

麻杏石甘汤及其拆方对肺炎链球菌致肺炎小鼠的影响

张辉果, 董志巧, 王晓利, 陈团营, 田新磊
(河南省中医院儿科, 河南 郑州 450009)

摘要: 目的 探讨麻杏石甘汤及其拆方对肺炎链球菌致肺炎小鼠的影响。方法 小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(头孢羟氨苄)及麻杏石甘汤全方组、拆方Ⅰ组(杏仁、石膏、甘草)、拆方Ⅱ组(麻黄、石膏、甘草)、拆方Ⅲ组(麻黄、杏仁、甘草)、拆方Ⅳ组(麻黄、杏仁、石膏),除正常对照组外,各组小鼠感染肺炎链球菌致肺炎。透射电镜观察肺组织超微结构和细胞凋亡,Western blot和免疫组化检测肺组织Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达,实时荧光定量PCR法检测三者mRNA表达。结果 与模型组比较,麻杏石甘汤全方组、拆方Ⅱ组、拆方Ⅳ组Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),全方组、拆方Ⅲ组、拆方Ⅳ组Bcl-2/Bax显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),以全方组更明显,各拆方组调控作用依次为Ⅳ>Ⅱ>Ⅲ>Ⅰ;全方组、拆方Ⅳ组Bax、caspase-3 mRNA表达显著降低,Bcl-2 mRNA表达显著升高($P < 0.01$)。结论 麻杏石甘汤能有效抑制肺炎链球菌诱导的小鼠肺炎,以全方效果最佳,方中麻黄、石膏作用较大。

关键词: 麻杏石甘汤;拆方;肺炎链球菌;肺炎;Bax;Bcl-2;caspase-3

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2084-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.013

Effects of Maxing Shigan Decoction and its decomposed formulae on mice with *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia

ZHANG Hui-guo, DONG Zhi-qiao, WANG Xiao-li, CHEN Tuan-ying, TIAN Xin-lei
(Department of Pediatrics, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450009, China)

KEY WORDS: Maxing Shigan Decoction; decomposed formulae; *streptococcus pneumoniae*; pneumonia; Bax; Bcl-2; caspase-3

肺炎链球菌 *Streptococcus pneumoniae* 是引起儿童社区获得性肺炎最常见主要的细菌病原体^[1-3],以往临床治疗以抗生素为主,但随着耐大环内酯类、万古霉素类细菌的出现^[4],给治疗带来了严峻考验。麻杏石甘汤是《伤寒论》经典方剂^[5],由麻黄(去节)四两(9g)、杏仁(去皮尖)五十个(9g)、甘草(炙)二两(6g)、石膏(碎、绵裹)半斤(18g)组成,加减结合中医定向透药治疗小儿支气管肺炎疗效显著,能显著改善肺炎喘嗽风热犯肺证患儿临床症状,优于阿奇霉素与利巴韦林联合治疗^[6],但尚无对其作用机制的研究。近年来研究发现,凋亡蛋白与肺炎小鼠肺组织炎症、肺泡壁增厚、肺泡上皮细胞破坏、细胞浸润等特征的变化密切相关^[7-9],故本实验考察不含麻

黄、杏仁、石膏、甘草的麻杏石甘汤拆方及其全方对肺炎链球菌致肺炎小鼠Bax、Bcl-2、caspase-3凋亡蛋白表达的影响,研究该方作用机制,并初步考证其在治疗肺炎链球菌D39感染所致肺炎方面的临床配伍是否科学合理。

1 材料

1.1 试药 麻黄、杏仁、甘草、石膏均由河南省中医院门诊中药房提供,经河南中医药大学药教研室董成明教授鉴定为正品。肺炎链球菌标准株(D39)购于中国医学细菌保藏管理中心,经血平板培养18h后用无菌生理盐水稀释至 6×10^8 CFU/mL(2麦氏单位)。头孢羟氨苄片(清远华能制药有限公司,250mg/片,国药准字H44023670,批号171003)。兔抗小鼠Bcl-2多抗(批号196542)、兔

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: 河南省卫生厅科技创新人才项目(172102310322)

作者简介: 张辉果(1981—),女,硕士,主治医师,从事中医儿科疾病研究。E-mail: zhanghuiguo2@163.com

抗小鼠 caspase-3 单抗 (批号 ZP4126BP26)、兔免疫球蛋白 (IgG) -免疫组化试剂盒 (批号 12109 A)、兔抗小鼠 Bax 单抗 (批号 13CM395 A)、BCA 蛋白定量试剂盒、DAB 试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物 昆明种无特定病原体级 (SPF) 健康小鼠 320 只, 雌雄各半, 5~6 周龄, 体质量 18~22 g, 购于河南省动物实验中心, 生产许可证号 SCXK (豫) 2010-0001, 动物质量合格证号 41003100001519。动物饲养于河南中医药大学动物实验中心, 使用许可证编号 SYXK (豫) 2010-0001, 温度 20~25 ℃, 相对湿度 40%~70%, 自由摄食进水。

1.3 仪器 SW-CJ-1F 超净工作台 (郑州宏朗仪器设备有限公司); Ion GeneStudio S5 Series DNA 测序仪、低温高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DU-600 蛋白-核酸分析仪 (美国 Beckman 公司); ABI 2720 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司); H-600 电子显微镜、H-7650 透射电镜 (日本日立公司); IX83 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); UC7 超薄切片 (德国 Leica 公司); LC II 实时荧光定量 PCR 仪 (美国罗氏公司); iMark 酶标仪、Experion 电泳仪、全自动凝胶分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 供试品制备

2.1.1 全方提取物 按麻杏石甘汤全方组成比例 (麻黄 9 g、杏仁 9 g、石膏 18 g、甘草 6 g) 混合药材, 粉碎, 过 20 目筛, 取 210 g (5 倍处方量), 8 倍量蒸馏水回流提取 2 次, 每次 3 h, 滤过, 合并滤液, 50 ℃ 下减压浓缩, 干燥, 即得, 蒸馏水配制成生药量 1 g/mL 的溶液。提取物称定质量, 计算出膏率, HPLC 法测定麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酸含量, 化学滴定法测定 Ca^{2+} 含量。

2.1.2 拆方提取物 按杏仁 9 g、石膏 18 g、甘草 6 g 的比例混合, 粉碎, 过 20 目筛, 取 165 g (5 倍拆方量), 按“2.1.1”项下方法处理, 作为拆方 I; 按麻黄 9 g、石膏 18 g、甘草 6 g 的比例混合, 粉碎, 过 20 目筛, 取 165 g (5 倍拆方量), 按“2.1.1”项下方法处理, 作为拆方 II; 按麻黄 9 g、杏仁 9 g、甘草 6 g 的比例混合, 粉碎, 过 20 目筛, 取 120 g (5 倍拆方量), 按“2.1.1”项下方法处理, 作为拆方 III; 按麻黄 9 g、杏仁 9 g、石膏 18 g 的比例混合, 粉碎, 过 20 目筛, 取 180 g

(5 倍拆方量), 按“2.1.1”项下方法处理, 作为拆方 IV。蒸馏水配制成生药量 1 g/mL 的溶液。

2.2 分组、造模及给药 320 只小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成正常对照组、阳性对照组、模型组及麻杏石甘汤全方组、拆方 I 组、拆方 II 组、拆方 III 组、拆方 IV 组, 每组 40 只。除正常对照组外, 其余各组小鼠均在乙醚轻度麻醉下鼻内接种 6×10^8 CFU/mL 肺炎链球菌 D39 标准菌株溶液, 每只 0.1 mL, 接种后呈 45° 保持 30 s 以利于溶液充分吸入, 连续接种 3 d; 正常对照组小鼠与其他组隔离饲养在同等条件下的房间, 接种等量生理盐水。接种后, 观察各组小鼠大便、体质量、活动度、进食等情况。

滴鼻造模 1 h 后开始给药, 根据小鼠体质量按成人 1 d 剂量折算, 麻杏石甘汤全方组为 5.5 g/kg, 拆方 I、II、III、IV 组分别为 4.71、3.14、4.32、4.32 g/kg。肺炎链球菌感染后 1 h, 麻杏石甘汤全方组小鼠按临床等效剂量的 3 倍 (16.5 g/kg) 灌胃给药, 拆方 I、II、III、IV 组小鼠分别按 14.14、9.43、12.96、12.96 g/kg 剂量灌胃, 每天 2 次; 正常对照组、模型组小鼠灌胃给予等剂量生理盐水, 每天 2 次, 连续 14 d; 阳性对照组小鼠灌胃给予头孢羟氨苄片药液 (10 mg/mL) 0.15 g/kg, 每天 1 次, 连续 3 d, 之后停药 4 d, 2 个循环, 停药期间灌胃给予等量蒸馏水。

2.3 组织样本采集 于给药后的第 3、7、11、14 天采集 (最后 1 次给药后先禁水禁食 4 h, 再采集)。各组随机取 10 只小鼠, 雌雄各半, 脱颈椎处死, 取出肺脏, 4% 多聚甲醛固定左肺, 常规石蜡包埋, 连续切片, 厚度 5 μ m, 备用; 右肺保存于 -80 ℃ 冰箱中, 备用。

2.4 小鼠肺组织超微结构观察 取各组小鼠给药第 3、7、11、14 天采集的右肺样本, 取其上叶组织, 2.5% 戊二醛预固定, 1% 锇酸固定, 环氧树脂浸透和包埋, 切片, 乙酸双氧铀、枸橼酸铅双层染色, 透射电镜观察超微结构变化。

2.5 小鼠肺组织 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达检测 取“2.3”项下小鼠肺组织石蜡切片, 免疫组化法检测 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达, 分别滴加相应一抗 (1:500、1:300、1:500), 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 染色液显色, 测定平均吸光度, 进行半定量分析。

然后, Western blot 法继续检测三者蛋白表达。称取“2.3”项下各组小鼠肺组织, 提取总蛋白,

BCA 试剂盒进行定量。各取 25 μg ，电泳分离，半干电转移至 PVDF 膜，5% 奶粉液封闭 2 h，加入相应一抗（稀释倍数同免疫组化法），4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置过夜，再加入相应二抗（1 : 5 000）孵育 1 h，化学发光法显色。以 GAPDH 为内参，Quantity One 软件对蛋白条带进行定量分析，计算各组样品目的蛋白条带与内参 GAPDH 条带灰度的比值，作为相对表达量。

2.6 小鼠肺组织 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* mRNA 表达检测 实时定量 PCR 法检测 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* mRNA 表达，所用引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。取各组小鼠肺组织，制成细胞悬液，提取 RNA，分析其纯度及完整性，质量合格后进行反转录，以其产物为模板，分别加入相应引物，以 GAPDH 为内参进行实时定量 PCR 检测。引物序列：*Bax* 正向 5'-GTGAGGAT-AGACGTCACACAG-3'，反向 5'-TATAGAGAGT-GAAGTGGCACGAG-3'；*Bcl-2* 正向 5'-CAGTCCT-CACGCATCTCTAC-3'，反向 5'-AGCTCAGT-CACTCTCGCGATA-3'；*caspase-3* 正向 5'-TCTCTA-GACGTACGGGCGTGG-3'，反向 5'-AGAGACCG-GCGGTAGAATGC-3'。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间差异比较采用单因素方差分析，各时间点差异比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠肺脏超微结构 图 1 显示，正常对照组小鼠肺泡壁完整，游离面可见少量微绒毛，细胞胞质均匀，核膜完整；模型组小鼠细胞膜膨出，异染色体凝聚在膨出的细胞膜周边，II 型肺泡细胞突起膨大，出现凋亡特征；麻杏石甘汤全方组小鼠 II 型肺泡细胞形态较正常，细胞板层小体增多，异质染色体聚集，肺泡细胞表面有微绒毛存在，可见脱落，间质内可见胶原纤维少许；拆方 I 组小鼠 II 型肺泡细胞减少，细胞核凸起，细胞核内异质染色体聚集为粗块，细胞表面有少许微绒毛存在，血管肿胀，可见细胞间堆积胶原纤维；拆方 II 组小鼠 II 型肺泡细胞减少，细胞核形状规则，染色质聚集，板层小体数量减少，肺泡之间间隔较小，有少许细胞微绒毛存在，有大量的血管肿胀可见；拆方 III 组小鼠 II 型肺泡细胞减少较多，细胞核凸起严重，染色质聚集成块，板层小体数量减少较多，肺泡之间有一定间隔，有微量细胞微绒毛存在，血管肿胀清晰可见；拆方 IV 组小鼠 II 型肺泡细胞急剧减少，细胞核凸起变形，染色质聚集成团块，板层小体数量大量减少，肺泡之间间隔较大，细胞微绒毛不易察觉，血管肿胀严重；阳性对照组小鼠 II 型肺泡细胞有所增多，细胞核及其核仁外形均完整，II 型肺泡细胞内板层小体的形态规整，细胞游离面微绒毛较丰富，细胞间质内有胶原纤维可见。

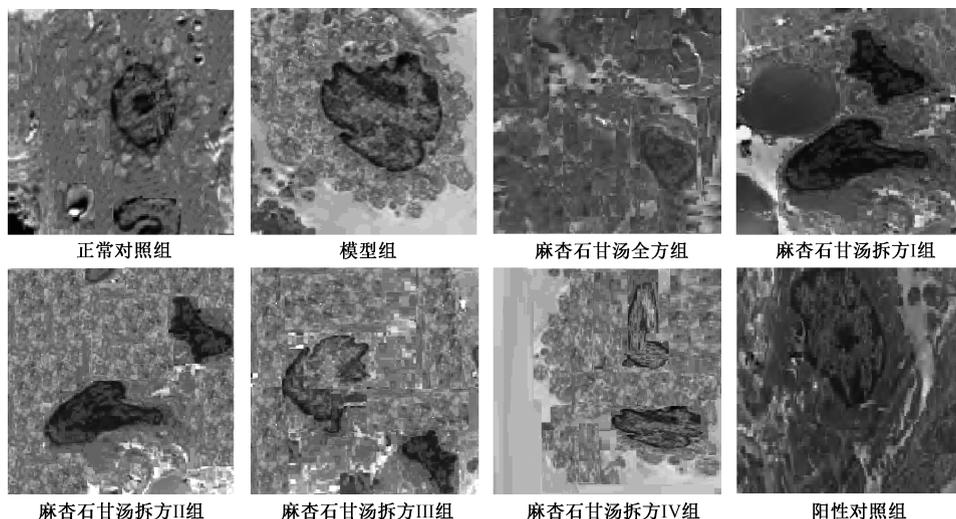


图 1 各组小鼠肺组织超微结构变化

Fig. 1 Ultrastructure changes of mouse lung tissues in various groups

3.2 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* 蛋白表达 首先，采用免疫组化法进行检测。表 1 显示，与正常对照组比较，模型组 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* 蛋白表达极显

著升高 ($P < 0.01$)，在不同时间点的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；与模型组比较，麻杏石甘汤全方组第 3 天三者蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)，第 7

天 Bax、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), caspase-3 蛋白表达极显著降低 ($P < 0.01$), 第 11、14 天三者蛋白表达极显著降低 ($P < 0.01$); 拆方 I 组各时间点三者蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$); 拆方 II 组第 7、11、14 天 Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 第 14 天 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 第 11、14 天 caspase-3 蛋白表达显

著降低 ($P < 0.05$); 拆方 III 组各时间点 Bax、caspase-3 蛋白表达无显著差异 ($P > 0.05$), 第 7、11、14 天 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 拆方 IV 组各时间点 Bax、Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 第 11、14 天 caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达比较 (免疫组化, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Comparison of Bax, Bcl-2 and caspase-3 protein expressions among various groups (immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | 时间 | Bax | Bcl-2 | Caspase-3 |
|---------------|--------------------------|--------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照组 | — | 第 3 天 | 0.163±0.003 | 0.178±0.004 | 0.174±0.001 |
| | | 第 7 天 | 0.165±0.004 | 0.177±0.003 | 0.175±0.002 |
| | | 第 11 天 | 0.164±0.003 | 0.178±0.004 | 0.174±0.001 |
| | | 第 14 天 | 0.167±0.004 | 0.176±0.003 | 0.174±0.002 |
| 模型组 | — | 第 3 天 | 0.196±0.005** | 0.204±0.003** | 0.199±0.002** |
| | | 第 7 天 | 0.197±0.006** | 0.202±0.003** | 0.198±0.001** |
| | | 第 11 天 | 0.195±0.005** | 0.203±0.002** | 0.199±0.002** |
| | | 第 14 天 | 0.194±0.004** | 0.202±0.002** | 0.199±0.001** |
| 麻杏石甘汤全方组 | 16.5 | 第 3 天 | 0.184±0.003 [△] | 0.185±0.002 [△] | 0.186±0.002 [△] |
| | | 第 7 天 | 0.181±0.004 [△] | 0.184±0.002 [△] | 0.175±0.001 ^{△△} |
| | | 第 11 天 | 0.175±0.003 ^{△△} | 0.175±0.003 ^{△△} | 0.176±0.002 ^{△△} |
| | | 第 14 天 | 0.175±0.004 ^{△△} | 0.174±0.002 ^{△△} | 0.175±0.001 ^{△△} |
| 麻杏石甘汤拆方 I 组 | 14.14 | 第 3 天 | 0.192±0.006 [#] | 0.201±0.002 ^{##} | 0.197±0.002 |
| | | 第 7 天 | 0.191±0.005 [#] | 0.201±0.001 ^{##} | 0.196±0.003 [#] |
| | | 第 11 天 | 0.191±0.005 ^{##} | 0.199±0.002 ^{##} | 0.196±0.002 ^{##} |
| | | 第 14 天 | 0.190±0.006 ^{##} | 0.198±0.001 ^{##} | 0.195±0.003 ^{##} |
| 麻杏石甘汤拆方 II 组 | 9.43 | 第 3 天 | 0.186±0.003 | 0.196±0.001 [#] | 0.193±0.002 [#] |
| | | 第 7 天 | 0.185±0.004 [△] | 0.195±0.001 [#] | 0.190±0.001 ^{##} |
| | | 第 11 天 | 0.184±0.005 ^{△#} | 0.193±0.001 ^{##} | 0.183±0.003 ^{△#} |
| | | 第 14 天 | 0.185±0.003 ^{△#} | 0.192±0.000 ^{△##} | 0.181±0.001 ^{△#} |
| 麻杏石甘汤拆方 III 组 | 12.96 | 第 3 天 | 0.188±0.005 | 0.194±0.002 [#] | 0.194±0.002 [#] |
| | | 第 7 天 | 0.187±0.004 | 0.191±0.001 ^{△#} | 0.191±0.001 ^{##} |
| | | 第 11 天 | 0.187±0.005 [#] | 0.187±0.001 ^{△#} | 0.189±0.003 ^{##} |
| | | 第 14 天 | 0.186±0.004 [#] | 0.188±0.002 ^{△#} | 0.190±0.002 ^{##} |
| 麻杏石甘汤拆方 IV 组 | 12.96 | 第 3 天 | 0.184±0.005 [△] | 0.190±0.002 ^{△#} | 0.191±0.001 [#] |
| | | 第 7 天 | 0.182±0.004 [△] | 0.192±0.001 ^{△#} | 0.190±0.002 ^{##} |
| | | 第 11 天 | 0.178±0.003 [△] | 0.187±0.001 ^{△#} | 0.185±0.001 ^{△#} |
| | | 第 14 天 | 0.178±0.004 [△] | 0.186±0.001 ^{△#} | 0.182±0.002 ^{△#} |
| 阳性对照组 | 0.15 | 第 3 天 | 0.185±0.003 [△] | 0.188±0.002 [△] | 0.183±0.002 [△] |
| | | 第 7 天 | 0.169±0.004 ^{△△#} | 0.179±0.001 ^{△△} | 0.177±0.001 ^{△△} |
| | | 第 11 天 | 0.168±0.003 ^{△△#} | 0.176±0.002 ^{△△} | 0.176±0.003 ^{△△} |
| | | 第 14 天 | 0.168±0.003 ^{△△#} | 0.176±0.001 ^{△△} | 0.176±0.002 ^{△△} |

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与麻杏石甘汤全方组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

然后,采用 Western blot 法进行检测第 7 天肺组织蛋白表达。表 2 显示,与正常对照组比较,模型组 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达极显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,麻杏石甘汤全方组三者蛋白表达极显著降低 ($P < 0.01$),拆方 II 组、IV 组三者蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),拆方 III 组

Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与全方组比较,拆方 I 组、II 组、III 组、IV 组 Bax、caspase-3 蛋白表达极显著升高 ($P < 0.01$);III 组、IV 组 Bcl-2 蛋白表达极显著升高 ($P < 0.01$),而 I 组、II 组其蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。

表2 各组 Bax、Bcl-2、caspase-3、Bcl-2/Bax 蛋白表达比较 (Western blot, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Comparison of Bax, Bcl-2, caspase-3 and Bcl-2/Bax protein expressions among various groups (Western blot, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | Bax | Bcl-2 | caspase-3 | Bcl-2/Bax |
|---------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 正常对照组 | — | 0.61±0.04 | 0.76±0.05 | 0.68±0.04 | 1.25±0.06 |
| 模型组 | — | 1.21±0.06** | 1.03±0.07** | 1.19±0.05** | 0.85±0.04** |
| 麻杏石甘汤全方组 | 16.5 | 0.57±0.04 ^{△△} | 0.75±0.06 ^{△△} | 0.62±0.05 ^{△△} | 1.32±0.06 ^{△△} |
| 麻杏石甘汤拆方 I 组 | 14.14 | 1.16±0.05 [#] | 0.94±0.06 [#] | 1.13±0.04 [#] | 0.81±0.05 [#] |
| 麻杏石甘汤拆方 II 组 | 9.43 | 1.03±0.04 ^{△#} | 0.86±0.05 ^{△#} | 0.91±0.05 ^{△#} | 0.83±0.05 [#] |
| 麻杏石甘汤拆方 III 组 | 12.96 | 1.05±0.06 [#] | 1.01±0.06 ^{△#} | 1.02±0.04 [#] | 0.96±0.05 ^{△#} |
| 麻杏石甘汤拆方 IV 组 | 12.96 | 0.93±0.05 ^{△#} | 0.95±0.04 ^{△#} | 0.89±0.04 ^{△#} | 1.03±0.05 ^{△△#} |
| 阳性对照组 | 0.15 | 0.53±0.04 ^{△△} | 0.69±0.04 ^{△△} | 0.58±0.03 ^{△△} | 1.30±0.04 ^{△△} |

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与麻杏石甘汤全方组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

综上所述,麻杏石甘汤全方组可极显著下调 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达 ($P<0.01$),而各拆方组的调节作用明显较弱,依次为 IV>II>III>I。由此推定,麻杏石甘汤中 4 味药材在方中的作用程度依次为麻黄>石膏>杏仁>甘草。

3.3 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 表达 表 3 显示,与正常对照组比较,模型组 Bax、caspase-3 mRNA 表达极显著升高 ($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 表达极显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,麻杏石甘汤全方组第 7 天 Bax、caspase-3 mRNA 表达极

表3 各组 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Comparison of Bax, Bcl-2 and caspase-3 mRNA expressions among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | 时间 | caspase-3 | Bcl-2 | Bax |
|---------------|--------------------------|--------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 正常对照组 | — | 第 3 天 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| | | 第 7 天 | 0.99±0.02 | 1.01±0.01 | 1.00±0.02 |
| | | 第 11 天 | 1.01±0.01 | 1.00±0.02 | 1.01±0.01 |
| | | 第 14 天 | 1.00±0.01 | 0.98±0.03 | 0.99±0.02 |
| 模型组 | — | 第 3 天 | 7.31±0.11** | 4.61±0.07** | 6.12±0.11** |
| | | 第 7 天 | 7.84±0.12** | 4.42±0.08** | 6.14±0.12** |
| | | 第 11 天 | 7.53±0.10** | 4.43±0.08** | 6.17±0.15** |
| | | 第 14 天 | 7.46±0.09** | 4.45±0.09** | 6.15±0.12** |
| 麻杏石甘汤全方组 | 16.5 | 第 3 天 | 6.17±0.07 | 3.53±0.11 | 5.36±0.12 |
| | | 第 7 天 | 4.44±0.06 [△] | 1.57±0.08 [△] | 1.67±0.05 ^{△△} |
| | | 第 11 天 | 3.79±0.05 ^{△△} | 1.37±0.07 ^{△△} | 1.62±0.04 ^{△△} |
| | | 第 14 天 | 3.52±0.05 ^{△△} | 1.24±0.06 ^{△△} | 1.61±0.06 ^{△△} |
| 麻杏石甘汤拆方 I 组 | 14.14 | 第 3 天 | 7.13±0.13 [#] | 4.13±0.10 [#] | 5.64±0.13 |
| | | 第 7 天 | 7.02±0.10 [#] | 4.29±0.11 [#] | 5.28±0.12 [#] |
| | | 第 11 天 | 6.84±0.08 [#] | 4.33±0.12 [#] | 5.35±0.12 [#] |
| | | 第 14 天 | 6.69±0.09 [#] | 4.36±0.14 [#] | 5.42±0.14 [#] |
| 麻杏石甘汤拆方 II 组 | 9.43 | 第 3 天 | 7.05±0.12 | 4.01±0.11 [#] | 4.68±0.11 [#] |
| | | 第 7 天 | 6.76±0.13 [△] | 4.12±0.11 [#] | 4.36±0.09 [#] |
| | | 第 11 天 | 6.41±0.13 ^{△#} | 4.21±0.12 [#] | 4.27±0.13 ^{△#} |
| | | 第 14 天 | 6.46±0.14 ^{△#} | 4.24±0.10 ^{△#} | 4.28±0.11 ^{△#} |
| 麻杏石甘汤拆方 III 组 | 12.96 | 第 3 天 | 7.08±0.12 | 3.52±0.08 [#] | 5.35±0.12 |
| | | 第 7 天 | 6.95±0.14 [#] | 2.91±0.07 ^{△#} | 5.21±0.12 [#] |
| | | 第 11 天 | 6.68±0.14 [#] | 2.95±0.09 ^{△#} | 5.12±0.11 [#] |
| | | 第 14 天 | 6.54±0.15 [#] | 2.98±0.08 ^{△#} | 5.14±0.10 [#] |
| 麻杏石甘汤拆方 IV 组 | 12.96 | 第 3 天 | 7.01±0.005 | 2.22±0.07 ^{△#} | 3.66±0.07 ^{△△#} |
| | | 第 7 天 | 6.39±0.004 [△] | 2.53±0.09 ^{△#} | 3.32±0.09 ^{△△#} |
| | | 第 11 天 | 5.84±0.003 ^{△#} | 2.74±0.06 ^{△#} | 3.29±0.08 ^{△△#} |
| | | 第 14 天 | 5.61±0.004 ^{△#} | 2.76±0.10 ^{△#} | 3.41±0.10 ^{△△#} |
| 阳性对照组 | 0.15 | 第 3 天 | 5.49±0.003 ^{△#} | 1.34±0.05 ^{△△#} | 1.67±0.09 ^{△△#} |
| | | 第 7 天 | 5.07±0.004 ^{△△#} | 1.63±0.08 ^{△△} | 1.33±0.06 ^{△△} |
| | | 第 11 天 | 4.73±0.003 ^{△△#} | 1.71±0.09 ^{△△#} | 1.34±0.07 ^{△△} |
| | | 第 14 天 | 4.67±0.003 ^{△△#} | 1.82±0.09 ^{△△#} | 1.33±0.08 ^{△△} |

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与麻杏石甘汤全方组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$

显著降低 ($P < 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达极显著升高 ($P < 0.01$), 第 11、14 天 *Bax*、*caspase-3* mRNA 表达极显著降低 ($P < 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达极显著升高 ($P < 0.01$); 拆方 IV 组第 7 天 *Bax*、*caspase-3* mRNA 表达极显著降低 ($P < 0.01$), *Bcl-2* mRNA 表达极显著升高 ($P < 0.01$); 拆方 I 组、II 组、III 组各时间点三者 mRNA 表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

4 讨论

肺炎链球菌是引起肺炎的首要病原菌^[10], 而小儿肺炎是临床上常见的呼吸系统疾病, 严重时伴有心力衰竭、呼吸衰竭等感染并发症, 危及生命^[11], 该细菌引起肺炎感染后, 可直接或间接诱导体内细胞凋亡, 也可能是生物机体利用细胞凋亡的方式清除病原微生物, 是一种牺牲少数细胞而保护机体的重要防卫机制^[12]。

凋亡主要受细胞内凋亡蛋白的调控, 机体内调节细胞凋亡的蛋白分为抗凋亡蛋白、促凋亡两类, *Bax*、*Bcl-2* 为同源相关蛋白, 其水平与细胞凋亡调控密切相关, 其中前者为促凋亡蛋白, 后者为抗凋亡蛋白, 并且 *Bcl-2/Bax* 异二聚体也起到抗凋亡作用。两者在正常细胞内的比例相对恒定, 但当细胞受到外界凋亡信号刺激后, 各蛋白表达发生变化, 从而影响细胞周期^[13]。*caspase-3* 是 *caspase* 家族中最重要的效应型, 其表达与肺炎小鼠肺泡上皮细胞凋亡有关, 也是细胞凋亡的执行人, 文献 [14] 报道支原体肺炎与 *caspase-3* 蛋白表达关系密切。

本实验发现, 小鼠感染肺炎链球菌后肺泡上皮细胞遭到破坏, 细胞有增生情况, 血管及毛细血管内皮细胞有肿胀向管腔突出, 肺泡细胞核质脱落, 板层小体排空, 空泡化, 有凋亡特征结构特征发生, 肺组织中 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* 蛋白表达明显升高, 而 *Bcl-2/Bax* 下降明显; 与模型组比较, 麻杏石甘汤全方组、拆方 II 组、拆方 IV 组 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* 蛋白表达均有所下降, 以全方组更明显, 而且 *Bax*、*caspase-3* mRNA 表达明显降低, *Bcl-2* mRNA 表达明显升高。

另外, 对麻杏石甘汤拆方进行研究时发现, 各药材作用强度由大到小依次为麻黄、石膏、杏仁、甘草, 方中麻黄为君药, 开泻肺热, 取“火郁发之”之意; 石膏味辛、甘, 性大寒, 清泻肺热; 杏仁降肺气, 佐麻黄、石膏清肺平喘; 炙甘草益气和中, 调和诸药^[15]。由此推测, 这些清除肺热的

药材在麻杏石甘汤治疗肺炎链球菌所致肺炎小鼠中可能起到了主要作用。

参考文献:

- [1] 刘 茹, 田琴琴, 陈云秀, 等. 新生儿肺炎链球菌肺炎对肺部树突状细胞和 Foxp3~+Tregs、Th17 表达的影响[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(2): 107-112.
- [2] 余 璐, 林 立, 李海燕, 等. 姜黄素对肺炎链球菌诱导 BEAS-2B 细胞 SLPI、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(2): 321-327.
- [3] 陈云秀, 田永露, 田小银, 等. 幼年期肺炎链球菌肺炎对哮喘形成的影响[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(10): 872-878.
- [4] 周志敏, 何群力. 肺炎链球菌流行基因型的细菌毒力及大环内酯类的耐药机制[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(1): 110-113.
- [5] 李 玲, 戴 冰, 卢芳国, 等. 麻杏石甘汤不同比例配伍对流感病毒感染小鼠影响的研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(1): 309-313.
- [6] 申冬冬, 袁 飞, 侯江红. 麻杏石甘汤加减结合中医定向透药疗法治疗风热犯肺证小儿肺炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 179-184.
- [7] 张佳敏, 周 瑶, 莫珍珍, 等. 肺炎支原体肺炎患儿血液中差异表达 miRNAs 的筛选及鉴定[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(5): 620-624.
- [8] 向 茜, 熊 昕. 苇茎汤合麻杏石甘汤加减治疗卒中相关性肺炎痰热蕴肺证疗效及对患者外周血 T 淋巴细胞亚群、血清炎症因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 180-184.
- [9] 吴振起, 马 融, 平 静, 等. 喜炎平对肺炎支原体感染 A549 细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2484-2487.
- [10] 尚燕萍, 林 立, 李昌崇. 肺炎链球菌诱导 SPLUNC1 表达及白藜芦醇对 SPLUNC1 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(1): 111-116.
- [11] 马春兰, 范亚莉, 刘润武. 小儿麻甘颗粒对小儿肺炎的治疗效果及对炎症细胞因子水平的影响[J]. 中药材, 2017, 41(1): 227-229.
- [12] 程 琳, 侯 宇, 王伟章. SR1078 激活 ROR α 诱导卵巢癌细胞凋亡的机制研究[J]. 药学报, 2018, 53(1): 62-67.
- [13] 赵志轩, 梁绍祯, 孙琳林, 等. 右归丸对 D-半乳糖致急性衰老大鼠抗氧化能力及 *Bax*、*Bcl-2*、*Caspase-3* 蛋白表达的影响[J]. 中成药, 2018, 40(2): 429-432.
- [14] 吴振起, 杨 璐, 敏 娜, 等. 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[J]. 中草药, 2018, 49(2): 389-395.
- [15] 孟玉凤, 杜建超, 冯淬灵, 等. 加味麻杏石甘汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重的机制研究[J]. 北京中医药大学学报, 2018, 41(1): 45-52.