

不同工艺提取的大黄外用对肺炎支原体感染小鼠肺部炎症的影响

高畅^{1a}, 吴振起^{2*}, 刘光华^{1b}, 于艳², 汤玉梅^{1a}, 齐兆东^{1a}(1.辽宁中医药大学, a.研究生学院, b.基础医学院, 沈阳 110847; 2.辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

摘要: 目的 探讨不同工艺提取的大黄外用对肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染小鼠 JAK2/STAT3 信号通路的影响, 探究其改善小鼠肺部炎症的效应靶点。方法 将 40 只 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组、生粉组、醇提组, 每组 10 只。除正常组小鼠外, 其余 3 组采用滴鼻法进行 MP 感染。造模后, 将各组对应药物贴于小鼠背俞穴区 30 min·d⁻¹, 连续敷药 7 d。给药后第 7 天取材, 光镜下观察小鼠肺组织、皮肤病理切片, 计算肺组织病理评分、肺指数, 采用 ELISA 法检测血清及肺组织中 IL-6 含量, Western blotting 及 qPCR 检测 STAT3、JAK2 蛋白和 mRNA 的表达。结果 MP 感染后小鼠肺泡间隔增厚, 细支气管壁增厚, 炎性细胞浸润, 小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分、血清及肺组织中 IL-6 含量、肺组织中 STAT3 和 JAK2 的蛋白表达及 mRNA 含量均升高($P<0.05$)。治疗后小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分、血清及肺组织中 IL-6 含量均降低($P<0.05$), 且醇提组作用效果较生粉组明显, 但血清中含量差异不显著。与模型组比较, 醇提组、生粉组 STAT3、JAK2 蛋白及 mRNA 含量下降($P<0.05$)。结论 大黄醇提物外用可有效改善 MP 感染小鼠肺部炎症, 下调 IL-6、JAK2 及 STAT3 的表达, 为其治疗 MP 肺炎提供了参考。

关键词: 肺炎支原体; 大黄; 醇提; JAK2/STAT3; IL-6

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)22-2781-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.22.003

引用本文: 高畅, 吴振起, 刘光华, 等. 不同工艺提取的大黄外用对肺炎支原体感染小鼠肺部炎症的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(22): 2781-2786.

Effects of Different Extraction Processed Rhei Radix et Rhizoma on Pulmonary Inflammation in Mice Infected with *Mycoplasma Pneumoniae*

GAO Chang^{1a}, WU Zhenqi^{2*}, LIU Guanghua^{1b}, YU Yan², TANG Yumei^{1a}, QI Zhaodong^{1a}(1.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, a.Graduate School, b.School of Basic Medicine, Shenyang 110847, China; 2.Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of external application of Rhei Radix et Rhizoma extracted by different processes on JAK2/STAT3 signaling pathway in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae*(MP), and to investigate the target of improving pulmonary inflammation in mice. **METHODS** Forty BALB/c mice were randomly divided into normal group, model group, raw powder group and ethanol extract group, with 10 mice in each group. Except the normal mice, the other 3 groups were infected with MP by nasal dropping. After the model was established, the corresponding drugs of each group were applied to the Back-Shu acupoint area of mice for 30 min·d⁻¹ for 7 consecutive days. On the 7th day after administration, pathological sections of lung and skin of mice were observed under light microscopy. Lung histopathological scores and lung index were calculated. IL-6 content in serum and lung tissue was detected by ELISA. STAT3, JAK2 protein and mRNA expression were detected by Western blotting and qPCR. **RESULTS** After MP infection, the alveolar septum, bronchiolar wall, inflammatory cell infiltration, lung index, inflammatory pathological score of lung tissue, IL-6 content in serum and lung tissue, the protein expression and mRNA content of STAT3 and JAK2 in lung tissue of mice were all increased($P<0.05$). After treatment, lung index, pathological score of pulmonary inflammation, IL-6 content in serum and lung tissue of mice were decreased($P<0.05$), and the effect of ethanol extraction group was more obvious than that of raw powder group, but there was no significant difference in serum content. Compared with model group, the contents of STAT3, JAK2 protein and mRNA in ethanol extract group and raw powder group decreased($P<0.05$). **CONCLUSION** External application of Rhei Radix et Rhizoma ethanol extract can effectively improve the pulmonary inflammation in mice infected with MP and down-regulate the expression of IL-6, JAK2 and STAT3, which provides reference for its treatment of MP pneumonia.

KEYWORDS: *Mycoplasma pneumoniae*; Rhei Radix et Rhizoma; ethanol extraction; JAK2/STAT3; IL-6

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373687, 81874490); 辽宁省“百千万人才工程”资助项目(辽人社[2018]47 号); 沈阳市高层次人才创新人才计划项目(RC180246); 辽宁省高等学校创新人才支持计划(LR2019040)

作者简介: 高畅, 女, 硕士 Tel: (024)31961395 E-mail: 1033946327@qq.com *通信作者: 吴振起, 男, 博士, 主任医师 Tel: (024)31961395 E-mail: zhenqiwu@163.com

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是导致儿童社区获得性呼吸道感染的重要常见病原体之一;约占住院儿童社区获得性肺炎总量的10%~40%^[1-2]。肺炎支原体肺炎(*Mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP)多发于学龄前及学龄期儿童,患儿由于免疫力低下,易引发混合感染,故MPP具有延绵不愈、容易复发的特点,导致患儿的生活质量严重下降^[3]。目前,临床上治疗儿童MPP的首选药物为大环内酯类抗菌药物,但其存在单一用药及耐药的问题,直接影响疗效并且延长病程^[4]。随着现代医学与中医学的相互交流与渗透,中医在MPP早期干预及急性期治疗、改善预后等方面正在逐步显现其独特的作用。MPP的中医个体化辨证施治与西医诊疗相结合,或将成为MPP合理诊疗新的临床思路^[5]。辽宁中医药大学附属医院院内制剂敷胸散,药物组成包含生大黄粉、芒硝、大蒜泥,临床应用二十余年,疗效确切,可辅助治疗小儿肺炎,改善咳嗽咳痰,缩短肺部听诊啰音消失时间,促进患儿肺部炎症的吸收^[6]。为了进一步探究其组方作用机制,本研究建立了小鼠MPP模型,检测小鼠血清及肺组织中的白介素-6(interleukin, IL-6)含量,肺组织中JAK2、STAT3蛋白表达及基因含量,探究大黄外用对MP感染小鼠肺部炎症的影响机制,以及通过对比提取工艺筛选更适合作为外用药的提取物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4~6周龄SPF级BALB/c小鼠40只,♂♀各半,体质量(20±2)g,购自辽宁长生生物技术有限公司[动物生产许可证号:SCXK(辽)2013-0009],分笼饲养于辽宁中医药大学实验动物中心[动物使用许可证号:SYXK(辽)2015-0001]。用于饲养小鼠的饲料和水均经过高温高压灭菌后使用。饲养环境:湿度(50±2)%,室温20~22℃,12h/12h明暗周期。

1.1.2 病毒株 MP标准株FH,由辽宁中医药大学附属医院病毒实验室保存。

1.1.3 药品及制备 药物组成:大黄药材(来自甘肃)经辽宁中医药大学附属医院中草药局冷玉杰教授鉴定,符合中国药典2020年版相关项下要求,将所需药物用粉碎机粉碎至200 nm粉末,避光保存。大黄醇提物药液的配制方法:根据预试验结果选取最佳的提取方式,用60%乙醇加热回流提

取3次,每次2h,合并药液,回收全部溶剂并浓缩,放置于干燥至恒重的蒸发器皿中,持续低温水浴浓缩至干,于60℃恒温箱中干燥至恒重,将药物用粉碎机粉碎至200 nm粉末,避光保存。按照实验所需比例用水调和成膏状,放置于4℃冰箱冷藏备用。

1.1.4 试剂与仪器 Trizol总RNA提取试剂(Invitrogen,批号:1203406);RT-PCR试剂盒(批号:Bk2701)、DNA marker DL2000(批号:CB3301),DEPC(批号:BBI0916S03)均购自TaKaRa;GAPDH(BOSTER,批号:14MA18);IL-6 ELISA试剂盒(上海酶联,批号:02/2019);ECM II Western blotting检测试剂盒浓缩型兔IgG二抗(BOSTER,批号:12J27C)。

TP1020型自动组织脱水处理机、RM2135型精密轮转切片机、EG1150型石蜡包埋机均购自德国Leica。BX50F4型显微镜(Olympus);IMark型酶标仪(美国Thermo);LC-II荧光定量PCR仪(美国Roche);Biofuge 28RS低温高速离心机(德国Heraeus),PowerPacTM Universal Power Supply电泳通用型电源、Trans-Blot SD半干转印系统均购自美国Bio-Rad;FluorChem Q蛋白印记成像系统(美国Proteinsimple)。

1.2 方法

1.2.1 分组 将40只BALB/c小鼠按照随机数字表法分成4组,分别为正常组、模型组、生粉组、醇提组,每组10只,并对各组小鼠进行标记称重且记录。

1.2.2 模型制备 除正常组以外,其余各组小鼠均用乙醚轻度麻醉,再用1 mL注射器缓慢地向鼻腔滴入 1×10^7 CCU·mL⁻¹的MP菌液0.1 mL,连续滴鼻3 d。将正常组小鼠放置于无菌同等条件的房间,以等量的蒸馏水滴鼻处理。

1.2.3 给药方法 用剪刀将各组小鼠的被毛剪短,再用干净的棉球蘸取浓度为8%的硫化钠,在实验所需要的部位涂上薄薄的一层,大约经过3~5 min后用清洁的纱布蘸取适量的温水轻轻洗去脱落的被毛,擦干即可。脱毛面积大约为3 cm×2 cm,将各组对应药物放置于纱布上,用胶布绑定于小鼠背俞穴区30 min,用清水清洁皮肤,连续敷药7 d。于第7天给药后禁食、禁水,4 h后取材。

1.2.4 光镜下病理组织学观察 将4%多聚甲醛固定的肺组织用石蜡包埋机包埋成蜡块,再用切

片机切成约 5 μm 的薄片, 在光镜下观察经 HE 染色后的肺组织病理学改变情况。每个肺组织标本取 6 张切片, 每张切片随机取 3 个视野, 采集图像用高清晰度系统生物显微镜, 病理变化程度依照文献[7]进行计分。

1.2.5 皮肤刺激性检验及病理观察 各组小鼠背部剃毛区每天贴敷 1 次, 每次 30 min, 连续 7 d。每日涂药后用纱布蘸取适量温水清洗药物残留, 于去除受试物后 1, 6, 24 h 观察其皮肤的刺激反应情况, 第 7 日仅观察去除受试物后 1 h 皮肤的刺激反应情况。

剪取处死后小鼠的后背部剃毛区皮肤, 用剪刀将皮肤剪切至合适的大小, 面积约为 0.5 cm^2 , 然后将其放置于甲醛中固定, 脱水、包埋。然后进行 HE 染色, 将染色后的切片放置于显微镜下观察皮肤组织病理学改变。

1.2.6 血清及肺组织中 IL-6 表达水平检测 于小鼠感染后第 7 天取材, 摘取小鼠的眼球取血, 高速离心, 取上清液, 冻存于 EP 管置于 -80°C 的冰箱中备用。予小鼠脱颈处死, 将小鼠固定于无菌操作台呈仰卧位, 用 75%酒精消毒颈部及胸腹部, 以无菌专用器械进行取材操作, 打开胸腔, 剪取 50 mg 右肺于 EP 管中, 加入 1 mL 的生理盐水, 用组织匀浆机研磨充分, 放入 -80°C 冰箱中冷冻以备用。采用 ELISA 法测定小鼠血清中 IL-6 表达水平, 检测程序按照小鼠 IL-6 的 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.7 Western blotting 检测 STAT3、JAK2 蛋白的表达 称取肺组织, 提取总蛋白, 离心, 取上清液, 于 -20°C 冰箱中冻存。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 用蒸馏水将蛋白浓度调整为统一浓度。提取液中加入 5 $\times$ SDS 的上样缓冲液, 于 100°C 沸水中变性 10 min。每孔加 10 μL 的蛋白上样, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜 30 min, 加入 2% BSA 置于摇床上室温封闭 2 h。再加入一抗(稀释 1:1 000)STAT3、JAK2, 摇床上室温孵育 2 h, 4°C 过夜。TBST 清洗膜, 每次 10 min, 共 3 次。加入二抗(稀释 1:3 000)摇床上室温孵育 1 h, TBST 清洗膜, 每次 10 min, 共 3 次。加入适量 ECL 发光液, 运用 Fluor Chem Q 蛋白质印迹成像系统显色。

1.2.8 qPCR 测定 STAT3、JAK2 基因含量 引物根据文献设计, STAT3 上游引物: 5'-TTGGGCATCAA

TCCTGTGGT-3'; 下游引物: 5'-AGTAGTTCACAC CAGGCCCTA-3'; JAK2 上游引物: 5'-TGTGTGGA GCTTTGGAGTGG-3'; 下游引物: 5'-GCCTTGGC AATCTTCCGTTG-3'; 内参三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH), G1: 5'-ACCACCATGGAGAAGGCTG G-3', G2: 5'-CTCAGTGTAGCCCAGGATGC-3', 扩增特异片段长度为 528 bp, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。将各组小鼠肺组织从 -80°C 冰箱中取出, 于组织中加入 Trizol, 用组织剪将肺组织破碎, 制成细胞悬液, 提取细胞总 RNA。解析 RNA 的纯度、完整性, 在 RNA 质量检测合格后进行反转录, 再以反转录产物为模板, 添加 STAT3、JAK2 的引物, 进行 qPCR 检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺指数及病理评分

小鼠感染后, 模型组肺指数较正常组明显增高($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组肺指数均下降($P < 0.05$); 其中醇提组明显低于生粉组($P < 0.05$)。与模型组比较, 各治疗组病理评分均有不同程度下降($P < 0.05$); 其中醇提组明显低于生粉组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠肺指数及病理评分比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Comparison of lung index and pathological scores in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	肺指数/%	病理评分/分
正常组	0.54 $\pm$ 0.02	—
模型组	0.95 $\pm$ 0.03 ¹⁾	14.50 $\pm$ 1.08
生粉组	0.70 $\pm$ 0.05 ²⁾	8.90 $\pm$ 1.52 ²⁾
醇提组	0.55 $\pm$ 0.05 ²⁾³⁾	7.40 $\pm$ 1.43 ²⁾³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与生粉组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with raw powder group, ³⁾ $P < 0.05$.

2.2 肺组织光镜病理组织学观察

正常组小鼠肺泡、肺泡壁、肺泡间隔形态结构完整, 周围血管无炎性细胞浸润。模型组小鼠肺泡、肺泡囊、肺泡间隔等结构消失, 肺泡间隔增厚, 细支气管壁增厚, 大量炎性细胞浸润, 肺泡壁毛细血管扩张。生粉组小鼠可见少量炎症细胞浸润于肺组织, 并且可见其背膜增厚。醇提组

小鼠肺泡内可见少量炎症细胞,支气管黏膜上皮水肿显著减轻。小鼠肺组织病理观察结果见图 1。

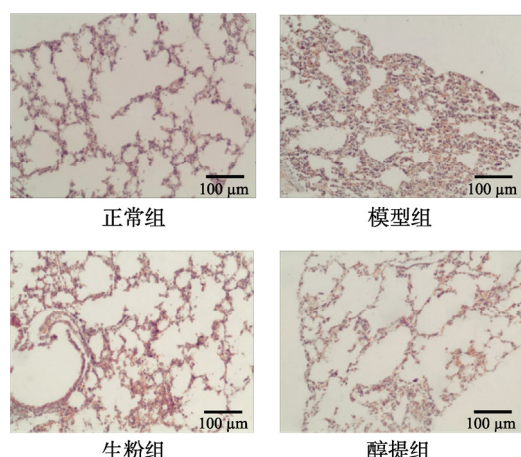


图 1 小鼠肺组织光镜病理改变(HE, 100×)
Fig. 1 Light microscopy pathological changes of lung tissue in mice(HE, 100×)

2.3 皮肤光镜病理组织学观察

正常组、生粉组和醇提组小鼠背部均无发红、渗血、糜烂、结痂,在生物显微镜下,正常组小鼠的表皮结构基本正常,模型组与 2 个治疗组小鼠皮肤与正常组基本无差异,表皮细胞无增厚,角质层无增厚、缺失,细胞层次未出现增多;真皮层细胞无炎症细胞浸润,腺上皮细胞正常。小鼠皮肤病理观察见图 2。

2.4 小鼠血清及肺组织中 IL-6 表达水平比较

小鼠感染后,与正常组比较,模型组血清和肺组织中 IL-6 表达均升高($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组血清和肺组织中 IL-6 表达均明显下降($P<0.05$);其中醇提组的肺组织 IL-6 含量明显低于生粉组($P<0.05$),而血清中醇提组虽低于生粉组,但差异无统计学意义。结果见表 2。

2.5 小鼠肺组织中 STAT3、JAK2 蛋白表达比较

小鼠感染后,与正常组比较,模型组肺组织

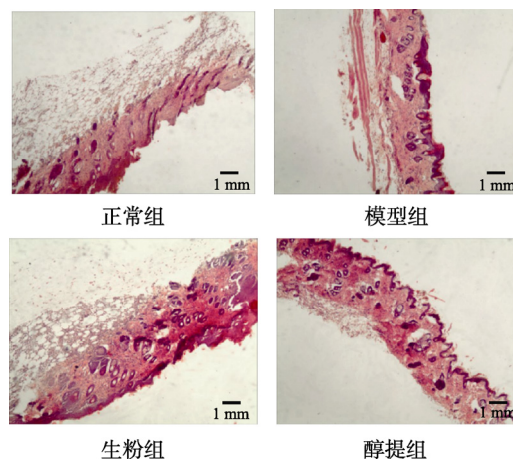


图 2 小鼠皮肤组织光镜病理改变(HE, 40×)
Fig. 2 Light microscopy pathological changes of mice skin tissue(HE, 40×)

表 2 各组小鼠血清及肺组织中 IL-6 表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Comparison of IL-6 expression levels in serum and lung tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	血清/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	肺组织/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$
正常组	85.92±12.63	325.34±26.72
模型组	130.16±6.98 ¹⁾	545.06±39.27 ¹⁾
生粉组	97.01±7.85 ²⁾	384.64±40.68 ²⁾
醇提组	90.31±12.52 ²⁾	337.65±28.79 ²⁾³⁾

注:与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$;与生粉组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with raw powder group, ³⁾ $P<0.05$ 。

中 STAT3、JAK2 蛋白表达明显增高($P<0.05$);与模型组比较,各治疗组蛋白表达均明显下降($P<0.05$);其中醇提组的蛋白表达明显低于生粉组($P<0.05$)。结果见图 3。

2.6 小鼠肺组织中 STAT3、JAK2 mRNA 表达比较

小鼠感染后,肺组织中 STAT3、JAK2 mRNA 相对表达量明显增高;与模型组比较,各治疗组 mRNA 相对表达量均明显下降($P<0.05$);其中醇提组与生粉组差异不显著。结果见表 3。

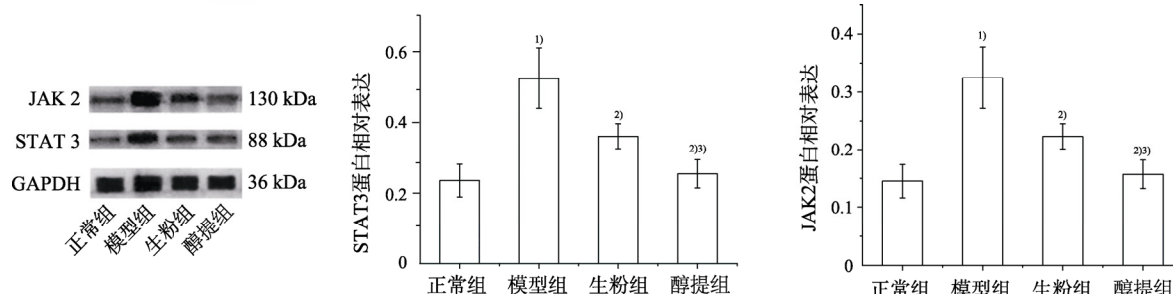


图 3 小鼠肺组织中 JAK2、STAT3 蛋白表达水平比较
与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$;与生粉组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Comparison of JAK2, STAT3 protein expression in lung tissues of mice

Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with raw powder group, ³⁾ $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠肺组织中 STAT3、JAK2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Comparison of STAT3 and JAK2 mRNA expressions in lung tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	STAT3 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)	JAK2 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)
正常组	—	—
模型组	4.471±0.874	5.735±0.515
生粉组	0.852±0.038 ¹⁾	1.071±0.148 ¹⁾
醇提组	0.437±0.019 ¹⁾	0.720±0.015 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$.

3 讨论

MP 是一种可独立生长繁殖的原核细胞型微生物, 介于病毒与细菌之间, 儿童多种呼吸道系统疾病皆由其引起^[8]。目前, MPP 的发病机制与 MP 直接黏附损伤、微循环障碍、CARDS 毒素损伤有关, 而宿主免疫损伤与失衡在整个发病机制中占有重要地位^[9]。炎症反应的活化与机体多条信号通路活化有关, 其中细胞因子受体介导的 JAK/STAT 信号通路是介导炎症介质过度表达的信号转导通路之一。JAK 由 JAK1、JAK2、JAK3、TYK 4 个成员组成; STAT 由 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b 和 STAT6 7 个主要成员组成^[10], 其中 STAT3 是细胞内重要的信号转导分子, 在细胞存活、增殖以及免疫细胞激活中起着重要的调节作用^[11]。MP 可诱导淋巴细胞、单核巨噬细胞等产生多种细胞因子, 其中 IL-6 是主要前炎症因子之一^[12]。IL-6 最重要的下游信号通路是 JAK2/STAT3 信号通路。IL-6 与细胞膜表面的 IL-6 受体结合后, 激活细胞内的 JAK2 激酶, 使胞浆内 STAT3 羧基端 705 位(Y705)的酪氨酸发生磷酸化。磷酸化的 STAT3 单体与另一 STAT3 分子磷酸化的酪氨酸残基通过在 SH2 结构域 608 位精氨酸相互作用形成二聚体进入细胞核, 与特异的 DNA 反应元件相结合, 调控靶基因转录, 发挥不一样的生物学效应^[13-14]。研究表明 IL-6 诱导 STAT3 的过度表达可引起肺气道炎症和肺气肿^[15], 因而阻断 JAK/STAT 信号传导通路能有效控制炎症损伤^[16]。

《神农本草经》中记载大黄: “味苦, 寒。主下瘀血; 血闭; 寒热; 破癥瘕、积聚; 留饮宿食, 荡涤肠胃, 推陈致新, 通利水谷, 调中化食, 安和五脏”。有研究表明^[17], 采用单味中药大黄外敷治疗小儿肺炎, 和单纯常规治疗相比较可明显

缩短病程, 消散肺炎炎症阴影, 吸收肺炎水泡音。近年来, 关于大黄或其主要成分的研究越来越多, 为治疗肺部相关疾病提供了现代医学基础。大黄具有多种药理学作用, 如泻下、抗肿瘤、抗炎、免疫调节等^[18], 其最主要的化学活性成分是蒽醌类化合物和它的衍生物, 包括大黄素、大黄酸等^[19]。有实验证实, 大黄中的有效活性成分可发挥比较强烈的抗炎作用, 其主要作用机制为抑制 MAPKs 通路, 避免其被激活, 进而明显降低 IL-6 炎症因子^[20]。目前大黄研究多以蒽醌类成分含量为指标, 由于其结合蒽醌成分的不稳定性, 受热容易分解成游离蒽醌成分, 为了保证蒽醌类成分的药效作用, 需要对其提取工艺进行研究^[21]。相关研究表明不同体积分数的乙醇溶液提取药物的效果基本优于水提的效果, 因而实际制剂生产中大黄多采用醇提工艺^[22-23], 这可能与蒽醌类成分母核极性较低, 在乙醇溶剂中溶解性相对较大有关, 同时温度的提高加速了结合蒽醌水解速度^[24]。大黄“泻下”效应为结合蒽醌到达结肠, 被酶解为游离蒽醌发挥泻下药效, 因此作为外用药, 游离型蒽醌的含量或许对体外透皮吸收性能及药效具有影响^[25-26]。为进一步探究不同提取工艺大黄外用的作用机制及靶点, 本次实验以 MPP 小鼠为模型进行研究。

研究结果显示, MP 感染后小鼠的肺指数和肺组织炎症病理评分均升高; 血清及肺组织中 IL-6 含量升高, 肺组织中 STAT3、JAK2 的蛋白表达及 mRNA 含量均升高。经药物外敷后, 小鼠肺指数、肺组织炎症病理评分降低, 血清及肺组织中 IL-6 含量均降低, 且醇提组作用效果较生粉组明显, 但醇提组和生粉组之间血清中含量比较差异无统计学意义, 这可能与外敷给药方式以及作用部位密切相关。大黄醇提组、生粉组均能下调 STAT3、JAK2 蛋白及 mRNA 含量, 且醇提组作用效果更为明显, 表明大黄外用贴于背俞穴, 可通过调节 JAK2/STAT3 信号通路改善小鼠肺部炎症。此外, 通过观察光镜下皮肤病理切片, 治疗组小鼠皮肤与正常组基本无差异, 表皮细胞无增厚, 角质层未出现增厚、缺失, 表明外敷大黄未对皮肤造成刺激及损伤, 较为安全。

综上所述, 大黄外敷可有效改善 MPP 肺部炎症表现, 其机制可能与抑制 IL-6、JAK2 及 STAT3 的表达有关, 同时醇提工艺制备大黄外敷药效果更明显, 为外用药治疗 MPP 提供了参考。

REFERENCES

- [1] WANG H D, LIN Y, ZHENG J G. Effect of Tanreqing injection and Montelukast Sodium tablets on children with *Mycoplasma pneumoniae*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(8): 999-1003.
- [2] JAIN S, WILLIAMS D J, ARNOLD S R, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among US children[J]. N Engl J Med, 2015, 372(9): 835-845. Doi: 10.1056/nejmoa1405870.
- [3] BROWN R J, NGUIDOP-DJOMO P, ZHAO H, et al. *Mycoplasma pneumoniae* epidemiology in England and Wales: A national perspective[J]. Front Microbiol, 2016(7): 157.
- [4] HE X Y, WANG X B, ZHANG R, et al. Investigation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric population from 12, 025 cases with respiratory infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(1): 22-27.
- [5] 中华中医药学会儿童肺炎联盟. 儿童肺炎支原体肺炎中西医结合诊治专家共识(2017 年制定)[J]. 中国实用儿科杂志, 2017, 32(12): 881-885.
- [6] HAO O M, WANG X F, LIU Y F. Comparative study of clinical efficacy between fuxiong cataplasms and Fuxiong powder in children pneumonia[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2016, 34(4): 820-822.
- [7] LIU X H, XIN D L, HOU A C, et al. A mouse model of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. Chongqing Med J(重庆医学), 2004, 33(9): 1338-1340.
- [8] Respiratory Branch of Chinese Pediatric Society of Chinese Medical Association, Editorial Board of Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics. Expert consensus on diagnosis and treatment of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children (2015)[J]. Chin J Appl Clin Pediatr(中华实用儿科临床杂志), 2015, 30(17): 1304-1308.
- [9] 谭丹, 姜之炎. 中医药治疗儿童肺炎支原体肺炎的机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1403-1406.
- [10] GUAN J, JIN D D, JIN L J, et al. Apoptosis in organs of rats in early stage after polytrauma combined with shock[J]. J Trauma, 2002, 52(1): 104-111.
- [11] YU H, PARDOLL D, JOVE R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 798-809.
- [12] 王英岩, 蒙艳丽, 钱锋, 等. 中药抗肺炎支原体作用的研究进展[J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(5): 65-67.
- [13] YU H, KORTYLEWSKI M, PARDOLL D. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(1): 41-51.
- [14] YIN P J, DI D M, LUO G H, et al. Up-regulation of MMP-10 expression is mediated by JAK2/STAT3 signaling pathway in human lung adenocarcinoma cell line[J]. Chin J Clin: Electron Ed(中华临床医师杂志: 电子版), 2009, 3(6): 904-912.
- [15] QUINTON L J, JONES M R, ROBSON B E, et al. Alveolar epithelial STAT3, IL-6 family cytokines, and host defense during *Escherichia coli* pneumonia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 38(6): 699-706.
- [16] WU P, HE W L, FU Y, et al. Effects of Fraxin on inflammatory factors expression and related pathways activation of rats with severe pneumonia[J]. Immunol J(免疫学杂志), 2020, 36(4): 292-298.
- [17] 郑丽新, 李强. 大黄单味外敷治疗小儿肺炎的临床观察[J]. 中医儿科杂志, 2009, 5(2): 46-47.
- [18] SONG Y D, LI X Z, WU Y X, et al. Emodin alleviates alternatively activated macrophage and asthmatic airway inflammation in a murine asthma model[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(8): 1317-1325.
- [19] CHEN Q Y, FU C M, LUO R F, et al. Research progress of effect of Rhei Radix et Rhizoma and its anthraquinone in treatment of autoimmune diseases[J]. China J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2021, 46(1): 15-23.
- [20] GUAN Y. Exploration on the active substances and mechanisms of Salvia-Safflower for cardioprotection and Salvia-Rhubarb for renoprotection[D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2015.
- [21] 彭红英, 周晓源. 单因素试验法优选大黄醇提工艺研究[J]. 农垦医学, 2006, 28(3): 180-182.
- [22] JIANG M L, GUO J S, YANG P H. Studies on effect of different extraction method to total anthraquinone content in Rhizoma Rhei[J]. J Mod Appl Pharm(现代应用药理学), 1993, 10(1): 33-34.
- [23] HUANG Y, XU X L, ZHANG Z R, et al. Orthogonal test for effect of water and alcohol extracting process to anthraquinone content in Rhubarb[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2003, 25(4): 15-18.
- [24] SUN Y Q, XIAO X H, MA Y G, et al. Optimization of extract process for anthraquinones from Radix et Rhizoma Rhei by SFE-CO₂ with central composite design[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2009, 44(22): 1689-1692.
- [25] LIU X G, LIU P, CHEN D W, et al. Optimization of preparation technology of colon-specific chitosan microspheres of rhubarb total anthraquinones[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(1): 38-42.
- [26] KUO C H, SUN S W. Analysis of nine rhubarb anthraquinones and bianthrone by micellar electrokinetic chromatography using experimental design[J]. Anal Chimica Acta, 2003, 482(1): 47-58.

收稿日期: 2020-11-01
(本文责编: 曹粤锋)