

·方药研究·

清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌感染小鼠的保护作用及其机理

王云飞 阙华发 唐汉钧 周 昕 王永灵 彭 昕

(上海中医药大学附属龙华医院中医外科、药剂科,上海市徐汇区宛平南路725号,200032)

[摘要] **目的** 观察清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌感染小鼠的保护作用。**方法** 168只小鼠随机分为清热败毒合剂大、中、小剂量组,阿莫西林组、六神丸组、模型组、正常对照组共7组,除正常对照组以外,其余各组小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌造成菌血症模型,观察各组小鼠死亡率并观察清热败毒合剂的体外抗菌作用。80只小鼠随机分为清热败毒合剂大剂量组、阿莫西林组、六神丸组、模型组、正常对照组5组,采用流式细胞仪观察小鼠外周血 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞数量的变化。**结果** 清热败毒合剂大剂量组、六神丸组与阿莫西林组、正常对照组小鼠的死亡率明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌的细菌回收率小于70%。清热败毒合剂大剂量组 $CD3^+$ 表达明显高于模型组($P < 0.05$),而 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD8^+$ 水平与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。清热败毒合剂大剂量组 $CD3^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD8^+$ 的表达分别与阿莫西林组、六神丸组、正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而其 $CD4^+$ 表达低于阿莫西林组、六神丸组、正常对照组($P < 0.05$)。阿莫西林组、六神丸组、正常对照组 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 表达均明显高于模型组($P < 0.05$),各组 $CD8^+$ 水平与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 清热败毒合剂大剂量组对金黄色葡萄球菌感染小鼠有一定的保护作用,其作用机制可能与清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌的抗菌作用以及提高免疫功能有关。

[关键词] 清热败毒合剂;金黄色葡萄球菌;抗菌作用;免疫功能

Protection and Its Mechanism of Qingre Baidu Mixture on Mice Infected with Staphylococcus Aureus

WANG Yunfei, QUE Huafa, TANG Hanjun, et al.

(Longhua Hospital of Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032)

ABSTRACT **Objective** To observe the protection of Qingre Baidu (Clearing heat to detoxicate) Mixture on mice infected with Staphylococcus Aureus. **Methods** The 168 mice were randomized into Qingre Baidu Mixture large, medium and small dosage groups, Amoxicillin group, Liushen Pill group, Model group and Normal control group. Except the normal control group, other groups were injected intraperitoneally Staphylococcus Aureus to make bacteremia models in order to observe the mortality of mice and the antibacterial effect in vitro of the mixture. The flow cytometry was used to observe the quantitative changes of $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in peripheral blood in Qingre Baidu Mixture large dosage group, A ~ group, L ~ group, M ~ group and N ~ group of totally 80 mice. **Results** The mortality of Qingre Baidu Mixture large dosage group, Liushen Pill group A ~ group, and N ~ group was obviously lower than that of the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The recovery rate of Qingre Baidu Mixture on Staphylococcus Aureus was less than 70%. $CD3^+$ level of Qingre Baidu Mixture large-dosage group was obviously higher than that of the model control group ($P < 0.05$), and the $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD8^+$ levels had no significant differences compared with the model control group ($P > 0.05$). The $CD3^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、 $CD8^+$ expression of Qingre Baidu Mixture large-dosage group had no significant difference with Liushen Pill group, Amoxicillin group and normal control group ($P > 0.05$); The $CD4^+$ levels of Qingre Baidu Mixture large-dosage group were lower than Liushen Pill group, Amoxicillin group and normal control group ($P < 0.05$). The $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ levels of Liushen Pill group, Amoxicillin group and normal control group were obviously higher than those of the model control group ($P < 0.05$), and the $CD8^+$ levels of Liushen Pill group, Amoxicillin group and normal control group had no obvious differences with the model control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Qingre Baidu Mixture has a protection function on mice infected by Staphylococcus Aureus and its mechanism may be related with the antibacterial function and improving immunity of Qingre Baidu Mixture.

Key Words Qingre Baidu Mixture; Staphylococcus Aureus; Antibacterial function; Immunity

外科感染性疾病是外科的常见病、多发病,约占外科所有疾病的1/3~1/2^[1]。国内外一般予抗生素治疗,但长期应用可产生二重感染及细菌耐药等毒副反应。

上海中医药大学附属龙华医院长期应用院内制剂清热败毒合剂治疗感染性疾病具有显著疗效。为进一步探讨清热败毒合剂治疗感染性疾病的药理作用机制,我们开展了以下研究。

1 材料

1.1 实验动物及菌株

昆明种 SPF 级小鼠284只,雌雄各半,4周龄,体重18~22g,由上海中医药大学附属龙华医院实验动物中心提供[合格证号 SCXK(沪) 2003-0003]。标准金黄色葡萄球菌菌株,编号 ATCC 26071,批号26071,购自中国药品生物制品检定所。

1.2 药物及试剂

清热败毒合剂由生黄芪300g、皂角刺150g、金银花130g、赤芍180g等10味中药组成,按水煎提取工艺,减压浓缩制成常规煎液,合剂每毫升标示量相当于1.35g中药(本院制剂室按清热败毒合剂工艺要求制备,未加入任何抑菌剂),批号061109;阿莫西林片,批号60605009,张家口药业有限公司生产;六神丸,批号060601,上海雷允上药业有限公司生产;营养肉汤培养基(NB),批号060524,上海中科昆虫生物技术开发有限公司生产;营养琼脂培养基,批号060828,上海中科昆虫生物技术开发有限公司生产;红四氮唑,批号20050413,上海灵锦精细化工有限公司生产;鼠抗CD3-FITC(MCA500FA),AbD Serotec 生产;鼠抗CD4-PE/Cy5(100514),Biolegend 生产;鼠抗CD8-PE(100708),Biolegend 生产。

1.3 细菌溶液的制备

营养肉汤培养基:将本品18g加入蒸馏水1000ml煮沸,完全溶解;营养琼脂培养基:将本品33g加入蒸馏水1000ml煮沸,完全溶解;NaCl-蛋白胨缓冲液:将 KH_2PO_4 3.56g、 Na^2HPO_4 7.23g、NaCl 4.30g、蛋白胨1.0g加入1000ml蒸馏水煮沸,完全溶解。上述溶液均经115℃灭菌30min,备用。

体外抗菌实验中清热败毒合剂供试液:取清热败毒合剂10ml,加入pH7.0无菌NaCl-蛋白胨缓冲液至100ml。

细菌溶液:将金黄色葡萄球菌营养肉汤培养基置35℃恒温培养箱中培养24~48h,并用NaCl-蛋白胨缓冲液以10倍顺序依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 浓度;另通过培养皿细菌计数,选取含菌数为500~1000cfu/ml的菌液(10^{-4} 浓度)供体外抗菌实验应用。

1.4 主要实验仪器

生化恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂;流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

2 方法

2.1 建立金黄色葡萄球菌感染小鼠动物模型

依据《中药药理研究方法学》^[2]进行金黄色葡萄球

菌对小鼠最小致死量的测定。预试验发现金黄色葡萄球菌对小鼠的最小致死量浓度为金黄色葡萄球菌第一代原菌液,金黄色葡萄球菌原菌液浓度为 1.3×10^7 个/ml。腹腔注射0.4ml原菌液可致约80%小鼠死亡。向除正常对照组以外的小鼠腹腔注射金黄色葡萄球菌原菌液0.4ml造成菌血症模型。

2.2 动物分级与给药及清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌感染小鼠死亡率的影响

168只小鼠随机分为清热败毒合剂大、中、小剂量组、阿莫西林组、六神丸组、模型组、正常对照组共7组,每组24只动物,雌雄各半。依据人鼠等效剂量^[2]药物换算,将药物分别溶解于生理盐水0.5ml,灌胃。清热败毒合剂大、中、小剂量组含生药分别为67.50、33.75、16.88g/kg,药物浓度分别为2.70、1.35、0.68g/ml;阿莫西林组0.50g/kg,药物浓度为0.02g/ml;六神丸组0.01g/kg,药物浓度为 4×10^{-4} g/ml。模型组与正常对照组灌服0.5ml生理盐水。各组于造模前2日开始给药,连续用药7天,每日1次,观察各组小鼠的死亡数。

2.3 清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌的体外抗菌作用^[3]

取清热败毒合剂供试液1ml(药物浓度1.35g/ml, pH4.0~6.0的等渗溶液)与菌液0.1ml加入培养皿,并加入琼脂培养基15ml;另取上述菌液0.1ml直接加入培养皿,并加入琼脂培养基15ml;均将培养皿混合均匀,待凝固后置35℃恒温培养箱中培养48小时,点击菌落数。每组重复3次,观察记录结果,并计算细菌回收率^[3]。公式为:实验组细菌回收率=(实验组平均菌落数/菌液组平均菌落数)×100%。

2.4 确定金黄色葡萄球菌感染小鼠采血时间点

36只小鼠随机分为6组,每组6只,雌雄各半。依据参考文献[4],腹腔注射金黄色葡萄球菌原菌液(菌液浓度 1.3×10^7 个/ml)0.3ml,取注射后1h、2h、4h、6h、10h、24h为不同采血时间点,将6组小鼠分别按上述时间点摘眼球取血,进行CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺的检测,并绘制变化曲线,确定金黄色葡萄球菌感染小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺采血时间点。

2.5 清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌感染小鼠免疫指标的影响

80只小鼠随机分为清热败毒合剂大剂量组、阿莫西林组、六神丸组、模型组、正常对照组共5组,每组16只动物,雌雄各半(因清热败毒合剂大剂量组对金黄色葡萄球菌感染小鼠有保护作用,故该实验采用清热败

毒合剂大剂量)。各组小鼠的药物剂量分别为:清热败毒合剂大剂量组含生药67.5g/kg,余同2.2实验给药剂量。依据参考文献[5],于造模前连续灌胃7日,每日1次,于第8日腹腔注射菌液0.3ml,于确定的采血时间点将小鼠摘眼球取血。

CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺的检测:取100 μl抗凝全血加入溶血素5ml,溶血10min后1500r/min离心5min弃上清液,加入PBS 5ml清洗细胞,再予1500r/min离心5min弃上清液,得到白细胞悬浮液,加入PBS 0.5ml。将上述悬浮液分为3管,分别加入荧光标记单抗CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 20 μl, 18~25℃室温避光孵育15~20min,上机前加入150 μl PBS,依次置于流式细胞仪中。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间比较采用重复测量设计的方差分析,两组间比较采用Tukey检验;计数资料以率表示,采用卡方检验。

3 结果

3.1 各组小鼠死亡情况比较

表1 各组金黄色葡萄球菌感染小鼠死亡情况比较(%)			
组别	鼠数	存活数	死亡数
清热败毒合剂大剂量组	24	15(62.50)	9(37.50)*△
清热败毒合剂中剂量组	24	13(54.17)	11(45.83)△
清热败毒合剂小剂量组	24	7(29.17)	17(70.83)△▲
六神丸对照组	24	16(66.67)	8(33.33)*△
阿莫西林对照组	24	20(83.33)	4(16.67)**
模型组	24	8(33.33)	16(66.67)△
正常对照组	24	24(100)	0(0)**

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与正常对照组比较,△ $P<0.01$;与阿莫西林组比较,▲ $P<0.05$

表2 金黄色葡萄球菌感染小鼠不同时间点CD3 ⁺ 、CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ 、CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 表达比较($\bar{x} \pm s$)					
时间点	鼠数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
1h	6	69.60±6.66*	53.28±8.88	12.53±2.33	4.38±1.14*
2h	6	74.78±3.94*	53.40±2.37	11.90±4.66	5.08±2.22
4h	6	82.43±5.80*	54.20±8.53	15.55±9.09	4.71±2.87
6h	6	89.15±3.97	69.13±3.32	11.75±2.22	5.88±1.14
10h	6	81.05±9.03*	65.45±6.31	9.13±3.00	5.68±0.87
24h	6	81.00±10.20*	63.38±10.76	12.55±2.23	5.18±1.32

注:与6小时比较,* $P<0.05$

表3 各组小鼠CD3 ⁺ 、CD4 ⁺ 、CD8 ⁺ 、CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)					
组别	鼠数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
清热败毒合剂大剂量组	16	64.53±17.47*	56.33±7.12	15.39±3.58	3.92±1.34
六神丸组	16	67.14±9.44*	63.29±4.84*△	15.23±4.84	4.74±2.03*
阿莫西林组	16	73.03±9.08*	74.88±6.20*△▲	17.25±4.98	4.69±1.47*
模型组	16	46.29±7.92	53.44±12.03	18.44±5.88	3.19±1.35
正常对照组	16	74.21±3.20*	76.18±7.20*△▲	17.01±4.12	4.53±1.23*

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与清热败毒合剂组比较,△ $P<0.05$;与六神丸组比较,▲ $P<0.05$

表1示,清热败毒合剂大剂量组、六神丸组与阿莫西林组、正常对照组小鼠的死亡率明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);清热败毒合剂大、中、小剂量组、六神丸组与模型组小鼠的死亡率明显高于正常对照组($P<0.01$)。

3.2 清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌的体外抗菌作用

清热败毒合剂3次实验的细菌回收率分别为13%、14%、9%,与70%的细菌回收率比较,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3.3 确定金黄色葡萄球菌感染小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺采血时间点

表2示,腹腔注射0.3ml金黄色葡萄球菌菌液后,小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺均呈上升趋势,至6h小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺均出现最高值,后出现下降趋势。6h小鼠CD3⁺水平均明显高于内其他时间点($P<0.05$);6h小鼠CD4⁺/CD8⁺水平明显高于1h($P<0.05$),而其余各组与1h的CD4⁺/CD8⁺水平无统计学意义($P>0.05$)。因此说明在6h小鼠的免疫反应最强。因此选择腹腔注射金黄色葡萄球菌后6h作为小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺采血时间点。

3.4 各组小鼠CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺表达水平比较

表3示,清热败毒合剂大剂量组、六神丸组、阿莫西林组、正常对照组CD3⁺表达明显高于模型组($P<0.05$);六神丸组、阿莫西林组、正常对照组的CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺水平明显高于模型组($P<0.05$);清热败毒合剂大剂量组、六神丸组、阿莫西林组、正常对照组、

模型组 $CD8^+$ 水平组间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

外科感染性疾病其发病多责之为“热毒”、“火毒”, 《医宗金鉴》中指出:“痈疽原是火毒生”。传统治疗多以清热解毒为主, 主要针对病因治疗, 未注重感染性疾病由“热毒蕴结”而致“气血凝滞”、“热盛肉腐”的病理变化过程。同时清热解毒药多为苦寒之品, 苦寒伤胃, 且局部易形成僵块, 迁延难愈。我们在长期临床和实验研究的基础上, 认为感染性疾病的发生发展变化错综复杂, 其演变过程难以截然分开, 往往需将“消”、“托”、“补”三法并施^[6]。我们认为, 外科感染性疾病的演变过程体现了邪正交争的变化过程, 正气充足与否决定了疾病的不同转归^[7], 故治疗中尤其注重扶正, 以使疮疡毒邪移深就浅, 使扩散的证候趋于局限, 从而达到脓出毒泄、肿痛消退的目的。提出了扶正托毒、清热凉血、和营消肿相结合的治疗原则, 并将其经验方药进行了提炼与概括, 创立了清热败毒合剂。

感染性疾病多由致病微生物入侵人体所引起, 多采用抗生素治疗为主。但目前研究证明, 感染性疾病的发生发展与机体免疫功能密切相关, 如重症感染多经历免疫激活、免疫抑制和免疫类型转化等多个环节, 其中免疫活性细胞的功能状态直接决定了上述变化过程。而细胞免疫在机体免疫功能中起着关键性的作用, $CD3^+$ 是诱导 T 细胞活化的第一信号, 而 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 是外周血成熟 T 淋巴细胞的两个亚群, 分别与不同的抗原肽相结合, 完成细胞免疫的激活过程。它们的功能变化在一定程度上反映机体的免疫功能状态, 因此本实验选用上述实验室指标进行研究。

清热败毒合剂以中医理论为基础, 将“消”、“托”、“补”三法并施, 由黄芪、皂角刺、金银花、丹参等10味中药组成, 广泛应用于疔疮、丹毒等感染性疾病, 经过10余年的临床验证, 安全有效。本研究结果表明, 清热败毒合剂大剂量组对金黄色葡萄球菌感染小鼠有一定的保护作用。同时体外抗菌实验发现清热败毒合剂的细菌回收率远低于70%, 依据《中华人民共和国药典》, 可认为其对金黄色葡萄球菌有较大的抑菌活性^[8]。而免疫功能方面, 清热败毒合剂组金黄色葡萄球菌感染小鼠的 $CD3^+$ 水平明显高于模型组, 因此可认为, 清热败毒合剂能够提高金黄色葡萄球菌感染小鼠的免疫功能。

现代药理研究发现, 黄芪^[8]通过对单核巨噬细胞、自然杀伤细胞 (NK)、T 细胞、B 细胞、细胞因子及神经

—内分泌—免疫网络的调节, 实现对机体的免疫调节作用。皂角刺^[9]其主要成分皂角刺总黄酮, 对小鼠腹腔巨噬细胞释放肿瘤坏死因子 (TNF) 有明显的抑制作用。赤芍^[10]含有丰富的苷类化合物, 药理作用研究证明其具有抑制血小板和红细胞聚集、抗凝和抗血栓、抗动脉硬化等作用, 具有广泛的药理活性。金银花^[11]有效成分为绿原酸类化合物, 绿原酸具有广谱抗菌作用, 在体外对多种致病菌有不同程度的抑制作用, 如金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、大肠杆菌、痢疾杆菌等。这与文献报道^[12]相一致。

清热败毒合剂对金黄色葡萄球菌感染小鼠有一定的保护作用, 其作用机制可能与清热败毒合剂的抗菌作用以及对小鼠免疫功能的提高有关。但本实验中清热败毒合剂中、小剂量对感染小鼠无明显保护作用, 可能与药物浓度太低或者与中药在小鼠体内代谢有关, 亦需要进一步深入研究。

参考文献

[1] 余林南. 外科感染的基本问题及其特点[J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5(11): 32-34.
[2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 278-279.
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 附录XIII C: 70-79.
[4] 李红云, 姚咏明, 施志国, 等. 烫伤合并金黄色葡萄球菌感染大鼠组织 $CD14$ mRNA 的改变[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(2): 88-91.
[5] 何显忠, 兰荣德. 金银花的药理作用与临床应用[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(12): 865-867.
[6] 程亦勤. 唐汉钧治疗重症痈疽的经验[J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(9): 696-697.
[7] 楼映, 阙华发, 蒯纲. 唐汉钧运用脾胃论观点治疗中医外科疾病举隅[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(10): 30-32.
[8] 索贞, 任敏, 周好田. 黄芪的化学成分及现代药理[J]. 现代医院, 2005, 5(9): 85-86.
[9] 曹学锋, 郭澄, 张俊平. 皂角刺总黄酮对小鼠细胞因子的调节作用[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(10): 588-589.
[10] 阮金兰, 赵钟祥, 曾庆忠, 等. 赤芍化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 34-36.
[11] 于俊生, 庄文青, 王砚琳. 尿感康治疗慢性泌尿系感染的免疫学研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(1): 40-40.
[12] 吴整军. 中医药抗感染治疗的探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(11): 1296-1297.

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net (收稿日期: 2008-02-29; 修回日期: 2008-10-30)