

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.06.001

文章编号: 1005-8982 (2024) 06-0001-07

肺炎专题·论著

## 匹多莫德对支原体感染小鼠肺功能损伤的影响及其机制研究\*

王坤, 李嫣

(苏州大学附属儿童医院 感染性疾病科, 江苏 苏州 215000)

**摘要:** **目的** 观察匹多莫德对支原体感染(MPI)小鼠肺功能损伤的保护作用,并探讨其可能机制。**方法** MPI小鼠随机分为MPI组和实验A、B、C组,每组10只;另取10只健康小鼠设为正常组。实验A、B、C组分别灌胃匹多莫德颗粒100、200和400 mg/kg,正常组、MPI组灌胃等量生理盐水,1次/d,持续3 d。采用小动物呼吸机检测肺功能,紫外分光光度法和细胞色素C还原法检测血清氧化应激指标,酶联免疫吸附试验检测血清免疫指标,苏木精-伊红染色观察肺组织病理变化,Western blotting检测肺组织核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达。**结果** 与正常组比较,MPI组每分钟通气量(MV)、潮气量(TV)、最大呼气量(MEV)均减少( $P < 0.05$ ),血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )水平均降低( $P < 0.05$ ),血清白细胞介素-4(IL-4)水平升高( $P < 0.05$ );与MPI组比较,实验A、B、C组MV、TV、MEV均增加( $P < 0.05$ ),GSH-Px、SOD活性均增强( $P < 0.05$ ),IFN- $\gamma$ 水平升高( $P < 0.05$ ),IL-4水平降低( $P < 0.05$ );与实验A组比较,实验B、C组MV、TV、MEV均增加( $P < 0.05$ ),GSH-Px、SOD活性均增强( $P < 0.05$ ),IFN- $\gamma$ 水平升高( $P < 0.05$ ),IL-4水平降低( $P < 0.05$ );与实验B组比较,实验C组MV、TV、MEV均增加( $P < 0.05$ ),GSH-Px、SOD活性均增强( $P < 0.05$ ),IFN- $\gamma$ 水平升高( $P < 0.05$ ),IL-4水平降低( $P < 0.05$ )。与正常组比较,MPI组肺组织Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均降低( $P < 0.05$ );与MPI组比较,实验A、B、C组肺组织Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ );与实验A组比较,实验B、C组肺组织Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ );与实验B组比较,实验C组肺组织Nrf2、HO-1蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ )。**结论** 匹多莫德可能通过调节Nrf2/HO-1信号通路,改善MPI小鼠肺功能和免疫功能,减轻氧化应激损伤。

**关键词:** 支原体感染;肺功能损伤;匹多莫德;核因子E2相关因子2;血红素加氧酶-1

**中图分类号:** R563.1;R375.2

**文献标识码:** A

## Effect of pidotimod on lung function impairment and the mechanism thereof in mice infected with *Mycoplasma pneumoniae*\*

Wang Kun, Li Yan

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Children's Hospital of Suzhou University, Jiangsu, Suzhou 215000, China)

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of pidotimod on lung function impairment in mice with *Mycoplasma pneumoniae* infection (MPI) and to explore the possible mechanism. **Methods** MPI mice were randomly divided into MPI group, experiment A group, experiment B group, and experiment C group, with 10 mice in each group. Besides, another 10 healthy mice were set as the normal group. The mice in experiment A, B, and C

收稿日期: 2023-08-20

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82171797); 苏州市“科教兴卫”青年科技项目(No: KJXW2022020)

[通信作者] 李嫣, E-mail: liyan0079@163.com; Tel: 18862390139

groups were given pidotimod granules (100, 200, and 400 mg/kg, respectively) by gavage, and those in the normal group and the MPI group were given equal volumes of normal saline by gavage, once a day for 3 days. Lung function parameters were measured by a small animal ventilator. Serum oxidative stress indicators were detected via ultraviolet spectrophotometry and the cytochrome C assay, while serum immune indicators were detected via the enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological changes were observed with the hematoxylin and eosin staining, and the protein expressions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in lung tissues were measured via Western blotting. **Results** Compared with the normal group, the minute ventilation (MV), tidal volume (TV), and maximum expiratory volume (MEV) were lower ( $P < 0.05$ ), the activities of serum glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) as well as the serum level of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) were lower ( $P < 0.05$ ), and the serum level of IL-4 was higher in the MPI group ( $P < 0.05$ ). Compared with the MPI group, the MV, TV, and MEV were higher ( $P < 0.05$ ), the activities of GSH-Px and SOD were higher ( $P < 0.05$ ), the IFN- $\gamma$  level was higher ( $P < 0.05$ ), and the IL-4 level was lower in the experimental A, B and C groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the experimental A group, the MV, TV, and MEV were higher ( $P < 0.05$ ), the activities of GSH-Px and SOD were higher ( $P < 0.05$ ), the IFN- $\gamma$  level was higher ( $P < 0.05$ ), and the IL-4 level was lower in the experimental B and C groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the experimental B group, the MV, TV, and MEV were higher ( $P < 0.05$ ), the activities of GSH-Px and SOD were higher ( $P < 0.05$ ), the IFN- $\gamma$  level was higher ( $P < 0.05$ ), and the IL-4 level was lower in the experimental C group ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal group, the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in pulmonary tissues of the MPI group were lower ( $P < 0.05$ ). Compared with the MPI group, the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in pulmonary tissues of the experimental A, B, and C groups were higher ( $P < 0.05$ ). Compared with the experimental A group, the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in pulmonary tissues of the experimental B and C groups were higher ( $P < 0.05$ ). Compared with the experimental B group, the protein expressions of Nrf2 and HO-1 in pulmonary tissues of the experimental C group were higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Pidotimod may improve lung function and immune function, and reduce oxidative stress in mice with MPI by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**Keywords:** mycoplasma infection; lung function impairment; pidotimod; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; heme oxygenase-1

支原体是一种无细胞壁的病原体,可侵入呼吸道、泌尿生殖道和关节等部位,引起多种感染性疾病。支原体肺炎是支原体感染(mycoplasma pneumoniae infection, MPI)最常见的疾病之一,主要发生在儿童和青少年,占社区获得性肺炎的10%~40%,以发热、咳嗽、胸闷、呼吸困难等为主要临床特征,可伴有肺间质纤维化、肺泡蛋白沉积、肺水肿等肺功能损伤<sup>[1]</sup>。目前,抗生素是支原体肺炎的主要治疗手段,但由于支原体的耐药性和抗生素的副作用,整体疗效仍有待提升<sup>[2]</sup>。因此,迫切需要寻找新的治疗方法和药物防治支原体肺炎。匹多莫德是一种人工合成的免疫调节剂,可提高免疫力,预防或辅助治疗感染性疾病<sup>[3]</sup>。近年来有研究发现,匹多莫德联合连花清瘟可显著改善老年支气管肺炎患者肺功能,为治疗支原体肺炎提供了新的思路<sup>[4]</sup>。但匹多莫德治疗支原体肺炎的作用机制尚不清楚。本研究通过动物实验观察匹多莫德对MPI小鼠肺功能损伤的疗效及可能的机制,以期为临床提供新的药物选择和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

50只SPF级雄性BALB/c小鼠,6~8周龄,体重18~22g,购自北京维泰瑞技术服务发展有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0013,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2021-0065。小鼠在12h光/暗周期、(22±2)℃恒温环境下饲养,自由进食饮水。实验前1周,小鼠进行适应性饲养。

### 1.2 药品与试剂

肺炎支原体标准菌株(上海舜冉生物科技有限公司),匹多莫德颗粒剂(浙江仙琚制药股份有限公司,生产批号:20030325),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司), $\gamma$ 干扰素(Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)试剂盒(上海信裕生物科技有限公司),兔抗小鼠核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红

素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)一抗(美国R&D公司)。

### 1.3 仪器

GENios Pro 酶标仪(瑞士Tecan公司),Pneupac Small Animal Ventilator 小动物呼吸机(美国DRE Veterinary公司),Axio Scope.A1 光学显微镜(德国蔡司公司),Gel SMART 凝胶成像仪(北京大龙兴创实验仪器股份公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 MPI模型的复制** 支原体菌液置于PPLO培养基内,在37℃培养箱中培养12h后达对数生长期,当培养液颜色由红变黄时进行连续传代,以变色最高稀释浓度为颜色改变单位(color change unit, CCU),CCU/mL为菌株浓度单位,用10倍梯度稀释法将菌液稀释为 $1 \times 10^8$  CCU/mL备用。40只小鼠吸入乙醚麻醉后,经移液器滴入50  $\mu$ L支原体菌液( $1 \times 10^8$  CCU/mL),滴入后将鼠头后仰使菌液随自主呼吸抵达下呼吸道,滴鼻持续3d,期间观测小鼠日常活动及体重变化,末次滴鼻6h后采集腹主动脉血。经颗粒凝集法判断,血清滴度 $\geq 1:160$ 表示存在支原体抗体,且出现嗜睡、蜷缩、竖毛、少动、拒食或少食,眼角出现分泌物等临床症状为模型复制成功<sup>[5]</sup>。

**1.4.2 动物分组及给药** 模型复制成功后,取40只MPI模型小鼠随机分为MPI组及实验A、B、C组,各10只;另外10只健康小鼠仅滴鼻同体积生理盐水设为正常组。气血检查后1h,实验A、B、C组小鼠分别灌胃匹多莫德颗粒(终浓度100、200、400 mg/kg溶于生理盐水)<sup>[6]</sup>。正常组、MPI组小鼠灌胃等量生理盐水,1次/d,持续3d。

**1.4.3 小动物呼吸机检测肺功能** 使用腹腔戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,沿颈部切开皮肤、肌肉和筋膜,暴露甲状腺后小心分离周围组织,避免出血,用钳子隔开颈前肌露出气管,固定气管后在气管上切开约1mm大小切口,沿气管向下插管,置于小动物呼吸机的密闭箱中,等待一段静息呼吸后,测量每分钟通气量(minute ventilation, MV)、潮气量(tidal volume, TV)、最大呼气量(maximum expiratory volume, MEV)<sup>[7]</sup>。

**1.4.4 组织取材** 肺功能检测完成后采集小鼠腹主动脉血,离心取血清保存于4℃条件下备用。采血后脊椎脱臼处死,沿胃下缘、小肠区上部横切口

开腹,暴露腹腔中、上部结构,从剑突下剪破膈肌,使肺回缩,随后向两侧扩大破口,与腹壁切口靠近,将灌注针从心轴方向进针,刺入心尖3~4mm,开始灌流后剪破右心耳,先以生理盐水40mL快速冲洗血管,然后用含4%多聚甲醛的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液20mL灌注固定,先快后慢。灌注固定完成后,用解剖剪沿胸骨中线剪开胸壁,暴露肺部结构。用解剖镊和剪刀分别夹住和切断气管、支气管、肺动脉及肺静脉,取出整个肺部,用刀片单向切割成约3~4mm厚的组织块,放入4%多聚甲醛中固定24h,脱水、包埋、浸蜡、切片(厚度4  $\mu$ m)备用。剩余肺组织投入液氮中冷冻保存备用。

**1.4.5 血清氧化应激指标检测** 取小鼠冷藏保存的部分主动脉血清,采用紫外分光光度法检测血清GSH-Px活性,细胞色素C还原法检测SOD活性,均严格按照试剂盒说明书进行操作<sup>[8]</sup>。

**1.4.6 酶联免疫吸附试验检测血清免疫指标** 取冷藏保存的部分主动脉血清,按照酶联免疫吸附试验试剂盒说明书进行操作,准备酶联免疫吸附板,将特异性抗IL-4或抗IFN- $\gamma$ 的单克隆抗体稀释后加入板孔中,包被在固相载体上,4℃过夜。去除多余的抗体,用磷酸盐缓冲液洗涤板孔,加入封闭液,室温孵育1h,阻止非特异性结合。去除封闭液,加入标准品或待测血清样本,用不同浓度的标准品绘制标准曲线,将待测血清样本稀释到合适的范围,室温孵育2h,使IL-4或IFN- $\gamma$ 与固相抗体结合。去除未结合的IL-4或IFN- $\gamma$ ,用磷酸盐缓冲液洗涤板孔,加入生物素标记的山羊抗小鼠IgG二抗,室温孵育1h,使二抗与固相复合物结合。去除未结合的二抗,洗涤板孔,加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,室温孵育30min,使亲和素与生物素结合。去除未结合的亲和素,洗涤板孔,加入适当的底物,室温显色10~30min,使底物在酶的作用下发生有色反应。加入终止液,停止反应,并使有色反应由蓝色变为黄色。用酶标仪在450nm波长处读取各孔的吸光度(optical density, OD)值,并根据标准品的OD值和浓度绘制标准曲线,计算待检样本IL-4、IFN- $\gamma$ 水平<sup>[9]</sup>。

**1.4.7 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察肺组织病理变化** 取肺组织切片放在玻璃载片上,用火焯加热使其贴合。置于二甲苯中脱蜡,5min/次,重复2次。将载片转移到乙醇中脱脂,分别

用 100%、95%、70% 乙醇各处理 2 次, 3 min/次。冲洗载片, 苏木精染色 15 min。冲洗载片, 0.5% 盐酸乙醇溶液分化 5 s。冲洗载片, Scott 氏溶液蓝化 1 min, 伊红溶液染色 10 min。冲洗载片, 用 95% 乙醇去除多余的伊红染料, 3 min/次, 重复 2 次。将载片转移到 100% 乙醇中脱水, 3 min/次, 重复 2 次。将载片转移到二甲苯中透明化, 5 min/次, 重复 2 次。用玻璃盖片覆盖载片, 封片胶固定, 在显微镜下观察<sup>[10]</sup>。

**1.4.8 Western blotting 检测肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达** 取冷冻保存的肺组织, 充分研磨、匀浆、裂解, 10 000 r/min 低温离心 10 min, 离心半径 15 cm, 取上清液定量蛋白。取少量样本蛋白, 混合 4 倍量上样缓冲液, 水浴加热变性蛋白, 以 20 ~ 30  $\mu\text{g}$ /孔加载到凝胶槽中, 加入预染色蛋白作为分子量标准, 用恒压电源进行电泳分离。将分离好的蛋白从凝胶转移到聚氟乙烯膜上, 用转印仪或半干法转印。将转印好的膜用 5% 牛奶在室温或 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 ~ 2 h, 防止非特异性结合。将封闭好的膜用含适当稀释比例的 Nrf2 或 HO-1 一抗溶液在 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜或室温 2 h 孵育, 使一抗与目标蛋白结合。将孵育好的膜用含 Tween-20 的 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 10 min/次, 去除未结合的一抗。将洗涤好的膜用含适当稀释比例的荧光标记的二抗溶液室温孵育 1 h, 使二抗与一抗结合。重复上述洗涤步骤, 去除未结合的二抗。用荧光成像仪扫描和分析洗涤好的膜, 根据荧光信号的强度和分子量计算 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量<sup>[11]</sup>。

## 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 23.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠肺功能指标比较

正常组、MPI 组、实验 A 组、实验 B 组、实验 C 组 MV、TV、MEV 比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $F = 17.626$ 、 $15.133$  和  $20.238$ , 均  $P = 0.000$ )。与正常组比较, MPI 组 MV、TV、MEV 减少 ( $P < 0.05$ ); 与 MPI 组比较, 实验 A、B、C 组 MV、TV、MEV 增加 ( $P < 0.05$ ); 与实验 A 组比较, 实验 B、C 组 MV、TV、MEV 增加 ( $P < 0.05$ ); 与实验 B 组比较, 实验 C 组 MV、TV、MEV 增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组小鼠肺功能指标比较 ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	MV/(mL/min)	TV/mL	MEV/(L/min)
正常组	29.41 $\pm$ 5.19	0.22 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.07
MPI 组	15.59 $\pm$ 4.31 <sup>①</sup>	0.11 $\pm$ 0.03 <sup>①</sup>	0.32 $\pm$ 0.04 <sup>①</sup>
实验 A 组	19.18 $\pm$ 3.87 <sup>②</sup>	0.15 $\pm$ 0.04 <sup>②</sup>	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>②</sup>
实验 B 组	23.77 $\pm$ 3.60 <sup>②③</sup>	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>②③</sup>	0.48 $\pm$ 0.09 <sup>②③</sup>
实验 C 组	28.16 $\pm$ 4.91 <sup>②③④</sup>	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>②③④</sup>	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>②③④</sup>
F 值	17.626	15.133	20.238
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与正常组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 MPI 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与实验 A 组比较,  $P < 0.05$ ; ④与实验 B 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.2 各组小鼠血清氧化应激指标比较

正常组、MPI 组、实验 A 组、实验 B 组、实验 C 组血清 GSH-Px、SOD 活性比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $F = 18.642$  和  $70.428$ , 均  $P = 0.000$ )。与正常组比较, MPI 组血清 GSH-Px、SOD 活性降低 ( $P < 0.05$ ); 与 MPI 组比较, 实验 A、B、C 组 GSH-Px、SOD 活性增强 ( $P < 0.05$ ); 与实验 A 组比较, 实验 B、C 组 GSH-Px、SOD 活性增强 ( $P < 0.05$ ); 与实验 B 组比较, 实验 C 组 GSH-Px、SOD 活性增强 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组小鼠血清氧化应激指标比较 ( $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	GSH-Px/(u/L)	SOD/(u/mL)
正常组	126.17 $\pm$ 10.24	68.54 $\pm$ 7.21
MPI 组	82.16 $\pm$ 9.63 <sup>①</sup>	21.62 $\pm$ 5.67 <sup>①</sup>
实验 A 组	91.35 $\pm$ 10.27 <sup>②</sup>	36.51 $\pm$ 7.57 <sup>②</sup>
实验 B 组	102.99 $\pm$ 15.14 <sup>②③</sup>	48.91 $\pm$ 5.02 <sup>②③</sup>
实验 C 组	120.03 $\pm$ 19.91 <sup>②③④</sup>	57.17 $\pm$ 8.27 <sup>②③④</sup>
F 值	18.642	70.428
P 值	0.000	0.000

注: ①与正常组比较,  $P < 0.05$ ; ②与 MPI 组比较,  $P < 0.05$ ; ③与实验 A 组比较,  $P < 0.05$ ; ④与实验 B 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.3 各组小鼠血清免疫指标比较

正常组、MPI 组、实验 A 组、实验 B 组、实验 C 组血清 IFN- $\gamma$ 、IL-4 水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ( $F = 26.663$  和  $31.635$ , 均  $P = 0.000$ )。与正常组比较, MPI 组血清 IFN- $\gamma$  水平降低, IL-4 水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 MPI 组比较, 实验 A、B、C 组 IFN- $\gamma$  水平升高, IL-4 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与实验 A 组比较, 实验 B、C 组 IFN- $\gamma$  水平升高, IL-4 水平降低 ( $P < 0.05$ )。

0.05);与实验B组比较,实验C组IFN- $\gamma$ 水平升高,IL-4水平降低( $P < 0.05$ )。见表3。

表3 各组小鼠血清免疫指标比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	IFN- $\gamma$ /(ng/mL)	IL-4/(ng/L)
正常组	71.69 $\pm$ 9.40	33.98 $\pm$ 6.37
MPI组	39.43 $\pm$ 4.55 <sup>①</sup>	75.46 $\pm$ 12.71 <sup>①</sup>
实验A组	47.52 $\pm$ 7.13 <sup>②</sup>	67.27 $\pm$ 8.90 <sup>②</sup>
实验B组	58.38 $\pm$ 7.42 <sup>②③</sup>	56.45 $\pm$ 9.16 <sup>②③</sup>
实验C组	63.12 $\pm$ 9.45 <sup>②③④</sup>	48.16 $\pm$ 7.10 <sup>②③④</sup>
F值	26.663	31.635
P值	0.000	0.000

注:①与正常组比较, $P < 0.05$ ;②与MPI组比较, $P < 0.05$ ;③与实验A组比较, $P < 0.05$ ;④与实验B组比较, $P < 0.05$ 。

## 2.4 各组小鼠肺组织病理变化

HE染色结果显示,正常组小鼠肺组织结构完整,肺泡状态正常。MPI组小鼠肺组织结构受损严重,肺泡壁断裂变形,组织间隙肿胀,毛细血管扩张充血,可见大量炎症细胞浸润。实验A、B、C组小鼠肺泡壁恢复连接,组织结构成形,炎症细胞浸润减少,间隙肿胀程度变小;实验C组较实验A、B组改善更显著,呈剂量依赖性。见图1。

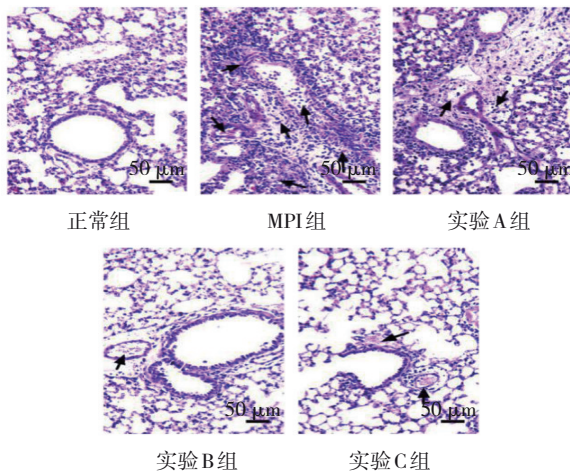


图1 各组小鼠肺组织病理变化 (HE染色 $\times 200$ )

## 2.5 各组小鼠肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量比较

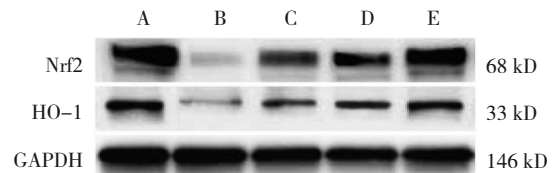
正常组、MPI组、实验A组、实验B组、实验C组肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义( $F=186.820$ 和 $123.063$ ,均 $P=0.000$ )。与正常组比较,MPI组肺组织 Nrf2、HO-1

蛋白相对表达量降低( $P < 0.05$ );与MPI组比较,实验A、B、C组肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ );与实验A组比较,实验B、C组肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ );与实验B组比较,实验C组肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ )。见表4和图2。

表4 各组小鼠肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	Nrf2	HO-1
正常组	0.92 $\pm$ 0.15	0.46 $\pm$ 0.04
MPI组	0.08 $\pm$ 0.02 <sup>①</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>①</sup>
实验A组	0.24 $\pm$ 0.03 <sup>②</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>②</sup>
实验B组	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>②③</sup>	0.28 $\pm$ 0.07 <sup>②③</sup>
实验C组	0.76 $\pm$ 0.08 <sup>②③④</sup>	0.40 $\pm$ 0.06 <sup>②③④</sup>
F值	186.820	123.063
P值	0.000	0.000

注:①与正常组比较, $P < 0.05$ ;②与MPI组比较, $P < 0.05$ ;③与实验A组比较, $P < 0.05$ ;④与实验B组比较, $P < 0.05$ 。



A:正常组;B:MPI组;C:实验A组;D:实验B组;E:实验C组。

图2 各组小鼠肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达

## 3 讨论

支原体肺炎是一种由肺炎支原体引起的急性呼吸道感染伴肺炎,其主要危险因素包括与患者密切接触、秋冬季节、儿童和青年年龄段、人群密集环境、免疫力低下及合并其他呼吸道感染等<sup>[12-13]</sup>。支原体肺炎发病机制涉及支原体对宿主细胞直接损伤、宿主对支原体的免疫反应,以及支原体与其他微生物的共同作用<sup>[14-16]</sup>。作为一种无细胞壁的病原体,肺炎支原体可抵抗细胞壁靶向性抗生素,并可改变自身大小和形状以适应周围环境,从而增加耐药性和免疫逃避能力,治疗难度高<sup>[17]</sup>。尽管已经有许多药物和治疗方法用于支原体肺炎,但是疗效仍不理想,因此迫切需要寻找新的治疗策略。

Th1/Th2平衡是指机体在应对不同类型的病原体时,产生适当比例的Th1、Th2细胞,以发挥最佳的

免疫效应,IFN- $\gamma$ 、IL-4 分别是两者的代表性因子,广泛参与支原体肺炎发生、发展<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,与 MPI 组比较,实验 A、B、C 组 MV、TV、MEV 均增加,IL-4 水平降低,GSH-Px、SOD 活性、IFN- $\gamma$  水平均升高,提示匹多莫德可改善 MPI 小鼠肺功能、氧化应激及免疫功能。匹多莫德是一种由 2 个 L-丙氨酸和 1 个 D-苯丙氨酸组成的二肽类化合物,常用于治疗有细胞介导免疫抑制证据的肺部及泌尿道感染,其可刺激和调节细胞因子的产生和释放,从而增强非特异性自然免疫、体液免疫和细胞免疫等相关免疫反应,增强巨噬细胞、中性粒细胞的抗感染能力,促使辅助性/抑制性 T 细胞比值恢复正常<sup>[20-21]</sup>。XU 等<sup>[22]</sup>研究认为,辅助匹多莫德治疗支原体肺炎可改善患者的炎症反应和肺功能,增强免疫功能。

Nrf2/HO-1 信号通路是机体内一条重要的细胞保护通路,参与调节氧化应激、炎症和凋亡等多个生物学过程。Nrf2 是该信号通路的核心转录因子,具有还原敏感性,可维持细胞内氧化还原稳态,在受到氧化应激或亲电性物质的刺激时,从细胞质中解离出来,转移至 HO-1<sup>[23-24]</sup>。HO-1 是一种血红素加氧酶,可将血红素降解为一氧化碳 CO、胆红素和游离铁,从而发挥抗氧化、抗炎、抗凋亡和稳定血管的作用<sup>[25]</sup>。在 MPI 中,Nrf2/HO-1 信号通路也起着重要作用。Nrf2 和 HO-1 蛋白在肺组织中主要由 II 型肺泡细胞分泌,II 型肺泡细胞是一种位于肺泡拐角处的立方或球形细胞,具有合成、分泌肺表面活性物质的功能。Nrf2 和 HO-1 蛋白可以保护肺泡细胞免受氧化应激和炎症反应损伤,对预防和治疗急性肺损伤等疾病有重要意义。支原体肺炎感染可导致肺组织产生大量的活性氧自由基,造成氧化应激损伤,Nrf2/HO-1 通路可调节细胞内抗氧化酶和抗氧化物质的表达,清除活性氧自由基,维持氧化还原平衡,减轻氧化应激反应。支原体肺炎感染可激活细胞膜上的 Toll 样受体 4,启动核转录因子  $\kappa$ B 信号通路,释放炎症因子,引发炎症反应,而 Nrf2/HO-1 通路可以抑制该信号通路的激活,减少炎症因子的表达,从而抑制炎症反应。支原体肺炎感染可通过黏附、入侵、毒素等方式直接损伤肺泡上皮细胞,导致肺泡水肿和气体交换障碍。Nrf2/HO-1 通路可通过增加 CO 的生成,改善微循环,增加血流灌注,保

护肺泡上皮细胞。有学者发现,Nrf2/HO-1 信号通路活性在支原体肺炎中被抑制,激活该通路可有效减轻小鼠肺部炎症反应,促进细胞增殖并抑制其凋亡<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,MPI 小鼠经不同剂量匹多莫德干预后,肺组织 Nrf2、HO-1 蛋白相对表达量均升高,提示匹多莫德可能通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路发挥对 MPI 小鼠的治疗作用。

综上所述,匹多莫德可能通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路改善 MPI 小鼠肺功能及免疫功能,减轻氧化应激损伤。本研究仍存在一定不足及局限性,如研究中使用的小鼠数量较少,导致结果的可信度和推广性受到限制,且由于小鼠和人类在生理和基因上存在一定差异,实验结果可能不完全适用于人类,无法完全模拟临床情况。未来研究应增加样本量,以提高实验的统计学能力和结果的可靠性,并逐步进行临床随机对照试验,进一步观察匹多莫德对 MPI 的影响。

#### 参 考 文 献 :

- [1] WANG X, LI M Z, LUO M, et al. Mycoplasma pneumoniae triggers pneumonia epidemic in autumn and winter in Beijing: a multicentre, population-based epidemiological study between 2015 and 2020[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 1508-1517.
- [2] JENSEN J S, CUSINI M, GOMBERG M, et al. 2021 European guideline on the management of Mycoplasma genitalium infections[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2022, 36(5): 641-650.
- [3] MAROGNA M, CIPRANDI G. Pidotimod as add-on therapy in patients with pollen-induced allergic rhinitis and asthma and associated respiratory infections[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2021, 35(3): 1053-1058.
- [4] 冯冬婵,张丽,雷玲芳,等. 连花清瘟颗粒联合匹多莫德治疗老年支气管炎临床疗效及安全性观察[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 236-239.
- [5] FU Y S, DUAN X Q, CHENG K R, et al. Geraniol relieves Mycoplasma pneumonia infection-induced lung injury in mice through the regulation of ERK/JNK and NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(4): e22984.
- [6] WU T C, CUI J, GAO J H, et al. Pidotimod enhanced the anti-growth effect of cisplatin on lung cancer in mice via promoting anti-tumor immune response[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 528(4): 678-684.
- [7] ZHOU J, PENG Z L, WANG J. Trelagliptin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and oxidative stress in acute lung injury mice[J]. Inflammation, 2021, 44(4): 1507-1517.

- [8] 潘建立, 郑良英, 叶成杰. 右美托咪定通过核转录因子红系2相关因子2/重组人血红素加氧酶-1信号转导通路对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(2): 251-255.
- [9] XU C, SONG Y L, WANG Z G, et al. Pterostilbene suppresses oxidative stress and allergic airway inflammation through AMPK/Sirt1 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(4): 1406-1417.
- [10] DONG L Y, WANG Y, ZHENG T T, et al. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 4.
- [11] 钟昌会, 钱进, 杨远征, 等. 苦杏仁苷对支气管哮喘大鼠 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1/核因子E2相关因子2信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(18): 2157-2161.
- [12] HAN C J, ZHANG T Q, ZHENG J F, et al. Analysis of the risk factors and clinical features of Mycoplasma pneumoniae pneumonia with embolism in children: a retrospective study[J]. Ital J Pediatr, 2022, 48(1): 153.
- [13] YANG L, ZHANG Y Y, SHEN C Q, et al. Clinical features and risk factors of plastic bronchitis caused by Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. BMC Pulm Med, 2023, 23(1): 468.
- [14] JIANG Z L, LI S H, ZHU C M, et al. Mycoplasma pneumoniae infections: pathogenesis and vaccine development[J]. Pathogens, 2021, 10(2): 119.
- [15] LEE Y C, CHANG C H, LEE W J, et al. Altered chemokine profile in refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia infected children[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2021, 54(4): 673-679.
- [16] HU J, YE Y Y, CHEN X X, et al. Insight into the pathogenic mechanism of Mycoplasma pneumoniae[J]. Curr Microbiol, 2022, 80(1): 14.
- [17] TSAI T A, TSAI C K, KUO K C, et al. Rational stepwise approach for Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2021, 54(4): 557-565.
- [18] ZHOU G D, TIAN Y C, TIAN J S, et al. Oral immunization with attenuated Salmonella choleraesuis expressing the P42 and P97 antigens protects mice against Mycoplasma pneumoniae challenge[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(6): e0236122.
- [19] RODRÍGUEZ F, ROSALES R S, RAMÍREZ A S, et al. Vaccination upregulates Th1 cytokines in the lung of Pigs experimentally infected with Mycoplasma hyopneumoniae[J]. Animals (Basel), 2023, 13(3): 520.
- [20] DEGLURKAR R, MATHEW J L, SINGH M. Efficacy and safety of pidotimod in persistent asthma: a randomized triple-blinded placebo-controlled trial[J]. Indian Pediatr, 2022, 59(3): 201-205.
- [21] UCCIFERRI C, FALASCA K, REALE M, et al. Pidotimod and immunological activation in individuals infected with HIV[J]. Curr HIV Res, 2021, 19(3): 260-268.
- [22] XU L, ZHAO Y, WU S K, et al. Effects of adjuvant pidotimod therapy on levels of inflammatory factors and expressions of serum GM-CSF and KL-6 in elderly patients with Mycoplasma pneumoniae[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(10): 11899-11907.
- [23] DANG R Z, WANG M Y, LI X H, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41.
- [24] GHAREGHOMI S, MOOSAVI-MOVAHEDI F, SASO L, et al. Modulation of Nrf2/HO-1 by natural compounds in lung cancer[J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(3): 735.
- [25] 徐佩尔, 颜雪芸, 周乐, 等. 血塞通(三七皂苷)对缺氧/复氧诱导的H9c2心肌细胞氧化损伤的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(2): 113-117.
- [26] 张晓, 李伟华. 基于Nrf2/HO-1信号通路探讨lncRNA H19对支原体感染肺炎小鼠肺组织的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(14): 1689-1695.

(童颖丹 编辑)

**本文引用格式:** 王坤, 李嫣. 匹多莫德对支原体感染小鼠肺功能损伤的影响及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(6): 1-7.

**Cite this article as:** WANG K, LI Y. Effect of pidotimod on lung function impairment and the mechanism thereof in mice infected with Mycoplasma pneumoniae[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(6): 1-7.