

清肺消炎丸对不可分型流感嗜血杆菌诱导肺部炎症小鼠的影响

黄家望¹, 陈平安², 廖 灿³, 袁 婷¹, 谢 希¹, 孟亚飞⁴, 付涵煦⁴, 曲 磊⁴, 刘 淑^{4*}

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学医学院, 湖南长沙 410208; 3. 湖南中医药大学中医学院, 湖南长沙 410208; 4. 天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300457)

摘要: 目的 探讨清肺消炎丸对不可分型流感嗜血杆菌诱导肺部炎症小鼠的影响。方法 50只小鼠随机分为空白组、模型组、氨苄西林组(0.288 mg/kg)、麻杏石甘汤组(6.05 g/kg)、清肺消炎丸组(2.16 g/kg), 每组10只。给药7 d后, 测定一般情况(体质量及肺、脾、胸腺指数), HE染色观察肺组织病理变化, ELISA法检测血清炎症细胞因子(IL-1 β 、IL-6、GCSF、TNF- α)水平, Western blot及RT-PCR法分别检测肺组织TLR4、MyD88、TRAF6蛋白及mRNA表达。结果 与模型组比较, 清肺消炎丸组一般情况显著改善($P < 0.01$), 炎症细胞因子水平, TLR4、MyD88、TRAF6蛋白及mRNA表达显著降低($P < 0.01$)。结论 清肺消炎丸可缓解不可分型流感嗜血杆菌诱导肺部炎症小鼠肺损伤和炎症, 其机制可能与调控被激活的TLR4-MYD88-TRAF6信号通路、抑制炎症细胞因子分泌有关。

关键词: 清肺消炎丸; 不可分型嗜血流感杆菌; 肺部炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-1006-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.010

Effects of Qingfei Xiaoyan Pills on lung inflammation mice induced by non-typeable *Haemophilus influenzae*

HUANG Jia-wang¹, CHEN Ping-an², LIAO Can³, YUAN Ping¹, XIE Xi¹, MENG Ya-fei⁴, FU Han-xu⁴, QU Lei⁴, LIU Shu^{4*}

(1. College of Integration of Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. College of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 4. Darentang Pharmaceutical Factory, Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of Qingfei Xiaoyan Pills on lung inflammation mice induced by non-typeable *Haemophilus influenzae*. **METHODS** Fifty mice were randomly divided into blank group, model group, ampicillin group (0.288 mg/kg), Maxing Shigan Decoction group (6.05 g/kg) and Qingfei Xiaoyan Pills group (2.16 g/kg), 10 mice in each group. After 7-day administration, general conditions (body weight and lung, spleen, thymus indices) were determined, pathological changes in lung tissue were detected by HE staining, the levels of serum inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, GCSF, TNF- α) were detected by ELISA, and TLR4, MyD88, TRAF6 protein and mRNA expressions in lung tissue were detected by Western blot and RT-PCR, respectively. **RESULTS** Compared with the model group, the Qingfei Xiaoyan Pills group demonstrated significant improvement in general conditions ($P < 0.01$), and marked decrease in inflammatory cytokine levels, TLR4, MyD88, TRAF6 protein and mRNA expressions ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Qingfei Xiaoyan Pills can alleviate lung injury and inflammation in lung inflammation mice induced by non-typeable *Haemophilus influenzae*, whose mecha-

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 湖南省大学生研究性学习与创新性实验项目(2017-292, 2018-412); 湖南中医药大学大学生研究性学习与创新性实验项目(2017-06, 2018-01, 2018-31, 2018-47)

作者简介: 黄家望(1999—), 男, 研究方向为感染性疾病中西医结合防治。Tel: 18163930019, E-mail: 1518522909@qq.com

*通信作者: 刘 淑(1975—), 女, 高级工程师。Tel: 13820071176, E-mail: liushu@darentang.com.cn

nisms may contribute to the regulation of TLR4-MYD88-TRAF6 signaling pathway and inhibition of inflammatory cytokine secretion.

KEY WORDS: Qingfei Xiaoyan Pills; non-typeable *Haemophilus influenzae*; lung inflammation

流感嗜血杆菌可分为荚膜型和无荚膜型,后者因不能与已知的荚膜多糖抗血清发生凝集反应,又被称为不可分型流感嗜血杆菌,它是引起慢性阻塞性肺疾病急性加重的最重要病原菌之一^[1],寄居于上皮细胞和巨噬细胞,借助该生存方式^[2]而逃避了局部免疫应答,得以在呼吸道中持续存在,从而与宿主免疫力之间维持一种动态平衡,当宿主免疫力下降时则大量繁殖,引起感染,严重时可危及患者生命,目前国内外尚无相关疫苗^[3-5]。TLR4通路被证实为介导不可分型流感嗜血杆菌诱发免疫反应的重要途径^[6],与炎症免疫机制密切相关^[7-8]。

天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂研制的清肺消炎丸由麻黄、地龙、葶苈子、炒苦杏仁、石膏、牛蒡子、人工牛黄、羚羊角八味药组成,对流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌等有较显著的抑制作用,而由不可分型流感嗜血杆菌诱导的肺炎临床表现为发热、寒战、咳嗽、胸闷,与清肺消炎丸主治症状相吻合,可为该制剂相关治疗提供理论依据。因此,本实验以不可分型流感嗜血杆菌感染的小鼠为研究对象,探讨清肺消炎丸是否通过调控TLR4介导的信号通路来干预其诱导的肺部炎症,为相关临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); YJ-875A 净化工作台(吴江市宇鑫净化技术设备有限公司); 超微量分光光度计(德国 Implen 公司); 实时定量 PCR 仪、电泳仪、垂直电泳槽、电转槽、ChemiDoc XRS+ 化学发光成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); A0820 石蜡切片机(美国 AO 公司); WD-9405B 水平摇床(北京六一仪器厂); Synergy2 多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.2 试剂 不可分型流感嗜血杆菌购自上海复祥生物科技有限公司,批号 ATCC49247。小鼠 IL-1 β (批号 ab100704)、IL-6(批号 ab100712)、GCSF(批号 ab197743)、TNF- α (批号 ab100747) ELISIA 检测试剂盒(英国 Abcam 公司); Trizol(美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒(批号

A3500)、qPCR mix(批号 A6001)(美国 Promega 公司); TLR4、MyD88、TRAF6、 β -actin 引物[生物工程(上海)股份有限公司]; RIPA 蛋白裂解液(批号 CW2334S)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 CW0014S)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 CW0022)(北京康为世纪生物科技有限公司); Fermentas 彩色预染蛋白 Marker(北京优尼康生物科技有限公司); ECL 发光检测试剂盒(批号 35055,美国 Thermo Fisher 公司); TLR4 抗体(批号 ab13556)、MyD88(批号 ab2064)、TRAF6(批号 ab62488)、 β -actin(批号 ab8227)(英国 Abcam 公司); HRP 标记的羊抗鼠二抗(批号 SA00001-1)、羊抗兔二抗(批号 SA00001-2)(美国 Proteintech 公司)。

1.3 动物 6~8 周 C57 小鼠 50 只,体质量(20 \pm 2) g,雌雄各半,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物质量合格证号 SYXK(湘)2013-0005。

1.4 药物 清肺消炎丸购自天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂(批号 9000081),氨苄西林(珠海联邦制药股份有限公司,批号 70910804)、麻杏石甘汤(麻黄 9 g、苦杏仁 9 g、石膏 18 g、炙甘草 6 g)购自湖南中医药大学第一附属医院。按动物体表面积剂量换算法,双蒸馏水制备小鼠临床等效剂量的各药物水溶液,见表 1。

表 1 各药物临床剂量

Tab. 1 Clinical dosages of various drugs

药物	人临床剂量	小鼠临床等效剂量
氨苄西林	0.5 g/片	0.288 mg/kg
麻杏石甘汤	42 g/60 kg	6.05 g/kg
清肺消炎丸	5 g/60 粒	2.16 g/kg

2 方法

2.1 造模、分组及给药 参考文献[9]方法制备不可分型流感嗜血杆菌琼脂珠悬液,10%水合氯醛腹腔麻醉小鼠后作颈部正中切口暴露气管,将琼脂珠悬液接种于肺部(2 \times 10⁵CFU),将其注入小鼠气管后在注入 100 μ L 空气,直立 10 s,使琼脂珠悬液流入肺部,空白组滴鼻等量生理盐水。第 2 天,再将 40 只感染小鼠根据随机数字表分为模

型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组，每组 10 只，分笼饲养，自由饮水摄食。见表 2。

表 2 各组给药方法 (n=10)

Tab. 2 Administration methods in various groups (n=10)

分组	给药方法
空白组	感染生理盐水+灌胃等量生理盐水
模型组	细菌感染+灌胃等量生理盐水
氨苄西林组	细菌感染+氨苄西林(0.4 mL/d, 共 7 d)
麻杏石甘汤组	细菌感染+麻杏石甘汤(0.4 mL/d, 共 7 d)
清肺消炎丸组	细菌感染+2 倍清肺消炎丸(0.4 mL/d, 共 7 d)

2.2 指标检测

2.2.1 一般情况 最后 1 次给药后小鼠禁水禁食 8 h，记录小鼠体质量，分离胸腺、脾脏、肺脏并称重^[9]。

2.2.2 血清炎性细胞因子水平检测 实验结束时处死小鼠，迅速摘除眼球取血，2 500 r/min 离心 10 min，分离上层血清，根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作，检测血清 IL-1 β 、IL-6、GCSF、TNF- α 水平。

2.2.3 肺组织病理变化观察 取小鼠左上叶肺病变区肺组织，10% 中性甲醛固定，梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，切片(厚度 5 μ m)，HE 染色，脱水，透明，封片，光学显微镜下观察肺组织病理变化。

2.2.4 肺组织 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达检测 采用 Western-blot 法。取小鼠右下叶肺组织，于液氮中研磨至粉末状，提取组织总蛋白质，BCA 法测定蛋白量，取 50 μ g 总蛋白上样，SDS-PAGE 电泳，转膜后封闭处理 1 h，加入一抗 TLR4、MyD88、TRAF6 兔抗鼠多克隆抗体(1:1 000)，孵育过夜，二抗(1:3 000)室温下孵育 1 h，暗室加 ECL 化学发光剂后于化学发光仪中成像，IPP6.0 图像分析软件进行信号分析，计算目的蛋白/ β -actin 蛋白比值。

2.2.5 肺组织 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法。取右上叶肺组织，Trizol 法提取总 RNA，超微量紫外分光光度计检测浓度后将 1 μ g 总 RNA 逆转录合成 cDNA，以其为模板，荧光定量 PCR 试剂盒进行扩增，操作均按相应试剂盒说明书进行。qPCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s，95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s，循环 40 次，以 β -actin 为内参，2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 TLR4、MyD88、TRAF6 相对表达，引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，序列见表 3。

表 3 引物序列

Tab. 3 Primer sequences

基因	方向	引物序列(5'→3')
TLR4	正向	GGAACAGACCAACTATCGGC
	反向	GAGACAACCACTACCATCCG
MyD88	正向	GGAACAGACCAACTATCGGC
	反向	GAGACAACCACTACCATCCG
TRAF6	正向	GCACTGAAAGATGACAGCGTGA
	反向	TCCCGTAAAGCCATCAAGCA
β -actin	正向	TCTGGCACCACCTTCT
	反向	GATCTGGGTCTCTCTCAC

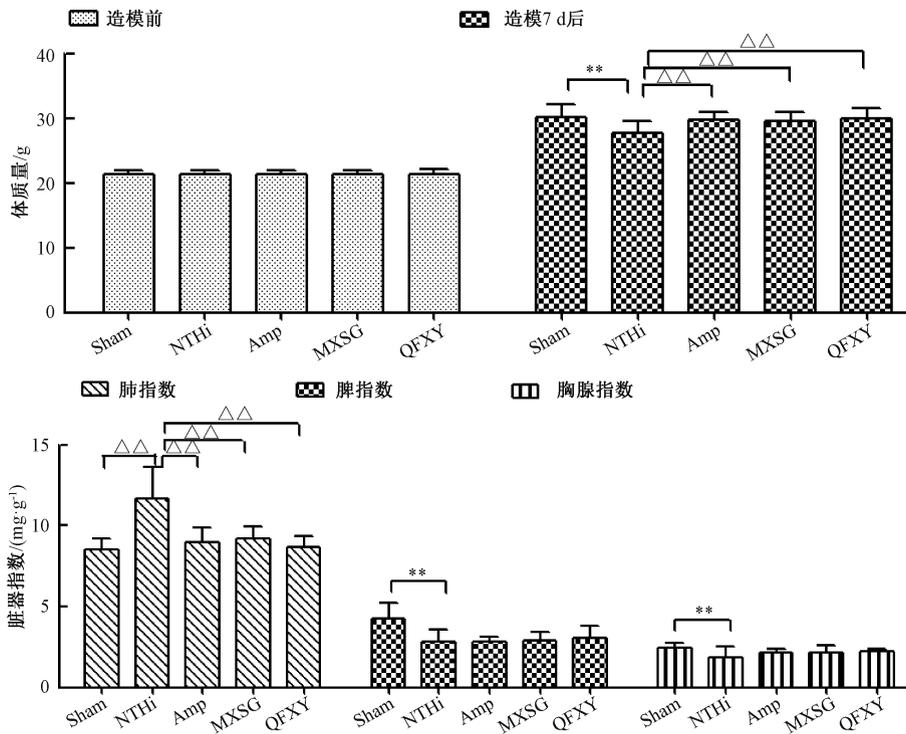
2.3 统计学处理 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，先对数据进行方差齐性检验，方差齐时用 One-Way ANOVA 检验，并用 LSD 法进行组间多重比较，而方差不齐时用非参数秩和检验，先用 Kruskal-Wallis H 检验比较总差异，再用 Mann-Whitney U 检验进行 2 组间比较；计数资料以百分率表示，采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。

3 结果

3.1 清肺消炎丸对小鼠一般情况的影响 图 1 显示，空白组小鼠精神良好，毛发有光泽，活动、进食、呼吸正常，体质量自然增加；模型组小鼠耸毛、蜷缩、怕冷、毛发无光泽，呼吸加快、短促，食差、消瘦，与空白组比较，体质量、脾指数、胸腺指数显著下降 ($P<0.01$)，肺指数显著升高 ($P<0.01$)；给药组均能不同程度改善小鼠一般情况，与模型组比较有显著差异 ($P<0.01$)，效果依次为清肺消炎丸组>氨苄西林组>麻杏石甘汤组，但组间比较无显著差异 ($P>0.05$)。

3.2 清肺消炎丸对炎性细胞因子水平的影响 图 2 显示，与空白组比较，模型组 IL-1 β 、IL-6、GCSF、TNF- α 水平显著升高 ($P<0.01$)；给药组四者水平不同程度下调，与模型组比较有显著差异 ($P<0.01$)，效果依次为氨苄西林组>清肺消炎丸组>麻杏石甘汤组，但组间比较无显著差异 ($P>0.05$)。

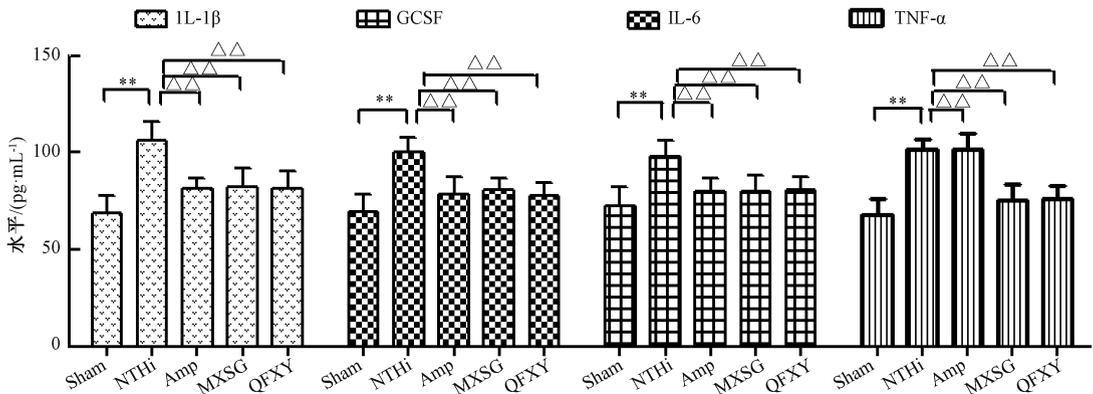
3.3 清肺消炎丸对小鼠肺组织病理变化的影响 表 4、图 3~4 显示，空白组小鼠肺支气管和肺泡结构完整，肺内未见炎症细胞浸润；模型组小鼠肺组织间质增生明显，肺泡隔增厚加重，肺泡扩张，肺内支气管上皮细胞脱落、炎症细胞浸润增多；给药组均能不同程度改善肺部间质增生现象及炎症渗出，与模型组比较有显著差异 ($P<0.05$)，但组间比较无显著差异 ($P>0.05$)。



注: Sham、NTHi、Amp、MXSG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组。与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 清肺消炎丸对小鼠一般情况的影响

Fig. 1 Effects of Qingfei Xiaoyan Pills on mice general conditions



注: Sham、NTHi、Amp、MXSG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组。与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 2 清肺消炎丸对炎症细胞因子水平的影响

Fig. 2 Effects of Qingfei Xiaoyan Pills on inflammatory cytokine levels

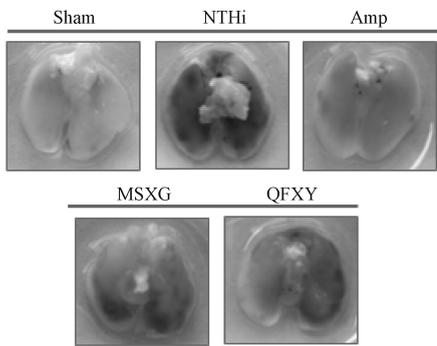
表 4 各组小鼠肺组织病变程度 (n=10)

Tab. 4 Lesion degrees of mice lung tissue in various groups (n=10)

组别	病变程度/只				P 值
	-	+	++	+++	
空白组	10	0	0	0	—
模型组	0	0	3	7	—
氨苄西林组	0	3	4	3	<0.05
麻杏石甘汤组	0	2	3	5	<0.05
清肺消炎丸组	1	3	3	4	<0.05

注: -表示无明显病变; +数量越多, 表示病变程度越严重

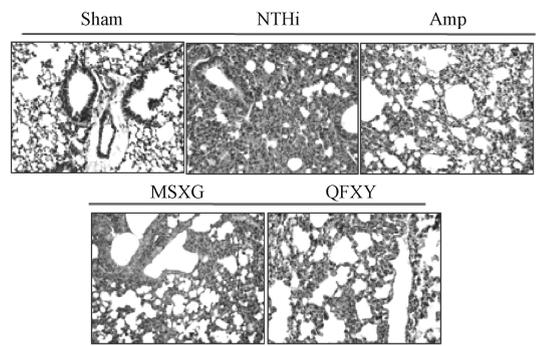
3.4 清肺消炎丸对TLR4、MyD88、TRAF6蛋白表达的影响 图5显示, 与空白组比较, 模型组TLR4、MyD88、TRAF6蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药组三者蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 效果依次为氨苄西林组>清肺消炎丸组>麻杏石甘汤组, 但组间比较无显著差异 ($P > 0.05$)。



注：Sham、NTHi、Amp、MSXG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组

图3 各组小鼠肺组织大体标本

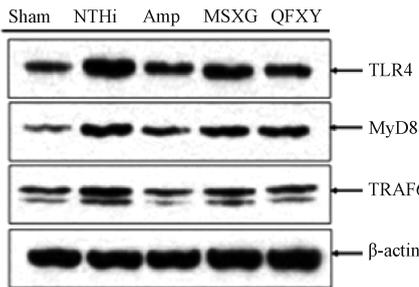
Fig. 3 Gross specimens of mice lung tissue in various groups



注：Sham、NTHi、Amp、MSXG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组

图4 各组小鼠肺组织病理变化 (HE, ×200)

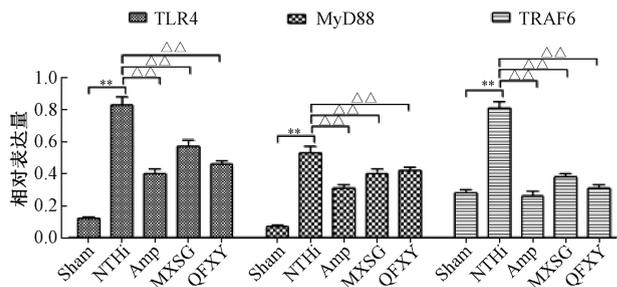
Fig. 4 Pathological changes of mice lung tissue in various groups (HE, ×200)



注：Sham、NTHi、Amp、MSXG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$

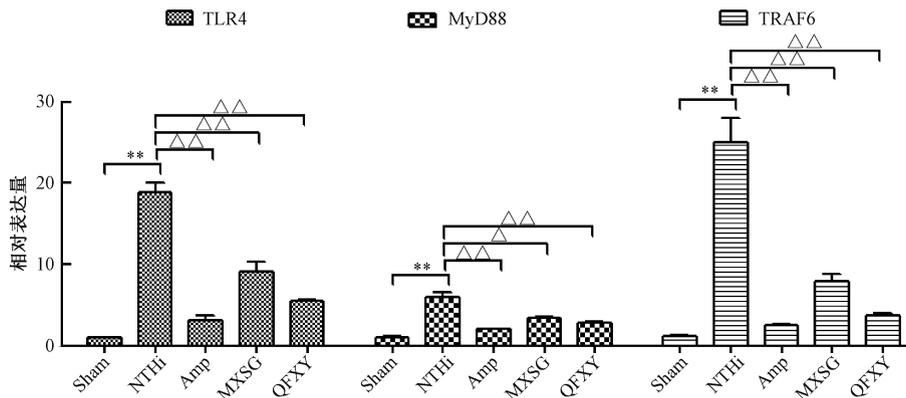
图5 清肺消炎丸对 TLR4、MyD88、TRAF6 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of Qingfei Xiaoyan Pills on TLR4, MyD88 and TRAF6 protein expressions



3.5 清肺消炎丸对 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达的影响 图6显示，与空白组比较，模型组 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达显著降低 ($P <$

0.01)；与模型组比较，给药组三者 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)，效果依次为氨苄西林组 > 清肺消炎丸组 > 麻杏石甘汤组。



注：Sham、NTHi、Amp、MSXG、QFXY 分别为空白组、模型组、氨苄西林组、麻杏石甘汤组、清肺消炎丸组。与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$

图6 清肺消炎丸对 TLR4、MyD88、TRAF6 mRNA 表达的影响

Fig. 6 Effects of Qingfei Xiaoyan Pills on TLR4, MyD88 and TRAF6 mRNA expressions

4 讨论

不可分型流感嗜血杆菌侵入下呼吸道后的感染

会释放细菌内毒素、纤毛毒素、蛋白水解酶等细菌产物，导致前炎症细胞因子释放，中性粒细胞、巨

噬细胞等炎性细胞在气道和肺实质的聚集和脱颗粒,诱导呼吸道黏膜上皮细胞释放前炎症细胞因子IL-8、IL-6、TNF- α 、ICAM-1表达,从而引发炎症,导致肺实质损伤和进行性小气道闭塞,甚至组织破坏和重构^[10]。炎症反应的启动有赖于模式识别受体(PRRS)对病原体保守分子的识别^[11],可识别流感嗜血杆菌的PRRS主要为Toll样受体(TLR)^[12-13],其中TLR4是典型的模式识别受体,主要表达于单核-巨噬细胞表面,识别内外源性致炎因子,介导肺部炎症反应^[14-15]。Wang等^[16]发现,LPS可诱导活化巨噬细胞,激活TLR4-MYD88-TRAF6信号通路,诱导肺实质损伤,抑制该信号通路时可抑制LPS诱导产生的肺实质损伤;Xu等^[17]报道,透明质酸可通过影响TLR4-MyD88-NF- κ B信号通路来减轻LPS诱发急性肺损伤小鼠肺组织的炎症反应和病理损害;本实验证实TLR4在不可分型流感嗜血杆菌诱导小鼠肺部炎症的发病机制中有着重要作用,其机制可能是TLR4通过直接或间接识别不可分型流感嗜血杆菌,启动MyD88依赖的信号通路,激活肿瘤坏死因子受体相关蛋白6(TKAF6),进而引起TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子介导机体抗细菌免疫应答,引起一系列炎症反应,这也提示药物若能在早期干预,可通过有效阻止不可分型流感嗜血杆菌诱导的TLR4-MyD88-TRAF6信号通路激活来避免或减轻肺部损伤。

清肺消炎丸以《伤寒论》中麻杏石甘汤为基础,保留主要药材麻黄、石膏、苦杏仁,增加地龙、牛蒡子、葶苈子、人工牛黄、羚羊角,方中麻黄辛温,宣肺平喘,是为君药;石膏辛甘大寒,清泻肺火;地龙清热平喘,共为臣药;苦杏仁甘大寒,止咳平喘;葶苈子泻肺平喘;牛蒡子解毒利咽;牛黄、羚羊角清热豁痰、凉肝熄风,共为佐药。该制剂既能宣通,又清内热,还有化痰、止咳、平喘的功效^[18],现代研究表明^[19]它具有止咳平喘、清肺化痰的功效,还可降低炎症因子表达,减少肺部细胞因子、炎细胞浸润,改善肺部组织坏死脱落,具有较好的抗炎效果。

本实验发现,清肺消炎丸能显著下调血清炎性细胞因子IL-1 β 、IL-6、GCSF、TNF- α 水平及肺组织TLR4、MYD88、TRAF6蛋白、mRNA表达,其机制可能是通过调控不可分型流感嗜血杆菌感染激活的TLR4-MYD88-TRAF6信号通路,进而抑制炎性细胞因子分泌,最终改善小鼠肺组织损伤和炎症

程度。但TLR4-MYD88-TRAF6信号通路是否为不可分型流感嗜血杆菌诱导肺部炎症的唯一通路还需进一步研究,而清肺消炎丸药效成分复杂,作用靶点多样,其相关物质基础也需深入探索。

参考文献:

- [1] Sethi S. Infectious etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis[J]. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 2): 380S-385S.
- [2] St Geme J W. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion[J]. *Cell Microbiol*, 2002, 4(4): 191-200.
- [3] Leroux-Roels G, Van Damme P, Haazen W, et al. Phase I, randomized, observer-blind, placebo-controlled studies to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an investigational non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) protein vaccine in adults[J]. *Vaccine*, 2016, 34(27): 3156-3163.
- [4] Khan M N, Ren D, Kaur R, et al. Developing a vaccine to prevent otitis media caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15(7): 863-878.
- [5] Clancy R L, Dunkley M L, Sockler J, et al. Multi-site placebo-controlled randomised clinical trial to assess protection following oral immunisation with inactivated non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Intern Med J*, 2016, 46(6): 684-693.
- [6] 何金鑫, 黄丽华. LPS-TLR4/NF- κ B信号通路与抗炎免疫研究进展[J]. *中外健康文摘*, 2013, 6(37): 27-29.
- [7] 张玲玲, 史欣德. 小柴胡汤治疗发热的调查分析[J]. *辽宁中医学院学报*, 2003, 5(4): 311-313.
- [8] Bakaletz L O, Leake E R, Billy J M, et al. Relative immunogenicity and efficacy of two synthetic chimeric peptides of fimbriae as vaccinogens against nasopharyngeal colonization by nontypeable *Haemophilus influenzae* in the chinchilla[J]. *Vaccine*, 1997, 15(9): 955-961.
- [9] 李玲, 卢芳国, 熊兴耀, 等. 麻杏石甘汤对A型流感病毒感染小鼠的免疫保护作用[J]. *中医药学报*, 2010, 38(2): 25-28.
- [10] Sethi S. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD[J]. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 1): 286S-291S.
- [11] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [12] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [13] Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, et al. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN[J]. *Blood*, 2009, 114(9): 1794-1802.
- [14] Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family[J]. *Immunol Lett*, 2003, 85(2): 85-95.

- [15] 李玲, 魏科, 卢芳国, 等. 基于TLR4-MyD88-TRAF6信号通路的麻杏石甘汤抗A型流感病毒感染小鼠所致的病毒性肺损伤研究[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1591-1596.
- [16] Wang J Q, Jeelall Y S, Ferguson L L, et al. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 367.
- [17] Xu C Q, Chen G, Yang W W, et al. Hyaluronan ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice via Toll-like receptor (TLR) 4-dependent signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(2): 1050-1058.
- [18] 张弦, 庞浩龙, 于旭红. 清肺消炎丸的临床应用评价[J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13(9): 780-781.
- [19] 程彬峰. 清肺消炎丸抗炎、平喘活性物质筛选及其作用机制研究[D]. 天津: 南开大学, 2013.

黄芪多糖对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas 轴及胰岛素抵抗的影响

马燕花¹, 邱晓青², 师霞¹, 余臣祖¹

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃兰州 730020)

摘要: 目的 探讨黄芪多糖对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas 轴及胰岛素抵抗的影响。方法 40 只大鼠随机分为正常组、模型组、黄芪多糖组 (400 mg/kg)、吡格列酮组 (20 mg/kg), 每组 10 只, 高脂饲料建立非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型。给药 4 周后, 测定体质量、肝湿重、血脂、肝功能、血清 Ang (1-7) 水平, 观察肝脏组织病理学变化, RT-PCR、Western blot 检测肝组织 ACE2、Mas、IRS-1 水平。结果 与模型组比较, 黄芪多糖组肝指数及 ALT、AST、TG、TC、MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), Ang-(1-7)、SOD 水平, Mas、ACE2、IRS-1 mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肝脂肪变性、炎症反应明显减轻。结论 黄芪多糖可有效缓解非酒精性脂肪性肝炎大鼠胰岛素抵抗, 其机制可能与上调 ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas 轴基因表达、改善胰岛素敏感性有关。

关键词: 黄芪多糖; 非酒精性脂肪性肝炎; ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas 轴; 胰岛素抵抗

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)05-1012-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.05.011

Effects of *Astragali Radix* polysaccharides on ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas axis and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis rats

MA Yan-hua¹, QIU Xiao-qing², SHI Xia¹, YU Chen-zu¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. The Hospital Affiliated to Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of *Astragali Radix* polysaccharides on ACE2-[Ang-(1-7)]-Mas axis and insulin resistance in non-alcoholic steatohepatitis rats. **METHODS** Forty rats were randomly divided into normal group, model group, *Astragali Radix* polysaccharides group (400 mg/kg) and pioglitazone group (20 mg/kg), 10 rats in each group. The rat model for non-alcoholic steatohepatitis was established by high-fat diet. After 4-week administration, body weight, liver wet weight, serum lipid, liver function and serum Ang (1-7) level were detected and liver histopathological changes were observed. ACE2, Mas and IRS-1 levels in liver tissue were detected by RT-PCR and Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the *Astragali Radix* polysaccharides group demonstrated significant decrease in liver index and ALT, AST, TG, TC, MDA levels ($P < 0.01$), marked increase in Ang-(1-7), SOD levels and Mas, ACE2, IRS-1 mRNA, protein expressions ($P < 0.05$, $P <$

收稿日期: 2018-05-08

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目 (81560753); 甘肃省中医药管理局资助项目 (GZK-2015-31); 甘肃省高等学校科研项目 (2017A-057)

作者简介: 马燕花 (1976—), 女, 博士, 副教授, 从事中西医肝病研究。Tel: 13893411954, E-mail: 617747928@qq.com