

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

孔令博¹ 刘清泉^{2*} 王 兰¹ 付跃峰¹ 高 洁³

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700;

2. 首都医科大学附属北京中医医院; 3. 中国人民解放军第三〇六医院)

基金项目:“十一五”国家科技重大专项资助项目(2009ZX09103-415);

“十二五”国家科技重大专项资助项目(2013ZX09102026);

中医药行业科研专项资助项目(200907001)

* 通讯作者: liuqingquan2003@126.com, (010)52176677

[摘要] 目的 探讨芪归银方对多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠的免疫调节作用。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、西药对照组、芪归银方组、中西医结合组, 每组 8 只。除空白组外其余各组大鼠将多重耐药铜绿假单胞菌菌液同 2.0% 西黄芪胶 1:1 混合后 8 ml/kg 腹腔注射, 注射后空白组和模型组给予蒸馏水 2 ml 灌胃, 西药对照组给予头孢他啶 0.45 g/kg 肌肉注射, 芪归银方组给予芪归银方提取物 2 ml (1.0 g/ml) 灌胃, 中西医结合组给予芪归银方提取物灌胃和头孢他啶肌肉注射, 各组腹腔感染后 3 h 留取脾脏组织标本, 运用 MTT 法检测各组大鼠 T、B 淋巴细胞的增殖水平。结果 模型组大鼠脾脏中 T、B 淋巴细胞增殖水平较空白组升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 西药对照组大鼠脾脏中 T、B 淋巴细胞增殖水平较空白组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 T、B 淋巴细胞增殖水平较空白组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 西药对照组、芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 T、B 淋巴细胞增殖水平均较模型组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 芪归银方具有适度下调多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠淋巴细胞增殖能力, 与头孢他啶过度抑制免疫应答反应相比, 其可使感染所导致的免疫紊乱趋于平衡。

[关键词] 芪归银方; 多重耐药菌感染; 淋巴细胞; 增殖; 免疫调节

Effect of Qiguiyin Formula on the Lymphocyte Proliferation in Rats with Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Infection
KONG Lingbo¹, LIU Qingquan², WANG Lan¹, FU Yuefeng¹, GAO Jie³

(1. Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. The 306th Hospital of PLA)

ABSTRACT **Objective** To study the immunomodulatory effect of Qiguiyin Formula [formula of Huangqi (*Radix Astragali*), Danggui (*Angelica Sinensis*) and Jinyinhua (*Flos Lonicerae*)] on rats with multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa infection. **Methods** The SD rats were randomized into the blank group, model group, western medicine control group, Qiguiyin Formula group and integrative medicine group, with 8 in each. The multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa bacteria and 2.0% tragacanth were mixed at one to one ratio and 8 ml/kg of the mixture was intraperitoneally injected to the rats in each group except the blank group. After injection, the blank group and model group were gavaged with 2 ml distilled water, the western medicine control group was intramuscularly injected with 0.45 g/kg ceftazidime, the Qiguiyin Formula group was gavaged with 2 ml (1.0 g/ml) Qiguiyin Formula extract and the integrative medicine group was gavaged with Qiguiyin Formula extract and intramuscularly injected with ceftazidime. The spleen tissue specimens were taken 3 hours after intraperitoneal infection. The proliferation levels of T and B lymphocytes were detected by MTT method. **Results** Comparing with the blank group, the proliferation levels of T and B lymphocytes were significantly increased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the blank group, the proliferation levels of T and B lymphocytes were significantly decreased in the western medicine control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the blank group, the proliferation levels of T and B lymphocytes were not significantly changed in the Qiguiyin Formula group and integrative medicine group ($P > 0.05$). Comparing with the model group, the proliferation levels of T and B lymphocytes were significantly decreased in the western medicine control group, Qiguiyin Formula group and integrative medicine group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Qiguiyin Formula can moderately down-regulate the lymphocyte proliferation in rats with multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa infection. Comparing with the excessive inhibition of immune response by ceftazidime, Qiguiyin Formula can balance the immune disorders caused by infection.

Keywords Qiguiyin Formula; multidrug-resistant infection; lymphocytes; proliferation; immunomodulatory

随着全球抗生素的不合理使用,耐药菌感染日趋严峻,细菌耐药性日益增强,多重耐药菌感染的发病率急剧攀升、死亡率居高不下,已成为国内外备受关注的重要公共卫生问题和医学界棘手难题。尽管现代医学针对细菌复杂的耐药机制进行了大量的研究,但目前仍缺乏有效的防治措施。近年来,基于中医整体观念、辨证论治思维指导下的相关研究充分显示出了中医药在细菌耐药和耐药菌感染方面的独特优势。中医认为多重耐药菌感染的发生与正虚邪伏、伺机而作、待时而发的伏邪致病特点相似,治疗上应温阳扶正、透邪外出^[1]。

我们前期研究以具有代表性的多重耐药铜绿假单胞菌为研究对象,证实了扶正透邪之芪归银方的体外抑菌作用及其与抗生素的协同抑菌作用^[2-4]。在此基础上,本研究通过体内试验对芪归银方抗多重耐药铜绿假单胞菌感染的作用机制进行了初步探索,具体如下。

1 材料

1.1 药物

芪归银方组成:黄芪 60 g,当归 15 g,金银花 15 g,青蒿 10 g,虎杖 10 g,提取物(1.0 g/ml)由北京中医药大学中药学院中药研究室提供;注射用头孢他啶,深圳致君制药有限公司,批号 E20100102。

1.2 实验动物

SD 大鼠 40 只,雌雄各半,清洁级,体重 200~220 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号:SCXK-(军)2007-004。正常光照条件下,食、水可自由摄取,室温 18~22℃。

1.3 菌株

多重耐药铜绿假单胞菌临床分离株 1643 号,由首都医科大学附属北京朝阳医院细菌室提供。

1.4 试剂与设备

M-H 琼脂平板(批号:XWO1100301)购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司,RPMI-1640 培养基(批号:NXL0743)、刀豆蛋白 A (ConA,批号:025K6931)、脂多糖(LPS,批号:LPSL3162)、MTT (批号:Amersco-0793)均购自 Sigma 公司,胎牛血清(批号:NVA2667)购自民海生物公司,磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(批号:131C021)购自鼎国生物技术有限公司,Tris-NH₄Cl(批号:S0234)购自上海化学试剂厂,0.01NH₄Cl-10%SDS(批号:323A031)购自 Gibco 公司,西黄芪胶(批号:C0016895)购自上海耐今实业有限公司。

立式自动电热压力蒸汽灭菌器(Astell 公司,型

号 AMA440N),恒温培养箱(Samyo 公司,型号 SIM-F124),涡混合器(Scientific Industries 公司,型号 VORTEX-GENIE 2),低温高速离心机(上海爱丁堡生物科技发展有限公司,型号 Kendro Labofuge 400R),微量天平(Mettler 公司,型号 AE100),酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司,型号 DNM-9602)。

2 方法

2.1 菌悬液制备

将实验菌株接种于 M-H 琼脂培养基活化,经 37℃ 恒温培养 18~24 h 后,用生理盐水洗脱菌落,3000 r/min 离心 20 min,弃去上清,加入生理盐水,混匀后吸出 0.5 ml 加入新的无菌试管中,加入适量生理盐水,与比浊计进行比浊,将菌液稀释成 24×10^8 CFU/ml,用酶标仪检测 OD 值为 (0.675 ± 0.005) ,再将其稀释成 0.48×10^8 CFU/ml,作为实验菌悬液。

2.2 模型制备

SD 大鼠常规饲养 1 周,采血前禁食过夜。按照杨钧等^[5]报道的方法建立多重耐药铜绿假单胞菌腹腔感染大鼠模型。具体方法如下:将多重耐药铜绿假单胞菌菌液(以下简称菌液)同 2.0% 西黄芪胶 1:1 混合后,8 ml/kg 腹腔注射,注射后自由进食、饮水。

2.3 动物分组与处理

采用随机数字表法将 SD 大鼠分为空白组、模型组、西药对照组、芪归银方组、中西医结合组,每组 8 只。空白组和模型组给予蒸馏水 2 ml 灌胃;西药对照组给予头孢他啶 0.45 g/kg 肌肉注射;芪归银方组给予芪归银方提取物 2 ml 灌胃;中西医结合组给予芪归银方提取物灌胃和头孢他啶肌肉注射,剂量和方法同西药对照组和芪归银方组。除空白组外其余各组均于腹腔注射菌液后即给予灌胃或肌肉注射 1 次,腹腔感染后 3 h,留取脾脏组织标本,空白组于同时间点留取脾脏组织。

2.4 ConA 诱导的脾脏 T 细胞增殖能力测定

无菌摘取大鼠脾脏(操作在冰浴中进行),常规制备脾细胞悬液,计数脾细胞,再用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 5×10^6 /ml,加至 96 板中,100 μ l/孔。分别加入含 ConA 完全 RPMI-1640 溶液 100 μ l/孔(ConA 终浓度为 5 μ g/ml),每组设 5 个复孔,并设无 ConA 细胞对照。将 96 孔板置 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 68 h,取出,每孔弃上清 100 μ l,加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l(终浓度 0.5 mg/ml),继续孵育 4 h,加入 0.01NH₄Cl-10%SDS 100 μ l/孔,振荡摇匀,37℃ 过

夜,酶标仪 570 nm 下测定各孔 A 值。

2.5 LPS 诱导的脾脏 B 淋巴细胞增殖能力的测定

无菌摘取大鼠脾脏(操作在冰浴中进行),常规制备脾细胞悬液,计数脾细胞,再用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 5×10^6 /ml,加至 96 板中,100 μ l/孔。分别加入含 LPS 完全 RPMI-1640 溶液 100 μ l/孔(LPS 终浓度为 5 μ g/ml),每组设 5 个复孔,并设无 LPS 细胞对照。将 96 孔板置 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 68 h,取出,每孔弃上清 100 μ l,加入 5 mg/ml 的 MTT 10 μ l(终浓度 0.5 mg/ml),继续孵育 4 h,加入 0.01 NH₄Cl-10% SDS 100 μ l/孔,振荡摇匀,37℃ 过夜,酶标仪 570 nm 下测定各孔 A 值。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 *t* 检验、方差分析。

3 结果

3.1 各组大鼠 T 淋巴细胞增殖水平比较

表 1 示,模型组大鼠脾脏中 T 淋巴细胞增殖水平较空白组升高($P < 0.01$);西药对照组大鼠脾脏中 T 淋巴细胞增殖水平较空白组降低($P < 0.05$);芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 T 淋巴细胞增殖水平与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。西药对照组、芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 T 淋巴细胞增殖水平均较模型组降低($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 T 淋巴细胞增殖水平比较(A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	T 淋巴细胞增殖
空白组	8	0.220 $\pm$ 0.015
模型组	8	0.295 $\pm$ 0.025**
西药对照组	8	0.182 $\pm$ 0.011* Δ
芪归银方组	8	0.226 $\pm$ 0.027 Δ
中西医结合组	8	0.228 $\pm$ 0.012 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3.2 各组大鼠 B 淋巴细胞增殖水平比较

表 2 示,模型组大鼠脾脏中 B 淋巴细胞增殖水平较空白组升高($P < 0.05$);西药对照组大鼠脾脏中 B 淋巴细胞增殖水平较空白组降低($P < 0.01$);芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 B 淋巴细胞增殖水平与空白组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。西药对照组、芪归银方组和中西医结合组大鼠脾脏中 B 淋巴细胞增殖水平均较模型组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠 B 淋巴细胞增殖水平比较(A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	B 淋巴细胞增殖
空白组	8	0.125 $\pm$ 0.020
模型组	8	0.150 $\pm$ 0.016*
西药对照组	8	0.097 $\pm$ 0.008** $\Delta\Delta$
芪归银方组	8	0.125 $\pm$ 0.008 Δ
中西医结合组	8	0.121 $\pm$ 0.008 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 讨论

淋巴细胞是机体免疫应答功能的重要细胞成分,分为 T、B 两种,其不仅参与后期炎症反应的发生同时还具有调节早期炎症反应的重要功能^[6]。在细菌感染的发病机制中除病原微生物及其毒素直接损害组织细胞外,免疫功能紊乱对其发生发展具有重要作用^[7],对多重耐药菌感染的重要性尤为突出。中医认为正邪斗争的消长盛衰决定着疾病的发生、发展变化及其转归,扶正祛邪是中医的基本治则之一,其目的在于恢复邪气内侵所导致的阴阳失衡状态。本实验所选芪归银方中黄芪、当归补气养血、培补元气,是治疗因气血不足而发热的经典方剂,加入金银花清解气分热毒,透邪外出;青蒿清热解毒,透达外邪;虎杖解毒散结,具有活血之功。纵观全方,补气养血以扶正,清热透达给邪以出路。本实验结果显示,西药对照组、芪归银方组和中西医结合组均能够明显降低多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠超早期 T、B 淋巴细胞的增殖水平,与模型组比较差异有统计学意义。但值得注意的是,与空白组比较,西药对照组差异显著,而芪归银方组和中西医结合组则无显著差异,提示单纯使用头孢他啶过度抑制了感染后超早期 T、B 淋巴细胞的增殖能力,而芪归银方不仅能适度下调感染后超早期 T、B 淋巴细胞的增殖能力,与抗生素联用还能促使抗生素过度抑制的 T、B 淋巴细胞增殖能力趋于正常水平。

由于炎症与免疫反应的复杂性和细胞因子的多样性,抗生素过度抑制免疫应答反应存在加重机体损伤、增加病死率的风险,芪归银方则具有适度下调免疫应答反应,使感染所导致的免疫紊乱趋于平衡的作用,充分体现了“阴平阳秘”、“以平为期”的中医理论,再次证实了中药复方对机体免疫系统的双向调节作用,即能够使过高或过低的免疫应答反应恢复到正常水平^[8]。在合理使用抗生素的基础上,针对多重耐药菌感染的病机特点应用扶正透邪之芪归银方,有利于阻断炎症瀑布反应,促进机体损伤的修

(下转第 1599 页)

机体抗病能力,消除虚弱证候;还可使心气充沛、血液充盈,从而促进心脏功能正常运行。现代药理研究表明,补虚药可增强机体的免疫功能,产生扶正祛邪的功效,还加强神经系统功能、促进物质代谢、调节神经内分泌系统,对心血管功能可产生正性肌力,双向调节血压,并且具有抗心肌缺血和心律失常、扩张冠状动脉、改善心肌血氧供应等作用以及促进造血功能^[7]。

现代医学治疗稳定型冠心病心绞痛主要有抗心绞痛和抗缺血、预防心肌梗死、抗血小板、抗凝、降脂治疗等^[8]。这些治疗虽然作用明显,但往往忽视了机体整体状态,急性期效果明显,但是后期整体效果却不甚理想。中医采用病证结合方证对应的模式,根据辨证对冠心病心绞痛采用活血化瘀、行气活血、益气活血、益气养阴活血及其他等治法。即《中国药典》所载中成药根据整体罹患冠心病心绞痛患者相同主症“胸痛”、“胸闷”、“心绞痛”,且相同病机“心肌缺血”,又根据整体观念治疗兼证而酌情组方配伍用药,111味中药根据类别和作用特点,依据君臣佐使、七情配伍,被使用在各中成药之中。

本研究结果显示,《中国药典》治疗冠心病心绞痛中成药以活血化瘀为治疗核心,兼以补虚、理气、开窍、清热、安神、温里、化痰而进行组方用药。而研究显示,冠心病心绞痛疾病以血瘀证(73.53%)为最常见,其次为气虚(64.71%)、痰浊(55.88%)、阴虚(50.98%)、阳虚(44.12%)等证^[9],其中痰浊所占比例很高,且随着现代生活方式的改变,痰瘀互阻型冠心病在临床上越来越常见。但是在《中国药典》中仅有正心降脂片具有益气活血、祛痰降浊的功能,这也是依据《中国药典》收录范围指导临床用药的局限性之一。

(上接第1587页)

复,提高抗多重耐药菌感染临床疗效的潜力与优势,值得进一步深入研究芪归银方在炎症、免疫方面的作用机制及其对多重耐药菌感染病死率的影响,为临床治疗多重耐药菌感染提供可靠的实验依据。

参考文献

- [1]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.
- [2]孔令博,刘清泉,邱泽计,等.扶正透邪方联合抗生素体外干预多重耐药铜绿假单胞菌研究[J].中国中医急症,2011,20(4):582-584.
- [3]高洁,刘清泉,田金洲,等.芪归银方对耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药作用的影响[J].中医杂志,2012,53(16):

尽管临床上治疗冠心病、胸痹、胸痛的中成药在《中华人民共和国药典临床用药须知:中药成方制剂卷》《中药成方制剂》《国家药品监督管理局药品汇编》等标准中时有可见,但是作为科学、实用、规范的《中国药典》仅收录68种。因此,以中医理论整体观念为指导,基于病证结合、方证对应的冠心病心绞痛中成药新药研发,应结合《中国药典》冠心病心绞痛中成药的配伍规律和其临床症候群的差异,运用现代科学方法研发出疗效确切、安全有效、质量标准可控的冠心病心绞痛中成药。

参考文献

- [1]国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010:401-1247.
- [2]国家药典委员会.中华人民共和国药典临床用药须知:中药成方制剂卷[M].北京:中国医药科技出版社,2011:225-626.
- [3]姚鹏,王哲,赵丽霞.中药活血化瘀法治疗冠心病心绞痛108例的临床疗效观察[J].中国实用医药,2011,6(13):159-161.
- [4]夏敏,陈晓虎.活血化瘀法在冠心病治疗中的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,4(4):260-262.
- [5]蔡丽萍,习志刚,杨红.丹参酮的药理作用和临床研究进展[J].广东药学院学报,2008,4(3):321-324.
- [6]王蓉,原永芳.丹酚酸B药理作用的研究概况[J].中医药导报,2011,17(4):130-132.
- [7]沈映君.中药药理学[M].北京:人民卫生出版社,2000:850-854.
- [8]王吉耀.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2005:272-282.
- [9]毕颖斐,毛静远,陆一竹,等.冠状动脉粥样硬化性心脏病临床分型中医证素分布特征的初步调查[J].环球中医药,2011,4(6):434-437.

(收稿日期:2013-04-03;修回日期:2013-05-24)

[编辑:崔京艳]

1408-1411.

- [4]孔令博,刘清泉,吴琨,等.扶正透邪方体外干预多重耐药铜绿假单胞菌研究[J].环球中医药,2012,5(2):81-84.
- [5]杨钧,张淑文,阴赅宏,等.耐药菌腹腔感染兔动物模型的建立[J].中华医院感染学杂志,2008,18(9):1129-1222.
- [6]赵洁,杨选明,都培双,等.T淋巴细胞抑制急性感染的炎症反应[J].生物化学与生物物理进展,2008,35(2):129-132.
- [7]李成荣.脓毒症免疫功能紊乱及免疫调节治疗[J].临床儿科杂志,2010,28(1):13-17.
- [8]杨敏,李光华.中药对机体的免疫调节及作用机制[J].辽宁中医杂志,2013,40(4):812-814.

(收稿日期:2013-07-10;修回日期:2013-08-07)

[编辑:邓媛]