

· 基础研究 ·

宣白承气汤对流感病毒和肺炎链球菌共感染致肺肠免疫损伤的影响

徐文涛¹ 王雪峰² 杨建树¹ 张秀英² 齐 心¹ 蔡 壮¹

摘要 **目的** 基于叉头盒 P3 (Foxp3) / 维甲酸相关核孤儿受体 γ t (ROR γ t) 免疫失衡机制分析相关细胞因子及肠道菌群的变化, 探讨宣白承气汤对流感病毒 (IV) 和肺炎链球菌 (Spn) 共感染所致肺肠损伤的作用机制。**方法** 将 96 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、中药组、西药组, 每组 24 只。除正常组外, 其余组用流感病毒溶液滴鼻, 72 h 后用肺炎链球菌滴鼻, 24 h 后形成共感染模型。中药组予宣白承气汤 1.0 g/kg 灌胃, 西药组予奥司他韦 22.8 mg/kg 联合头孢 56.9 mg/kg 灌胃, 空白组与模型组予以等量生理盐水, 各组均每天 1 次, 持续给药 7 天。在 3、5、7 天时 HE 染色观察肺肠组织病理变化; 采用 ELISA 法检测小鼠血清 IL-17、IL-10 表达; 采用 Western Blot 法检测肺肠组织中 Foxp3、ROR γ t 蛋白的表达; 采用 16S rDNA 测序观察小鼠肠道菌群结构与组成情况。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肺泡间隔破裂, 肺间质水肿, 大量炎性细胞聚集, 肠组织单层柱状上皮细胞间紧密连接破坏, 数量减少, 黏膜层有大量炎性细胞浸润; 肺指数升高 ($P<0.01$); 血清 IL-17 水平升高、IL-10 水平降低 ($P<0.01$), Foxp3 蛋白表达量降低, ROR γ t 蛋白表达量升高 ($P<0.01$), 肠道菌群丰度与多样性均降低。与模型组比较, 中药组与西药组小鼠的肺肠组织病理损伤有明显改善; 肺指数降低 ($P<0.01$); 血清 IL-17 水平降低、IL-10 水平增高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 明显上调肺肠组织 Foxp3 蛋白表达水平、下调 ROR γ t 蛋白表达水平 ($P<0.05$, $P<0.01$); 各药物组干预后肠道菌群丰度和多样性均升高。**结论** 宣白承气汤干预治疗 IV/SPN 共感染, 可以进一步调节肺肠 Foxp3、ROR γ t 及其相关细胞因子表达, 调节免疫微环境, 可能通过调整肠道菌群的结构和多样性对 IV/SPN 共感染所致肺肠损伤起到治疗作用。

关键词 共感染; 基于叉头盒 P3/ 维甲酸相关核孤儿受体 γ t; 宣白承气汤; 肺肠损伤; 肠道菌群; 中药复方

Effect of Xuanbai Chengqi Decoction on Pulmonary and Intestinal Immune Injury Induced by Co-infection of Influenza Virus and *Streptococcus Pneumoniae* XU Wen-tao¹, WANG Xue-feng², YANG Jian-shu¹, ZHANG Xiu-ying², Qi Xin¹, and Cai Zhuang¹ 1 Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847); 2 Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032)

ABSTRACT **Objective** Based on the Forkhead Box P3 (Foxp3) / Retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR γ t) immune imbalance mechanism, to analyze the changes of related cytokines and intestinal flora, and to explore the mechanism of Xuanbai Chengqi Decoction (XBCQD) on lung and intestinal injury caused by influenza virus (IV) and *Streptococcus pneumoniae* (SPN) co-infection. **Methods** Totally 96 mice were divided into normal group, model group, Chinese medicine group, and Western medicine group according to the random number table, with 24 mice in each group. Except for the normal group, all groups were intranasally administered IV solution. After 72 h, *Streptococcus pneumoniae* was intranasally administered, and a co-infection model was formed after 24 h. The Chinese medicine group was given XBCQD 1.0 g/kg by gavage. The Western medicine group was given oseltamivir 22.8 mg/kg combined with cephalosporin 56.9 mg/kg by gavage, and the blank group

基金项目: 中医药循证能力建设项目课题 (No. 2019XZZX-LG006); 国家自然科学基金面上项目 (No. 81973907)

作者单位: 1. 辽宁中医药大学研究生学院 (沈阳 110847); 2. 辽宁中医药大学附属医院儿科 (沈阳 110032)

通讯作者: 王雪峰, Tel: 024-82961169, E-mail: lnzywxf@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20230809.211

and the model group were given an equivalent amount of normal saline. Each group was administered one dose per day for 7 days. HE staining was used to observe the pathological changes of lung and intestinal tissues at 3, 5 and 7 days. The expression of IL-17 and IL-10 in the sera of mice was detected using ELISA. The expression of Foxp3 and ROR γ t proteins in lung and intestinal tissues was detected via Western Blot. The structure and composition of intestinal flora in mice were observed through 16 S rDNA sequencing. **Results** Compared with the normal group, the alveolar septum of the mice in the model group was ruptured, pulmonary interstitial edema was present, many inflammatory cells converged, the tight junction between the single-layer columnar epithelial cells of the intestinal tissue was destroyed, the number was reduced, and a large number of inflammatory cells infiltrated in the mucosal layer. The lung index increased ($P<0.01$). The serum IL-17 level increased, the IL-10 level decreased ($P<0.01$), the expression of Foxp3 protein decreased, and the expression of ROR γ t protein increased ($P<0.01$). The abundance and diversity of intestinal flora decreased. Compared with the model group, the pathological damage of lung and intestinal tissues in the Chinese medicine group and the Western medicine group was significantly improved. The lung index significant decrease ($P<0.01$). The serum IL-17 level decreased, and the IL-10 level increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression of Foxp3 protein in lung and intestinal tissue up-regulated, and the expression of ROR γ t protein down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). The abundance and diversity of intestinal flora increased after intervention in each drug group. **Conclusions** The intervention of XBCQD in the treatment of IV/SPN co-infection can further regulate the expression of Foxp3, ROR γ t, and related cytokines in lung and intestinal tissues. Furthermore, this intervention can regulate the immune microenvironment, which may play a therapeutic role in lung and intestinal injury caused by IV/SPN co-infection by modulating the structure and diversity of intestinal flora.

KEYWORDS co-infection; Foxp3/ROR γ t; Xuanbai Chengqi Decoction; lung and intestine injury; intestinal flora; Chinese herbal compound

呼吸道感染性疾病是全世界最普遍的致死原因之一^[1], 在 1918 年流感大流行中, 全球超过 5 000 万人死亡, 死于继发性细菌感染占比为 95%。2009 年甲型 H1N1 流感大流行, 造成全球约 28.4 万人死亡, 而流感病毒继发细菌感染有着 18%~34% 重症病例和高达 55% 的死亡病例^[2], 其中肺炎链球菌是最常见的病原体^[3, 4]。流感病毒 (influenza virus, IV) 和细菌共感染发生时病原体毒力更强, 有着更高的发病率和病死率^[2]。严重的流感大流行时, 在很大程度上是合并细菌感染的问题^[4]。儿童因其免疫系统发育尚未健全, 流感发作之后, 大大增加了继发细菌感染的发生几率, 严重威胁儿童健康^[5]。当前, 在治疗方面虽然有很多抗菌药物及疫苗使用, 但对于共感染导致的严重肺部疾病的治疗, 效果却是一般。

近年来, 肺—肠轴的提出也引起业内学者的广泛关注, 两者可能通过微生物菌群的变化, 产生了联系^[6], 很多肺部疾病常伴随着肠道病变如肠屏障受损、肠道菌群失衡。研究也表明, 肠道菌群可以通过参与宿主免疫来调节肺部感染, 通过肺肠同调, 起到靶向治疗的目的^[7-9]。目前, 关于中医药防治 IV/肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SPN) 共感染性疾病的相关报道较少, 而中医药具有广谱杀灭或

抑制病毒、调节人体免疫功能的作用, 而且有着用药相对安全、无菌群失调及二重感染的特点, 在感染性疾病取得较好的临床疗效^[10]。宣白承气汤能够宣发肺气, 散肠腑热结, 共奏“下病治上、脏腑合治、相辅相成之妙”, 是临床治疗的常用方剂, 疗效确切^[11, 12]。研究发现流感病毒感染和肺炎链球菌感染后免疫稳态破坏均与基于叉头盒 P3 (Forkhead Box P3, Foxp3) / 维甲酸相关核孤儿受体 γ t (Retinoic acid-related orphan receptor γ t, ROR γ t) 失衡密切相关^[13], 本研究以 Foxp3/ROR γ t 免疫失衡为切入点, 通过观察不同时间点肺肠组织中相关蛋白表达, 血清中细胞因子白细胞介素 -17 (interleukin-17, IL-17)、IL-10 的变化, 及肠道菌群在 IV/SPN 共感染中的变化, 分析宣白承气汤在肺肠同治过程中的作用机制。

材料与方法

1 动物 96 只, 6~8 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠, 体重 (18 ± 2) g, 雌雄各半, 购自辽宁长生公司 [许可证号: SCXK (辽) 2021—0001]。实验按照辽宁中医药大学实验动物伦理委员会动物实验操作要求严格执行 (No.21000042021111)。

2 药物 宣白承气汤组成:生石膏 15 g 杏仁 5 g 大黄 10 g 瓜蒌 10 g, 均购自辽宁中医药大学附属医院;奥司他韦(规格:15 mg, 东阳光长江药业股份有限公司, 批号:0372108070);头孢克肟干混悬剂(规格:0.125 g, 苏州西克罗制药有限公司, 批号:D500578)。

3 病毒、鸡胚与细胞 甲型流感病毒鼠肺适应株 A/FM/1/47 (H1N1) (辽宁中医药大学附属医院病毒室提供);无特定病原体 9 日龄 SPF 级鸡胚(辽宁益康公司);肺炎链球菌常见定植菌株 ATCC 49619 (北京百欧博伟公司, 批号:bio-53178)。

4 主要试剂及仪器 主要试剂:Minute 总蛋白提取试剂盒(美国 Invent Biotechnologies 公司, 批号:SD-001);BCA 试剂盒(碧云天公司, 批号:P0010);Anti-ROR γ t 抗体(美国 SAB 公司, 批号:33794);Anti-Foxp3 抗体(美国 SAB 公司, 批号:41822); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号:AF7018);HRP 标记羊抗兔二抗(江苏亲科公司, 批号:S0001#209)。主要仪器:WB 电泳仪(Bio-Rad 公司, 美国, 型号:PowerPac HV);酶标仪(Bio-Tek 公司, 美国, 型号:Epoch);凝胶成像(天能科技有限公司, 中国, 型号:Tanon 5200 Multi 全自动化学发光系统)。

5 共感染模型建立 将 96 只小鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、中药组、西药组, 每组 24 只。小鼠用乙醚浸泡过的棉球放置在麻醉罐中, 除正常组外逐个放置于其中, 处于密封状态。观察到小鼠逐渐出现无力迹象后, 立即将其取出, 将其头部向上抓住, 并用移液枪将 100 μ L 100 LD₅₀ 流感病毒溶液滴鼻, 72 h 后将 100 μ L 1×10^6 CFU 肺炎链球菌滴到小鼠的鼻孔中, 形成共感染模型^[14], 24 h 后造模完成, 开始灌胃给药。按照成人—小鼠体表面积给药剂量换算表对小鼠给药剂量进行换算^[15], 小鼠每天给予临床等效剂量为 60 kg 成人剂量的 9.1 倍。中药组药物出膏率为 0.17, 由此换算出每天给宣白承气汤药剂量为 1.0 g/kg。西药组奥司他韦每天给药剂量为 22.8 mg/kg, 头孢克肟干混悬剂每天给药剂量为 56.9 mg/kg, 中药组与西药组均每天 1 次, 持续给药 7 天。

6 检测指标及方法

6.1 肺指数 给药后第 3、5、7 天, 在禁食 8 h 后, 对小鼠称量体重, 处死小鼠后称量肺。计算脏器指数:肺指数(%) = 肺湿重(g) / 体重(g) $\times$ 100%。

6.2 肺肠组织组织形态学检测 肺肠组织病理

切片、染色, 称量后, 取血、肺组织及肠组织, 进行脱水、包埋、制成 4~5 μ m 切片并染色, 在显微镜下观察肺肠组织的病理改变。

6.3 ELISA 法检测血清中 IL-10、IL-17 细胞因子水平 提取冷冻后的血清, 按操作步骤进行酶联免疫吸附试验。首先将标准品配制完成, 取出 96 孔板, 分别加入不同浓度标准品, 待检样品 0.1 mL 分别加入反应孔内, 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 2 h。移除每孔液体, 加入新鲜稀释工作液 A 0.1 mL; 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 加入新鲜稀释工作液 B 0.1 mL; 在 37 $^{\circ}$ C 温箱中孵育 1 h 后, 加入底物显色工作液, 孵育 10~20 min, 加入终止液, 在 450 nm 下, 采用酶标仪测定各组样品的吸光度, 并用标准曲线进行浓度测定。

6.4 Western Blot 法检测 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达 取小鼠肺肠组织, 按照提取总蛋白试剂盒要求加入蛋白酶抑制剂, 充分裂解样本后提取总蛋白; 加入上样缓冲液, 煮沸变性后冻存备用; 制胶后电泳, 再将蛋白转移至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜, 加入二抗, 摇床孵育 1 h 后, 加入显色剂 ECL 显影。

6.5 16S rRNA 检测肠道菌群变化 取 500 mg 回肠内容物进行基因组 DNA 的提取, 16S rDNA V3-V4 区进行 PCR 扩增及建库, 进行高通量测序, 委托沈阳赛诺科技有限公司协助完成。

7 统计学方法 数据均用 SPSS 27.0 进行分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同期组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD-t 检验, 若方差不齐采用 Dunnett T3 检验; 组内不同时间点的比较采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般状态观察 正常组小鼠明显活跃, 皮色光滑, 正常饮食, 无发热、打喷嚏等表现; 模型组小鼠出现不同程度的活动减少、精神萎靡, 发热、气促、饮食不佳, 出现弓背竖毛表现, 在观察粪便后发现, 模型组小鼠出现大便燥结表现; 在中药组和西药组给药后, 小鼠一般状态较模型组明显减轻, 活动和饮食增加, 精神状态、打喷嚏、咳嗽症状明显改善, 毛发逐渐恢复光泽, 粪便逐渐恢复正常软便。

2 各组小鼠肺指数比较(表 1) 感染后第 3、5、7 天, 与正常组同期比较, 模型组各时间肺指数均升高($P < 0.01$); 与模型组同期比较, 中药组与西药组肺指数各时间均降低($P < 0.01$)。中药组与西药组随着给

表 1 各组小鼠肺指数比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

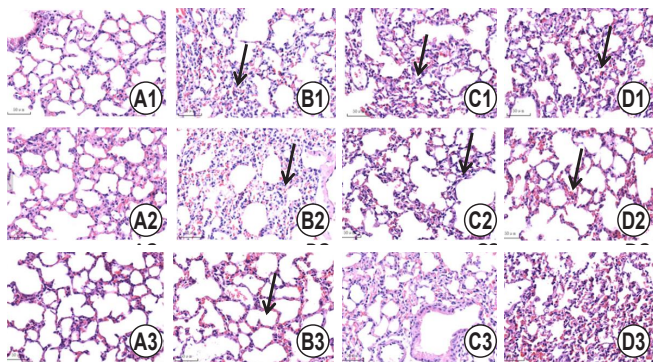
组别	n	肺指数		
		3 天	5 天	7 天
正常	8	0.66 ± 0.23	0.66 ± 0.21	0.65 ± 0.17
模型	8	0.80 ± 0.14*	0.82 ± 0.15*	0.85 ± 0.23*
中药	8	0.77 ± 0.06 [△]	0.73 ± 0.16 [△]	0.69 ± 0.19 [△]
西药	8	0.74 ± 0.10 [△]	0.72 ± 0.20 [△]	0.70 ± 0.20 [△]

注: 与正常组同期比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, [△] $P < 0.01$

药时间延长, 肺指数均逐渐趋于正常, 两组组内和组间不同时间点比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

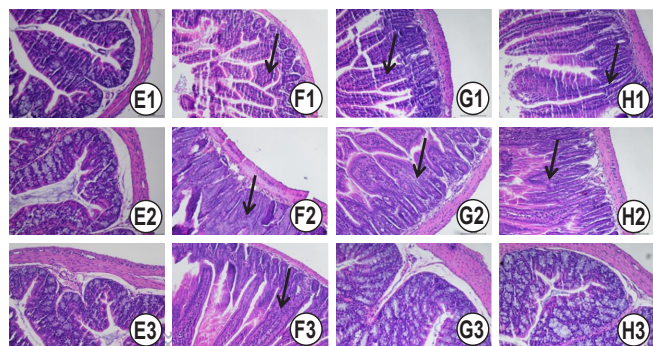
3 各组小鼠肺、肠病理组织学比较 (图 1、2) 正常组肺泡组织形态清楚, 无渗出, 出血、无炎性细胞, 肺泡间隔无增厚; 模型组肺泡间隔破裂、变宽, 大范围肺泡融合, 肺间质水肿, 大量炎性细胞聚集。与模型组比较, 中药组与西药组随着干预时间延长炎症细胞的浸润和肺泡间隔破裂、肺泡壁增厚情况均有所降低, 并且到第 7 天时肺泡结构基本恢复正常。

正常组小鼠肠组织结构较完整, 柱状上皮细胞与杯状细胞排列整齐; 模型组小鼠肠组织单层柱状上皮



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为中药组; D 为西药组; A1、B1、C1、D1 为 3 天, A2、B2、C2、D2 为 5 天; A3、B3、C3、D3 为 7 天; 箭头所指为明显病变处

图 1 各组小鼠肺组织病理结果比较 (HE, ×200)



注: E 为正常组; F 为模型组; G 为中药组; H 为西药组; E1、F1、G1、H1 为 3 天, E2、F2、G2、H2 为 5 天, E3、F3、G3、H3 为 7 天; 箭头所指为明显病变处

图 2 各组小鼠肠组织病理结果比较 (HE, ×200)

细胞间紧密连接破坏, 数量减少, 黏膜层有大量炎性细胞浸润。与模型组比较, 中药组与西药组柱状上皮细胞结构较为完整, 杯状细胞增多, 形态结构清晰, 炎性细胞浸润及腺体破坏明显减少, 随着治疗时间延长小鼠结肠病变改善明显且到干预第 7 天时基本恢复正常。

4 各组小鼠血清 IL-10、IL-17 水平比较 (表 2) 与正常组比较, 模型组各时间 IL-17 水平升高 ($P < 0.01$), IL-10 水平降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组与西药组各时间 IL-17 水平均降低, IL-10 水平均增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。中药组与西药组同时间点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组第 3 天比较, 第 5、7 天时中药组和西药组 IL-10 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 第 7 天中药组和西药组 IL-17 水平均降低 ($P < 0.05$)。与本组第 7 天比较, 中药组和西药组 IL-10 水平升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠血清 IL-17、IL-10 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	IL-17	IL-10
正常	8	3 天	47.46 ± 0.58	98.69 ± 0.94
		5 天	48.02 ± 0.52	101.20 ± 1.60
		7 天	47.52 ± 0.41	99.93 ± 0.49
模型	8	3 天	228.53 ± 32.62*	63.01 ± 0.91*
		5 天	275.43 ± 9.63*	62.17 ± 0.86*
		7 天	578.36 ± 52.30* ^{△△} ○	56.26 ± 2.78* [△] ○
中药	8	3 天	166.30 ± 21.14 [△]	69.21 ± 1.37 [△]
		5 天	127.09 ± 11.97 ^{△△}	78.14 ± 1.61 ^{△△△}
		7 天	83.73 ± 12.75 ^{△△△}	90.24 ± 0.33 ^{△△△△} ○
西药	8	3 天	151.87 ± 33.64 [△]	74.43 ± 3.44 ^{△△}
		5 天	136.08 ± 22.39 ^{△△}	79.40 ± 1.24 ^{△△△}
		7 天	79.56 ± 21.30 ^{△△△}	88.86 ± 1.40 ^{△△△△} ○

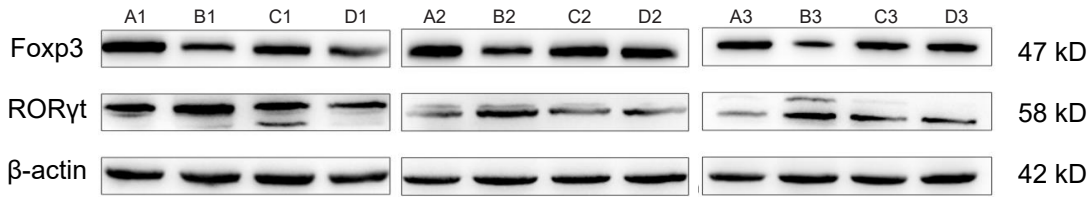
注: 与正常组同期比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与同组第 3 天比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与同组第 5 天比较, [○] $P < 0.01$

5 各组小鼠肺、肠组织 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达比较 (表 3, 图 3) 与正常组比较, 模型组肺、肠各时间 Foxp3 蛋白表达量均降低, ROR γ t 蛋白表达量均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 中药组与西药组肺、肠各时间均上调 Foxp3 蛋白表达, 下调 ROR γ t 蛋白表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。中药组与西药组同时间点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组第 3 天比较, 在第 7 天时中药组与西药组肺、肠组织 Foxp3 水平均升高, ROR γ t 水平减低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第 5 天时中药组与西药组肠组织 Foxp3 蛋白表达升高, 肺、肠组织 ROR γ t 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与本组第 5 天比较,

表 3 各组小鼠肺、肠组织中 Foxp3 及 ROR γ t 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	Foxp3		ROR γ t	
			肺组织	肠组织	肺组织	肠组织
正常	8	3 天	1.11 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.10
		5 天	1.06 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.10
		7 天	1.09 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.12
模型	8	3 天	0.66 $\pm$ 0.02*	0.60 $\pm$ 0.02*	0.94 $\pm$ 0.02*	1.07 $\pm$ 0.04*
		5 天	0.46 $\pm$ 0.04* $\Delta\Delta$	0.61 $\pm$ 0.02*	1.07 $\pm$ 0.03* $\Delta\Delta$	1.12 $\pm$ 0.02*
		7 天	0.43 $\pm$ 0.03* $\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.01* $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.15 $\pm$ 0.03* $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.23 $\pm$ 0.11* Δ
中药	8	3 天	0.77 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.78 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.02 Δ	0.90 $\pm$ 0.03 Δ
		5 天	0.81 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.90 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.77 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.71 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
		7 天	0.95 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.07 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.66 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.62 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
西药	8	3 天	0.74 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.69 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$	0.84 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.87 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$
		5 天	0.79 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.76 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	0.76 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta$	0.68 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
		7 天	0.95 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.96 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.66 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.65 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

注: 与正常组同期比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与同组第 3 天比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与同组第 5 天比较, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为中药组; D 为西药组; 1 为 3 天; 2 为 5 天; 3 为 7 天

图 3 IV/SPN 共感染后 Foxp3、ROR γ t 蛋白表达条带

中药组和西药组肺、肠 Foxp3 蛋白表达升高, 肺 ROR γ t 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

6 肠道菌群变化

6.1 各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性比较 (表 4) 与正常组比较, 模型组小鼠菌群丰度与多样性明显降低。与模型组比较, 中药组与西药组肠道菌群丰度与多样性均有升高, 且第 7 天中药组明显高于西药组, 但差异均无统计学意义。

6.2 各组小鼠肠道菌群群落结构结果 (图 4、

5) 深入分析肠道菌群相对丰度发现各组肠道细菌群落结构组成和丰度在门分类水平上, 正常组小鼠结肠主要优势菌群为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*), 模型组 3、5 天小鼠结肠内优势菌群组成与正常组比较, 厚壁菌门相对丰度有所下降, 拟杆菌门相对丰度有所上升, 在 7 天模型组, 热脱硫杆菌门 (*Desulfobacterota*) 丰度相对上升; 与模型组相比西药组小鼠结肠优势菌群为拟杆菌门, 随着药物干预治疗, 西药组中厚壁杆菌门的比例逐渐升高;

表 4 各组小鼠肠道菌群微生物丰度及多样性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	Chao1	Shannon	Simpson
正常	8	3 天	1 152.774 $\pm$ 113.339	6.785 $\pm$ 0.051	0.979 $\pm$ 0.015
		5 天	1 122.774 $\pm$ 152.281	6.818 $\pm$ 0.103	0.976 $\pm$ 0.003
		7 天	1 092.774 $\pm$ 92.938	6.818 $\pm$ 0.103	0.976 $\pm$ 0.003
模型	8	3 天	1 174.315 $\pm$ 207.769	7.002 $\pm$ 0.331	0.981 $\pm$ 0.007
		5 天	890.523 $\pm$ 39.543	6.272 $\pm$ 0.085	0.967 $\pm$ 0.004
		7 天	623.361 $\pm$ 88.277	5.717 $\pm$ 0.038	0.939 $\pm$ 0.003
中药	8	3 天	789.251 $\pm$ 46.973	5.841 $\pm$ 0.051	0.940 $\pm$ 0.002
		5 天	1 151.361 $\pm$ 166.811	6.675 $\pm$ 0.012	0.980 $\pm$ 0.001
		7 天	1 408.281 $\pm$ 54.114	7.445 $\pm$ 0.052	0.988 $\pm$ 0.002
西药	8	3 天	808.154 $\pm$ 130.535	6.013 $\pm$ 0.026	0.945 $\pm$ 0.003
		5 天	968.839 $\pm$ 212.966	7.016 $\pm$ 0.058	0.969 $\pm$ 0.002
		7 天	827.987 $\pm$ 145.537	6.043 $\pm$ 0.101	0.956 $\pm$ 0.003

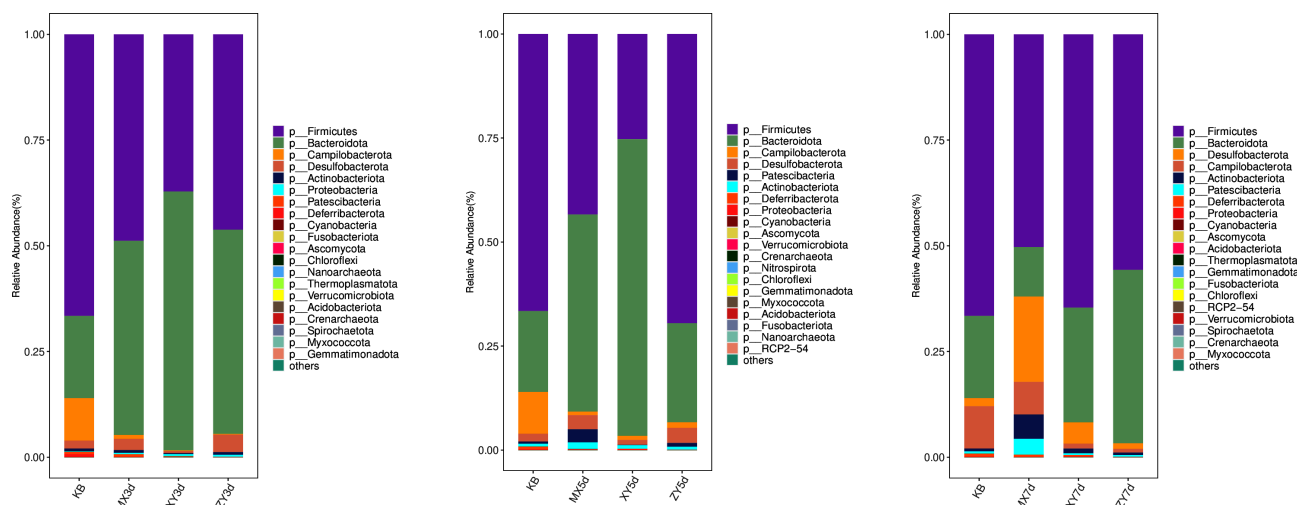


图 4 各组小鼠肠道菌群门水平分类学组成和分布图

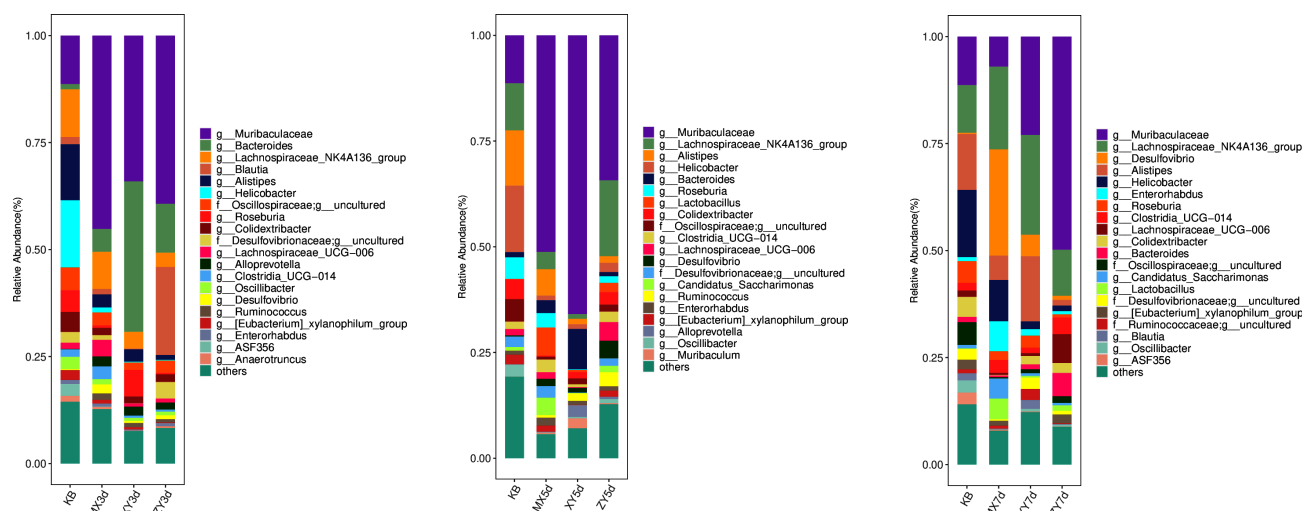


图 5 各组小鼠肠道菌群属水平分类学组成和分布图

宣白承气汤组小鼠结肠中厚壁菌门的比例总体趋势升高, 拟杆菌门的比例明显升高。

各组肠道细菌具有类似的群落结构组成, 主要包括 *Muribaculaceae* 属、毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、布劳特氏属 (*Blautia*)、另枝菌属 (*Alistipes*)。与正常组比较, 3、5 天模型组中未分类的 *Muribaculaceae* 属显著增高, 7 天时降低, 毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*)、脱硫弧菌属 (*Desulfovibrio*) 显著增多, 与模型组比较, 中药处理后 3 天拟杆菌属 (*Bacteroides*) 比例较高, 5 天时 *Muribaculaceae* 属达到高峰, 7 天时相对降低, 毛螺菌属 (*Lachnospiraceae*) 比例有所升高。

讨论

近年来, 研究发现混合感染肺炎及肠道菌群失调的机制与多种免疫信号转导系统调控有关^[16]。因此,

调节宿主免疫应答、尤其是黏膜免疫应答, 可能是缓解肺部和肠道疾病的一种有希望的策略。机体的免疫应答中, *Foxp3* 是调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Treg) 的特异性转录因子, 对维持 Treg 的自我耐受和免疫稳态功能至关重要。*ROR γ t* 是调控辅助性 T 细胞 (T helper cells-17, Th17) 分化的特异性转录因子。*Foxp3* 通过调控 Treg 细胞介导免疫抑制^[17] 而 *ROR γ t* 通过调控 Th17 细胞分化介导炎症反应^[18]。当机体发生感染时, *Foxp3* 表达降低, *CD4*⁺T 细胞向 Treg 细胞分化不足, 抑炎因子 IL-10、TGF- β 分泌降低。而 *ROR γ t* 介导的 Th17 分化途径则被激活, 机体产生炎症反应^[19]。*ROR γ t*/*Foxp3* 在生物功能上相互制约, Th17/Treg 细胞在分化过程相互拮抗成为维持体内免疫平衡的关键。而 Th17/Treg 细胞的失衡在大多数感染性疾病中都有体现^[20], 证明免疫调节稳态的失衡与机体损伤存在密不可分的联系。

宣白承气汤出自吴鞠通的《温病条辨》：“阳明温病，下之不通，其证有五……喘促不宁，痰涎壅滞，右寸实大，肺气不降者，宣白承气汤主之。”^[21]方中生石膏甘辛大寒，杏仁味苦降泄。两药配伍一温一寒，集清肺泄热、止咳平喘之功。生石膏主要成分为含水硫酸钙，而钙离子不仅存在于 T 细胞受体和免疫受体信号通路中，在其他众多生物过程的信号通路中也可能发挥重要功能^[22]。苦杏仁苷是苦杏仁的主要有效成分，其对支气管平滑肌细胞具有抑制作用^[23]，口服后在 β -葡萄糖苷酶作用下分解为氢氰酸，能一定程度上抑制呼吸中枢，达到镇咳平喘的作用^[24]。大黄成分主要有蒽醌类、蒽酮类、鞣质类等。大黄素具有抗炎和抗菌作用^[25, 26]，可以通过降低 Treg 比例减轻免疫抑制状态，增加调节性 B 细胞比例抑制炎症反应^[27]。蒽酮类化合物能刺激肠黏膜使肠道平滑肌受体兴奋，引起肠道蠕动，对胃肠道疾病有显著的疗效^[28]；鞣质类化合物具有抗氧化、抗炎和抗病毒作用^[29]；瓜蒌清热涤痰，宽胸散结，可显著提高巨噬细胞活性及淋巴细胞的转化，促进机体免疫应答并对肺炎链球菌在内的多种的细菌均有抑制作用^[30, 31]。纵观全方，四药配伍，相互为用，共奏开肺通肠之效。作为肺肠同治的代表方，现代临床已方多用于治疗毒热闭肺，腑气不通的肺系及肠系疾病，如肺炎、支气管感染、支气管哮喘、肺热便秘等^[32-34]。临床研究中发现在肺炎痰热壅肺证的治疗中，与单纯西医治疗相比，联用宣白承气汤治疗可提高临床总有效率^[32]。在治疗痰热闭肺证型肺炎的研究中发现，加味宣白承气汤既可以改善肺损伤，又能修复肠黏膜免疫屏障，增加肠道有益菌含量^[35]。宣白承气汤肺肠同治与现代西医提出的“呼吸道和消化道黏膜免疫细胞的通过迁徙进行免疫联系”理论相契合^[36]，而宣白承气汤有望与西药联合治疗 IV/SPN 共感染所致肺损伤的相关疾病，预防疾病向重症化发展。

中医学理论认为，肺与大肠相表里。《灵枢·经脉》言：“肺手太阴之脉，起于中焦，下络大肠。”阐述了肺与大肠在生理上联系密切。在病理上亦相互影响，邪气犯肺，肺宣发肃降功能异常，津液输布失常，导致大肠传导功能失常。肠道微生态菌群介导的“肠—肺”轴是肺与大肠相表里传统理论的现代体现。从肠道菌群失调方面来看，肠道菌群以其多样性和丰富性影响着机体的免疫调节，生理状态下，宿主与体内微生物群处于相对稳定的动态平衡，但是一方发生异常，可能会通过菌群的变化造成远端脏器受累。肺部疾病的发生可能会造成患者的肠道病变及肠道菌群

改变^[37, 38]。肠道菌群紊乱导致相关细胞因子分泌异常，继而影响 Th17/Treg 轴，引起肠道黏膜炎症^[39]，因此调节 Th17/Treg 平衡可以改善肠道炎症环境并重建肠道免疫平衡^[40]。本文利用 16S rRNA 测序技术分析发现，模型组肠道菌群丰度与多样性较正常组均降低，中药组及西药组干预后菌群丰度和多样性均升高，说明共感染可能会存在一定的肠道菌群失调。在进行属水平菌群分析时，模型组中脱硫弧菌产生明显增多，脱硫弧菌产生的硫化氢可碱性化肠道，影响消化和吸收，可能与肠道疾病发生有着密切的关系。在给予宣白承气汤干预之后，第 5 天 *Muribaculaceae* 属达到高峰，而 *Muribaculaceae* 归属于拟杆菌门拟杆菌目分类，在肠道血糖血脂代谢等方面具有重要作用，被视为有益菌存在。毛螺菌属 (*Lachnospira*) 属于厚壁菌门，参与肠道能量代谢，被认为是潜在的有益菌。研究发现益生菌一方面可以刺激肠道黏膜免疫反应，通过共同黏膜免疫系统影响呼吸道功能，另一方面可间接调节肠道菌群的代谢产物，调节肠道免疫；而这些代谢物又可通过血液循环到达肺脏，在肺脏发挥抗炎作用^[41]。不难看在肺肠相关疾病中，肠道微生物群可能处于发病机制的中心环节。这也揭示了宣白承气汤可以作用于 Foxp3/ROR γ t 信号通路来调节 Treg 和 Th17 细胞介导的肺肠免疫失衡，改善肠道菌群紊乱，维持肠道微生态平衡，预防机体感染后重症化进展。

综上所述，宣白承气汤能够上调 Foxp3 表达，同时下调 ROR γ t 表达，进而调节 Treg 和 Th17 细胞介导的炎性因子分泌，也可以调节肠道菌群紊乱，减轻肺肠病理损伤的发生及发展，改善 Foxp3/ROR γ t 免疫失衡状态，恢复机体免疫稳态，起到干预 IV/SPN 共感染所致肺肠损伤的作用。这也提示靶向肠道菌群，维持免疫平衡，可作为治疗肺部疾病的新策略，而关于微生物群的变化如何通过影响宿主更进一步影响远端器官的作用机制仍需不断探讨，以便更好地指导临床。

利益冲突：本研究与其他基金项目 and 机构无利益冲突，作者之间、作者署名排序均无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Roth GA, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global

- Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392 (10159): 1736–1788.
- [2] Chertow DS, Memoli MJ. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review[J]. *JAMA*, 2013, 309 (3): 275–282.
- [3] Cillóniz C, Ewig S, Menéndez R, et al. Bacterial co-infection with H1N1 infection in patients admitted with community acquired pneumonia[J]. *J Infect*, 2012, 65 (3): 223–230.
- [4] Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness[J]. *J Infect Dis*, 2008, 198 (7): 962–970.
- [5] Sullivan SG, Price OH, Regan AK. Burden, effectiveness and safety of influenza vaccines in elderly, paediatric and pregnant populations[J]. *Ther Adv Vaccines Immunother*, 2019, 7: 2515135519826481.
- [6] 张文杰, 戴岳. “肺-肠轴”的研究进展[J]. *药学研究*, 2022, 41 (1): 53–56.
- [7] van den Elsen LW, Poyntz HC, Weyrich LS, et al. Embracing the gut microbiota: the new frontier for inflammatory and infectious diseases[J]. *Clin Transl Immunology*, 2017, 6 (1): e125.
- [8] 孙宇洁, 常永龙, 郭锦晨, 等. 宣白承气汤“肺肠同治”慢性阻塞性肺疾病的作用机制[J]. *西南医科大学学报*, 2022, 45 (5): 409–415.
- [9] Barcik W, Boutin RCT, Sokolowska M, et al. The role of lung and gut microbiota in the pathology of asthma[J]. *Immunity*, 2020, 52 (2): 241–255.
- [10] 彭胜利. 中医药治疗病毒性感染性疾病的优势和特色[J]. *广州中医药大学学报*, 2004, 21 (5): 336–339.
- [11] 黎江, 张培帅, 于白莉. 宣白承气汤对慢性阻塞性肺疾病合并胃肠功能障碍患者胃肠道症状及胃肠道激素水平的影响[J]. *中医临床研究*, 2023, 15 (12): 42–45.
- [12] 侯文肖. 基于“肺与大肠相表里”探讨新加宣白承气汤对重症肺炎患者临床疗效的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2022.
- [13] Fasching P, Stradner M, Graninger W, et al. Therapeutic potential of targeting the Th17/Treg axis in autoimmune disorders[J]. *Molecules*, 2017, 22 (1): 134.
- [14] 赫昊, 王雪峰, 张秀英, 等. 流感病毒与肺炎链球菌共感染动物模型的国内外研究进展[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2021, 13 (3): 201–204.
- [15] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9 (9): 1069–1072.
- [16] 常一川. 多组学联合分析宣白承气汤加味干预 IV /SPn 共感染小鼠肺炎的调控机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2022.
- [17] Konopacki C, Pritykin Y, Rubtsov Y, et al. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20 (2): 232–242.
- [18] Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer[J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42 (7): 549–559.
- [19] Lee GR. The balance of Th17 versus Treg cells in autoimmunity[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (3): 730.
- [20] Imani S, Salimian J, Bozorgmehr M, et al. Assessment of Treg/Th17 axis role in immunopathogenesis of chronic injuries of mustard lung disease[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2016, 36 (5): 531–541.
- [21] 明·吴鞠通著. 温病条辨[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 47.
- [22] Shi X, Bi Y, Yang W, et al. Ca²⁺ regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids[J]. *Nature*, 2013, 493 (7430): 111–115.
- [23] 张德珂, 聂金娥, 钱芳芳. 中药苦杏仁药理作用研究进展[J]. *山东化工*, 2021, 50 (22): 100–102, 105.
- [24] 赵玉升, 胡杰, 吴佳姝等. 苦杏仁炮制方法及药理作用研究进展[J]. *中医药导报*, 2021, 27 (3): 175–180.
- [25] Huang Q, Lu G, Shen HM, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb[J]. *Med Res Rev*, 2007, 27 (5): 609–630.
- [26] Li RR, Liu XF, Feng SX, et al. Pharmacodynamics of five anthraquinones (aloe-emodin, emodin, rhein, chrysophanol, and physcion) and reciprocal pharmacokinetic interaction in rats with cerebral ischemia[J]. *Molecules*, 2019, 24 (10): 1898.
- [27] 邹蕾, 黄志远, 杨桥, 等. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠淋巴细胞功能的影响[J]. *河北医药*, 2020, 42

- (5): 690–693, 697.
- [28] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121–126.
- [29] 邓瑞雪, 黄玉阳, 张玉秀, 等. 掌叶大黄鞣质类化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(4): 908–911.
- [30] 张霄翔, 王艳苹, 王玉凤, 等. 瓜蒌皮对环磷酰胺致免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(9): 648–650.
- [31] 《全国中草药汇编》编写组主编. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 198.
- [32] 于芳杰. 宣白承气汤联合西医常规疗法对老年肺炎痰热壅肺证的疗效及炎症因子影响[J]. 华夏医学, 2020, 33(4): 141–145.
- [33] 李艳梅, 宋玉琳, 张波. 加减宣白承气汤治疗肺热肠燥型功能性便秘 91 例临床观察[J]. 河北中医, 2009, 31(6): 837–838.
- [34] 张萍, 陈彬, 费树钢. 加味宣白承气汤联合噻托溴铵治疗哮喘慢阻肺重叠综合征临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(10): 127–129.
- [35] 包春秀, 姜永红. 加味宣白承气汤对痰热闭肺型肺炎支原体肺炎患儿肠道菌群及 sIgA 水平的影响[J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(7): 53–58.
- [36] 郑榕, 许若缨, 柯敏辉, 等. 基于“肺与大肠相表里”探讨“肺肠合病”与黏膜免疫的关系[J]. 北京中医药大学学报, 2020, 43(6): 487–491.
- [37] Dumas A, Bernard L, Poquet Y, et al. The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases[J]. Cell Microbiol, 2018, 20(12): e12966.
- [38] 张良登, 冯兴中, 姜敏, 等. 基于肺与大肠相表里的肺病患者肠道菌群特点研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(4): 19–23.
- [39] 林凯, 齐育英, 王开银, 等. 免疫性甲状腺疾病患者肠道菌群分布及其对 Th17/Treg 细胞的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(3): 318–322, 326.
- [40] Luo A, Leach S T, Barres R, et al. The microbiota and epigenetic regulation of T helper 17/regulatory T cells: in search of a balanced immune system[J]. Front Immunol, 2017, 8: 417.
- [41] 慕之勇, 魏艳玲, 李宁, 等. “肠-肺”轴与肺部疾病关系的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(11): 1178–1183.
- (收稿: 2023-01-20 在线: 2023-11-09)
责任编辑: 白霞

欢迎订阅 2024 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录, 2023 年 6 月底科睿唯安公布 2022 年本刊 SCI 影响因子为 2.9。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价, 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjim_en@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。