

引用:王梦蕾,殷苗苗,马婕馨,等. 小儿风热清口服液抗菌药理作用研究[J]. 现代中医药,2024,44(5):95-103.

# 小儿风热清口服液抗菌药理作用研究<sup>\*</sup>

王梦蕾<sup>1</sup> 殷苗苗<sup>2</sup> 马婕馨<sup>3</sup> 刘妍<sup>3</sup> 刘齐超<sup>1</sup> 刘会云<sup>2,3\*</sup>

(1. 河北省(邯郸)中药产业技术研究院,河北 邯郸 056000;2. 河北省中药大品种培育技术创新中心,河北 邯郸 056000;3. 邯郸制药股份有限公司,河北 邯郸 056000)

**摘要:**目的 研究小儿风热清合剂(口服液)抗菌药理作用。方法 采用琼脂二倍稀释法测定小儿风热清对呼吸道常见致病菌肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)。采用 CCK-8 法检测小儿风热清对 A549 细胞抵抗肺炎链球菌感染能力的影响;采用 ELISA 法检测细胞上清液中一氧化氮(nitric oxide, NO)、白细胞介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的水平。将雄性 BALB/c 小鼠按体质量随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组及小儿风热清低、中、高剂量(5.4、10.8、21.6 mL·kg<sup>-1</sup>)组,除正常对照组外,其余各组小鼠利用细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)口咽吸入法构建小鼠急性肺损伤模型,测定各组小鼠肺指数;采用 ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )水平;采用苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色考察肺组织病理变化。**结果** MIC 实验结果表明小儿风热清对 6 种供试细菌均具有抑菌作用;MBC 实验结果表明,小儿风热清对除金黄色葡萄球菌外的其他 5 种供试细菌具有杀菌效果。CCK-8 结果显示,与正常对照组比较,肺炎链球菌感染后, A549 细胞活力显著下降( $P<0.001$ ),与模型组比较,小儿风热清给药组细胞损伤程度得到改善,细胞活力升高( $P<0.0001, 0.01, 0.05$ );与正常对照组比较,肺炎链球菌感染后,细胞上清液中 NO 水平( $P<0.001$ )、IL-1 $\beta$  水平( $P<0.001$ )显著升高;与模型组比较,小儿风热清给药组细胞上清液中 NO、IL-1 $\beta$  水平降低。LPS 溶液经小鼠口咽后部吸入胸腔后可导致肺部炎性细胞浸润、肺泡出血充血、肺组织实化,其肺损伤病理评价总分与对照组相比具有显著性差异( $P<0.0001$ );与模型组相比,小儿风热清高剂量组小鼠肺指数明显降低( $P<0.05$ );血清中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平降低( $P<0.01, 0.05$ );与模型组相比,小儿风热清中剂量组小鼠肺损伤病理评分总分显著降低( $P<0.01$ ),另外小儿风热清低、中、高剂量组均可显著改善肺损伤中肺组织实化程度。**结论** 小儿风热清对 6 种呼吸道常见致病菌均具有较强抑制作用,且能够显著改善肺炎链球菌感染 A549 细胞造成的细胞损伤情况,降低 LPS 诱导急性肺损伤小鼠肺指数,改善 LPS 所致肺组织病理形态学异常,提示小儿风热清对细菌内毒素所致小鼠肺损伤具有治疗作用,且具有显著抗菌、抗炎能力。

**关键词:** 小儿风热清; 抗菌; ELISA; A549 细胞

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-0571(2024)05-0095-09

**DOI:** 10.13424/j.cnki.mtem.2024.05.018

## Study on the Antibacterial and Pharmacological Effects of Xiao'er Fengreqing Oral Liquid

WANG Menglei<sup>1</sup> YIN Miaomiao<sup>2</sup> MA Jiexin<sup>3</sup> LIU Yan<sup>3</sup> LIU Qichao<sup>1</sup> LIU Huiyun<sup>2</sup>

(1. Hebei Province (Handan) Traditional Chinese Medicine Industry Technology Research Institute, Hebei Handan 056000, China; 2. Hebei Province Traditional Chinese Medicine Variety Cultivation Technology Innovation Center, Hebei Handan 056000, China; 3. Handan Pharmaceutical Co., Ltd., Hebei Handan 056000, China)

**\* 基金项目:** 河北省重点研发计划项目(22372501D); 河北省中医药管理局科研计划项目(2022318, 2022319); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(22313014001; 23313014008); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(21112093033);

**\*\* 通讯作者:** 刘会云, 工程师。E-mail: liuhuy@hanyao.com.cn

**Abstract: Objective** To study the antibacterial and pharmacological effects of Xiao'er Fengqing mixture (oral liquid). **Methods** The agar dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Xiao'er Fengqing mixture against common respiratory pathogens such as *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. The CCK-8 method was used to detect the effect of Xiao'er Fengqing mixture on the resistance of A549 cells to *Streptococcus pneumoniae* infection; ELISA was used to detect the levels of nitric oxide (NO) and interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the cell supernatant. Male BALB/c mice were randomly divided into normal control group, model group, positive control group, and Xiao'er Fengqing mixture low, medium, and high dose (5.4, 10.8, 21.6 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) groups according to body weight. Except for the normal control group, the other groups of mice were used to construct a mouse acute lung injury model by oral inhalation of bacterial endotoxin lipopolysaccharides (LPS), and the lung index of each group of mice was measured; ELISA was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in mouse serum; Hematoxylin Eosin (HE) staining was used to investigate the pathological changes in lung tissue. **Results** The MIC experiment results showed that Xiao'er Fengqing mixture had antibacterial effects on all six tested bacteria; The MBC experiment results showed that Xiao'er Fengqing has bactericidal effects on the other five tested bacteria except for *Staphylococcus aureus*. The CCK-8 results showed that compared with the normal control group, A549 cell viability significantly decreased after *Streptococcus pneumoniae* infection ( $P < 0.001$ ). Compared with the model group, the degree of cell damage was improved and cell viability increased in the Xiao'er Fengqing treatment group ( $P < 0.0001, 0.01, 0.05$ ); Compared with the normal control group, the levels of NO ( $P < 0.001$ ) and IL-1  $\beta$  ( $P < 0.001$ ) in the cell supernatant significantly increased after infection with *Streptococcus pneumoniae*; Compared with the model group, the levels of NO and IL-1 $\beta$  in the cell supernatant of the Xiao'er Fengqing treatment group decreased. LPS solution inhaled into the lung cavity through the posterior pharynx of mice can cause infiltration of inflammatory cells in the lungs, alveolar hemorrhage and congestion, and consolidation of lung tissue. The total score of pathological evaluation of lung injury is significantly different from that of the control group ( $P < 0.0001$ ); Compared with the model group, the lung index of mice in the high-dose group of Xiao'er Fengqing was significantly reduced ( $P < 0.05$ ); The levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in serum decreased ( $P < 0.01, 0.05$ ); Compared with the model group, the total pathological score of lung injury in mice in the medium dose group of Xiao'er Fengqing was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). In addition, the low, medium, and high dose groups of Xiao'er Fengqing could significantly improve the degree of lung tissue consolidation in lung injury. **Conclusion** Xiao'er Fengqing has a strong inhibitory effect on six common respiratory pathogens, and can significantly improve the cell damage caused by *Streptococcus pneumoniae* infection in A549 cells, reduce the lung index of LPS induced acute lung injury mice, and improve the pathological morphological abnormalities of lung tissue caused by LPS. This suggests that Xiao'er Fengqing has therapeutic effects on bacterial endotoxin induced lung injury in mice, and has significant antibacterial and anti-inflammatory abilities.

**Key words:** Xiao'er Fengqing; Antibacterial; ELISA; A549 cells

急性上呼吸道感染系指自鼻孔至环状软骨下缘包括鼻腔、咽或喉部急性炎症的总称<sup>[1-2]</sup>,是最常见的感染性疾病。全年皆可发病,但多见于冬春季节。发病不分性别、年龄、职业与地区,免疫功能低下者易感<sup>[3-4]</sup>。现代医学认为,导致急性上呼吸道感染的常见病因约 80% 为病毒感染,约 20% 为细菌感染,细菌感染可单纯发生或继发于病毒感染之后<sup>[5-9]</sup>。儿童细菌性急性上呼吸道感染常见的致病菌为金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌等<sup>[11-12]</sup>。

中药具有整体调节、多靶点治疗的特点,在治疗急性上呼吸道感染方面具有独特疗效,有效性及安

全性高的中成药可以更好地适应临床需求,同时可降低抗生素的使用率<sup>[13-14]</sup>。小儿风热清口服液(以下简称“小儿风热清”)是以银翘散为基础方辨证加减研制而成的一种纯天然制剂,有辛凉解表、清热解毒、止咳利咽的功效,适用于发热、咳嗽、咳痰、鼻塞流涕、咽喉红肿疼痛等症状<sup>[15]</sup>。在临床应用中对儿童甲型流行性感冒<sup>[16]</sup>、小儿急性上呼吸道感染(风热感冒证)<sup>[17]</sup>等具有良好的治疗效果。由于中药具有副作用小、不易残留和较少出现耐药性等优点,使得从中药中筛选抗菌药物越来越受到国内外学者的广泛重视<sup>[10]</sup>。

本研究通过体外抗菌实验,研究小儿风热清对

于呼吸道常见致病菌肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等的抑菌、杀菌作用;在体外抗菌实验的基础上,进一步开展细胞实验,研究小儿风热清对肺炎链球菌导致的肺上皮细胞损伤的抑制作用。基于体外抗菌实验和细胞实验,进一步开展动物实验,建立细菌内毒素脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)诱导小鼠急性肺损伤模型,旨在考察小儿风热清对小鼠急性肺损伤模型的影响、量效关系并对其体内药效评价方法进行验证,为临床应用提供药理学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Multiskan FC 酶标仪(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司);FA2204 电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);5418R Eppendorf 小型高速冷冻离心机(艾本德中国有限公司);SW-CJ-1D 单人单面净化工作台(苏州博莱尔净化设备有限公司);MCO-170AICUVDL-PC 二氧化碳培养箱(普和希株式会社);HF100(Ti-Gas)三气培养箱(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 细胞株、菌株 人肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549 细胞)购自北纳生物,批号:BNCC337696;金黄色葡萄球菌(ATCC25923)购自中国典型培养物保藏中心;大肠杆菌(CICC10305)购自中国工业微生物菌种保存中心;肺炎克雷伯菌(CMCC46117)购自中国医学细菌保藏中心;流感嗜血菌(TS274248)购自宁波泰斯拓生物;铜绿假单胞菌(CICC21636)购自中国工业微生物菌种保存中心;肺炎链球菌(CMCC31001)购自中国医学细菌保藏中心。

1.3 药品与试剂 市售小儿风热清口服液体积浓缩至 1/2 的小儿风热清药液供体内动物实验和体外抗菌实验使用,市售小儿风热清口服液体积浓缩至 1/4 的小儿风热清药液供细胞实验使用。市售小儿风热清口服液(规格为每瓶装 10 mL,每 1 mL 相当于饮片 2.0 g),批号:S03520001,邯郸制药股份有限公司;醋酸地塞米松片(规格为 0.75 mg),批号:CD190502b,天津天药药业股份有限公司;LPS(规格为 10 mg),批号:121021220413,碧云天;小鼠酶联免疫吸附测定试剂盒(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6),批号:Nov 2021,泉州市九邦生物科技有限公司;水合氯醛(规格为 100 g),批号:C12659264,上海麦克林生化科技有限公司;4%多聚甲醛固定液(规格为 500

mL),批号:CR2203209,武汉赛维尔生物科技有限公司;胰酪大豆琼脂培养基(TSA),批号:180829,北京三药;胰酪大豆胨肉汤培养基(TSB),批号:180716,北京三药;脑心浸液肉汤培养基(BHI),批号:20190821,山东拓普生物工程有限公司;无菌脱纤维羊血,批号:20220823,山东拓普生物工程有限公司;琼脂粉,批号:20201018,海博生物;甘油(规格为 500 mL),批号:H127BA0011,生工生物工程(上海)股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,批号:20201118,北京索莱宝科技有限公司;一次性微生物培养皿(规格为 90 mm),批号:2020052201,上海卧宏生物科技有限公司;96 孔板,批号:21102301,上海卧宏生物科技有限公司;打孔器(直径 6 mm),泽雅科教;冻存管(规格为 1.5 mL),批号:020822CT01,无锡耐思生命科技股份有限公司;DMEM 高糖培养基,批号:2340178, gibco; CCK-8 试剂盒,批号:112921220411,碧云天;细胞上清液试剂盒(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、NO),批号:Nov 2021,泉州市九邦生物科技有限公司。

1.4 实验动物 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体质量 18 ~ 22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物饲养于恒温(20 ~ 26  $^{\circ}\text{C}$ )、恒湿(50% ~ 65%)的屏障环境内,照明设定为 12/12 h 明暗交替。饲予灭菌维持饲料、纯净水。动物伦理审批单位:维通利华实验动物技术有限公司机构实验动物管理和使用委员会,伦理审查号:P2021096。

2 方法

2.1 小儿风热清对呼吸道常见致病菌的影响  
2.1.1 菌株的培养及复核 平板培养及复核:将购买的 6 株细菌分别涂布于合适的琼脂斜面培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜复苏(肺炎链球菌和流感嗜血菌需 5%  $\text{CO}_2$ ),传代后,挑取单菌落,按照细菌总 DNA 提取试剂盒说明书,提取上述 6 株菌的总 DNA,将 PCR 扩增产物 16S rRNA 基因测序,利用 GeneBank 进行序列比对,复核 6 株供试菌的种属。液体培养:分别挑取 6 株细菌单菌落,接种于对应液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 18 ~ 24 h,使其处于对数生长期,备用。  
2.1.2 最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定 采用微板法开展本部分实验。

取待测药物适量,配成母液过  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜,采用二倍稀释法,制成含不同浓度梯度的液体培养基,每个浓度 3 个平行,以不含药的培养基作为阳性对照组,以含药不含菌的培养基作为阴性对照组,每孔体积均为  $100\ \mu\text{L}$ 。取 6 种菌的菌液,接种于对应液体培养基至终菌液浓度为  $5\times 10^5\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,于  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h (流感嗜血菌与肺炎链球菌需  $5\%\ \text{CO}_2$ ),与阴性对照组进行比较,以无细菌生长的最低浓度作为该成分对该菌的 MIC。

**2.1.3 最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 测定** 基于液体二倍稀释法测定出的 MIC 值,取未见细菌生长孔的培养液  $2\ \mu\text{L}$  涂布于对应无药琼脂表面, $37^\circ\text{C}$  继续培养 24 h,仍无细菌生长的药物最低浓度为 MBC。

**2.2 小儿风热清对呼吸道致病菌致肺上皮细胞损伤的影响**

**2.2.1 肺上皮细胞 A549 的培养** 本实验使用人肺上皮细胞 A549 细胞,细胞培养选择 DMEM 高糖培养基 (含  $10\%\ \text{FBS}$  和  $1\%\ \text{PS}$ ),将细胞培养在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\ \text{CO}_2$  环境,待细胞贴壁长至培养瓶底面积  $80\%$  后,使用  $0.25\%$  胰酶消化进行  $1:3$  传代。肺炎链球菌用 TSA/TSB 培养基 (需补充  $5\sim 7\%$  无菌脱纤维羊血),于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\ \text{CO}_2$  培养。

**2.2.2 CCK-8 法检测 A549 细胞活性** 本实验共分为正常对照组、模型组、阳性对照组、小儿风热清低 (细胞培养液体积的  $1\%$ )、中 (细胞培养液体积的  $2\%$ )、高剂量组 (细胞培养液体积的  $5\%$ )。实验前 1 d A549 细胞经  $0.25\%$  胰酶消化后接种于 96 孔板 ( $1\times 10^4$  个/孔),培养 24 h 后弃掉原来培养基,除正常对照组外,其余各组更换为含  $1\times 10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  肺炎链球菌的 DMEM 培养基,小儿风热清低、中、高剂量组分别加入含对应药物浓度的培养基,阳性对照组加入含地塞米松的培养基,终浓度为  $10\ \mu\cdot\text{mL}^{-1}$  同时设置不含药液的孔作为空白对照组,每组 3 个复孔, $37^\circ\text{C}$  培养 24 h。按 CCK-8 试剂盒说明书操作,于酶标仪  $450\ \text{nm}$  处测定吸光值并计算细胞存活率,以确定药物对 A549 细胞活性的影响。

**2.2.3 细胞上清液中炎症因子水平测定** 收集各组细胞上清液于无菌 EP 管中,保存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中。按照试剂盒说明书,分别测定炎症因子  $\text{NO}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{IL-6}$  的含量,评估小儿风热清对呼吸

道致病菌的抗炎效果。

**2.3 小儿风热清对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠急性肺损伤的影响**

**2.3.1 动物分组及给药** 雄性 BALB/c 小鼠,  $6\sim 7$  周龄,体质量  $18\sim 22\ \text{g}$ ,共 60 只,随机分成 6 组,每组 10 只,即正常对照组、模型组、阳性对照组、小儿风热清低、中、高剂量组。小儿风热清低剂量组按照  $5.4\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量给予小儿风热清药液;小儿风热清中剂量组按照  $10.8\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量给予小儿风热清药液;小儿风热清高剂量组按照  $21.6\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量给予小儿风热清药液;阳性对照组按照每只  $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量给药地塞米松;模型组给予等量蒸馏水。每天灌胃一次,连续给药 7 d。

**2.3.2 小鼠 LPS 诱导急性肺损伤模型建立** 末次给药 1 h 后,除正常对照组外,其余各组按以下造模方法构建急性肺损伤模型:腹腔注射水合氯醛,10 min 后见尾根、后肢、睫毛反射均消失,呼吸缓慢均匀为深度麻醉,小鼠麻醉后,头向下倾斜,将舌头用镊子牵出,用灌胃针吸取 LPS 溶液 (每只  $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),经咽后壁滴入口腔,迅速捏住鼻孔,维持 30 s 待液体全部吸入鼻腔,放入笼中让其自然苏醒。

**2.3.3 肺指数测定** 造模 24 h 后麻醉处死小鼠,打开胸腔,迅速取出肺组织,分析天平称定质量,计算肺指数。肺指数 = 肺质量/体质量

**2.3.4 血清中  $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$  水平的测定** 所有小鼠分别取血,分离血清,后续用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-6}$ 、 $\text{IL-1}\beta$  等炎症因子含量。

**2.3.5 肺组织病理学观察及评分** 肺组织称定质量后,于  $4\%$  多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋并 HE 染色,进行观察和对比,以肺组织病变的程度对其病理学分级评分。

病理学的变化是急性肺损伤模型最直观的指标之一,可直接反映肺组织炎症反应的程度。正常肺组织的特征是肺泡壁薄,偶见肺泡内巨噬细胞,中性粒细胞也较少;当肺组织受外源性 LPS 刺激出现急性炎症反应时,病理学表现为肺泡腔变小、肺泡壁充血水肿、炎性细胞尤其是中性粒细胞的浸润,严重时几乎无法辨认肺泡结构。病理学形态学检查的结果可以通过肺组织病理学半定量评分进行量化比较。根据 MIKAWA 等<sup>[11]</sup>经典的肺组织病理半定量评分

标准:对肺泡充血出血、炎性细胞浸润或聚集、肺泡壁增厚、肺组织石化 4 项指标,分别依病变轻重评为 0~4 分(0 分指无病变或非常轻微病变;1 分为轻度病变;2 分为中度病变;3 分为重度病变;4 分为极重度病变),总分 16 分,4 项评定分数总和为肺损伤的总评分。

2.4 统计学方法 使用 SPSS 21.0 对数据进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间多重比较分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA),结合最小显著性差异法(LSD)多重比较分析, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小儿风热清对呼吸道常见致病菌的抑制作用 用肉汤稀释法通过液体培养基的澄清度判断其最小抑菌浓度。采用双倍稀释法将小儿风热清浓度逐级稀释至 4、2、1、0.5、0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (均为终浓度)。如表 1 所示,可以看出,小儿风热清对 6 种供试细菌表现为高敏感现象,具有良好的抗菌活性。其中,对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度为 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌的最低抑制浓度为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对流感嗜血杆菌的最低抑制浓度为 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对肺炎链球菌的最低抑制浓度为 0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

如表 1 所示,用肉汤稀释法通过液体培养基的

表 2 对 6 种致病菌的杀菌 MBC 值( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

项目	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	肺炎克雷伯菌	流感嗜血杆菌	铜绿假单胞菌	肺炎链球菌
MBC	—	1	1	4	2	0.25

3.2 小儿风热清对呼吸道致病菌致肺上皮细胞损伤的影响 如图 1 所示。结果显示,小儿风热清(浓缩 4 倍药液)于细胞培养液体积的 1%~10% 加入时,对细胞活性不产生影响,但是当小儿风热清药液提高到培养液体积的 20% 时,可看到细胞活性明显下降。由此确定,本细胞实验使用小儿风热清浓度为小儿风热清低剂量组为细胞培养液体积的 1%、中剂量组为细胞培养液体积的 2%、高剂量组为细胞培养液体积的 5%。

如图 2 所示,CCK8 法检测肺炎链球菌感染及不同浓度小儿风热清处理后细胞的损伤程度。结果显示,与正常对照组比较,肺炎链球菌感染后,A549 细胞活力极显著下降( $P<0.0001$ ),细胞损伤程度极显著增加;与模型组比较,小儿风热清低、中、高剂量

澄清度判断其最小抑菌浓度,MIC 结果显示,小儿风热清对 6 种供试细菌表现为高敏感现象,具有良好的抗菌活性。其中,对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌的 MIC 值为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对流感嗜血杆菌的 MIC 值为 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对肺炎链球菌的 MIC 值为 0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

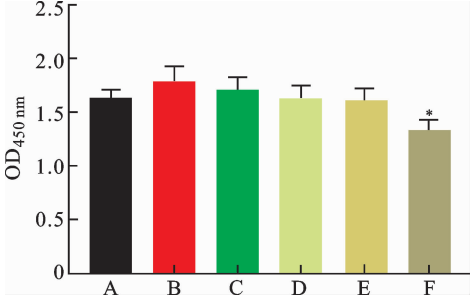
如表 2 所示,基于 MIC 实验结果,展开 MBC 实验。结果显示,小儿风热清除金黄色葡萄球菌外,对其他 5 种供试细菌均具有杀菌效果。其中,对大肠杆菌、肺炎克雷伯菌的 MBC 值为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对流感嗜血杆菌的 MBC 值为 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对铜绿假单胞菌的 MBC 值为 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对肺炎链球菌的 MBC 值为 0.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 1 不同浓度小儿风热清对 6 种致病菌的抑制效果

供试菌株	小儿风热清给药浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
	4	2	1	0.5	0.25
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	+
大肠杆菌	-	-	-	+	++
肺炎克雷伯菌	-	-	-	+	++
流感嗜血杆菌	-	+	++	+++	+++
铜绿假单胞菌	-	-	-	+	++
肺炎链球菌	-	-	-	-	-

注:-表示无细菌生长,+表示有细菌生长,其中,+表示轻度浑浊,++表示浑浊,+++表示十分浑浊

组细胞损伤程度得到极显著改善,细胞活力升高。提示小儿风热清可提高 A549 细胞抵抗肺炎链球菌感染的能力。



A. 正常对照组;B. 小儿风热清-1%;C. 小儿风热清-2%;D. 小儿风热清-5%;E. 小儿风热清-10%;F. 小儿风热清-20%;与正常对照组相比,\* $P<0.05$

图 1 不同浓度的小儿风热清对 A549 细胞活性的影响

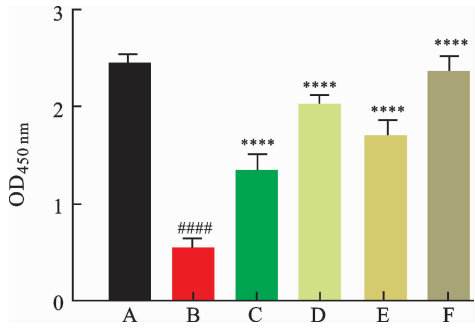
如图 3 所示,与正常对照组比较,肺炎链球菌感

染后,细胞上清液中 NO 水平( $P<0.001$ )、IL-1 $\beta$  水平( $P<0.001$ )显著升高;与模型组比较,小儿风热清低、中、高剂量组细胞上清液中 NO、IL-1 $\beta$  水平降低。提示小儿风热清表现出一定的抗炎能力。

**3.3 小儿风热清对脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肺损伤的影响** 如图 4 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠肺指数明显升高( $P<0.001$ );与模型组比较,阳性对照组小鼠肺指数明显降低( $P<0.01$ ),小儿风热清高剂量给药组小鼠肺指数明显降低( $P<0.05$ )。

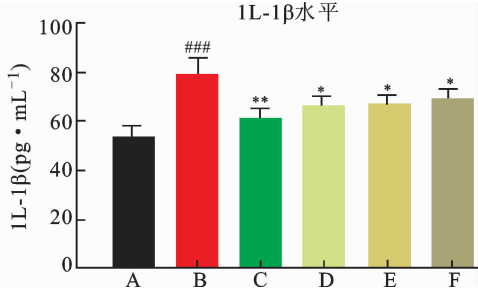
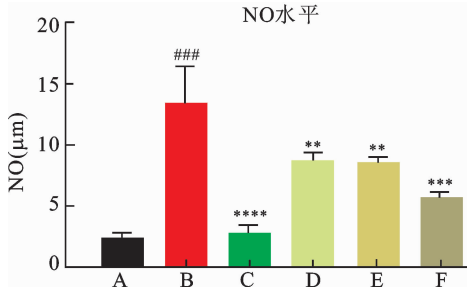
如图 5 所示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ )、IL-1 $\beta$  ( $P<0.001$ )、IL-6 ( $P<0.05$ ) 水平显著升高;与模型组比较,阳性对照组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ )、IL-1 $\beta$  ( $P<0.01$ )、IL-6 ( $P<0.001$ ) 水平显著降低;与模型组比较,小儿风热清低剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  ( $P<0.001$ )、IL-1 $\beta$  ( $P<0.001$ )、IL-6 ( $P<0.01$ ) 水平明显降低;小儿风热清中剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ )、IL-6

( $P<0.01$ ) 水平明显降低,IL-1 $\beta$  ( $P<0.0001$ ) 水平极显著降低;小儿风热清高剂量组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ )、IL-1 $\beta$  ( $P<0.001$ )、IL-6 ( $P<0.01$ ) 水平显著降低。



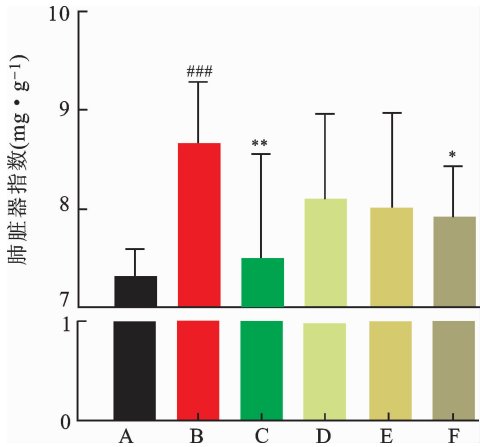
A. 正常对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 小儿风热清低剂量组;E. 小儿风热清中剂量组;F. 小儿风热清高剂量组;与正常对照组相比,#### $P<0.0001$ ;与模型组相比,\*\*\*\* $P<0.0001$

图 2 小儿风热清对 A549 细胞抵抗肺炎链球菌感染能力的影响



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 小儿风热清低剂量组;E. 小儿风热清中剂量组;F. 小儿风热清高剂量组;与正常对照组相比,### $P<0.001$ ,与模型组相比,\*\*\*\* $P<0.0001$ ,\*\*\* $P<0.001$ ,\*\* $P<0.01$ ,\* $P<0.05$

图 3 小儿风热清对肺炎链球菌感染感染细胞后细胞上清中 NO、IL-1 $\beta$  水平变化



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 小儿风热清低剂量组;E. 小儿风热清中剂量组;F. 小儿风热清高剂量组;与正常对照组相比,### $P<0.001$ ;与模型组相比,\*\* $P<0.01$ ,\* $P<0.05$

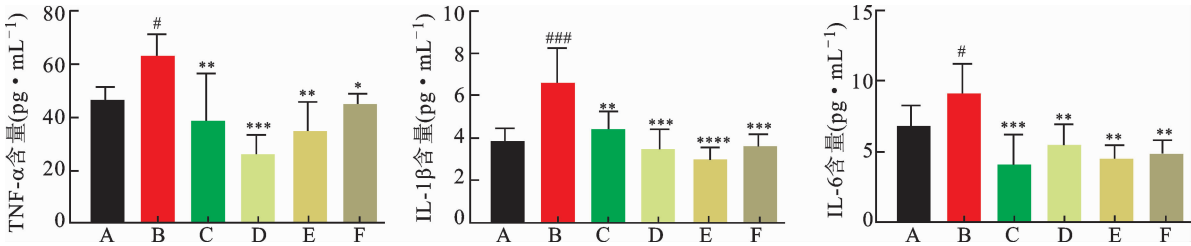
图 4 小儿风热清对 LPS 诱导急性肺损伤小鼠肺指数的影响

如图 6A 所示,正常对照组肺脏组织表面被覆一层光滑的浆膜,无明显异常;肺脏实质为肺内支气管各级分支及其终末的大量肺泡,各级支气管结构无明显异常,肺泡壁由单层上皮组成,结构清晰;间质包括肺内结缔组织及血管等,均无明显异常,未见明显的炎性改变。如图 6B 所示,模型组组织中可见较多肺泡壁增厚,伴有重度的中性粒细胞与淋巴细胞浸润(黑色箭头),可见多处出血(黄色箭头),大量炎性细胞浸润至支气管管腔内(黄色箭头)。如图 6C 所示,与模型组比较,阳性对照组小鼠肺组织中肺泡壁增厚和肺组织出血的现象得到明显改善,肺泡壁上可见散在的淋巴细胞与中性粒细胞浸润(黑色箭头)。如图 6D 所示,与模型组比较,小儿风热清低剂量组组织中呈现轻度的肺泡壁增厚与淋巴细胞与中性粒细胞浸润(黑色箭头),肺泡充血出



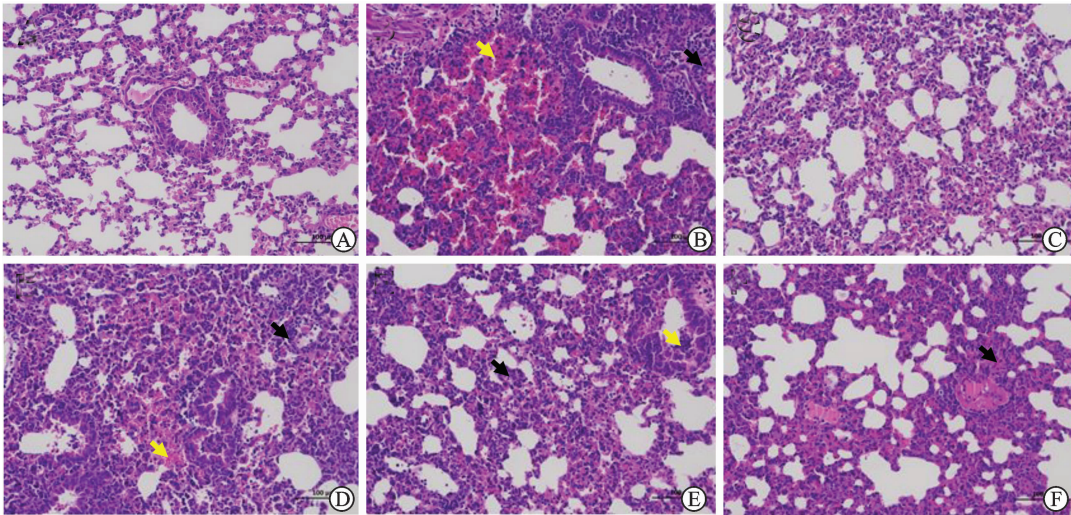
血的现象得到明显的好转。如图 6E 所示,与模型组比较,小儿风热清中剂量组肺泡充血出血以及肺泡壁增厚现象得到明显的改善,肺组织伴有少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润(黑色箭头),支气管黏膜上皮细胞未见明显的变性、坏死。如图 6F 所示,与模型组比

较,小儿风热清高剂量组肺组织中肺泡壁增厚和肺泡充血出血现象得到改善,肺泡壁上与肺泡腔内有少量淋巴细胞与中性粒细胞浸润(黑色箭头)。各给药组小鼠肺组织、肺泡出血、水肿、肺内细支气管周围炎症等病变与模型组相比有不同程度地减轻。



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 小儿风热清低剂量组;E. 小儿风热清中剂量组;F. 小儿风热清高剂量组;与正常对照组相比,###*P*<0.001, #*P*<0.05;与模型组相比,\*\*\*\**P*<0.0001, \*\*\**P*<0.001, \*\**P*<0.01, \**P*<0.05

图 5 小儿风热清对 LPS 诱导急性肺损伤小鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 小儿风热清低剂量组;E. 小儿风热清中剂量组;F. 小儿风热清高剂量组。

图 6 小儿风热清对 LPS 诱导肺炎小鼠肺组织病理变化的影响(HE,×200)

如表 3 所示,分别从肺泡充血出血、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集、肺泡壁增厚和肺组织实化四个维度对肺部病变进行病理评分。与正常对照组比较,模型组小鼠的肺组织病变明显,炎性细胞浸润程度极显著升高(*P*<0.0001),肺泡壁明显增厚

(*P*<0.01),肺组织石化极显著升高(*P*<0.0001),肺损伤程度病理总评分极显著升高(*P*<0.0001);与模型组比较,小儿风热清中剂量组小鼠肺组织损伤程度得到改善,肺损伤程度病理总评分显著降低(*P*<0.01)。

表 3 小儿风热清对小鼠肺损伤程度病理评分的影响( $\bar{x}\pm s$ ,*n*=10)

组别	炎性细胞浸润 程度病理评分	肺泡充血出血 病理评分	肺泡壁增厚 病理评分	肺组织石化 病理评分	肺损伤程度 病理评价总分
正常对照组	0.50±0.53	0.20±0.42	0.10±0.32	0.10±0.32	0.90±0.74
模型组	2.50±0.76####	0.50±0.71	1.00±0.82##	1.71±1.38####	5.38±2.88####
阳性对照组	1.63±0.52 *	0.11±0.33	0.56±0.53	0.63±0.74 *	2.86±1.35 *
小儿风热清低剂量组	1.80±0.63	0.11±0.33	0.88±0.83	0.44±0.53 **	3.56±1.59
小儿风热清中剂量组	1.63±0.52 *	0.20±0.42	0.78±0.44	0.22±0.44 ***	2.89±0.93 **
小儿风热清高剂量组	1.63±0.52 *	0.40±0.52	0.80±0.45	0.40±0.52 **	3.43±1.13

注:与正常对照组相比,####*P*<0.0001,##*P*<0.01;与模型组相比,\*\*\**P*<0.001,\*\**P*<0.01,\**P*<0.05

## 4 讨论

急性上呼吸道感染属于中医学“感冒”范畴,是由细菌或病毒侵袭人体所引起的一种急性炎症<sup>[20]</sup>,也是临床的多发病、常见病,如果不能及时治疗将发展成肺炎等影响人体健康的多种呼吸系统疾病。目前细菌感染或病毒合并细菌感染引起的急性上呼吸道感染<sup>[21-23]</sup>,治疗多选用抗生素、免疫增强剂等,随着抗生素的大量使用,细菌的耐药现象日益严重,中药的抑菌作用开始受到人们的关注<sup>[24-27]</sup>,中药抑菌成分较多,可作用于细菌的不同部位和繁殖的不同阶段,并对细菌的多个代谢环节作用,故不易产生耐药性<sup>[28-30]</sup>。因此研究和开发抗菌中药具有重要意义。

小儿风热清口服液是儿科感冒常用药,为“辛凉平剂”银翘散化裁,由金银花、连翘、板蓝根、薄荷、柴胡、牛蒡子、荆芥穗、石膏、黄芩、栀子、桔梗、赤芍、芦根、炒苦杏仁、淡竹叶、枳壳、炒六神曲、僵蚕、防风、甘草 20 味药经煎煮后浓缩、沉淀、滤过,再历经灌装、灭菌等现代化制药先进工艺制成。具有辛凉解表、清热解毒、止咳利咽的功效,适用于发热、咳嗽、咳痰、鼻塞流涕、咽喉红肿疼痛等症状。经文献检索<sup>[31-38]</sup>,近三年来,儿童细菌性急性上呼吸道感染病原体排名前六依次是:金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌。因此,选用这六种常见呼吸道致病菌,开展小儿风热清体外抗菌实验,结果显示,小儿风热清对于六种呼吸道常见致病菌均有显著抑制作用;对于除金黄色葡萄菌之外的其它五种呼吸道常见致病菌有杀菌效果。

上皮细胞是发挥机体黏膜免疫防御功能的主要结构细胞,其中肺泡上皮细胞是细菌等病原微生物感染肺部时最主要的靶细胞,其在接受细菌不同成分刺激后表现出不同程度的损伤及损伤后效应<sup>[39]</sup>,包括紧密连接的破坏、炎症因子分泌的增加、趋化因子、抗菌肽的释放等,进一步诱发机体固有和适应性免疫应答,在肺部病原微生物的清除中发挥重要作用<sup>[40]</sup>。因此本研究以人肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549 细胞)为研究对象,探讨小儿风热清对肺炎链球菌造成 A549 细胞损伤的保护作用。实验结果表明,小儿风热清可有效抑制肺炎链球菌导致的肺上皮细胞损伤。

据文献报道,细菌性肺炎多是用相应的细菌菌液直接注射或者喷洒建立细菌性肺炎模型,由于本实验室条件有限,选用细菌内毒素进行动物模型的建立,验证小儿风热清对 LPS 诱导的急性肺损伤的影响。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要组成成分,是细菌内毒素,LPS 进入机体后,可以使肺组织中大量炎性细胞趋化,并伴随着炎性介质的过度表达,最终导致急性肺损伤的发生。本文使用 LPS 诱导建立急性肺损伤模型,初步研究小儿风热清的抗菌药理作用。本实验发现小儿风热清能够降低 LPS 诱导肺炎小鼠肺指数,改善 LPS 所致肺组织病理形态学异常,降低小鼠血清中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平,提示小儿风热清对 LPS 所致的急性肺损伤具有治疗作用。

综上,研究表明小儿风热清具有有效的抑菌和杀菌效果,且能够改善肺炎链球菌感染 A549 细胞造成的细胞损伤情况,对 LPS 诱导的急性肺损伤具有治疗作用,且具有显著抗炎能力。后续将进一步进行小儿风热清对细菌性肺炎影响的研究,为其临床应用提供实验依据。

## 参考文献

- [1] NAGATA Y, YAMAMOTO S, KATO K. Immune checkpoint inhibitors in e-sophageal cancer: clinical development and perspectives [J]. Human vaccines & Immunotherapeutics, 2022, 18(6): 2143177.
- [2] 刘宇英, 魏君丽, 江柔, 等. 食管癌的流行病学及筛查研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(7): 839-844.
- [3] 赫捷, 陈万青, 李兆申, 等. 中国食管癌筛查与早诊早治指南 (2022, 北京) [J]. 中国肿瘤, 2022, 31(6): 401-436.
- [4] 郑玉玲, 张亚玲. 《中西医结合食管癌治疗方案专家共识》(2021 年版) 解读 [J]. 现代中医药, 2021, 41(6): 11-15.
- [5] TSUCHIYA N, KUNISAKI C, SATO S, et al. Chemoradiotherapy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. Langenbeck, Archives of Surgery, 2022, 407(5): 1911-1921.
- [6] YANG YM, HONG P, XU WW, et al. Advances in targeted therapy for e-sophageal cancer [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5: 229.
- [7] 韩天赐, 刘斌, 张亮. 食管癌新辅助免疫治疗研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(13): 2460-2464.
- [8] 刘前林, 周俊东. 食管癌放疗联合免疫治疗的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2024, 17(5): 590-594.
- [9] ZHAO B, HUI XD, WANG J, et al. Matrine suppresses lung cancer metastasis via targeting M2-like tumour-associated-macrophages polarization [J]. American Journal of Cancer Research, 2021, 11(9): 4308-4328.



[10] 旦增旺姆, 韩广素, 李晨露, 等. 中药调节肿瘤免疫微环境发挥抗肿瘤作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2023, 15(6): 410-414.

[11] 杨迎, 侯婷婷, 王威, 等. 黄精多糖的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(3): 659-665.

[12] 权利娜, 王露, 王嘉雯, 等. 多花黄精总皂苷的提取工艺及体外抗氧化研究[J]. 现代中医药, 2022, 42(5): 47-51.

[13] 罗婷, 罗丹, 甘露. 黄精多糖的现代药理作用研究进展[J]. 临床合理用药, 2023, 16(2): 177-180.

[14] 边金焯, 杜李继, 王子丽, 等. 黄精多糖与积雪草苷对糖尿病斑马鱼尾鳍再生的药效学研究[J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(7): 592-598.

[15] 龙杰凤, 陈文经, 李金巧. 黄精多糖提取工艺及降糖活性研究[J]. 亚太传统医药, 2024, 2(4): 49-53.

[16] 李佳纯, 刘继业. 黄精多糖抗衰老的研究进展[J]. 实用老年医学, 2024, 38(4): 334-337.

[17] 丛悦, 李莉, 关佳莉, 等. 黄精多糖对 X 射线辐射损伤小鼠外周血象及肠道菌群的影响研究[J]. 现代中药研究与实践, 2024, 38(1): 24-29.

[18] XIAO LX, QI L, ZHANG GZ, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharides attenuate lipopoly-saccharide-induced septic liver injury by suppression of pyroptosis via NLRP3/GSDMD signals[J]. Molecules, 2022, 27(18): 5999.

[19] LIU TY, ZHAO LL, CHEN SB, et al. polygonatum sibiricum polysaccharides prevent LpS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation via the TLR4/Myd88/NF-KB pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 20(4): 3733-3739.

[20] LONG TT, LIU ZJ, SHANG JC, et al. polygonatum sibiricum polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MapK/NF-KB signaling pathways[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 813-821.

[21] BETANCOURT-CUELLAR SL, BENVENISTE MFK, PALACIO DP, et al. Esophageal cancer: tumor-node-metastasis staging[J]. Radiologic clinics of North America, 2021, 59(2): 219-229.

[22] 齐义军, 朱亚飞, 李恩民. 食管癌转移的表观遗传学改变研究进展[J]. 食管疾病, 2021, 3(1): 58-63.

[23] PENMAN ID, HENRY E. Advanced esophageal cancer[J]. Gastrointestinal Endoscopy clinics of North America, 2005, 15(1): 101-116.

[24] YAMAMOTO S, KATO K. pembrolizumab for the treatment of esophageal cancer[J]. Expert opinion on Biological Therapy, 2020, 20(10): 1143-1150.

[25] 杨慧超, 荀敬, 姜晓琳, 等. 中医药治疗食管癌的作用机制研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2024, 30(3): 419-423.

[26] XU F, SHANGGUAN X, PAN JH, et al. HoXD13 suppresses prostate cancer metastasis and Bmp4-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting SMAD1[J]. International Journal of cancer, 2021, 148(12): 3060-3070.

[27] 何伟, 胡勇, 佟雅婧. 肿瘤免疫抑制及炎性微环境的中医病机[J]. 现代中医药, 2022, 42(6): 1-5.

[28] 柴国静, 帖彦清, 赵海利. 肿瘤相关巨噬细胞对肿瘤转移的影响及靶向治疗的研究进展[J]. 中国医药, 2024, 19(4): 638-640.

[29] LIN YX, XU JX, LAN HY. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications[J]. Journal of Hematology & oncology, 2019, 12(1): 76.

[30] 魏晓环, 单前前, 朱军. LPS 诱导巨噬细胞 M1 型极化对肿瘤生长的影响[J]. 中国现代医生, 2024, 62(3): 54-59.

[31] GENIN M, CLEMENT F, FATTACCIOLI A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THp-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to topotecan[J]. BMC cancer, 2015, 15: 577.

[32] BHAT AA, NISAR S, MAACHA S, et al. cytokine-chemokine network driven metastasis in esophageal cancer; promising avenue for targeted therapy[J]. Molecular cancer, 2021, 20(1): 2.

[33] 陈吉豪, 唐佳佳, 陈晓钢, 等. LGR4 通过调控上皮-间充质转化促进宫颈癌转移[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(3): 413-420.

[34] 卢洪胜, 於樱枝, 牟樱红, 等. FOXK1 通过上皮间充质转化促进胃癌浸润转移研究[J]. 现代实用医学, 2018, 30(4): 436-438, 416.

[35] HUANG RL, WANG SQ, WANG N, et al. ccL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating  $\beta$ -catenin/STAT3 signaling[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11(4): 234.

[36] YANG C, DOU R, XIONG B, et al. Tumor-derived exosomal miRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis[J]. Mol Ther, 2021, 29(6): 2088-2107.

[37] BOUTILIER AJ, ELSAWA SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 6995.

[38] YU T, GAN SC, ZHU QC, et al. Modulation of M2 macrophage polarization by the crosstalk between Stat6 and Trim24[J]. Nature communications, 2019, 10: 4353.

[39] HUANG CY, WANG J, LIU HB, et al. Ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate ameliorates colitis by promoting M2 macrophage polarization through the STAT6-dependent signaling pathway[J]. BMC Medicine, 2022, 20(1): 148.

[40] QUERO L, HALL J, KYBURZ D, et al. miR-221-3p Drives the Shift of M2-Macrophages to a Pro-Inflammatory Function by Suppressing JAK3/STAT3 Activation[J]. Front Immunol, 2020, 10: 3087.