

## 玉屏风散对上呼吸道菌群失调小鼠咽部 ICAM 表达的影响<sup>\*</sup>

陈 滢, 姚 政, 赵文娟, 马 洁, 陈文慧<sup>△</sup>

(云南中医学院 基础医学院, 云南昆明 650500)

**摘要:** 目的 研究玉屏风散对上呼吸道菌群失调致感染小鼠咽部黏膜 ICAM(inter cellular adhesion molecular) 表达的调节作用。方法 30 只 SPF 级昆明种小白鼠随机分为 3 组: 正常对照组、模型组和玉屏风散组。模型组通过腹腔注射氨苄青霉素致上呼吸道菌群失调建立模型, 玉屏风散组在造模型后用玉屏风散灌胃治疗。7d 后取咽部黏膜组织固定, 进行 ICAM 免疫组化染色, 显微镜下观察其表达情况, 应用图像分析仪计算阳性结果的平均光密度值。结果 模型组 ICAM 表达较对照组增加( $P<0.01$ ), 而玉屏风散组 ICAM 表达较模型组明显减少( $P<0.01$ )。结论 菌群失调所致咽部感染会促进小鼠咽黏膜 ICAM 的表达, 而玉屏风散能减少小鼠咽黏膜 ICAM 的表达。表明玉屏风散调节上呼吸道微生态失衡的作用机制可能与降低 ICAM 有关。

**关键词:** 玉屏风散; 上呼吸道; 菌群失调; ICAM

**中图分类号:** R285

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-2723(2013)04-0009-04

上呼吸道感染是临床常见的感染性疾病。上呼吸道由于与外界相通, 其黏膜表面存在着大量的细菌、真菌、螺旋体等微生物群。正常情况下, 人体和这些菌群之间保持一定的平衡。如果生态平衡失调, 这些正常菌群中各细菌的比例关系发生数量和质量上的变化会导致菌群失调, 引起或加重上呼吸道感染。我们前期研究中发现玉屏风散能促进上呼吸道微生态失调小鼠口咽部甲型链球菌、菌群密集度和菌群多样性的增长, 对小鼠口咽部的微生态平衡具有一定调节作用<sup>[1-2]</sup>。为探讨玉屏风散调节小鼠上呼吸道菌群的调节机制, 开展本实验研究, 通过观察玉屏风散对菌群失调导致上呼吸道感染小鼠咽部黏膜组织中细胞间黏附因子(inter cellular adhesion molecule, ICAM)表达的影响, 初步揭示玉屏风散防治上呼吸道感染疾病的作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物和分组

SPF 级昆明种小白鼠, 购自四川省医学科学院实验动物研究所, 许可证号: SCXP(川)2004-16, 体重 18~23 g, 雌雄各半。适应性饲养 3d 后随机分为正常对照组、模型组和玉屏风散组, 每组 10 只。

#### 1.2 小鼠上呼吸道微生态失调模型<sup>[3]</sup>的建立

造模前每组随机抽取 3 只, 共 9 只小鼠进行咽部拭子采样和检测。采样完毕后, 正常对照组腹腔注射生理盐水(1.56g/kg), 其余两组均腹腔注射氨苄西林钠(0.13g/kg), 每天上午 8~9 点给药, 连续 3d, 自由饮食。

#### 1.3 药物制备

玉屏风散由黄芪、白术和防风组成, 质量比例为 1:2:1。按临床常用剂量购置、煎煮和提取, 4℃冰箱储藏备用; 用药前恢复到常温后使用。

#### 1.4 动物给药

药物组在造模第 1 天开始用玉屏风散连续灌胃 7d, 模型组和对照组用等容量生理盐水(1.56g/kg)灌胃。药物组每日给小鼠灌胃玉屏风散煎液(1.56g/kg)。第 4 天, 正常对照组的 10 只小鼠和造模组的 10 只小鼠进行口咽部拭子采样和检测。

#### 1.5 细菌采集、鉴定和计数

第 8 天对各组所有实验小鼠进行口咽部拭子采样和检测, 之后处死小鼠。通过 3 次采样检测的结果观察小鼠上呼吸道微生态失调模型的建立情况、给药及乙型溶血性链球菌攻击后小鼠上呼吸道

<sup>\*</sup> 基金项目: 云南省科技计划项目(NO:2008CD150)

收稿日期: 2013-06-17 修回日期: 2013-08-18

作者简介: 陈滢(1976~), 女, 讲师, 主要从事正常人体解剖学与组织胚胎学教学工作。

<sup>△</sup>通信作者: 陈文慧, E-mail: cwh6581908@126.com

菌群变化情况。

## 1.6 病理检查及免疫组织化学检测方法

实验第 8 天动物脱颈椎处死后, 分离出咽喉部, 生理盐水冲洗后吸干, 浸泡于 10% 甲醛固定, 2 d 后作常规石蜡包埋切片, 再进行 HE 染色及免疫组织化学染色。

### 1.6.1 病理检查

石蜡切片行 HE 染色, 在普通显微镜下观察组织病理改变。

### 1.6.2 免疫组织化学检测

取石蜡包埋切片, 按链霉亲和素生物素-过氧化物酶 (SABC) 方法进行免疫组化检测。一抗 ICAM-1、二抗 (兔抗小鼠) 均由武汉博士德生物制品公司提供, 严格按照试剂说明书操作。染完色后取各免疫组化染片在高倍视野 (400 ×) 下随机取 5 个视野, 采用 MiVnt 图像分析软件系统测算 ICAM-1 的平均光密度值。再计算各片均值, 作为该片的代表值。

## 1.7 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 多组比较用单因素方差分析, 两两比较方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时使用 Dunnett's T3 检验,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 青霉素致小鼠上呼吸道微生态失调的模型复制建立

造模后与正常对照组比较, 小鼠口咽部甲型链

表 1 造模前后小鼠口咽部菌群密集度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| Lg CFU/mL |    |               |               |               |
|-----------|----|---------------|---------------|---------------|
| 组别        | n  | 甲型链球菌         | 菌群密集度         | 菌群多样性         |
| 正常对照      | 10 | 6.92 ± 0.55   | 7.14 ± 0.55   | 0.74 ± 0.08   |
| 造模后       | 10 | 0.00 ± 0.00** | 5.81 ± 0.30** | 0.58 ± 0.05** |

注: 与造模前相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

球菌未检出、菌群密集度和菌群多样性明显减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 表明小鼠上呼吸道菌群失调模型成功建立。

### 2.2 小鼠上呼吸道黏膜病理改变

正常对照组小鼠上呼吸道黏膜病理切片可见咽上皮层光整, 周围未见炎性细胞浸润, 黏膜较薄 (图 1-a)。模型组病理切片可见血管及咽黏膜周围大量炎性细胞浸润, 杯状细胞增生、肥大, 腺体结构改变, 黏膜上皮增厚、受损、脱落 (图 1-b)。玉屏风散组血管周围及咽各层组织中炎性细胞浸润明显减轻, 黏膜变薄, 黏膜上皮细胞脱落也有所改善 (图 1-c)。

### 2.3 小鼠咽部黏膜 ICAM-1 免疫组化结果及平均积分光密度值

正常对照组小鼠上呼吸道黏膜边缘及腔内无阳性颗粒。模型组小鼠上呼吸道黏膜边缘呈深色黄染条带, 咽腔内大量阳性细胞, 腺体间和血管内也可见阳性染成棕黄色细胞。药物组黏膜表面无阳性表现, 腺体间无阳性细胞, 血管内和咽腔内有少量阳性细胞。测量平均积分光密度值结果显示正常对照组与模型组间有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 模型组与玉屏风散组间有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 正常对照组与模型组间无统计学差异。图像分析结果见表 2, 图 2、3、4。

表 2 3 组小鼠上呼吸道黏膜 ICAM-1 平均积分光密度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n  | ICAM-1                     |
|-------|----|----------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 0.145 ± 0.027              |
| 模型组   | 10 | 0.329 ± 0.035*             |
| 玉屏风散组 | 10 | 0.165 ± 0.031 <sup>△</sup> |

注: 与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$

## 3 讨论

本实验采用腹腔注射氨苄西林钠复制小鼠上呼吸道微生态失调模型, 检测小鼠口咽部菌群, 与

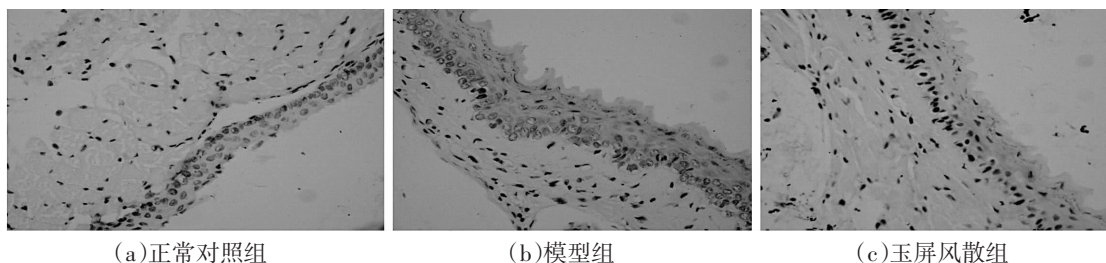
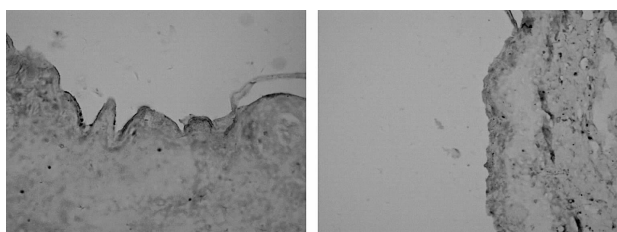
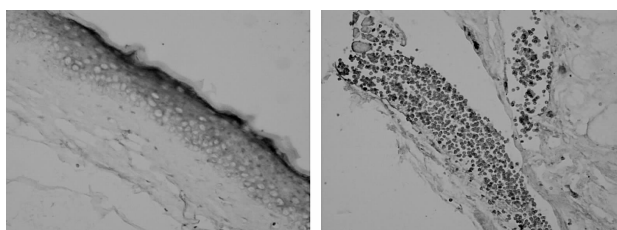


图 1 3 组小鼠咽部黏膜病理切片 HE 染色结果 (400 ×)



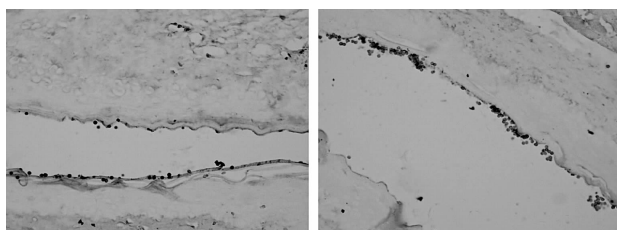
(a)  
(b)  
(a:小鼠咽粘膜边缘及腔内无阳性颗粒,  
b:小鼠咽粘膜腺体间及血管内无阳性颗粒)

图2 对照组小鼠咽部粘膜免疫组化结果(400×)



(a)  
(b)  
(a:咽粘膜边缘呈深色黄染条带,腺体间可见棕黄色颗粒;  
b:咽腔内大量阳性细胞,血管内可见阳性染成棕黄色细胞)

图3 模型组小鼠咽部粘膜免疫组化结果(400×)



(a)  
(b)  
(a:咽黏膜上皮及固有层无阳性颗粒,表面有少量阳性细胞附着,b:咽腔内见少量阳性细胞,腺体间和血管内无阳性细胞)

图4 药物组小鼠咽部黏膜免疫组化结果(400×)

造模前和正常对照组相比,造模后小鼠口咽部甲型链球菌未检出、菌群密集度和菌群多样性明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明小鼠上呼吸道微生态失调模型成功建立。我们前期的实验研究发现给予玉屏风散后药物组有促进小鼠口咽部菌群密集度、菌群多样性恢复的作用<sup>[1-2]</sup>。表明玉屏风散可通过促进甲型链球菌的生长,及菌群密集度和菌群多样性的恢复,促使上呼吸道微生态失调小鼠口咽部菌群向正常状态转变,对小鼠口咽部菌群平衡具有调节作用。

细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)是一类介导细胞与细胞,细胞与细胞外基质以及某些血浆蛋白间识别与结合作用的膜表面糖蛋白。根据

其基因结构的同源性和功能特点,主要分为选择素家族、黏蛋白样家族、整合素家族、免疫球蛋白超家族和钙离子依赖的细胞黏附素家族5大类<sup>[3]</sup>。其中免疫球蛋白超家族中的细胞间黏附分子-1(inter cellular adhesion molecular-1, ICAM-1)位于第19号染色体,以膜型和可溶型2种形式存在。前者位于细胞膜表面,后者存在于体液中,二者功能并无质的区别。ICAM-1在正常情况下极少出现,当受到炎性细胞因子,如IL-1(Intermediate Language, 白介素-1)、TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor, 肿瘤坏死因子 $\alpha$ )和IFN- $\gamma$ (Interferon, 干扰素 $\gamma$ )以及内毒素等刺激后,可广泛出现于造血和非造血系统来源的多种细胞表面。在外伤、炎症刺激物等的作用下,淋巴细胞、巨噬细胞和其它细胞释放IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-1等细胞因子,促进内皮细胞生成ICAM-1,增强白细胞与血管内皮间的黏附作用,从而促进炎症的发生与发展<sup>[4]</sup>。

在本实验中发现,腹腔注射氨苄西林钠诱导的上呼吸道微生态失调小鼠咽部粘膜能表达大量ICAM-1。ICAM-1的大量表达会加重炎症反应,进一步损伤咽部黏膜。表达过度的ICAM-1会导致大量中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞的渗出。中性粒细胞跨内皮迁移并在病灶内浸润,通过释放蛋白水解酶、化学介质和毒性氧自由基等,产生细胞毒性作用;并引起内皮损伤、变性,通透性增加,间质水肿等,从而加重局部组织损伤并延长炎症过程。同时有研究发现,ICAM-1还是人类病毒主要受体,在100多种无免疫交叉反应的鼻病毒感染中,90%都与ICAM-1结合,40%~50%普通感冒是由这类病毒引起<sup>[5]</sup>。由此可见在感染过程中ICAM-1的增加进一步引起病毒入侵,加重病变。国外有学者<sup>[6-8]</sup>复制某些器官组织损伤或疾病的动物模型,采用ICAM-1多克隆或单克隆抗体以及一些抗ICAM-1药物对动物模型中人为造成的损伤或疾病进行干预,发现经抗ICAM-1处理后可显著减轻这些损伤和疾病中的炎症反应以及其他一些对机体的不良反应。我们研究中发现,上呼吸道微生态失调小鼠经玉屏风散治疗后,小鼠咽部黏膜ICAM-1的表达大量下降,说明玉屏风散能有效降低感染咽部ICAM-1的分泌,从而减少中性粒细胞、嗜酸性粒细胞等炎性细胞的浸润,减轻炎症反应,达到保护咽部黏膜的作用。表明玉屏风散调节上呼吸道微生态失衡的作



用机制可能与降低 ICAM-1 有关;同时,还为将玉屏风散应用于治疗其他由 ICAM-1 介导的相关疾病提供一定的实验依据。

### 参考文献

- [1] 姚政,彭静,徐艳琴,等. 从微生态角度探讨玉屏风散和甲型链球菌防治上呼吸道感染的机制 [J]. 中国当代医药, 2012,19(13):23-25.
- [2] 姚政,徐艳琴,郭剑男,等. 玉屏风散及甲型链球菌预防上呼吸道感染的微生态作用机理初探[J]. 云南中医学院学报, 2011,34(5):26-29.
- [3] 毕爱华. 医学免疫学 [M]. 北京:人民军医出版社,2002: 80-92.
- [4] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社,2000: 107-124.
- [5] Michael F T,James M S,Akbar H,et al. The binding site on ICAM-1 for plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site[J].

The Journal of Immunology, 1992,149:3345.

- [6] Kanemoto Y,Nakase H,Akita N,et al. Effects of anti- intercellular adhesion molecule- 1 antibody on reperfusion injury induced by late reperfusion in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. Neurosurgery,2002,51 (4): 1034- 1042.
- [7] Berti R,Williams A J,Velarde LC,et al. Effect o f the protea-some inhibitor MLN 519 on the expression of inflammatory molecules following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in the rat [J]. Neurotoxin Res,2003,5(7): 505- 514.
- [8] Isaksson J, Hillered L, Olsson Y. Cognitive and histopathological outcome after weight- drop bra in injury in the rat:influence o f systemic administration o f monoclonal antibodies to ICAM - 1 [J]. Act a Neuropathol (Berl), 2001,102(3):246- 256.

(编辑:迟越)

## Effects of Yupingfeng San on the Expression of Mice Pharynx ICAM under Flora Imbalance in the Upper Respiratory Tract

CHEN Yan, YAO Zheng, ZHAO Wen-juan, MA Jie, CHEN Wen-hui  
(Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To study the regulation effect of Yupingfeng San on the expression of ICAM in mice pharynx mucous membrane when flora imbalance causes upper respiratory tract infection. **Methods** 30 SPF Kunming mice were randomly divided into three groups:normal control group, model group and Yupingfeng San group. The model group by intraperitoneal injection of ampicillin induced flora imbalance model of the upper respiratory tract. Yupingfeng San group in building models were treated by gastric perfusion With Yupingfeng San. 7 days later, the pharyngeal mucosal tissues were fixed and ICAM was measured by immunohistochemical staining in these tissues. To observe the positive expression under the microscope and calculate the average optical density of the positive results using image analyzer. **Results** In the model group, the expression of ICAM increased than the control group( $P<0.01$ ), while the expression of ICAM in Yupingfeng San group than those in the model group decreased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Pharyngeal infection by flora imbalance can promote the expression of ICAM in mouse pharyngeal mucosal tissues. But Yupingfeng San can reduce the expression of ICAM. Consequently, the adjustment mechanism of Yupingfeng San to the upper respiratory Micro-ecological imbalance may be related to the reduce of ICAM.

**KEY WORDS:** Yupingfeng San;the upper respiratory tract;flora imbalance;ICAM