

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.22.013

清肺理痰方对肺炎克雷伯菌诱导的急性肺损伤模型小鼠肺功能、肺组织病理及体内炎症因子的影响

王鹏¹, 丁奇^{2✉}, 曲思昊², 李振球¹, 喻清和¹, 朱汉平¹, 史渊源³, 潘俊辉¹

1. 广州医科大学附属第一医院, 广东省广州市沿江路151号, 510120; 2. 北京中医药大学生命科学院; 3. 深圳北京中医药大学研究院

[摘要] **目的** 探讨清肺理痰方治疗急性肺损伤的作用及可能机制。**方法** 108只BALB/c小鼠随机分为空白组、模型组、头孢曲松钠组及清肺理痰方低、中、高剂量组, 每组18只。除空白组外, 其余各组采用一次性气管滴注肺炎克雷伯菌 1.04×10^9 CFU复制小鼠急性肺损伤模型。造模后, 头孢曲松钠组单次尾静脉注射200 mg/kg头孢曲松钠药液, 清肺理痰方低、中、高剂量组每次分别灌胃清肺理痰方药液1.0、2.0、4.0 g/kg, 空白组及模型组灌胃生理盐水10 ml/kg, 于造模后0、24、48、72 h各给药1次, 共4次。于造模后0、24、48、72、96 h称量体重。末次给药24 h后检测各组小鼠血常规指标 [包括白细胞总数 (WBC)、中性粒细胞 (NEU)、淋巴细胞 (LYN)], 血清及肺泡灌洗液、肺组织中炎症因子白细胞介素 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6 (IL-6), 肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 水平, 肺功能指标 [包括肺总阻力 (RL)、肺出气阻力 (Re)、肺动态顺应性 (C_{dyn})、呼气峰值流速 (PEF) 和最大通气量 (MVV)]; HE染色观察肺组织病理形态学变化。**结果** 与空白组同时间比较, 模型组小鼠体重在造模后24 h到96 h均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 病理结果显示肺组织结构明显被破坏, WBC、NEU、LYN水平均升高 ($P < 0.01$), 肺泡灌洗液、肺组织及血清中IL-6、IL- 1β 、TNF- α 和肺组织中MPO水平均升高 ($P < 0.01$), 肺功能指标RL、Re水平升高, C_{dyn}、PEF、MVV水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间比较, 各组小鼠体重各时间点差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 病理结果显示头孢曲松钠组和清肺理痰方各剂量组肺组织损伤明显改善, 其中以清肺理痰方高剂量组改善最明显; 清肺理痰方中、低剂量组及头孢曲松钠组WBC、NEU和LYM水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 头孢曲松钠组和清肺理痰方各剂量组小鼠肺泡灌洗液、肺组织和血清IL-6、IL- 1β 和TNF- α 水平均降低 ($P < 0.01$), 清肺理痰方高剂量组肺功能指标RL、Re均降低, C_{dyn}、PEF、MVV均升高 ($P < 0.01$)。清肺理痰方各剂量组组间比较, 清肺理痰方高剂量组小鼠RL、Re及肺组织IL-6、TNF- α 水平最低, C_{dyn}、PEF、MVV水平最高, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 清肺理痰方能减轻急性肺损伤模型小鼠肺组织病理损伤并恢复肺功能, 其中以高剂量效果最好, 其作用机制可能与抑制体内炎症因子分泌有关。

[关键词] 急性肺损伤; 清肺理痰方; 肺炎克雷伯菌; 炎症因子; 肺功能

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是机体在严重感染、休克、创伤等情况下, 造成的肺毛细血管内皮和肺泡上皮损伤、血管通透性增高的临床综合征, 临床表现为急性、进行性加重的呼吸困难、难治性低氧血症和肺水肿^[1]。肺炎克雷伯菌

(*Klebsiella pneumoniae*, KP) 感染是院内感染常见的类型, 在患者机体免疫力下降时肺炎克雷伯菌极易移位至肺部诱发ALI^[2]。ALI患者病情进展迅速, 患者往往因为体内“炎症因子风暴”导致多器官功能衰竭^[3]。清肺理痰方源自《22个专业95个病种中医诊疗方案》中风温肺热病 (非重症社区获得性肺炎) 诊疗方案中痰热壅肺证推荐方药^[4], 为麻杏石甘汤合金苇茎汤加减而成, 具有清热祛痰、宣

基金项目: 2021 年省级医疗卫生健康事业发展 (传承发展中医药事业) 专项资金 [粤财社 [2020] 359 号]; 广州医科大学附属第一医院 2017—2018 年度科研项目 (ZH201821)

✉ 通讯作者: dingqisc@163.com

肺止咳的功效。前期研究^[5]表明,清肺理痰方联合西医治疗能明显改善肺炎咳嗽痰热壅肺型患者的临床症状,提高治疗有效率。本研究通过建立 KP 诱导的 ALI 小鼠模型,观察清肺理痰方的治疗作用并探讨其可能的作用机制,为清肺理痰方的临床应用提供实验基础。本实验经过广州中医药大学动物伦理委员会批准(批准号:20210624004)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 108 只,6~8 周龄,体重 20~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于广西中医药大学 SPF 等级标准实验动物室,室温 20.0~25.0℃,相对湿度 40.0%~70.0%,照明 12 h/12 h 明暗交替,饲喂 SPF 级小鼠配合饲料,自由摄食、饮用纯净水。

1.2 菌种

肺炎克雷伯菌(批号:186335),购自北纳创联生物科技有限公司。使用时菌液用注射用生理盐水稀释至 1.04×10^9 CFU。

1.3 药品、试剂与仪器

清肺理痰方组成:青天葵 10 g、生石膏 30 g、瓜蒌皮 15 g、黄芩 15 g、浙贝母 15 g、鱼腥草 20 g、苇茎 15 g、苦杏仁 10 g、桔梗 15 g、甘草 10 g,由华润三九集团制成干膏粉,室温密封保存。使用时加注射用生理盐水充分溶解,分别配制 0.1、0.2、0.4 g/ml 浓度的药液,临用现配。注射用头孢曲松钠(批号:18101111),瑞阳制药有限公司,1.0 g/瓶,使用时加注射用生理盐水充分溶解,得到 20 mg/ml 头孢曲松钠药液,临用现配。

牛肉膏(批号:G8270)、蛋白胨(批号:P8450)、琼脂粉(批号:A8190),Solarbio 公司;氯化钠(批号:10019318),国药集团化学试剂有限公司;伊红-苏木素(HE)染色试剂盒(货号:G1120),Solarbio 公司;白细胞介素 6(IL-6,批号:M210125-004a)、白细胞介素 1 β (IL-1 β ,批号:M210125-003a)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号:M200115-102a)ELISA 试剂盒,欣博盛生物科技有限公司;髓过氧化物酶(MPO)测试盒(批号:A044-1-1),南京建成科技有限公司;戊巴比妥钠(批号:120210),德国 Merck 公司。

细菌培养箱(型号:DNP-9052),上海精宏实验设备有限公司;纯水仪(型号:IQ 7000),

MiliQ 公司;高压蒸汽灭菌(型号:MLS-3781L-PC),Panasonic 公司;恒温培养摇床(型号:THZ-103B),上海一恒科学仪器有限公司;血常规检测仪(型号:BC-5000vet),深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;电子天平(型号:ME204E),梅特勒-托利多仪器上海有限公司;低温高速离心机(型号:5425R),Eppendorf 公司;酶联免疫检测仪(型号:SYNERGYH1),美国 BioTek 公司;超分辨组织成像显微镜(型号:BX-60),日本 Olympus 公司;组织研磨机(型号:TP-24),杰灵仪器制造天津有限公司;动物呼吸机(型号:RES3050)、信号调理器(AniRes 动物肺功能分析系统,型号:RES1050),北京贝兰博科技有限公司。

1.4 分组、造模及给药

108 只小鼠采用随机数字法分为空白组、模型组、头孢曲松钠组及清肺理痰方低、中、高剂量组,每组 18 只。空白组给予等体积无菌注射用生理盐水。其余各组参照文献[6]制备 ALI 模型。腹腔注射 4 mg/ml 戊巴比妥钠溶液 0.014 ml/g 麻醉小鼠,仰卧固定于手术台上,用小鼠开口器撑开口腔,手术灯照明找到会厌软骨处,使用微量注射器通过会厌软骨插入小鼠气管,将浓度为 1.04×10^9 CFU 的菌液 50 μ l/只一次性注入小鼠肺脏。小鼠肺组织中炎性细胞浸润增多,说明造模成功^[7]。模型组及清肺理痰方中、高剂量组各造模成功 15 只,清肺理痰方低剂量组及头孢曲松钠组各造模成功 16 只。造模后,头孢曲松钠组单次给药,尾静脉注射 200 mg/kg 头孢曲松钠药液;清肺理痰方低、中、高剂量组每次分别灌胃清肺理痰方药液 1.0、2.0、4.0 g/kg,空白组及模型组灌胃生理盐水,各组灌胃量均为 10 ml/kg,于造模后 0 h、24 h、48 h、72 h 各给药 1 次,共 4 次。清肺理痰方灌胃剂量根据人与小鼠药物剂量换算^[8]得到每只小鼠对应的等效剂量为 8.0 g/kg,本研究为了进一步研究清肺理痰方治疗 ALI 的量效关系,以人与动物等效剂量的 0.5 倍作为高剂量进行研究,于是高、中、低剂量分别取 4.0、2.0、1.0 g/kg。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 体重 于造模后 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 用电子秤称量体重 1 次。

1.5.2 肺功能 在 Excel 表中使用随机函数每组选取 4 只小鼠。末次给药 24 h 后,采用 RES3050 动物呼吸机及 AniRes2005 软件分析系统共同测量小鼠肺总阻力(RL)、肺出气阻力(Re)、肺动态顺应

性 (C_{dyn})、呼吸峰值流速 (PEF) 和最大通气量 (MVV) 值。

1.5.3 血常规 在 Excel 2019 表中使用随机函数每组选取 7 只小鼠进行检测。末次给药 24 h 后, 拔除眼球采血, 迅速吸取 45 μ l 全血, 与 5 μ l 抗凝剂充分混匀, 采用血常规检测仪检测血液中白细胞总数 (WBC)、中性粒细胞 (NEU)、淋巴细胞 (LYM) 水平。

1.5.4 血清炎症因子 在 Excel 表中使用随机函数每组选取 5 只小鼠进行检测。末次给药 24 h 后, 拔眼采血, 迅速吸取 45 μ l 全血, 收集于 EP 管中, 室温放置 2 h 后, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min (离心半径 5 cm) 离心 20 min, 分离血清。检测血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, 具体操作严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5.5 肺泡灌洗液炎症因子 采血结束后, 处死小鼠, 迅速打开胸腔并暴露颈部气管, 用 1 ml 注射器由气管注入 PBS 溶液 0.3 ml, 反复回抽推注 3 次, 得肺泡灌洗液, 同法重复 3 次, 合并 3 次肺泡灌洗液, 置于低温冷冻离心机, 4 $^{\circ}$ C、1600 r/min (离心半径 5 cm) 离心 10 min, 收集上清液。采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平, 具体操作按 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5.6 肺组织病理学 在 Excel 表中使用随机函数选取 5 只小鼠。末次给药 24 h 后处死小鼠, 分离右肺下叶, 采用多聚甲醛固定, 包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肺组织病理学改变。

1.5.7 肺组织炎症因子及 MPO 水平 1.5.6 中剩余肺组织用冰冷生理盐水漂洗, 滤纸吸干表面水分, 称重, 记录, 使用组织研磨机匀浆, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min (离心半径 5 cm) 离心 10 min, 取上清液, 分装冻存于 -80 $^{\circ}$ C, 用于检测肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平及 MPO 水平, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism 7 软件统计分析, 计量资料均符合正态分布且方差齐, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠造模后不同时间体重比较

表 1 示, 与空白组同时间比较, 其余各组小鼠体重在造模后 24 h 到 96 h 均下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组同时间比较, 各组小鼠体重各时间点体重差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠肺组织病理学结果

HE 染色结果显示, 空白组小鼠肺组织气管黏膜平滑, 假复层纤毛柱状上皮杯状细胞和纤毛细胞清晰可见, 肺泡未见增厚、充血或水肿等改变, 肺泡壁薄, 分布整齐, 边界清晰; 模型组小鼠肺组织肺泡损坏萎陷挤压明显, 肺泡壁变厚, 边界不清晰, 有明显的炎性细胞浸润、水肿等病理症状; 头孢曲松钠组和清肺理痰方各剂量组肺组织损伤明显改善, 肺泡萎陷明显缓解, 边界较清晰, 挤压和炎性改变明显减轻, 其中以清肺理痰方高剂量组改善最为明显。

2.3 各组小鼠末次给药 24 h 后肺功能指标比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠 RL、Re 水平显著升高, C_{dyn}、PEF、MVV 水平显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 除清肺理痰方低剂量组 Re 外, 其余清肺理痰方各剂量组及头孢曲松钠组 RL 和 Re 水平均显著降低 ($P<0.01$), 除头孢曲松钠组 MVV、清肺理痰方中剂量组 PEF 差异无统计学意义 ($P>0.05$) 外, 其余清肺理痰方各剂量组及头孢曲松钠组小鼠 C_{dyn}、PEF、MVV 水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 清肺理痰方各剂量组比较, 清肺理痰方高剂量组 RL 和 Re 水平最低, C_{dyn}、PEF、MVV 水平最高,

表 1 各组小鼠造模后不同时间体重比较

(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	造模后 0 h	造模后 24 h	造模后 48 h	造模后 72 h	造模后 96 h
空白组	18	20.32 $\pm$ 0.16	20.83 $\pm$ 0.29	19.60 $\pm$ 0.26	18.91 $\pm$ 0.30	18.81 $\pm$ 0.33
模型组	15	20.31 $\pm$ 0.24	19.57 $\pm$ 0.34 ^{a)}	18.09 $\pm$ 0.33 ^{b)}	17.65 $\pm$ 0.34 ^{a)}	16.88 $\pm$ 0.30 ^{b)}
头孢曲松钠组	16	20.25 $\pm$ 0.21	19.46 $\pm$ 0.16 ^{a)}	18.40 $\pm$ 0.15 ^{a)}	18.07 $\pm$ 0.17 ^{a)}	17.19 $\pm$ 0.15 ^{a)}
清肺理痰方低剂量组	16	20.51 $\pm$ 0.25	19.46 $\pm$ 0.26 ^{a)}	17.96 $\pm$ 0.22 ^{b)}	17.29 $\pm$ 0.23 ^{b)}	16.54 $\pm$ 0.25 ^{b)}
清肺理痰方中剂量组	15	20.38 $\pm$ 0.25	19.14 $\pm$ 0.26 ^{a)}	18.19 $\pm$ 0.19 ^{b)}	17.60 $\pm$ 0.19 ^{a)}	16.94 $\pm$ 0.20 ^{a)}
清肺理痰方高剂量组	15	20.10 $\pm$ 0.22	19.28 $\pm$ 0.20 ^{a)}	17.96 $\pm$ 0.26 ^{b)}	17.29 $\pm$ 0.28 ^{b)}	16.57 $\pm$ 0.28 ^{b)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.01$ 。

表 2 各组小鼠末次给药 24 h 后肺功能指标比较
 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RL	Re	Cdyn	PEF	MVV
空白组	4	51.12±2.44	62.07±4.86	187.50±6.82	109.88±4.83	105.12±3.57
模型组	4	100.00±8.21 ^{a)}	100.00±4.40 ^{a)}	100.00±7.87 ^{a)}	100.00±2.10 ^{b)}	100.00±1.35 ^{a)}
头孢曲松钠组	4	61.98±2.19 ^{c)}	68.29±3.72 ^{c)}	163.64±6.82 ^{c)}	110.06±1.65 ^{c)}	101.86±0.83
清肺理痰方低剂量组	4	61.92±0.68 ^{c)}	103.82±7.15	161.36±3.94 ^{c)}	89.81±2.79 ^{c)}	104.09±1.10 ^{d)}
清肺理痰方中剂量组	4	55.19±3.45 ^{c) e)}	73.32±9.95 ^{c) e)}	184.09±11.81 ^{c) e)}	106.78±5.53 ^{c)}	115.88±0.67 ^{c) e)}
清肺理痰方高剂量组	4	54.16±2.60 ^{c) e) f)}	54.73±0.85 ^{c) e) f)}	186.36±10.41 ^{c) e) f)}	119.68±3.66 ^{c) e) f)}	113.83±4.56 ^{c) e) f)}

注：RL，肺总阻力；Re，肺出气阻力；Cdyn，肺动态顺应性；PEF，呼吸峰值流速；MVV，最大通气量。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与清肺理痰方低剂量组比较， $P<0.01$ ；f) 与清肺理痰方中剂量组比较， $P<0.05$ 。

呈剂量依赖性 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组小鼠血常规指标比较

表 3 示，与空白组比较，模型组小鼠血液 WBC、NEU、LYM 水平均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，清肺理痰方中、低剂量组及头孢曲松钠组小鼠血液 WBC、NEUT、LYM 水平均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与头孢曲松钠组比较，清肺理痰方中剂量组 NEU 降低，清肺理痰方高剂量组 NEU 升高 ($P<0.05$)；清肺理痰方各剂量组比较，清肺理痰方中剂量组 WBC 显著低于清肺理痰方低、高剂量组，NEUT、LYM 水平低于清肺理痰方高剂量组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.5 各组小鼠肺泡灌洗液炎症因子水平比较

表 4 示，与空白组比较，模型组小鼠肺泡灌洗

液 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，头孢曲松钠和清肺理痰方各剂量组小鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$)；与头孢曲松钠组比较，清肺理痰方低剂量组 IL-6、IL-1 β 升高 ($P<0.05$)；清肺理痰方各剂量组比较，清肺理痰方高剂量组 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平明显低于清肺理痰方低剂量组，清肺理痰方高中剂量组 IL-1 β 水平亦低于清肺理痰方低剂量组 ($P<0.01$)。

2.6 各组小鼠肺组织炎症因子水平比较

表 5 示，与空白组比较，模型组小鼠肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 水平均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，头孢曲松钠和清肺理痰方各剂量组小鼠肺组织炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水

表 3 各组小鼠血常规指标水平比较
 ($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	WBC	NEU	LYM
空白组	7	3.74±1.28	2.20±0.80	1.00±0.24
模型组	7	7.18±1.17 ^{a)}	5.51±1.20 ^{a)}	1.51±0.08 ^{a)}
头孢曲松钠组	7	5.95±0.61 ^{b)}	4.37±0.36 ^{b)}	1.15±0.20 ^{c)}
清肺理痰方低剂量组	7	5.78±0.94 ^{b)}	3.89±0.86 ^{c)}	1.06±0.15 ^{c)}
清肺理痰方中剂量组	7	4.56±0.88 ^{c) e)}	3.45±0.96 ^{c) d)}	0.92±0.18 ^{c)}
清肺理痰方高剂量组	7	6.75±0.84 ^{e)}	5.20±0.83 ^{d) e) g)}	1.34±0.23 ^{f)}

注：WBC，白细胞总数；NEU，中性粒细胞；LYM，淋巴细胞。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与头孢曲松钠组比较， $P<0.05$ ；e) 与清肺理痰方低剂量组比较， $P<0.01$ ；f) 与清肺理痰方中剂量组比较， $P<0.05$ ；g) 与清肺理痰方中剂量比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平比较
 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$	TNF- α / $\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$
空白组	5	657.52±153.61	3.04±1.66	1816.48±546.86
模型组	5	2333.52±647.09 ^{a)}	13.84±6.53 ^{a)}	3075.19±659.81 ^{a)}
头孢曲松钠组	5	672.43±234.37 ^{b)}	3.43±2.03 ^{b)}	1609.17±460.14 ^{b)}
清肺理痰方低剂量组	5	1262.66±381.46 ^{b) c)}	6.35±1.6 ^{b) c)}	1759.23±382.06 ^{b)}
清肺理痰方中剂量组	5	743.57±350.58 ^{b)}	2.06±0.34 ^{b) d)}	1317.94±166.08 ^{b)}
清肺理痰方高剂量	5	497.66±163.48 ^{b) d)}	1.81±0.41 ^{b) d)}	1229.09±121.04 ^{b) d)}

注：IL-6，白细胞介素 6；IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与头孢曲松钠组比较， $P<0.05$ ；d) 与清肺理痰方低剂量组比较， $P<0.01$ 。

表5 各组小鼠肺组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MPO 水平比较(x $\pm$ s)

组别	鼠数	IL-6/ pg $\cdot$ ml $^{-1}$	IL-1 β /ng $\cdot$ ml $^{-1}$	TNF- α / pg $\cdot$ ml $^{-1}$	MPO/U $\cdot$ g $^{-1}$
空白组	5	8.03 $\pm$ 2.19	53.24 $\pm$ 18.51	14.5 $\pm$ 1.81	6.48 $\pm$ 1.46
模型组	5	30.13 $\pm$ 6.30 ^{a)}	101.88 $\pm$ 6.23 ^{a)}	33.34 $\pm$ 2.89 ^{a)}	11.42 $\pm$ 1.71 ^{a)}
头孢曲松钠组	5	11.08 $\pm$ 2.05 ^{b)}	42.7 $\pm$ 7.93 ^{b)}	20.03 $\pm$ 3.69 ^{b)}	6.11 $\pm$ 2.01 ^{b)}
清肺理痰方低剂量组	5	15.86 $\pm$ 3.30 ^{b) d)}	38.68 $\pm$ 8.65 ^{b)}	21.97 $\pm$ 2.83 ^{b)}	9.50 $\pm$ 0.47 ^{c) e)}
清肺理痰方中剂量组	5	11.28 $\pm$ 1.39 ^{b) f)}	41.36 $\pm$ 22.83 ^{b)}	23.10 $\pm$ 3.44 ^{b)}	8.23 $\pm$ 0.64 ^{c) f)}
清肺理痰方高剂量组	5	8.93 $\pm$ 2.28 ^{b) g)}	49.95 $\pm$ 11.59 ^{b)}	16.02 $\pm$ 3.22 ^{b) f) h)}	6.73 $\pm$ 1.37 ^{b) g) h)}

注: IL-6, 白细胞介素 6; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; MPO, 髓过氧化物酶。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与头孢曲松钠组比较, $P<0.05$; e) 与头孢曲松钠组比较, $P<0.01$; f) 与清肺理痰方低剂量组比较, $P<0.05$; g) 与清肺理痰方低剂量组比较, $P<0.01$; h) 与清肺理痰方中剂量组比较, $P<0.05$ 。

平和 MPO 水平均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与头孢曲松钠组比较, 清肺理痰方低剂量组 IL-6、MPO 水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与清肺理痰方低剂量组比较, 清肺理痰方高剂量组 IL-6、TNF- α 和 MPO 水平降低, 清肺理痰方中剂量组 IL-6、MPO 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与清肺理痰方中剂量组比较, 清肺理痰方高剂量组 IL-6、TNF- α 、MPO 水平均降低 ($P<0.05$)。

2.7 各组小鼠血清炎症因子水平比较

表 6 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 头孢曲松钠组和清肺理痰方各剂量组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著降低 ($P<0.01$); 与头孢曲松钠组比较, 清肺理痰方低、中剂量组 IL-6 水平升高、TNF- α 水平降低, 清肺理痰方高剂量组 IL-1 β 、TNF- α 水平降低 ($P<0.01$); 清肺理痰方高剂量组 IL-6 水平低于清肺理痰方低剂量组 ($P<0.01$)。

3 讨论

ALI 临床表现为喘、满、昏、热, 其中尤以喘、满表现更甚, 发病多为实邪所致, 可归属于中医学“风温肺热病”范畴^[9]。肺为娇脏, 易受邪

侵, 温邪上攻, 郁而化热, 致使痰热瘀结, 肺失宣降, 故临床多治以清热化痰之法。清肺理痰方中生石膏解肌清热、除烦止渴; 青天葵清热润肺, 散瘀解毒, 退热而不伤阴, 二者均为君药, 清肺解肌, 散瘀退热。瓜蒌皮宽胸理气、润肺化痰, 黄芩清热燥湿, 浙贝母清热化痰、散结消痰, 鱼腥草清热解毒、化痰排脓, 四药共为臣药, 清热化痰、化瘀解毒。苦杏仁祛痰止咳平喘, 桔梗宣肺祛痰, 葶苈清肺热, 引肺热于小便利出, 三者均为佐药。甘草补脾益气、润肺止咳、调和诸药, 为使药。诸药合用, 共奏清热化痰、理清肺络、宣肺止咳之功。

KP 是院内感染的常见致病性革兰阴性菌, 正常情况下位于肠道等器官, 在机体免疫力下降时其移位至其他器官中引发感染。KP 侵袭肺部时, 释放脂多糖诱发肺炎甚至 ALI^[10], 病情进展快、病死率高。本实验用 KP 诱导细菌性肺炎来建立 ALI 模型, 通过直接注射菌液以更好地模拟细菌侵袭的病理过程。ALI 的一个典型组织病理学特征是弥漫性肺泡损伤, 肺泡的损伤会进一步导致炎性非心源性肺水肿^[11]。本研究病理学结果发现, 清肺理痰方各剂量组均能显著改善 KP 诱导的小鼠肺组织中肺泡损伤、萎陷和边界不清晰的情况, 并能减轻炎性

表6 各组小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平比较(x $\pm$ s)

组别	鼠数	IL-6/pg $\cdot$ ml $^{-1}$	IL-1 β /ng $\cdot$ ml $^{-1}$	TNF- α /pg $\cdot$ ml $^{-1}$
空白组	5	887.39 $\pm$ 223.23	6.71 $\pm$ 2.92	1021.77 $\pm$ 223.93
模型组	5	5466.75 $\pm$ 1324.10 ^{a)}	21.67 $\pm$ 12.47 ^{a)}	1773.29 $\pm$ 415.17 ^{a)}
头孢曲松钠组	5	841.14 $\pm$ 372.56 ^{b)}	8.77 $\pm$ 2.76 ^{b)}	1219.22 $\pm$ 221.25 ^{b)}
清肺理痰方低剂量组	5	2954.1 $\pm$ 1963.69 ^{b) d)}	6.96 $\pm$ 1.00 ^{b)}	957.6 $\pm$ 258.02 ^{b) e)}
清肺理痰方中剂量组	5	2456.36 $\pm$ 1369.55 ^{b) d)}	6.75 $\pm$ 1.61 ^{b)}	960.07 $\pm$ 168.18 ^{b) e)}
清肺理痰方高剂量组	5	851.51 $\pm$ 289.62 ^{b) e)}	6.16 $\pm$ 0.93 ^{b) e)}	956.37 $\pm$ 128.77 ^{b) d)}

注: IL-6, 白细胞介素 6; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与头孢曲松钠组比较, $P<0.05$; d) 与头孢曲松钠组比较, $P<0.01$; e) 与清肺理痰方低剂量组比较, $P<0.01$ 。

细胞浸润和水肿等表征, 其中高剂量组效果最好。另外, 清肺理痰方各剂量组亦能明显改善小鼠肺功能, 证明清肺理痰方可以明显改善 KP 诱导小鼠肺损伤。

炎症反应是导致 ALI 的一个重要因素^[12-13], 而中性粒细胞浸润又是 ALI 炎症反应的重要参与者^[14]。在肺损伤后, 活化的中性粒细胞募集进入肺组织中^[15]。同时 MPO 的表达也是中性粒细胞浸润组织的有效量度^[16]。本研究结果显示, 模型组小鼠血液 WBC、NEU、LYM 水平升高, 而头孢曲松钠和清肺理痰方各剂量组则起到降低 WBC、NEU 和 LYM 水平的作用, 且清肺理痰方中剂量组效果最好, 在降低 NEU 方面优于头孢曲松钠组。除此之外, KP 诱导的小鼠肺组织中 MPO 水平也在清肺理痰方的干预后下调, 证明了清肺理痰方可以阻止中性粒细胞向肺组织浸润, 且清肺理痰方高剂量组效果与头孢曲松钠组相当。

IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 是体内重要的促炎因子, 在炎性介质网络中发挥着重要的调控作用^[17], 且 ALI 小鼠肺泡灌洗液中这几种炎症因子的含量显著增加^[18-19]。这些因子通过参与多种炎症因子转录的调控, 影响肺功能^[19]。这些炎症因子一方面能直接损伤血管内皮细胞和肺泡上皮细胞等功能细胞, 使肺泡原毛细血管屏障受损, 增加肺泡-血管屏障通透性, 降低肺顺应性和肺功能; 另一方面可作用于核因子 κ B (NF- κ B) 等通路, 进一步促进炎症因子的分泌, 使炎症加重^[20]。本研究结果显示, 清肺理痰方各剂量不仅可以明显抑制 KP 诱导的小鼠肺泡灌洗液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的上调, 同时还可以抑制其在肺组织和血清中的表达, 以高剂量组效果最为明显, 提示清肺理痰方可以通过抗炎来改善 ALI。

综上所述, 清肺理痰方对 KP 诱导 ALI 模型小鼠有明显的治疗作用, 能减轻肺组织病理损伤并恢复肺功能, 其作用机制可能与抑制体内炎症因子分泌有关。而本研究中未探讨清肺理痰方对机体免疫的调节作用及对 KP 在体内增殖的影响, 今后的实验需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] WHEELER AP, BERNARD GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review [J]. *Lancet*, 2007, 369(9572): 1553-1564.
- [2] GONZALEZ-FERRER S, PEÑALOZA HF, BUDNICK JA, et al. Finding order in the chaos: outstanding ques-

- tions in klebsiella pneumoniae pathogenesis [J]. *Infect Immun*, 2021, 89(4): e00693-20.
- [3] BUTT Y, KURDOWSKA A, ALLEN TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4): 345-350.
- [4] 国家中医药管理局医政司. 22 个专业 95 个病种中医诊疗方案 [M]. 北京: 国家中医药管理局医政司, 2010: 75.
- [5] 曾俊飞, 潘俊辉, 王鹏, 等. 中西医结合治疗肺炎咳嗽 (痰热壅肺证) 的多中心临床研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13): 259-262.
- [6] DUPUIS J, SIROIS MG, RHÉAUME E, et al. Colchicine reduces lung injury in experimental acute respiratory distress syndrome [J]. *PloS One*, 2020, 15(12): e0242318.
- [7] POTEY PM, ROSSI AG, LUCAS CD, et al. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential [J]. *J Pathol*, 2019, 247(5): 672-685.
- [8] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited [J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 659-661.
- [9] 苏景深, 刘恩顺, 赵鑫民. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医药治疗研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(5): 696-700.
- [10] BANSAL S, CHHIBBER S. Curcumin alone and in combination with augmentin protects against pulmonary inflammation and acute lung injury generated during Klebsiella pneumoniae B5055-induced lung infection in BALB/c mice [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59 (Pt 4): 429-437.
- [11] SWEENEY RMAC, MCAULEY DF. Acute respiratory distress syndrome [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10058): 2416-2430.
- [12] GOODMAN RB, PUGIN J, LEE JS, et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(6): 523-535.
- [13] REUTERSHAN J, VOLLMER I, STARK S, et al. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs [J]. *FASEB J*, 2009, 23(2): 473-482.
- [14] ABRAHAM E. Neutrophils and acute lung injury [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(Suppl 4): S195-S199.
- [15] WONG JJM, LEONG JY, LEE JH, et al. Insights into the immuno-pathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(19): 504.
- [16] SCHIERWAGEN C, BYLUND-FELLENIEUS AC, LUNDBERG C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity [J]. *J Pharmacol Methods*, 1990, 23(3): 179-186.

- [17] KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1):33–42.
- [18] DU ZA, SUN MN, HU ZS. Saikosaponin a ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Inflammation*, 2018, 41(1):193–198.
- [19] RICARD JD, DREYFUSS D, SAUMON G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(5): 1176–1180.
- [20] JU M, LIU B, HE H, et al. MicroRNA-27a alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis through modulating TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(16): 2001–2018.

Effect of *Qingfei Litan Formula* (清肺理痰方) on Lung Function, Lung Tissue Pathology and Inflammatory Factors in *Klebsiella pneumoniae*-induced Acute Lung Injury Model Mice

WANG Peng¹, DING Qi², QU Enhao², LI Zhenqiu¹, YU Qinghe¹, Zhu Hanping¹, SHI Yuanyuan³, PAN Junhui¹

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510120; 2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Shenzhen Research Institute of Beijing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To analyze the effect of *Qingfei Litan Formula* (清肺理痰方, QLF) in treatment of *Klebsiella pneumoniae*-induced acute lung injury (ALI) in mice model and to explore the potential mechanism.

Methods Totally 108 BALB/c mice were randomly divided into 6 groups, control group, model group, ceftriaxone sodium group, QLF low, medium, and high-dose groups, with 18 mice in each group. Tracheal instillation of *Klebsiella pneumoniae* (1.04×10^9 CFU) was used to replicate the ALI model in mice of all groups except for blank group. After the models were established, ceftriaxone sodium liquid at a single dose of 200 mg/kg was given to the mice through tail vein injection in the ceftriaxone sodium group; QLF liquid at a dose of 1.0 g/kg, 2.0 g/kg and 4.0 g/kg was given by gavage to the low, medium and high dose QLF group, respectively; the model group and the control group were given normal saline for injection at 10 mg/kg by gavage; the interventions were administered for four times at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h after modeling. The body weight was observed at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h after modeling. After the last administration, the blood routine indicators including white blood cells (WBC), neutrophils (NEU), lymphocytes (LYN), inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and myeloperoxidase (MPO) level in the serum, alveolar lavage fluid and lung tissues, as well as lung function indicators including total lung resistance (RL), lung outflow resistance (Re), lung dynamic compliance (C_{dyn}), peak expiratory flow rate (PEF) and maximum ventilation (MVV) were assessed. HE staining was used to observe the pathomorphological changes of lung tissue. **Results** Compared to those assessed at the same timepoint of the blank group, the weight of the model group at 24 h and 96 h significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the structure of lung tissue was obviously destroyed from the pathological results; the levels of WBC, NEU, and LYN were increased ($P < 0.01$); the levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α in the serum, alveolar lavage fluid and lung tissues, and the MPO level in the lung tissue significantly increased ($P < 0.01$); the RL and Re levels increased, while C_{dyn}, PEF and MVV levels decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those assessed at the same timepoint of the model group, there were no significant differences among groups in the body weight ($P > 0.05$); the lung tissue injuries of the ceftriaxone sodium group and the QLF groups significantly improved from pathological results, especially in the QLF high-dose group; the WBC, NEU and LYM levels of QLF low and medium dose groups and the ceftriaxone sodium group were all significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the IL-6, IL-1 β , and TNF- α levels of the ceftriaxone sodium group and the QLF groups decreased significantly ($P < 0.01$); regarding the lung function indicators, the RL and Re level of QLF high-dose group significantly decreased, while the C_{dyn} level, PEF and MVV level increased ($P < 0.01$). When compared between different dose groups of QLF, the RL and Re levels, and the IL-6 and TNF- α levels of lung tissue were the lowest, while the C_{dyn}, PEF and MVV levels were the highest, showing dose-dependent relation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** QLF can alleviate the pathological changes of lung tissues and improve the lung function in mice model with acute lung injury, and the high dose of QLF works best. The possible mechanism may be related to the inhibition of secretion of inflammatory factors in the body.

Keywords acute lung injury; *Qingfei Litan Formula* (清肺理痰方); *Klebsiella pneumoniae*; inflammatory factors; lung function

(收稿日期: 2021-06-27; 修回日期: 2021-10-02)

[编辑: 王利芬]