

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

王斯楚, 孙一, 王晓溪, 王欣, 蒙艳丽*, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

摘要:目的 探讨汉黄芩素通过调控肺上皮间质形成因子的表达, 治疗肺炎支原体肺炎的作用机制。方法 运用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术检测芩百清肺浓缩丸中的活性成分汉黄芩素, 通过 Biacore 垂钓技术将其与转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 进行结合, 动力学分析验证其结合的特异性。采用 Tripos Sybyl-X2.1.1 以及 Discovery Studio2016 软件对汉黄芩素和 TGF- β 1 进行分子对接, 对药物分子与受体蛋白的结合模式进行可视化分析。通过动物实验制作小鼠肺部病理组织切片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、Masson 染色, 观察其病理结构形态。运用实时 (real-time, RT)-PCR、免疫组化 (immunohistochemistry) 技术检测汉黄芩素对小鼠肺组织中 TGF- β 1、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、波形蛋白、E-钙黏蛋白 mRNA 和蛋白的表达水平的影响。结果 Biacore 垂钓得到的样品经 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定分析为汉黄芩素。汉黄芩素与 TGF- β 1 存在较强的特异性结合。HE 染色和 Masson 染色结果表明, 汉黄芩素给药组小鼠肺组织形态结构与对照组相似。免疫组化实验结果表明, 与模型组相比, 汉黄芩素中、高剂量组 TGF- β 1、波形蛋白的表达均明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), EGF、E-钙黏蛋白的表达升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。RT-PCR 实验结果表明, 与模型组相比, 汉黄芩素各给药组小鼠肺组织 TGF- β 1、波形蛋白的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001), EGF 和 E-钙黏蛋白的 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$)。结论 汉黄芩素能够下调 TGF- β 1 和波形蛋白的表达, 同时上调 EGF 和 E-钙黏蛋白的表达, 从而达到治疗肺炎支原体肺炎及肺组织纤维化的目的。

关键词: 肺炎支原体; 汉黄芩素; 上皮间质转化; 表皮生长因子; E-钙黏蛋白; 转化生长因子 β 1; 波形蛋白

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)01-0172-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.020

Effect of wogonin on expression of lung epithelial-mesenchymal formation factor in lung tissue of mycoplasma pneumoniae pneumonia mice

WANG Si-chu, SUN Yi, WANG Xiao-xi, WANG Xin, MENG Yan-li, WANG Wei-ming

Heilongjiang Academy of Chinese Medicine Sciences, Harbin 150036, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of wogonin in the treatment of mycoplasma pneumoniae pneumonia by regulating the expression of epithelial-mesenchymal formation factor. **Methods** UPLC-Q-TOF-MS was used to detect the active ingredient wogonin in Qinbai Qingfei Concentrated Pills (芩百清肺浓缩丸), and it was bound to transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) by Biacore fishing technique, and the specificity of binding was verified by kinetic analysis. Tripos SYbyl-X2.1.1 and Discovery Studio2016 software was used to perform molecular docking between wogonin and TGF- β 1, and the binding mode between drug molecules and receptor proteins was visualized. The lung pathological tissue sections of mice were prepared by animal experiments. Hematoxylin-eosin (HS) staining and Masson staining were performed to observe the pathological structure and morphology of the staining. The effects of wogonin on mRNA and protein expression levels of TGF- β 1, epidermal growth factor (EGF), vimentin, E-cadherin in mouse lung tissue by real-time (RT)-PCR and immunohistochemistry method. **Results** The samples obtained from Biacore fishing were identified and analyzed as wogonin by UPLC-Q-TOF-MS. There was strong specific binding between wogonin and TGF- β 1. The results of HE staining and Masson staining showed that the morphological structure of lung tissue in the wogonin

收稿日期: 2022-08-21

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: 王斯楚 (1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药学研究。E-mail: 840074577@qq.com。

*通信作者: 蒙艳丽 (1976—), 女, 硕士生导师, 研究员, 主要从事新药研发。E-mail: mengyanli2000@163.com

王伟明 (1966—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新产品研发、药食同源中药发酵。

E-mail: wangweiming475@yahoo.com

group was similar to that of the control group. Immunohistochemical test results showed that compared with model group, the expression levels of TGF- β 1 and vimentin in medium and high dose wogonin groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the expressions of EGF and E-cadherin were increased ($P < 0.05, 0.01$). The results of RT-PCR showed that compared with the model group, the mRNA expression levels of *TGF- β 1* and *vimentin* in lung tissue of mice in wogonin administration groups was significantly decreased ($P < 0.05, 0.001$), while the mRNA expression levels of *EGF* and *E-cadherin* was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Wogonin can down-regulate the expression of TGF- β 1 and vimentin, and up-regulate the expression of EGF and E-cadherin, so as to achieve the purpose of treating mycoplasma pneumoniae pneumonia and lung tissue fibrosis.

Key words: mycoplasma pneumoniae; wogonin; epithelial-mesenchymal transitions; epidermal growth factor; E-cadherin; transforming growth factor- β 1; vimentin

肺炎支原体肺炎 (mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP) 是一种常见的社会获得性肺炎, 其主要发病机制为肺炎支原体经飞沫传播, 进入呼吸道后黏附于气道上皮细胞, 导致上皮细胞破坏、死亡^[1], 多发于学龄前和学龄期儿童, 约占肺炎总数的 30%, 加之儿童免疫力低下可诱发混合感染, 具有延绵不愈、易复发的特点, 严重影响生活质量^[2]。MPP 属于间质性肺炎, 以肺间质纤维素沉积为主要病理改变, 有时并发支气管肺炎, X 线可出现两肺中、下野弥散性网状或结节状阴影^[3]。有研究表明, 肺炎支原体反复感染肺部可导致肺间质纤维素沉积^[4], 肺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化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 而来, 且在炎症反应持续的情况下, EMT 的过程也会持续存在, 最终造成组织器官纤维化病变^[5]。目前的临床用药常选用阿奇霉素等大环内酯类抗生素, 但对于肺炎支原体反复发作慢性迁延导致纤维素沉积, 其不具有预防和治疗作用。且随着抗生素的广泛长期使用, 患者会产生耐药性, 从而对治疗效果造成不良影响, 严重时还会导致药物不良反应^[6]。因此开发即杀灭肺炎支原体又预防和治疗肺纤维素沉积的药物显得尤为重要。

芩百清肺浓缩丸 (Qinbai Qingfei Concentrated Pills) 是在临床研究基础上组成的具有治疗肺炎支原体肺炎作用方药^[7], III 期临床观察明确治疗小儿支原体肺炎。汉黄芩素 (wogonin) 又名 5,7-二羟基-8-甲氧基-2-苯基-4H-1-苯并呋喃-4-酮, 是中药黄芩中的活性成分之一, 也是芩百清肺浓缩丸中的主要活性成分。目前已有研究表明汉黄芩素有显著的抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤等多种作用^[8], 并且能够明显抑制肺组织炎症相关因子的产生^[9], 因此汉黄芩素很可能成为新一代治疗 MPP 的药物。

在 EMT 过程中上皮细胞丧失细胞极性, 失去

与基底膜的连接等上皮表型, 获得了较高的降解细胞外基质的能力等间质表型^[10]。其主要的特征有细胞黏附分子 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达减少、波形蛋白 (vimentin) 表达增加。且有研究表明, 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 在 EMT 转变起关键作用^[11]。TGF- β 1 作为最主要的一种强效致纤维化因子, 通过激活下游多个信号转导因子, 在肺组织中诱导纤维化^[12]。

本研究通过验证汉黄芩素对 TGF- β 1、EGF、波形蛋白、E-钙黏蛋白表达的影响, 探讨汉黄芩素治疗 MPP 的作用机制, 为芩百清肺浓缩丸的临床使用提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂及仪器

1.1.1 试剂 兔二步法检测试剂盒 (兔增强聚合物法检测系统) 购自北京诺博莱德科技有限公司 (产品编号 PV-9001), 二抗批号 2214B0114; DAB 试剂购自 Thermo 公司 (批号 ZLI-9018); Trizol 购自美国 Invitrogen 公司 (批号 19124-1-AP); UltraSYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司 (批号 29520); Biacore T200 试剂盒、CM5 芯片购自 GEHealthcare 公司 (批号 10280148); 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液购自南京建成公司; 一抗 TGF- β 1 (批号 ab64715)、EGF (批号 ab77815)、波形蛋白 (批号 ab45939)、E-钙黏蛋白 (批号 ab76055) 均购自 Abcam 公司; 引物合成自上海 Invitrogen 公司。

1.1.2 仪器 BIAcoreT200 分子互作分析仪购自美国 GE 公司; Reverse Transcribe PCR 仪 Tc-24/H (b) 购自中国博日生物公司; InfiniteM200PRO 酶标仪购自瑞士 TecanKD-BM 公司; Waters ACQUITYTM UPLC 色谱仪, 美国 Waters 公司; AB SCEIX Triple-TOF TM5600+ 高分辨质谱, 美国 ABSCIEX 公司; 生物组

织包埋机、KDTS3A 自动组织脱水机购自浙江科迪仪器设备公司。

1.2 实验动物及病毒

6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠，雌雄各 24 只。体质量 20~22 g，购自哈尔滨医科大学，动物合格证号 SCXK（黑）2019-001，在 GLP 实验室室温 25 °C、湿度 60% 条件下饲养。本研究中的动物实验得到黑龙江省中医药科学院保护和和使用委员会的批准（许可证号 SY3R-2020006），实验过程依照《黑龙江省实验动物护理和使用指南》进行。肺炎支原体（ATCC 15531）购自 American Type Culture Collection。

1.3 实验药品

芩百清肺浓缩丸购自天合力药业有限公司，生产批号 CXZS1000045，规格为 3 g/袋（相当于生药 2.5 g）；汉黄芩素对照品由黑龙江省药品检验所提供（批号 H01811804026），质量分数 99% 以上；阿奇霉素分散片购自石药集团欧意药业有限公司（批号 274150404）。

2 方法

2.1 Biacore 实验

2.1.1 预富集实验及配体耦联实验 参照徐明杭等^[13]的前期实验，运用 Biacore T200 测试系统，用化学耦联法将 TGF- β 1 蛋白偶联到 CM5 芯片上，在最佳 pH 4 的条件下，配制 TGF- β 1 蛋白溶液 200 μ L 注入芯片表面，体积流量 10 μ L/min，耦联时间 600 s。

2.1.2 Biacore 垂钓法钩取亲和成分 称取 20 mg 研磨成粉末状的芩百清肺浓缩丸药粉，加入 1 mL 超纯水中充分溶解后，用 0.22 μ m 滤膜过滤到另一 EP 管中备用（芩百溶液）。将配制好的芩百溶液（20 mg/mL）注入 CM5 芯片表面，体积流量 5 μ L/min，耦联时间 180 s。取 2 μ L 样品回收液（0.5% 甲酸溶液）注入流动池孵育 20 s，使芩百溶液与 TGF- β 1 的结合成分解离至样品回收液中。改变传感器表面样品的流动方向，使其朝相反方向流动，将含有结合成分的回收液沉积到 10 μ L 的碳酸氢铵溶液（50 mmol/L）中，循环次数 20 次。

2.2 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定有效成分

使用氮吹仪将 Biacore 垂钓所得样品吹干后溶解于 100 μ L 甲醇溶液，在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 20 min，吸取上清液上机检测。色谱条件与质谱条件参照徐明杭等^[13]实验条件。

2.3 汉黄芩素与 TGF- β 1 蛋白的结合能力测试

称取 1 mg 汉黄芩素对照品，加入无核酸水配

制成 10 mg/mL 的溶液。样品以 30 μ L/min 经芯片表面，进样 60 s，等待 60 s，再生 30 s。从输出的传感图结果中观察和分析响应值（RU）。

2.4 汉黄芩素与 TGF- β 1 的亲合力分析

运用 Biacore 软件，根据汉黄芩素相对分子质量将其分别稀释成 24.375、48.750、97.500、195.000、390.000 nmol/L 的 5 个浓度梯度，再将不同浓度的溶液注入 Biacore 系统，注射 60 s，体积流量 30 μ L/min，再生 60 s。汉黄芩素溶液浓度 97.500 nmol/L 实验 2 次，总循环次数 3 次。最后利用软件中的亲和性分析模块分析实验结果。

2.5 分子对接模拟实验

利用软件 Tripos Sybyl-X2.1.1 和 Discovery Studio 2016 模拟分析汉黄芩素与 TGF- β 1 之间的相互作用模式，运用 Surflex-Dock 软件对汉黄芩素与 TGF- β 1 蛋白进行打分，判断二者之间的结合活性。

2.6 体内动物实验

2.6.1 肺炎支原体培养 在无菌环境中复苏肺炎支原体后培养在含胎牛血清的 PPLO 培养基中，37 °C 孵箱培养，每隔 7 d 传代 1 次。

2.6.2 小鼠肺炎支原体肺炎模型的建立 将 48 只雌雄各半的 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、阿奇霉素组（阳性对照组）以及汉黄芩素高、中、低剂量组，每组 8 只。除对照组外，各组小鼠乙醚麻醉后鼻滴入 20 μ L 106CCu 肺炎支原体，每天 1 次，持续 3 d。造模完成后，根据芩百清肺浓缩丸人用剂量进行折合计算，汉黄芩素各给药组小鼠分别 ig 给予 148.54、74.27、37.14 μ g/(kg·d) 汉黄芩素；阿奇霉素组小鼠给予阿奇霉素 32 mg/(kg·d)；对照组和模型组小鼠 ig 等体积的生理盐水。连续给药 7 d 后脱颈处死小鼠，剥离各组小鼠肺组织，一半置于 10% 甲醛溶液中，一半 -80 °C 冻存用于后续实验。

2.7 免疫组化（immunohistochemistry, IHC）法检测肺组织中 TGF- β 1、EGF、波形蛋白、E-钙黏蛋白的表达水平

10% 甲醛浸泡 24 h 后，取各组小鼠肺组织进行包埋切片，依据兔二步法检测试剂盒说明书进行免疫组化反应。在光学显微镜下对比观察各组小鼠肺组织中抗原分布，并对各组进行 IHC 评分。

2.8 HE 染色

取各组小鼠肺组织切片，二甲苯脱蜡后进行 HE 染色，封片后置于显微镜下观察各组间肺组织病理变化。

2.9 Masson 染色

取各组小鼠肺组织切片，二甲苯脱蜡后依次进行苏木素染色、立春红-酸性复红染色、1%磷钼酸染色和 2%醋酸苯胺蓝染色。梯度酒精脱水后二甲苯浸泡，中性树脂封片后于显微镜下观察。

2.10 RT-PCR 检测 *TGF-β1*、*EGF*、波形蛋白、E-钙黏蛋白 mRNA 的表达水平

取各组小鼠肺组织，根据 RNA 提取试剂盒提取各组小鼠肺组织总 RNA，酶标仪检测各组 RNA 浓度。依照 one-step reverse transcription PCR kit 说明书检测 *TGF-β1*、*EGF*、波形蛋白和 E-钙黏蛋白 mRNA 的表达水平。其中各引物基因序列如下：

TGF-β1, F: 5'-AGAAACGAGCAGAGGATTGAGC-3', R: 5'-CTGAAAGTGTGGCAGGGACAA-3';
EGF, F: 5'-GTCACCCACAGAAACAAT-3', R: 5'-AGGAGCGAACCTACTAAA-3';
 E-钙黏蛋白, F: 5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT-3', R: 5'-CACAACCAATCAACAACACA-3';
 波形蛋白, F: 5'-AATGGCTCGTCACCTTCG-3', R: 5'-CTAGTTTCAACCGTCTTAATCAG-3';
 β -actin, F: 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3', R: 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。

2.11 统计学方法

采用 SPSS 26 统计学软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，单因素方差分析组间差异，以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定垂钓产物

在前期垂钓实验中回收到多个提取物，通过数据库对比，发现其中 1 种提取物的裂解规律与汉黄芩素一致。如图 1-A、B 所示，虚线部分为镜像分割线，其上部分为样品，下部分为汉黄芩素对照品，由图可见，垂钓产物二级碎片均与汉黄芩素对照品一致，可以确定芩百清肺浓缩丸回收样品中与 *TGF-β1* 蛋白结合的垂钓产物为汉黄芩素。见图 1。

3.2 汉黄芩素与 *TGF-β1* 蛋白结合结果

如图 2 所示，汉黄芩素与 *TGF-β1* 存在结合解

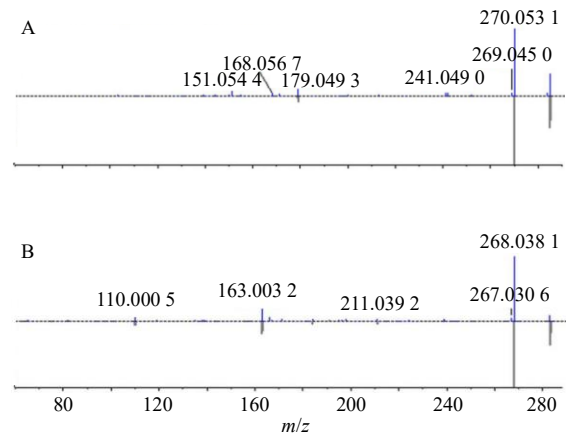
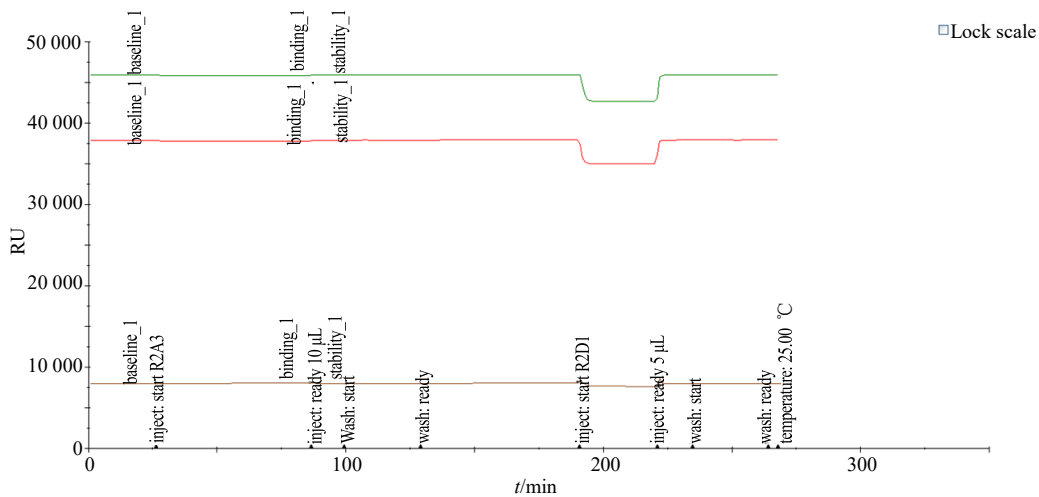


图 1 垂钓产物正(A)、负离子 (B) 模式下 ESI-MS² 质谱图
 Fig. 1 ESI-MS² mass spectrometry of fishing products under positive (A) and negative (B) ion mode



绿色线为 2 通道结合曲线；红色线为 1 通道结合曲线；棕色线为 2、1 通道结合曲线

The green line is the 2-channel combination curve; The red line is the 1-channel binding curve; The brown line is the combination curve of channel 2 and channel 1

图 2 汉黄芩素与 *TGF-β1* 蛋白结合响应

Fig. 2 Binding of wogonin and *TGF-β1* protein

离峰, 根据 binding 报告, 二者的结合峰值为 11.2 RU, 而 1 RU 响应值大致相当于芯片表面结合物质的浓度改变了 1 pg/mm², 预估结果在 2~10 RU 为结合良好, 说明汉黄芩素与 TGF-β1 能够较好地结合。

3.3 汉黄芩素与 TGF-β1 亲和力分析结果

从图 3 可以看出, 信号响应强度随着汉黄芩素溶液浓度的增加而逐渐增大, 呈浓度相关性。表明汉黄芩素在体外能够与 TGF-β1 蛋白进行特异性结合。

3.4 分子对接结果

通过蛋白晶体研究及与配体相互作用研究, 发现 TGF-β1 的活性口袋位于图 4 中红色球体所示的

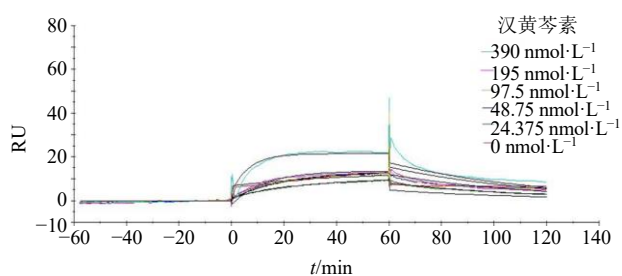
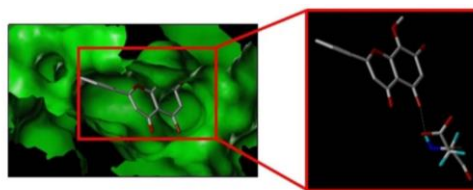


图 3 梯度浓度的汉黄芩素与 TGF-β1 蛋白结合响应值
Fig. 3 Binding response values of gradient concentration of wogonin and TGF-β1 protein



显示为红色球体的活性位点 (软件: Discovery Studio 2016)



汉黄芩素与 TGF-β1 相互作用模式图 (软件: Tripos Sybyl X2.1.1)

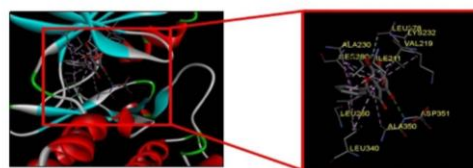


图 4 汉黄芩素与 TGF-β1 模拟分子对接示意图

Fig. 4 Schematic diagram of simulated molecular docking between wogonin and TGF-β1

位置, 是一个由芳香族氨基酸、非极性氨基酸和极性氨基酸组成的疏水口袋; 其中有多参与小分子药物作用的关键氨基酸残基, 如 Ile211、Ala230、Lys232、Leu260、Tyr282 等。运用 Surflex-Dock 软件对汉黄芩素与 TGF-β1 蛋白之间的相互作用进行打分, 判断二者之间结合活性, 所得分数为 5。利用软件 Tripos Sybyl-X2.1.1 和 Discovery Studio 2016 分析汉黄芩素与 TGF-β1 之间的相互作用模式, 如图 5 所示。由图可知, 汉黄芩素与 TGF-β1 受体之间存在多种相互作用, 例如与 Asp351 形成的 1 条氢键, 以及与 Ile211 形成的疏水作用力, 而这些构成相互作用的氨基酸残基均为先前分析活性位点时找到的关键氨基酸残基; 同时, 汉黄芩素亦与活性口袋中其他关键氨基酸残基形成了多种其他非键相互作用力。这说明汉黄芩素确实可以有效地与 TGF-β1 受体结合。

3.5 IHC 法检测汉黄芩素对肺组织中 TGF-β1、EGF、波形蛋白、E-钙黏蛋白表达的影响

在 200 倍镜下观察各组小鼠肺组织的染色情

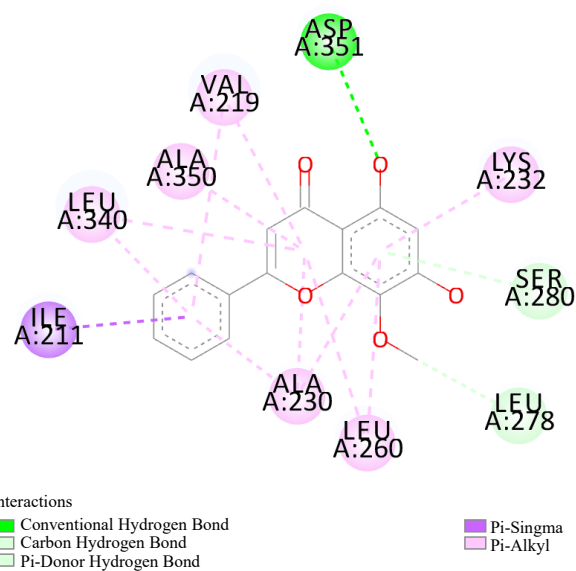


图 5 汉黄芩素与 TGF-β1 相互作用二维图 (软件: Discovery Studio 2016)

Fig. 5 Two-dimensional diagram of interaction between wogonin and TGF-β1 (software: Discovery Studio 2016)

况，每张切片随机选取3个不同的视野，对各组进行IHC评分。评分标准：组织切片IHC评分=着色强度分×阳性细胞着色比例分；着色强度分：不着色0分，弱着色1分，中等着色2分，强着色3分；阳性细胞比例评分：0~5%阳性0分，6%~25%阳性1分，26%~50%阳性2分，51%~74%阳性3分，>75%阳性4分^[14]。通过观察，汉黄芩素中、

高剂量组与模型组对比，TGF-β1、波形蛋白的表达均明显减少 ($P<0.05, 0.01$)，EGF、E-钙黏蛋白的表达均不同程度有所升高 ($P<0.05, 0.01$)，表现为褐色着色点加深。见图6、7。

3.6 HE染色

200倍显微镜下观察，结果如图8所示，对照组小鼠肺组织形态正常，肺泡细胞排列紧密。模型

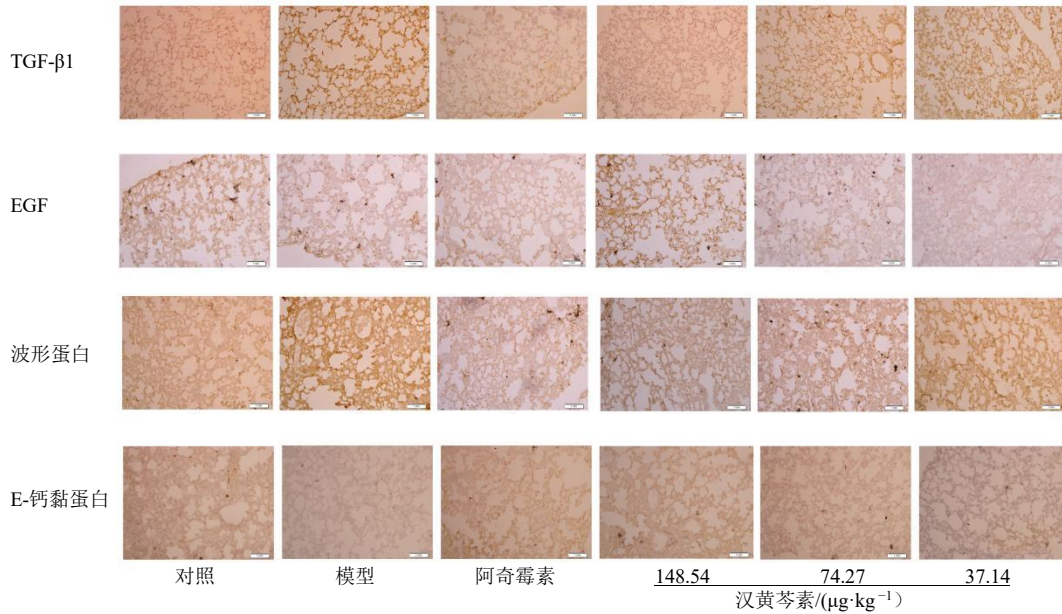
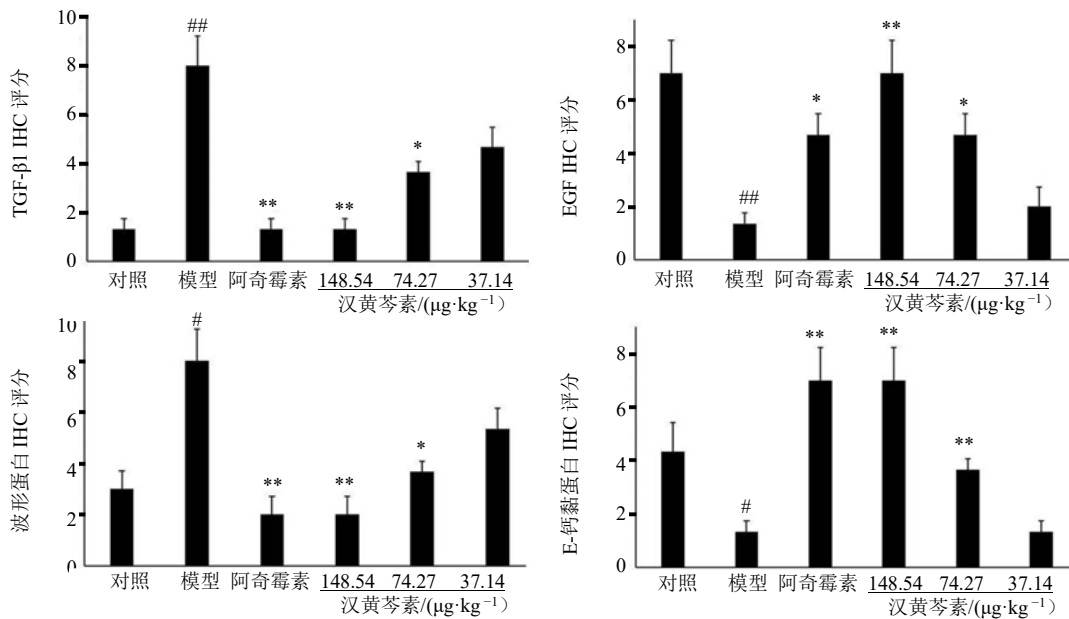


图6 汉黄芩素对肺组织 TGF-β1、EGF、波形蛋白、E-钙黏蛋白表达的影响 (×20)

Fig. 6 Effects of wogonin on protein expressions of TGF-β1, EGF, vimentin and E-cadherin in lung tissue (×20)



与对照组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
$P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

图7 各组小鼠肺组织切片 IHC 评分 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 7 IHC scores of lung tissue sections of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

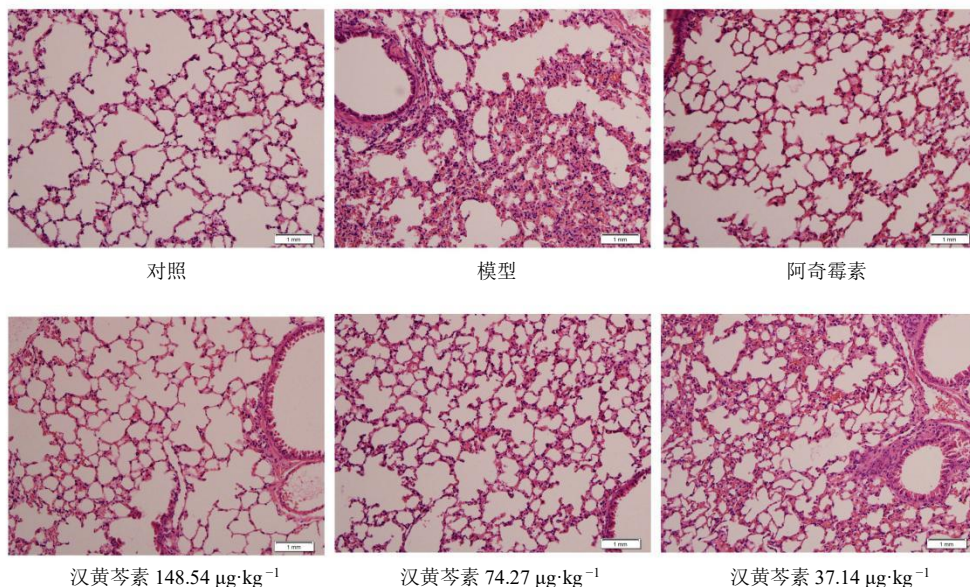


图 8 各组小鼠肺组织 HE 染色 (×200)

Fig. 8 HE staining of lung tissue of mice in each group (× 200)

组小鼠肺组织中肺泡壁有明显增厚，且有大面积充血，肺泡腔多处塌陷。汉黄芩素各给药组对比模型组，有少量肺泡壁充血和炎性细胞浸润，与对照组和阳性对照阿奇霉素组的肺组织相似，且汉黄芩素高剂量组的治疗效果最好。

3.7 Masson 染色

将染色切片置于显微镜 200 倍镜下观察，结果如图 9 所示，对照组小鼠肺组织切片组织排列紧密规则，在血管周围存在极少量纤维沉积。模型组小鼠肺组织形态紊乱，且有大量胶原纤维（呈蓝色）

分布，肺泡腔塌陷，肺泡壁周围有大量炎性细胞聚集。与模型组相比，汉黄芩素各给药组蓝色面积都有显著减少，其组织形态与对照组和阳性对照阿奇霉素组的肺组织相似，且治疗效果随汉黄芩素剂量的降低而减弱。

3.8 RT-PCR 检测汉黄芩素对 *TGF-β1*、*EGF*、波形蛋白、E-钙黏蛋白 mRNA 表达的影响

汉黄芩素对 *TGF-β1*、*EGF*、波形蛋白、E-钙黏蛋白 mRNA 表达的影响如图 10 所示。与模型组相比，汉黄芩素各剂量组的 *TGF-β1* 和波形蛋白

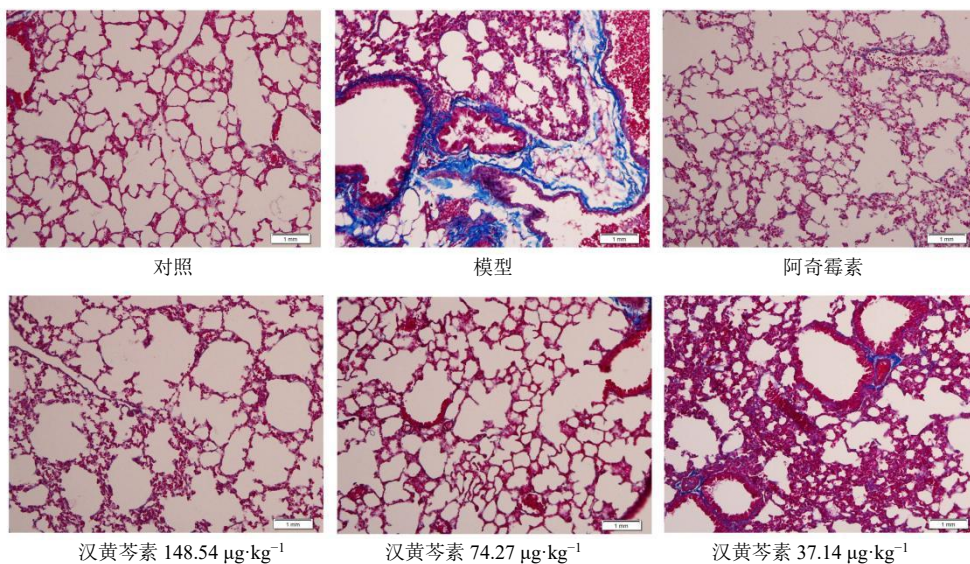


图 9 各组小鼠肺组织 Masson 染色 (×200)

Fig. 9 Masson staining of lung tissue of mice in each group (× 200)

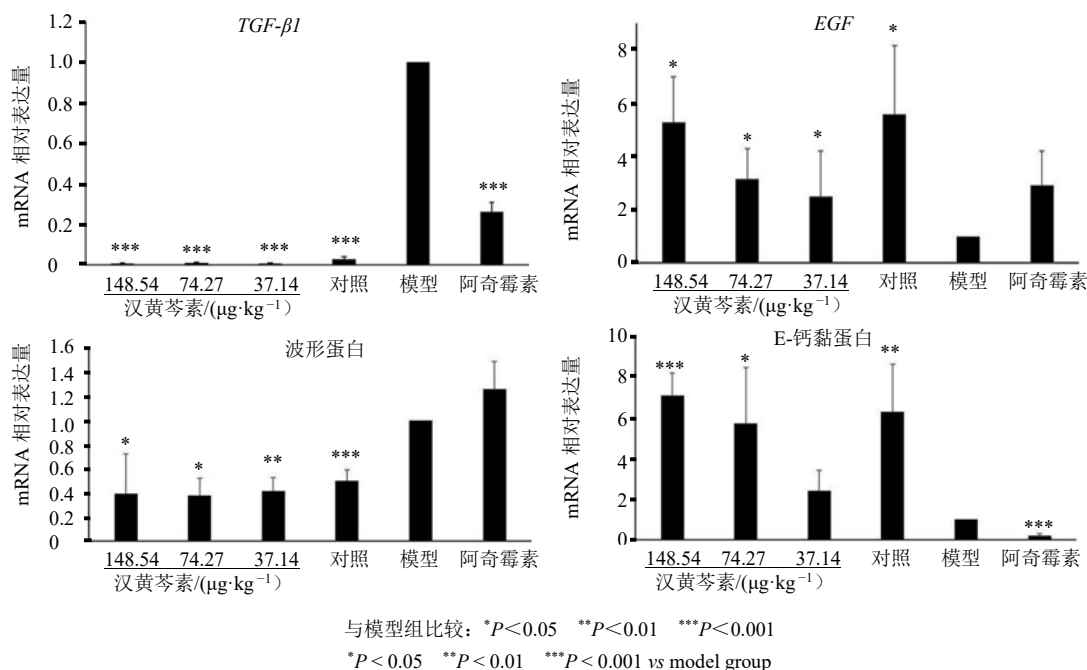


图 10 汉黄芩素对各组小鼠肺组织 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 Effect of wogonin on mRNA expression in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mRNA 表达明显降低,EGF 与 E-钙黏蛋白的 mRNA 表达均有不同程度升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

4 讨论

芩百清肺浓缩丸最早由黑龙江省中医药科学院研发,在临床上多用于止咳化痰平喘。目前已有的研究证实芩百清肺浓缩丸可抑制肺泡上皮细胞分化,促进肺组织修复^[15],能降低 MPP 的纤维化因子表达,起到抗纤维化沉积的作用^[16]。但对于其中的活性成分汉黄芩素的作用机制目前仍不明确。

肺炎支原体感染肺组织致使的肺纤维化主要作用机制包括炎症反应、EMT 等^[17]。目前已有研究证实 TGF- β 1 为 EMT 的主要诱导剂^[18],主要负责肺成纤维细胞的增殖和胶原的合成^[19]。

本研究通过前期体外分子对接模拟汉黄芩素与 TGF- β 1 的结合,以及后续的体内动物实验,探讨汉黄芩素干预后小鼠肺组织中间质形成相关因子表达水平的变化,以此确定 MPP 所致 EMT 的作用机制。实验结果表明,未施加汉黄芩素干预的模型组小鼠肺组织中有大量的 TGF- β 1 和波形蛋白蛋白的表达,且通过切片观察到肺各组织中发生了不同程度的病变,表现为肺泡壁塌陷,炎性细胞增多,肺泡周围出现大量胶原纤维沉积,这也进一步证实在肺炎支原体感染肺部组织时,存在 TGF- β 1 诱导 EMT 的过程。而通过汉黄芩素治疗后的 MPP 小鼠

肺组织形态结构治愈情况良好,肺组织中的胶原纤维和炎性细胞也有所减少,TGF- β 1 和波形蛋白的表达显著减少。该结果表明汉黄芩素抑制小鼠肺部炎症反应和肺纤维化的形成可能是通过降低肺组织中 TGF- β 1 的表达,以此来抑制 EMT 过程。而 EGF 对于细胞的增殖、分裂有着重要的作用,能够促进组织损伤部分的修复愈合^[20]。伴随着 TGF- β 1 表达的降低,汉黄芩素各给药组的 EGF mRNA 表达量都有所升高,上皮标志物 E-钙黏蛋白的表达也与 TGF- β 1 呈现负相关的趋势。

综上所述,汉黄芩素能够起到治疗 MPP 以及肺纤维化疾病的效果,其作用机制可能是一方面通过降低 TGF- β 1 和波形蛋白的表达,抑制 EMT 过程的发生;另一方面提高 EGF 和 E-钙黏蛋白的表达来实现的。且对比汉黄芩素各给药剂量组之间的差异可以看出,高剂量的汉黄芩素治疗效果最为突出。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 蔡玲利, 钟森. 肺炎支原体肺炎的研究进展 [J]. 河北医药, 2022, 44(11): 1726-1731.
- [2] Brown R J, Nguipdop-Djomo P, Zhao H X, et al. *Mycoplasma pneumoniae* epidemiology in England and Wales: A national perspective [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 157.

- [3] 王志坚, 王涛, 白建华, 等. 支气管肺炎中医临床证型与影像诊断的研究 [J]. 职业与健康, 1995, 11(2): 27-37.
- [4] 刘东旭, 彭东信. 长期反复 MP 感染致肺间质纤维化形成的实验研究 [J]. 同济医科大学学报, 1996, 25: 154-156.
- [5] Luo Q H, Cai Z W, 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.
- [6] 林泉, 缪长新, 魏旭华, 等. 连花清瘟颗粒联合阿奇霉素序贯治疗儿童肺炎支原体肺炎合并肺不张疗效及对 T 淋巴细胞亚群和炎性因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(2): 153-158.
- [7] 魏文峰, 刘焯, 霍金海, 等. 基于代谢组学的芩苈清肺浓缩丸治疗支原体肺炎小鼠的作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5211-5216.
- [8] 朴花子, 于兆霞, 朴日龙, 等. 汉黄芩素对脂多糖诱导一氧化氮和单核细胞趋化蛋白-1 的影响 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3): 20-21.
- [9] 玛热古丽·苏甫尔, 阿吉古丽·苏甫尔. 汉黄芩素对流感病毒感染肺泡巨噬细胞炎症相关因子的影响分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(11): 23.
- [10] Liao Y Y, Wang W Y, Huang X M, *et al.* Reduced graphene oxide triggered epithelial-mesenchymal transition in A549 cells [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 15188.
- [11] 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.
- [12] Hu H H, Chen D Q, Wang Y N, *et al.* New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 292: 76-83.
- [13] 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.
- [14] 张畅, 胡阿锦, 龚苗子, 等. 结直肠癌组织 CD3 免疫组织化学评分与肿瘤分化程度及预后关系分析 [J]. 中国医药生物技术, 2019, 14(4): 347-351.
- [15] 姚琳, 张俊威, 王博, 等. 芩苈清肺浓缩丸对肺炎支原体感染大鼠肺组织中 TGF- β 和 SP-A 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 564-569.
- [16] 蒙艳丽, 徐慧星, 王晓溪, 等. 芩苈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.
- [17] 张秀, 胡静, 覃惠, 等. 宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad 表达的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3326-3333.
- [18] Kasai H, Allen J T, Mason R M, *et al.* TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT) [J]. *Respir Res*, 2005, 6(1): 56.
- [19] 郭敬文, 胡晨阳, 薄存香, 等. 抗肺纤中药颗粒抑制 SiO₂ 诱导的大鼠肺组织上皮-间质转化 [J]. 职业与健康, 2020, 36(17): 2329-2334.
- [20] 戴月, 匡继林. 盆炎方对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TNF- α 、EGF 蛋白表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(4): 15-18.

[责任编辑 潘明佳]