

白术多糖抑制重症肺炎模型大鼠的炎症反应

孟德权, 秦欣, 陈玲, 覃军*

荆州市中心医院 儿科, 湖北 荆州 434020

摘要:目的 探讨白术多糖(PAM)对重症肺炎作用的分子机制。方法 将60只SD雄性大鼠随机分成对照组、模型组(气管穿刺注射肺炎克雷伯菌)、阳性药对照组(左氧氟沙星, 18 mg/kg)、PAM低(50 mg/kg)、高(200 mg/kg)剂量组。模型构建成功后,灌胃给药,1次/d,持续7 d,每组12只。对肺组织进行HE染色,观察其病理学变化并对其损伤程度进行评分;称量法测定肺组织湿/干比;血细胞分析仪检测外周血中白细胞和中性粒细胞数量;酶联免疫吸附反应检测血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-6的水平;Western blot检测肺组织中Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路相关蛋白质的表达。结果 模型组大鼠肺损伤评分及湿/干比、血液中白细胞和中性粒细胞数量、血清及BALF中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平以及肺组织中TLR4、MyD88蛋白表达和NF- κ B p56磷酸化水平均显著高于对照组($P < 0.05$)。与模型组比较,各药物组大鼠肺损伤得到明显改善;其中,PAM高剂量组大鼠外周血中白细胞和中性粒细胞数量均显著降低($P < 0.05$);血清及BALF中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平均显著降低($P < 0.05$),肺组织中TLR4、MyD88蛋白表达和NF- κ B p56磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 PAM对肺炎克雷伯菌所致重症肺炎模型大鼠具有一定的保护作用,其机制可能与调控TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路抑制炎症反应有关。

关键词: 白术多糖;重症肺炎;炎症反应;TLR4/MyD88/NF- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.09.1263

Polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* koidz. inhibit inflammatory response in rat model of severe pneumonia

MENG Dequan, QIN Xin, CHEN Ling, QIN Jun*

Department of Pediatrics, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* koidz. (PAM) to treat severe pneumonia. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into control group, model group (inoculation of *Klebsiella pneumoniae* by tracheal puncture), positive control group (levofloxacin, 18 mg/kg), PAM low-dose group (50 mg/kg) and PAM high-dose group (200 mg/kg) with 12 in each. After occurrence of severe pneumonia, the rats were orally administered the medicine once daily for 7 day. The lung tissue underwent histopathological examination using HE staining microscopy to find the pathological alterations and evaluate

收稿日期: 2023-12-25 修回日期: 2024-05-11

基金项目: 荆州市医疗卫生科技计划(29)

* 通信作者 (corresponding author): 357053516@qq.com

the extent of injury. Wet/dry ratio of lung tissue was measured by weighing method. The leukocytes and neutrophils counts in peripheral blood were determined by hematology analyzer. The level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of proteins related to the Toll-like receptor 4 (TLR4) / myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in lung tissues was detected using Western blot analysis. **Results** Compared with the control group, lung injury score and wet/dry ratio, the number of leukocytes and neutrophils in peripheral blood, the level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum and in BALF, protein expression of TLR4 and MyD88 and the phosphorylation level of NF- κ B p56 in lung tissues from model group were all significantly increased ($P < 0.05$). The lung injury of rats in each levofloxacin treatment group exhibited significant improvement compared to the model group. Among them, the number of leukocytes and neutrophils in peripheral blood of rats in PAM high-dose group decreased significantly ($P < 0.05$); The level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum and BALF, the protein expression of TLR4 and MyD88 and the phosphorylation level of NF- κ B p56 in lung tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** The administration of PAM exerts a specific protective effect against *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia in rats, potentially suppress inflammatory response through modulation of the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

Key words: polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* koidz.; severe pneumonia; inflammation; TLR4/MyD88/NF- κ B

肺炎是一个重要的临床和公共卫生问题,其可发展为重症肺炎(severe pneumonia)。重症肺炎常发生于社区或医院等易感区域,表现出呼吸衰竭和累及其他系统功能等症状。重症肺炎的病原体组成复杂,含多种致病细菌或病毒^[1],治疗难度比较大。目前,临床上针对重症肺炎的初始阶段常采用抗生素进行治疗,但长期使用抗生素导致的耐药性大大制约了其治疗效率,在疾病中、后期效果乏力^[2]。近些年,越来越多的中医药被证明对重症肺炎具有良好的临床效果,例如在2019年末爆发的新型冠状病毒肺炎疫情便凸显了中医药不可或缺的地位^[3]。白术多糖(polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* koidz., PAM)是提取于草本植物白术(*A. macrocephala* Koidz. AM)的多糖类物质,由半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖等组成,其生物活性多表现在抗氧化、抗衰老、抗肿瘤及增强免疫力等方面^[4],而在治疗重症肺炎上尚未有十分详尽的报道。本研究拟通过构建重症肺炎大鼠模型,观察PAM的抗炎保护效果,并初步探究其作用分子机制,以期中医药在重症肺炎中的应用推广提供新见解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 60只5~8周龄SPF级SD雄性大

鼠(体质量180~230g,购自河北省实验动物中心),所有大鼠适应性喂养1周后开始进行实验。

1.1.2 主要药物与试剂:白术多糖(纯度 $\geq 98\%$, HPLC,陕西慈缘生物技术有限公司);左氧氟沙星片[规格:0.1g,第一三共制药(北京)有限公司];肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)菌株由荆州市中心医院检验科细菌室提供,注射使用时稀释至 1.2×10^9 CFU/mL;HE染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);大鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒、全蛋白质提取试剂盒(南京建成生物技术有限公司);兔抗大鼠TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65和 β -actin一抗以及羊抗兔IgG二抗(Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模与给药:将SD大鼠随机分成对照组、模型组、阳性药对照组、PAM低、高剂量组, $n=12$ 。除对照组以外,剩余4组大鼠均参照文献[5]的气管穿刺注射肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)法建立重症肺炎大鼠模型。方法概述如下:建模前1d,复苏肺炎克雷伯菌,次日收集菌液并稀释至 1.2×10^9 CFU/mL备用。采用腹腔注射戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉大鼠,暴露颈上段气管,每只大鼠注射0.3 mL菌液,注射完毕后立即竖立大鼠并持续约20 s,以便肺炎克雷伯菌菌液入肺,

进而提高接种质量。模型构建成功的标志:观察模型大鼠食欲、活动度、反应意识、呼吸功能、体质量等较对照组大鼠有明显差异($P<0.05$)。诊断确定模型构建成功后,阳性药对照组(左氧氟沙星,按成人剂量折算 18 mg/kg),PAM 低剂量组(50 mg/kg)和 PAM 高剂量组(200 mg/kg)(水溶解)大鼠按 10 mL/kg 给予相应药物灌胃治疗,对照组和模型组大鼠则灌胃等体积的蒸馏水,1次/d,持续7d。治疗过程中,各组大鼠均未出现死亡现象。

1.2.2 取材与标本收集:末次灌胃结束后6h,采集大鼠腹主动脉血,平均分成两份,一份用于血细胞的计数,另一份用于分离血清进行ELISA检测。肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluids, BALF)的制备方法概述:用输液管套管插入主支气管约 $3\sim 4\text{ cm}$,加以固定,无菌 0.9% 氯化钠溶液 3 mL 经输液管套管注入肺腔,抽回再灌注,反复抽注3次,最后抽出灌洗液为肺泡灌洗1次,重复该灌洗操作3次后收集总灌洗液进行ELISA检测。最后,颈椎脱臼处死所有大鼠后迅速分离肺组织,一部分用于测量湿、干重以便统计各组大鼠的肺组织湿/干比,剩余的肺组织一半置于甲醛中固定,一半在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2.3 HE检测肺组织病理学:取出预先在甲醛溶液中固定好的肺组织,用刀片分割成小块置于包埋盒中流水冲洗过夜。石蜡包埋并制备成石蜡切片,然后进行HE染色,于显微镜下观察其组织病理学变化并进行肺组织损伤评分^[6],分6个等级,分别对应 $0\sim 5$ 分。每张病理图片选取3个视野进行评价,取3个得分的平均分为该片的最终得分,每组随机选取6只大鼠的肺组织制片。

1.2.4 肺组织湿/干比:每组随机选取6只大鼠肺组织分别称湿重,在烘烤箱中烘干后再称干重,最后计算肺组织湿/干比。

1.2.5 外周血白细胞及中性粒细胞计数:取新鲜的大鼠腹主动脉血,在血细胞分析仪上自动检测白细胞及中性粒细胞的数量。

1.2.6 ELISA检测血清及BALF炎症因子检测:取预先制备好的血清及BALF,按对应ELISA检测试剂盒相关操作分别测定大鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平。

1.2.7 Western blot检测肺组织TLR-4、MyD88、

p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65蛋白水平:取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的肺组织适量,裂解提取组织总蛋白质。蛋白质定量后取 $25\text{ }\mu\text{g}$ 上样进行SDS-PAGE分离。将蛋白质转至PVDF膜上, 5% 脱脂牛奶封闭1h。加入一抗(TLR-4、MyD88、p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65、 β -actin; $1:1\ 000$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入羊抗兔IgG二抗($1:5\ 000$)室温孵育0.5h。加入化学发光试剂进行显影,分析条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析,计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较选择单因素方差分析,采用Tukey检验进行组间进一步两两比较。

2 结果

2.1 白术多糖改善重症肺炎大鼠肺损伤

正常对照组大鼠肺组织结构正常,无明显病理损伤,而模型组大鼠肺组织损伤严重,多处肺泡壁增厚,肺泡水肿,并有大量炎性细胞浸润,损伤评分显著增加($P<0.05$);给药处理后,大鼠肺组织损伤得到有效缓解,阳性药对照组和PAM低、高剂量组损伤评分显著低于模型组($P<0.05$)(图1)。

2.2 白术多糖改善重症肺炎大鼠肺组织水肿

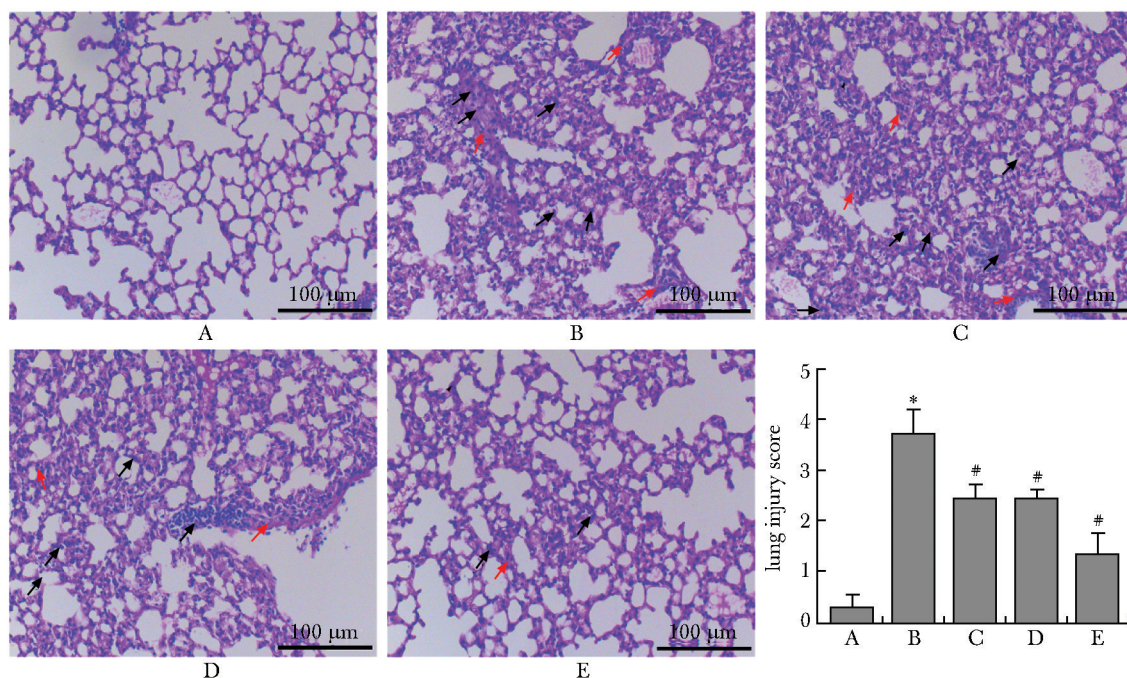
与正常对照组比较,模型组大鼠肺组织出现水肿,湿/干比显著增加($P<0.05$);经过给药处理后,阳性药对照组和PAM低、高剂量组大鼠肺组织水肿减轻,湿/干比显著降低($P<0.05$)(表1)。

2.3 白术多糖减少重症肺炎大鼠血液中白细胞和中性粒细胞数量

与正常对照组比较,模型组大鼠血液中白细胞和中性粒细胞均显著增加($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血液中白细胞和中性粒细胞均显著降低($P<0.05$)(表2)。

2.4 白术多糖降低重症肺炎大鼠血清和BALF炎症因子水平

模型组大鼠血清和BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量均显著高于正常对照组($P<0.05$);经过给药处理后,阳性药对照组和PAM低、高剂量组大鼠血清和BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的含量显著降低($P<0.05$)(图2)。



Black arrow. inflammatory cell infiltration; Red arrow. alveolar wall thickening and edema; A. control group; B. model group; C. positive control group; D. PAM low-dose(50 mg/kg) group; E. PAM high-dose(200 mg/kg) group; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group.

图1 PAM改善重症肺炎大鼠肺组织损伤

Fig 1 PAM improved lung tissue damage in rats with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表1 PAM减轻重症肺炎大鼠肺组织水肿

Table 1 PAM reduced pulmonary edema in rats with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

group	therapeutic dose/ (mg/kg)	lung wet/ dry ratio
control	/	3.16 ± 0.21
model	/	5.88 ± 0.22*
positive control	18	5.00 ± 0.29#
PAM low-dose	50	4.97 ± 0.16#
PAM high-dose	200	3.92 ± 0.32#

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group.

2.5 白术多糖抑制重症肺炎大鼠肺组织 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路激活

与正常对照组比较,TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65蛋白在模型组大鼠肺组织中的表达量均显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,TLR4、MyD88、p-NF- κ B p65蛋白在阳性药对照组和PAM低、高剂量组大鼠肺组织中的表达量均显著降低($P < 0.05$)(图3)。

3 讨论

临床确诊重症肺炎患者多需在重症监护室内接

表2 PAM减少重症肺炎大鼠血液中白细胞和中性粒细胞数量

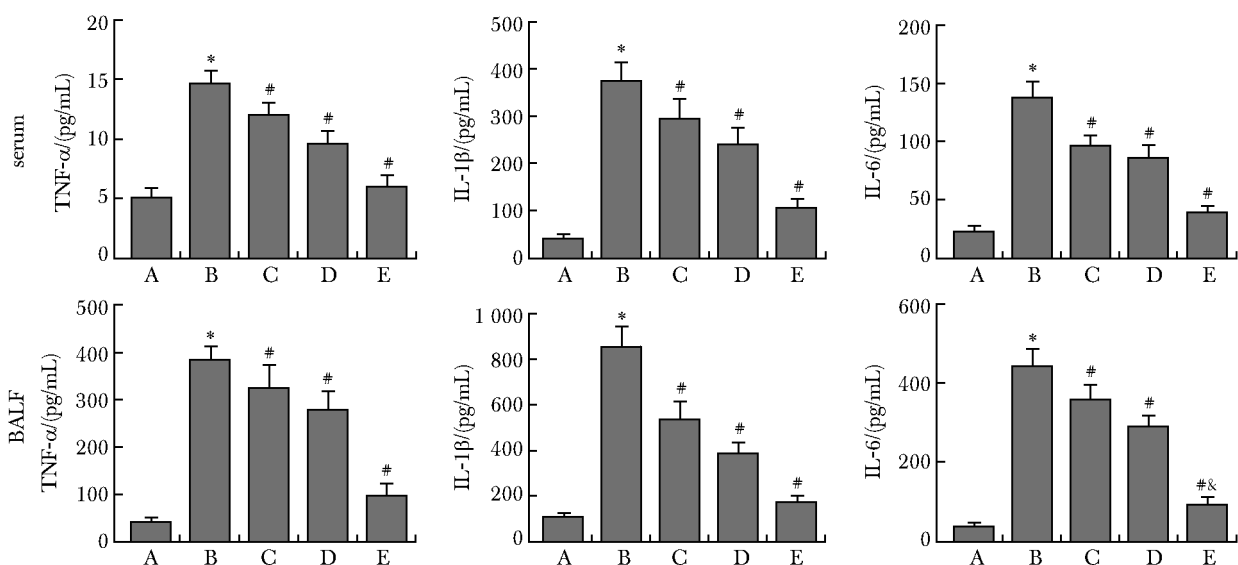
Table 2 PAM reduced the number of leukocytes and neutrophils in blood of rats with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

group	therapeutic dose (mg/kg)	leukocytes ($\times 10^9$ cells/L)	neutrophils ($\times 10^9$ cells/L)
control	/	7.50 ± 0.72	2.82 ± 0.42
model	/	22.58 ± 2.10*	15.35 ± 1.16*
positive control	18	14.15 ± 1.10#	11.73 ± 1.25#
PAM low-dose	50	15.47 ± 1.28#	13.03 ± 1.72#
PAM high-dose	200	9.08 ± 0.69#	5.82 ± 0.77#

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group.

受治疗,预后较差,死亡率高。近些年,随着对该病认识的不断加深,其治疗策略逐渐演变成了由基础生命体征维持、抗生素治疗、免疫调节剂治疗和全身多器官支持治疗的多阶段、多形式的治疗方式;其中,抗生素的耐药性是制约其临床治疗效果的重要因素之一,替代药物的开发已迫在眉睫。

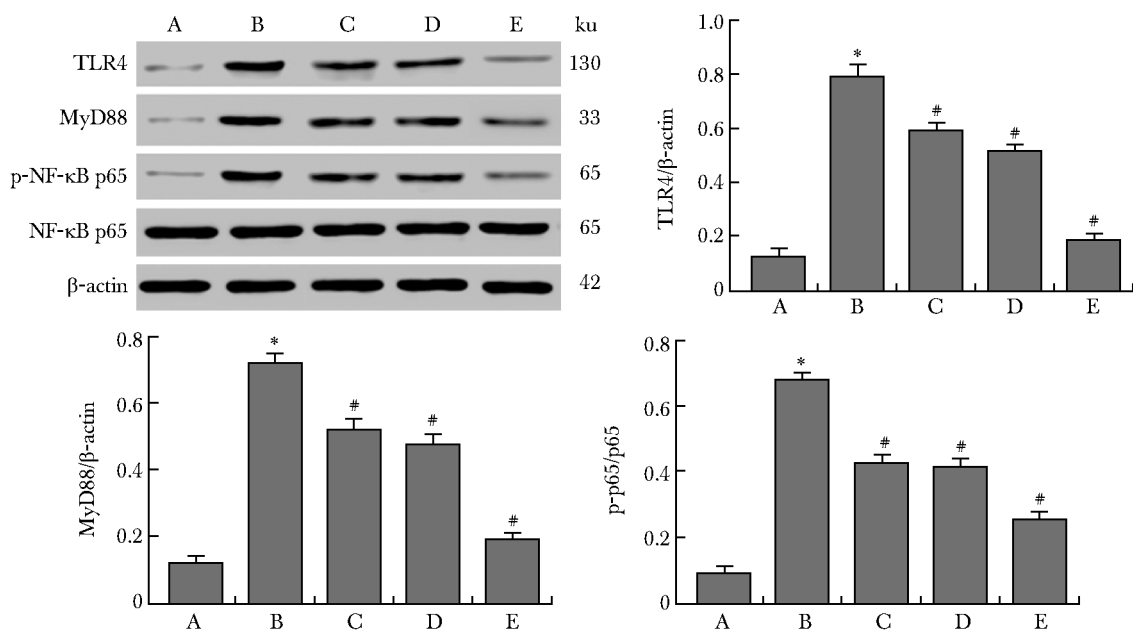
目前,涉及中医药对于重症肺炎的治疗研究报道日趋广泛,其机制多集中于对抗炎及增强免疫力



A. control group; B. model group; C. positive control group; D. PAM low-dose (50 mg/kg) group; E. PAM high-dose (200 mg/kg) group; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group.

图2 PAM降低重症肺炎大鼠血清和BALF中炎症因子水平

Fig 2 PAM reduced the levels of inflammatory factors in serum and BALF of rats with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



A. control group; B. model group; C. positive control group; D. PAM low-dose (50 mg/kg) group; E. PAM high-dose (200 mg/kg) group; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group.

图3 PAM抑制重症肺炎大鼠肺组织TLR4/MyD88/NF-κB信号通路激活

Fig 3 PAM inhibited the activation of TLR4/MyD88/NF-κB pathway in lung tissue of rats with severe pneumonia ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

等方面,较抗生素其具备基本无耐药性等优越性。肺炎克雷伯菌是医院感染导致重症肺炎的常见病原菌之一,患者感染后会引发内源性炎症反应,造成严重的组织损伤和器官功能衰竭^[7]。本研究通过气管穿刺注射肺炎克雷伯菌复制了重症肺炎大鼠模

型,观察检测显示其肺组织损伤严重、炎症细胞浸润明显、血液中白细胞和粒细胞数量增加、血清及BALF中分泌有大量促炎细胞因子,提示模型构建成功。有临床数据显示,肺炎克雷伯菌对抗生素耐药率高达80%,其多重耐药率也呈上升趋势^[8]。而

中医药对克雷伯杆菌肺炎具有显著的抑制作用。例如,鱼腥草提取物可降低强克雷伯杆菌肺炎大鼠肺部感染情况及炎性水平^[9]。秦皮甙(Fraxin)则通过抑制细胞凋亡,促进肺组织损伤修复,进而缓解肺炎克雷伯菌所致重症肺炎^[10]。而本研究发现,PAM能显著通过抗炎作用发挥其对克雷伯菌所致重症肺炎大鼠肺损伤的保护作用。

炎性因子的大量释放是重症肺炎的主要临床表现之一^[11]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6是机体主要的促炎细胞因子,其中,TNF- α 能激活巨噬细胞的分泌,引发局部炎症反应,使器官受累;IL-1 β 参与机体的免疫反应,促进白细胞和中性粒细胞的产生;IL-6能刺激机体免疫反应,增强免疫细胞功能^[12]。本研究显示,与模型组比较,白术多糖高剂量组能显著降低肺炎大鼠血液中白细胞和粒细胞含量以及血清及BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的分泌水平,提示白术多糖的抗炎作用显著。

TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路是与炎性调

节相关的经典信号通路,其涉及多种中草药的抗炎机制^[13]。其中,TLR4是TLRs家族中的重要成员,MyD88是其适配蛋白,NF- κ B是一种重要的核转录因子。机体在外源病原体的刺激下,经TLR4/MyD88途径激活NF- κ B,进而介导炎症反应的发生与发展^[14]。本研究显示,模型组大鼠肺组织TLR4、MyD88蛋白相对表达量及NF- κ B p65磷酸化水平均显著增加,说明肺炎克雷伯菌激活了机体的TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路;而PAM给药显著降低大鼠肺组织TLR4、MyD88蛋白表达及NF- κ B p65磷酸化水平,说明PAM对激活的TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路具有抑制作用。

综上所述,PAM有效改善肺炎克雷伯菌所致重症肺炎大鼠的肺损伤,其机制可能与抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的活化及炎性因子的释放有关。本研究为PAM治疗肺炎克雷伯菌所致重症肺炎提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 郭慧颖,段晓峰. 84例重症肺炎患儿痰培养病原学分析[J]. 临床医学, 2021, 41:62-64.
- [2] 刘巧艳,王永兴,王萍,等. 多药耐药菌感染重症肺炎患者预后的危险因素分析[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23:1883-1888+1870.
- [3] 曾予,赵敏. 中医药抗击新冠肺炎疫情的纵深实践及制度构建[J]. 时珍国医国药, 2020, 31:951-954.
- [4] Liu C, Wang S, Xiang Z, et al. The chemistry and efficacy benefits of polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:952061. Doi: 10.3389/fphar.2022.952061.
- [5] 陈业民,黄文杰,李胜利,等. 肺炎克雷伯菌致大鼠重症肺炎模型的建立[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25:1498-1502.
- [6] 李彦桥,黄婉奕,高玥,等. 三味龙胆花片对克雷伯菌急性肺炎大鼠中NF- κ B信号通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29:713-718.
- [7] 曹培,杨勇,张志勇. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌血流感染患者死亡危险因素分析[J]. 医药导报, 2021, 40:1048-1052.
- [8] 黄郁竹,张冰琦,杨忠贤,等. 2499例肺炎克雷伯菌临床分布及耐药性分析[J]. 基础医学与临床, 2016, 36:1554-1557.
- [9] 王晓鑫,白静,任智慧,等. 鱼腥草提取物对大鼠肺炎克雷伯菌肺炎的干预效果[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32:3375-3379.
- [10] 吴萍,何文龙,付云,等. 秦皮甙对重症肺炎大鼠炎症因子表达及相关通路活化的影响[J]. 免疫学杂志, 2020, 36:292-298.
- [11] Jobs A, Simon R, de Waha S, et al. Pneumonia and inflammation in acute decompensated heart failure: a registry-based analysis of 1939 patients[J]. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2018, 7:362-370.
- [12] Barichello T, Santos ID, Savi GD, et al. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*[J]. J Neuroimmunol, 2010, 221:42-45.
- [13] Liu L, Zhou L, Wang L, et al. MUC1 attenuates neutrophilic airway inflammation in asthma by reducing NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis through the inhibition of the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway[J]. Respir Res, 2023, 24:255. doi:10.1186/s12931-023-02550-y.
- [14] Xu J, Lu C, Liu Z, et al. Schizandrin B protects LPS-induced sepsis via TLR4/NF- κ B/MyD88 signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10: 1155-1163.