

基于甲型 H1N1 流感病毒继发金黄色葡萄球菌感染小鼠模型探究金银花药效及作用机制

王 晨¹, 李 勋², 高 燕¹, 毛志海², 周思琴², 吴高峰², 才太吉¹, 高树华¹, 张永文^{3*}, 赵瀚年^{1*}

1. 山东中医药大学 药物研究院, 山东 济南 250355

2. 真奥金银花药业有限公司, 湖北 咸宁 437099

3. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 建立甲型 H1N1 流感病毒 (H1N1) 继发金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 感染模型, 探讨金银花水提物 (LJAE) 对该模型药效及机制。**方法** 小鼠按体质量随机分为对照组、模型组、磷酸奥司他韦 (OT, 抗病毒阳性药, 11 mg·kg⁻¹, 临床等效剂量) 组、头孢克洛缓释片 (CF, 抗菌阳性药, 106.38 mg·kg⁻¹, 临床等效剂量) 组和 LJAE 低、中、高剂量 (6.5、13.0、26.0 mL·kg⁻¹) 组, 除对照组外, 建立致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型, 连续给药 5 d, 观察死亡率; 除对照组外, 建立亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型, 连续给药 5 d, 测定肺指数, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肺病毒量, 平板法检测肺菌量, 苏木精-伊红 (HE) 染色观察肺损伤; 瑞氏-吉姆萨染色法测定肺泡灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞数目; 通过 qRT-PCR 法检测肺单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)、白介素-4 (IL-4)、趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1 (CXCL-1) mRNA 表达量; ELISA 法检测肺组织 MCP-1、TNF- α 、IFN- γ 水平; 流式细胞术测定外周血 CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) 和 CD4⁺IL-4⁺ (Th2) 细胞比例。**结果** 与模型组比较, LJAE 显著降低致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型小鼠的死亡率 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 显著降低亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型小鼠的肺指数 ($P < 0.001$)、肺病毒量 ($P < 0.001$) 和肺菌量 ($P < 0.001$), 减轻肺病理损伤; LJAE 显著减少肺部中性粒细胞和巨噬细胞的募集 ($P < 0.001$), 显著降低趋化因子 MCP-1 和促炎细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.001$), 降低外周血单核细胞 CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺ ($P < 0.001$)。**结论** LJAE 具有显著的抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的活性, 能够通过调节过激的 Th1 型免疫反应, 抑制 Th1 型细胞因子 MCP-1、TNF- α 和 IFN- γ 的释放, 减轻肺部炎症细胞的过度浸润, 修复 H1N1 继发 *S. aureus* 引发的肺损伤。

关键词: 金银花; 甲型 H1N1 流感病毒; 金黄色葡萄球菌; 继发感染; 巨噬细胞; Th1/Th2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)05-1155-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.008

Efficacy and mechanism of *Lonicera japonica* on mice model of secondary *Staphylococcus aureus* infection induced by influenza A (H1N1) virus

WANG Chen¹, LI Xun², GAO Yan¹, MAO Zhihai², ZHOU Siqin², WU Gaofeng², CAI Taiji¹, GAO Shuhua¹, ZHANG Yongwen³, ZHAO Bonian¹

1. Institute of Pharmaceutical Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Zhenao Jinyinhua Pharmacoutical Limited Company, Xianning 437099, China

3. Institute of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish a secondary *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infection model of influenza A H1N1 virus (H1N1), and explore the efficacy evaluation and research of *Lonicera japonica* aqueous extract (LJAE) on this model. **Methods** Mice were randomly divided into the control group, model group, oseltamivir phosphate (OT, antiviral positive drug, 11 mg·kg⁻¹, clinical

收稿日期: 2024-11-20

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2021CXGC010511); 校企合作项目-金银花口服液技术开发项目 (KYC2022035); 2023 年全国中药特色技术传承人才培训项目 (T20234832005)

作者简介: 王 晨 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事中药质量综合评价及中药新药研究。E-mail: w2022111525@163.com

***通信作者:** 赵瀚年, 教授, 博士, 从事中药质量综合评价及中药新药研究。E-mail: bonianzh@163.com

张永文, 教授, 博士, 从事中药、天然药物的药理学评价与研究。E-mail: zhangyw@njucm.edu.cn

equivalent dose) group, Cefaclor Sustained-Release Tablets (CF, antibacterial positive drug, 106.38 mg·kg⁻¹, clinical equivalent dose) group and low, medium and high dose LJA (6.5, 13.0, 26.0 mL·kg⁻¹) groups according to body weight. Except for the control group, lethal H1N1 secondary *S. aureus* models were established, and continuous administration was given for five days to observe the mortality rate. Except for the control group, sublethal H1N1 secondary *S. aureus* models were established, and continuous administration was given for five days. The lung index was measured, the lung viral load was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), the lung bacterial load was detected by plate method, and lung injury was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The number of macrophages and neutrophils in the alveolar lavage fluid was determined by Wright-Giemsa staining. The mRNA expression levels of lung monocyte chemoattractant protein-1 (*MCP-1*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interferon- γ (*IFN- γ*), interleukin-4 (*IL-4*), and chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (*CXCL-1*) were detected by qRT-PCR. The levels of MCP-1, TNF- α , and IFN- γ in lung tissue were detected by ELISA. The proportions of CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) and CD4⁺IL-4⁺ (Th2) cells in peripheral blood were determined by flow cytometry. **Results** Compared with the model group, LJA significantly reduced the mortality rate of mice in the lethal H1N1 secondary *S. aureus* model ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), significantly reduced the lung index ($P < 0.001$), lung viral load ($P < 0.001$), and lung bacterial load ($P < 0.001$) of mice in the sublethal H1N1 secondary *S. aureus* model, and alleviated lung injury. LJA significantly reduced the recruitment of neutrophils and macrophages in the lungs ($P < 0.001$), significantly decreased the mRNA and protein expression of chemokine MCP-1 and pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ ($P < 0.001$), and decreased the ratio of CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺ in peripheral blood mononuclear cells. **Conclusion** LJA has significant anti-H1N1 secondary *S. aureus* activity, by inhibiting the excessive Th1 immune response, it inhibits the release of Th1 cytokines MCP-1, TNF- α , and IFN- γ , reduces excessive infiltration of lung inflammatory cells, and alleviates lung injury caused by H1N1 secondary *S. aureus*. **Key words:** *Lonicera japonica* Thunb.; influenza A H1N1 virus; *Staphylococcus aureus*; secondary infection; macrophages; Th1/Th2

甲型 H1N1 流感病毒（以下简称 H1N1）易引起流感及传染性呼吸道疾病^[1]，其表面的抗原极易发生变异产生新亚型，从而引起流感类疾病大爆发^[2]，H1N1 感染后主要表现为高热、咳嗽、肌肉酸痛等症状，少数伴有严重的肺炎及多种器官衰竭，病死率较高。金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是临床分离率最高的革兰阳性致病菌，近年来，由于该菌株致病力不断攀升及广泛传播使其成为全球抗生素危机下最受关注的细菌病原之一^[3]。甲型流感造成的高死亡率与继发性细菌感染密切相关^[4-5]，有研究表明在 H1N1 感染的 2~3 d 后，肺上皮组织受到破坏、细菌易感率增加，造成肺组织损伤加重。

由于细菌耐药性不断增强及病毒的高变异性，临床亟需抗生素以外的新型治疗策略^[6]。传统中药从整体观出发，抗病毒作用机制遵循整体治疗理念，不仅可以直接抑制或杀灭病原体，而且能够调节免疫功能、减轻机体病理损伤^[7]，具有少并发症和低不良反应等独特优势^[8]。本研究进行传统解热抗炎类中药抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型研究。

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花，具有清热解毒、疏散风热的作用^[9-10]，金银花素有“中药中的青霉素”之称，具有显著的抗菌、抗脓毒症及抗炎活性^[11-14]，临床上常用于治疗上呼吸道感染^[15]、疱

疹性咽峡炎^[16]、肺炎^[17]等热症、炎症，疗效显著。另外，金银花具有显著的抗病毒活性，对 H1N1^[18-19]、呼吸道合胞病毒^[20]、新型冠状病毒^[21]等均具有预防和治疗作用。本课题组前期研究表明，金银花具有显著的抗 H1N1^[18-19]和抗 *S. aureus* 感染^[12]活性，鉴于流感继发细菌感染造成的不良预后与过激的炎症反应有关^[22]，而金银花具有较好的抗炎活性^[23]，因此推测金银花拟通过抑制机体炎症反应发挥治疗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染作用。

本研究通过建立致死/亚致死性 H1N1 继发 *S. aureus* 模型，明确金银花抗 H1N1 继发 *S. aureus* 活性，并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及流式细胞术等方法探究其作用机制，旨在为中医药抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Nanodrop One 型超微量分光光度计（赛默飞世尔科技公司）；CFX Connect 型实时荧光定量 PCR 仪、580BR 10080 型 PCR 扩增仪（伯乐生命医学产品有限公司）；R500 型动物麻醉机（瑞沃德生命科技有限公司）；BD AccuriC6 Plus 流式细胞仪（美国 BD 公司）。

1.2 药物及主要试剂

山东省九间棚金银花种植基地中金 1 号大白时期金银花，经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴

定均为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花；磷酸奥司他韦颗粒（OT，货号 H20080763），购自宜昌东阳光长江药业股份有限公司；头孢克洛缓释片（CF，货号 D505714），购自亿腾医药有限公司；Mouse 肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）High Sensitivity ELISA Kit（货号 A282H40237）、Mouse 干扰素- γ （IFN- γ ）High Sensitivity ELISA Kit（货号 A280H30724）、Mouse 单核细胞趋化蛋白-1（MCP-1）ELISA Kit（货号 EK287/2-96），均购自联科生物技术股份有限公司；Anti-Mouse IFN- γ （货号 F21IFNG03）、Anti-Mouse APC（Clone: XMG1.2）检测试剂（货号 F2100401/2）、Anti-Mouse CD4，FITC（Clone: GK1.5）检测试剂（货号 F21016320）、Anti-Mouse CD16/CD32，Purified（Clone: 2.4G2）功能抗体，均购自联科生物技术股份有限公司；白细胞介素（IL）-4 Monoclonal Antibody（11B11）（货号 12-7041-82），购自赛默飞世尔科技有限公司；佛波酯（PMA/TPA）（货号 S1819-1 mg）、Ionomycin（货号 S1672）、Monensin（货号 S1753），均购自碧云天生物技术公司；小鼠外周血淋巴细胞分离液试剂盒（货号 P8620）、总 RNA 提取试剂盒（货号 R1200），均购自索莱宝生物技术公司；NP、 β -actin、MCP-1、TNF- α 、IL-4、IFN- γ 引物，均购自上海生工生物工程（上海）股份有限公司；SYBR Green qPCR 试剂盒（货号 AG11701）、Rescript II RT SuperMix for qPCR（+gDNA Eraser）（货号 AG11728），均购自于 AG 公司；异氟烷（货号 20220101），购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司；胰蛋白胨（酶解）（货号 LP0042B），购自赛默飞世尔科技有限公司；酵母提取物（货号 EZ6570515A），购自德国 Biofrox 公司。

1.3 实验动物

SPF 级健康雌性 ICR 小鼠 126 只，3~4 周龄，体质量 18~23 g，购自济南朋悦实验动物繁育有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（鲁）2022-0006。小鼠饲养于山东中医药大学抗病毒实验动物中心 SPF 级屏障环境中，饲养环境：温度 20~26 °C，相对湿度 40%~70%，12 h/12 h 昼夜交替。本研究获得山东中医药大学动物伦理委员会批准，批准号 SDUTCM20230413611。

1.4 病毒及细菌

H1N1（A/PR/8/34）由山东中医药大学抗病毒实验中心惠赠；革兰阳性 *S. aureus*（ATCC6538）购

自美国典型培养物保藏中心。

2 方法

2.1 药物制备

金银花水提物（LJAE）的制备：水蒸汽蒸馏提取器中加入蒸馏水 80 °C 预热，而后加入 30 g 金银花药材，加热提取 1.5 h，分别收集芳香水（75 mL）、水提液，水提液滤过并用苹果酸调节 pH 值至 4.3，旋蒸浓缩至 66.67 mL，再与芳香水混合，4 °C 保存备用。经高效液相色谱法检测，金银花中绿原酸质量分数为 1.6%、木犀草苷质量分数为 1.3%、总酚酸质量分数为 11.9%，均符合《中国药典》2020 年版相关要求。

S. aureus 菌液制备：挑取单菌落 *S. aureus* 置于液体培养基（胰蛋白胨：氯化钠：酵母提取物：双蒸水=2：2：1：200）中于 37 °C 细菌培养振荡箱中培养 24 h 得到菌液，使用平板法进行菌落计数，计数后使用磷酸盐缓冲液（PBS）调整菌液至造模浓度。

2.2 致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型制备及分组给药

小鼠按体质量随机分为对照组、模型组、OT（抗病毒阳性药，11 mg·kg⁻¹，临床等效剂量）组、CF（抗菌阳性药，106.38 mg·kg⁻¹，临床等效剂量）组和 LJAE 低、中、高剂量（6.5、13.0、26.0 mL·kg⁻¹）组，根据已有研究^[24]，小鼠经异氟烷麻醉后滴鼻感染 H1N1[0.2×半数致死量（LD₅₀）]，3 d 后滴鼻感染 *S. aureus*（每只 2×10⁵ CFU），建立致死型模型，对照组滴鼻等体积 0.9%氯化钠溶液。于感染 *S. aureus* 当天感染前 2 h ig 给药，每天 1 次，连续给药 5 d，对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水。于每天同一时间观察记录小鼠状态、体质量、生存率，至感染 *S. aureus* 后 14 d。

2.3 亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型制备及分组给药

小鼠分组同“2.2”项，根据已有研究^[24]，小鼠经异氟烷麻醉后滴鼻感染 H1N1（0.2×LD₅₀），3 d 后滴鼻感染 *S. aureus*（每只 2×10³ CFU），建立亚致死型模型，对照组滴鼻等体积 0.9%氯化钠溶液。于感染 *S. aureus* 当天感染前 2 h ig 给药，每天 1 次，至感染 *S. aureus* 后第 4 天。小鼠经异氟烷麻醉后，摘眼球取血；脱颈椎处死，用 2 mL 0.9%氯化钠溶液进行全肺灌洗，制得肺泡灌洗液用于细胞计数；或处死后摘取肺组织，左上肺叶浸于中性多聚甲醛

溶液中用于病理切片的制备，其他肺组织分装、经液氮速冻后，转移至-80℃保存，用于后续检测。

2.4 平板法检测肺菌量

参考相关研究^[25]，称取右上肺叶，按照 1：10 加入 PBS 研磨，并取 100 μL 于 LB 固体培养基（琼脂粉-胰蛋白胨-氯化钠-酵母提取物-双蒸水=3：2：2：1：200）涂布，置于 37℃细菌培养震荡箱中培养 24 h，计数。

2.5 肺组织切片的制备

对小鼠左上肺叶进行石蜡包埋、切片，常规 HE 染色，在显微镜下观察。

2.6 中性粒细胞及巨噬细胞计数

取不同组小鼠肺泡灌洗液滴加 10 μL 瑞氏-姬姆萨复合染色液进行染色，晾干后置于显微镜下观察中性粒细胞及巨噬细胞数量^[26-27]。

2.7 qRT-PCR 检测

按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取肺组织 RNA，利用 PrimeScript RT reagent Kit 逆转录总 RNA 获得 cDNA 样本，按照 SYBRs Premix Ex Tap TM II 说明书对 cDNA 样品进行 qRT-PCR 实验。反应条件为：95℃、30 s 变性；95℃、5 s 解链，60℃、30 s 退火和延伸，共 40 个循环。各样本的 C_t 值经内参基因 *β-actin* 均一化处理。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequence

基因	序列 (5'→3')
H1N1-NP	F: GTATGGACCTGCCGTAGC R: CGTCTACCTGCAGCCTC
<i>β-actin</i>	F: CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG R: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG
MCP-1	F: GCTACAAGAGGATCACCAGCAG R: GTCTGGACCCATTCTTCTTGG
TNF-α	F: TGTAGCCACGTCGTAGC R: TTGAGATCCATGCCGTTG
IFN-γ	F: ATCTGGAGGAAGTGGCAAAA R: TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG
CXCL-1	F: ACTCAAGAATGGTCGCGAG R: CTGCCATCAGAGCAGTCTGT
IL-4	F: ATCATCGGCATTTGAACGAGGTC R: ACCTTGGAAGCCCTACAGACGA

2.8 ELISA 法检测肺组织 MCP-1、TNF-α、IFN-γ 水平

取小鼠肺组织按 1：10 加入 PBS 进行匀浆，按照 ELISA 试剂盒要求测定 IFN-γ、MCP-1、TNF-α

水平。

2.9 流式细胞术检测外周血 CD4⁺IFN-γ⁺ (Th1) / CD4⁺IL-4⁺ (Th2) 细胞比例

应用外周血淋巴细胞分离液试剂盒从血液分离得到外周血单个核细胞 (PBMC)。加入 PMA (终质量浓度 50 ng·mL⁻¹)、离子霉素 (终质量浓度 1.3 μg·mL⁻¹) 和莫能菌素 (终质量浓度 1.4 μg·mL⁻¹) 于培养箱中刺激培养 4 h。经 FC Block 封闭细胞表面 Fc 段受体后，加入 CD4-FITC 抗体进行表面染色，染色缓冲液清洗并加入 4%多聚甲醛固定液固定细胞。免疫染色通透液重悬细胞进行穿膜，加入 IFN-γ-APC 抗体、IL-4-PE 抗体进行胞内染色。染色缓冲液重悬细胞过筛后上机检测。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计软件进行分析，采用 GraphPad Prism 9.0 进行作图。以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较，服从正态分布采用方差分析，方差齐用 LSD 检验，方差不齐用 Dunett's T3 检验；不服从正态分布用秩和检验，生存率采用 Log rank test 分析。

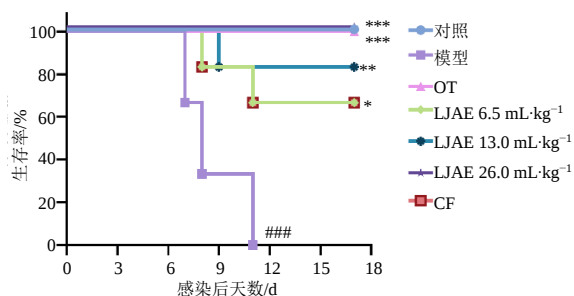
3 结果

3.1 LJAE 降低致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型的死亡率

在致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型中 (图 1)，模型组小鼠在继发 *S. aureus* 感染后第 3 天，出现了体质量下降、少动和呼吸急促等症状，死亡高峰期出现在继发 *S. aureus* 感染后第 5~8 天，死亡率 100%。与模型组比较，LJAE 高剂量组的症状减轻，体质量虽有下降但无死亡，死亡率显著降低 ($P<0.001$)；LJAE 中剂量组小鼠症状有所改善，但仍可观察到明显体质量下降和少动，死亡率显著降低，为 16.7% ($P<0.01$)；LJAE 低剂量组小鼠症状与模型组差异不大，死亡率明显降低，为 33.3% ($P<0.05$)。OP 组体质量降低较对照组减少，且体表症状轻微，无死亡；CF 组小鼠症状较模型组有所改善但体质量仍下降明显，死亡率显著降低，为 16.7% ($P<0.01$)。结果表明 LJAE 对致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型小鼠具有保护作用，可明显降低小鼠死亡率，延长生存时间，提高生存质量。

3.2 LJAE 降低亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 肺病毒量和肺菌量

测定亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型小鼠的肺指数，结果如图 2-A 所示，与对照组比较，模型

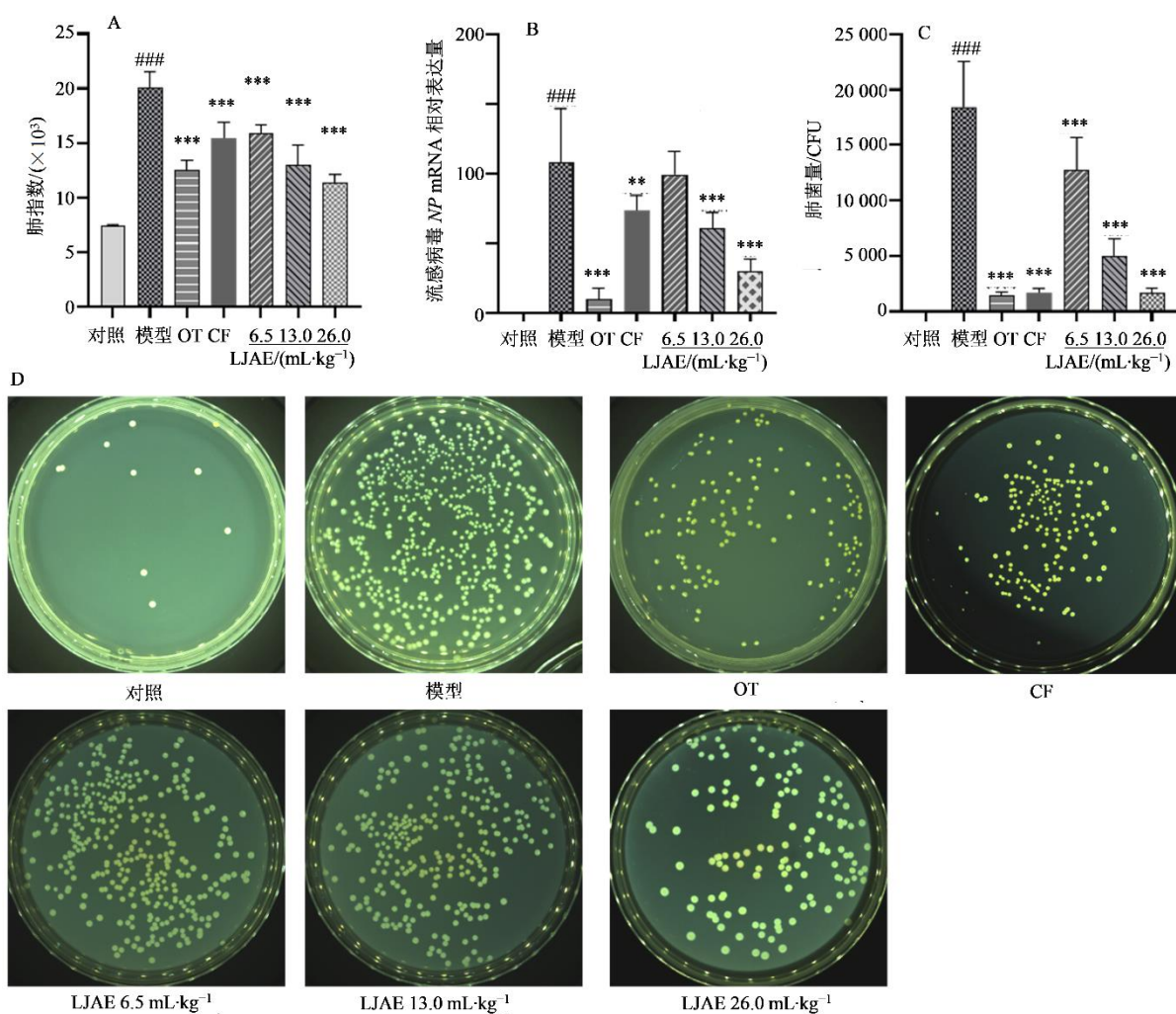


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 1 LJAE 降低致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型的死亡率 ($n=6$)

Fig. 1 Reduce of LJAE on mortality in lethal secondary *S. aureus* model of H1N1 ($n=6$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 2 LJAE 对亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染小鼠肺指数 (A)、肺病毒量 (B) 和肺菌量 (C、D) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Effect of LJAE on lung index (A), lung viral load (B), and lung bacterial load (C and D) in mice with sublethal type secondary *S. aureus* infection caused by H1N1 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组小鼠肺指数显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, LJAE 低、中、高剂量组肺指数均显著降低 ($P < 0.001$)。LJAE 高剂量组肺指数与 OT 组相比无显著性差异, 较 CF 组下降。

qRT-PCR 检测结果表明 (图 2-B), 与对照组比较, 模型组小鼠肺病毒量显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, LJAE 中、高剂量组的肺病毒量显著降低 ($P < 0.001$)。LJAE 高剂量组肺病毒量与 OT 组相比无显著性差异, 较 CF 组下降。

平板法检测肺菌量表明 (图 2-C、D), 与对照组相比, 模型组肺菌量显著增多 ($P < 0.001$); 与模型组相比, LJAE 低、中、高剂量组肺菌量均显著下降 ($P < 0.001$)。LJAE 高剂量组肺菌量与 OT、CF 组相比无显著性差异。

3.3 LJAE 减轻亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 模型小鼠肺损伤

病理切片显示(图 3),对照组肺各级支气管结构完整清晰,支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞形态正常;模型组、CF 组、LJAE 低剂量组肺组织大片实质化,其间可见明显纤维组织增生,肺泡上皮细胞增多,局部肺泡上皮细胞变性坏死,肺泡腔和肺间质内有大量炎性细胞浸润,以核圆深染的淋巴细胞和杆状分叶的中性粒细胞为主;LJAE 中剂量组肺组织实质化有所改善,但局部肺泡上皮细胞仍有增多;LJAE 高剂量组见少量炎性细胞浸润,肺泡上

皮细胞变性坏死显著减少,肺组织形态改变与 OP 组相近。

药效学结果表明,致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型中小鼠生存率低,亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型导致肺组织大片实质化、肺损伤严重;LJAE 可显著降低 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的死亡率,降低肺病毒量和肺菌量,改善肺组织损伤,具有显著抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的活性,抗菌、抗病毒活性,且作用呈剂量相关性。故本研究选择 LJAE 高剂量组为最佳给药剂量进行后续 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型研究。

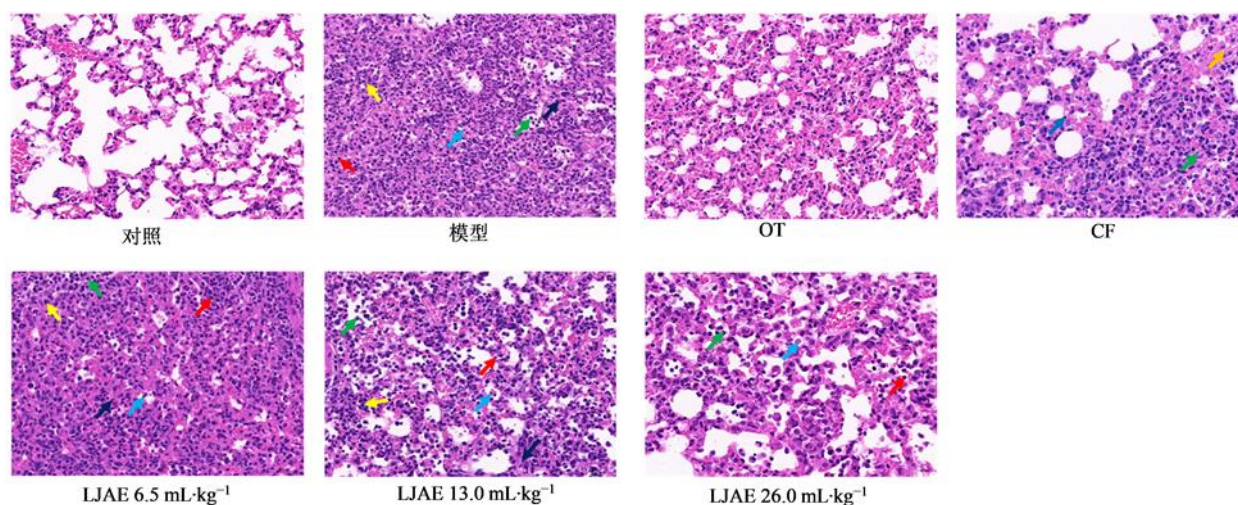


图 3 LJAE 对亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染小鼠肺损伤的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of LJAE on lung injury in mice with sublethal type secondary *S. aureus* infection induced by H1N1 (×400)

3.4 LJAE 对肺部中性粒细胞和巨噬细胞的募集及 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IFN- γ /IL-4 表达的影响

研究表明,H1N1 继发 *S. aureus* 感染会引发肺组织中炎性细胞的大量浸润^[28-29],本实验通过瑞氏-姬姆萨染色法对小鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞进行计数。结果表明(图 4),与对照组相比,模型组小鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞数目均显著性增加($P<0.001$)。与模型组相比,LJAE 高剂量组巨噬细胞和中性粒细胞数目均显著性降低($P<0.001$),且较 OT 组更低,与 CF 组无显著性差异。

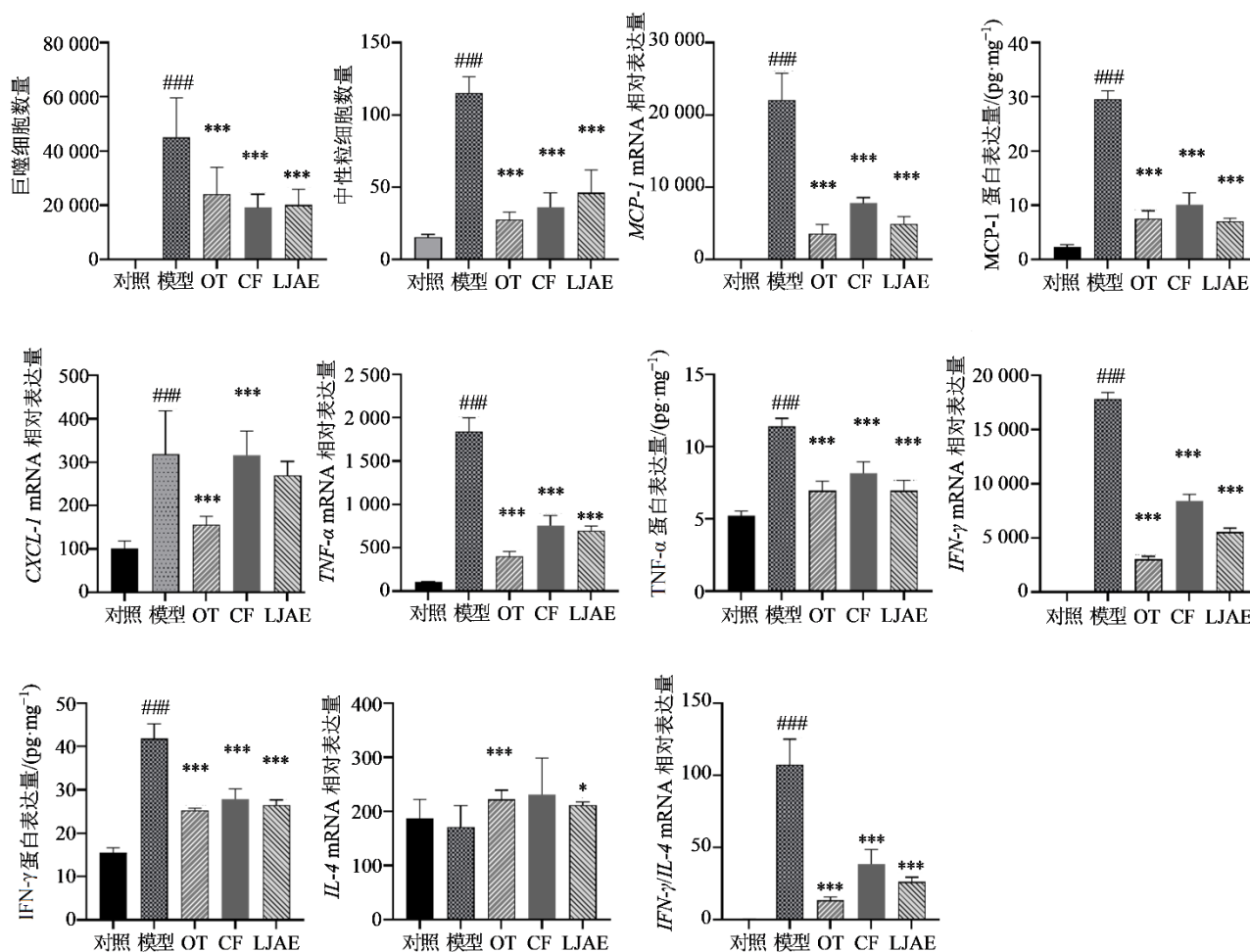
本实验同时检测了小鼠肺组织中单核细胞趋化因子 MCP-1 和中性粒细胞趋化因子 CXCL-1 的表达情况。qRT-PCR 及 ELISA 检测表明,相较于对照组,模型组 MCP-1 表达显著升高($P<0.001$);相较于模型组,LJAE 高剂量组 MCP-1 表达显著降

低($P<0.001$),且与 OT 组无显著差异,较 CF 组降低。

qRT-PCR 检测结果表明,相较于对照组,模型组 CXCL-1 mRNA 表达显著升高($P<0.001$);LJAE 高剂量组 CXCL-1 mRNA 表达较模型组降低,但无显著性差异。

TNF- α 是导致急性肺损伤的关键细胞因子,主要由活化的巨噬细胞及中性粒细胞产生。qRT-PCR 及 ELISA 检测结果表明,相较于对照组,模型组 TNF- α 表达显著升高($P<0.001$)。相较于模型组,LJAE 高剂量组 TNF- α 表达显著降低($P<0.001$),且与 OT、CF 组无显著差异。

IFN- γ 是重要的抗病毒细胞因子,通过激活巨噬细胞和直接抑制病毒复制增强机体的抗病毒能力^[30],IFN- γ 可以通过抑制 Th2 型细胞反应使 Th1/Th2 的平衡移向 Th1 型细胞反应,从而发挥抗



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 4 LJAE 对亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型小鼠肺泡灌洗液中巨噬细胞、中性粒细胞及肺组织中 MCP-1、CXCL-1、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4 及 IFN- γ /IL-4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effects of LJAE on neutrophils and macrophages in alveolar lavage, and MCP-1, CXCL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IFN- γ /IL-4 expression in lung tissue of mice with sublethal secondary *S. aureus* infection and H1N1 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

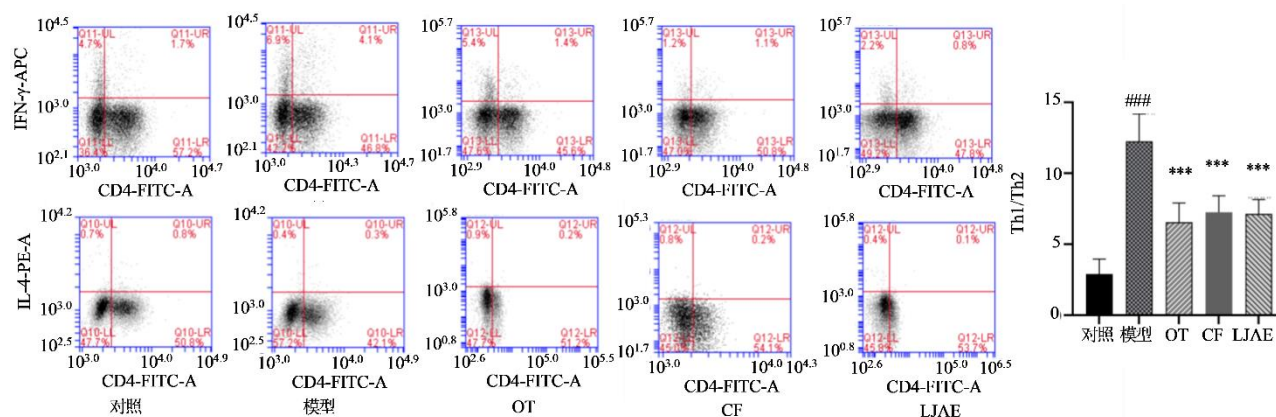
肺组织纤维化作用^[31]。qRT-PCR 及 ELISA 检测表明,相较于对照组,模型组 IFN- γ 表达显著升高 ($P < 0.001$);相较于模型组, LJAE 高剂量组 IFN- γ 表达显著降低 ($P < 0.001$),且与 OT 组无显著差异,较 CF 组降低 ($P < 0.001$)。

鉴于 TNF- α 、IFN- γ 均为 Th1 细胞分泌的细胞因子^[32],推测 LJAE 可能具有调节因 H1N1 继发 *S. aureus* 感染造成的 Th1/Th2 失衡的潜力。本实验检测了 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达, qRT-PCR 检测结果表明,与模型组比较, LJAE 组 IL-4 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$)。相较于对照组,模型组 IFN- γ /IL-4 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.001$);相较于模型组, LJAE 高剂量组 IFN- γ /IL-4 mRNA 相

对表达量显著降低 ($P < 0.001$),且与 OT 组无显著差异,较 CF 组降低。鉴于 LJAE 高剂量组能够有效降低 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 的表达,减少肺部中性粒细胞和巨噬细胞的募集,有效降低了 IFN- γ /IL-4 mRNA 相对表达量,认为金银花在发挥抗病毒和抗菌活性的同时表现出了显著的抗炎活性。

3.5 LJAE 降低亚致死型 H1N1 继发 *S. aureus* 感染小鼠模型外周血单核细胞 CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺

为进一步确定 LJAE 对 H1N1 继发 *S. aureus* 感染引发的 Th1/Th2 失衡的影响,采用流式细胞术测定外周血 CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) 和 CD4⁺IL-4⁺ (Th2) 细胞的百分比例 (图 5)。结果表明,与对照组相比,模型组 CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺ 显著升高 ($P < 0.001$),



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图 5 外周血 CD4⁺ IFN-γ⁺和 CD4⁺ IL-4⁺细胞的百分比 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Percentage of CD4⁺ IFN-γ⁺ and CD4⁺ IL-4⁺ cells in peripheral blood ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

提示 H1N1 继发 *S. aureus* 感染使 Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移。与模型组相比, LJAE 高剂量组 CD4⁺IFN-γ⁺/CD4⁺IL-4⁺显著降低 ($P < 0.001$), 且与 OT、CF 组无显著性差异。结果表明 LJAE 的抗炎活性可能与纠正 H1N1 继发 *S. aureus* 感染造成的 Th1/Th2 失衡, 抑制过激的 Th1 型反应有关。

4 讨论

H1N1 是一种具有高度传染性的病原体, 易引发急性呼吸道感染, 原发性 H1N1 感染后首先破坏肺上皮组织的完整性, 造成肺上皮组织损伤并降低肺上皮细胞修复能力, 从而导致肺部整体结构遭到破坏, 并增加了细菌的易感性^[32]。与本研究不同是, 王剑等^[33]研究发现 *S. aureus* 致敏可以显著减轻流感病毒感染导致的肺脏免疫损伤, 而 Kudva 等^[34]研究发现相较于单独感染 *S. aureus* 的小鼠而言, 同时感染甲型流感病毒和 *S. aureus* 的小鼠肺部负担和死亡率增加, 这与本研究的构建继发感染模型的目的与实际情况相符。在机体免疫方面, H1N1 入侵肺组织过度激活炎症信号通路使大量免疫细胞募集, 从而产生过度炎症反应, 引起以 TNF-α、IFN-γ 为代表的促炎细胞因子异常表达, 引起局部炎症风暴, 进一步加重肺组织器官损伤^[35]。H1N1 侵入机体后, 自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞等非特异性免疫细胞通过模式识别受体监视被病毒感染的靶细胞, 并传递抗病毒信号^[28-29]。*S. aureus* 为重症肺炎常见感染细菌类型, 此病菌致病能力强, 耐药性高, 早期识别 *S. aureus* 能有效指导临床治疗并降低

重症肺炎患者的病死风险^[36]。H1N1 继发 *S. aureus* 感染会引起坏死性支气管炎、肺炎等严重疾病, 引发严重的并发症甚至引起死亡^[37]。研究发现 LJAE 可显著降低 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的死亡率, 其中 LJAE 高剂量组死亡率最低, 且 LJAE 高剂量组小鼠肺组织中肺病毒量、肺菌量相较于模型组下降最多, 肺病毒量下降趋势与 OT 组无差异, 肺菌量下降趋势与 CF 组无差异, 且 LJAE 高剂量组肺组织结构清晰、无明显病变, 炎性细胞浸润程度趋近于 OT 组及对照组, 因此在 H1N1 继发 *S. aureus* 感染后, 施以 26 mL·kg⁻¹ LJAE 干预, 能够有效发挥其抑菌、抗病毒的药理活性。

炎症反应是由机体对病毒或细菌的致病相关分子模式 (PAMPs) 的识别所介导的^[38]。当入侵性病原体侵袭机体时, PAMPs 和损伤相关分子模式 (DAMP) 可与这些细胞群上的模式识别受体 (PRR) 结合, PRR 的连接导致细胞信号传导途径的激活及可溶性干扰素 (IFN) 的产生^[39]。H1N1 继发 *S. aureus* 感染时分泌产生促炎细胞因子和趋化因子, 如 IFN-γ、TNF-α、MCP-1 等, 促炎细胞因子和趋化因子的诱导产生又与“细胞因子风暴”的诱导有关^[28-29]，“细胞因子风暴”的产生导致机体产生炎症免疫应答, 同时这些因子又通过募集天然免疫细胞从而抵抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染。此外 H1N1 继发 *S. aureus* 感染后会引发机体产生过度炎症反应, 首先机体在肺部募集的大量中性粒细胞、单核-巨噬细胞造成肺部炎性细胞过度浸润, 同时分泌大量

MCP-1、TNF- α 、IFN- γ 等促炎因子、趋化因子,从而导致炎症反应加重。Liu 等^[40]研究发现 *S. aureus* 侵入肺部巨噬细胞诱导 TNF- α 促炎因子产生进而导致巨噬细胞坏死性凋亡,与本研究相似。本研究发现 H1N1 继发 *S. aureus* 感染后,小鼠肺组织内 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 因子异常表达,在给予 26 mL·kg⁻¹ LJAE 干预后,显著性降低了肺组织内 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 的表达,同时降低 IFN- γ /IL-4 mRNA 表达相对表达量,减少了肺部中性粒细胞和巨噬细胞的募集,改善了小鼠肺部炎症细胞浸润,抑制了由于 H1N1 继发 *S. aureus* 感染引起的机体过度炎症反应。证实 LJAE 可以通过调控促炎因子、趋化因子的表达,抑制机体局部炎症反应的发生,从而发挥治疗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染的作用。

肖文艳等^[41]研究发现小鼠感染 *S. aureus* 后刺激巨噬细胞活化 JNK 信号通路,继而能够影响 Th1/Th2 型细胞因子的表达,任亮等^[42]研究发现清营解表合剂通过调节流感病毒感染小鼠外周血 Th 型细胞因子的表达水平,恢复机体的抗感染免疫平衡,提高机体免疫功能,以防治流感病毒感染。且 Th1/Th2 失衡与炎症的形成和各种免疫疾病的发生有关^[43-44],Th1 细胞在抵抗病毒感染中尤为重要,通过产生 IFN- γ 等细胞因子,激活巨噬细胞,增强细胞毒性 T 细胞的功能,鉴于 TNF- α 和 IFN- γ 是 Th1 型细胞因子,推测 LJAE 调控了 Th1/Th2 平衡。本研究发现,H1N1 继发 *S. aureus* 感染可使外周血单核细胞 CD4⁺IFN- γ ⁺ 细胞增多,CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺ 细胞比例升高。金银花治疗后 CD4⁺IFN- γ ⁺ 细胞减少,CD4⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺IL-4⁺ 细胞比例降低。证实 LJAE 能够通过纠正 Th1/Th2 向 Th1 偏移,避免过度的 Th1 型免疫反应,降低 Th1 型细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 释放,从而减轻 H1N1 继发 *S. aureus* 感染导致的肺损伤。

本研究证实 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型会导致病死率增加、肺病毒量及肺菌量增加、肺部炎症细胞增多从而导致严重肺部损伤。而 LJAE 在体内具有显著的抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染活性,能够降低感染小鼠肺组织病毒量、死亡率,改善肺部炎症。并且 LJAE 可能通过纠正 Th1/Th2 向 Th1 偏移,避免了过度的 Th1 型免疫反应,降低了 Th1 型细胞因子 TNF- α 和 IFN- γ 的释放,从而减轻机体炎症反应。这些发现为金银花作为一种有效的抗病毒继发细菌感染药物提供了参考,为我国新发、突发传染

病的防治提供有效支撑,为中药解表抗病毒类药物抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染提供研究思路,为未来防控病毒风险储备候选中药,同时为推进中药现代化的进程提供实验参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙雅娜. 甲型 H1N1 流感患者 200 例临床特征分析 [J]. 中国城乡企业卫生, 2020, 35(8): 114-116.
Sun Y N. Clinical characteristics of 200 patients with influenza A (H1N1) [J]. Chin J Urban Rural Enterp Hyg, 2020, 35(8): 114-116.
- [2] 李晶晶, 刘晓东, 肖峰, 等. 甲型流感病毒合并肺部感染与非病毒性肺部感染的表现及治疗分析 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(17): 3366-3369.
Li J J, Liu X D, Xiao F, et al. Manifestation and treatment of influenza A virus with pulmonary infection and non-viral lung infection [J]. Prog Mod Biomed, 2019, 19(17): 3366-3369.
- [3] 王婷婷, 王建锋, 周永林, 等. 山柰酚作为 ADAM10 抑制剂抗金黄色葡萄球菌感染的机制研究 [A]//中国毒理学会第九次全国青年科技大会暨第二届生物技术药物毒理与安全评价委员会学术会议论文集 [C]. 厦门: 中国毒理学会, 2023.
Wang T T, Wang J F, Zhou Y L, et al. Research on the mechanism of using kaempferol as an ADAM10 inhibitor to resist *Staphylococcus aureus* infection [A]//Proceedings of the 9th National Youth Science and Technology Conference and the 2nd Biotechnology Drug Toxicology and Safety Evaluation Committee Academic Conference of the Chinese Society of Toxicology [C]. Xiamen: Chinese Society of Toxicology, 2023.
- [4] Harish M M, Ruhatiya R S. Influenza H1N1 infection in immunocompromised host: A concise review [J]. Lung India, 2019, 36(4): 330-336.
- [5] Sun K E, Yajjala V K, Bauer C, et al. Nox2-derived oxidative stress results in inefficacy of antibiotics against post-influenza *S. aureus* pneumonia [J]. J Exp Med, 2016, 213(9): 1851-1864.
- [6] 时艳杰, 张颖, 甘雨, 等. 基于“肺与大肠相表里”理论探讨射干止咳胶囊对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染肺炎大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 55-60.
Shi Y J, Zhang Y, Gan Y, et al. Effect of Shegan Zhike capsule (射干止咳胶囊) on intestinal flora of pneumonia rats infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on theory of “lung and large intestine” [J].

- Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(11): 55-60.
- [7] Li L, Wu Y Z, Wang J B, et al. Potential treatment of COVID-19 with traditional Chinese medicine: What herbs can help win the battle with SARS-CoV-2? [J]. Engineering, 2022, 19: 139-152.
- [8] 魏清筠, 陈姣, 周谦, 等. 中药抗呼吸道病毒感染性疾病的研究述评 [J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(10): 1141-1148.
- Wei Q Y, Chen J, Zhou Q, et al. Review on Chinese medicine against respiratory viral infectious disease research [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2024, 40(10): 1141-1148.
- [9] 李姚姚. 中药金银花化学成分及药理作用研究进展 [A]. 中国中西医结合学会中药专业委员会. 全国中药研究学术讨论会论文集 [C]. 南昌: 中国中医研究院中药研究所, 2003.
- Li R R. Research progress on chemical components and pharmacological effects of traditional Chinese medicine honeysuckle [A]. Chinese Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Professional Committee of Chinese Materia Medica. Proceedings of the National Academic Symposium on Chinese Materia [C]. Nanchang: Institute of Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, 2003.
- [10] 侯士良, 赵晶, 杨国营, 等. 金银花最早出处及药用部位考证 [J]. 中药材, 1997(11): 583-585.
- Hou S L, Zhao J, Yang G Y, et al. Textual research on the earliest provenance and medicinal parts of honeysuckle [J]. J Chin Med Mater, 1997(11): 583-585.
- [11] 冯峰, 段晓怡, 徐美霞, 等. 金银花质量等级标准研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(18): 6656-6662.
- Feng F, Duan X Y, Xu M X, et al. Study on quality grade standard of *Lonicerae japonicae Flos* [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(18): 6656-6662.
- [12] 高樱, 牛水蛟, 于海英, 等. 基于谱-效相关金银花提取物抑菌作用质量评价系统的研究 [J]. 药物分析杂志, 2024, 44(6): 1031-1039.
- Gao Y, Niu S J, Yu H Y, et al. Research on the quality evaluation system of antibacterial activity of *Flos Lonicerae* extract based on chromatogram-effect correlation [J]. Chin J Pharm Anal, 2024, 44(6): 1031-1039.
- [13] 李平, 赵成. 金银花水提物及醇提物体外抗菌实验 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(17): 48-48, 50.
- Li P, Zhao C. Antibacteria test of aqueous extract and ethanol extract of *Flos lonicerae japonicae* [J]. China Mod Med, 2010, 17(17): 48-48, 50.
- [14] 李文举, 罗福龙, 王凤忠, 等. 金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 79-89.
- Li W J, Luo F L, Wang F Z, et al. Exploring the mechanism of *Lonicerae japonicae Flos* water extract in the treatment of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 79-89.
- [15] 汪建华. 金银花口服液治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2023, 33(8): 41-43.
- Wang J H. Observation on therapeutic effect of honeysuckle oral liquid on acute upper respiratory tract infection in children [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 33(8): 41-43.
- [16] 蔡晓政. 金银花口服液联合伐昔洛韦治疗单纯疱疹的临床效果及其机制探讨 [J]. 医学理论与实践, 2023, 36(12): 2055-2057.
- Cai X Z. Clinical effect and mechanism of honeysuckle oral liquid combined with valaciclovir in the treatment of herpes simplex [J]. J Med Theory Pract, 2023, 36(12): 2055-2057.
- [17] 李晨, 吕婧, 杨龙飞, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 整合网络药理学探讨金银花抗 RSV 肺炎的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(8): 769-776.
- Li C, Lyu J, Yang L F, et al. Integrate network pharmacology to explore the anti-RSV pneumonia mechanism of *Lonicera Japonica* Thunb. based upon UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS [J]. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(8): 769-776.
- [18] 高燕, 赵渤年, 于宗渊, 等. 金银花抗流感病毒谱-效相关质量评价模式的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3508-3511.
- Gao Y, Zhao B N, Yu Z Y, et al. Study on the spectrum-efficient correlation pattern for quality evaluation of *Lonicerae Japonicae Flos* on anti-influenza virus [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2013, 28(12): 3508-3511.
- [19] 王变利, 高燕, 赵秀香. 金银花水提物体外抗病毒实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(8): 1495-1497.
- Wang B L, Gao Y, Zhao X X. Study on *Lonicera japonica* Thumb. antiviral effect in vitro [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2015, 42(8): 1495-1497.
- [20] 张旋, 郑明星, 朱志兵, 等. 金银花体外抗呼吸道合胞病毒作用研究 [J]. 新中医, 2014, 46(6): 204-206.
- Zhang X, Zheng M X, Zhu Z B, et al. Anti-respiratory syncytial virus effect of honeysuckle *in vitro* [J]. J New Chin Med, 2014, 46(6): 204-206.
- [21] 张又莉, 雷亮, 徐勇, 等. 金银花口服液治疗新型冠状病毒肺炎 80 例临床疗效分析 [J]. 中国药业, 2020, 29(9): 23-26.

- Zhang Y L, Lei L, Xu Y, et al. Clinical efficacy of Jinyinhua oral liquid in the treatment of 80 patients with coronavirus disease 2019 [J]. China Pharm, 2020, 29(9): 23-26.
- [22] Deinhardt-Emmer S, Rennert K, Schicke E, et al. Co-infection with *Staphylococcus aureus* after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model [J]. Biofabrication, 2020, 12(2): 025012.
- [23] Schicke E, Csereenyés Z, Rennert K, et al. *Staphylococcus aureus* lung infection results in down-regulation of surfactant protein-a mainly caused by pro-inflammatory macrophages [J]. Microorganisms, 2020, 8(4): 577.
- [24] 韩雨秀, 赵良鑫, 杜宝香, 等. 流感病毒-金黄色葡萄球菌共感染小鼠模型建立及达菲的干预作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 463-470.
- Han Y X, Zhao L X, Du B X, et al. Establishment of a mouse model by influenza virus-*Staphylococcus aureus* co-infection and intervention effect of Tamiflu [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(4): 463-470.
- [25] 向亚平, 鲁建云, 李飞凤, 等. 臭氧化山茶油对金黄色葡萄球菌的体外杀伤效果 [J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(2): 139-142.
- Xiang Y P, Lu J Y, Li F F, et al. Bactericidal effect of ozonated Camellia oil on *Staphylococcus aureus* in vitro [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2018, 43(2): 139-142.
- [26] 吴志豪, 杨露银, 任维, 等. 小鼠支气管肺泡灌洗术研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1368-1373.
- Wu Z H, Yang L Y, Ren W, et al. Research progress of bronchoalveolar lavage in mice [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2023, 31(10): 1368-1373.
- [27] 龙隆, 赵显莉, 谭红, 等. 大、小鼠支气管肺泡灌洗术的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(12): 115-119.
- Long L, Zhao X L, Tan H, et al. Research progress of bronchoalveolar lavage in rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(12): 115-119.
- [28] 李杰婷, 陈俏连, 赵昕, 等. 香雪抗病毒口服液体外抗甲型流感病毒及炎症因子的作用机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(9): 2118-2125.
- Li J T, Chen Q L, Zhao X, et al. Mechanism of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid against influenza A virus and inflammatory factors in vitro [J]. Drugs Clin, 2023, 38(9): 2118-2125.
- [29] 黄锐, 黄霞, 车霄, 等. 甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠肺共信号分子变化研究 [J]. 解放军医学院学报, 2024, 45(4): 405-410.
- Huang R, Huang X, Che X, et al. Changes of pulmonary co-signaling molecules in influenza A (H1N1) virus infected mice [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2024, 45(4): 405-410.
- [30] 包蕾, 刘燕, 耿子涵, 等. 天山堇菜提取物对甲型 H1N1 流感病毒感染小鼠的抗病毒及免疫调节作用研究 [J]. 病毒学报, 2024, 40(4): 695-704.
- Bao L, Liu Y, Geng Z H, et al. Study on the antiviral and immunomodulatory effects of *Viola tianshanica* maxim extract on mice infected with influenza A H1N1 virus [J]. Chin J Virol, 2024, 40(4): 695-704.
- [31] 吴燕燕. IFN- γ 在肺损伤纤维化中的研究进展 [J]. 国外医学(儿科学分册), 2003, 30(4): 213-215.
- Wu Y Y. Research progress of IFN- γ in lung injury fibrosis [J]. Foreign Med Sci Sect Pediatr, 2003, 30(4): 213-215.
- [32] Zhang Y, Zhang Y G, Gu W P, et al. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals [J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 841: 15-44.
- [33] 王剑, 李凤琦, 孙汭, 等. 呼吸道共生菌诱导 M2 型肺泡巨噬细胞减轻流感病毒感染导致的免疫损伤 [A]// 中国免疫学会. 第八届全国免疫学学术大会论文集 [C]. 重庆: 中国科学技术大学生命科学学院免疫学研究所, 2012.
- Wang J, Li F Q, Sun Y, et al. Respiratory commensal bacteria induce M2 alveolar macrophages to alleviate immune damage caused by influenza virus infection [A]// Institute of Immunology. Chinese Society of Immunology Proceedings of the 8th National Conference on Immunology [C]. Chongqing: School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, 2012.
- [34] Kudva A, Scheller E V, Robinson K M, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice [J]. J Immunol, 2011, 186(3): 1666-1674.
- [35] 张明惠, 米尔扎提·麦麦提, 郝梦, 等. 寒喘祖帕颗粒对甲型流感病毒 H1N1/PR8 株感染致小鼠肺炎的作用 [J]. 中成药, 2024, 46(9): 3154-3159.
- Zhang M H, Mirzati M M T, Hao M, et al. Effect of Hanchuan zupa granule on pneumonia in mice infected by influenza A virus H1N1/PR8 strain [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(9): 3154-3159.
- [36] Borgogna T R, Hisey B, Heitmann E, et al. Secondary bacterial pneumonia by *Staphylococcus aureus* following influenza A infection is SaeR/S dependent [J]. J Infect Dis, 2018, 218(5): 809-813.
- [37] Bartley P S, Deshpande A, Yu P C, et al. Bacterial coinfection in influenza pneumonia: Rates, pathogens, and outcomes [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2022, 43(2):

- 212-217.
- [38] Song J, Zhao J, Cai X J, et al. Lianhuaqingwen capsule inhibits non-lethal doses of influenza virus-induced secondary *Staphylococcus aureus* infection in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115653.
- [39] Aguilera E R, Lenz L L. Inflammation as a modulator of host susceptibility to pulmonary influenza, pneumococcal, and co-infections [J]. Front Immunol, 2020, 11: 105.
- [40] 刘博, 巩志国, 哈斯苏荣. MLKL 对金黄色葡萄球菌诱导的炎症介质分泌及炎症信号通路激活的影响 [J/OL]. 中国畜牧兽医, 2024: 1-10. (2024-11-29). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GWXK20241128016&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
Liu B, Gong Z G, Ha S. Effect of MLKL on the secretion of inflammatory mediators and the activation of inflammatory signaling pathway induced by *Staphylococcus aureus* [J/OL]. China Ind Econ, 2024: 1-10. (2024-11-29). <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=GWXK20241128016&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ>.
- [41] 肖文艳. 金黄色葡萄球菌刺激巨噬细胞活化 JNK 和 Th1/Th2 型细胞因子分泌的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2014.
- Xiao W Y. The effect of *Staphylococcus aureus* on macrophage activation of JNK and secretion of Th1/Th2 cytokines [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014.
- [42] 任亮, 宋素花, 姜璐, 等. 清营解表合剂对流感病毒感染小鼠外周血 Th1, Th2 型细胞因子动态表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 255-260.
- Ren L, Song S H, Jiang L, et al. Influence of Qingying Jiebiao Mixture on dynamic expression of peripheral blood cytokines Th1, Th2 in mice infected by influenza virus [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(11): 255-260.
- [43] Betakova T, Kostrabova A, Lachova V, et al. Cytokines induced during influenza virus infection [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(18): 2616-2622.
- [44] 任莉莉, 李富荣, 齐晖, 等. 论外周血 CD4+淋巴细胞及 Th1/Th2 细胞因子变化与 HIV/AIDS 疾病发展的相关性 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20): 3123-3125.
- Ren L L, Li F R, Qi H, et al. Correlation analysis between HIV/AIDS process and CD4⁺ cells and Th1/Th2 cytokines [J]. China J Mod Med, 2005, 15(20): 3123-3125.

[责任编辑 兰新新]