

扶正透邪方对耐药铜绿假单胞菌肺部感染大鼠免疫稳态的影响及机制

张迪¹, 晏军^{2*}, 钱莹¹, 姚兴伟¹, 付跃峰¹, 郭楠¹, 李宝萍¹, 杨琦¹, 刘清泉³, 孔令博^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 北京中医药大学第四临床医学院, 山东枣庄 277100; 3. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京 100010)

[摘要] 目的:探讨扶正透邪方及其不同功效在不同时点对耐药铜绿假单胞菌肺部感染大鼠免疫稳态的影响及其机制。方法:将168只大鼠随机分为空白组($n=8$),模型组($n=40$),单纯透邪组($n=40$),早期扶正组($n=40$)和延迟扶正组($n=40$),空白组予蒸馏水灌胃;模型组在感染后予蒸馏水灌胃;单纯透邪组在感染后予清热透邪药物免煎颗粒($3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃;早期扶正组在感染后予扶正透邪全方免煎颗粒($10.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃;延迟扶正组在清热透邪药物免煎颗粒灌胃的基础上于感染后第3天加扶正药物免煎颗粒[($3.5+10.75$) $\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$]灌胃;3个治疗组灌胃每日2次,每次2 mL。除空白组外将每个组根据3 h,1 d,3 d,5 d,7 d时间点分为5个小组($n=8$)。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),高迁移率族蛋白B1(HMGB1),白细胞介素-10(IL-10)和肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白8样分子-2(TIPE2)的水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HMGB1蛋白表达水平。结果:3 h时,与空白组和模型组比较,单纯透邪组、早期扶正组、延迟扶正组TNF- α 含量均明显升高($P<0.05$)。3 d时,与模型组比较,早期扶正组和延迟扶正组TNF- α 含量明显降低($P<0.05$);与透邪组比较,早期扶正组和延迟扶正组TNF- α 含量均明显降低($P<0.05$)。1 d时,与模型组比较,单纯透邪组、延迟扶正组HMGB1含量均明显升高($P<0.05$)。5 d时,与模型组比较,延迟扶正组HMGB1含量明显降低($P<0.05$)。7 d时,与空白组比较,模型组HMGB1蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,早期扶正组HMGB1蛋白表达明显降低($P<0.05$)。3 d时,与模型组比较,早期扶正组、延迟扶正组IL-10含量均明显升高($P<0.05$)。5 d时,与单纯透邪组比较,早期扶正组IL-10含量明显升高($P<0.05$);7 d时,与单纯透邪组比较,早期扶正组、延迟扶正组IL-10含量均明显降低($P<0.05$)。5 d时,与模型组比较,早期扶正组TIPE2含量明显降低($P<0.05$)。7 d时,与模型组比较,单纯透邪组、延迟扶正组TIPE2含量均明显降低($P<0.05$)。结论:扶正透邪全方或加用扶正药物在早期可促进炎症反应消除病原菌,晚期抑制炎症反应,避免炎症级联效应和肺组织损伤,说明扶正药物在感染后对维持机体免疫稳态具有重要作用。

[关键词] 耐药铜绿假单胞菌; 肺部感染模型大鼠; 免疫稳态; 扶正透邪方

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0071-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212491

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211028.0838.001.html>

[网络出版日期] 2021-10-28 11:07

Effect and Mechanism of Fuzheng Touxie Prescription on Immune Homeostasis of Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection Rats

ZHANG Di¹, YAN Jun^{2*}, QIAN Ying¹, YAO Xing-wei¹, FU Yue-feng¹, GUO Nan¹, LI Bao-ping¹, YANG Qi¹, LIU Qing-quan³, KONG Ling-bo^{1*}

(1. Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine Fourth Clinical Medical College, Zaozhuang 277100, China;

3. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

[收稿日期] 20210525(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703900)

[第一作者] 张迪,博士,从事中医药防治呼吸系统疾病研究,E-mail:342510558@qq.com

[通信作者] *孔令博,博士,副主任医师,从事中医药防治重症感染性疾病、急性脑血管病研究,Tel:84013151,E-mail:klb1984@163.com;

*晏军,博士,主任医师,从事中医药防治呼吸系统疾病研究,E-mail:dzmyyj@126.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Fuzheng Touxie prescription (FZTX) on the immune homeostasis of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in rats at different time points. **Method:** A total of 168 rats were divided into a blank group ($n=8$), a model group ($n=40$), a Touxie (TX) group ($n=40$), an early Fuzheng (FZ) group ($n=40$), and a delayed FZ group ($n=40$). The blank group was given distilled water by gavage, the model group was given distilled water by gavage after infection, the TX group was given clear heat and penetrate evil drug free decoction granules ($3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) by gavage after infection, the early FZ group was given Fuzheng Touxie whole formula free decoction granules ($10.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) by gavage after infection, the delayed FZ group was given clear heat and penetrate evil drug free decoction granules by gavage after infection, on the third day plus Fuzheng drug free decoction granules [$(3.5+10.75) \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$] by gavage, the three treatment groups were gavaged twice a day, 2 mL each time. Each drug treatment group was divided into five groups according to five time points (3 h, 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d), with eight rats in each group. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), high mobility group protein 1 (HMGB1), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor - α -induced protein-8-like2 (TIPE2) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and HMGB1 protein expression level by Western blot. **Result:** At 3 h, the TNF- α content in the drug treatment groups was higher than that in the blank group and the model group ($P<0.05$). At 3 d, the TNF- α content in the early FZ group and the delayed FZ group was lower than that in the model group ($P<0.05$) and the TX group ($P<0.05$). At 1 d, the HMGB1 content in the TX group and the delayed FZ group was higher than that in the model group ($P<0.05$). At 5 d, the HMGB1 content was lower in the delayed FZ group than in the model group ($P<0.05$). At 7 d, HMGB1 protein expression in the model group was higher than that in the blank group ($P<0.05$) and the early FZ group ($P<0.05$). At 3 d, the IL-10 content was significantly higher in both the early FZ group and the delayed FZ group than that in the model group ($P<0.05$). At 5 d, the IL-10 content was higher in the early FZ group than that in the TX group ($P<0.05$). At 7 d, the IL-10 content in the early FZ group and the delayed FZ group was lower than that in the TX group ($P<0.05$). At 5 d, the TIPE2 content in the early FZ group was lower than that in the model group ($P<0.05$). At 7 d, the TIPE2 content in the TX group and the delayed FZ group was lower than that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion:** FZTX or modified prescription can promote the inflammatory response to eliminate pathogenic bacteria in the early stage and suppress the inflammatory response in the late stage to avoid the inflammatory cascade effect and lung tissue damage, indicating that Fuzheng drugs have an important role in maintaining the immune homeostasis of the body after infection.

[Keywords] drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; lung infection model rats; immune homeostasis; Fuzheng Touxie prescription

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* (PA) 是一种需氧的革兰阴性杆菌,具有易定植、多重耐药的特点,2005年至2014年中国细菌耐药监测网PA检测显示70.60%的菌株分离自呼吸道标本,当机体免疫力下降时,可引起肺炎和菌血症等感染性疾病,甚至导致患者死亡^[1-3]。脂多糖(LPS)是PA的主要成分之一,LPS通过与Toll样受体4(TLR4)结合,促进核转录因子- κ B(NF- κ B)的核转位和活化,进而导致肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的过度释放。TNF- α 还是机体急性炎症反应的重要递质,促进炎症的发生发展^[4]。高迁移率族蛋白B1(HMGB1)是典型的晚期炎症因子,主要在PA感染的后期促进炎症反

应^[5]。白细胞介素-10(IL-10)是一种重要的抗炎细胞因子,可抑制某些细胞释放促炎介质,包括TNF- α ^[6]。肿瘤坏死因子- α 诱导蛋白8样分子-2(TIPE2)是炎症反应的重要调节因子,可以抑制TLR和NF- κ B的表达,从而抑制炎症反应^[7]。炎症反应是机体对损伤性伤害的一种防御性反应,炎症早期适度的炎症反应对人体是有益的,但是进入晚期后持续的炎症反应则会造成机体自身调节能力的失调,从而导致炎症失控,发生级联瀑布效应,出现更为严重的自身损伤^[8],其中促炎因子与抗炎因子的不平衡是加重炎症免疫紊乱的重要因素^[9]。

“正虚邪侵,热毒内伏”是耐药菌感染患者特有

的病机和发病特点,治疗耐药菌感染以扶正透邪为主^[10-11]。课题组前期研究已证实与头孢他啶过度抑制免疫反应相比,扶正透邪方能适度下调PA感染大鼠淋巴细胞增殖,使免疫紊乱趋于平衡^[12]。同时,与抗生素相比,扶正透邪方能够在炎症反应早期增强促炎因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)释放,并随时间推移,迅速降低,维持正常炎症反应,避免过长过激炎症反应不利于损伤的修复^[13-14]。但对于耐药菌感染的研究多只证实了中药对某些炎症因子或某种通路是否具有干预作用,缺乏在不同时点的中药组方对具有不同调控作用(促炎、抗炎)炎症因子的系统性研究。

鉴于此,本实验使用扶正透邪法不同功效组分(透邪组分、扶正组分)作用于耐药PA肺部感染大鼠,观察了多个时点使用不同组分之后促炎/抗炎炎症因子的水平,为临床上抗耐药菌感染中药的精准使用提供了实验依据。

1 材料

1.1 菌株 耐药PA临床分离株,样本号20PXSP1925,经北京中医药大学东直门医院细菌室进行菌种鉴定与药敏检测。

1.2 动物 清洁级SD大鼠168只,雄性,体质量(200 \pm 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SYXK(京)2020-0013。动物实验经北京盈科瑞生物医药研究所伦理委员会批准(批准号IACUC-YKRSW-2021-D001)。

1.3 药物 扶正透邪方组成为黄芪60g,当归15g,金银花15g,青蒿10g,虎杖10g(批号分别为20039311, 20027671, 20003891, 20011611, 20000761),根据Meeh-Rubner计算实验动物的体表面积公式,200g体质量大鼠体表面积约等于60kg人体表面积的0.019倍。因此,每只大鼠清热透邪药物为金银花0.3g,青蒿0.2g,虎杖0.2g;扶正药物为黄芪1.15g,当归0.3g^[15]。以上各组用药均为中药全成分免煎颗粒,由北京康仁堂药业有限公司提供。

1.4 试剂 TNF- α , HMGB1, IL-10酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉云克隆公司,批号分别为SEA133Ra, SEA399Ra, SEA056Ra); TIPE2 ELISA试剂盒(南京SAB公司,批号EK6246); HMGB1抗体(英国Abcam公司,批号Ab79823); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京Affity公司,批号AF7021); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京MDL公司,批号MD912565)。

1.5 仪器 ELx808型Microplate reader酶标仪(美国Biotek公司); Mini-PROTEAN[®] 1658001型电泳槽, Mini Trans-Blot[®] 1703935型转印槽, PowerPac[™] 1645070型通用电泳仪电源, ChemiDoc MP化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司); GelDoc-It310型凝胶成像系统(美国UVP公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 大鼠予腹腔注射10%水合氯醛溶液, 4 g \cdot kg⁻¹, 待大鼠完全麻醉后,用皮筋将其固定于木板(60 $^\circ$ 斜坡)上,用镊子轻轻拉出大鼠舌头。待大鼠舌头拉出后,将透射灯光对准大鼠颈部,打开光源,用棉签轻轻将咽喉分泌物擦拭干净,并调整大鼠倾斜角度直至通过口腔可清晰看到声门裂为宜。将微量进液器抽吸菌液50 μ L,缓慢将微量进液器针头送入声门裂,向气管内缓慢滴注菌液。滴注菌液后保持大鼠直立,予以左右旋转,使菌液均匀分布于大鼠左右两肺^[16]。空白组按上述方法在大鼠气管内注入等量的无菌生理盐水。感染后处死大鼠,取肺组织后研磨器匀浆,接种于琼脂培养基,恒温孵育过夜,培养基见到PA菌落证明造模成功。

2.2 分组、干预及取材 将大鼠随机分为空白组、模型组、单纯透邪组、早期扶正组、延迟扶正组,共5组。空白组8只,其余4个组按时间点又分为感染后3 h, 1 d, 3 d, 5 d和7 d共5个亚组,每个亚组各8只。空白组予蒸馏水灌胃;模型组在感染后予蒸馏水灌胃;单纯透邪组在感染后予清热透邪药物(金银花、青蒿、虎杖)免煎颗粒灌胃(3.5 g \cdot kg⁻¹);早期扶正组在感染后予扶正透邪全方免煎颗粒灌胃(10.75 g \cdot kg⁻¹);延迟扶正组在清热透邪药物免煎颗粒灌胃的基础上于感染后第3天加扶正药物(黄芪、金银花)免煎颗粒灌胃[(3.5+10.75) g \cdot kg⁻¹];3个治疗组灌胃每日2次,每次2 mL。各组按分组所示相应时间点,予腹腔注射10%水合氯醛溶液, 4 g \cdot kg⁻¹,麻醉后,常规消毒大鼠腹部皮肤,打开腹腔,分离腹主动脉,留取血标本和肺组织。

2.3 ELISA检测 TNF- α , HMGB1, IL-10, TIPE2水平 按标准品稀释方法加好标准品(100 μ L/孔),空白孔加试剂稀释液100 μ L;在每个样本孔中加入试剂稀释液50 μ L和样本50 μ L;随后在样本和标准孔中加入生物素化抗体工作液50 μ L,用封板胶纸封住反应孔。室温孵育120 min。洗板5次。加入酶结合物工作液(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔。室温孵育60 min。洗板5次。加入显色底物,室温

避光孵育 10 min。加入终止液 100 μL/孔,混匀后立即测量 450 nm 波长处的吸光度 *A*。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HMGB1 蛋白的表达 由于单纯透邪组药方组成不全,延迟扶正组后期药物剂量改变,故仅探索性对应用全方且药量不变的早期扶正组做 Western blot 检测。将大鼠肺组织研碎,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,使用 10% SDS-PAGE 凝胶分离目的蛋白,PVDF 转膜,封闭 1 h,加入稀释好的一抗 HMGB1 (1:1 000),4 °C 孵育过夜。洗膜后加入二抗 (1:300),37 °C 孵育 1 h。洗膜后使用 ECL 法显色。

2.5 统计学方法 采用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布

且方差齐者采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法 (LSD)-*t* 法,对不符合正态分布的计量资料采用非参数检验 Kruskal-Wallis H 法进行分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠外周血中 TNF-α 含量的影响 3 h 时,与空白组和模型组比较,单纯透邪组、早期扶正组、延迟扶正组 TNF-α 含量均明显升高 ($P < 0.05$);与单纯透邪组比较,早期扶正组 TNF-α 含量明显升高 ($P < 0.05$)。3 d 时,早期扶正组和延迟扶正组 TNF-α 含量均明显低于模型组 ($P < 0.05$);与单纯透邪组比较,早期扶正组和延迟扶正组 TNF-α 含量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 扶正透邪方对大鼠外周血中 TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 h	1 d	3 d	5 d	7 d
空白		54.68±13.08	54.68±13.08	54.68±13.08	54.68±13.08	54.68±13.08
模型		57.03±9.86	70.26±30.51	115.84±69.24	40.29±2.04	38.24±1.51
单纯透邪	3.5	85.35±12.53 ^{1,2)}	48.83±6.16 ²⁾	166.01±53.65 ¹⁾	41.95±3.42 ¹⁾	49.44±12.13 ²⁾
早期扶正	10.75	159.80±65.98 ^{1,2,3)}	51.19±6.61	67.60±37.44 ^{2,3)}	43.02±13.52 ¹⁾	46.68±14.12 ¹⁾
延迟扶正	3.5+10.75	106.67±41.73 ^{1,2)}	47.07±1.45 ²⁾	44.33±4.68 ^{1,2,3)}	39.06±1.85 ¹⁾	39.11±1.64 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与单纯透邪组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 对大鼠外周血中 HMGB1 含量的影响 研究显示,1 d 时,与模型组比较,单纯透邪组、延迟扶正组 HMGB1 含量均明显升高,差异具有统计学

意义 ($P < 0.05$)。5 d 时,与模型组比较,延迟扶正组 HMGB1 含量明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 扶正透邪方对大鼠外周血中 HMGB1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 h	1 d	3 d	5 d	7 d
空白		108.14±21.59	108.14±21.59	108.14±21.59	108.14±21.59	108.14±21.59
模型		126.99±14.81	84.01±8.93	120.54±13.98	127.80±14.50	100.24±7.69
单纯透邪	3.5	113.91±19.29	107.62±19.45 ²⁾	107.03±19.57	131.61±29.37	98.05±17.34
早期扶正	10.75	124.49±19.46	89.82±6.93 ¹⁾	191.09±37.77 ^{1,2,3)}	122.32±23.45	91.31±9.16
延迟扶正	3.5+10.75	132.75±8.28 ¹⁾	104.36±11.87 ^{2,4)}	135.69±20.65 ^{1,3,4)}	114.35±15.14 ²⁾	100.95±13.33

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与单纯透邪组比较³⁾ $P < 0.05$;与早期扶正组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

3.3 对大鼠外周血中 IL-10 含量的影响 3 d 时,与模型组比较,早期扶正组、延迟扶正组 IL-10 含量均明显升高 ($P < 0.05$)。5 d 时,与单纯透邪组比较,早期扶正组 IL-10 含量明显升高 ($P < 0.05$)。7 d 时,与单纯透邪组比较,早期扶正组、延迟扶正组 IL-10 含量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对大鼠外周血中 TIPE2 含量的影响 结果显示,5 d 时,与模型组比较,早期扶正组 TIPE2 含量明显降低 ($P < 0.05$)。7 d 时,与模型组比较,单纯

透邪组、延迟扶正组 TIPE2 含量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

3.5 对大鼠肺组织 HMGB1 蛋白表达的影响 取 7 d 大鼠肺组织检测 HMGB1 蛋白表达,模型组肺组织中 HMGB1 蛋白表达量明显高于空白组 ($P < 0.05$),早期扶正组 HMGB1 蛋白表达量明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 5,图 1。

4 讨论

TNF-α 是炎症早期最主要的炎性因子,可激活

表 3 扶正透邪方对大鼠外周血中 IL-10 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 h	1 d	3 d	5 d	7 d
空白		85.45±3.80	85.45±3.80	85.45±3.80	85.45±3.80	85.45±3.80
模型		109.41±18.54	166.75±73.44	88.90±4.99	112.75±16.03	135.12±57.70
单纯透邪	3.5	146.19±35.97 ¹⁾	189.27±69.23 ¹⁾	104.70±16.89 ¹⁾	104.72±12.60 ¹⁾	171.44±52.57 ¹⁾
早期扶正	10.75	146.21±66.95 ¹⁾	192.76±51.34 ¹⁾	105.53±10.60 ^{1,2)}	115.00±14.46 ^{1,3)}	110.59±23.59 ^{1,3)}
延迟扶正	3.5+10.75	132.56±39.37 ¹⁾	169.19±76.12 ¹⁾	117.01±32.45 ^{1,2)}	105.89±17.68 ¹⁾	102.90±9.64 ^{1,3)}

表 4 扶正透邪方对大鼠外周血中 TIPE2 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

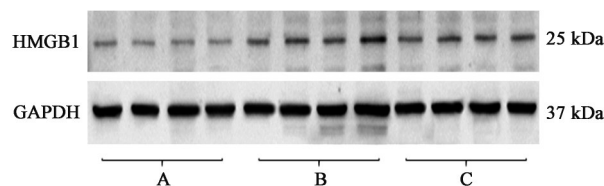
组别	剂量/g·kg ⁻¹	3 h	1 d	3 d	5 d	7 d
空白		279.29±66.59	279.29±66.59	279.29±66.59	279.29±66.59	279.29±66.59
模型		188.93±20.60	272.72±44.49	208.67±19.63	196.37±21.66	218.29±35.17
单纯透邪	3.5	241.59±40.89 ²⁾	272.92±36.20	239.21±65.52	209.73±22.18 ¹⁾	179.74±9.46 ^{1,2)}
早期扶正	10.75	246.29±56.76 ²⁾	315.22±83.36	216.05±12.63 ¹⁾	246.43±45.65 ²⁾	224.95±52.23
延迟扶正	3.5+10.75	231.66±31.21 ²⁾	228.46±39.43	234.22±46.16	229.69±43.22	185.79±22.86 ^{1,2,4)}

表 5 扶正透邪方对大鼠肺组织 HMGB1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of Fuzheng Touxie prescription on HMGB1 protein expression in rat lung tissue ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HMGB1/GAPDH
空白		0.29±0.04
模型		0.46±0.09 ¹⁾
早期扶正	10.75	0.33±0.02 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05。



A. 空白组; B. 模型组; C. 早期扶正组

图 1 大鼠肺组织 HMGB1 蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of HMGB1 protein expression in rat lung tissue

单核巨噬细胞及多形核中性粒细胞自身释放 TNF- α , IL-1 等炎性递质, 形成正反馈进一步释放促炎因子^[17-18]。在感染 3 h 时, 中药组(单纯透邪组+早期扶正组+延迟扶正组, 下同) TNF- α 水平整体高于模型组, 说明中药组在感染之初可提高机体炎症水平, 促进炎症细胞对病原体的消除。感染 3 d 时, 早期扶正组 TNF- α 水平低于模型组, 说明扶正透邪方主要在早期促进炎症反应, 之后开始抑制 TNF- α 的释放, 避免炎症“瀑布反应”效应和肺组织损伤的发生。感染 3 d 时, 延迟扶正组 TNF- α 水平较单纯透

邪组低, 说明在感染过程中加用扶正中药(黄芪、当归)可有效减少 TNF- α 释放, 恢复自身免疫平衡。

HMGB1 是一种高度保守的非组蛋白染色体蛋白, 可作为一种重要的晚期炎性介质介导多种反应^[19]。HMGB1 分泌到胞外后刺激单核/巨噬细胞分泌 IL-1, TNF- α 等炎性介质^[20]。脂多糖(LPS)是 PA 感染的主要毒力因子, HMGB1 可以和 LPS 结合, 作用于 TLR4 下游信号通路, 导致 NF- κ B 激活, 促进 TNF- α , IL-1 β 等炎症基因转录, 引起炎症反应^[21-22]。对 PA 感染大鼠使用 HMGB1 拮抗剂可明显减少 TNF- α , IL-1 β 等炎症因子的释放^[23]。因此, HMGB1 在耐药 PA 肺炎晚期起重要作用。感染 1 d 时, HMGB1 含量在各组均较低, 单纯透邪组和延迟扶正组 HMGB1 含量较模型组升高, 可能与早期帮助清除病原菌有关。感染 3 d 和 5 d 时, HMGB1 含量明显升高, 说明 HMGB1 主要在感染的晚期发挥作用。感染 5 d 时, 延迟扶正组 HMGB1 水平明显低于单纯透邪组, 并在感染 7 d 时降低 HMGB1 到正常水平。感染 7 d 时, 模型组 HMGB1 蛋白表达明显高于空白组, 而早期扶正组 HMGB1 蛋白表达明显低于模型组, 以上结果说明在感染的晚期加用扶正药物(黄芪、当归)或应用扶正透邪全方可有效减少 HMGB1 释放, 减轻组织损伤。

IL-10 为一种抗炎因子, 能抑制激活的单核细胞巨噬细胞产生其他的细胞因子如 TNF- α , γ 干扰素 (IFN- γ), IL-1 β 等^[24-25]。TIPE2 是维持免疫稳态的调控蛋白, TIPE2 可通过与半胱氨酸天冬氨酸蛋白

水解酶-8(Caspase-8)结合来降低激活蛋白-1(AP-1)和NF- κ B的水平,此外,TIPE2还可通过抑制TNF- α 维持免疫稳态^[26-28]。

在感染3 d时,早期扶正与延迟扶正组IL-10较模型组低,说明扶正透邪方或加用扶正中药可更早地抑制促炎反应,使机体进入免疫稳定状态,同时时间点的早期扶正组与延迟扶正组TNF- α 水平亦低于模型组。感染5 d时,早期扶正组IL-10高于单纯透邪组,早期扶正组TIPE2高于模型组,说明感染晚期扶正透邪方可以抑制过度炎症反应。感染7 d时,早期扶正和延迟扶正组IL-10水平低于单纯透邪组,单纯透邪组、延迟扶正组TIPE2水平低于模型组,且更趋近于空白组,说明扶正药物可帮助机体更快的恢复到正常的免疫平衡状态。

在整个感染过程中,模型组的IL-10和TIPE2呈现大致相同的变化趋势,表现为早期升高-中期下降-晚期升高的变化过程。模型组IL-10, TIPE2与TNF- α 的趋势呈现一定的互补变化,在早期,IL-10, TIPE2升而TNF- α , HMGB1降低,中期IL-10, TIPE2降低而TNF- α , HMGB1升高,晚期IL-10, TIPE2升高而TNF- α , HMGB1降低且趋于平缓。说明在感染后机体促炎与抗炎处于一个相互抗衡的状态,初期为清除病原体,促炎的TNF- α 处于高水平状态,晚期病原体消除后,抗炎的IL-10和TIPE2处于高水平状态, HMGB1分泌减少,抑制炎症反应的进一步扩大,使机体恢复正常免疫水平。

综上所述,扶正透邪方不同功效组分在感染3 h时均可升高TNF- α 水平,促进机体对病原体的清除。感染3 d时,扶正透邪全方或加用扶正药物(黄芪、当归)可降低促炎因子TNF- α 水平,同时升高抗炎因子IL-10水平,避免炎症的级联反应损伤肺组织。感染5 d时,扶正透邪方可升高IL-10和TIPE2,增强抗炎作用,同时加用扶正药物可相较于单纯透邪可降低HMGB1水平,减少晚期炎症因子释放。感染7 d时, HMGB1恢复至正常水平, IL-10和TIPE2也开始降低,说明扶正透邪方或加用扶正药物可帮助机体恢复更快的恢复至免疫平衡。中医认为决定疾病的发生、发展变化及其转归的是正邪斗争的消长盛衰,治疗的关键在于改善邪气内侵所导致的阴阳失衡状态。本实验的扶正透邪方中黄芪、当归补气养血以扶正,祛除细菌产生耐药的根本,金银花、青蒿、虎杖清热透达,以清除细菌,给邪以出路,全方扶正与透邪相辅相成,共同达到恢复机体阴阳平衡稳态的目的。本实验结果也证实了

这一点,初步阐释了扶正透邪方及其不同组分尤其是方中扶正组分调节耐药PA肺部感染大鼠免疫稳态的作用机制,值得进一步深入研究耐药菌感染后不同时期在清热透邪药物的基础上配伍不同剂量扶正药物调控炎症反应作用的量效关系,为临床更精准地掌握耐药菌感染不同时期扶正的最佳力度提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张祎博,孙景勇,倪语星,等. 2005—2014年CHINET铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(2): 141-145.
- [2] FENG W, SUN F, WANG Q, et al. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2017, 8: 142-147.
- [3] BASSETTI M, ECHOLS R, MATSUNAGA Y, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial [J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(2): 226-240.
- [4] HU N, WANG C, DAI X, et al. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248: 112361.
- [5] 丁军颖,丁雪霏,卢幼然,等. 芪归银对铜绿假单胞菌致肺炎大鼠免疫调节作用初探[J]. 河北中医药学报, 2019, 34(2): 1-5.
- [6] AGGARWAL R, JAIN A K, MITTAL P, et al. Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia [J]. J Clin Lab Anal, 2019, 33(4): e22834.
- [7] WU X, KONG Q, ZHAN L, et al. TIPE2 ameliorates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in acute lung injury [J]. Inflamm Res, 2019, 68(11): 981-992.
- [8] 冯娟,栗艳,孙阳,等. 大黄多糖抑制脂多糖引起的TLR-4/NF- κ B通路活化[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(31): 6035-6038.
- [9] 李文星,张毅,温勃阳,等. 连翘对内毒素作用下大鼠脾脏淋巴细胞Toll样受体4、核因子- κ B及白细胞介素-6、白细胞介素-10的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(2): 288-290.
- [10] 高洁,刘清泉,马群,等. 从伏邪理论看耐药菌感染

- [J]. 中医杂志, 2011, 52(6): 536-538.
- [11] 刘清泉, 孙宏源, 高洁, 等. 耐药菌感染中医病机探讨及临床中药疗效观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(17): 213-214.
- [12] 孔令博, 刘清泉, 王兰, 等. 芪归银方对多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠淋巴细胞增殖的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1585-1587.
- [13] KONG L B, MA Q, GAO J, et al. Effect of Qiguiyin Decoction on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in rats [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(12): 916-921.
- [14] 孔令博, 郭玉红, 付跃峰, 等. 芪归银方对多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠血清 IL-1 β 水平的影响[J]. 世界中医药, 2016, 11(10): 1966-1969.
- [15] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5): 52-53.
- [16] 王瑜, 张定林, 冯伟, 等. 小鼠铜绿假单胞菌气管插管滴注法肺部感染模型的建立及评价[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(10): 918-922.
- [17] ZHANG H, SUN L, ZHI L, et al. Astilbin alleviates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting the expression of macrophage inhibitory factor in rats [J]. Arch Pharm Res, 2017, 40(10): 1176-1185.
- [18] HAN Y, KANG C, KANG M, et al. Long non-coding RNA Mirt2 prevents TNF- α -triggered inflammation via the repression of microRNA-101 [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 76: 105878.
- [19] VIJAYAKUMAR E C, BHATT L K, PRABHAVALKAR K S. High mobility group box-1 (HMGB1): a potential target in therapeutics [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(14): 1474-1485.
- [20] XU X, PIAO H N, AOSAI F, et al. Arctigenin protects against depression by inhibiting microglial activation and neuroinflammation via HMGB1/TLR4/NF-kappaB and TNF-alpha/TNFR1/NF-kappaB pathways [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(22): 5224-5245.
- [21] RAO Z, ZHANG N, XU N, et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D inhibits LPS-induced high-mobility group box 1 (HMGB1) secretion via targeting the NF-E2-related factor 2-hemeoxygenase-1-HMGB1 Pathway in macrophages [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1308.
- [22] YANG H, WANG H, ANDERSSON U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. Front Immunol, 2020, 11: 484.
- [23] EKANAYAKA S A, MCCLELLAN S A, PENG X, et al. HMGB1 antagonist, box A, reduces TLR4, RAGE, and inflammatory cytokines in the cornea of *p. aeruginosa*-infected mice [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2018, 34(10): 659-669.
- [24] HERMANKOVA B, ZAJICOVA A, JAVORKOVA E, et al. Suppression of IL-10 production by activated B cells via a cell contact-dependent cyclooxygenase-2 pathway upregulated in IFN- γ -treated mesenchymal stem cells [J]. Immunobiology, 2016, 221(2): 129-136.
- [25] KULKARNI U, KARSTEN C M, KOHLER T, et al. IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(5): 1487-1497.
- [26] WANG Q, MA L, LIU T, et al. TIPE2 suppresses *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by inhibiting NF- κ B signaling and the infiltration of inflammatory cells [J]. J Infect Dis, 2019, 220(6): 1008-1018.
- [27] NITURE S, DONG X, ARTHUR E, et al. Oncogenic role of tumor necrosis factor α -induced protein 8 (TNFAIP8) [J]. Cells, 2019, 8(1): 9.
- [28] 王玉婷, 徐红日, 赵世同, 等. 扶正解毒化痰方对多重耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 外排泵表达影响的研究 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 859-863.

[责任编辑 王鑫]