

# 芪归银方对多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠血清 IL-1 $\beta$ 水平的影响

孔令博<sup>1</sup> 郭玉红<sup>2</sup> 付跃峰<sup>1</sup> 李艳鹏<sup>1</sup> 牛丽强<sup>1</sup> 杨雪冬<sup>1</sup> 姜旭<sup>1</sup> 刘佳莹<sup>1</sup> 刘清泉<sup>2</sup>

(1 北京中医药大学东直门医院,北京,100700; 2 首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010)

**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血清 IL-1 $\beta$  水平的影响。方法:将 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 5 组,运用 ELISA 检测采用不同干预方法的各组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平,比较各组之间的差异。结果:模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在各时间点均较空白组明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );西药对照组、芪归银方组、中西医结合组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在 3 h、8 h、24 h 较空白组明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );西药对照组、芪归银方组、中西医结合组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在 72 h、5 d 较空白组无统计学意义( $P > 0.05$ );西药对照组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在 72 h、5 d 较模型组降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );扶正透邪方组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在 24 h 较模型组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 5 d 较模型组降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );中西医结合组大鼠血清 IL-1 $\beta$  水平在 24 h 较模型组升高,在 72 h、5 d 较模型组降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:与抗生素相比,芪归银方能够在炎症反应早期增强促炎递质的释放,二者联用则作用更明显,有利于积极清除细菌及毒素,并随着时间的推移,使促炎递质的释放迅速下降,维持正常炎症反应水平以免太长的过激炎症反应不利于损伤的修复,充分体现了“阴平阳秘”“以平为期”的中医理论。

**关键词** 扶正透邪;芪归银方;多重耐药菌感染;炎症反应因子;IL-1 $\beta$

## The Impact of Qiguiyin Decoction on IL-1 $\beta$ in Serum of Multi-drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa Infected Rats

Kong Lingbo<sup>1</sup>, Guo Yuhong<sup>2</sup>, Fu Yuefeng<sup>1</sup>, Li Yanpeng<sup>1</sup>, Niu Liqiang<sup>1</sup>, Yang Xuedong<sup>1</sup>, Jiang Xu<sup>1</sup>, Liu Jiaying<sup>1</sup>, Liu Qingquan<sup>2</sup>

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

2 Beijing Hospital of TCM, Beijing 100010, China)

**Abstract Objective:** To explore the impact of qiguiyin decoction on IL-1 $\beta$  in serum of multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa infection rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into blank group, model group, western medicine control group, qiguiyin decoction group, and integrated Traditional Chinese Medicine and western medicine group. Level of IL-1 $\beta$  in rats was detected by ELISA, and then the differences between groups were compared. **Results:** The level of IL-1 $\beta$  in model group was significantly higher than that of blank group, with statistically significant difference ( $P < 0.01$ ). The levels of IL-1 $\beta$  in western medicine control group, qiguiyin decoction group, and integrated Traditional Chinese Medicine and western medicine group at 3 h, 8 h, 24 h were significantly higher than those of blank group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The levels of IL-1 $\beta$  in western medicine control group, qiguiyin decoction group, and integrated Traditional Chinese Medicine and western medicine group at 72 h, 5 d showed no statistically significant difference when comparing with those of blank group ( $P > 0.05$ ). The levels of IL-1 $\beta$  in control group at 72 h, 5 d were lower than model group, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The level of IL-1 $\beta$  in qiguiyin decoction group at 24 h was significantly higher than that of model group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The level of IL-1 $\beta$  in qiguiyin decoction group at 5 d was lower than that of model group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The level of IL-1 $\beta$  in integrated Traditional Chinese Medicine and western medicine group at 24 h was significantly higher than model group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The level of IL-1 $\beta$  in integrated Traditional Chinese Medicine and western medicine group at 72 h, 5 d were lower than model group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Compared with antibiotics, qiguiyin decoction increased the release of pro-inflammatory medium in early inflammatory response. The efficacy of antibiotics combined with qiguiyin decoction was more obvious, which removed bacteria and toxins while the release of pro-inflammatory medium dropping rapidly over time to keep normal inflammatory response level for repairing damage. And it indicated Chinese medicine theories, yin and yang in equilibrium, to achieve balance.

基金项目:北京中医药大学基本科研业务费项目(编号:2015-JYB-JSMS057);国家“十二五”科技重大专项(编号:2013ZX09102026)

并列第一作者:孔令博,男,副主任医师,中医急诊与危重病方向;郭玉红,女,副主任医师,中西医结合急诊与危重病方向

通信作者:刘清泉,男,中医感染性疾病基础研究北京市重点实验室主任,研究方向:中西医结合急危重症,联系方式:(010)52176522, E-mail:liuqingquan2003@126.com

**Key Words** Fuzheng touxie; Qiguiyin Decoction; Multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa infection; Inflammatory factor; Interleukin-1 $\beta$

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.007

耐药菌的高频出现及其导致的高死亡率和沉重的经济负担,已经成为国内外倍受关注的重要公共卫生问题。美国疾病控制与预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)首次对耐药细菌进行分级,仅美国每年有超过200万人感染耐药细菌<sup>[1]</sup>。如何降低其发病率及死亡率已成为目前国内外亟待解决的问题。中医药在感染性疾病中调节机体炎性反应免疫和清除内毒素等方面的作用已经得到广泛证实。在中医理论的指导下运用中药同样能够将抗耐药细菌毒素与保护脏器组织、调节免疫紊乱相结合,促进损伤组织的修复,阻断微循环障碍的病理过程,进而提高临床抗耐药菌感染的疗效<sup>[2]</sup>。有学者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如出一辙,治疗上应温阳扶正、透邪外出<sup>[3]</sup>。有鉴于此,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<sup>[4,5]</sup>。在此基础上,我们在本研究通过体内实验对芪归银方干预多重耐药铜绿假单胞菌感染炎性反应的作用机制进行了初步探索,具体报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 药物 芪归银方(黄芪60g、当归15g、金银花15g、青蒿10g、虎杖10g)提取物(1.0g/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,产品批号E20100102。(大鼠给药剂量按照70kg成人用量的6.3倍计算)

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

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琼脂平板购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司(批号:XWO1100301),RP-MI-1640培养基购自Sigma公司(批号:NXL0743),Rat IL-1 $\beta$ ELISA试剂盒(96t ZABFBZAA01)购自上

海依科赛生物制品有限公司,西黄芪胶购自上海耐今实业有限公司(批号:C0016895)。

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)。

1.5 制备菌悬液 将实验菌株接种于M-H琼脂培养基活化,经37℃恒温培养18~24h后,用生理盐水洗脱菌落,离心,3000r/min,20min,弃去上清,加入生理盐水,混匀后吸出0.5mL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 $24 \times 10^8$ CFU/mL,用酶标仪检测OD值为 $0.675 \pm 0.005$ ,再将其稀释成 $0.48 \times 10^8$ CFU/mL,作为实验菌悬液。

1.6 制备动物模型 SD大鼠常规饲养1周,室温控制在18~22℃之间,自由获取食、水,采血前禁食过夜。按照杨钧等<sup>[6]</sup>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,腹腔注射。注射后自由进食、饮水。

1.7 动物分组与处理 将SD大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、西药对照组、芪归银方组、中西医结合组,共5组。空白组给予蒸馏水灌胃2mL;模型组腹腔注射菌液后(8mL/kg),即给予蒸馏水灌胃2mL;西药对照组腹腔注射菌液后(8mL/kg),即给予头孢他啶,肌肉注射0.45g/kg;芪归银方组腹腔注射菌液后(8mL/kg),即给予芪归银方提取物灌胃2mL;中西医结合组腹腔注射菌液后(8mL/kg),即给予芪归银方提取物灌胃2mL,同时予头孢他啶,肌肉注射0.45g/kg。以上各组按时间点又分为腹腔注射后3h、8h、24h、72h和5d组,每组各8只,各组按分组所示相应时间点,留取血及组织标本。

1.8 大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平ELISA检测方法 准备工作:1)提前20min从冰箱中取出试剂盒,以平衡

至室温。2)将浓缩洗涤液用双蒸水稀释(1:20)。3)标准品:加入试剂稀释液0.5 mL至冻干标准品中,静置15 min,待其充分溶解后,轻轻混匀(浓度为2 000 pg/mL)。然后根据2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、0 pg/mL浓度进行稀释。4)生物素化抗体工作液:使用前30 min用试剂稀释液稀释浓缩生物素化抗体(1:100)配置成生物素化抗体工作液。5)酶结合物工作液:使用前30 min用试剂稀释液稀释浓缩酶结合物(1:100)配置成酶结合物工作液,室温避光放置。

洗涤方法:用自动洗板机,注入350  $\mu\text{L}$ 洗涤液,注入与吸出间隔20~30 s。洗板4次。

操作步骤:1)从已平衡至室温的密封袋中取出试验所需板条。2)留空白孔。3)先按标准品稀释方法加好标准品(100  $\mu\text{L}$ /孔),0 pg/mL孔加试剂稀释液(Assay Diluent)100  $\mu\text{L}$ ;在每个样本孔中加入50  $\mu\text{L}$ 试剂稀释液(Assay Diluent)和50  $\mu\text{L}$ 样本(此时样本已做了1:2倍稀释,计算结果时样本含量要乘以2);随后在样本和标准孔中加入50  $\mu\text{L}$ 生物素化抗体工作液,用封板胶纸封住反应孔。4)室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ ),使用微量振荡仪(最低频率,100 r/min),孵育120 min。5)洗板5次。6)除空白孔外,加入酶结合物工作液(100  $\mu\text{L}$ /孔),用封板胶封住反应孔。7)室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ ),使用微量振荡仪(最低频率,100 r/min),孵育60 min。8)洗板5次。9)加入显色底物(包括空白孔)100  $\mu\text{L}$ /孔,室温(22~25  $^{\circ}\text{C}$ ),避光孵育10 min。10)加入终止液(包括空白孔)100  $\mu\text{L}$ /孔,混匀后即刻测量OD450值(10 min内)。

结果判断:1)每个标准品和标本的OD值减去

零孔的OD值。2)手工绘制标准曲线。以标准品浓度作横坐标,OD值作纵坐标,以平滑线连接各标准品的坐标点。通过标本的OD值在标准曲线上查出其浓度。3)若标本OD值高于标准曲线上限,应当稀释后重测,计算浓度时应乘以稀释倍数。

1.9 统计学方法 采用SPSS 13.0统计软件包,参数计量资料进行 $t$ 检验、方差分析,计数资料使用 $\chi^2$ 检验进行统计学处理。各计量资料用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

模型组和各治疗组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在感染后3 h已经开始升高。各治疗组大鼠血清IL-1 $\beta$ 高峰较模型组延迟出现,72 h后模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 维持在高于正常水平,而各治疗组大鼠血清IL-1 $\beta$ 则接近正常水平。

模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在各时间点均较空白组明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );西药对照组、芪归银方组、中西医结合组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在3 h、8 h、24 h较空白组明显升高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );西药对照组、芪归银方组、中西医结合组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在72 h、5 d较空白组无统计学意义( $P>0.05$ );西药对照组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在72 h、5 d较模型组降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ );扶正透邪方组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在24 h较模型组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),在5 d较模型组降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ );中西医结合组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平在24 h较模型组升高,在72 h、5 d较模型组降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。见表1、图1。

表1 各组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平的变化( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	3 h	8 h	24 h	72 h	5 d
空白组	0.34 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.08	0.38 $\pm$ 0.17	0.38 $\pm$ 0.17	0.38 $\pm$ 0.17
模型组	2.40 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta$	2.95 $\pm$ 0.90 $\Delta\Delta$	2.41 $\pm$ 0.85 $\Delta\Delta$	0.96 $\pm$ 0.61 $\Delta\Delta$	0.93 $\pm$ 0.52 $\Delta\Delta$
西药对照组	2.31 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	2.60 $\pm$ 0.99 $\Delta\Delta$	3.18 $\pm$ 1.21 $\Delta\Delta$	0.36 $\pm$ 0.14**	0.28 $\pm$ 0.05**
扶正透邪方组	1.82 $\pm$ 0.57 $\Delta\Delta$	2.52 $\pm$ 0.71 $\Delta\Delta$	3.57 $\pm$ 0.43* $\Delta\Delta$	0.59 $\pm$ 0.42	0.32 $\pm$ 0.07**
中西医结合组	2.27 $\pm$ 0.95 $\Delta\Delta$	3.24 $\pm$ 0.63 $\Delta\Delta$	4.18 $\pm$ 0.92** $\Delta\Delta$	0.25 $\pm$ 0.06**	0.32 $\pm$ 0.11**

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

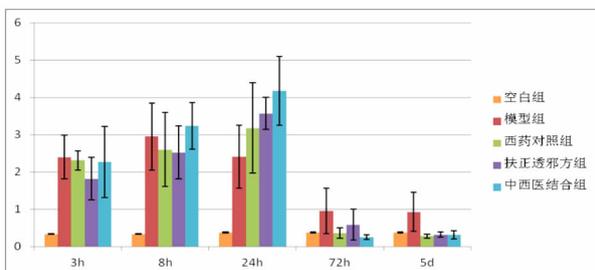


图1 各组大鼠血清IL-1 $\beta$ 水平的变化

## 3 讨论

炎症反应是机体对损伤性伤害的一种防御性反应,其对感染性疾病的发生、发展尤为重要。不同时期、不同作用炎症反应因子的释放和调节左右着感染性疾病的发生、发展过程。适度的炎症反应对人体是有益的,但是持续的炎症反应则会造成机体自身调节能力的失调,从而导致炎症反应失控,发生级联瀑布效应,出现更为严重的自身损伤<sup>[7]</sup>。促炎因

子与抗炎因子的不平衡是加重炎性反应免疫紊乱的重要因素<sup>[8]</sup>。而这一点对多重耐药菌感染的重要性更是尤为突出。众所周知,抗生素能否有效治疗细菌感染的关键在于其是否能够有针对性的清除病原菌及其产生的内毒素,使机体的炎性反应得到有效控制。耐药菌感染正是由于缺乏针对性的抗生素,而无法迅速、有效地控制炎性反应,比普通细菌感染更易导致或加重机体炎性反应的失衡,造成炎性反应失控,加剧机体不可逆的炎性反应损伤。因而,能否有效调控感染后机体的炎性反应失衡,阻断炎性反应瀑布反应对提高抗多重耐药菌感染临床疗效和改善预后至关重要。而IL-1 $\beta$ 是一种主要由巨噬细胞产生的早期促炎性细胞因子,是体内调节免疫和炎性反应的中心递质,无论是在疾病引发的起始阶段还是在炎性反应发展的过程中,若是产生在不恰当的位置或是含量不适当都将对机体产生负面的效应<sup>[9]</sup>。

中医学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,去除细菌产生耐药的根本,清热透达,以清除细菌,给邪以出路,达到祛邪的目的。实验结果显示西药对照组、芪归银方组和中西医结合组在炎性反应早期均能够明显增加多重耐药铜绿假单胞菌感染大鼠血清IL-1 $\beta$ 的释放。但值得注意的是,与抗生素相比,芪归银方能够在炎性反应早期增强促炎递质的释放,二者联用则作用更明

显,有利于积极清除细菌及毒素。而随着时间的推移,芪归银方则能够使促炎递质的释放迅速下降,维持正常炎性反应水平以免太长的过激炎性反应不利于损伤的修复。研究结果显示芪归银方具有适度调节炎性反应,改善炎性反应因子不适当释放对机体产生负面的效应,充分体现了“阴平阳秘”“以平为期”的中医理论。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,有利于阻断炎性反应瀑布反应,促进机体损伤的修复,极具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,从而为临床治疗多重耐药菌感染提供可靠的实验证据和参考依据。

#### 参考文献

- [1]郭爽.美疾控中心首次对耐药细菌分级[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2013,39(5):544.
- [2]Calfee CS,Matthay MA. Clinical immunology:culprits with evolutionary ties[J]. Nature,2010,464(7285):41-42.
- [3]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.
- [4]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.
- [5]孔令博,刘清泉,吴珺,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.
- [6]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.
- [7]冯娟,栗艳,孙阳,等.大黄多糖抑制脂多糖引起的TLR4/NF- $\kappa$ B通路活化[J].现代生物医学进展,2014,14(31):6035-6038.
- [8]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- $\kappa$ 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.
- [9]宋相伟,杨婉身,周晓巍,等.白细胞介素-1信号转导调控研究进展[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(1):3-5.

(2016-09-12 收稿 责任编辑:洪志强)