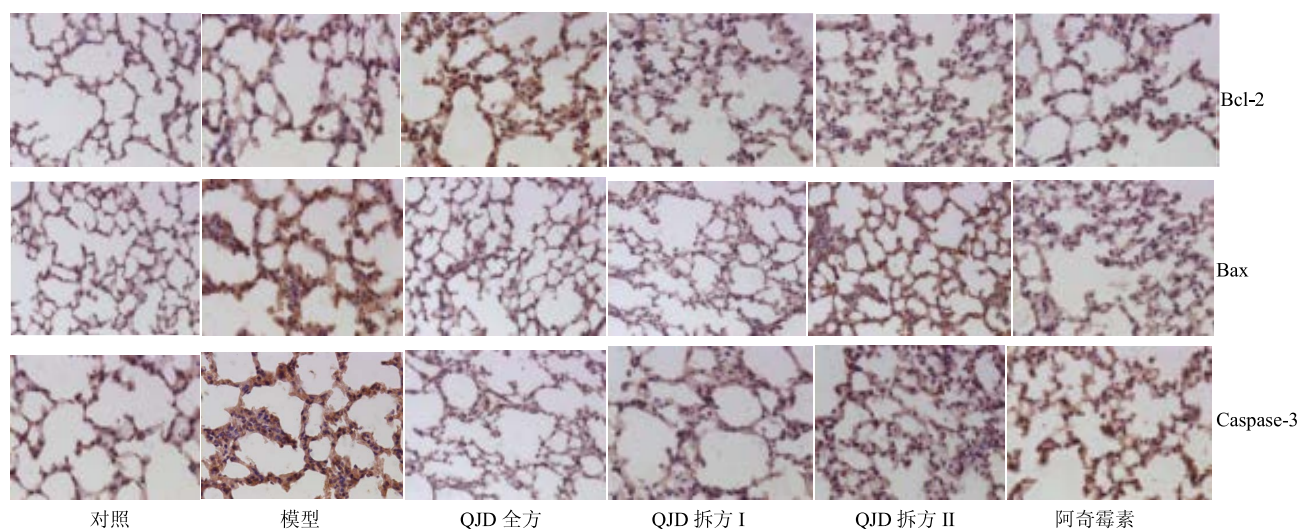


图 2 各组小鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达 (免疫组化法)

Fig. 2 Protein expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in lung tissue of mice in each group (immunohistochemistry)

表 2 各组小鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达相对量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Relative quality of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 protein expression in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	时间	Bcl-2	Bax	Caspase-3
对照	—	第 3 天	0.162±0.002	0.170±0.003	0.166±0.005
		第 7 天	0.167±0.002	0.168±0.003	0.165±0.003
		第 10 天	0.168±0.002	0.165±0.002	0.168±0.004
		第 14 天	0.165±0.004	0.163±0.005	0.166±0.008
模型	—	第 3 天	0.188±0.004**	0.187±0.005**	0.189±0.006**
		第 7 天	0.184±0.003**	0.186±0.003**	0.190±0.002**
		第 10 天	0.186±0.005**	0.189±0.005**	0.188±0.002**
		第 14 天	0.182±0.003**	0.186±0.003**	0.188±0.002**
QJD 全方	15	第 3 天	0.182±0.006**#	0.185±0.003	0.176±0.005
		第 7 天	0.189±0.001**	0.178±0.001***	0.177±0.004***
		第 10 天	0.187±0.008**	0.179±0.003***	0.173±0.004###
		第 14 天	0.187±0.008**	0.178±0.005***	0.168±0.003###
QJD 拆方 I	9.15	第 3 天	0.187±0.001**	0.171±0.014###▲	0.188±0.001**▲
		第 7 天	0.185±0.004**	0.180±0.005**	0.189±0.001**▲
		第 10 天	0.184±0.001**	0.181±0.007***	0.181±0.004**▲
		第 14 天	0.184±0.001**	0.179±0.005**	0.180±0.004**▲
QJD 拆方 II	5.85	第 3 天	0.191±0.001**▲	0.182±0.002	0.193±0.001**▲
		第 7 天	0.187±0.001**	0.188±0.005***▲	0.189±0.000**▲
		第 10 天	0.182±0.004**	0.190±0.002***▲	0.189±0.000**▲
		第 14 天	0.183±0.005**	0.188±0.002***▲	0.189±0.000**▲
阿奇霉素	0.09	第 3 天	0.189±0.002**▲	0.182±0.002	0.181±0.003**#
		第 7 天	0.168±0.005###▲	0.180±0.006**	0.182±0.002***
		第 10 天	0.168±0.005###▲	0.179±0.003***	0.177±0.005###
		第 14 天	0.168±0.005###▲	0.179±0.009***	0.177±0.006###▲

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与 QJD 全方组比较: ▲ $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs QJD group

3.4 Western blotting 法检测肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达结果

给药第 7 天, 小鼠肺组织中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$), 药物干预后, 与模型组比较, QJD 全方组、QJD

拆方 I 组和阿奇霉素组 Bax 和 Caspase-3 的表达明显下调, Bcl-2 的表达上调 ($P < 0.05$)。QJD 全方组、QJD 拆方 I 组和阿奇霉素组相比表达有差异, 但没有统计学差异 ($P > 0.05$)。结果见图 3 和表 3。

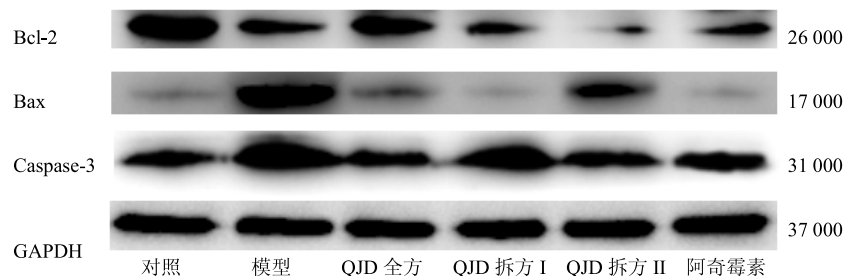


图 3 Western blotting 法检测肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in lung tissue detected by Western blotting

表 3 各组小鼠肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达相对量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Relative quality of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 protein expression in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Bax	Caspase-3	Bcl-2	Bcl-2/Bax
对照	—	0.58±0.05	0.79±0.06	0.63±0.03	1.10±0.10
模型	—	1.18±0.08**	1.39±0.02**	0.76±0.06*	0.65±0.10**
QJD 全方	15	0.49±0.06 ^{##}	0.72±0.03 ^{##}	0.52±0.01 ^{##}	1.10±0.17 ^{##}
QJD 拆方 I	9.15	0.51±0.05 ^{##}	0.78±0.06 ^{##}	0.45±0.07 ^{##}	0.88±0.17 ^{##}
QJD 拆方 II	5.85	0.93±0.05 ^{##}	1.36±0.05 [▲]	0.16±0.03 ^{##▲}	0.17±0.02 ^{##▲}
阿奇霉素	0.09	0.49±0.03 ^{##}	0.93±0.04 ^{##▲}	0.50±0.07	1.02±0.12 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 QJD 全方组比较: [▲] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs QJD group

4 讨论

MP 感染细胞后,可直接诱导凋亡,亦可通过局部细胞因子或其他的物质间接诱导凋亡。同时,在感染初期,体内细胞凋亡也有可能是机体利用凋亡来清除病原微生物,可能是一种以牺牲少数细胞而保护整体的重要防卫机制^[6]。但在感染中后期,过多的细胞凋亡会造成机体的损伤。凋亡主要受细胞内的凋亡蛋白调控,凋亡调节蛋白分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白 2 大类。Bax 是与 Bcl-2 同源的相关蛋白,Bax 属于促凋亡蛋白,Bcl-2 属于抑制细胞凋亡的抗凋亡蛋白^[7-9]。Bax 与 Bcl-2 蛋白水平高低与凋亡调控直接相关。在正常情况下两者的比例是相对恒定的,当细胞受到凋亡信号刺激后,2 种蛋白的含量发生变化,从而决定细胞生命的走向。二者以二聚体的形式发挥作用。以往的研究中发现,上调 Bcl-2 的表达,可抑制 Bax 的作用,使 Bax/Bax 同源二聚体解离,形成更加稳定的 Bcl-2/Bax 异二聚体,起到抗凋亡的作用。上调 Bax 的表达,Bax/Bax 同源二聚体增多,线粒体通透性增加,释放细胞色素 C^[10],从而激活 Caspase 家族,促进凋亡^[11]。Caspase-3 是 Caspase 家族中最重要效应型 Caspase,多种的凋亡的刺激信号传递在此汇聚。因此 Caspase-3 是细胞凋亡的主要效应因子和关键的执行者^[12]。有研究显示,MP 可激活外源性凋亡受体通路,使促凋亡蛋白 Bax 的表达增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达减少,激活 Caspase-3 的表达,促进肺泡上皮细胞凋亡^[13-14]。

儿童 MPP 以反复发热、刺激性咳嗽为其主要特点。在整个病程当中,干咳是其特征性症状,正恰如燥邪伤肺,肺失肃降之干咳。肺属金,燥者金之气,同气相求,故燥邪侵袭,以肺为病变中心。正如喻嘉言所说:“燥气先伤上焦华盖”,其临床表现为肺系燥热的征候,故方选清燥救肺汤加减,用

于治疗临床中小儿 MP 感染后燥热伤肺之证^[15]。全方以桑叶为君药,性味甘苦寒,清肺泻火,凉润肺燥。佐以石膏、枇杷叶、杏仁,使肺气宣,肺热得降。同时佐以麦冬、人参、阿胶、甘草、胡麻仁,益气养阴,补肺润肺。为了探讨 QJD 的起效成分,对其全方进行拆分成拆方 I 与拆方 II。拆方 I 由桑叶、石膏、枇杷叶、杏仁组成;拆方 II 由麦冬、人参、阿胶、甘草、胡麻仁组成。本研究采用 QJD 治疗 MP 感染后的小鼠,在透射电镜下观察其肺组织的形态改变,并观察肺组织中肺组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的表达。结果显示,MP 感染后的小鼠肺组织,在电镜下观察其肺泡上皮细胞破坏,细胞增生,血管、毛细血管内皮细胞肿胀,明显突向管腔。肺泡 II 型细胞核质脱落,板层小体排空,空泡化,发现凋亡特征结构。肺组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的表达明显升高,但是 Bcl-2/Bax 的值明显下降。与模型组相比,QJD 全方组、QJD 拆方 I 组及阿奇霉素组的 Bcl-2 的表达升高,Bcl-2/Bax 的值也明显升高,Bax、Caspase-3 的表达下降。其中 QJD 作用优于拆方,并且拆方 II 的作用不明显。本实验研究表明,机体在感染 MP 的刺激下,凋亡信号开始启动,Bcl-2、Bax 开始升高,其中促凋亡 Bax 占优势,从而增加线粒体的通透性,活化执行蛋白酶 Caspase-3,发生细胞凋亡。QJD 可以上调 Bcl-2 的表达,下调 Bax 的表达,从而提高 Bcl-2/Bax 的值,阻止 Bax 孔道的形成,使细胞减少凋亡。其中拆方 I 中的药物组成作用明显优于拆方 II,据此推测拆方 I 中的药物组成在 QJD 中起到了清肺润燥的主要作用。本实验表明,QJD 可能以 Bax、Bcl-2 为效应靶点,从而抑制 Caspase-3 的表达,使细胞可以免于凋亡。

参考文献

[1] Principi N, Esposito S. Mycoplasma pneumoniae and

- Chlamydia pneumoniae cause lower respiratory tract disease in paediatric patients [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2002, 15(3): 295-300.
- [2] 吴振起, 刘光华, 王雪峰, 等. 从燥论治肺炎支原体感染 [J]. 中医杂志, 2012, 53(21): 1879-1880.
- [3] Rathmell J C, Thompson C B. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease [J]. *Cell*, 2002, 109 Suppl(2): S97.
- [4] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Brit J Cancer*, 1972, 26(4): 239-57.
- [5] 李 敏, 林 俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(2): 103-107.
- [6] 迟秀玲, 严奉祥. 支原体引起细胞凋亡的机制 [J]. 临床与病理杂志, 2006, 26(6): 546-549.
- [7] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak [J]. *Cell Cycle*, 2007(24): 3043-3047.
- [8] Llambi F, Green D R. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family [J]. *Curr Opin Genet Develop*, 2011, 21(1): 12-20.
- [9] 尹智勇, 杨俊元, 祁 宏. Bcl-2 蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2017, 30(2): 340-344.
- [10] Muñoz-Pinedo C. *Signaling Pathways That Regulate Life And Cell Death: Evolution Of Apoptosis In The Context Of Self-Defense* [M]. Self and Nonsell: Springer, 2012.
- [11] Jurgensmeier J M, Xie Z, Deveraux Q. Bax directly induced release of cytochrome c from isolated mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4997-5002.
- [12] Liu X, Zou H, Slaughter C, *et al*. A heterodimeric protein that functions downstream of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 175-184.
- [13] Shi S, Liu X, Li H. Downregulation of caspase-3 alleviates mycoplasma pneumoniae-induced apoptosis in alveolar epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9601-9606.
- [14] Ni B, Bai F F, Wei Y, *et al*. Apoptosis induced by lipid-associated membrane proteins from Mycoplasma hyopneumoniae in a porcine lung epithelial cell line with the involvement of caspase 3 and the MAPK pathway [J]. *Genet Mol Res Gmr*, 2015, 14(3): 11429.
- [15] 徐癭瑾, 万迎新. 清燥救肺汤在肺系疾病中的应用 [J]. 世界中医药, 2014, 9(11): 1509-1511.