

# 枸杞多糖对免疫低下小鼠肺炎克雷伯菌感染的实验研究

徐珍<sup>1</sup>, 何冰瑶<sup>2,3,4</sup>, 王玮琪<sup>4</sup>, 李松樯<sup>4</sup>, 马东菊<sup>4</sup>, 熊莉晶<sup>4</sup>, 宋银宏<sup>4</sup>, 苏维敏<sup>5\*</sup>, 周永芹<sup>2,3,4\*</sup> (1. 三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443000; 2. 湖北省老年胃癌精准防治临床医学研究中心, 三峡大学附属第二人民医院, 湖北 宜昌 443000; 3. 天然产物研究与利用湖北省重点实验室, 三峡大学, 湖北 宜昌 443000; 4. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学, 湖北 宜昌 443000; 5. 宜昌市中心人民医院, 三峡大学人民医院, 湖北 宜昌 443000)

**摘要:**目的 本研究旨在探讨枸杞多糖(*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP)对免疫低下小鼠机会致病性肺炎克雷伯菌感染的影响。方法 采用环磷酰胺制备免疫低下小鼠模型,并随机分为肺炎模型组、LBP高(40 mg·kg<sup>-1</sup>)、中(20 mg·kg<sup>-1</sup>)、低(10 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组,同时设正常对照组。通过滴鼻给予肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)菌液制备肺炎小鼠模型,同时各组小鼠灌胃给予相应浓度的LBP,每日一次,持续10 d,对照组和模型组则给予等量生理盐水。实验期间,监测小鼠一般状态、体质量和生存率。实验结束,取小鼠的肺脏、脾脏、胸腺和肝脏,计算内脏指数;同时分析肺组织载菌量和组织病理;检测中性粒细胞吞噬能力、脾脏淋巴细胞亚群及增殖能力,以评估小鼠免疫功能。结合炎症相关细胞因子和氧化应激活性的分析,进一步揭示其作用机制。结果 模型组小鼠的一般状态、体质量和生存率均明显降低,同时伴随着中性粒细胞吞噬指数的显著下调,脾脏淋巴细胞总数、总T细胞、辅助性T细胞(T helper cell, Th)和B细胞含量也显著降低,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性低下,共同证明了免疫低下模型的制备成功。然而,经过不同剂量的LBP处理后,结果显示LBP可有效改善免疫低下合并KP感染肺炎小鼠一般状态和生存率。小鼠的肺脏指数较模型组明显降低( $P < 0.05$ ),表明肺部炎症减轻;肺组织匀浆载菌量显著降低,组织病理分析显示肺泡结构相对完整、充血及炎性渗出减少。同时,治疗组小鼠的淋巴细胞总数、总T细胞、Th和B细胞含量较模型组升高( $P < 0.05$ ),且高剂量组的差异具有显著性。此外,LBP组还呈现出明显提升的中性粒细胞吞噬指数和淋巴细胞增殖率,以及恢复的MPO和SOD活性,共同说明LBP具有免疫增强作用,进而发挥抗感染效应。最后,相较于模型组紊乱的血清细胞因子水平,LBP对异常升高的炎症细胞因子干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 和白细胞介素(interleukin, IL)-6水平呈现剂量依赖性的下调。结论 LBP可有效改善免疫低下合并KP感染肺炎小鼠一般状态和生存率。具体表现为降低肺组织载菌量、缓解肺组织病理损伤,伴随升高的淋巴细胞数量和增殖能力,增强中性粒细胞吞噬能力,纠正失衡的细胞因子水平和氧化应激水平等,共同提高免疫低下小鼠的免疫功能及抗感染能力,发挥免疫保护和免疫调节作用。

**关键词:**枸杞多糖;免疫低下;肺炎克雷伯菌;免疫调节;抗感染

doi:10.11669/cpj.2025.04.006 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)04-0363-10

## Effects of *Lycium Barbarum Polysaccharides* on *Klebsiella Pneumoniae* Infection in Immunocompromised Mice

XÜ Zhen<sup>1</sup>, HE Bingyao<sup>2,3,4</sup>, WANG Weiqi<sup>4</sup>, LI Songqiang<sup>4</sup>, MA Dongju<sup>4</sup>, XIONG Lijing<sup>4</sup>, SONG Yinhong<sup>4</sup>, SU Weimin<sup>5\*</sup>, ZHOU Yongqin<sup>2,3,4\*</sup> (1. Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 2. Hubei Province Clinical Medical Research Center for Precision Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer in the Elderly, The Second People's Hospital Affiliated to China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 3. Hubei Key Laboratory of Research and Utilization of Natural Products, China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 4. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443000, China; 5. Yichang Central People's Hospital, People's Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effects of *Lycium barbarum polysaccharides*(LBP) on opportunistic pathogenic *Klebsiella pneumoniae* infection in immunocompromised mice. **METHODS** Immunocompromised mouse models were constructed using cyclophosphamide, then randomly divided these mice into a pneumonia model group, high-dose LBP group(40 mg·kg<sup>-1</sup>), medium-dose

**基金项目:**湖北省老年胃癌精准防治临床医学研究中心开放基金项目资助(2022EGC-10);宜昌市医疗卫生科研项目资助(A24-2-058);肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金项目资助(2023KZL028);天然产物研究与利用湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金项目资助(NPRD-2018012)

**作者简介:**徐珍,女,硕士研究生 研究方向:中药药理与感染;何冰瑶,女,学士 研究方向:中药药理与益生菌。徐珍和何冰瑶为共同第一作者  
\* 通讯作者:苏维敏,女,硕士,副主任医师 研究方向:骨科感染;周永芹,女,博士,副教授 研究方向:中药药理,益生菌与感染及炎症相关疾病

LBP group ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), low-dose LBP group ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and a normal control group. Pneumonia mouse models were constructed by intranasal administration of *Klebsiella pneumoniae* (KP) bacterial solution. Mice in LBP-treated groups were administered LBP at corresponding concentrations through gavage once daily for 10 days, while the control and model group mice were given equal volumes of normal saline. During the experiment, the general condition, body weight, and survival rate of the mice were monitored. After the experiment, the lungs, spleen, thymus, and liver of the mice were collected to calculate the organ index. The lung tissue bacterial load and histopathology were analyzed, and the phagocytic capacity of neutrophils, spleen lymphocyte subsets, and proliferative capacity were detected to evaluate the immune function of the mice. Combined with the analysis of inflammation-related cytokines and oxidative stress activity, the mechanism of action was further revealed. **RESULTS** The general condition, body weight, and survival rate of mice in the model group were significantly decreased, accompanied by a significant downregulation of the neutrophil phagocytic index, a significant reduction in the total number of spleen lymphocytes, total T cells, T helper cells (Th), and B cells, as well as decreased myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) activity, collectively demonstrating the successful preparation of the immunocompromised model. However, after treatment with different doses of LBP, the results showed that LBP could effectively improve the general condition and survival rate of immunocompromised mice with KP-infected pneumonia. The lung index of mice in the LBP treatment groups was significantly lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ), indicating reduced lung inflammation. The lung tissue homogenate bacterial load was significantly decreased, and histopathological analysis showed relatively intact alveolar structure, reduced congestion, and decreased inflammatory exudation. At the same time, the total number of lymphocytes, total T cells, Th, and B cells in the treatment groups were increased compared with the model group ( $P < 0.05$ ), with significant differences in the high-dose group. In addition, the LBP groups also showed obviously increased neutrophil phagocytic index and lymphocyte proliferation rate, as well as restored MPO and SOD activity, collectively indicating that LBP has an immune-enhancing effect and exerts an anti-infective effect. Finally, compared with the disordered serum cytokine levels in the model group, LBP showed a dose-dependent downregulation of abnormally elevated inflammatory cytokines interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and interleukin (IL)-6 levels. **CONCLUSION** LBP can effectively improve the general condition and survival rate of immunocompromised mice with KP-infected pneumonia. Specifically, it reduces lung tissue bacterial load, alleviates lung tissue pathological damage, increases lymphocyte count and proliferative capacity, enhances neutrophil phagocytic capacity, corrects imbalanced cytokine levels and oxidative stress levels, etc., collectively improving the immune function and anti-infective ability of immunocompromised mice and exerting immune protection and immunomodulatory effects.

**KEY WORDS:** *Lycium barbarum* polysaccharide; immunocompromise; *Klebsiella pneumoniae*; immunomodulation; anti-infection

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 是一种革兰阴性杆菌,广泛分布于自然界,如土壤和水源,同时在人体的肠道和呼吸道等部位也常见<sup>[1]</sup>。近年来,由 KP 引起的机会性感染日益增多,已成为医院感染中革兰阴性菌的第二大原因<sup>[2-3]</sup>。当机体免疫力低下或长期大量使用抗生素导致菌群失调时, KP 常会导致社区获得性肺炎、院内获得性肺炎甚至重症肺炎,以及尿路、颅内、关节和皮肤软组织等不同部位的感染<sup>[4-5]</sup>。随着广谱抗生素的广泛使用,细菌的耐药问题愈发严峻,抗生素耐药已成为全球死亡的主要原因之一。根据抗微生物药物耐药性合作者 (antimicrobial resistance collaborators) 对 2019 年全球 204 个国家和地区的数据统计分析,与细菌耐药相关的死亡人数高达 495 万 (范围 362 ~ 657 万),其中直接死于细菌耐药的为 127 万<sup>[6]</sup>。在所有与耐药死亡相关的 6 种主要病原体 (大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌) 中, KP 位列第三<sup>[7]</sup>,因此 KP 已成为住院患者机会性感染中

抗微生物药物耐药性的一个常见原因<sup>[8-9]</sup>,并且是导致人类免疫缺陷病毒所致的获得性免疫缺陷综合征患者死亡和发病的主要原因之一<sup>[10]</sup>。

枸杞子 (*Lycii Fructus*), 又称枸杞、红耳坠,源自我国传统的药食两用功能性大宗药材——茄科小灌木植物枸杞的干燥成熟果实<sup>[11]</sup>。在《本草纲目》中,枸杞子被描述为“甘平而润,性滋补;能补肾、润肺、生精、益气,此乃平补之药”。无论是在传统还是现代应用中,枸杞子都被广泛地用于各种药膳食方和中药处方之中<sup>[12]</sup>。枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharides*, LBP) 作为枸杞子提取物中的主要生物活性成分<sup>[13-14]</sup>,是一种水溶性杂多糖复合物。现代药理学研究显示, LBP 具有抗氧化、抗衰老、降血糖、营养神经、保肝、免疫调节、抗肿瘤等多种生物学活性<sup>[13-18]</sup>,这些活性与枸杞子在传统药膳食方和中药处方中的应用功效密切相关。

本课题旨在研究 LBP 对免疫低下合并 KP 感染性肺炎小鼠的影响,以期为临床免疫功能低下、菌群失调患者的机会性感染防治提供新的思路和策略。

## 1 材料与仪器

### 1.1 主要仪器

SW-4T-2F 超净工作台(上海博讯实业公司医疗设备厂);TYPE1500-458 全波长酶标仪(美国Thermo Electron 公司);ISO9001 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);FACS Verse 流式细胞分析系统(美国 BD 公司);TS100 型倒置显微镜(日本Nikon 公司);MCD175 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(日本 SANYO 公司);Centrifuge 5424 离心机(德国 eppendorf 公司);CR21GII 系列高速冷冻离心机(日本日立公司)。

### 1.2 试剂

羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE, Sigma 21888-25MG-F)、刀豆蛋白 A (ConA, C5275-5MG, 美国 Sigma Aldrich)、瑞氏-吉姆萨染色液(BA-4017, 珠海贝索公司)、新生牛血清(NCS, 杭州四季青公司)、胎牛血清(FBS, LOT2045512CP, 美国 Gibco)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA, ST023-200 g, 碧云天生物公司)、无水乙醇(天津科密欧公司);小鼠单克隆荧光抗体(CD3-FITC: Cat#100306, CD4-PE: Cat#100408; CD8-APC: Cat#100712; CD19-PE: Cat#152407, 美国 Biolegend 公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, Cat#A001-3)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) (Cat#A044-1-1) 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);流式微球分析(cytometric bead array, CBA)小鼠辅助性 T 细胞(helper T cells, Th)1/Th2/Th17 细胞因子检测试剂盒(Cat#560485, 美国 BD 公司),枸杞多糖(CAS#107-43-7, 武汉远成共创科技公司),注射用环磷酰胺(江苏盛迪医药公司),营养肉汤和营养琼脂(青岛海博生物)。肺炎克雷伯菌、表皮葡萄球菌菌种由三峡大学感染与炎症损伤研究所保存。

### 1.3 实验动物

昆明小鼠 50 只,体质量(22~26) g,雌雄各半,由三峡大学 SPF 级实验动物中心提供(实验动物生产许可证号 SCXK(鄂)2020-0013;动物实验伦理审核编号 2022021Y)。小鼠自由摄食和饮水,环境温度控制在 22~25 °C,实验前适应性饲养 3 d。

## 2 方法

### 2.1 KP 菌液制备

将菌种分离划线接种于固体培养基,37 °C 培养过夜以复苏菌种。随后,挑取单克隆菌落接种于肉汤试管中进行增菌培养,再以体积分数 1% 接种新鲜肉汤培养基中进行活化。收集处于对数生长期的

新鲜菌液,使用无菌 PBS 离心 10 min (12 000 r · min<sup>-1</sup>),洗涤 2 次。参照标准曲线,以 600 nm 处的吸光度值(absorbance, A)调整菌液浓度至 1.5 × 10<sup>7</sup> 菌落形成单位(colony-forming unit, CFU) · mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 动物分组及处理

小鼠被随机分为 5 组,分别为:正常对照组(control)、KP 感染肺炎模型组(model)、LBP 低(10 mg · kg<sup>-1</sup>)、中(20 mg · kg<sup>-1</sup>)、高(40 mg · kg<sup>-1</sup>) 剂量治疗组,每组 10 只。治疗组小鼠每天接受 100 μL 对应浓度 LBP 溶液灌胃(intragastric, ig),每日 1 次,连续 10 d;对照组则接受等体积的生理盐水灌胃。在实验的第 4 天,以 60 mg · kg<sup>-1</sup> 体质量给予小鼠腹腔(intraperitoneal, ip)注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CY)溶液,每日 1 次,连续注射 4 d,制备免疫低下小鼠模型;对照组注射等量生理盐水作为替代。第 7 天,参照文献[19-20]略作修改,ip 注射戊巴比妥钠(40 mg · kg<sup>-1</sup>)麻醉小鼠,左侧鼻孔滴鼻(intranasally, in)每只给予 50 μL 的 KP 菌液(1.5 × 10<sup>7</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>),以制备免疫低下合并 KP 感染肺炎小鼠模型;N 组小鼠滴入等体积生理盐水(图 1A)。实验期间监测小鼠体质量、一般状态和生存率。

### 2.3 采集外周血

小鼠在细菌感染后 72 h,以摘眼球法取血。一部分血液加入肝素抗凝,用于检测外周血的中性粒细胞吞噬能力;余下不抗凝血待凝固后于 4 °C,10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,收集上清分装,-80 °C 冻存备用。

### 2.4 内脏指数测定

小鼠通过断颈法处死,浸泡于体积分数 75% 乙醇消毒 3~5 min,于净化工作台中完整摘取脾脏、胸腺、肝脏和肺脏,分别称重,并按下列公式 1。

$$\text{计算脏器指数: } I = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

式中, $I$  为小鼠的脏器指数; $m_1$  为小鼠的脏器质量(g); $m_0$  为小鼠的体质量(g)。

### 2.5 中性粒细胞吞噬功能测定

取 50 μL 肝素抗凝血与 25 μL 热灭活的表皮葡萄球菌菌液(5 × 10<sup>8</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>) 混匀,于 37 °C 湿盒中孵育 20 min(期间每隔 10 min 混匀一次)。取孵育后的含菌血液 10 μL,制备血涂片,瑞氏-吉姆萨染色,油镜镜检。按下列公式 2。

$$\text{计算吞噬指数: } P = \frac{N_1}{N_0} \quad \text{公式(2)}$$

式中, $P$  为吞噬指数; $N_1$  为被吞噬的细菌总数; $N_0$  为吞噬细菌的细胞总数。

## 2.6 肺部载菌量分析

无菌摘取肺组织,每只小鼠称取左肺叶组织 100 mg,眼科剪碎,以玻璃匀浆器反复研磨至匀浆,收集肺组织匀浆经 300 目滤网过滤,随后以 12 000  $g \times 10 \text{ min}$  离心,收集上清  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冻存储备。沉淀以 500  $\mu\text{L}$  无菌 PBS 重悬,每只取 50  $\mu\text{L}$  涂布琼脂平皿,37  $^\circ\text{C}$  培养箱培养过夜。次日,对平皿上的菌落进行计数。

## 2.7 脾脏淋巴细胞亚群检测

脾脏称重后放入预先盛有 5 mL 体积分数 2% NCS-PBS 的无菌培养皿,以注射器内筒轻轻研磨成单细胞悬液。300 目筛网过滤,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min。细胞沉淀加入红细胞裂解液裂红,洗涤 2 次,以体积分数 2% NCS-PBS 缓冲液调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  备用。

以每管 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入流式管中,随后加入 CD3、CD4、CD8 和 CD19 单克隆荧光抗体,4  $^\circ\text{C}$  避光孵育 30 min。孵育结束,离心洗涤后重悬,最后上流式细胞仪采样分析。

## 2.8 淋巴细胞增殖能力检测

取  $1.5 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  脾细胞悬液以预冷的体积分数 0.1% BSA-PBS 缓冲液重悬,4  $^\circ\text{C}$ 、1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 洗涤 1 次,弃上清。细胞沉淀以体积分数 0.1% BSA-PBS-CFSE 染液(CFSE 终浓度:3.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )2 mL 重悬,轻轻混匀后置 37  $^\circ\text{C}$  体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中避光染色 7 min。染色结束立即加入 2 mL 完全 NCS 孵育 5 min 终止染色,再以完全 1640 培养基离心洗涤 2 次,调整细胞至  $5 \times 10^6$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,然后接种到 24 孔板中。加入 Con A (质量浓度为 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 刺激增殖,37  $^\circ\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养 72 h。收集细胞,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 8 min 洗涤 2 次,随后以 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬,使用流式细胞仪检测分析。

## 2.9 肺组织匀浆生化指标检测

取适量小鼠肺组织,经冰冷生理盐水漂洗、除去血液,滤纸吸干、称重。按组织重量放入 9 倍体积量的生理盐水,冰上剪碎组织,并在冰浴下研磨以制备小鼠肺组织匀浆。样本均质化后,按照试剂盒说明书分别完成 MPO 和 SOD 活性检测。MPO 活性常作为中性粒细胞浸润的重要指标;而 SOD 可通过清除超氧化物自由基,保护组织细胞免受氧化应激损伤。

## 2.10 血清细胞因子水平测定

采用 BD 公司的 CBA 小鼠 Th1/Th2/Th17 细胞

因子检测试剂盒,参照文献[20]方法以流式细胞仪检测各组小鼠血清中炎症相关细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17;干扰素(interferon, IFN)- $\gamma$  和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  的水平。

## 2.11 肺组织病理分析

切取适当大小肺组织,以质量分数 4% 多聚甲醛液进行固定 24 h。之后进行梯度脱水处理,石蜡包埋并切片。采用苏木精伊红(HE)染色法进行染色,并以中性树脂封片。参照文献[19],采用双盲法对肺组织的病理改变进行评分。

## 2.12 统计分析

实验数据均采用平均值  $\pm$  标准误(mean  $\pm$  SEM)表示,保留小数点后两位。以 Graphpad Prism 7.0 进行单因素方差分析,检验水准为  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  表示有统计学意义。

# 3 结果

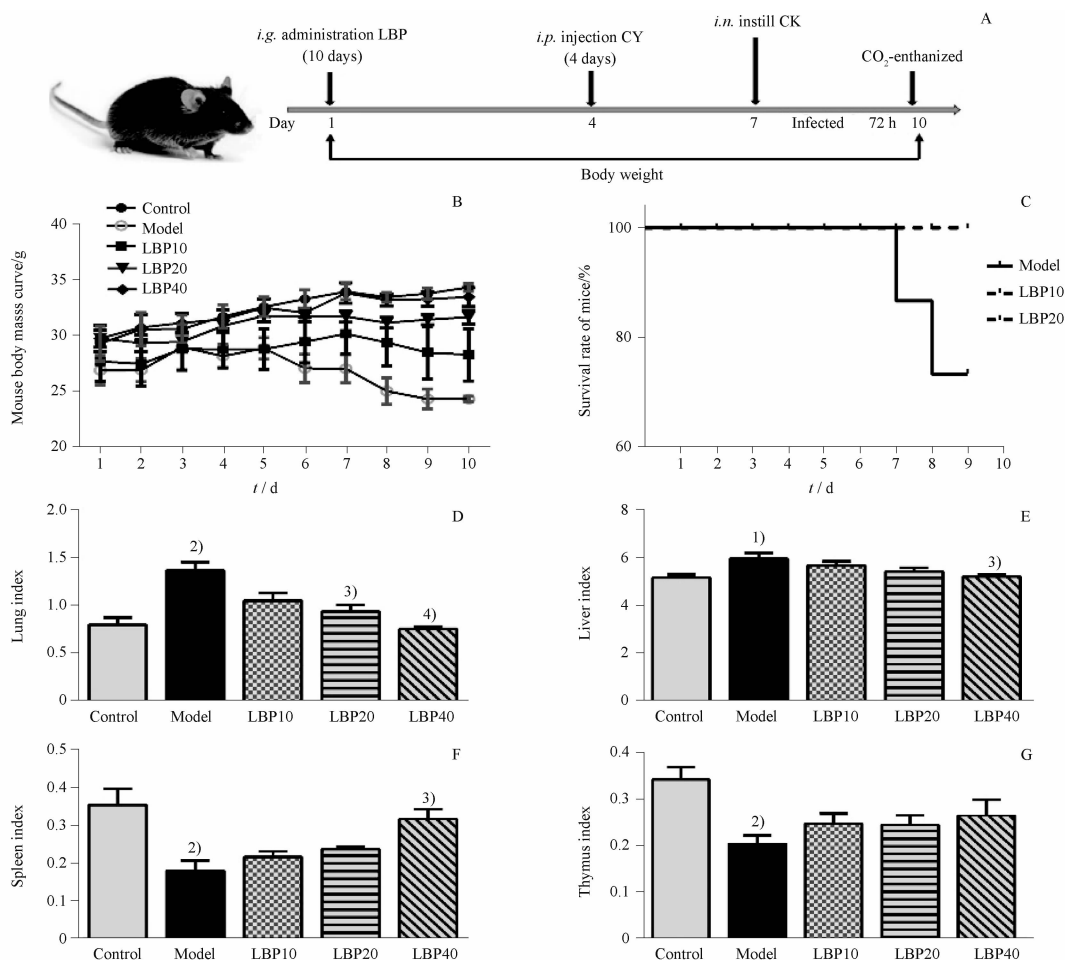
## 3.1 LBP 有效改善免疫低下合并 KP 感染肺炎小鼠一般状态和生存率

实验期间连续监测小鼠的体质量和一般状态(图 1A),结果显示注射 CY 后,模型组小鼠相较于正常对照组体质量出现下降。KP 菌液滴鼻后,小鼠活动明显减少,毛发润泽度进一步变差并出现明显的毛发竖立凌乱现象,整体缺乏活力,体质量显著减轻。相比之下,给药组小鼠皮毛顺滑度介于对照组和模型组之间,活动度尚可,体质量减轻的程度较模型组有明显改善(图 1B)。在合并感染后 24 ~ 48 h 期间,模型组小鼠出现小鼠死亡;而在同样感染状态下,药物处理组的小鼠均未发生死亡(图 1C)。

脏器指数的结果显示,模型组小鼠的肺脏指数较正常对照组显著增加( $P < 0.05$ ),说明肺质量增加(图 1D)。此外,模型组小鼠的肝脏指数(图 1E)也明显升高;而 LBP 干预组小鼠的肺、肝脏指数呈现剂量依赖性的不同程度缓解,尤其 LBP 中、高剂量组,相较于模型组有明显缓解( $P < 0.05$ )。然而,模型组的脾脏指数(图 1F)和胸腺指数(图 1G)均显著降低,表明出现了免疫抑制。LBP 干预的高剂量组在一定程度上缓解了这种免疫抑制状态。

## 3.2 LBP 有效缓解肺炎小鼠的肺组织病理损伤

正常小鼠的肺脏大体形态正常,肺组织切片镜下观察可见肺泡结构清晰,肺泡腔内干净,肺泡壁厚度均匀,间质无炎性细胞浸润,肺泡排列整齐。而模型组小鼠的肺脏呈现暗红色,镜下观察可见肺组织



A - 实验流程图; B - 小鼠体质量曲线图; C - 小鼠生存率; D - 肺脏指数; E - 肝脏指数; F - 脾脏指数; G - 胸腺指数; 与正常对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

A - experimental flowchart; B - mouse body weight curve; C - mouse survival rate; D - lung index; E - liver index; F - spleen index; G - thymus index. *vs* normal control group; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , *vs* control group; <sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ , *vs* model group.

图1 枸杞多糖(LBP)对肺炎克雷伯菌(KP)感染肺炎小鼠一般状态的影响。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 Effect of LBP on the general states of KP-infected pneumonia mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

出现明显的间质性病变:肺泡壁充血增厚,支气管周围有大量炎性细胞浸润,肺组织纹路紊乱,肺泡结构破坏,甚至完全闭塞,这些表现提示肺炎小鼠模型建模成功。

相比之下,LBP 干预组小鼠的肺组织结构有所改善:肺泡壁的充血水肿程度减轻,渗出现象减少。虽然局部仍有少量微血管扩张,但炎性细胞浸润有所减少,肺间质增厚得到缓解,肺组织结构相较于模型组有明显好转。这表明 LBP 对 KP 感染引起的肺炎有一定的缓解作用,且在本实验所选的剂量范围内存在量效关系。同时,肺组织病理评分的统计结果进一步说明了 LBP 显著缓解了肺脏的炎症及受损情况(图 2)。

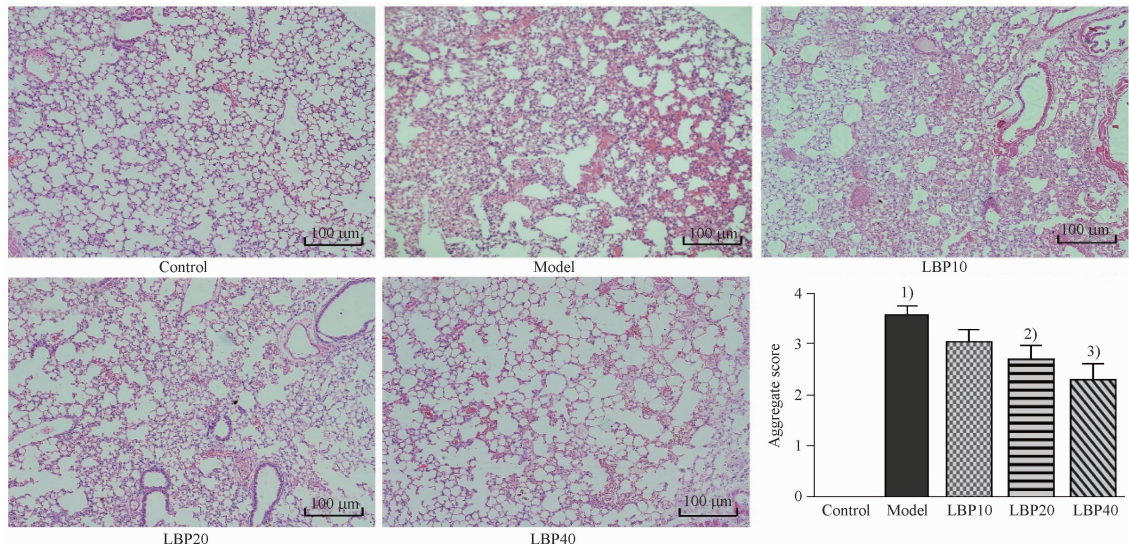
### 3.3 LBP 降低 KP 感染肺炎小鼠的肺组织细菌载量

为观察 LBP 对肺炎小鼠肺部载菌量的影响,小

鼠肺组织匀浆涂板培养结果显示,对照组小鼠的肺组织基本无菌生长,而模型组小鼠的肺组织则出现了大量的黏液型菌落,进一步说明 KP 感染性肺炎小鼠的模型成功建立。LBP 干预组的小鼠肺组织匀浆培养的菌克隆数有所减少,以高剂量组减少最为显著,表明 LBP 可通过降低小鼠肺部载菌量,对 KP 引起的肺炎产生治疗效果(图 3)。

### 3.4 LBP 增强肺炎小鼠的中性粒细胞吞噬功能

外周血中性粒细胞是体内重要的吞噬细胞群体之一,具有强大的移动能力和吞噬活性,其胞浆富含溶酶体、氧化应激相关酶 MPO 及抗氧化酶 SOD 等杀菌物质,构成宿主固有免疫防御的第一道防线。中性粒细胞噬菌实验的结果显示,对照组小鼠的吞噬指数为  $1.55 \pm 0.75$ ,而模型组的吞噬指数降至  $0.56 \pm 0.40$ ,说明模型组小鼠的中性粒细胞吞噬

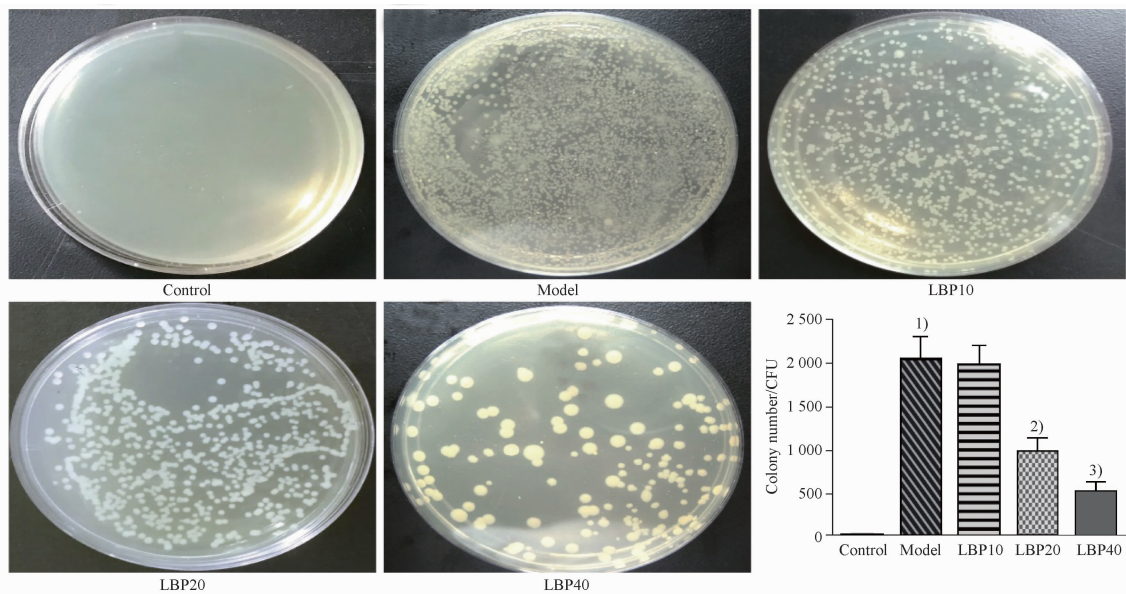


与正常对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group

**图 2** LBP 对 KP 感染肺炎小鼠肺组织病理形态学变化(HE,  $\times 10$ )。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

**Fig. 2** Effect of LBP on pathological and morphological changes in lung tissue of KP-infected pneumonia mice(HE,  $\times 10$ ).  $n = 10, \bar{x} \pm s$



与正常对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组与,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$ , vs model group.

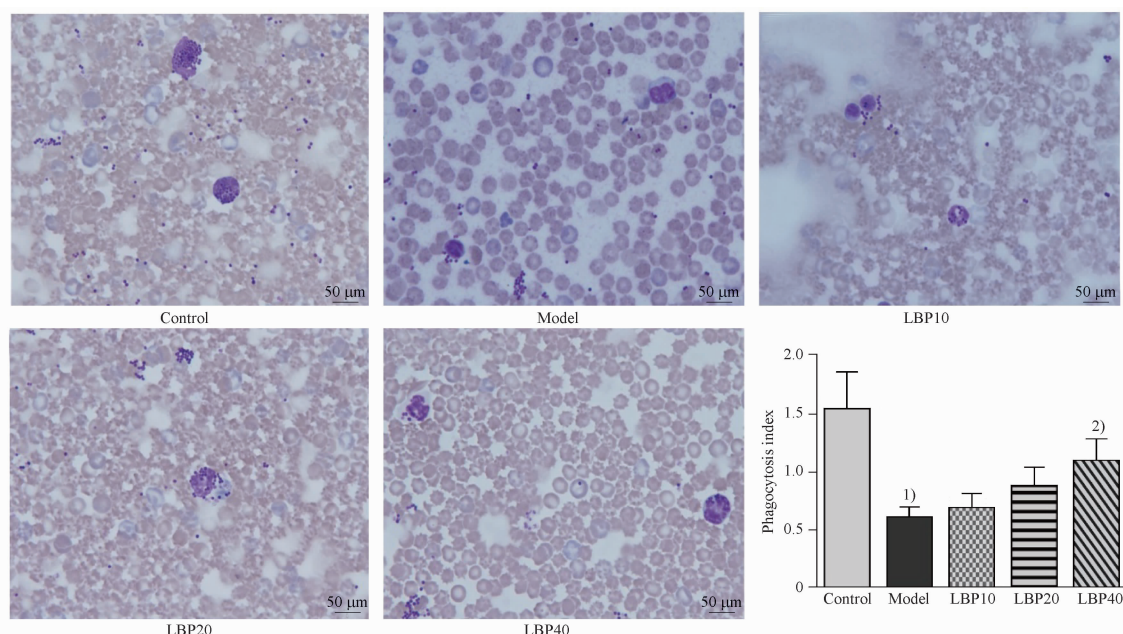
**图 3** LBP 对 KP 感染肺炎小鼠肺组织培养菌落计数的影响。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

**Fig. 3** Effect of LBP on the number of colony in lung tissue from KP-infected pneumonia mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

功能降低,进一步验证了本实验中免疫低下小鼠模型的成功建立。经过 LBP 的处理干预后,小鼠的中性粒细胞吞噬指数上升,其中高剂量组的升高具有显著性( $P < 0.05$ ) (图 4),提示 LBP 可以通过增强中性粒细胞的吞噬能力,提高机会感染性肺炎小鼠的抗感染能力。

### 3.5 LBP 恢复免疫低下合并感染的小鼠抗氧化能力 氧化应激和炎症反应是感染性疾病发病过程中

常见的两个病理反应过程。在感染发生的早期,宿主固有免疫系统的重要防御机制之一是通过中性粒细胞的脱颗粒作用释放过氧化物酶-环氧合酶超家族成员 MPO,后者可进一步促进组织细胞释放大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 等生物活性介质,这些介质在介导氧化应激发挥抗感染作用的同时,也可能导致组织病理损伤。体内的抗氧化酶如 SOD,



与正常对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group.

**图 4** LBP 对 KP 感染肺炎小鼠外周血中性粒细胞吞噬活性的影响 ( $\times 100$ )。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

**Fig. 4** Effects of LBP on phagocytic activity of peripheral blood neutrophil from KP-infected Pneumonia mice ( $\times 100$ ).  $n = 10, \bar{x} \pm s$

可通过催化超氧化物歧化生成氧和过氧化氢,从而清除氧自由基,维持氧化/抗氧化反应的平衡,减少组织损伤。为进一步探究 LBP 是否通过调控氧化应激反应发挥干预肺炎小鼠的作用,本研究接下来对肺组织匀浆中的 MPO 和 SOD 水平分别进行了分析。结果显示,与对照组相比,模型组小鼠肺组织中无论 MPO 水平还是 SOD 水平均显著降低,进一步证明小鼠的免疫功能处于低下状态。经灌胃给予 LBP 处理后,与模型组相比,小鼠肺组织中的 MPO 与 SOD 水平有所恢复,其中以高剂量组的升高具有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。这一结果表明, LBP 同时具有恢复免疫低下小鼠的抗氧化能力作用。

**表 1** LBP 对 KP 感染肺炎小鼠肺组织匀浆中髓过氧化物酶 (MPO) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 水平的影响。  $n = 10, \bar{x} \pm s$

**Tab. 1** Effects of LBP on expression levels of MPO and SOD in lung tissue homogenates of KP-infected pneumonia mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

Group	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MPO/ $U \cdot g^{-1}$
Control	126.20 $\pm$ 9.19	0.72 $\pm$ 0.51
Model	38.64 $\pm$ 9.57 <sup>1)</sup>	0.34 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>
LBP10	54.36 $\pm$ 8.37	0.44 $\pm$ 0.61
LBP20	67.62 $\pm$ 8.73	0.48 $\pm$ 0.73
LBP40	93.94 $\pm$ 12.79 <sup>2)</sup>	0.65 $\pm$ 0.62 <sup>2)</sup>

注:与正常对照组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

Note:<sup>1)</sup> $P < 0.01$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs model group.

### 3.6 LBP 纠正免疫低下合并 KP 感染小鼠失衡的淋巴细胞亚群

模型组小鼠脾脏中的淋巴细胞、总 T 细胞 ( $CD3^+$ )、Th 细胞 ( $CD3^+ CD4^+$ ) 以及 B 细胞 ( $CD19^+$ ) 含量均显著低于对照组,而  $CD3^+ CD8^+$  细胞毒性 T 细胞比例则呈现被动升高状态,进一步说明小鼠免疫功能低下。与模型组相比, LBP 处理组小鼠脾脏中失衡的淋巴细胞亚群得到纠正,其中以高剂量组的恢复效果最为显著 ( $P < 0.05$ ) (图 5)。

### 3.7 LBP 增强脾脏淋巴细胞增殖能力

在 Con A 刺激下,对照组小鼠脾脏淋巴细胞可见明显增殖,但同样条件下,模型组淋巴细胞则基本无增殖。与模型组相比, LBP 处理组小鼠的淋巴细胞增殖率呈现剂量依赖性的升高,说明 LBP 对免疫低下小鼠的免疫功能具有增强作用 (图 6)。

### 3.8 LBP 改善失衡的细胞因子水平

结果如图所示,与正常组比较,模型组小鼠血清中 IL-10 和 IL-17 水平显著降低; IL-4 和 IL-2 水平虽有降低,但不具有显著性。与 M 组相比, LBP 各治疗组的相应细胞因子水平有所增加,但无统计学意义。值得注意的是,受细菌性感染的影响,模型组中常见的炎性细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 而 LBP 处理组的这些炎性细胞因子呈现剂量依赖性的下调,展现出较强的免疫调节作用 (图 7)。

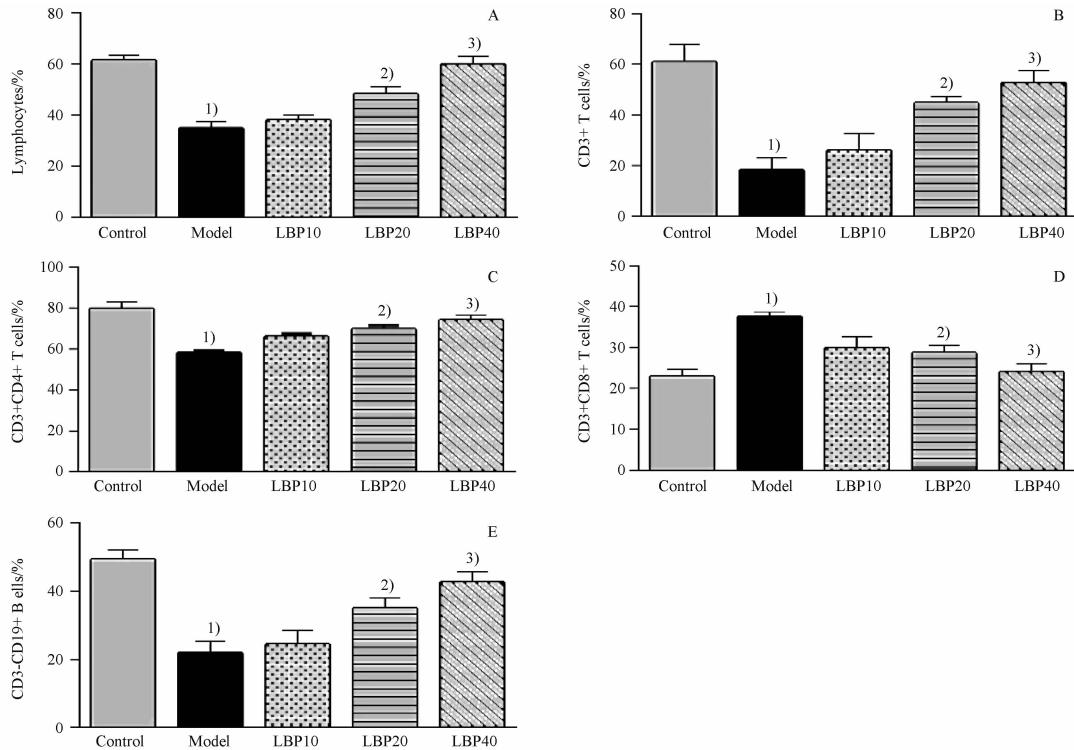


图5 LBP对KP感染肺炎小鼠脾脏淋巴细胞亚群的影响。n=10,  $\bar{x} \pm s$   
**Fig. 5** Effects of LBP on splenic lymphocyte subsets of KP-infected pneumonia mice. n=10,  $\bar{x} \pm s$

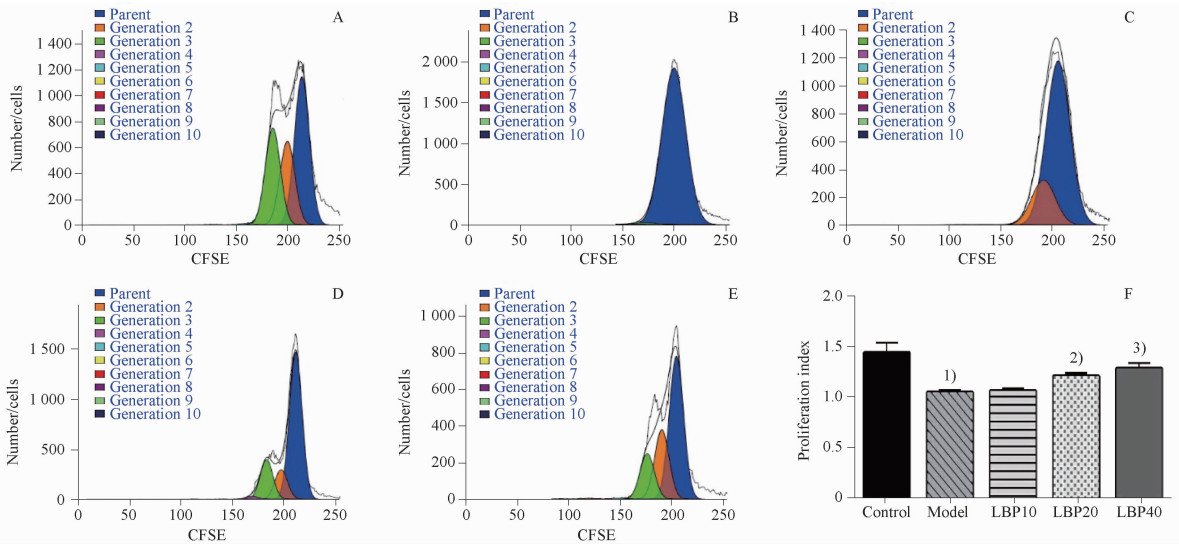
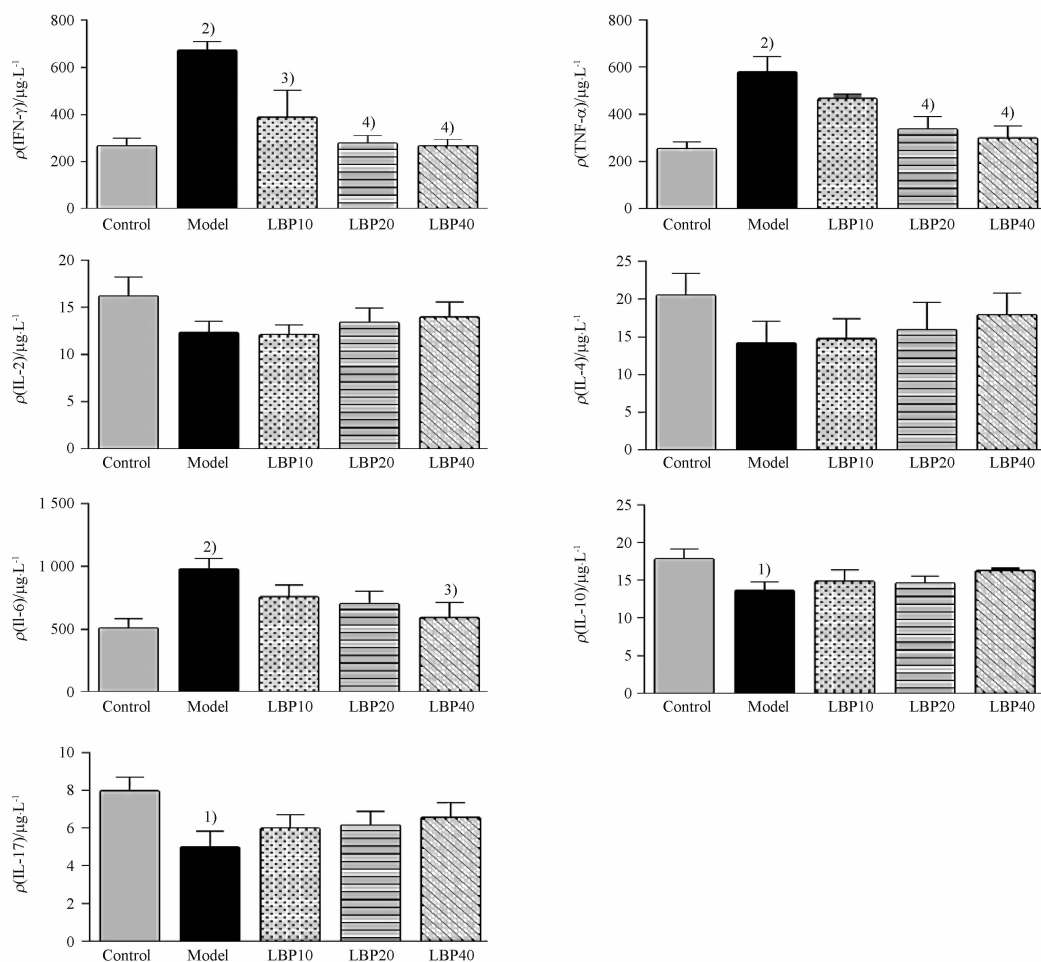


图6 LBP对KP感染肺炎小鼠脾脏淋巴细胞增殖活性的影响。n=10,  $\bar{x} \pm s$   
**Fig. 6** Effects of LBP on proliferation activity of splenic lymphocytes from KP-infected pneumonia mice. n=10,  $\bar{x} \pm s$

#### 4 讨论

本研究通过构建免疫低下小鼠模型并引入KP感染,系统评估了LBP对免疫功能低下机体的机会致病菌感染的影响,揭示了LBP在增强免疫功能及

抗感染方面的潜能。研究结果显示,LBP不仅能显著改善免疫低下小鼠的一般状态和生存率,还能有效降低肺组织载菌量,缓解肺组织病理损伤,这些发现为LBP在免疫治疗领域的应用提供了新的科学依据。



与正常对照组,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组,<sup>3)</sup> $P < 0.1$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。  
<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>3)</sup> $P < 0.1$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.05$ , vs model group.

图7 LBP对KP感染肺炎小鼠血清细胞因子的影响。 $n = 10, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effect of LBP on levels of serum cytokines from KP-infected pneumonia mice.  $n = 10, \bar{x} \pm s$

首先,通过环磷酸胺诱导的免疫抑制小鼠模型,成功观察到小鼠在免疫低下状态下的多重生理和免疫指标异常,包括体重下降、生存率降低、中性粒细胞吞噬指数下调以及脾脏淋巴细胞亚群含量减少等。这些变化共同验证了免疫低下模型的制备成功,为后续研究提供了可靠的基础。在LBP干预后,发现小鼠的一般状态和生存率得到了显著改善,表明LBP具有免疫保护和调节作用。具体而言,LBP能够降低肺脏指数,减少肺组织匀浆中的载菌量,并改善肺组织的病理结构,使肺泡结构相对完整,充血及炎性渗出减少。这些变化直接反映了LBP在减轻肺部炎症和抑制致病菌感染方面的积极作用。

此外,LBP对小鼠免疫功能的提升作用亦不容忽视。研究结果显示,LBP能够增加淋巴细胞总数和总T细胞、Th细胞和B细胞含量,这些细胞在免

疫应答中扮演着关键角色。同时,LBP还能提高中性粒细胞吞噬指数和淋巴细胞增殖率,进一步证实了其免疫增强效果。这些改变不仅有助于小鼠抵抗外界病原体的侵袭,还能促进机体的自我修复和恢复能力。在探讨LBP的作用机制时,我们发现LBP能够调节失衡的细胞因子水平和氧化应激水平。具体来说,LBP能剂量依赖性地降低异常升高的炎性细胞因子IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平,有助于减轻机体的炎症反应和免疫损伤。同时,LBP还能恢复MPO和SOD的活性,这些酶在清除自由基和抗氧化方面具有重要作用,从而有助于保护机体免受氧化应激损害。

值得注意的是,本研究还发现LBP的免疫增强效果与其剂量存在一定的相关性。高剂量LBP在改善小鼠免疫功能方面表现出更为显著的效果。这一发现为LBP的临床应用提供了重要参考,即在保

证安全性的前提下,适当增加 LBP 剂量可能有助于增强其免疫增强作用。

作为我国传统药食同源中药材枸杞的生物活性提取物,LBP 不仅具有优良的生物相容性和低廉的成本,还具有免疫调节、抗衰老、抗肿瘤、抗辐射等多种药理活性。本研究为 LBP 在免疫调节和抗感染领域的应用提供了有力证据,表明 LBP 有望成为防治机会性感染的替代或辅助疗法,为临床上免疫功能低下患者的机会性感染的防治提供新思路。

然而,本研究尚存在一定局限性。例如,未深入探讨 LBP 在免疫抑制小鼠中的具体分子机制,也未研究 LBP 与其他免疫调节药物的联合应用效果。因此,未来的研究将进一步探讨 LBP 的分子作用机制,并评估其与其他免疫调节药物的协同作用,以期 LBP 在免疫治疗领域的应用提供更全面的科学依据。

总之,本研究通过构建免疫抑制小鼠模型并探讨 LBP 在其中的作用,揭示了 LBP 在提升免疫功能及抗感染方面的潜力,为 LBP 的临床应用提供了新的科学依据,也为免疫功能低下患者机会性感染的防治提供了新思路。

## REFERENCES

- [ 1 ] LIU X, LIU Y, MA X, *et al.* Emergence of plasmid-borne tet (X4) resistance gene in clinical isolate of eravacycline-and omadacycline-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST485 [J]. *Microbiol Spectr*, 2024; e0049624. DOI: 10.1128/spectrum.00496-24.
- [ 2 ] LIANG Z, WANG Y, LAI Y, *et al.* Host defense against the infection of *Klebsiella pneumoniae*: New strategy to kill the bacterium in the era of antibiotics? [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12:1050396. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1050396.
- [ 3 ] GUO X, LI J, XU W, *et al.* Cost-effectiveness analysis of ceftazidime/avibactam in the treatment of hospital-acquired pneumonia due to Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2023, 58(19):1783-1788.
- [ 4 ] YANG X, DONG N, CHAN E W-C, *et al.* Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(1):65-83.
- [ 5 ] ZENG J, WAN X, LIU T, *et al.* Chlorogenic acid ameliorates *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia in immunosuppressed mice via inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19):9466-9475.
- [ 6 ] CASTAÑEDA-BARBA S, TOP E M, STALDER S. Plasmids, a molecular cornerstone of antimicrobial resistance in the one health era [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 22(1):18-32.
- [ 7 ] WYRES K L, LAM M M C, HOLT K E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(6):344-359.
- [ 8 ] MORADIGARAVAND D, MARTIN V, PEACOCK S J, *et al.* Evolution and epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland [J]. *mBio*, 2017, 8(1):e01976. DOI: 10.1128/mBio.01976-16.
- [ 9 ] FU H, CAO L, GAN L, *et al.* Application progress of bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant bacterial pneumonia [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2024, 59(6):549-554.
- [ 10 ] TILAHUN M, GEBRETSADIK D, SEID A, *et al.* Bacteriology of community-acquired pneumonia, antimicrobial susceptibility pattern and associated risk factors among HIV patients, Northeast Ethiopia: cross-sectional study [J]. *SAGE Open Med*, 2023, 11:20503121221145569. DOI: 10.1177/20503121221145569.
- [ 11 ] NEELAM K, DEY S, SIM R, *et al.* Fructus lycii: a natural dietary supplement for amelioration of retinal diseases [J]. *Nutrients*, 2021, 13(1):246. DOI: 10.3390/nu13010246.
- [ 12 ] XIAO Z, DENG Q, ZHOU W, *et al.* Immune activities of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. What do we know so far? [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 229:107921. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107921.
- [ 13 ] WANG Z, ZHANG X, LÜ D M, *et al.* Fructus lycii oligosaccharide alleviates acute liver injury via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Immunol Res*, 2023, 72(2):271-283.
- [ 14 ] ZHANG F, ZHANG X, GU Y, *et al.* Hepatoprotection of Lycii Fructus polysaccharide against oxidative stress in hepatocytes and larval zebrafish [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:3923625:3923621-3923614.
- [ 15 ] LIANG X, LIU M, GUO S, *et al.* Structural elucidation of a novel arabinogalactan LFP-80-W1 from Lycii fructus with potential immunostimulatory activity [J]. *Front Nutr*, 2023, 9:1067836. DOI: 10.3389/fnut.2022.1067836.
- [ 16 ] ZHANG X, DAI Y, WANG Y, *et al.* Research progress of Gouqi(*Lycium barbarum*) and predictive analysis on its Q-markers [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2024, 42(1):174-183.
- [ 17 ] ZHANG M, YUE K, JIANG J, *et al.* Research progress on pharmacological effects of Lycii Fructus and its active ingredients [J]. *Drug Eval Res*(药物评价研究), 2023, 46(7):1611-1619.
- [ 18 ] YANG Y, WANG Y, DENG Y, *et al.* Fructus Lycii and *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract attenuate oxidative stress-induced photoreceptor ferroptosis in retinitis pigmentosa [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167:115547. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115547.
- [ 19 ] WASBOTTEN R K, DAHLER A A, MACKEL J J, *et al.* Murine respiratory tract infection with classical *Klebsiella pneumoniae* induces bronchus-associated lymphoid tissue [J]. *Infect Immun*, 2022, 90(4):e0059621. DOI: 10.1128/iai.00596-21.
- [ 20 ] ZHOU Y, WENG X, DOU R, *et al.* Betulin from *Hedyotis hedyotideae* ameliorates concanavalin A-induced and T cell-mediated autoimmune hepatitis in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 2017, 2017(38):201-210.

(收稿日期:2024-08-23)