

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.15.010

小柴胡汤联合抗菌药物对 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型的影响分析*

高 吟¹, 张立红^{1△}, 张志斌¹, 周春刚¹, 周永华²

1. 无锡市中医医院检验科, 江苏无锡 214000; 2. 江苏省血吸虫防治研究所, 江苏无锡 214000

摘 要:目的 探讨与分析小柴胡汤联合抗菌药物对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)致腹膜炎/脓毒症大鼠模型的影响。方法 36 只 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠随机分为 3 组, 模型组、西药组与联合用药组, 每组 12 只。西药组给予皮下注射头孢哌酮/舒巴坦[240/120 mg/(kg·12 h)]+亚胺培南[156 mg/(kg·12 h)], 2 次/天; 联合用药组在西药组治疗的基础上给予小柴胡汤中药提取液 0.3 mg/kg 灌胃, 2 次/天; 模型组每日灌胃生理盐水。结果 西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺髓过氧化物酶(MPO)水平及干湿指数均低于模型组($P<0.05$), 联合用药组低于西药组($P<0.05$)。西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平均低于模型组($P<0.05$), 联合用药组低于西药组($P<0.05$)。西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺 Notch1、端粒酶调节相关蛋白(TRAP)蛋白相对表达水平均低于模型组($P<0.05$), 联合用药组低于西药组($P<0.05$)。结论 小柴胡汤联合抗菌药物在 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型的应用能抑制 Notch1、TRAP 蛋白的表达, 抑制炎症因子的表达, 从而降低肺 MPO 水平与干湿指数。

关键词:小柴胡汤; 抗菌药物; 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌; 腹膜炎; 脓毒症; 大鼠模型

中图法分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)15-2055-04

Effect of Xiaochaihu decoction combined with antibacterial agents
on CRAB-induced peritonitis/sepsis rat model*

GAO Yin¹, ZHANG Lihong^{1△}, ZHANG Zhibin¹, ZHOU Chungang¹, ZHOU Yonghua²

1. Department of Clinical Laboratory, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi, Jiangsu 214000, China; 2. Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi, Jiangsu 214000, China

Abstract: **Objective** To investigate and analyze the effect of Xiaochaihu decoction combined with antibacterial agents on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB)-induced peritonitis/sepsis rat model. **Methods** A total of 36 CRAB-induced peritonitis/septic rats were equally randomly divided into model group, western medicine group and combined medication group, 12 rats in each group. The western medicine group were given subcutaneous injection of cefoperazone/sulbactam [240/120 mg/(kg·12 h)]+imipenem [156 mg/(kg·12 h)] twice daily; the combined medication group were given Xiaochaihu decoction Chinese medicine extract 0.3 mg/kg by gavage on the basis of the western medicine group, twice daily; the model group were gavaged with normal saline every day. **Results** The level of lung myeloperoxidase (MPO) and dryness and wetness index on the 3rd and 7th day of treatment in the western medicine group and combined medication group were lower than those in the model group ($P<0.05$), and those in the combined medication group were lower than those in the western medicine group ($P<0.05$). Serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels on the 3rd and 7th day of treatment in the western medicine group and combined medication group were lower than those in the model group ($P<0.05$), and those in the combined medication group were lower than those in the western medicine group ($P<0.05$). The relative expression levels of Notch1 and telomerase regulation associated protein (TRAP) protein in the lungs in the western medicine group and the combined medication group were lower than those in the model group on the 3rd and 7th day of treatment ($P<0.05$), and those in the combined medication group were lower than those in the western medicine group ($P<0.05$). **Conclusion** The application of Xiaochaihu decoction combined with antibacterial agents in CRAB-induced peritonitis/sepsis rat model could inhibit the expression of Notch1 and TRAP protein, inhibit the expression of inflammatory factors, and thereby reduce lung MPO level and dryness and wetness

* 基金项目: 无锡市卫生健康委员会青年项目(Q201840)。

作者简介: 高吟, 女, 副主任技师, 主要从事脓毒症、多重耐药菌相关研究。△ 通信作者, E-mail: 34613177@qq.com。

index.

Key words: Xiaochaihu decoction; antibacterial agents; carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; peritonitis; sepsis; rat model

脓毒症属于临床危重疾病,多伴随腹膜炎,该病在创伤、感染等应激状态下,损伤肠道的屏障功能,进一步导致肠源性感染及炎症性介质毒性网络的产生,造成肠道内大量的细菌和内毒素经门静脉及淋巴系统侵入血液循环,从而引起全身多器官功能衰竭^[1-2]。腹膜炎/脓毒症的具体发病机制较复杂,其具有病死率高、并发症多等特征,内皮细胞、中性粒细胞、单核-巨噬细胞所释放的大量细胞因子、炎性介质均为该病发病过程的关键性物质^[3]。耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)致腹膜炎/脓毒症大鼠模型是当前较常见的动物模型,具有建模效率高、操作方便等特征。当前有关西医治疗脓毒症的思路为对症治疗,包括水电解质平衡的维持、调节免疫、抗感染、清除炎症因子等,头孢哌酮/舒巴坦等均为脓毒症常用抗菌药物。西药治疗虽能降低病死率,但可导致机体出现耐药性,也伴随发生一定的不良反应^[4]。随着中医药的不断发展和进步,中药治疗脓毒症取得了很好的效果,小柴胡汤由柴胡、生姜、大枣、黄芩、人参、半夏、甘草等组成,具有抗炎和增强人体免疫功能的作用,也可发挥解表清里的功效,使邪毒随糟粕排出体外^[5-6]。本研究探讨与分析了小柴胡汤联合抗菌药物对 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型的影响,并简单阐述了其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 由无锡市中医医院 SPF 动物实验中心提供的清洁级 3 月龄雌性 SD 大鼠[体质量为(200.00±20.00)g]购自北京维通利华公司(动物质量合格证号 SCXK2021-0006-152)。大鼠分笼饲养(每笼 6 只),均进行标准大鼠饲料喂养,定期清除笼内异物,可自由饮食、饮水和活动,饲养条件是室温 18~28℃,相对湿度 62%~80%。

1.2 仪器与试剂 小柴胡汤由兰州太宝制药有限公司提供(国药准字 Z62021311),酶联免疫吸附试验检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,CRAB 由无锡市中医医院提供。亚胺培南购自浙江海正药业股份有限公司(国药准字 H20070067),头孢哌酮/舒巴坦购自湖南方盛制药股份有限公司(国药准字 H20067077),抗 Notch-1 抗体、抗端粒酶调节相关蛋白(TRAP)抗体、抗 β -actin 抗体购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型的建立 CRAB 在 MHA 平板上生长、传代,腹腔注射 0.5 mL/20 g CRAB 与 5% 猪粘蛋白到大鼠中,建立 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型。造模成功条件如

下:(1)动物体温下降、休克等,且模型的自然死亡率>50%,死亡时间与模型制备时间间隔>12 h;(2)细菌血培养阳性;(3)各脏器病理出现炎性损伤、坏死等改变。

1.3.2 模型分组与治疗 将 36 只 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠随机分为 3 组:模型组、西药组与联合用药组,每组 12 只。西药组给予皮下注射头孢哌酮/舒巴坦[240/120 mg/(kg·12 h)]+亚胺培南[156 mg/(kg·12 h)],2 次/天。联合用药组在西药组治疗的基础上给予小柴胡汤中药提取液[组方:柴胡 30 g,黄芩、人参、半夏、甘草(炙)、生姜(切)各 9 g、大枣(擘)4 枚]0.3 mg/kg 灌胃,2 次/天。模型组每日灌胃生理盐水。3 组均治疗观察 7 d。

1.3.3 观察指标 3 组分别在治疗第 3 天与第 7 天处死 6 只大鼠,然后进行以下检测。(1)采用 Kuebler 方法检测肺组织的髓过氧化物酶(MPO)水平,可以有效评价肺组织中性粒细胞的渗出程度。大鼠右肺标本用滤纸吸去表面液体后称重,烤箱内加热 72 h 再称重,计算肺标本的干湿指数。(2)对大鼠心脏进行取血,离心(1 500 r/min 离心 10 min)后收集上清液,-80℃冰箱保存,采用酶联免疫吸附试验检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平。(3)无菌条件下分离大鼠的部分脏器,4% 甲醛固定进行 HE 染色。(4)分离大鼠的肺组织并研磨,进行总蛋白的提取,采用二喹啉甲酸(BCA)方法定量蛋白质水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 数据处理及统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析。计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。所有检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况对比 模型组:大鼠躯体蜷缩,眼目不睁,活动减少,对刺激反应迟钝,精神萎靡嗜睡,被毛蓬松少光泽。西药组与联合用药组:大鼠的活动性、进食饮水状况、反应性均优于模型组。

2.2 肺 MPO 水平与干湿指数对比 西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺 MPO 水平及干湿指数均低于模型组($P < 0.05$),联合用药组低于西药组($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 血清炎症因子水平对比 西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的血清 TNF- α 和 IL-6 水平均低于模型组($P < 0.05$),联合用药组低于西药组($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 Notch1、TRAP 蛋白相对表达水平对比 西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺 Notch1、TRAP 蛋白相对表达水平均低于模型组($P<0.05$),联合用药组低于西药组($P<0.05$)。见表 3。

表 1 3 组治疗不同时间点的肺 MPO 水平及干湿指数对比($\bar{x}\pm s$)

组别	只数(n)	MPO(U/g)		干湿指数	
		第 3 天	第 7 天	第 3 天	第 7 天
模型组	6	8.56±0.22	8.59±0.13	5.41±0.21	5.40±0.18
西药组	6	4.87±0.21 ^a	4.88±0.18 ^a	4.64±0.18 ^a	4.65±0.19 ^a
联合用药组	6	3.41±0.17 ^{ab}	3.42±0.16 ^{ab}	4.13±0.34 ^{ab}	4.12±0.20 ^{ab}
F		14.293	14.777	7.724	7.714
P		<0.001	<0.001	0.010	0.011

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,^b $P<0.05$ 。

表 2 3 组治疗不同时间点的血清炎症因子水平对比($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	只数(n)	TNF- α		IL-6	
		第 3 天	第 7 天	第 3 天	第 7 天
模型组	6	945.26±78.19	948.02±89.14	647.29±78.11	648.09±89.42
西药组	6	524.92±87.14 ^a	522.09±78.18 ^a	478.29±87.11 ^a	481.77±76.28 ^a
联合用药组	6	222.98±18.37 ^{ab}	223.09±19.47 ^{ab}	118.98±12.47 ^{ab}	119.09±13.33 ^{ab}
F		34.024	34.777	49.824	49.227
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,^b $P<0.05$ 。

表 3 3 组治疗不同时间点的肺 Notch1、TRAP 蛋白相对表达水平对比($\bar{x}\pm s$)

组别	只数(n)	Notch1		TRAP	
		第 3 天	第 7 天	第 3 天	第 7 天
模型组	6	3.98±0.11	3.92±0.18	5.83±0.13	5.84±0.22
西药组	6	2.46±0.23 ^a	2.47±0.19 ^a	3.67±0.19 ^a	3.69±0.21
联合用药组	6	1.56±0.12 ^{ab}	1.58±0.18 ^{ab}	1.98±0.24 ^{ab}	2.00±0.38
F		9.991	9.782	18.832	19.111
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与西药组比较,^b $P<0.05$ 。

3 讨 论

腹膜炎/脓毒症具有极高的发病率和病死率,其中肺脏由于肺循环滤过全身血液,肺组织内存在大量单核巨噬细胞,使之成为脓毒症发生时最易受损伤的器官。肠道在发生脓毒症时也易受到损伤,脓毒症可导致肠道细菌移位与肠道细胞凋亡,从而加重病情。同时腹膜炎/脓毒症可通过刺激淋巴组织导致免疫激活,继续损伤肠道黏膜,形成恶性循环,最终导致全身多脏器功能不全^[7]。中医认为,脓毒症患者多毒邪外犯、壮热汗出、邪毒亢盛、邪正斗争剧烈,津液运化失司、瘀血阻滞脉络、大肠传导功能失常^[8]。本研究结果显示,西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺 MPO 水平及干湿指数低于模型组,联合用药组低于西药组,表明小柴胡汤联合抗菌药物在 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型中的应用能降低肺 MPO 水平

与干湿指数。从机制上看,小柴胡汤为表里双解剂,功效为内泻热结、和解少阳。现代药理研究提示,柴胡的主要化学成分为糖类、黄酮类、皂苷类、香豆素类、挥发油类等,其具有良好的调节免疫功能与抗炎作用,可有效恢复脓毒症患者的免疫平衡^[9]。黄芩含有黄酮类化合物、多糖、挥发油等各种成分,具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒等作用。小柴胡汤的应用具有保护肠黏膜屏障、抑制胰腺分泌磷脂酶 A2 等作用,对脓毒症的治疗也具有较好的前景。孢哌酮/舒巴坦+亚胺培南等抗菌药物,可抑制体内的病原体的细胞壁及细胞核的合成,进而抑制其繁殖,起到不可逆的抑制作用,且抗菌药物可迅速进入腹水达到杀菌浓度,进而发挥抗炎抗菌的作用。二者合用,可加强抗炎作用,并提高人体免疫功能^[10-11]。

腹膜炎/脓毒症的发生机制目前仍未完全阐明,

适量的炎症因子有利于机体正常防御反应,但炎症因子的大量释放则可产生广泛的损伤作用。TNF- α 是机体受到有害刺激后最初分泌的细胞因子,可诱导 IL-6 表达,促使炎症细胞因子之间相互作用并形成正反馈环,诱发“级联效应”。IL-6 的高表达可激活核转录因子 κ B,从而导致脓毒症进一步加重。有研究表明,TNF- α 可由激活的中性粒细胞和巨噬细胞释放,而对各种免疫细胞和结构细胞产生刺激,进而诱导机体释放大炎症介质,最终引起全身炎症反应^[12]。本研究结果显示,西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的血清 TNF- α 和 IL-6 水平低于模型组,联合用药组低于西药组,表明小柴胡汤在 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型中的应用可抑制炎症因子的表达。从机制上分析,小柴胡汤和抗菌药物二者联用除了可以抗炎和增强人体免疫功能,也能发挥肠道保护和减少细菌移位等作用,从而减轻全身炎症反应^[13]。

Notch 信号通路被发现可参与多种疾病的发生、发展,Notch-1 是 Notch 受体的重要类型。当 Notch 信号通路被激活时,会增加 Notch-1 的表达,进而引发下游靶基因的激活。TRAP 也是调节脓毒症发生、发展的关键因子,可调节破骨细胞的生成和活化,通过正反馈加重炎症反应,并促进炎症介质的大量释放。本研究结果显示,西药组与联合用药组治疗第 3 天与第 7 天的肺 Notch1、TRAP 蛋白相对表达水平低于模型组,联合用药组低于西药组,表明小柴胡汤联合抗菌药物在 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型中的应用可抑制 Notch1、TRAP 蛋白的表达。小柴胡汤可作用于线粒体中有氧呼吸的过程,进而影响机体能量代谢,从而缓解因脓毒症引起的微循环障碍。此外,小柴胡汤可从“神经-内分泌-免疫-代谢”等多层面影响脓毒症的发生与发展,从而对肺脏起到保护作用^[14-15]。本研究也存在一定的不足,如未设置空白对照组,也未进行不同剂量的组别分析,笔者将在后续研究中探讨。

综上所述,小柴胡汤联合抗菌药物在 CRAB 致腹膜炎/脓毒症大鼠模型中的应用能抑制 Notch1、TRAP 蛋白的表达,抑制炎症因子的表达,从而降低肺 MPO 水平及干湿指数。

参考文献

[1] KRONENFELD N, ZILBERMAN-ITSKOVICH S, LAZAROVITCH T, et al. The impact of improper empirical usage of antipseudomonals on admission to an acute care hospital [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22(11): 5-8.

[2] WEINBERG S E, VILLEDIEU A, BAGDASARIAN N, et

al. Control and management of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*; a review of the evidence and proposal of novel approaches[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2020, 2(3): 100077.

[3] 完玛南杰, 李成琴. 腹腔镜及开腹手术对阑尾穿孔腹膜炎脓毒症患儿免疫指标及细胞因子的影响[J]. 河北医学, 2020, 26(1): 5.

[4] 易林高, 陈晓孩, 何国鑫, 等. 头孢哌酮舒巴坦在重症监护病房脓症患者体内的药代动力学研究[J]. 中国医药导报, 2018, 15(10): 34-37.

[5] 邱根全, 叶峰, 刘昶, 等. 小柴胡汤对实验大鼠非酒精性脂肪肝的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013, 34(3): 400-402.

[6] 张洋, 石志超, 石鉴泉, 等. 从小柴胡汤事件浅析“古方今病, 不相能也”[J]. 中医学报, 2021, 36(6): 1172-1175.

[7] LIU C P, LU H P, LUO R T. Clonal relationship and the association of the ST218 strain harboring bla(OXA-72) gene to mortality in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2019, 52(2): 297-303.

[8] 陈靖, 王卉, 刘晓丹, 等. 小柴胡汤化裁方对 AD 小鼠记忆认知能力及海马神经元形态的影响[J]. 西部中医药, 2021, 34(5): 32-35.

[9] 田丽丽. 知柏地黄汤合小柴胡汤加减治疗乳腺癌内分泌治疗类更年期综合征[J]. 中国药物与临床, 2021, 21(9): 1582-1584.

[10] 李筱棠, 唐川, 贾鹏. 小柴胡汤加减联合耳穴埋豆法治疗颈性眩晕疗效及对脑血流速度和血液流变学的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(8): 885-888.

[11] ISLER B, DOI Y, BONOMO R A, et al. New treatment options against Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 63(1): e01110-e01118.

[12] WILSON N, PATEY C, HOWSE D. Catch of a lifetime *Erysipelothrix rhusiopathiae* bacteraemia, septicaemia, endocarditis and osteomyelitis in a Newfoundland crab fisherman and butcher [J]. J Korean Med Sci, 2019, 24(4): 123-126.

[13] 张慧, 原晨, 卢华锋, 等. 小柴胡汤对抑郁症大鼠 JAK2/STAT3 通路及小胶质细胞活化的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(4): 617-624.

[14] 刘慧慧, 刘建和, 程丑夫, 等. 程丑夫教授运用小柴胡汤加减治疗胸痹验案举隅[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(10): 1770-1772.

[15] 刘凯利, 阮君, 尚浩南, 等. 小柴胡汤和解少阳枢机不利防治代谢综合征组疾病[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(22): 2496-2500.

(收稿日期: 2021-11-09 修回日期: 2022-03-01)