基于 TLR2/NF－κB 信号通路探讨茵陈清肺颗粒对肺炎支原体肺炎小鼠的调控作用及机制

王睿昊[1]，张葆青[2*]，贾广媛[2]，周旭[2]
（1. 山东中医药大学第一临床医学院，山东 济南 250011；2. 山东省中医院，山东 济南 250011）

摘要 目的：探究茵陈清肺颗粒治疗肺炎支原体肺炎（MPP）的作用机制和有效靶点。方法：选取 SPF 级 BALB/c 小鼠 36 只，普通饲料适应性喂养 3 d 后，随机选取 6 只作为空白组，剩余 30 只采用肺炎支原体（MP）菌液滴鼻联合高脂饮食和外环境法建立湿热闭肺证模型。成功建立模型后随机分为模型组、阿奇霉素组（给予阿奇霉素 90.1 mg·kg^{-1}·d^{-1}）、茵陈清肺颗粒高（8.109 g·kg^{-1}·d^{-1}、）、中（5.406 g·kg^{-1}·d^{-1}）、低剂量组（2.703 g·kg^{-1}·d^{-1}），模型组及空白组灌服等体积 0.9% 生理盐水。给药 3 d 后，在末次给药 4 h 后取材，HE 染色观察小鼠肺组织病理变化；RT－qPCR 技术检测肺组织 TLR2、MyD88、NF－κB p65 mRNA 表达水平；Western blot 技术检测肺组织 TLR2、MyD88、NF－κB p65 蛋白表达水平。结果：HE 染色结果表明，空白组可见肺泡结构清晰，模型组出现肺实变，大量炎性细胞浸润，血管内大量出血，各给药组均能改善小鼠肺组织病变、细胞浸润及炎症程度。mRNA 表达水平检测结果表明，与空白组比较，模型组 TLR2、MyD88 以及 NF－κB p65 的 mRNA 表达显著增高（$P<0.01$），与模型组比较，除茵陈清肺颗粒低剂量组 NF－κB p65 外，其余给药组的 mRNA 表达显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），茵陈清肺颗粒高剂量组 TLR2 mRNA 表达低于阿奇霉素组（$P<0.05$）。蛋白表达水平检测结果表明，与空白组比较，模型组 TLR2、MyD88 以及 NF－κB p65 的蛋白表达水平明显升高（$P<0.01$），除茵陈清肺颗粒中剂量组 MyD88、NF－κB p65 蛋白表达外，其他给药组通路蛋白表达均显著低于模型组（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：茵陈清肺颗粒能明显改善 MP 小鼠肺组织炎性症状，其机制可能与抑制 TLR2/NF－κB 信号通路相关。

关键词 TLR2/NF－κB；肺炎支原体肺炎；祛湿通络；茵陈清肺颗粒
中图分类号：R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1002－2392(2025)01－0029－06
DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250005

肺炎支原体肺炎（Mycoplasma pneumoniae pneumonia，MPP）由肺炎支原体（Mycoplasma pneumoniae，MP）感染所引起，在儿童社区获得性肺炎（Community acquired pneumonia，CAP）患儿中达 23% ～30%，尤其在 5 岁以上儿童中甚至可占到 50%[1]。小儿肺炎属于中医学“肺炎喘嗽”范畴，其临床症状常以咳嗽、发热、呼吸增快、肺部湿啰音为主要表现，胸部 X 线检查可见炎性改变。西医对于 MPP 的治疗，临床上仍推荐以阿奇霉素为首选的大环内酯类抗生素作为抗 MP 感染的一线药物，短时间内见效快，有效缓解病情[2－3]。但抗生素的过度使用导致耐药菌株的流行，抗菌药物的治疗效果并不理想[4]，亟须寻找安全有效减轻肺炎病理变化的治疗方法。张葆青教授发掘规律，总结经验，以甘露消毒丹为主方自拟祛湿通络方并形成院内制剂茵陈清肺颗粒，本研究拟通过检测肺组织中 TLR2/NF－κB 信号通路关键基因和蛋白的表达，进一步探究茵陈清肺颗粒治疗 MMP 的作用机制和有效靶点，为进一步临床运用提供相关实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级健康雌性 BALB/c 小鼠 36 只，5 周龄，体质量（15±2）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证编号：SXCK（京）2021－0006，于山东中医药大学实验中心 SPF 级动物房，普通饲料适应性喂养。饲养期间环境湿度 30% ～40%，温度 20～25 ℃，12 h

收稿日期：2024－02－04 **修回日期**：2024－07－17
基金项目：山东省中医药科技青年项目（2020Q015）；山东省中医药科技面上项目（2021M172）
作者简介：王睿昊（1997－），女，硕士研究生，研究方向：中医儿科肺系疾病。
*通信作者：张葆青（1965－），女，博士，主任医师，博士生导师，研究方向：中医儿科心肝系疾病、肺系疾病。

交替照明,避免噪音干扰。实验动物的饮食、二便,活动等情况,均未见异常即可进行实验。实验动物伦理由山东中医药大学动物利伦理审查委员会受理(2021 - 46)。

1.2 MP 菌株

MP 标准菌株(ATCC - 15531)购自上海宝录生物科技有限公司。

1.3 实验药物

阿奇霉素干混悬剂购自辉瑞制药有限公司,批号为 FL3506,剂量为 0.1 g;茵陈清肺颗粒是根据临床有效方剂经多年临床研究形成的山东中医药大学附属医院院内制剂(鲁药制备字 Z20220088000),批号为 23041802,剂量为 3 g。原方药物组成:茵陈 15 g,藿香 12 g,石菖蒲 12 g,黄芩 12 g,浙贝母 12 g,虎杖 12 g,桃仁 9 g,厚朴 9 g,甘草 6 g。

1.4 主要仪器与试剂

生物安全柜(BHC - 1300 Ⅱ A2,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);常温、低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);恒温恒湿培养箱(HHWS - n - 250,上海跃进);实时荧光定量 PCR 仪(Light Cycler 480 Ⅱ,Roche);全波长酶标仪(Bio Tek Cytation5,美国伯腾);石蜡切片机(RM2255,Leica);多色荧光成像系统(Amersham Imager 600,GE);研磨仪(KZ - Ⅱ,武汉塞维尔);涡旋混匀仪(MV - 100,武汉赛维尔);荧光倒置显微镜(CKX41,OLYMPUS)。

总 RNA 快速提取试剂盒、SPARK script Ⅱ RT Plus Kit、2 × SYBR Green qPCR Mix(山东思科捷生物技术有限公司,批号:AC0202、AG0304、AH0104);小鼠 GAPDH 内参引物(上海生工,批号:J609KA9737);小鼠 TLR2 Rabbit pAb(ABClonal,批号:A2545);Myd88 Rabbit mAb、NF - κB p65 Rabbit mAb(美国 Cell Signaling 公司,批号:4283S、8242T);HRP - conjugated GAPDH Monoclonal antibody(武汉三鹰,批号:HRP - 60004);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H + L)(北京中杉金桥,批号:222070627)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

普通饲料适应性喂养 3 d,36 只小鼠体质量、精神状态无明显差异,按数字法随机分成 6 组,空白组、模型组、阿奇霉素组、茵陈清肺颗粒低、中、高剂量组。采用 MP 菌液滴鼻联合肥甘饮食和外环境造湿热模型,空白组小鼠继续普通饲料喂养,造模组小鼠改换高脂饲料(普通饲料中混入 12% 猪油,8% 蜂蜜)喂养,每日将模型组小鼠置于潮湿外环境下 2 h,于双数日灌服 29.5°九江双蒸酒 0.3 mL,第 11 天开始用兽用异氟烷轻度麻醉后,将 1×10^7 CCU/mL 的 MP 菌液 0.2 mL 缓慢滴入小鼠鼻腔,使其随小鼠自然呼吸进入肺部,滴鼻 1 次/d,连续 3 d。

第 14 天开始给予药物灌胃干预,小鼠给药剂量参照杜冠华主编的《实验药理学》[5] 中动物给药剂量计算公式,小鼠的给药剂量 = 人的临床剂量 ×(鼠的剂量折算系数 ÷ 人的剂量折算系数),小鼠与人之间的折算系数为 9.01,按 20 kg 小儿用量为中剂量折算,低剂量为 0.5 倍给药,高剂量按 1.5 倍给药。

茵陈清肺颗粒按照说明书,4 ~ 6 岁小儿每天用量为 4 袋/d,每袋 3 g,则给药剂量为 600 mg/kg。

阿奇霉素干混悬剂根据临床用药规律,20 kg 小儿每日用量 200 mg,则给药剂量为 10 mg/kg。

计算可得小鼠最终给药剂量:阿奇霉素组混悬液 90.1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$、茵陈清肺颗粒低剂量组浓缩液 2.703 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$、中剂量组浓缩液 5.406 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,高剂量组浓缩液 8.109 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$。

2.2 一般情况观察

造模及给药过程中,观察小鼠毛发、饮食、活动及体质量的变化。

2.3 取材

给药后对小鼠禁食禁水 4 h,采用戊巴比妥钠腹腔麻醉小鼠后脱颈处死,剪取一部分肺组织置入 4% 浓度的多聚甲醛溶液中等待处理进行后续 HE 染色,剩余存于 - 80 ℃冰箱,用于后续检测基因和蛋白的定量表达。

2.4 HE 染色观察小鼠肺组织病理形态变化

小鼠肺组织在 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,浸蜡,包埋,切成 5 μm 薄片,进行 HE 染色,中性树胶封片后光镜下观察小鼠肺组织病理形态变化。

2.5 RT - qPCR 技术检测相关基因表达水平

按照试剂盒要求提取肺组织总 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR,总反应体系为 20 μL:qPCR Mix 10 μL、cDNA 1 μL、上游引物下游引物各 0.4 μL、RNase Free H_2O 8.2 μL。反应条件:1 cycle,94 ℃ 3 min;40 cycle,94 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各基因相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。

2.6 Western Blot 技术检测相关蛋白表达水平

取肺组织称重,使用眼科剪将组织剪碎后,加入预冷的 PBS 磷酸盐缓冲液 1 mL 离心弃上清,根据组织重量加入相对应量的 RIPA 裂解液、PMSF、2 ~ 3 颗研

磨珠，使用组织研磨仪对肺组织匀浆 3 次，匀浆后置于冰上裂解 20 min，离心 20 min，取上清测 BCA 蛋白浓度，加 5 × 蛋白上样缓冲液水浴加热变性，PAGE 凝胶电泳后转膜至 PVDF 膜上，快速封闭液封闭 20 min，加入稀释后一抗 4 ℃孵育过夜，TBST 洗膜，加入二抗室温孵育 1 h，TBST 洗膜，曝光显影，保存数据，用 Image J 软件对条带进行灰度分析，计算蛋白相对表达量。

2.7 统计学处理

采用 IBM SPSS Statistics 21、Prism 8.0 软件进行数据处理和绘图。对于满足正态分布且方差齐性的计量资料，当涉及两组间的比较时，采用独立样本 t 检验；多组间对比分析则采取单因素方差分析方法，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	上游引物(5′ to 3′)	下游引物(5′ to 3′)
TLR2	TGGTGTCTGGAGTCTGCTGTG	GCTTTCTTGGGCTTCCTCTTGG
MyD88	TATACCAACCCTTGCACCAAGTC	TCAGGCTCCAAGTCAGCTCATC
NF－κB p65	ATCCCTGCTTCCCCTTTCTC	CTGTCTTATGGCTGAGGTCTGGT
GAPDH	GTCCAATGATCCAATGGATCTTA	ATCCGTAAATGCTAAGCCGCATG

3 结果

3.1 各组小鼠体质量变化

记录各组小鼠体质量，如表 2 所示，空白组小鼠体质量逐渐上升，其余组小鼠前期体质量增长较快，在第 5 天时体质量高于空白组小鼠，之后的体质量增长趋势有所降低。给药治疗后，阿奇霉素组和不同剂量茵陈清肺颗粒组体质量增长趋势明显高于模型组，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

表 2 各组小鼠体质量变化（$g, \bar{x} \pm s, n = 6$）

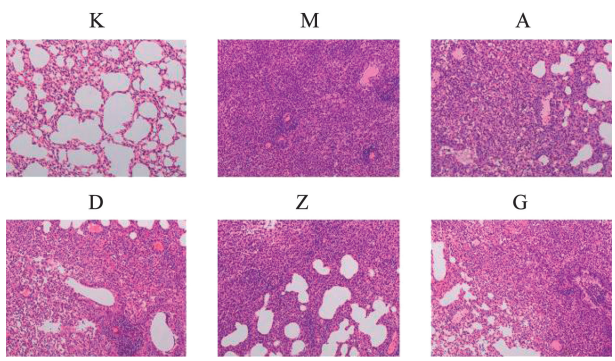
组别	剂量	第 0 天	第 5 天	第 10 天	第 13 天	第 16 天
空白组	0	15.13 ± 0.45	15.78 ± 0.37	16.53 ± 0.33	16.80 ± 0.38	17.15 ± 0.38
模型组	0	15.08 ± 0.36	16.97 ± 0.37	18.27 ± 0.36	18.67 ± 0.39	19.00 ± 0.40
阿奇霉素组	90.100 mg/kg	15.72 ± 0.18	17.50 ± 0.20	18.63 ± 0.38	18.97 ± 0.35	19.81 ± 0.26
茵陈清肺颗粒低剂量组	2.703 g/kg	15.42 ± 0.27	16.95 ± 0.64	18.33 ± 0.57	18.75 ± 0.54	19.52 ± 0.50
茵陈清肺颗粒中剂量组	5.406 g/kg	15.41 ± 0.62	16.83 ± 0.54	18.23 ± 0.51	18.62 ± 0.46	19.52 ± 0.42
茵陈清肺颗粒高剂量组	8.109 g/kg	15.85 ± 0.56	17.83 ± 0.39	19.02 ± 0.15	19.40 ± 0.09	20.18 ± 0.16

3.2 小鼠行为学变化

空白组小鼠精神状态良好，毛发正常有光泽，活动良好，大小便正常。模型组小鼠随着湿热模型造模的进展，出现精神烦躁、抓挠头面部、皮毛逐渐枯槁无泽、食欲不振、饮食进水减少等症状，小便颜色较深，大便质黏，气味较空白组臭，给予 MP 滴鼻造模后出现寒战、呼吸频率增快、口鼻周围出现分泌物等症状，另有不同程度的大便黏滞或溏泄伴臭秽。

3.3 茵陈清肺颗粒对模型小鼠肺组织形态的影响

在光镜下对各组肺组织进行 HE 染色并观察，结果如图 1 所示，空白组可见肺泡结构清晰，上皮细胞排列整齐，管壁厚度正常，肺泡内无明显分泌物，未见巨噬细胞、中性粒细胞等细胞浸润；与空白组相比，模型组出现肺实变，肺泡消失，肺内出现大量炎性细胞、中性粒细胞浸润，血管内大量出血，上皮细胞增生严重；阿奇霉素、茵陈清肺颗粒高、中、低剂量组出现肺实变，但肺实变情况相较模型组有所改善，上皮细胞增生严重，肺泡融合成肺大泡，肺泡内可见分泌物，肺内出现大量炎性细胞浸润，可见血管内有大量出血现象。



注：K. 空白组；M. 模型组；A. 阿奇霉素组；D. 茵陈清肺颗粒低剂量组；Z. 茵陈清肺颗粒中剂量组；G. 茵陈清肺颗粒高剂量组。

图 1 各组小鼠肺组织形态（HE，×20）

3.4 各组小鼠肺组织中 TLR2、MyD88、NF－κB p65 mRNA 的表达量比较

如表 3 所示，模型组 TLR2、MyD88、NF－κB p65 的 mRNA 表达均高于空白组（$P < 0.01$）；阿奇霉素组、茵陈清肺颗粒中、高剂量组的 mRNA 表达均低于模型

组($P<0.01$)；茵陈清肺颗粒高剂量组 TLR2 mRNA 表达低于阿奇霉素组($P<0.05$)；茵陈清肺颗粒中剂量组 TLR2 mRNA 的表达和高剂量组 NF－κB mRNA 的表达与阿奇霉素组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3　各组小鼠肺组织中 TLR2、MyD88、NF－κB p65 mRNA 的表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TLR2	MyD88	NF－κB P65
空白组	1.00±0.092	1.00±0.10	1.03±0.32
模型组	32.13±5.02▲▲	10.89±0.58▲▲	9.69±1.37▲▲
阿奇霉素组	13.66±1.39**	4.39±0.14**	5.43±0.56**
茵陈清肺颗粒低剂量组	17.73±0.87**	8.75±0.99*	9.04±2.09
茵陈清肺颗粒中剂量组	12.75±1.80**	7.15±0.68**	5.55±0.12**
茵陈清肺颗粒高剂量组	10.17±1.13**△	4.78±0.15**	5.03±0.27**

注：与空白组相比，▲▲$P<0.01$；与模型组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与阿奇霉素组相比，△$P<0.05$。

3.5　各组小鼠肺组织中 TLR2、MyD88、NF－κB p65 蛋白的表达量比较

模型组 TLR2 的蛋白表达高于空白组($P<0.01$)；其他药物干预组的表达均低于模型组($P<0.05$)；模型组 MyD88 蛋白表达高于空白组($P<0.01$)，除茵陈清肺颗粒中剂量组外($P>0.05$)，其他药物干预组的表达均低于模型组($P<0.05$，$P<0.01$)；模型组 NF－κB p65 蛋白表达高于空白组($P<0.01$)，除茵陈清肺颗粒中剂量组外($P>0.05$)，其他药物干预组的表达均低于模型组($P<0.05$，$P<0.01$)。结果见图 2、表 4。

4　讨论

小儿肺炎喘嗽“发病容易、传变迅速”，近年来，MPP 发生率呈逐年增长趋势，且其临床表现多样，大部分 MPP 患儿常快速发展为 SMPP，如不彻底治疗可反复发作，甚至可引起肺外并发症，甚则出现多系统、多器官的损害[6－7]。

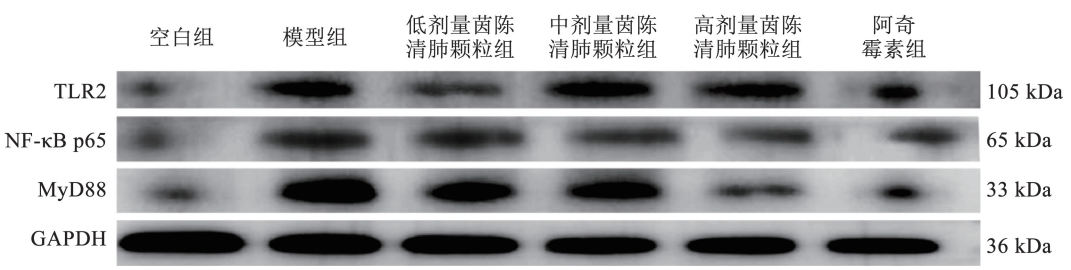


图 2　各组小鼠肺组织中 TLR2、MyD88、NF－κB p65 的蛋白表达印迹图

表 4　各组小鼠肺组织中 TLR2、MyD88、NF－κB p65 蛋白的相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TLR2	MyD88	NF－κB P65
空白组	0.89±0.06	0.74±0.11	0.55±0.02
模型组	1.16±0.02▲▲	1.25±0.04▲▲	1.04±0.05▲▲
茵陈清肺颗粒低剂量组	1.05±0.05*	0.94±0.19*	0.67±0.14*
茵陈清肺颗粒中剂量组	1.08±0.03*	1.18±0.15	1.08±0.13
茵陈清肺颗粒高剂量组	1.09±0.02*	0.81±0.11**	0.72±0.09**
阿奇霉素组	0.99±0.06*	0.90±0.20*	0.78±0.14*

注：与空白组相比，▲▲$P<0.01$；与模型组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$。

《温病条辨》中提出：“小儿稚阳未充、稚阴未长者也。”小儿生理表现上脏腑娇嫩，加之家长常有喂养不当导致小儿过食肥甘厚味，在功能表现上常为脾常不足，无以运化，形成食滞，从而导致脾胃积热。而 MP 潜伏期长，大致在 14～21 d，且适合在高温潮湿环境中生长繁殖，这样的生存条件也符合中医湿热病邪的特点，当邪气犯肺，肺气郁闭，导致肺失于宣肃，肺津因之熏灼凝聚，则炼津成痰，痰、湿、热三者胶结最易阻遏气机，气滞则血瘀[8－10]，故导师张葆青教授认为湿、热、痰、瘀是本病的主要病因，治法应当以祛湿清热、化痰散瘀为主，在主治湿热并重的甘露消毒丹基础上形成院内自制剂茵陈清肺颗粒。

全方主要组成为茵陈、黄芩、虎杖、广藿香、石菖蒲、浙贝母、厚朴、炒桃仁、甘草等。多项研究表明，茵陈[11]、黄芩[12]、广藿香[13]、虎杖[14－15]等药物可以抑制多种病毒、细菌，具有抗炎、抗肿瘤等作用。茵陈味苦辛而性微寒，归脾、胃、肝胆经，具有清利湿热、利胆退黄之功效。研究发现[16－17]，茵陈中的有效活性成分黄酮类可以通过抑制 MAPKs 和 NF－κB 信号通路磷酸化调控血清内炎症因子的表达水平，达到抗炎、抗病毒的作用。黄芩性味苦寒，主入肺和大肠经，临床主要用于清热泻火、燥湿除湿，尤其擅长清上焦湿热，与茵陈共为君药。而黄芩苷可以通过调节 TLR2/MyD88/NF－κB 信号通路[18]、PI3K－Akt－NF－κB 信号通路[19]、TLR4/MyD88/NF－κB 信号通路[20]、NF－κB－HIF－1 信号轴[21]等降低炎症因子的表达水平，从而抑制炎性反应，降低肺损伤程度。虎杖性微苦寒，归肝、胆、肺经，具有清热、利湿、止咳化痰的功能。研究表明[22－23]，虎杖的抗炎作用可能与其主要活性成分白

藜芦醇抑制多种信号通路基因表达,减少 NF－κB、TNF－α、IL－4 等相关因子的产生有关。广藿香性辛微温,入肺经,有发表解暑、开胃止呕之效。研究表明[24－25],广藿香酮可以通过抑制 NF－κB 的活化发挥抗炎作用,达到减轻肺损伤的目的。厚朴性味苦、辛、温,归脾、胃、肺、大肠经,入肺经后能发挥降气化痰、除湿平喘的作用。研究证明和厚朴酚在治疗呼吸系统疾病方面具有显著效果[26－27]。石菖蒲性辛温苦,归心、胃经,主要功效为化湿豁痰。研究表明,石菖蒲中的活性物质 β－细辛醚可以通过延长凝血时间[28]、抗菌抗炎[29]改善 MP 引起的微循环障碍。浙贝母性寒味苦,入心、肺经,长于宣肺化痰止咳,清火散结,与虎杖、藿香、厚朴共为臣药。甘草味甘性平,主入脾、肺经,既益气补中,又缓和药性,同时还有祛痰止咳的疗效。浙贝母提取物中的活性成分贝母辛及甘草提取物中的活性成分甘草酸则可以通过调节多种细胞内信号通路,降低气道上皮细胞中黏蛋白的生成,抑制气道黏液的过分泌,下调相关炎症因子表达水平,进而达到缓解肺功能,改善肺损伤,起到化痰清肺、祛痰止咳的作用[30－32]。

TLR2 作为脂蛋白和脂类分子的主要识别受体,通过和病原相关分子的结合,在机体炎症反应中起着非常重要的作用[33－35],NF－κB 是经典的炎症信号通路之一,激活后诱导促炎细胞因子的产生。TLR2 通过亮氨酸重复序列(LRRs)识别相应的病原体相关分子模式(PAMPs),可诱导形成异二聚体[36－37],并通过细胞质结构域包含的高度同源的 TIR 募集接头分子 MyD88 与之结合,随后 MyD88 通过其死亡结构域与 IRAK 相互作用,导致其发生自身磷酸化而激活 TRAF6。TRAF6 随后与 TAK1 及其结合蛋白 TAB1/2 形成复合物,最后激活 NF－κB,诱导促炎性细胞因子的分泌[38－40]。研究表明[41－43],TLR2 及相关通路蛋白的表达与 MP 感染肺组织的炎症反应密切相关,因此,干预 TLR2/NF－κB 信号通路有望成为治疗 MPP 的新靶点。

本实验结果显示,模型组小鼠肺组织 TLR2、MyD88、NF－κB p65 mRNA 和蛋白表达较空白组明显升高,表明 MPP 小鼠肺组织 TLR2/NF－κB 信号通路被激活,药物干预后,TLR2、MyD88、NF－κB 相关表达均有所降低,提示可以通过干预信号通路的表达,调节呼吸道免疫,抑制炎症因子释放,从而达到治疗 MPP 的效果。为进一步研究 TLR2/NF－κB 信号通路是治疗 MPP 的作用靶点,阐明茵陈清肺颗粒的作用依据,为干预 MPP 提供新的视角和理论支持,后续将从细胞、分子学等更多角度对此展开研究。

参考文献:

[1] 徐时芬,吴超雄,钟蒙蒙,等. 不同年龄儿童肺炎支原体肺炎的临床特征[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(22):1699－1702.
[2] 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.
[3] 倪鑫. 儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019 年版)[J]. 全科医学临床与教育,2019,17(9):771－777.
[4] 陆世霞. 不同小儿支气管肺炎抗菌药物应用情况与病原菌耐药性调查分析[J]. 临床合理用药杂志,2021,14(17):146－148.
[5] 杜冠华. 实验药理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:48－50.
[6] LEE E, LEEY Y. Predictive factors of the responses to treatment of Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. J Clin Med,2021,10(6):1154.
[7] HE H A, WANG X, XIAO Y Y, et al. Comparative efficacy and safety of traditional Chinese patent medicine in the treatment of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children: a protocol for systematic review and meta－analysis[J]. Medicine,2020,99(51):e23747.
[8] 王萌瑶,周朋. 儿童支原体感染临床特点及中医学证治体会[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2018,18(38):204－205.
[9] 张华军. 李燕宁教授从湿热辨治儿童支原体肺炎[J]. 中医临床研究,2022,14(2):42－44.
[10] 李娜,于光志,董倩,等. 从湿热论治小儿肺炎支原体肺炎[J]. 成都中医药大学学报,2021,44(3):109－112.
[11] 刘玉萍,邱小玉,刘烨,等. 茵陈的药理作用研究进展[J]. 中草药,2019,50(9):2235－2241.
[12] 甘灿云,陈海红,杨海燕. 黄芩苷抗炎作用的研究进展[J]. 中国当代医药,2023,30(27):23－29.
[13] 李淑仪. 广藿香的化学成分及其生物活性研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2023.
[14] 唐春丽,魏江存,滕红丽,等. 黄酮类成分抗炎活性及其作用机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(4):154－159.
[15] 马姜嫄,李智新,王志忠,等. 白藜芦醇及其衍生物药理作用的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2023,42(12):787－792.
[16] WANG X, HUANG H, MA X P, et al. Anti－inflammatory effects and mechanism of the total flavonoids from Artemisia scoparia Waldst. et kit. in vitro and in vivo[J]. Biomedecine Pharmacother, 2018, 104:390－403.
[17] YAN H Y, WANG H Q, MA L L, et al. Cirsimaritin inhibits influenza A virus replication by downregulating the NF－κB signal transduction pathway[J]. Virol J,2018,15(1):88.
[18] 胡焓,冯丹,田佳玉,等. 黄芩苷通过抑制 TLR2/MyD88/NF－κB 信号通路减轻带状疱疹后遗神经痛大鼠神经炎症[J]. 中国老年学杂志,2023,43(24):6073－6078.
[19] 张炜,王莉,杨雨欣,等. 黄芩苷调节 let－7i－3p/PI3K/Akt/NF－κB 信号轴减轻类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 NLRP3 炎性小体活化[J]. 中国药理学通报,2023,39(12):2313－2319.
[20] 吴文娟,曾妮,王硕莹,等. 黄芩苷对支原体肺炎小鼠 TLR4/NF－κB 信号通路的抗炎及肺功能保护作用[J]. 中华医院感染学杂志,2023,33(23):3521－3526.
[21] 刘春柳,刘维,陆航,等. 黄芩苷抑制 THP－1 细胞 NF－κB－HIF－1信号轴缓解痛风炎症的机制研究[J]. 中国中医急症,2023,32(6):947－950,982.
[22] HSU Y A, CHEN C S, WANG Y C, et al. Anti－inflammatory effects of resveratrol on human retinal pigment cells and a myopia animal model[J]. Curr Issues Mol Biol,2021,43(2):716－727.
[23] GHANIM H, SI A, ABUAYSHEH S, et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of Polygonum cuspidatum containing resveratrol[J]. J Clin Endocrinol Metab,2010,95(9):E1－E8.
[24] LI Y C, XIAN Y F, SU Z R, et al. Pogostone suppresses proinflammatory

mediator production and protects against endotoxic shock in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 157: 212 – 221.
[25] 张味娜,张明明,俞敏. 广藿香酮对 COPD 小鼠肺部损伤保护作用机制研究[J]. 健康研究,2019,39(4):428 – 431.
[26] HSIAO W L, LIU L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy—from TCM theory to mechanistic insights[J]. Planta Med, 2010, 76(11): 1118 – 1131.
[27] 秦超,戴曦,杨小琼,等. 和厚朴酚对哮喘小鼠肺组织炎症反应的干预作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版),2020,46(2):214 – 220,封 2.
[28] 吴启端,吴清和,王绮雯,等. 石菖蒲挥发油及 β – 细辛醚的抗血栓作用[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(1):29 – 31.
[29] 石坚宏,姬丽婷,骆启晗,等. 石菖蒲化学成分、药理作用及质量标志物预测分析研究进展[J]. 中成药,2021,43(5):1286 – 1290.
[30] 卓诗勤,张浩,丁弋娜,等. 硫熏和鲜切浙贝母的化学成分及其药理作用的比较研究[J]. 中华中医药学刊,2016,34(3):618 – 621.
[31] 李想,李冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药,2019,51(5):81 – 86.
[32] 李梅,王丽,夏亚飞,等. 基于 PI3K/Akt/NF – κB 通路探讨复方甘草酸苷对病毒性肺炎小鼠肺损伤的保护作用[J]. 中成药,2023,45(11):3775 – 3779.
[33] PELKA K, SHIBATA T, MIYAKE K, et al. Nucleic acid – sensing TLRs and autoimmunity: novel insights from structural and cell biology[J]. Immunol Rev, 2016, 269(1): 60 – 75.
[34] 王海坤,韩代书. Toll 样受体(TLRs)的信号转导与免疫调节[J]. 生物化学与生物物理进展,2006,33(9):820 – 827.
[35] PÉREZ – REGIDOR L, ZARIOH M, ORTEGA L, et al. Virtual screening approaches towards the discovery of toll – like receptor modulators[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): 1508.
[36] DOWLING J K, MANSELL A. Toll – like receptors: the Swiss army knife of immunity and vaccine development[J]. Clin Transl Immunology, 2016, 5(5): e85.
[37] 罗浩荡,游晓星,吴移谋. 肺炎支原体致炎的分子机制研究进展[J]. 免疫学杂志,2017,33(7):639 – 644.
[38] 王金桥,邓银芝. 五味子乙素通过 Traf6/TAK1 信号通路介导人胃癌细胞凋亡[J]. 实用药物与临床,2018,21(9):970 – 973.
[39] GONG J, LI Z Z, GUO S, et al. Neuron – specific tumor necrosis factor receptor – associated factor 3 is a central regulator of neuronal death in acute ischemic stroke[J]. Hypertension, 2015, 66(3): 604 – 616.
[40] HU Q C, ZHAO Y B, WANG Z W, et al. Chicken gga – miR – 19a targets ZMYND11 and plays an important role in host defense against Mycoplasma gallisepticum (HS strain) infection[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 6: 102.
[41] 王振虹,姜永杰,徐雷,等. TLR – MyD88 – NF – κB 信号通路在支原体肺炎模型小鼠肺部炎症损伤中的作用及其机制[J]. 精准医学杂志,2021,36(4):316 – 319.
[42] 薛今俊,史晓霞. 儿童支原体肺炎患者外周血单核细胞中 TLRs 的表达及其对 NF – kB/IkBα 信号通路的影响[J]. 中国卫生检验杂志,2019,29(20):2433 – 2436.
[43] 高阳,贺琳晰,赵璠,等. 儿童肺炎支原体肺炎 TIPE2、TLR2 及 TLR4 表达及意义[J]. 中华医院感染学杂志,2022,32(15):2373 – 2377.

Regulatory Effects and Mechanism of Yinchen Qingfei Granules on Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia in Mice Based on the TLR2/NF – κB Signaling Pathway

WANG Ruihao[1], ZHANG Baoqing[2], JIA Guangyuan[2], ZHOU Xu[2]
(1. *The First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan* 250011, *China*; 2. *Shandong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Jinan* 250011, *China*)

Abstract Objective: To investigate the mechanism and effective targets of Yinchen Qingfei Granules in treating Mycoplasma Pneumoniae Pneumonia (MPP). Methods: Thirty – six SPF – grade BALB/c mice were used. After 3 days of adaptive feeding with standard diet, 6 mice were randomly selected as the blank group, and the remaining 30 mice were subjected to nasal instillation of Mycoplasma Pneumoniae (MP) bacterial solution combined with high – fat diet and environmental exposure to establish a model of damp – heat obstructing lung syndrome. After the model was successfully established, the mice were randomly divided into model group, azithromycin group (administered azithromycin 90.1 mg · kg^{-1} · d^{-1}), and low (8.109 g · kg^{-1} · d^{-1}), medium (5.406 g · kg^{-1} · d^{-1}), and high – dose (2.703 g · kg^{-1} · d^{-1}) Yinchen Qingfei Granules groups. The model and blank groups were given an equal volume of 0.9% saline. After 3 days of treatment, tissues were collected 4 hours after the last dose for analysis. HE staining was used to observe the pathological changes in the lung tissue of the mice; RT – qPCR was used to detect the mRNA expression of TLR2, MyD88, and NF – κBp65 in lung tissue; Western blot was used to detect the protein expression levels of TLR2, MyD88, and NF – κBp65 in lung tissue. Results: HE staining showed that the alveolar structure was clear in the blank group, while the model group exhibited lung consolidation, extensive inflammatory cell infiltration, and significant hemorrhage in the vessels. Lung tissue lesions, cellular infiltration, and inflammation were improved in all treatment groups. Compared to the blank group, the mRNA expression of TLR2, MyD88, and NF – κBp65 significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared to the model group, mRNA expression levels of TLR2 and NF – κBp65 were significantly decreased in all treatment groups except the low – dose group ($P < 0.05$), with the high – dose Yinchen Qingfei Granules group having lower TLR2 mRNA expression than the azithromycin group ($P < 0.05$). Compared to the blank group, the protein expression levels of TLR2, MyD88, and NF – κBp65 were significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Except for the medium – dose Yinchen Qingfei Granules group where MyD88 and NF – κBp65 protein levels were not significantly different, other treatment groups had significantly lower pathway protein expression than the model group ($P < 0.05$). Conclusion: Yinchen Qingfei Granules can significantly improve inflammatory symptoms in MP – infected mouse lung tissue, and its mechanism may be related to the inhibition of the TLR2/NF – κB signaling pathway.

Key words TLR2/NF – κB; Mycoplasma penumoniae Pneumonia; Dampness – dispelling and collaterals – unblocking; Yinchen Qingfei Granules