

玉屏风散及甲型链球菌预防上呼吸道感染的微生态作用机理初探^{*}

姚 政, 徐艳琴, 郭剑男, 杨增祥, 邢海晶, 张 亮

(云南中医学院, 云南昆明 650500)

〔摘 要〕目的: 观察玉屏风散和甲型链球菌防治病原菌金黄色葡萄球菌侵袭上呼吸道, 调节上呼吸道微生态平衡的情况。方法: 分别对上呼吸道菌群失调小鼠灌胃给玉屏风散或灌胃给玉屏风散加口咽部滴注甲型链球菌7d, 再以金黄色葡萄球菌口咽部滴注攻击3d, 检测小鼠上呼吸道在不同时间点的菌群密集度、甲型链球菌数量、菌群多样性。结果: 服用玉屏风散可使小鼠口咽部菌群紊乱的情况有所缓解, 从而起到一定的对抗有害菌攻击的作用, 口咽部定植甲链可在一定程度上增强这种作用。同时玉屏风散可对甲型链球菌的生长繁殖进行调节干预, 保持其优势菌地位, 进而维持上呼吸道微生态平衡。结论: 可考虑采用中药治疗或微生态制剂干预的方法来对抗上呼吸道有害菌感染。

〔关键词〕玉屏风散; 上呼吸道感染; 微生态; 甲型链球菌; 金黄色葡萄球菌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2011)05—0026—04

上呼吸道感染是临床最为常见的感染性疾病, 一年四季、任何年龄均可发病, 尤以冬春季节较为多见。常于机体抵抗力降低时, 如受寒、劳累、淋雨等情况, 原已存在或由外界侵入的病毒和(或)细菌, 迅速生长繁殖, 导致感染。反复上呼吸道感染容易导致机体免疫力下降以及其他相关系统疾病的发生。现代医学治疗上呼吸道感染仍以抗生素为主, 但在控制感染的同时, 也导致了人体上呼吸道正常菌群的紊乱、耐药菌株和二重感染的产生。近年来, 国内外研究者已开始从上呼吸道微生态角度开展了对防治上呼吸道感染的研究^[1-2]。

玉屏风散是中医扶正固本的经典方剂, 为临床常用的防治体虚感冒的良方, 该方由黄芪、白术、防风组成。我们对玉屏风散作用后小鼠口咽部菌群的变化情况, 以及对临床常见上呼吸道致病菌金黄色葡萄球菌的抵抗情况进行了实验观察, 期望能从微生态角度初步揭示玉屏风散扶正祛邪, 减少上呼吸道感染疾病发生的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种小白鼠(SPF级), 40只, 雌雄各半,

体重: 18~22g, 购自四川省医学科学院实验动物研究所(许可证号: SCXP(川)2004-16)), 购买后饲养于云南中医学院实验动物中心层流架, 自由饮食。

玉屏风散黄芪、白术、防风3味中药依《丹溪心法》所载组方剂量比例, 黄芪:白术:防风=1:2:1, 购自云南中医学院白塔路门诊部, 由云南中医学院中药教研室鉴定为正品。

甲型链球菌、金黄色葡萄球菌为临床分离培养菌株, 由云南省第一人民医院微生物检验科提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组情况

动物随机分为4个组: 空白组、造模自然恢复组、玉屏风散组、玉屏风散+甲型链球菌接种组(以下简称玉甲组), 每组8只。空白组腹腔注射生理盐水, 其余组腹腔注射青霉素3d进行造模, 空白组、造模自然恢复组第4d灌胃给生理盐水, 玉屏风散组灌胃给玉屏风散, 玉甲组灌胃给玉屏风散加口咽部滴注甲型链球菌, 连续7d, 第11天开始用金黄色葡萄球菌经口咽部滴注攻击各组小鼠3d。

^{*}基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NO: 30760296); 云南省科技计划资助项目(NO: 2007C017M)

收稿日期: 2011—05—02 修回日期: 2011—09—18

作者简介: 姚政(1977~), 女, 云南文山, 讲师, 主要从事生物化学及分子生物学、医学统计学教学及科研工作。

1.2.2 小鼠上呼吸道菌群失调模型的制备

青霉素钠注射液腹腔注射（根据临床成人用量，按动物体表面积等效剂量计算方法，每 20g 小鼠体重给药0.015 6g/d），连续 3d，自由饮食。

造模成功标准：小鼠上呼吸道菌群数量和种类明显减少，可出现对抗生素不敏感的细菌。

1.2.3 药液制备、给药剂量及方法

将玉屏风散采用水煎法煎煮并灭菌，浓缩为 100% 滤液后 4℃ 冰箱储藏备用。根据动物体表面积等效剂量计算方法，将成人每日所需生药量换算成小鼠所需药量，得出每 20g 小鼠给药剂量为 0.312g/d，连续 7d。

1.2.4 菌液准备

甲型链球菌接种：每只小鼠咽部接种 0.01mL（含甲链 10⁶CFu/mL），连续 3d。接种时间为灌胃给药后 0.5h。接种后禁水禁食 2h。

金黄色葡萄球菌攻击：将金葡菌均匀分散于含 5% 胃膜素的生理盐水中（加胃膜素可提高菌群粘附力），每只小鼠咽部接种 0.01mL（含金葡 10⁶CFu/mL），连续 3d。菌液攻击后禁水禁食 2h。

1.2.5 采样时间

各组采样检测微生态指标菌群密集度、甲型链球菌、菌群多样性的时间为：

第 1 次：造模前采样（采样后即进行腹腔注射青霉素造模）；

第 2 次：腹腔注射青霉素造模 3d 后采样；

第 3 次：灌胃给玉屏风散或生理盐水 7d 后采样；

第 4 次：金葡口咽部攻击 3d 后采样。

1.2.6 采样方式及微生态指标检测

用一次性医用男性拭子在小鼠咽后壁反复涂抹取样。样品在实验室内经稀释、羊血培养基和巧克力培养基培养、纯化、染色、镜检，挑选纯菌落分别进行生化鉴定。

菌群密集度检测：将鉴定的所有细菌根据其浓度稀释倍数和菌落数，计算出原先每毫升标本中的菌落形成单位（colony forming unit，CFU）。

甲型链球菌鉴定标准：革兰氏染色阳性，呈典型链状排列，触酶阴性，生化鉴定中胆汁七叶苷阴性，高盐肉汤阴性，奥普托新药敏实验不敏感。

菌群多样性检测：小鼠口咽部细菌经过生化鉴定后，同属而不同种的细菌视为一类，计每个样本

所含的菌属数量总和。

1.3 统计学处理

由于数据分布形态为偏态，故数据以 M ± QR（中位数 ± 四分位数间距）表示，使用 SPSS 17.0 软件包和 Excel 2003 进行统计分析处理。经方差齐性检验，方差不齐，故采用秩和检验，经 Kruskal - Wallis H 检验后，进行秩转换采用 LSD 法进行两两比较。检验水准为 α = 0.05。

2 结果

2.1 造模前后小鼠口咽部菌群密集度、甲型链球菌、多样性的比较

表 1 造模前后菌群密集度比较（CFU/mL，×10⁴）

组别	n	菌群密集度 (M ± QR)	甲型链球菌 (M ± QR)	菌群多样性 (种)
造模前	8	33.67 ± 63.00	25.67 ± 58.42	5.00 ± 2.25
造模后	8	2.50 ± 6.50**	0.17 ± 1.08**	2.00 ± 2.00**

注：与造模前比较，* P < 0.05，** P < 0.01。

模型显示：造模后与造模前比较，小鼠口咽部菌群密集度（P = 0.000）、甲型链球菌（P = 0.000）、菌群多样性（P = 0.000）均低于造模前，差异均有统计学意义，表明小鼠上呼吸道菌群失调模型制作成功^[1]。

2.2 各组分别给生理盐水或玉屏风散灌胃 7d 后，小鼠口咽部微生态指标（以下简称给药后比较）

表 2 给药后各组微生态指标（M ± QR，CFU/mL，×10⁴）

组别	n	菌群密集度	甲型链球菌	菌群多样性
空白组	8	9.17 ± 3.92	2.17 ± 3.58	3.50 ± 1.00
造模自然恢复组	8	9.67 ± 32.50	0.50 ± 3.00	5.50 ± 2.75
玉屏风散组	8	21.50 ± 60.08***▲	16.17 ± 27.92***▲	4.50 ± 3.75
玉甲组	8	19.17 ± 24.75**▲	12.67 ± 26.92***▲	4.00 ± 2.75

注：与空白组相比，* P < 0.05，** P < 0.01；与造模自然恢复组相比，▲ P < 0.05，▲▲ P < 0.01

结果表明：给药后，与空白组相比，玉屏风散组和玉甲组甲链明显升高，差异有高度统计学意义

($P=0.000$)，造模自然恢复组甲链减少，但差异无统计学意义 ($P=0.208$)；与造模自然恢复组相比，玉屏风散组和玉甲组菌群密集度明显升高，差异有高度统计学意义 ($P=0.000$)。

2.3 用金黄色葡萄球菌对小鼠口咽部攻击后，小鼠口咽部微生态指标比较（以下简称金葡菌攻击前后比较）

表 4 金葡菌攻击前后各组微生态指标变化情况（ $M \pm QR$, CFU/mL, $\times 10^4$ ）

	n	菌群密集度		甲型链球菌		菌群多样性	
		攻击前	攻击后	攻击前	攻击后	攻击前	攻击后
空白组	8	9.17 $\pm$ 3.92	1.00 $\pm$ 3.67 ^{**}	2.17 $\pm$ 3.58	0.00 $\pm$ 0.17 ^{**}	3.50 $\pm$ 1.00	2.00 $\pm$ 1.50
造模自然恢复组	8	9.67 $\pm$ 32.50	11.33 $\pm$ 8.67 [*]	0.50 $\pm$ 3.00	1.67 $\pm$ 7.42 [*]	5.50 $\pm$ 2.75	3.00 $\pm$ 1.50
玉屏风散组	8	21.50 $\pm$ 60.08	4.50 $\pm$ 26.42 ^{***}	16.17 $\pm$ 27.92	2.50 $\pm$ 3.33 ^{***}	4.50 $\pm$ 3.75	2.50 $\pm$ 1.50
玉甲组	8	19.17 $\pm$ 24.75	11.00 $\pm$ 46.82 ^{***}	12.67 $\pm$ 37.00	1.00 $\pm$ 10.00 ^{***}	4.00 $\pm$ 2.75	3.00 $\pm$ 2.50

注：各组分别与攻击前相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与空白组相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与造模自然恢复组相比，[▲] $P < 0.05$ ，^{▲▲} $P < 0.01$

结果表明：空白组攻击后与攻击前相比，菌群密集度明显降低，差异有高度统计学意义 ($P = 0.003$)。金葡菌攻击后，与空白组比较，各组小鼠菌群密集度、甲链数量、菌群多样性高于空白组，且差异大多具有统计学意义；与造模自然恢复组比较，玉屏风散组、玉甲组菌群密集度、甲链数量、菌群多样性大多高于造模自然恢复组，但差异大多不具有统计学意义。

2.4 讨论与结论

玉屏风散出自元代著名医家朱震亨的《丹溪心法》一书。该方专门针对体虚、肌肤不固易感冒者而设，常用于表虚自汗等病症。玉屏风散中的药物只有黄芪、白术、防风 3 味，简单，但却配伍严密。方中黄芪甘温，内可大补脾肺之气，外可固表止汗，为君药。白术健脾益气，助黄芪以加强益气固表之力，为臣药。两药合用，使气旺表实，则汗不外泄，外邪亦难内侵。佐以防风走表而散风御邪，黄芪得防风，则固表而不留邪；防风得黄芪，则祛风而不伤正。该方以益气固表为主，固中有疏，散中有补，补散并用，相反相成。是中医用于扶正的经典名方之一^[3]。

反复上呼吸道感染，即中医所谓的易感冒患者常伴有口咽部微生态失衡的状况^[1,4]。正常情况下，人体口咽部定植着多种菌群，形成微生态平衡

状态。其中的优势菌甲型链球菌为有益菌，是维持菌群平衡，保持微生态健康状态的重要因素^[5-6]。而反复上呼吸道感染患者多存在口咽部甲型链球菌减少的情况。玉屏风散可通过扶持人体正气，促使人体回复平衡状态来达到治疗的目的。我们根据团队的前期研究结果选择了玉屏风散作用效果较好的一个剂量进行实验^[6-8]，发现玉屏风散可有效调节小鼠口咽部菌群微生态平衡，尤其是甲型链球菌的密集度，这与前期的研究结果相一致。

金黄色葡萄球菌是一种革兰染色阳性菌，是人类的重要病原菌，可定植在人体的皮肤和鼻前庭等处，上呼吸道感染患者口咽部常可检出该病原菌^[9-11]。当人体抵抗力低下时，金黄色葡萄球菌可通过吸入感染和血源感染 2 种途径入侵而引起广泛的感染，从而引发多种严重的疾病^[7]。我们的实验结果显示，动物机体受到金葡攻击后，上呼吸道菌群密集度、多样性和甲链数量减少，机体抵抗力下降。服用玉屏风散可使菌群紊乱的情况有所缓解，从而起到一定的对抗有害菌攻击的作用，口咽部定植甲型链球菌可在一定程度上增强这种作用。同时玉屏风散可对甲型链球菌的生长繁殖进行调节干预，保持其优势菌地位，进而维持上呼吸道微生态平衡。

实验的研究结果提示我们，对抗有害菌感染，

可在抗生素治疗之外选择中药治疗或微生态制剂干预的方法。中药玉屏风散疗效可靠, 价格低廉, 且毒副作用较低, 可广泛应用于临床防治上呼吸道感染。甲型链球菌作为一种微生态制剂辅助治疗, 可在一定程度上提高玉屏风散的疗效。但有关微生态制剂的剂型、剂量、使用方法等还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Sato R, Tanaka M. Intestinal distribution and intraluminal localization of orally administered clostridium butyricum in rats [J]. Microbiol Immunol, 1997, 41: 665 - 671.
- [2] 赵鹏, 袁嘉丽, 陈文慧. 冬季感冒患者及健康人上呼吸道微生态状况研究 [J]. 中医研究, 2008, 21 (2): 26 - 29.
- [3] 金哲峰, 王聪. 玉屏风散 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009. 1.
- [4] 陈文慧, 袁嘉丽, 张玉峰, 等. 急性上呼吸道感染中医证型与口咽部微生态平衡相关性初步研究 [J]. 云南中医学院学报, 2004, 27 (2): 10 - 12.
- [5] 徐艳琴, 袁嘉丽, 陈文慧, 等. 益气类中药黄芪甘草

对小鼠上呼吸道菌群调节的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28 (5): 1008 - 1009.

- [6] 王健伟, 彭静, 袁嘉丽. 玉屏风散影响上呼吸道甲型链球菌生长的实验研究 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31 (2): 20 - 22.
- [7] 徐艳琴, 袁嘉丽, 陈文慧, 等. 玉屏风散中君臣两药扶植上呼吸道优势菌甲型链球菌的研究 [J]. 中医药学报, 2010, 38 (2): 16 - 18.
- [8] 刘青, 杨雪, 李庆生. 玉屏风散不同剂量比例关系研究及治疗上呼吸道感染概况 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31 (3): 61 - 64.
- [9] 何贵山, 赵瑞萍, 余艳芳. 1137 例上呼吸道感染患者细菌培养和药敏试验的调查 [J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14 (10): 1168 - 1170.
- [10] 杨永弘, 马香. 小儿呼吸道感染的细菌病原 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26 (4): 229 - 232.
- [11] 夏胜英, 刘凡, 刘萍. 反复呼吸道感染患儿病原菌检测及其免疫机制 [J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25 (16): 1247 - 1249.

(编辑: 迟 越)

Study on the Microbial Mechanism of Yupingfeng San and α - Hemolytic Streptococcus Prevention of Upper Respiratory Tract Infection

YAO Zheng, XU Yan - qin, GUO Jian - nan, YANG Zeng - xiang,
XING Hai - jing, ZHANG Liang

(Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500, China)

[**ABSTRACT**] Objective: To observe the situation of Yupingfeng San and α - Hemolytic streptococcus to prevent bacteria Staphylococcus aureus invasion, and to adjust micro - ecological balance ment situation in upper respiratory tract. Methods: Flora imbalance in the upper respiratory tract of mice were respectively fed to Yupingfeng or Yupingfeng San plus α - Hemolytic streptococcus by oropharyngeal infusion for 7 days. Then to attack mice by Staphylococcus aureus oropharyngeal infusion for three days. To test flora Density, α - Hemolytic streptococcus quantity, flora diversity in the upper respiratory tract flora of mice at different time points. Results: Taking yupinfeng San can ease flora disturbance in oropharyngeal of mice and play a role against harmful bacterium attacking. Oropharyngeal colonization of Streptococcus can be enhanced this role. Yupinfeng San can adjust the growing of α - Hemolytic streptococcus, to Maintain its position of dominant bacteria and the micro - ecological balance of the upper respiratory tract. Conclusions: We could consider using traditional Chinese medicine therapy or probiotics intervention to combat harmful bacterial infections of upper respiratory tract.

[**KEY WORDS**] Yupingfen San; upper respiratory tract infection; microecologic; α - hemolytic streptococcus; staphylococcus aureus