

柴葛芩连汤对幼年小鼠肺炎模型治疗作用及其机制

边红恩, 陈团营*

(河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450000)

[摘要] **目的:** 观察柴葛芩连汤对肺炎幼年小鼠(幼鼠)模型的治疗作用,并探讨其相关的作用机制。**方法:** 以金黄色葡萄球菌经幼鼠鼻孔缓慢滴入小鼠鼻腔内的方法复制肺炎模型,造模成功后将幼鼠随机分为模型组、克林霉素组、柴葛芩连汤高、低剂量组,并以假手术组作为阴性组。造模后当天开始给药,柴葛芩连汤高、低剂量 200, 100 mg·kg⁻¹,克林霉素 120 mg·kg⁻¹。每天观察幼鼠状况,5 d 后对每组幼鼠的肺脏进行菌落计数,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测每组小鼠的肺脏灌洗液中白细胞介素(IL)-16,肿瘤坏死因子(TNF)-α的表达水平,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)测量幼鼠肺中肿瘤坏死因子受体(TNFR)1,半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3, Caspase-7 mRNA 及蛋白的表达,并观察肺脏的病理学改变。**结果:** 与假手术组比较,造模幼鼠呼吸状态及活动状态较差,给药后均有不同程度改善,其中以柴葛芩连汤高剂量组存活率较高。与假手术组比较,模型组幼鼠肺内菌落计数均有所增加;与模型组比较,克林霉素组、柴葛芩连汤高剂量组肺内菌落计数改善较明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组 IL-16, TNF-α 的表达水平及肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.01$),而与模型组比较,克林霉素组、柴葛芩连汤高、低剂量组 IL-16, TNF-α 的表达水平及肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 和蛋白的表达水平均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),且肺脏病理学改变有所改善,克林霉素组、柴葛芩连汤高剂量组改善较明显。**结论:** 柴葛芩连汤对金黄色葡萄球菌肺炎幼鼠模型具有一定的治疗作用,该作用可能与调控 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 通路,减少 IL-16, TNF-α 的分泌,增强对金黄色葡萄球菌的清除有关。

[关键词] 肺炎幼年小鼠模型; 柴葛芩连汤; 金黄色葡萄球菌; 白细胞介素-16 (IL-16); 肿瘤坏死因子受体 1 (TNFR1)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)04-0023-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191021.1042.008.html>

[网络出版时间] 2019-10-21 11:15

Therapeutic Effect and Mechanism of Chaige Qinlian Tang on Young Mouse MRSA Pneumonia Model

BIAN Hong-en, CHEN Tuan-ying*

(Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the therapeutic effect and mechanism of Chaige Qinlian Tang on pneumonia in young mice. **Method:** The pneumonia model was duplicated by slowly dripping *Staphylococcus aureus* into the nasal cavity of mice. After successful modeling, the mice were randomly divided into model group, clindamycin group, and high and low-dose Chaige Qinlian Tang groups, with sham operation group as negative control group. The rats were given 200 mg·kg⁻¹ high-dose Chaige Qinlian Tang, 100 mg·kg⁻¹ low-dose Chaige Qinlian Tang and 120 mg·kg⁻¹ clindamycin. The mice were observed every day. Colonies were counted in the lungs of each group five days later. The expression levels of interleukin (IL) -16, tumor necrosis factor (TNF) -α in lung lavage fluid of each group were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time

[收稿日期] 20190605(019)

[基金项目] 河南省科技厅技术研究计划项目(142300410070)

[第一作者] 边红恩, 硕士, 主治医师, 从事小儿呼吸系统与神经系统相关疾病研究, E-mail: hongen72@163.com

[通信作者] * 陈团营, 副主任中医师, 从事儿科常见病中医药研究, E-mail: yifan96606@126.com

fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to measure the expression levels of IL-16, TNF- α in lung lavage fluid of each group. The expressions of tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, Caspase-3 and Caspase-7 in lung and the pathological changes of lung were observed. **Result:** Compared with the sham operation group, the respiratory state and the activity state of the model mice were worse, and the survival rate was higher in the high-dose Chaige Qinlian Tang group. Compared with the sham operation group, the pulmonary colony counts in the model group and treatment groups were increased, compared with the model group, the lung colony counts in clindamycin group and high-dose Chaige Qinlian Tang group were improved significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the expression levels of IL-16, TNF- α , TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA and protein in the lung of model group and treatment groups were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the expression levels of IL-16, TNF- α and TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 in the lung of clindamycin group and high and low-dose Chaige Qinlian Tang groups were significantly increased ($P < 0.01$). The expression levels of protein and mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the pathological changes of lung were improved, especially in clindamycin group and high-dose Chaige Qinlian Tang group. **Conclusion:** Chaige Qinlian Tang has a certain therapeutic effect on *Staphylococcus aureus* pneumonia in young mice. This effect may be related to regulating TNFR1, Caspase-3 and Caspase-7 pathways, reducing the secretion of IL-16 and TNF- α , and enhancing the clearance of *staphylococcus aureus*.

[**Key words**] pneumonia young mice model; Chaige Qinlian Tang; *staphylococcus aureus*; interleukin-16 (IL-16); tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)

金黄色葡萄球菌(SA)是一种常在鼻前庭定植的病原菌,亦可见于鼻外定植,如皮肤、会阴、胃肠道和喉部。SA 病菌可通过多种途径侵入机体,引起造成局部组织、内脏器官或全身性化脓性感染。研究调查结果显示,约 30% 成年人鼻前庭有 SA 定植^[1]。从 1961 年报道了第一株 MRSA 病菌,即耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillm-resistant *Staphylococcus aureus*)以来,SA 和 MRSA 的检出率呈逐年上升趋势,MRSA 感染已成为近年来医学上的一个难题^[2-3]。一项流行病学研究显示,美国的 SA 的感染每年造成约 1.9 万人死亡,其中金黄色葡萄球菌肺炎(SAP)在儿科中较常见^[1,3]。目前糖肽类、恶唑烷酮类抗生素仍是 SA 感染重症患儿治疗最有效的首选药物,在临床上被大量使用甚至滥用,继而造成进展迅速的耐药问题也令人堪忧^[4]。

大量的研究报道表明具有清热解毒的中药及其组方,例如黄柏、黄连片、黄芩片、清金颗粒、莲花清瘟胶囊等对于 MRSA 具有显著的抗菌作用^[5-10]。柴葛芩连汤出自《症因脉治》卷四,该方为古典清热方剂,由北柴胡、葛根、黄芩片和黄连片经过煎煮熬制而成。柴葛芩连汤具有清热,升阳以止利的功效,主治外感中热泻,发热口渴,唇干齿燥,面赤烦躁,小便赤涩,小腹中一泛即泻,一泻即止,少顷复痛复泻,肛门灼热,粪色多黄,热在表者^[11]。现代研究报道表

明柴葛芩连汤临床单用或者联合抗生素治疗小儿支气管肺炎湿热闭肺证等炎症性疾病具有良好的效果^[12-14]。但其治疗肺炎的药效机制尚未清楚,本研究应用幼鼠肺炎模型,探讨出自《症因脉治》的柴葛芩连汤对 MRSA 的治疗作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 C57BL/6J 幼年小鼠(幼鼠) 200 只,SPF 级,年龄 4~6 周,购自河南省实验动物生产有限公司,合格证号 SCXY(豫)2012-0002。室内环境控制在 12 h/12 h 黑白交替,温度(23 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 55% \pm 5%。动物实验经河南中医药大学医学伦理委员会批准(201805081)。

1.2 药物 柴葛芩连汤(北柴胡 10 g,黄芩片 10 g,葛根 10 g,甘草片 6 g,黄连片 2 g,由本校药学院提供,以上药物均由河南省中医院药学部伏晓主任进行鉴定)。中药煎煮前用冷水浸泡 20 min,煎煮 20 min,煎煮 2 次,最后浓缩成 19 mL,质量浓度为 2 g \cdot mL⁻¹,给药剂量为高剂量 200 mg \cdot kg⁻¹,低剂量 100 mg \cdot kg⁻¹^[15]。

1.3 试剂 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 ATCC4300(美国 ATCC 公司,批号 ATCC4300);克林霉素(美国 Selleck 公司,批号 S2555);trizol(美国 Therm Fisher 公司,批号 15596026);苏木素染色液(美国 Sigma 公司,货号 517-28-2);伊红染色液(武

汉博士德生物工程有限公司, 货号 AR1180-2); 小鼠白细胞介素-16(IL-16), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 Biologend 公司, 批号分别为 XYA062Ra, 430904); 鼠抗人肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1), 半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-7(Caspase-7), Caspase-3, β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体, 兔抗鼠二抗(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab19139, ab255818, ab13585, ab8227, ab97046); cDNA 第一链合成试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 KGA1313); 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix (SYBR Green)(日本 Toyobo 公司, 批号 QPK201)。

1.4 仪器 DP72 型显微镜(日本 Olympus 公司); MultiGene Gradient 型 PCR 循环仪(日本岛津公司), DA7600 型 Real-time PCR 循环仪(中山达安公司); Centrifuge 5810R 型低温高速离心机, 5333 型梯度 PCR 仪, Lightcycler 型 Real-time PCR 仪(德国 Roche 公司); EPS-300 型电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System 型蛋白电泳槽, Mini Trans-Blot 型蛋白转印系统, ChemiDoc™ XRS + 型化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); ZS-2 型板式酶标仪(北京市新风机电技术公司)。

2 方法

2.1 模型建立及分组给药^[16] 幼鼠适应 1 周后用于建立 MRSA 肺炎小鼠模型。ATCC4300 是 MRSA 的标准菌株, 将 ATCC4300 菌液 10 μ L (1×10^{10} CFU \cdot mL⁻¹)经幼鼠鼻孔缓慢滴入幼鼠鼻腔内建立肺炎幼鼠模型。造模幼鼠 200 只, 随机分为模型组、克林霉素组和柴葛芩连汤高、低剂量组, 每组 50 只。另外随机选取正常 C57BL/6J 小鼠 40 只, 经鼻孔缓慢将生理盐水滴入幼鼠鼻腔中, 作为假手术组。克林霉素组作为阳性药组, 幼鼠给与腹腔注射克林霉素 120 mg \cdot kg⁻¹。柴葛芩连汤组幼鼠灌胃给予对应剂量的柴葛芩连汤。假手术组作为阴性组给予等量生理盐水。

2.2 菌落计数 在给药 5 d 后对每组随机选取部分幼鼠颈椎脱臼处死, 在无菌操作下取出部分肺脏, 称质量、组织匀浆、稀释, 固定于培养基表层, 恒温箱培养中培养 24 h 后于显微镜下进行菌落计数; 另一部分肺脏用于苏木素-伊红(HE)染色。

2.3 HE 染色观察大鼠脑组织形态学变化 取肺组织置于 10% 甲醛溶液中固定, 进行常规石蜡切片, 厚度为 4 μ m, HE 染色, 中性树胶封片后于光学显微镜下观察大鼠脑组织形态学变化。

2.4 ELISA 检测 IL-16, TNF- α 含量 在给药 5 d 后, 每组随机选取部分幼鼠麻醉后, 运用 ELISA 试剂盒方法对肺泡灌洗液中 IL-16, TNF- α 含量进行测定。

2.5 Real-time PCR 检测 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 表达 在给药 5 d 后, 每组随机选取部分鼠颈椎脱臼处死, 在无菌操作下取出部分肺脏研磨后, 加入 trizol 进行裂解, 采用 RNA 提取试剂盒分离提取肺中的总 mRNA。测定总 mRNA 浓度, 符合要求后, 采用 cDNA 合成试剂盒合成模板 cDNA 并进行逆转录 PCR(RT-PCR)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, RT-PCR 引物序列, TNFR1 (1.4 kbp): 上游 5'-CATTGCCTAGCGAGCGACC-3', 下游 5'-GGTAGGCTTCGGGAGACC-3'; Caspase-3 (834 bp): 上游 5'-TGGAACAAATG GACCTGTTGACC-3', 下游 5'-AGGACTCAAATTCTG TTGCCACC-3'; Caspase-7 (488 bp): 上游 5'-TCCACCCGGCACTACAATCT-3', 下游 5'-CCATCAC CGACCATCAGACCTGG-3'; β -actin (136 bp) 上游 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3', 下游 5'-TGGA AATTGTGAGGGAGATGC-3'。Real-time PCR 扩增仪检测 mRNA 表达水平。Real-time PCR 扩增体系为 10 μ L, 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 35 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法表示 mRNA 相对表达量。运用 7500 system software 系统分析结果, 得出各组 β -actin 和目的基因的 C_t 值, 相对定量采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 分析方法, 假定目的基因与 β -actin 的相对表达量为 1, 计算目的基因的表达量, 以此表示目的基因相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 蛋白表达 在给药 5 d 后, 每组随机选取部分幼鼠颈椎脱臼处死, 在无菌操作下取出肺脏组织于蛋白裂解缓冲液中匀浆, 分离提取各个幼鼠肺总蛋白。蛋白于 SDS-PAGE 胶上进行电泳分离并转膜。脱脂牛奶(5%)封闭, 于 4 $^{\circ}$ C 摇床中用稀释 1 000 倍的一抗孵育过夜, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗膜 3 次, 稀释 5 000 倍的二抗孵育 1.5 h, PBS 洗膜 3 次, ECL 化学发光试剂盒显像。利用化学发光荧光成像仪的图像分析功能对条带灰度进行分析, 计算目的蛋白条带与内参条带灰度值的比值作为半定量结果。

2.7 统计学分析 实验所得的所有数据均采用 SPSS 19.0 进行统计分析。实验结果符合正态分布的用表示, 采用单因素方差分析比较组间差异, 两两比较方差齐性者采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$

表示差异有统计学意义。

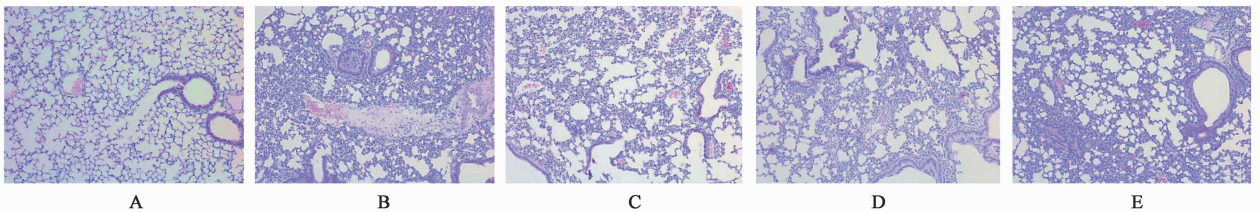
3 结果

3.1 幼鼠状况观察及存活率 模型组和各给药组幼鼠在感染后 6 h 出现进食减少、精神萎靡、活动减少、呼吸急促。第 2,3 天出现呼吸频速, 进食饮水进一步减少, 身体蜷缩, 抓取时反应迟钝, 尤以模型组幼鼠明显。部分模型组幼鼠出现呼吸困难, 颜面部、四肢紫绀, 开始出现死亡; 第 4,5 天开始恢复, 克林霉素组、柴葛芩连汤高剂量组幼鼠上述症状恢复较快, 且以柴葛芩连汤高剂量组幼鼠状态较佳, 死亡减少。实验 5 d 后, 假手术组无死亡幼鼠, 存活率为 100%; 模型组剩余 31 只, 存活率为 62%; 克林霉素组剩余 38 只, 存活率为 76%; 柴葛芩连汤高剂量组, 剩余 41 只, 存活率为 82%; 柴葛芩连汤低剂量组剩余 34 只, 存活率为 68%。各组存活的幼鼠数量均足够用于各项实验。

3.2 对 MRSA 肺炎幼鼠肺内菌落计数的影响 实验 5 d 后, 模型组肺内菌落计数为 $[(5.7 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mg}^{-1}]$, 与柴葛芩连汤高剂量组 $[(2.4 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mg}^{-1}]$, 柴葛芩连汤低剂量组

$[(3.9 \pm 0.8) \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mg}^{-1}]$, 克林霉素组 $[(1.8 \pm 0.5) \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mg}^{-1}]$ 肺内菌落计数均比假手术组 $[(1.0 \pm 0.2) \times 10^2 \text{ CFU} \cdot \text{mg}^{-1}]$ 高 ($P < 0.05$); 各给药组与模型组相比, 肺内菌落计数显著减少 ($P < 0.05$), 其中克林霉素组、柴葛芩连汤高剂量组 ($P < 0.01$)。

3.3 对 MRSA 肺炎幼鼠肺病理学结构的影响 HE 染色后观察到, 假手术组幼鼠肺组织结构完整, 肺泡边缘整齐, 肺泡腔内无异常; 肺炎模型组幼鼠肺内组织结构模糊, 无法识别肺泡, 大量细菌弥漫在整个肺内, 部分炎性细胞破裂坏死, 细支气管上皮细胞部分坏死, 其腔内有大量的炎性细胞, 同时血管周围水肿, 并有纤维组织渗出; 克林霉素组幼鼠肺内组织中, 少部分肺泡腔融合, 肺泡壁毛细血管呈现略有扩张以及少量炎性细胞浸润; 柴葛芩连汤高剂量组幼鼠肺内组织中, 部分肺泡腔融合, 肺泡壁毛细血管呈现略有扩张以及炎性细胞的浸润; 柴葛芩连汤低剂量组幼鼠肺内组织中, 部分肺泡形态无法识别, 仍有较多细菌散布在肺内, 炎症细胞可见有破裂现象, 有组织渗出。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 克林霉素组; D. 柴葛芩连汤高剂量组; E. 柴葛芩连汤低剂量组

图 1 柴葛芩连汤对 MRSA 肺炎幼鼠肺病理学结构的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Chai-Ge-Qin-Lian-Tang on pathological structure of lung in MRSA pneumonia young mice (HE, $\times 400$)

3.4 对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 IL-16, TNF- α 的影响

给药 5 d 后, 与假手术组比较, 模型组 IL-16, TNF- α 显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 IL-16, TNF- α 表达水平明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 柴葛芩连汤高剂量比低剂量作用更强。见表 1。

3.5 对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 表达的影响

与假手术组比较, 模型组幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 的表达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 柴葛芩连汤高剂量比低剂量作用更强。见表 2。

3.6 对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型

表 1 柴葛芩连汤对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 IL-16, TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Chai-Ge-Qin-Lian-Tang on IL-16 and TNF- α in lung of MRSA pneumonia young mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-16	TNF- α
假手术	-	43.3 \pm 7.2	52.1 \pm 8.9
模型	-	676.2 \pm 30.2 ¹⁾	983.2 \pm 26.9 ¹⁾
克林霉素	120	214.2 \pm 39.0 ³⁾	280.8 \pm 56.6 ³⁾
柴葛芩连汤	200	333.8 \pm 27.2 ³⁾	402.8 \pm 21.3 ³⁾
	100	435.4 \pm 41.6 ²⁾	551.2 \pm 41.4 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

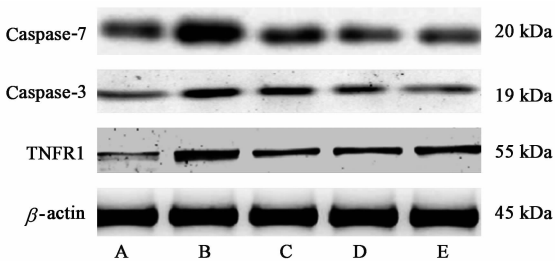
组幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 的蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 的蛋白表

表 2 柴葛芩连汤对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Chaige Qinlian Tang on TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 mRNA expression in lung of MRSA pneumonia young mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNFR1	Caspase-3	Caspase-7
假手术	-	0.113 ± 0.017	0.387 ± 0.019	0.263 ± 0.051
模型	-	0.776 ± 0.040 ¹⁾	1.011 ± 0.034 ¹⁾	1.124 ± 0.044 ¹⁾
克林霉素	120	0.293 ± 0.060 ³⁾	0.401 ± 0.079 ³⁾	0.307 ± 0.058 ³⁾
柴葛芩连汤	200	0.323 ± 0.037 ³⁾	0.511 ± 0.039 ³⁾	0.419 ± 0.086 ³⁾
	100	0.514 ± 0.037 ²⁾	0.803 ± 0.052 ²⁾	0.721 ± 0.074 ²⁾

达水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 柴葛芩连汤高剂量比低剂量作用更佳。见图 2, 表 3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 柴葛芩连汤低剂量组; D. 柴葛芩连汤高剂量组; E. 克林霉素组

图 2 各组幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 protein expression bands in lung of young mice

表 3 柴葛芩连汤对 MRSA 肺炎幼鼠肺中 TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Chaige Qinlian Tang on TNFR1, Caspase-3, Caspase-7 protein expression in lung of MRSA pneumonia young mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNFR1 /β-actin	Caspase-3 /β-actin	Caspase-7 /β-actin
假手术	-	0.09 ± 0.026	0.13 ± 0.047	0.18 ± 0.030
模型	-	0.79 ± 0.024 ¹⁾	0.63 ± 0.031 ¹⁾	1.22 ± 0.041 ¹⁾
克林霉素	120	0.28 ± 0.014 ³⁾	0.18 ± 0.040 ³⁾	0.37 ± 0.050 ³⁾
柴葛芩连汤	200	0.34 ± 0.025 ³⁾	0.30 ± 0.062 ³⁾	0.50 ± 0.044 ³⁾
	100	0.43 ± 0.029 ²⁾	0.41 ± 0.067 ²⁾	0.89 ± 0.041 ²⁾

4 讨论

金黄色葡萄球菌是常见的革兰氏阳性球菌,其致病力强,并且可产生多种毒素,是目前临床上感染和社区获得性感染常见的致病菌之一。自从在 1951 年发现了青霉素耐药的金黄色葡萄球菌开始,

耐药菌株普遍出现,尤其是多重耐药的菌株。随着耐甲氧西林金葡菌感染(MRSA)的逐年上涨,重症监护病房中 MRSA 的感染率高达 76%^[1,16],并且容易造成爆发成流行性感染并扩散。研究显示,金葡菌的定植与年龄相关,5 岁以下的儿童、尤其是在 2~6 月婴儿更容易感染 MRSA^[3,16]。而由于婴幼儿的免疫功能尚不成熟,常见呼吸道黏液腺分泌不足、纤毛运动能力较差等,导致细菌在呼吸系统局部不能及时地被清除。幼儿肺炎的致病病原体常通过呼吸道入侵机体,少部分经血行入肺,有研究者推测,儿童金黄色葡萄球菌肺炎大部分来源于鼻前庭定植菌株。目前,临床常采用抗生素进行治疗。克林霉素能够抑制 MRSA 毒素蛋白的合成,对改善 MRSA 肺炎的预后有重要的作用^[17-18],因此设为阳性药物作为对照。然而,由于患儿肠道菌群结构不完善,其肠黏膜免疫功能较弱,抗生素治疗容易发生腹泻。中医学认为,肺炎属“肺炎喘嗽”的范畴。因此,在治疗肺炎湿热闭肺证患儿过程中,须从清热祛湿、宣肺开闭方面入手^[5,14]。

柴葛芩连汤出自《症因脉治》,方中北柴胡、葛根解肌退热、升阳止利;黄芩片、黄连片清热燥湿,泻火解毒,柴胡伍黄芩和解少阳,葛根伍黄连清泻阳明,合则合解清利、升阳止利,使内陷阳明之邪透出少阳而解^[19]。临床采用此法,往往能取得良好的效果。本文就柴葛芩连汤的作用机制进行探讨,以期为临床应用提供科学数据。结果发现,柴葛芩连汤对于幼鼠金黄色葡萄球菌肺炎模型具有较好的金黄色葡萄球菌清除作用,能较好的改善肺炎模型幼鼠肺的病理学改变。而其机制可能与其调控 IL-16 的自分泌通路有关。国外学者的研究显示金黄色葡萄球菌引起的严重肺炎与其激活的复杂的免疫系统信号通路失调有关^[20-21]。人体呼吸系统受到金黄色葡萄球菌的侵袭后,金黄色葡萄球菌激活 TNFR1 通路,使得人气道上皮细胞、血管内皮细胞, THP-1 和 Jurkat T 细胞会分泌大量的 IL-16, TNF-α, 引发肺炎, IL-16 参与了自分泌信号通路,中和 IL-16 可以增强对金黄色葡萄球菌的清除,减轻肺的病理学改变^[22-25]。另一方面, Caspase-3, Caspase-7 通路的激活,也能导致 THP-1 细胞分泌 IL-16, TNF-α, 从而加剧炎症^[20,26]。模型组各指标均有显著改变,可见造模成功。柴葛芩连汤的干预能降低 TNFR1 和 Caspase-3, Caspase-7 的表达,可能是其中和 IL-16, 增强肺炎金黄色葡萄球菌的清除作用,减轻金黄色葡萄球菌肺炎模型幼鼠肺部病理学的改变,从而对

肺炎幼鼠起到治疗的作用,且有较明显的量效关系。虽然柴葛芩连汤组在炎症因子的水平及凋亡蛋白表达的控制效果未及克林霉素效果好,但是柴葛芩连汤组高剂量组幼鼠在呼吸状态及活动状态方面恢复比克林霉素中更好,且存活率也较高,可能与该复方的其他作用机制有关,有待进一步探讨。在本研究发现,柴葛芩连汤可显著改善金黄色葡萄球菌引起的幼鼠肺部炎症浸润,机制可能是通过下调 IL-16, TNF- α , 从而降低 TNFR1 和 Caspase-3, Caspase-7 的表达。因此本研究发现柴葛芩连汤可改善金黄色葡萄球菌引起的肺炎,为临床应用提供相应的参考。

[参考文献]

[1] Self W H, Wunderink R G, Williams D J, et al. *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia: prevalence, clinical characteristics, and outcomes [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63(3): 300-309.

[2] Parker D, Prince A. Immunopathogenesis of *Staphylococcus aureus* pulmonary infection [J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34(2): 281-297.

[3] Dela Calle C, Morata L, Cobos-Trigueros N, et al. *Staphylococcus aureus* bacteremic pneumonia [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(3): 497-502.

[4] Peyrani P, Ramirez J. What is the best therapeutic approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia? [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2015, 28(2): 164-170.

[5] 张少言,张晔敏,吴定中,等.清金颗粒对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染肺炎模型小鼠的影响[J].*中国中医药信息杂志*, 2018, 25(2): 55-58.

[6] 李旭,邹今晷.中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抗菌研究进展[J].*现代中西医结合杂志*, 2018, 27(8): 902-904, 912.

[7] 尹长江,路国兵,赵长祺,等.常见抗菌中草药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的抑菌作用[J].*时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1380-1381.

[8] 王艺竹,王宏涛,韩雪,等.连花清瘟胶囊水提物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌细菌生物膜的影响[J].*中华医院感染学杂志*, 2015, 25(4): 727-729, 790.

[9] 杨明炜,陆付耳,徐丽君,等.20种清热解暑中药对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抑菌的初步观察[J].*中国药师*, 2006, 9(2): 141-142.

[10] 宓伟,何深一.抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的中药筛选[J].*中国生化药物杂志*, 2011, 32(1): 44-46.

[11] 《中医大辞典》编辑委员会. *中医大辞典: 试用本 方剂分册* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 253.

[12] 李雪.柴葛芩连汤联合西药治疗小儿支气管肺炎湿热闭肺证疗效观察[J].*实用中医药杂志*, 2017, 33

(4): 401-403.

[13] 江隽.柴葛芩连汤治疗小儿支气管肺炎湿热闭肺证临床疗效分析[J].*深圳中西医结合杂志*, 2017, 27(3): 45-46.

[14] 韩爱敏.柴葛芩连汤联合西药治疗小儿支气管肺炎湿热闭肺证疗效及中医症状积分观察[J].*当代临床医刊*, 2019, 32(2): 185-186.

[15] 余林中,伍杰勇,罗佳波,等.葛根芩连汤拆方对肺炎链球菌抑菌作用比较研究[J].*中草药*, 2003, 34(11): 1011-1013.

[16] Danielle A, Dane P, Paul J P, et al. Secretion of IL-16 through TNFR1 and calpain-caspase signaling contributes to MRSA pneumonia [J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(6): 1366-1374.

[17] Planet P J, Parker D, Cohen T S, et al. Lambda interferon restructures the nasal microbiome and increases susceptibility to *Staphylococcus aureus* superinfection [J]. *mBio*, 2016, 7(1): e01939-15.

[18] Stevens D L, MA Y, Salmi D B, et al. Impact of antibiotics on expression of virulence associated exotoxin genes in methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Infect Dis*, 2007, 195: 202-211.

[19] Dumitrescu O, Boisset S, Badiou C, et al. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing panton-valentine leukocidin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 1515-1519.

[20] Parker D, Ryan C L, Alonzo F, et al. CD4⁺ T cells promote the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(5): 835-845.

[21] Smith S, WU P W, Seo J J, et al. IL-16/miR-125a axis controls neutrophil recruitment in pristane-induced lung inflammation [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(15): 120798.

[22] Gomez M I. *Staphylococcus aureus* protein A: activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 20190-20196.

[23] Cruikshank W W, Kornfeld H, Center D M. Interleukin-16 [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67: 757-766.

[24] 边红恩,陈团营,单海军.加味五虎汤联合阿奇霉素治疗痰热闭肺型小儿支原体肺炎疗效及对 T 淋巴细胞亚群的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 164-169.

[25] 姚荣妹,毛鑫,曲天歌,等.喘可治注射液对甲型 H1N1 流感病毒 FM1 株致小鼠肺炎的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(12): 43-49.

[26] Meagher C, Beilke J, Arreaza G, et al. Neutralization of interleukin-16 protects non obese diabetic mice from autoimmune type 1 diabetes by a CCL4-dependent mechanism [J]. *Diabetes*, 2010, 59: 2862-2871.

[责任编辑 周冰冰]