

蛭丹化瘀口服液对支原体感染小鼠肺炎的影响^{*}

刘晓红 侯安存 辛德莉 魏田力 叶慧初 李 靖 张长淮 陈光勇

摘要 目的 探讨活血化瘀中药对小鼠肺炎支原体肺炎的影响。方法 BALB/C 小鼠 135 只随机分为对照组、支原体肺炎模型组(IF1, IF2)、罗红霉素治疗组(LH1, LH2)和罗红霉素加蛭丹化瘀口服液组(LZ1, LZ2), 分别检测鼠肺组织病理学评分、肺组织图像分析和肺血栓计数的变化。结果 经灌喂治疗, 在第 3 天罗红霉素组(LH1)、罗红霉素加蛭丹化瘀口服液组(LZ1)小鼠肺组织病理学评分明显低于模型组(IF1, $P < 0.01$); LH1、LZ1 组图像分析值明显高于模型组(IF1, $P < 0.05$); LH1 及 LZ1 组肺部炎症证明显轻于 IF1 组, 但两组之间治疗效果差异无显著性。随着疗程的延长, 在灌喂治疗的第 4 天, LZ2 鼠肺组织病理学评分明显低于模型组(IF2, $P < 0.01$), 图像分析值 LZ2 组明显高于 IF2 ($P < 0.01$); LZ2 组与 LH2 组比较, 疗效更显著($P < 0.05$)。在肺炎治疗的第 3、4 天, LH1、LH2 肺组织血栓计数与 IF1、IF2 之间差异无显著性($P > 0.05$); LZ1、LZ2 组肺组织血栓计数均显著低于 IF1、IF2 组($P < 0.05$)。结论 蛭丹化瘀口服液可辅助罗红霉素减轻支原体肺炎小鼠的病情, 其作用机制可能与减少血栓形成、改善微循环有关。

关键词 活血化瘀药 肺炎支原体 支原体肺炎 小鼠 组织病理学

Effect of Zhidan Huayu Oral Liquid on Mycoplasmal Pneumonia in Mice LIU Xiao-hong, HOU An-cun, XIN De-li, et al *Department of Pediatrics, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing (100050)*

Objective: To study the effect of Chinese herbal medicine for activating blood circulation to remove stasis in treating mycoplasmal pneumonia (MP) in mice. **Methods:** One hundred and thirty-five BALB/C mice were randomly divided into the control group, the MP model groups IF1 and IF2, the Rexithromycin treated groups LH1 and LH2, and the Rexithromycin plus Zhidan Huayu oral liquid treated groups LZ1 and LZ2. The changes of pathologic scoring, graphic analysis and thrombus counting of lung were observed. **Results:** In the 3rd day of treatment, the pathologic scores in LH1 and LZ1 were significantly lower and their values of graphic analysis were significantly higher than those in IF1 ($P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively), but with inflammation of lung significantly milder than that in IF1. The difference of therapeutic effect between LH1 and LZ1 was insignificant. In the 4th day of treatment, pathologic scores in LZ2 was significantly lower and value of graphic analysis higher than those in IF2 respectively ($P < 0.01$), with the improvement better than that of LH2 ($P < 0.05$). In 3rd and 4th day of treatment, the difference of thrombus counting between the Rexithromycin treated groups and the model groups was insignificant ($P > 0.05$), but it was significantly lower in the combined treated groups than that in the model groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zhidan Huayu oral liquid could assist Rexithromycin to alleviate the condition of mice with MP, its mechanism may be related with the effect of reducing thrombosis and improving microcirculation.

Key words drugs for activating blood circulation to remove stasis, pneumonia mycoplasma, mycoplasmal pneumonia, mice, pathohistology

小儿肺炎支原体感染十分常见, 一般采用综合治疗的原则, 针对病原常选用大环内酯类抗生素进行治

疗, 对消除肺炎的症状和体征有一定效果, 但疗程长, 停药过早易复发, 且有一定的副作用。我们作了一系列体外试验, 发现蛭丹化瘀口服液有抑制肺炎支原体(mycoplasmal pneumonia, MP)的作用, 并与罗红霉素有协同作用, 为进一步了解该药性能, 我们进行了动物实验研究。

^{*} 北京市中医药重点学科经费资助项目(2001 年)

首都医科大学附属北京友谊医院儿科(北京 100050)

通讯作者: 刘晓红, Tel: 010-63014411 转 3410, E-mail: xuex-

万方数据

ingchen@sina.com

材料和方法

1 材料

1.1 病原体 人肺炎支原体国际标准株,由北京友谊医院儿科研究室提供。

1.2 药物 (1)罗红霉素混悬液的制备:用三蒸水溶解罗迈新(丽珠集团丽珠制药厂生产,每片 0.15g,批号:020705)配成 10mg/ml 浓度,当日配制,灌喂时摇匀使用。(2)蛭丹化痰口服液:首都医科大学附属北京友谊医院中药制剂中心提供实验用药。每 10ml 口服液中含黄芪 6.25g 当归 3.75g 赤芍 3.75g 川芎 3.75g 鸡血藤 5.0g 水蛭 2.5g 牡丹皮 2.5g。

1.3 动物 SPF 级 7~12 周的体重 16~22g 的 BALB/C 小鼠 135 只,雌雄各半,北京维通利华公司提供。

2 方法

2.1 动物分组 在新环境中适应 3 天,小鼠按体重和性别随机分组,每组雌雄各半,雌雄分笼饲养。培养基对照组与感染动物隔离饲养。(1)正常对照组 10 只(NM 组)。(2)肺炎模型感染 3 天宰杀组 29 只(IF1 组)。(3)肺炎模型感染 4 天宰杀组 26 只(IF2 组)。(4)接种 3 次菌液后宰杀组 12 只(IF3 组)。(5)感染后罗红霉素治疗 3 天组 19 只(LH1 组)。(6)感染后罗红霉素治疗 4 天组 11 只(LH2 组)。(7)感染后罗红霉素加蛭丹化痰口服液治疗 3 天组 16 只(LZ1 组)。(8)感染后罗红霉素加蛭丹化痰口服液治疗 4 天组 12 只(LZ2 组)。

2.2 模型及给药方法 乙醚麻醉各组动物,IF1、IF2、IF3、LH1、LH2、LZ1、LZ2 组小鼠,用加样器吸入 100 μ l 含有 1×10^7 cfu/ml 的肺炎支原体菌液,并在乙醚麻醉后缓慢滴入鼻腔使其进入气管支气管,连续 3 天接种。NM 组以同等量的培养基滴鼻接种。于第 2 次感染的同时分别给 NM 组灌喂三蒸水, LH1 和 LH2 组灌喂罗红霉素混悬液, LZ1 和 LZ2 组灌喂罗红霉素加蛭丹化痰口服液,各 0.5ml/只,每天 1 次,连续 3~4 天。

2.3 取材 在第 1 次感染后 3、4 天分别乙醚麻醉,摘取眼球取血,并开胸无菌操作下取肺称重,无菌条件下取右肺中叶留作病原学检测。余肺、气管以 10% 福尔马林固定后石蜡包埋,切片,HE 染色。在光学显微镜下观察。

2.4 病原学检测 IF3 组 12 只鼠肺组织无菌操作下肺匀浆培养基中 37℃ 培养。经过 1 周培养后,再

翻种到新的培养基中 37℃ 再培养 3 周,以 PCR 鉴定证实为肺炎支原体和肺组织匀浆 PCR 证实为肺炎支原体。方法见文献^[1,2]。

2.5 支原体肺炎的程度鉴定

2.5.1 组织病理学评分 采用国外支原体肺炎动物模型的组织病理学评分系统来评价支原体肺炎的严重程度。这一评分系统根据气管、支气管腔内炎性细胞渗出,气管、支气管周围以淋巴细胞为主的炎细胞浸润,血管周围的炎细胞浸润和肺间质的炎症病灶程度分为 0~26 分^[3]。

2.5.2 肺细小血管内血栓形成的计数 阅每只鼠肺切片,计数小血管内透明血栓数。

2.5.3 组织病理学图像分析 应用 HPIAS-100 型高清晰度彩色图文分析系统行图像分析,每只小鼠选择经组织病理学评分最严重的肺切片,在 100 倍光镜下随机选取 3 个病变最重的视野分别测定视野中含气部分占整个扫描视野的百分比,取其平均值,作为小鼠的测定值,间接反映肺炎的严重程度,含气部分多,间接反映小鼠肺的通换气功能强,炎症程度轻。

3 统计学方法 各组间比较均采用单因素方差分析及方差齐性检验,统计分析均采用 SPSS 8.0 版完成。

结 果

1 各组外观大体观察 模型组多数小鼠蜷缩少动,毛竖少泽,双目微闭,呼吸急促和大便秘结,采血时见血液粘稠、量少。罗红霉素组上述现象有改善,但血液粘稠、量少情况仍略同于模型组,而罗红霉素加蛭丹化痰组上述症状明显改善。

2 各组肺组织病理学检查结果 见表 1。IF1、IF2、IF3 组均出现明显的间质性肺炎改变,可见严重的血管周围炎细胞尤其淋巴细胞的浸润(见图 A);支气管、细支气管周围淋巴细胞浸润(见图 B);部分支气管、细支气管腔内炎细胞渗出(见图 C);支气管内皮坏死脱落,肺实质以淋巴细胞为主的实变病灶(见图 D),并可见明显的小血管内血栓形成(见图 E)。IF3 组组织病理学评分为 9.13 分。在治疗第 3 天 LH1 组病变轻于 IF1 组($P < 0.01$), LZ1 组病变也明显轻于 IF1 组($P < 0.01$)。在治疗第 4 天, IF2 组肺炎有自限的趋势, LH2 组与 IF2 组比较,差异无显著性($P > 0.05$);而 LZ2 组病变明显轻于 IF2 组($P < 0.01$); LH2 组与 LZ2 组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。NM 组肺组织无明显炎症反应(见图 F)。

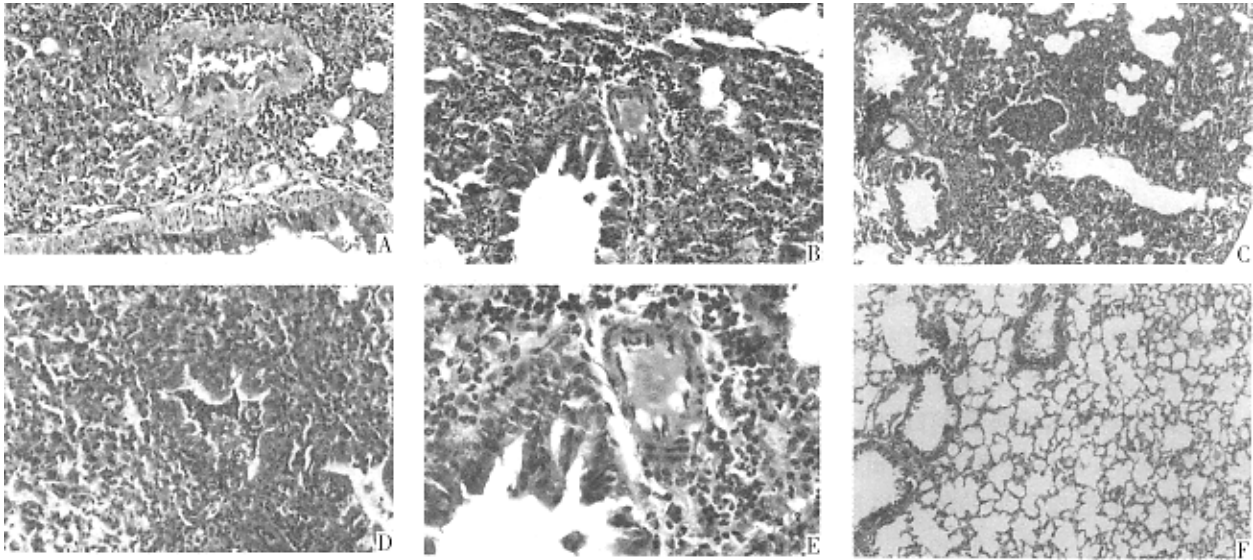


图 A IF1 组接种肺炎支原体后第 3 天小鼠血管周围组织病理学改变 ,小血管周围明显的淋巴细胞为主的炎细胞浸润 ;HE×20 图 B IF1 组接种肺炎支原体后第 3 天小鼠支气管周围组织病理学改变 ,支气管周围明显的淋巴细胞为主的炎细胞浸润 ;HE×20 图 C IF1 组接种肺炎支原体后第 3 天小鼠支气管腔内组织病理学改变 淋巴细胞为主的炎细胞充满支气管腔内 ,支气管周围大量淋巴细胞及少数单核细胞浸润 ;HE×10 图 D IF1 组接种肺炎支原体后第 3 天小鼠肺脏组织病理学改变 肺泡间隔增宽 ,融合呈实变样改变 肺泡腔高度狭窄 ,支气管腔内淋巴细胞渗出 ,支气管上皮细胞坏死脱落 ;HE×20 图 E IF1 组接种肺炎支原体后第 3 天小鼠血管周围组织病理学改变 ,可见明显的小血管内血栓形成 ;HE×40 图 F NM 组接种培养基后第 3 天小鼠肺组织病理学改变 图中肺组织无明显炎症反应 ;HE×10

表 1 治疗 3 天和 4 天时各组肺组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	组织病理学评分
IF1	29	16.63±3.35
LH1	19	8.69±2.51 *
LZ1	16	7.89±3.75 *
IF2	26	9.52±3.37
LH2	11	9.72±1.66
LZ2	12	6.50±3.13 ^{△▲}

注 :与 IF1 组比较 ,* $P<0.01$;与 IF2 组比较 ,[△] $P<0.01$;与 LH2 组比较 ,[▲] $P<0.05$

3 肺内小血管内血栓计数比较 见表 2。模型组(IF1 ,IF2)肺内可见一定数量的明显的小血管内透明血栓 ,而罗红霉素加蛭丹化瘀口服液组(LZ1 ,LZ2)血栓数明显少于模型组($P<0.01$ 和 $P<0.05$) ;LZ1 组血栓数还明显少于 LH1 组($P<0.05$)。

表 2 治疗 3 天和 4 天时各组肺内小血管内血栓计数结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血栓计数(个)
IF1	29	19.41±16.01
LH1	19	17.32±10.63
LZ1	16	6.63±4.95 * [△]
IF2	26	11.47±6.81
LH2	11	8.81±5.08
LZ2	12	5.83±4.64 [▲]

注 :与 IF1 组比较 ,* $P<0.01$;与 LH1 组比较 ,[△] $P<0.05$;与 IF2 组比较 ,[▲] $P<0.05$

4 组织病理学图像分析 见表 3。在治疗第 3 天放大 100 倍光镜下 ,LZ1 组分析值明显高于 IF1($P<0.05$) ,LH1 组分析值也明显高于 IF1 组($P<0.05$) ,但 LH1 与 LZ1 组之间差异无显著性。在治疗第 4 天放大 100 倍光镜下 ,LZ2 组分析值明显高于 IF2 组($P<0.01$) ,而 LH2 组与 IF2 组比较差异无显著性($P>0.05$) ;LH2 与 LZ2 组比较差异有显著性($P<0.01$)。

表 3 治疗 3 天和 4 天时各组半定量组织病理学图像分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	图像分析(%)
NM	10	55.50±11.39 [▲]
IF1	29	42.04±11.99 *
LH1	19	48.89±8.29 [△]
LZ1	16	48.60±8.85 [△]
IF2	26	42.72±7.13 *
LH2	11	39.89±7.30 [○]
LZ2	12	50.08±6.27 [▲]

注 :与 NM 组比较 ,* $P<0.01$;与 IF1 组比较 ,[△] $P<0.05$;与 IF2 组比较 ,[▲] $P<0.01$,[○] $P<0.01$

5 病原学检测结果 IF1、IF2 及 IF3 组动物肺组织经 PCR 检测和支原体培养均证实有肺炎支原体。

讨 论

目前认为 ,支原体肺炎的发病机制之一是 MP 表面抗原与人红细胞 i₁ 抗原具有共性 ,导致红细胞自身

抗体的生成,造成红细胞的损害^[4]。

鼠发生支原体肺炎时,存在血液流变学指标的改变,提示了支原体肺炎的发生与血液的粘滞、红细胞聚集有关,有依据表明中医临床将支原体肺炎可辨证为血瘀证^[5]。

在急性支原体肺炎中由于血管内凝血机制异常而发展成 ARDS 或 DIC 的情况时有报道^[6,7],微血管内血栓形成和纤维蛋白溶解与此同时发生^[8]。在儿童中包括支原体在内的病原的感染而引起的急性肺疾患中 DIC 的发生也很常见^[9],在前人的动物实验中,已证实小鼠的支原体急性感染期,存在纤维蛋白原降解产物的增加,提示在急性期存在凝血机制异常^[10]。

我国传统的活血化瘀药物有改善微循环的作用,有可能改善上述的凝血机制异常,这可能是活血化瘀中药与罗红霉素协同有效治疗 MP 肺炎的机制所在。

在动物实验中,为了更客观的研究药物对支原体肺炎的作用,我们在国内首次采用图像分析技术和组织病理学评分法定量评估中西药物对小鼠支原体肺炎的组织病理改变的影响。结果显示经罗红霉素和蛭丹化瘀口服液联合治疗,小鼠肺部炎症明显减轻,肺内血栓数明显减少,提示活血化瘀中药与罗红霉素协同治疗 MP 肺炎有利于炎症的更快消失,有可能缩短疗程。

参 考 文 献

- 1 Martin RJ, Chu HW, Honour JM. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after mycoplasma pneumoniae infection in a murine model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2001;24(4):577—582.

- 2 辛德利,李 贵,张继红,等.聚合酶链反应在肺炎支原体检测中的临床应用与研究. *中华儿科杂志* 1994;32(5):296—297.
- 3 Cimolai N, Taylor GP, Mah D, et al. Definition and application of a histopathological scoring scheme for an animal model of acute mycoplasma pneumoniae pulmonary infection. *Microbiol Immunol* 1992;36(5):465—478.
- 4 胡皓天.肺炎支原体肺炎的发病机制. *实用儿科杂志* 1993;8(3):198—199.
- 5 刘晓红,李 贵,方惠秋,等.抗毒通瘀合剂治疗支原体肺炎大鼠的实验研究. *中国实验方剂学杂志* 1998;4(1):16—19.
- 6 Chiou CC, Liu YC, Lin HH. Mycoplasma pneumoniae infection complicated by lung abscess, pleural effusion, thrombocytopenia and disseminated intravascular coagulation. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(3):327—329.
- 7 Chrysanthopoulos C, Eboriadou M, Monti K. Fatal disseminated intravascular coagulation caused by mycoplasma pneumoniae. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(6):634—635.
- 8 Fumarola D. Intravascular coagulation and mycoplasma pneumoniae infection. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16(10):1012—1013.
- 9 Tsinzerling AV, Anisimova IN, Ioakimova NV. Acute respiratory infections in children who have died and the role of the DIC syndrome in these diseases. *Arkh Patol* 1990;52(1):7—12.
- 10 Faulkner CB, Davidson MK, Davis JK, et al. Acute mycoplasma pulmonis infection associated with coagulopathy in C3H/HeN mice. *Laboratory Animal Science* 1995;45(4):368—372.

(收稿 2003-02-26 修回 2003-03-29)

第四届全国中西医结合口腔学术暨工作经验交流会征文通知

第四届全国中西医结合口腔学术暨工作经验交流会原定于 2003 年 10 月在浙江宁波市召开,因故延期,现将有关征文事项通知如下:(1)征文内容:中西医结合口腔学术科研成果;口腔疾病临床诊断治疗经验总结及体会;中药及方剂在口腔疾病临床应用及研究;口腔疾病的针灸及中医其他疗法;口腔中西医结合的思路方法及前景探讨。(2)征文要求:来稿必须实事求是,内容真实,未在正式杂志上公开发表过,来稿形式不限,包括论著、临床总结、治疗机制、理论探讨、综述、评论等,来稿限 4 000 字以内,并附 800 字以内摘要各 1 份。要求字迹清楚工整,稿纸书写或打印,来稿请注明详细地址、邮编、作者姓名、单位,并加盖单位公章。请自留底稿,恕不退稿。

本会议并邀请有关专家做学术讲座。凡会议录用论文并参加会议交流者给予国家继续教育学分。征文截止日期 2003 年 9 月 30 日。征文请寄:北京东城区海运仓 5 号 北京中医药大学东直门医院口腔科李佳瑜、陈 颖收,邮编 100700,信封请注明“征文”。联系电话 010-84013165,传真 010-64010817。开会的具体日期将另行通知。