

基于抑制肺泡巨噬细胞耗竭探究热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒继发金黄色葡萄球菌感染的作用机制

张大杰¹, 柯斯元^{1,2}, 谢昊泽¹, 梁庭佳¹, 刘永俊³, 刘 玉^{4*}, 耿子凯^{1*}

1. 山东医药大学, 山东 烟台 264003

2. 安康市人民医院, 陕西 安康 725000

3. 山东祥隆医药研究院有限公司, 山东 烟台 264003

4. 深圳市中医院, 广东 深圳 518033

摘要:目的 从抑制肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 耗竭角度探究热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒继发金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 感染的药效机制。方法 建立 H1N1 继发 *S. aureus* 致死性和亚致死性感染模型, 给予药物干预后, 检测小鼠死亡率、体质量变化率、肺指数; qRT-PCR 法检测肺病毒量, 平板菌落计数法检测肺菌量; qRT-PCR 和 ELISA 法检测肺组织 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、CXC 趋化因子配体-1 (C-X-C motif chemokine ligand-1, CXCL-1)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达; ELISA 法检测支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中髓过氧化物酶-DNA 复合物 (myeloperoxidase-DNA, MPO-DNA) 和中性粒细胞弹性蛋白酶-DNA 复合物 (neutrophil elastase-DNA, NE-DNA) 水平; 流式细胞术检测肺单细胞悬液中 AMs、中性粒细胞和单核细胞比例, 检测外周血 1 型辅助性 T 细胞 (Thelper 1, Th1) / 2 型辅助性 T 细胞 (Thelper 2, Th2) 细胞比例。**结果** 与继发感染组相比, 高剂量的热毒宁注射液可降低小鼠死亡率、抑制体质量下降、降低肺指数 ($P < 0.01, 0.001$); 热毒宁注射液高、低剂量组均可显著降低肺病毒量和肺菌量 ($P < 0.05, 0.001$); 且高剂量的热毒宁注射液在抑制体质量下降、降低肺指数和肺病毒量方面优于头孢克洛 ($P < 0.05, 0.01$)。热毒宁注射液高、低剂量组肺组织 IFN- γ 、CXCL-1 水平显著降低, AMs 比例显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 热毒宁注射液高剂量组 MCP-1 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 且热毒宁注射液高剂量组 AMs 比例高于磷酸奥司他韦组和头孢克洛组 ($P < 0.05, 0.001$), CXCL-1 和 MCP-1 水平低于头孢克洛组 ($P < 0.05, 0.01$)。热毒宁注射液高、低剂量组中性粒细胞和单核细胞浸润均显著减少 ($P < 0.001$), 且热毒宁注射液高剂量组均优于磷酸奥司他韦组和头孢克洛组 ($P < 0.05, 0.001$)。热毒宁注射液高剂量组 TNF- α 水平显著下降 ($P < 0.01$), 热毒宁注射液高、低剂量组 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平显著下降 ($P < 0.05, 0.001$); 且热毒宁注射液高剂量组 TNF- α 和 NE-DNA 水平低于头孢克洛组 ($P < 0.01$)。热毒宁注射液高、低剂量组 Th1/Th2 比值显著下降 ($P < 0.01, 0.001$), 且热毒宁注射液高剂量组低于头孢克洛组 ($P < 0.05$)。**结论** 热毒宁注射液具有显著的抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染活性, 通过修正过激的 Th1 型免疫极化, 减少 IFN- γ 表达, 恢复 AMs 比例, 减少效应细胞浸润, 减轻了肺部炎症损伤。

关键词: 热毒宁注射液; 流感继发细菌感染; 肺泡巨噬细胞; Th1/Th2 稳态; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)08-2887-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.002

Mechanism of Reduning Injection against secondary *Staphylococcus aureus* infection following H1N1 influenza A virus infection based on inhibition of alveolar macrophages depletion

ZHANG Dajie¹, KE Siyuan^{1,2}, XIE Haoze¹, LIANG Tingjia¹, LIU Yongjun³, LIU Yu⁴, GENG Zikai¹

1. Shandong Medical and Pharmaceutical University, Yantai 264003, China

2. Ankang City People's Hospital, Ankang 725000, China

收稿日期: 2025-08-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81904103); 山东省自然科学基金青年基金资助项目 (ZR2020QH328); 国家级大学生创新创业训练计划 (202310440211); 国家级大学生创新创业训练计划 (202510440001)

作者简介: 张大杰, 硕士研究生, 从事中药药理学研究。Tel: 19861121228 E-mail: zdj10222023@163.com

*通信作者: 耿子凯, 博士, 副教授, 从事中药抗病毒与抗感染药理研究。Tel: 18660808601 E-mail: gengzikai@126.com

刘 玉, 博士, 主任医师, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究。Tel: 15813736562 E-mail: liuyutcm@foxmail.com

3. Shandong Xianglong Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Yantai 264003, China

4. Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which Reduning Injection (热毒宁注射液, RDN) against secondary *Staphylococcus aureus* infection following H1N1 influenza A virus infection by inhibiting alveolar macrophages (AMs) depletion. **Methods** Lethal and sub lethal infection model of H1N1 secondary *S. aureus* were established and drugs were given for intervention, mortality, body weight change rate and lung index of mice were determined. Lung viral load was detected by qRT-PCR and lung bacterial load was detected using plate colony counting. The expressions of interferon- γ (IFN- γ), C-X-C motif chemokine ligand-1 (CXCL-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue were analyzed by qRT-PCR and ELISA, levels of myeloperoxidase-DNA (MPO-DNA) and neutrophil elastase-DNA (NE-DNA) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by ELISA. Flow cytometry was used to assess the proportions of AMs, neutrophils and monocytes in lung single-cell suspensions and the proportion of T helper 1(Th1)/T helper 2 (Th2) cells in peripheral blood. **Results** Compared with the secondary infection group, high-dose of RDN reduced mortality and inhibited body weight loss and lung index ($P < 0.01, 0.001$). Both high-and low-dose of RDN significantly reduced lung virus and bacteria levels ($P < 0.05, 0.001$). High-dose of RDN were superior to cefuroxime in inhibiting weight loss, reducing the lung index and decreasing lung virus level ($P < 0.05, 0.01$). RDN high-and low-dose groups significantly reduced the levels of IFN- γ and CXCL-1 in lung tissue and significantly increased the proportion of AMs ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). RDN high-dose group significantly reduced MCP-1 level ($P < 0.05, 0.01$); The proportion of AMs in RDN high-dose group was higher than that of oseltamivir phosphate group and cefaclor group ($P < 0.05, 0.001$), while the levels of CXCL-1 and MCP-1 were lower than those of cefaclor group ($P < 0.05, 0.01$). The infiltration of neutrophils and monocytes in RDN high-and low-dose groups was significantly reduced ($P < 0.001$), and RDN high-dose group was superior to oseltamivir phosphate group and cefaclor group ($P < 0.05, 0.001$). The level of TNF- α was significantly decreased in RDN high-dose group ($P < 0.01$), while the levels of MPO-DNA and NE-DNA were significantly decreased in RDN high-and low-dose groups ($P < 0.05, 0.001$); The levels of TNF- α and NE-DNA in RDN high-dose group were lower than those in cefaclor group ($P < 0.01$). The Th1/Th2 ratio was significantly decreased in RDN high-and low-dose groups ($P < 0.01, 0.001$), and RDN high-dose group was lower than cefaclor group ($P < 0.05$). **Conclusion** RDN shows significant activity against secondary *S. aureus* infection following H1N1 infection. RDN alleviates lung inflammatory damage by correcting excessive Th1-type immune polarization, reducing IFN- γ expression, restoring the AMs ratio and reducing effector cell infiltration.

Key words: Reduning Injection; secondary bacterial infection following influenza; alveolar macrophages; Th1/Th2 homeostasis; inflammation

甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 感染多为自限性, 然而 IAV 感染增加了继发细菌感染的易感性, 而流感重症往往与继发细菌感染密切相关^[1]。对 1918—2009 年发生的 4 次全球流感大流行样本的回顾性研究发现, 40%~95% 的死亡病例是由流感继发细菌感染所致^[2]。即便有流感疫苗和抗生素, 但由于 IAV 高突变和细菌耐药等问题, 流感后的细菌感染仍较为普遍, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是最常见的病原体之一^[2-3]。肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs) 是驻留于肺泡中具有高效吞噬活性的免疫细胞^[4]。IAV 感染引发的 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 高表达可造成 AMs 耗竭, 这是导致流感继发细菌感染易感性增加的重要原因^[5-6]。由于 AMs 耗竭, 中性粒细胞和单核细胞被大量招募以应对细菌感染, 广泛的效应细胞浸润和不可控的炎症反应导致了流感继发细菌感染的

高致病性^[7-8]。因此, 抑制 AMs 耗竭, 恢复肺部固有免疫抗菌屏障, 可降低流感继发细菌感染易感性和致病性。

热毒宁注射液由栀子、青蒿和金银花 3 味中药组成, 主要用于治疗感冒、流行性感、上呼吸道感染和急性支气管炎等疾病, 安全性高, 疗效确切^[9]。已有研究报道了热毒宁注射液在体内外均具有抗 IAV 活性^[10-12]。课题组前期完成了热毒宁注射液治疗流感的大样本临床研究, 以磷酸奥司他韦为对照药物, 采用随机、对照、双盲设计评价了热毒宁注射液治疗流感的有效性和安全性。结果显示, 与磷酸奥司他韦相比, 热毒宁注射液显著缩短流病程, 对发热、恶寒、咽痛、鼻塞等流感样症状的改善优于磷酸奥司他韦; 且在研究期间未观察到严重不良反应^[13]。课题组也通过实验证实, 与利巴韦林相比, 热毒宁注射液可更好地缓解甲型 H1N1 流

感病毒感染所致的肺部炎症^[14]。此外,有研究报道了热毒宁注射液的抗菌活性^[15],临床经验亦提示热毒宁注射液对痰黄黏稠具有一定的治疗作用^[16]。然而关于热毒宁注射液能否治疗流感继发细菌感染尚无报道。

本研究以 H1N1 继发 *S. aureus* 感染为模型,首先在致死性和亚致死性感染模型中探究了热毒宁注射液抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染活性;而后检测了热毒宁注射液对 H1N1 感染所致 IFN- γ 高表达、AMs 耗竭和效应细胞浸润的干预作用;最后探究热毒宁注射液对 1 型辅助性 T 细胞 (T helper 1, Th1) / 2 型辅助性 T 细胞 (T helper 2, Th2) 稳态的调控作用。本研究从维持 Th1/Th2 稳态、抑制 IFN- γ 高表达所致 AMs 耗竭角度,探讨了热毒宁注射液抑制 H1N1 继发 *S. aureus* 感染所致炎症性肺损伤的药效机制,为热毒宁注射液临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物、病毒与细菌

SPF 级雌性 3 周龄 ICR 小鼠购自济南朋悦有限公司,生产许可证号 SCXK(鲁)2022-0006,动物饲养于动物生物安全二级实验室。本研究经滨州医学院伦理委员会批准(动研批第 2024-L060)。

H1N1 (A/PR/8/34) 由课题组保存,在 9 日龄鸡胚中扩增,对 ICR 小鼠毒力为 1.5×10^6 LD₅₀/mL (LD₅₀ 为半数致死量)。*S. aureus* (G⁺, ATCC6538) 由山东省医用抗菌材料高等学校重点实验室提供。

1.2 药品与试剂

热毒宁注射液(国药准字 Z20050217,批号 231019)购自江苏康缘药业股份有限公司;磷酸奥司他韦胶囊(国药准字 H20223182,批号 KE1F4020)购自齐鲁制药(海南)有限公司;头孢克洛胶囊(国药准字 H10930008,批号 230604)购自山东淄博新达制药有限公司;异氟烷(批号 20121301)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 061223231124)、免疫染色通透液(批号 080921240724)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;CXC 趋化因子配体-1 (C-X-C motif chemokine ligand-1, CXCL-1) 试剂盒(批号 20240410)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 试剂盒(批号 20240410)、IFN- γ 试剂盒(批号 20240410)、髓过氧化物酶-DNA 复合物 (myeloperoxidase-DNA, MPO-DNA) 试剂盒(批号 20240410)、中性粒细胞

弹性蛋白酶-DNA 复合物 (neutrophil elastase-DNA, NE-DNA) 试剂盒(批号 20240410)购自深圳市康贝科学仪器有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(批号 A282H40237)、FC Block (anti-mouse CD16/CD32) 封闭抗体(批号 A406133)、CD4-FITC 抗体(批号 A407423)、IFN- γ -APC 抗体(批号 A407451)、CD11b-FITC 抗体(批号 A409252)、CD45-PerCp-Cy5.5 抗体(批号 A410332)、淋巴细胞抗原 6G (lymphocyte antigen 6G, Ly-6G) -PE 抗体(批号 A410228)、CD11c-APC 抗体(批号 A409253)、F4/80-PE 抗体(批号 A409153)购自杭州联科生物技术有限公司;DEPC 水(批号 2336252)、4%多聚甲醛(批号 23333866)购自 Biosharp 公司;小鼠外周血淋巴细胞分离试剂盒(批号 240003001)、总 RNA 提取试剂盒(批号 240006004)购自北京索莱宝科技有限公司;淋巴细胞抗原 6C (lymphocyte antigen 6C, Ly-6C) -APC 抗体(批号 WU116V2F0442)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) -PE 抗体(批号 2863205)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;EvoM-MLV 反转录试剂盒(批号 A5A3027)、SYBR Green Premix Pro TaqHS qPCR 试剂盒(批号 A5A1470)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。

1.3 仪器

R500 型小鼠麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);5415R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);JXFSTPRP 型样品研磨仪(上海静信实业有限公司);DW-HL398 型超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司);Scan 300 型菌落计数器(法国 Interscience 公司);M2e 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);CFX 型荧光定量 PCR 仪、MyCycler 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);C6 Plus 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 致死性感染模型的建立及给药

将小鼠按体质量随机分为对照组、H1N1 感染组、H1N1 继发 *S. aureus* 感染组、磷酸奥司他韦(21.2 mg/kg, 相当于临床等效剂量)组、头孢克洛(106.3 mg/kg, 相当于临床等效剂量)组、热毒宁高剂量(11 mL/kg, 相当于人临床等效剂量的 4 倍,小鼠无不良反应的最大剂量)组和热毒宁低剂量(5.5 mL/kg)组,每组 6 只。小鼠经异氟烷麻醉后,滴鼻感染 0.2

LD₅₀ H1N1 (20 μL/只), 3 d 后滴鼻感染 1×10⁵ CFU *S. aureus* (20 μL/只) [17-18]; 对照组滴鼻等体积的生理盐水。于感染 *S. aureus* 当天开始给药, 磷酸奥司他韦组 ig 磷酸奥司他韦胶囊, 头孢克洛组 ig 头孢克洛胶囊, 热毒宁高、低剂量组用胰岛素注射器经尾 iv 热毒宁注射液, 对照组和继发感染组尾 iv 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。每天同一时间观察记录小鼠状态, 并称定体质量, 持续观察 14 d。

2.2 亚致死性感染模型的建立及给药

小鼠分组及感染方式同“2.1”项, *S. aureus* 感染量降至 1×10³ CFU (20 μL/只) [17-18]。于感染 *S. aureus* 当天开始给药, 连续给药 4 d。末次给药后 2 h, 小鼠经异氟烷麻醉, 气管切开插入软质针头, 细线固定, 注射 2 mL 生理盐水, 制得支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF); 麻醉后脱颈椎处死, 摘取肺组织称定质量, 左上肺叶浸于 4% 多聚甲醛溶液中, 剩余肺叶分装, 经液氮速冻后, 转移至 -80 °C 冰箱, 用于进一步检测; 取全肺于 PBS 中漂洗后用于制作肺单细胞悬液。

2.3 qRT-PCR 检测相关基因表达

取肺组织 50~100 mg, 经 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 经 EvoM-MLV 反转录试剂盒获得 cDNA, 用 SYBR Green Premix Pro TaqHS qPCR 试剂盒进行 qRT-PCR 检测。反应条件: 95 °C、30 s 变性; 95 °C、5 s 解链, 60 °C、30 s 退火和延伸, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的表达量, 以 *β-actin* 作为内参基因进行均一化处理。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5' -3')
<i>NP</i>	F: GTATGGACCTGCCGTAGC R: CTCTTGGGAGCACCTTCG
<i>CXCL-1</i>	F: TCCAGAGCTTGAAGGTGTTGCC R: AACCAAGGGAGCTTCAGGGTCA
<i>MCP-1</i>	F: GCTACAAGAGGATCACCAGCAG R: GTCTGGACCCATTCCTTCTTG
<i>TNF-α</i>	F: CCAAAGGGATGAGAAGTTCC R: CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
<i>IFN-γ</i>	F: CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG R: TTTCCGCTTCTGAGGCTGGAT
<i>β-actin</i>	F: CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG R: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

2.4 平板菌落计数法检测肺菌量

取 100 μL BALF 均匀涂布在直径 10 cm 的固体培养基表面, 置 37 °C 恒温培养箱 18 h, 菌落计数仪测量菌落数量。

2.5 ELISA 检测肺组织 CXCL-1、MCP-1、TNF-α、IFN-γ 及 BALF 中 MPO-DNA、NE-DNA 水平

每 10 mg 肺组织加 100 μL PBS 研磨, 离心后取上清, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清中 CXCL-1、MCP-1、TNF-α 和 IFN-γ 水平。BALF 离心取上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平。

2.6 流式细胞术检测 AMs、中性粒细胞和单核细胞比例

将肺置于 300 目筛网上, 滴加 RPMI 1640 完全培养液研磨过筛, 吸取细胞悬液挤压过 300 目滤网重复 3 次; 用染色缓冲液 (含 2% 胎牛血清的 PBS) 洗涤 2 次, 裂解红细胞后, 用染色缓冲液洗涤后过 400 目筛, 即得肺单细胞悬液 [19-20]。调整细胞浓度为 5×10⁶ 个/mL, 取 100 μL 肺单细胞悬液, 加入 FC Block 封闭液 4 °C 避光封闭 20 min, 随后加入 F4/80-PE、CD11b-FITC、CD11c-APC 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min, 染色缓冲液清洗 2 次, 采用流式细胞仪检测 AMs (F4/80⁺CD11b⁻CD11c⁺) 比例 [5,21]。肺单细胞悬液经 FC Block 封闭液封闭后, 加入 CD45-PerCp-Cy5.5、CD11b-FITC、Ly-6G-PE、Ly-6C-APC 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min, 染色缓冲液清洗 2 次, 采用流式细胞仪检测中性粒细胞 (CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺) 和单核细胞 (CD45⁺Ly-6G⁻CD11b⁺Ly-6C⁺) 比例 [22-24]。

2.7 流式细胞术检测外周血 Th1/Th2 细胞比例

小鼠末次给药 2 h 后, 摘眼球取血, 肝素抗凝。采用小鼠外周血淋巴细胞分离液试剂盒获取小鼠外周血单个核细胞, 根据文献报道的方法 [25], 采用流式细胞术检测外周血 Th1 (CD4⁺IFN-γ⁺) /Th2 (CD4⁺IL-4⁺) 细胞比例。

2.8 肺组织病理变化观察

对小鼠左上肺叶进行石蜡包埋、切片, 常规苏木素-伊红 (HE) 染色, 在显微镜下观察并拍照。

2.9 统计学分析

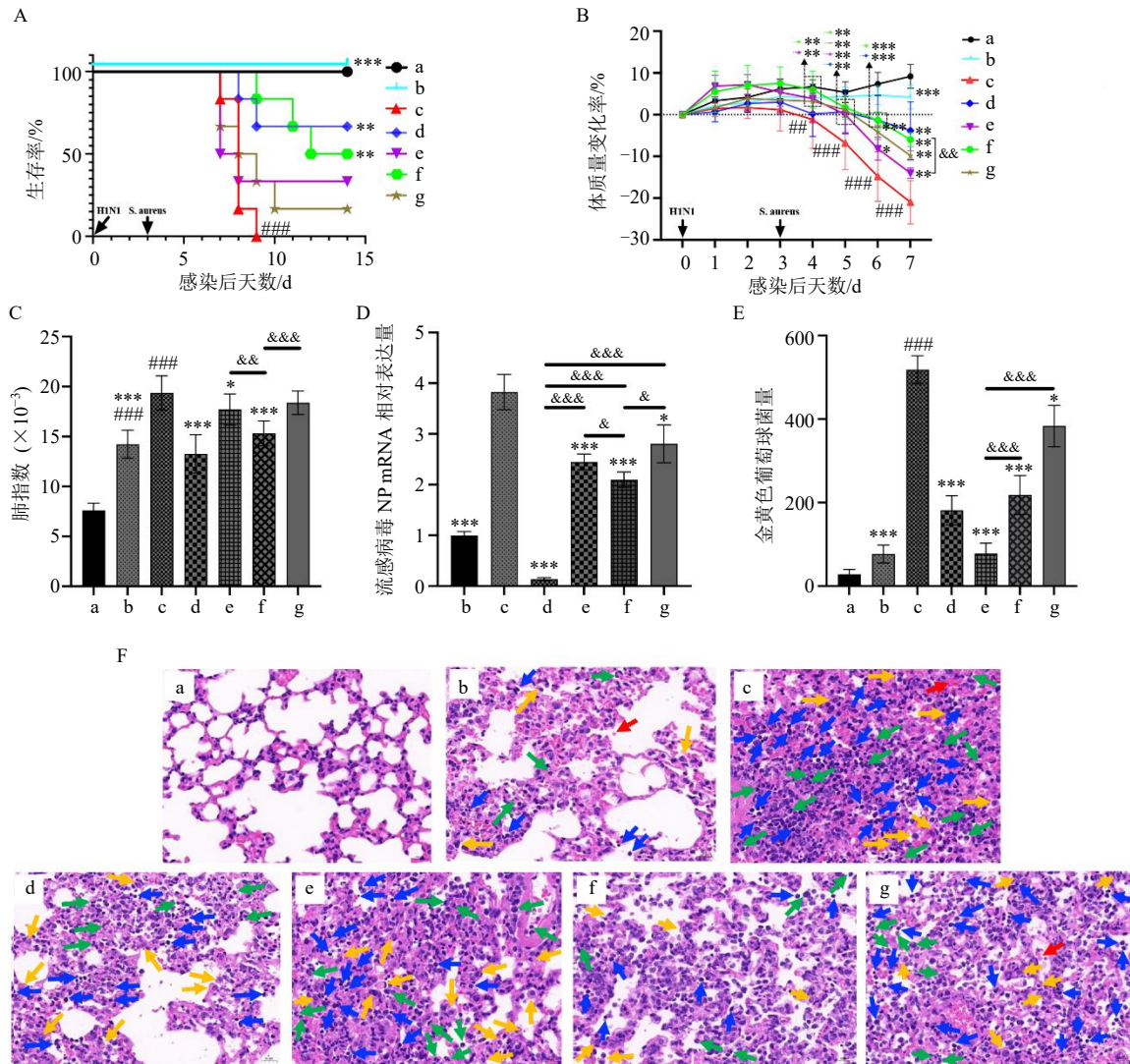
数据采用 SPSS 25 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 Kaplan-Meier 生存分析比较组间死亡率差异; 组间多重比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 并通过 Bonferroni 法进行校正。

3 结果

3.1 热毒宁注射液可降低致死性 H1N1 继发 *S. aureus* 感染小鼠死亡率

如图 1-A 所示, 仅 H1N1 感染未造成小鼠死亡, 而继发 *S. aureus* (1×10^5 CFU/只) 感染后第 6

天, 小鼠全部死亡。热毒宁注射液高剂量组小鼠在继发感染后第 6 天开始出现死亡。与继发感染组相比, 热毒宁注射液高剂量组生存率显著提高 ($P < 0.01$, 生存率为 50%), 且与磷酸奥司他韦组 (生存率为 66.7%) 和头孢克洛组 (生存率为 33.3%) 无



A-致死性感染模型小鼠生存率; B-亚致死性模型小鼠体质量变化率; C-肺指数; D-肺病毒载量; E-肺菌量; F-肺病理切片 HE 染色 ($\times 400$), 绿色箭头表示中性粒细胞, 蓝色箭头表示单核细胞, 橙色箭头表示巨噬细胞, 红色箭头表示红细胞; a-对照组; b-H1N1 感染组; c-H1N1 继发 *S. aureus* 感染组; d-磷酸奥司他韦组; e-头孢克洛组; f-热毒宁注射液高剂量组; g-热毒宁注射液低剂量组; 与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#\#}P < 0.001$; 与 H1N1 继发 *S. aureus* 感染组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$; 组间比较: $^{\&}P < 0.05$ $^{\&\&}P < 0.01$ $^{\&\&\&}P < 0.001$; 下同。

A-survival rate of mice in lethal infection model; B-rate of change in body weight of mice in sublethal model; C-lung index; D-lung viral load; E-lung bacterial load; F-HE staining of lung pathology sections ($\times 400$), green arrow indicates neutrophils, blue arrow indicates monocytes, orange arrow indicates macrophages, red arrow indicates red blood cells; a-control group; b-H1N1 infection group; c-H1N1 secondary *S. aureus* infection group; d-oseltamivir phosphate group; e-cefaclor group; f-Reduning Injection high-dose group; g-Reduning Injection low-dose group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs control group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs H1N1 secondary *S. aureus* infection; $^{\&}P < 0.05$ $^{\&\&}P < 0.01$ $^{\&\&\&}P < 0.001$ vs intergroup; Same as below figures.

图 1 热毒宁注射液对 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型小鼠生存率、体质量变化率、肺指数、肺病毒载量、肺菌量和肺部病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Reduning Injection on survival, body weight change rate, lung index, pulmonary viral load, pulmonary bacterial load and pathological changes of mice with H1N1 secondary *S. aureus* infection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

差异。热毒宁注射液低剂量组生存率为 16.7%，与继发感染组无差异。表明高剂量的热毒宁注射液对致死性 H1N1 继发 *S. aureus* 感染具有保护作用，可显著降低小鼠死亡率，延长生存时间。

3.2 热毒宁注射液可降低亚致死性 H1N1 继发 *S. aureus* 感染小鼠肺病毒量和肺菌量

如图 1-B 所示，仅 H1N1 感染未导致小鼠体质量显著下降，而继发 *S. aureus* (1×10^3 CFU/只) 感染后 1 d，小鼠体质量出现显著下降 ($P < 0.01$)。在继发感染后第 2~4 天，热毒宁注射液高、低剂量组小鼠体质量下降均得到控制 ($P < 0.01$ 、 0.001)；且在继发感染后第 4 天热毒宁注射液高剂量组优于头孢克洛组 ($P < 0.01$)。如图 1-C 所示，继发感染后第 4 天，与对照组相比，H1N1 感染组肺指数升高 ($P < 0.001$)，继发 *S. aureus* 感染可进一步升高肺指数 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高剂量组肺指数显著降低 ($P < 0.001$)，且低于头孢克洛组 ($P < 0.01$)，与磷酸奥司他韦组无差异。热毒宁注射液低剂量组肺指数与继发感染组无差异。

肺病毒量检测显示 (图 1-D)，与 H1N1 感染组相比，继发 *S. aureus* 感染导致肺病毒量进一步增加 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组肺病毒量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)；且热毒宁注射液高剂量组肺病毒量低于头孢克洛组 ($P < 0.05$)，但仍高于磷酸奥司他韦组 ($P < 0.001$)。肺菌量检测显示 (图 1-E)，对照组、H1N1 感染组和头孢克洛组均具有极低且相近的肺菌量。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组肺菌量均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.001)，但仍高于头孢克洛组 ($P < 0.001$)。

肺组织病理学检测显示 (图 1-F)，对照组肺泡结构清晰，未见炎性细胞浸润。H1N1 感染组出现少量中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞浸润；继发感染组肺泡结构消失，中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞显著增多，并伴有出血；与继发感染组相比，热毒宁注射液高剂量组肺泡形态结构改善，中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞浸润减少；热毒宁注射液低剂量组肺部形态较继发感染组略有改善，但仍有大量效应细胞浸润。

3.3 热毒宁注射液可抑制 IFN- γ 表达，恢复 AMs 比例

流感病毒感染引发的 IFN- γ 高表达导致了 AMs 耗竭^[19]，因此本研究检测了热毒宁注射液对 IFN- γ

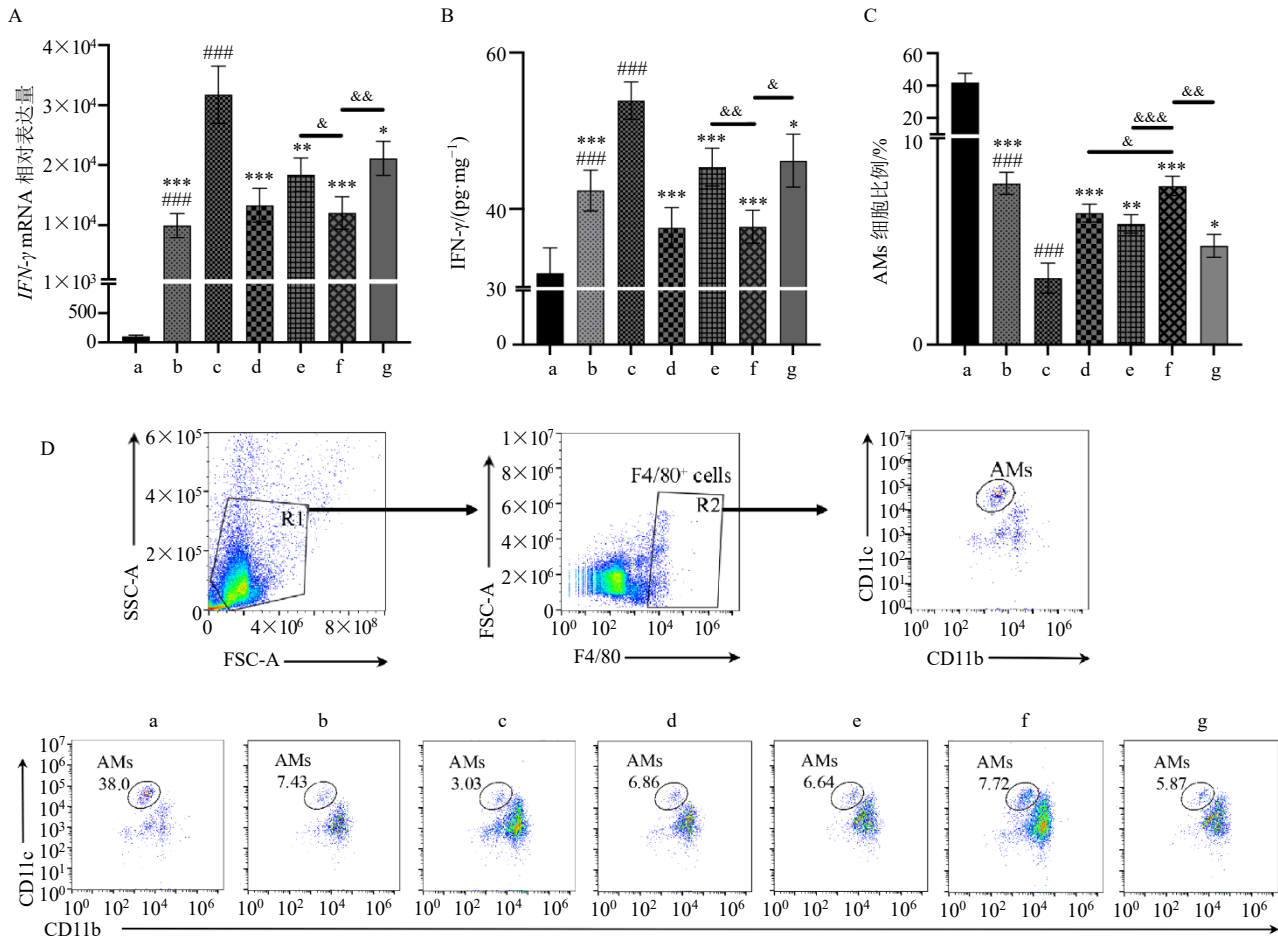
表达的影响。如图 2-A、B 所示，与对照组相比，H1N1 感染可显著上调 IFN- γ 表达 ($P < 0.001$)，继发 *S. aureus* 感染加剧了这一过程 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组 IFN- γ 表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)；且热毒宁注射液高剂量组 IFN- γ 水平低于头孢克洛组 ($P < 0.05$ 、 0.01)，与磷酸奥司他韦组无差异。流式细胞术检测了肺单细胞悬液中 AMs 比例，结果如图 2-C、D 所示，与对照组相比，H1N1 感染组 AMs 比例降低 ($P < 0.001$)，而继发 *S. aureus* 感染进一步降低了 AMs 比例 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组 AMs 比例显著提升 ($P < 0.05$ 、 0.001)，且热毒宁注射液高剂量组优于磷酸奥司他韦组和头孢克洛组 ($P < 0.05$ 、 0.001)。

3.4 热毒宁注射液可减少中性粒细胞和单核细胞浸润，抑制 TNF- α 和中性粒细胞外陷阱 (neutrophil extracellular traps, NETs) 释放

AMs 耗竭引发大量效应细胞被募集以应对细菌感染^[19]。如图 3 所示，与对照组相比，H1N1 感染组肺部趋化因子 CXCL-1 和 MCP-1 mRNA 和蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；继发 *S. aureus* 感染可加剧这一过程 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组 CXCL-1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，热毒宁注射液高剂量组 MCP-1 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)，热毒宁注射液低剂量组 MCP-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；且热毒宁注射液高剂量组 CXCL-1 和 MCP-1 mRNA 和蛋白表达水平显著低于头孢克洛组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

采用流式细胞术检测了肺单细胞悬液中中性粒细胞和单核细胞比例。结果如图 4 所示，与对照组相比，H1N1 感染引发了中性粒细胞和单核细胞浸润 ($P < 0.001$)；继发 *S. aureus* 感染可加剧这一过程 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组中性粒细胞和单核细胞浸润显著减少 ($P < 0.001$)；且与磷酸奥司他韦和头孢克洛组相比，热毒宁注射液高剂量组显著抑制中性粒细胞和单核细胞浸润 ($P < 0.05$ 、 0.001)。

如图 5-A、B 所示，与对照组相比，H1N1 感染可上调肺组织 TNF- α 表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)，继发 *S. aureus* 感染进一步促进了 TNF- α 高表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高



A- $IFN-\gamma$ mRNA 表达; B- $IFN-\gamma$ 蛋白表达; C-AMs 细胞比例; D-流式细胞术检测肺单细胞悬液中 AMs ($F4/80^+CD11b^-CD11c^+$) 比例。

A-expression of $IFN-\gamma$ mRNA; B-expression of $IFN-\gamma$ protein; C-proportion of AMs; D-proportion of AMs ($F4/80^+CD11b^-CD11c^+$) in lung single-cell suspensions detected by flow cytometry.

图 2 热毒宁注射液对 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型小鼠肺部 $IFN-\gamma$ 表达及肺单细胞悬液中 AMs 比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of Reduning Injection on $IFN-\gamma$ expression in lung and proportion of AMs in lung single-cell suspension of mice with H1N1 secondary *S. aureus* infection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

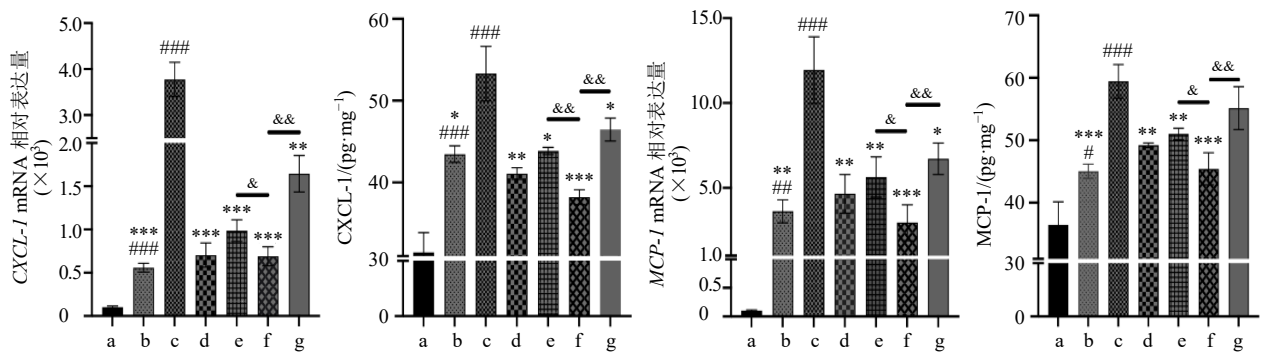


图 3 热毒宁注射液对 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型小鼠肺部 $CXCL-1$ 和 $MCP-1$ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Reduning Injection on expressions of $CXCL-1$ and $MCP-1$ in lung of mice with H1N1 secondary *S. aureus* infection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

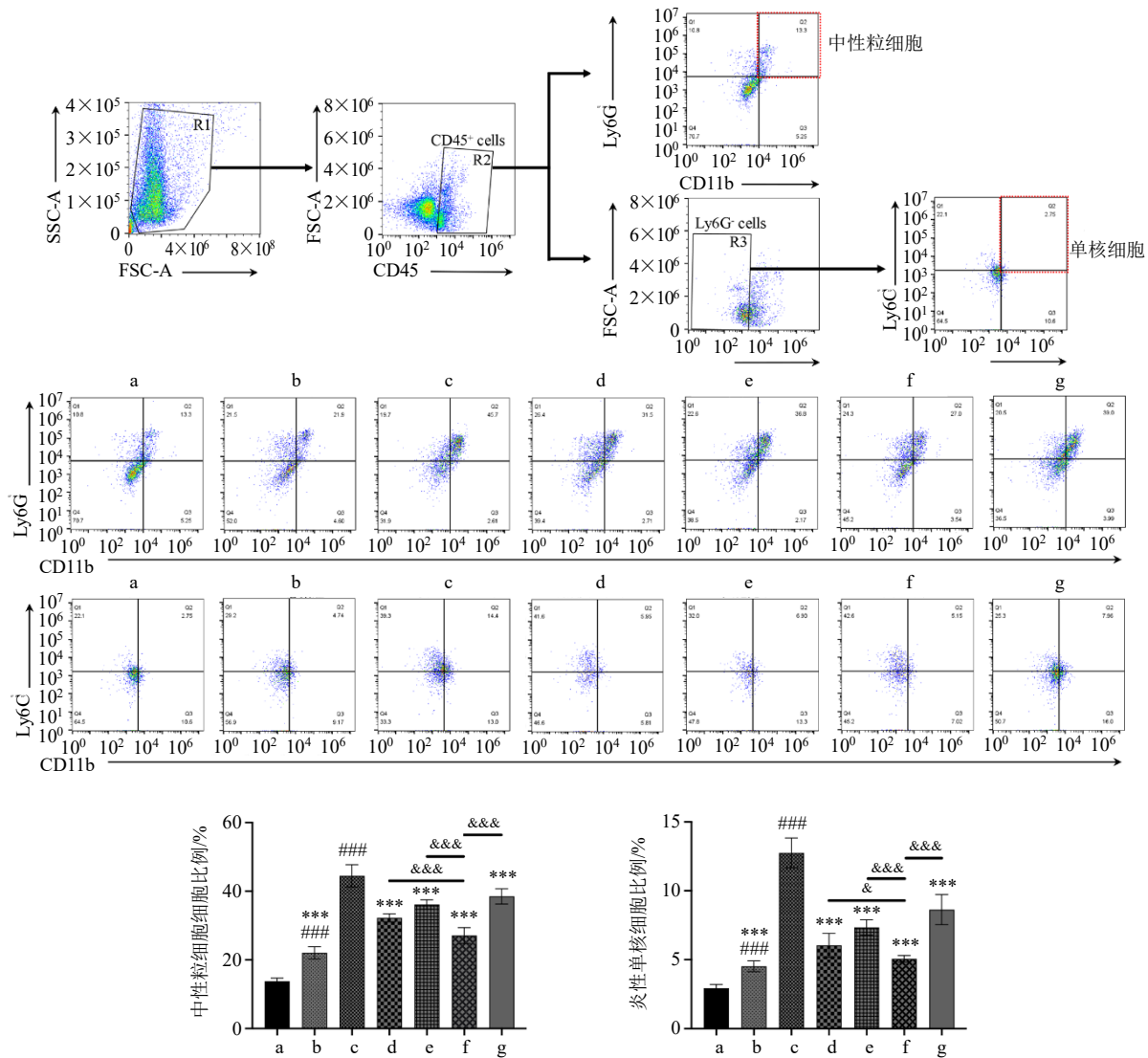


图4 流式细胞术检测中性粒细胞 (CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺) 和单核细胞 (CD45⁺Ly-6G⁻CD11b⁺Ly-6C⁺) 比例 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 4 Proportions of neutrophils (CD45⁺CD11b⁺Ly-6G⁺) and monocytes (CD45⁺Ly-6G⁻CD11b⁺Ly-6C⁺) detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

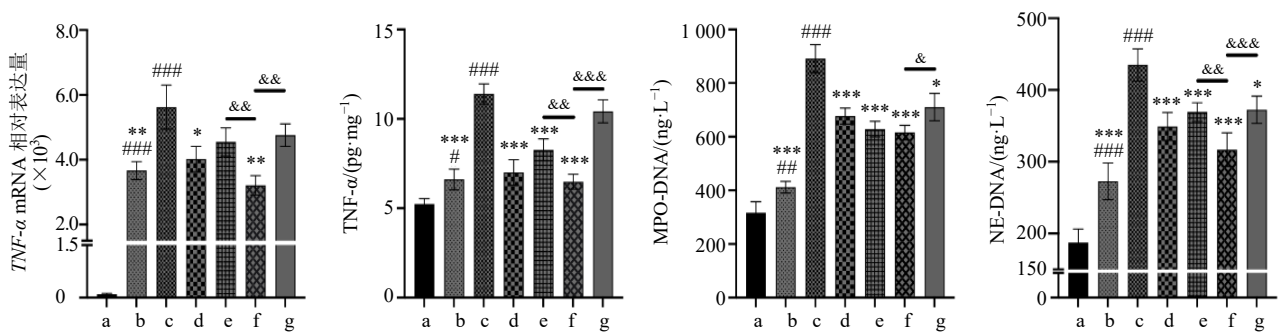


图5 热毒宁注射液对 H1N1 继发 *S. aureus* 感染模型小鼠肺部 TNF- α 表达和 BALF 中 MPO-DNA、NE-DNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 5 Effect of Reduning Injection on expression of TNF- α in lung and levels of MPO-DNA, NE-DNA in BALF of mice with H1N1 secondary *S. aureus* infection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

剂量组 TNF- α 表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)，且低于头孢克洛组 ($P < 0.01$)。BALF 中 NETs 标志物检测结果如图 5-C、D 所示，仅 H1N1 感染即可引发 NETs 释放，MPO-DNA 和 NE-DNA 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001)；继发 *S. aureus* 感染可使 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平进一步增加 ($P < 0.001$)。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组 BALF 中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.001)；且热毒宁注射液高剂量组 MPO-DNA 水平与头孢克洛组无差异，NE-DNA 水平显著低于头孢克洛组 ($P < 0.01$)。

3.5 热毒宁注射液可抑制过激的 Th1 型免疫反应

CD4⁺ Th1 型细胞是病原体感染后固有免疫应答阶段 IFN- γ 产生的重要途径之一^[26]。流式细胞术检测外周血 Th1/Th2 比例，结果如图 6 所示，仅 H1N1 感染即可引发 Th1 型免疫极化 ($P < 0.01$)。继发 *S. aureus* 感染进一步加剧了这一过程 ($P < 0.001$)，Th1/Th2 比值较 H1N1 感染组提升约 4 倍。与继发感染组相比，热毒宁注射液高、低剂量组 Th1/Th2 比值均显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)，且热毒宁注射液高剂量组 Th1/Th2 比值显著低于头孢克洛组 ($P < 0.05$)，与磷酸奥司他韦组无差异。

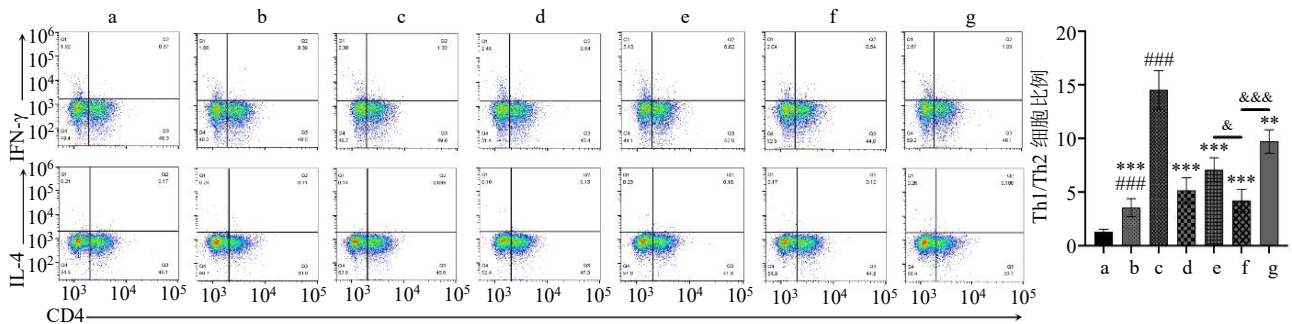


图 6 流式细胞术检测 Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺) 细胞和 Th2 (CD4⁺ IL-4⁺) 细胞比例 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Proportions of Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺) cells and Th2 (CD4⁺ IL-4⁺) cells detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

热毒宁注射液是用于治疗外感风热所致上呼吸道感染的中药大品种，因其退热、抗炎效果显著，安全性高，2005 年上市至今已先后被我国 11 项流感相关指南/共识/诊疗方案所推荐，其中 4 项为儿童领域的指南/共识^[27-28]。已有研究报道了热毒宁注射液具有抗流感病毒、抗菌、抗炎和免疫调节等活性^[12,16,29-30]。本研究证实热毒宁注射液具有显著的抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染活性，可显著降低致死性感染模型死亡率，降低亚致死性模型肺指数、肺病毒载量和肺菌量，减轻肺部炎症损伤。虽然热毒宁注射液抗病毒活性不及磷酸奥司他韦、抗菌活性不及头孢克洛，但高剂量的热毒宁注射液在抑制体质量下降、降低肺指数方面优于头孢克洛，与磷酸奥司他韦无差异。

与现有报道一致^[6]，虽然头孢克洛治疗几乎完全清除了细菌感染，但仍显示出严重的肺损伤。这再次提示过激的炎症反应是流感继发细菌感染高致病性的关键因素。热毒宁注射液的抗炎活性已被广泛报道^[29]，本研究聚焦流感后易继发细菌感染的关键因素——AMs 耗竭，从抑制 AMs 耗竭角度探究了热毒宁注射液缓解 H1N1 继发 *S. aureus* 感染所

致炎症性肺损伤的药效机制。AMs 是驻留于人类和小鼠肺泡中的主要免疫细胞^[4,31]，具有高效的吞噬活性和自我更新能力，被认为是呼吸道抵御细菌感染最重要的第一道防线^[32]。在细菌感染早期 AMs 以不产生促炎反应的方式高效清除细菌，而无需招募中性粒细胞，避免了肺部炎症的发生^[19,33]。然而 IAV 感染引发的 IFN- γ 大量释放可导致 AMs 耗竭，表现为爬行能力受阻、线粒体功能破坏、自我更新能力降低和死亡增加等^[34-35]。由于 AMs 的耗竭，中性粒细胞和单核细胞被大量招募以应对细菌感染，随之而来的“细胞因子风暴”不可避免地造成了炎症损伤^[19]。此外，IAV 感染招募的中性粒细胞还可引发 AMs 基因表达向产生 IFN- γ 和 TNF- α 等促炎细胞因子方向偏移^[36]。本研究发现，与继发感染组相比，热毒宁可显著抑制 IFN- γ 表达，提升肺部 AMs 比例。虽然高剂量的热毒宁注射液抗 H1N1 活性不及磷酸奥司他韦、抗菌活性不及头孢克洛，但热毒宁注射液高剂量组 IFN- γ 水平与磷酸奥司他韦组相似，且低于头孢克洛组。值得注意的是，热毒宁注射液高剂量组可较磷酸奥司他韦和头孢克洛更好地提升 AMs 比例。热毒宁注射液在抗病原微生物的同时展示出了独特的 IFN- γ 和 AMs 调节活性。磷

酸奥司他韦虽无抗菌活性，但治疗后肺菌量亦得到了有效控制，这可能得益于病毒量下降，气道上皮损伤的缓解和肺固有免疫抗菌屏障的恢复。

与 AMs 比例升高对应的是热毒宁注射液高剂量组趋化因子 CXCL-1 和 MCP-1 水平降低，中性粒细胞和单核细胞的浸润减少，肺部促炎细胞因子 TNF- α 水平下降，且各项指标均优于头孢克洛组，并在抑制中性粒细胞和单核细胞浸润方面亦优于磷酸奥司他韦组。NETs 是中性粒细胞防御微生物侵袭的重要手段，但在捕获细菌的同时也促进了炎症的发生^[37]。有研究报道了热毒宁注射液可通过抑制丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）通路抑制 NETs 形成，缓解脂多糖诱导的急性肺损伤^[29]。本研究发现，虽然热毒宁注射液高剂量组较头孢克洛组具有更高的肺菌量，较磷酸奥司他韦组具有更高的肺病毒量，但 NETs 标志物水平低于头孢克洛组，并与磷酸奥司他韦组无差异。这些数据再次证明了热毒宁注射液优秀的 NETs 调节活性。

前期研究表明流感病毒感染可诱导 Th1 免疫极化，上调 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子表达^[25]。而 IFN- γ 又可通过正反馈作用增强 Th1 分化，进一步促进 IFN- γ 的表达^[26]。因此本研究继续探究了热毒宁注射液对 Th1/Th2 平衡的潜在调控作用。结果表明，与 H1N1 感染相比，继发 *S. aureus* 感染进一步加剧了 Th1 免疫极化。虽然高剂量的热毒宁注射液抗 H1N1 活性弱于磷酸奥司他韦（肺菌量相似），但其 Th1/Th2 比值与磷酸奥司他韦组无差异。表明热毒宁注射液在抗流感病毒的同时发挥了独立的 Th1 免疫调控活性。

综上，本研究报道了热毒宁注射液具有抗 H1N1 继发 *S. aureus* 感染活性。通过与磷酸奥司他韦和头孢克洛对比，发现了热毒宁在治疗流感继发细菌感染中展示出独特的免疫调节优势。热毒宁注射液可通过修正 H1N1 继发 *S. aureus* 感染期间过度的 Th1 型免疫极化，抑制 IFN- γ 高表达造成的 AMs 耗竭，减少效应细胞浸润带来的炎症损伤。本研究将为热毒宁注射液的临床应用及流感继发细菌感染的临床防治提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, *et al.* Secondary streptococcal infection following influenza [J]. *Microbiol*

Immunol, 2022, 66(6): 253-263.

- [2] Morris D E, Cleary D W, Clarke S C. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1041.
- [3] Majumder S, Li P, Das S, *et al.* A bacterial vesicle-based pneumococcal vaccine against influenza-mediated secondary *Streptococcus pneumoniae* pulmonary infection [J]. *Mucosal Immunol*, 2024, 17(2): 169-181.
- [4] Parajuli N, Subedi K, Solone X K, *et al.* Epigenetic control of alveolar macrophages: Impact on lung health and disease [J]. *Cells*, 2025, 14(9): 640.
- [5] Ghoneim H E, Thomas P G, McCullers J A. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections [J]. *J Immunol*, 2013, 191(3): 1250-1259.
- [6] 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.
- [7] Santos Rizzo Zuttion M S, Parimon T, Bora S A, *et al.* Antibiotic use during influenza infection augments lung eosinophils that impair immunity against secondary bacterial pneumonia [J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(21): e180986.
- [8] Sharma L, Singh R B, Ngeow C, *et al.* Therapeutic JAK inhibition does not impact lung injury during viral or bacterial pneumonia in male mice [J]. *Physiol Rep*, 2025, 13(3): e70232.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于印发《甲型 H1N1 流感诊疗方案（2010 年版）》的通知（2010 年第 79 号）[EB/OL]. (2010-04-13) [2025-04-23]. <https://www.nhc.gov.cn/zwgkzt/pyzgl1/201005/47250.shtml>.
- [10] 王振中, 鲍琳琳, 孙兰, 等. 热毒宁注射液抗甲型 H1N1 流感病毒作用机制研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(1): 90-93.
- [11] 颜海燕, 王萌, 王辉强, 等. 热毒宁注射液抗流感病毒作用及机制研究 [J]. *药学报*, 2023, 58(6): 1596-1602.
- [12] 叶小兰, 汤琛琛, 刘慧, 等. 热毒宁注射液通过抑制肺脏炎症细胞浸润和降低细胞因子风暴保护流感小鼠 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(17): 4698-4706.
- [13] Liu Y, Mu W, Xiao W, *et al.* Efficacy and safety of Re-Du-Ning Injection in the treatment of seasonal influenza: Results from a randomized, double-blinded, multicenter, oseltamivir-controlled trial [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 55176-55186.
- [14] 刘玉, 谢纬, 贾丹, 等. 热毒宁注射液对甲型流感病毒感染小鼠肺组织炎症和相关炎症因子水平的影响 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(2): 225-228.

- [15] 张帅, 王红梅, 常秀娟, 等. 热毒宁注射液抗菌及调节免疫活性作用研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 1056-1060.
- [16] 张腾之, 宋玲, 唐黎明, 等. 热毒宁注射液雾化吸入给药的安全性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 3015-3026.
- [17] Zhao J, Wang Y T, Huang X D, *et al.* Liu Shen Wan inhibits influenza virus-induced secondary *Staphylococcus aureus* infection *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 277: 114066.
- [18] 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.
- [19] Neupane A S, Willson M, Chojnacki A K, *et al.* Patrolling alveolar macrophages conceal bacteria from the immune system to maintain homeostasis [J]. *Cell*, 2020, 183(1): 110-125.e11.
- [20] 韩鑫涛, 赵殿元, 唐丽. 流式细胞术分选小鼠肺泡巨噬细胞及鉴定 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(11): 1596-1600.
- [21] Janssen W J, Barthel L, Muldrow A, *et al.* Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(5): 547-560.
- [22] Kimball A, Schaller M, Joshi A, *et al.* Ly6C^{Hi} blood monocyte/macrophage drive chronic inflammation and impair wound healing in diabetes mellitus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(5): 1102-1114.
- [23] Xie L L, Zhong Y, Chen Y, *et al.* Cryptotanshinone alleviates immunosuppression in endometriosis by targeting MDSCs through JAK2/STAT3 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156227.
- [24] Wang T, Zhang J J, Wang Y L, *et al.* Influenza-trained mucosal-resident alveolar macrophages confer long-term antitumor immunity in the lungs [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(3): 423-438.
- [25] Geng Z K, Li Y Q, Cui Q H, *et al.* Exploration of the mechanisms of Ge Gen Decoction against influenza A virus infection [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(9): 650-662.
- [26] Zhu X L, Zhu J F. CD4 T helper cell subsets and related human immunological disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8011.
- [27] 王连心, 杨硕, 王萌萌, 等. 100 249 例热毒宁注射液儿童用药临床安全性的前瞻性、多中心、大样本医院集中监测 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(12): 3396-3403.
- [28] 史楠楠, 熊磊, 马融, 等. 中成药治疗儿童流感临床应用指南 (2024 年) [J]. 中医杂志, 2025, 66(9): 973-980.
- [29] Yang C X, Song C L, Liu Y T, *et al.* Re-Du-Ning Injection ameliorates LPS-induced lung injury through inhibiting neutrophil extracellular traps formation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153635.
- [30] Wang Z, Chen W, Li Y Y, *et al.* Reduning injection and its effective constituent luteoloside protect against sepsis partly via inhibition of HMGB1/TLR4/NF- κ B/MAPKs signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 270: 113783.
- [31] Lam T Y W, Nguyen N, Peh H Y, *et al.* ISM1 protects lung homeostasis via cell-surface GRP78-mediated alveolar macrophage apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(4): e2019161119.
- [32] Panahipoor Javaherdehi A, Ghanbari S, Mahdavi P, *et al.* The role of alveolar macrophages in viral respiratory infections and their therapeutic implications [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2024, 40: 101826.
- [33] Martin F P, Jacqueline C, Poschmann J, *et al.* Alveolar macrophages: Adaptation to their anatomic niche during and after inflammation [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2720.
- [34] Verma A K, Bauer C, Yajjala V K, *et al.* Linezolid attenuates lethal lung damage during postinfluenza methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. *Infect Immun*, 2019, 87(10): e00538-19.
- [35] Gao X C, Zhu B B, Wu Y, *et al.* TFAM-dependent mitochondrial metabolism is required for alveolar macrophage maintenance and homeostasis [J]. *J Immunol*, 2022, 208(6): 1456-1466.
- [36] Gao X C, Zhang W J, Zhang N, *et al.* Multiple death pathways of neutrophils regulate alveolar macrophage proliferation [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3633.
- [37] Yi T, Ding W X, Hao Y Z, *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate severe lung injury induced by influenza A virus H1N1 in mice coinfecting with *Staphylococcus aureus* [J]. *Microb Pathog*, 2022, 166: 105558.

[责任编辑 李亚楠]