探讨中和汤治疗脓肿型淋巴结结核的作用机制

赵丽萍[1]，孙 晴[2]，王桂荣[2*]
（1. 首都医科大学附属北京胸科医院中医科，北京 101149；2. 首都医科大学附属北京胸科医院检验科，北京 101149）

摘要：目的 探讨中和汤干预脓肿型淋巴结结核的作用机制。**方法** 使用细胞计数试剂盒 -8 方法检测不同浓度中和汤溶液对人单核细胞（THP-1）的细胞毒性，结果进一步运用二代高通量 RNA 转录组测序技术进行测序，筛选差异表达基因，并对其进行基因本体论功能注释及京都基因与基因组百科全书通路分析。**结果** 中和汤可降低炎症因子表达，细菌感染相关的通路受抑制，磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路响应降低，细胞焦亡和自噬相关的信号通路亦受抑制。**结论** 中和汤可能通过抑制磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B 信号通路抑制细胞焦亡干预淋巴结结核。

关键字：中和汤；磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B；脓肿型淋巴结结核；细胞焦亡
中图分类号：R-33 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2024）06-0590-07
DOI：10.13683/j.wph.2024.06.004

The mechanism of Zhonghe decoction in the treatment of abscess type lymph node tuberculosis

ZHAO Liping[1], SUN Qing[2], WANG Guirong[2*]
（*1. Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China;*
2. Department of Clinical Laboratory, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China）

Abstract: ***Objective*** To explore the mechanism of Zhonghe decoction in the intervention of abscess type lymph node tuberculosis. ***Methods*** Cell counting Kit 8 method was used to detect the cytotoxicity of THP-1 in different concentrations of neutralization soup solution. The results were further sequenced by second-generation high-throughput RNA transcriptome sequencing technology, and the differentially expressed genes were screened, and the Gene Ontology functional annotation and pathway analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes were performed. ***Results*** Zhonghe decoction can reduce the expression of inflammatory factors, inhibit the pathway related to bacterial infection, reduce the response of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway, and inhibit the signaling pathway related to pyroptosis and autophagy. ***Conclusion*** Zhonghe decoction may interfere with lymph node tuberculosis by inhibiting cell pyrodeath by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway.

Key words: Zhonghe decoction; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B; abscess type lymph node tuberculosis; pyroptosis

淋巴结结核是一种由结核分枝杆菌感染淋巴结引起的慢性传染病，是常见的肺外结核病[1—2]，多见于颈部、腋窝，其中颈部淋巴结结核发病率最高[3]，约占肺外结核的 80% ～ 90%[4]，由于肺结核和肺外结核可共存[5—6]，且肺外结核耐药率比单一肺结核高[7]，造成淋巴结结核诊疗十分困难，而脓肿型淋巴结结核更是临床棘手难题。现临床有关颈部淋巴结核的治疗无特异性方案，既往常用的西医治疗虽有一定疗效，但不良反应较多，易产生耐药性，给临床治疗带来困难[8]，给患者造成极大身心

收稿日期：2024-01-09
作者简介：赵丽萍，主治医师，研究方向：中医肺结核及肺外结核治疗。
通信作者：王桂荣，研究员，研究方向：临床检验诊断。
基金项目：首都卫生发展科研专项项目（首发2022-4-2164）

折磨和社交工作障碍，同时给家庭和社会带来极大经济负担。近两年来，笔者在临床诊疗中运用中和汤治疗脓肿型淋巴结结核取得确切疗效，但其作用机制尚不清楚，故进行本研究探讨中和汤治疗淋巴结结核的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

人单核细胞 THP-1 来自中国科学院细胞库；H37Rv（ATCC27294）来自于首都医科大学附属北京胸科医院菌株库；含 10% 胎牛血清洛斯维·帕克纪念研究所（Roswell Park Memorial Institute，RPMI）-1640 培养基购自 allBio；佛波酯（phorbol ester，PMA）购自 Sigma；RNA 提取试剂盒 EastepTM Super Total RNA Extraction Kit 购自 Promega；人外周血单个核细胞分离试剂、红细胞裂解液以及细胞计数试剂盒（cell counting kit，CCK）-8 试剂均购自北京索莱宝科技有限公司；反转录试剂盒 GoScript Reverse Transcription System 购自 Promega；PowerUp™ SYBR™ Green 预混液购自 ABI；Middlebrook 7H9 Broth Base（7H9 培养基）、Middlebrook OADC 增菌液均购自 BD。

1.2 药物

中和汤组方为黄芪 40 g、当归 15 g、皂角刺 15 g、川芎、白芷各 8 g、金银花 10 g、人参 6 g、陈皮、白术、茯苓、生甘草各 10 g 以及乳香、没药各 3 g，以上药物采用中药颗粒剂（北京康仁堂药业有限公司生产）。将中药颗粒用蒸馏水进行溶解备用。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 检测筛选浓度

取生长良好的 THP-1 细胞，离心 5 min，1640 培养基重悬，将细胞调整为 2.5×10^5 个 /ml，并加入 PMA 诱导剂，使 PMA 的终浓度为 100 ng/ml，制备为细胞悬液；取 100 μl 细胞悬液接种于 96 孔板内，培养 48 h，诱导分化后的细胞加入不同浓度的中和汤溶液，使用 1640 培养基调整中和汤溶液浓度，浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0 以及 128.0 g/ml，于 37 ℃，5% 二氧化碳孵箱中分别培养 24 h 和 48 h，然后加入 CCK8 试剂，于 37 ℃，5% 二氧化碳孵箱内培养 1 h，在 450 nm 处测定光密度（optical density，OD）值。

1.3.2 中药胞内抑菌实验及分组

取生长良好的 THP-1 细胞，离心 5 min，并用 1640 培养基重悬，将细胞调整为 2×10^6 个 /ml，并加入 PMA 诱导剂，使 PMA 的终浓度为 100 ng/ml，制备为细胞悬液；取 2 ml 细胞悬液接种于 6 孔板内，培养 48 h 诱导分化；用含 10% 7H9 培养基培养 H37Rv 菌株 2 ～ 3 周至对数生长期，取处于对数生长期的 H37Rv 菌株，离心 10 min 并用含 10% 胎牛血清 1640 培养基重悬菌体沉淀，调整至 OD_{600} ＝ 0.6；按照细菌数：细胞数＝ 5 ： 1 感染细胞；感染 4 h 后，取出细胞培养板，每个培养孔用预热的磷酸盐缓冲液重复清洗 3 次，加入 20 μg/ml 的庆大霉素孵育 2 h 以去除细胞外菌，后加入中和汤溶液使其浓度为 16 mg/ml，继续培养 24 h 和 48 h。分为对照组、H37Rv-24 h 组、中药 -24 h 组、H37Rv-48 h 组和中药 -48 h 组。

1.3.3 RNA 转录组测序

严格按照 EastepTM Super Total RNA Extraction Kit 试剂盒说明书提取细胞 RNA，完成 RNA 转录组测序。

1.4 数据分析

生物信息学分析均使用 R 软件进行。使用“加权基因共表达网络分析（weighted gene co-expression network analysis，WGCNA）”对所有数据的基因表达情况进行聚类分析；使用“clusterProfiler”对关键差异表达基因分别进行基因本体论（Gene Ontology，GO）及京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。

2 结果

2.1 CCK-8

当生药浓度为 16 mg/ml 时，THP-1 细胞 24 h 的存活为 100.0%，THP-1 细胞 48 h 的存活为 75.08%，由于生药浓度为 16 mg/ml 时细胞 24 h 和 48 h 的存活率均大于 75%，故后续将以此浓度进行中药胞内抑菌实验，见表 1。

表 1 CCK-8 不同时间及中药浓度细胞存活率
Table 1 Cell survival rate of CCK-8 at different time and concentrations of Chinese medicine

中和汤方生药浓度/mg ml^{-1}	24 h细胞存活率/%	48 h细胞存活率/%
0.5	100	100
1.0	100	100
2.0	100	100
4.0	100	100
8.0	100	100
16.0	100	75.08
32.0	100	26.12
64.0	48.71	22.23
128.0	16.46	22.37

2.2 WGCNA 分析

主成分分析显示，中和汤溶液的加入可显著区别不同的样本，H37Rv 感染后的细胞不同时间点的样本差距不明显，而在 H37Rv 感染后加入中和汤溶液处理的 48 h 样本存在明显差异，见图 1。

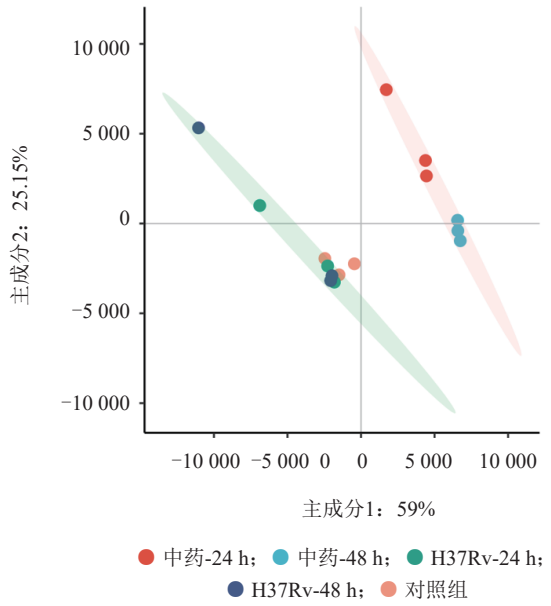


图 1 WGCNA 分析结果
Figure 1 WGCNA analysis results

根据数据分析获得 WGCNA 的 power 值，最终确定幂次运算的值为 5，以符合无尺度网络分布。利用构建共表达网络绘制模块聚类树状图，表达数据相似的基因被聚类在一起形成 1 个分支，见图 2。

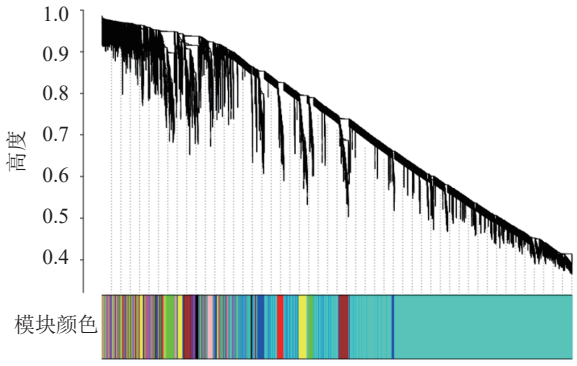


图 2 聚类树状图
Figure 2 Clustering tree diagram

将中和汤溶液处理后表型数据、H37Rv 感染后的表型数据分别与 WGCNA 的模块进行关联分析，绘制模块临床特性关联图，结果显示，棕色和蓝色的模块分别与 H37Rv 感染后和中和汤溶液处理后的基因表达模块高度相关，见图 3。

2.3 GO 与 KEGG 富集分析

GO 富集分析显示，H37Rv 感染组大部分的通路都表现出上调的效应，细胞内的信号分子被激活，细胞因子以及信号通路受体也被激活；而在中和汤溶液的作用下，H37Rv 感染组上调的细胞信号活性被显著抑制。随着药物处理时间的增加，细胞代谢活动降低，抑制肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）相关受体结合作用亦受抑制，见图 4。

KEGG 富集分析显示，H37Rv 感染组细胞因子相互作用信号通路、MAPK、Ras 和磷脂酰肌醇 3-

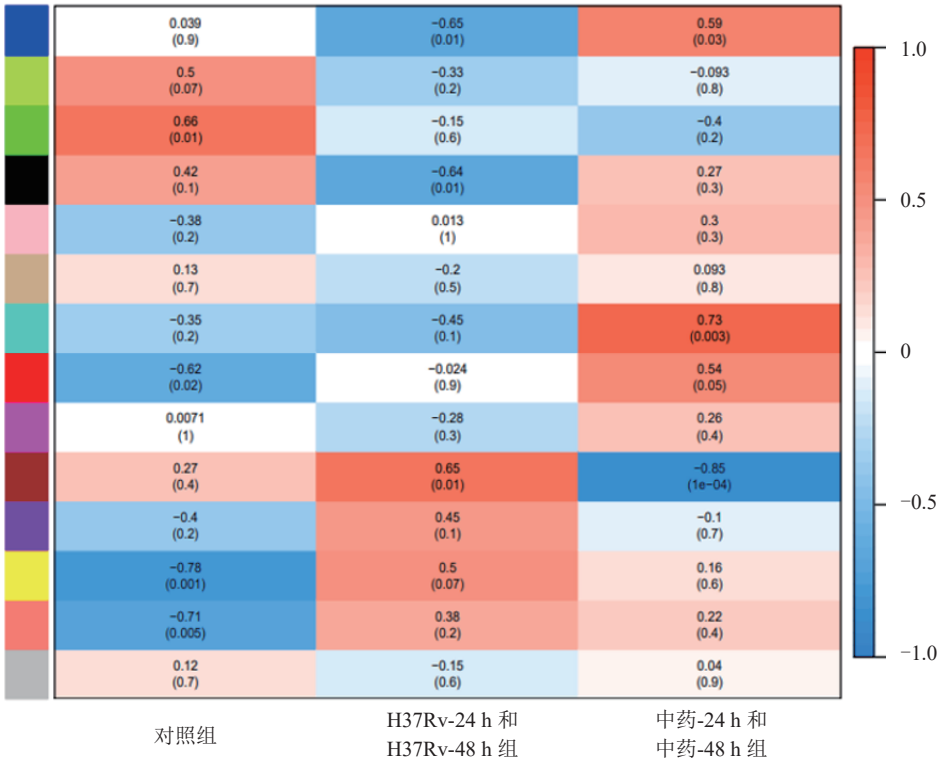


图 3　基因表达模块特征图

Figure 3　Gene expression module feature map

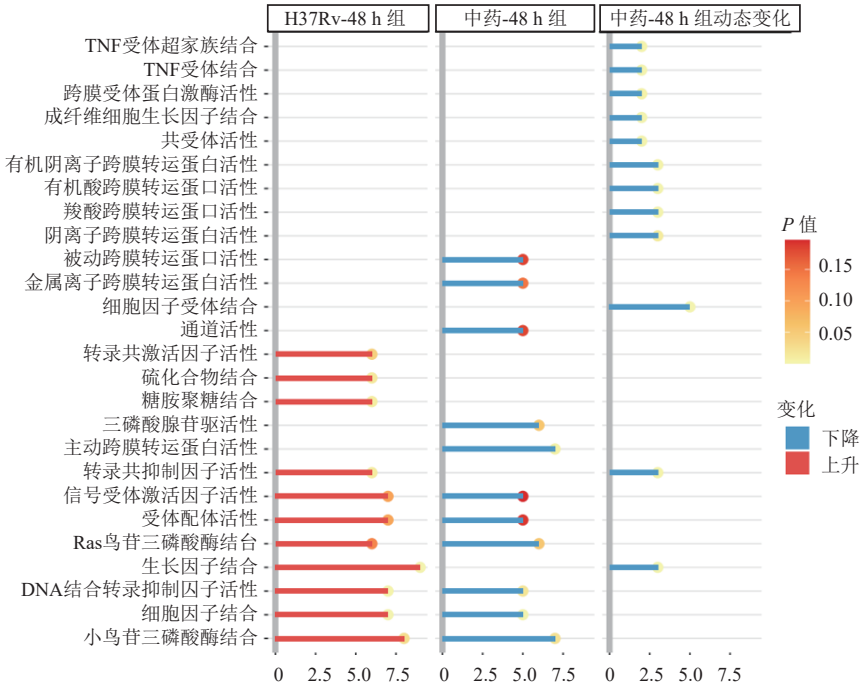


图 4　GO 富集分析

Figure 4　GO enrichment analysis

激酶 / 蛋白激酶 B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）等信号通路上调。在中和汤溶液的作用下，细菌感染相关通路受抑制，随着药物处理时间的增加，H37Rv 感染引起的局部粘连、PI3K-Akt 等信号通路响应降低，细胞焦亡和自噬相关的信号通路亦受抑制，见图 5。

2.4 细胞因子相关基因表达情况分析

通过热图分析，H37Rv- 中药 -48 h 组的炎症因子抑制作用较 H37Rv-48 h 组差异显著，其中白介素（interleukin，IL）-1β、IL-11、IL-18、TNF-α、Ⅰ型干扰素受体（type Ⅰ interferon-α/β receptor，IFNAR）1、IFNAR2、CC- 趋化因子配体（C-C motif chenmokine ligand，CCL）-2、CCL-3、CCL-4、CCL-7、CCL-8、CCL-13 以及 CXC- 趋化因子配体（C-X-C motif chenmokine ligand，CXCL）-10 的表达水平均较未使用中药的 H37Rv-48 h 组低，见图 6，提示以上炎症因子可能参与了 PI3K-Akt 信号通路的下调。

3 讨论

淋巴结结核属于中医“瘰疬”范畴，其病机以气阴两虚为主，兼见痰瘀互结，当以益气和血，补气透托，和血消散为主要治则。需扶正以祛邪，针对淋巴结结核应内消外托相结合进行治疗。

结核分枝杆菌感染机体后刺激巨噬细胞，巨噬细胞会通过其模式识别受体开启固有免疫反应，外周淋巴器官和组织诱导 T 细胞活化，进而启动适应性免疫应答，然后通过激活细胞凋亡、细胞焦亡和自噬等途径消灭病原菌。清除细胞内病原体需杀死感染细胞[9]，虽有助于抗结核，但有可能释放活菌从而导致结核杆菌的逸散，使感染进一步扩大[10]，且过度的细胞焦亡、自噬等反应会导致组织的严重损坏。研究证实，细胞焦亡、过度炎症反应是导致

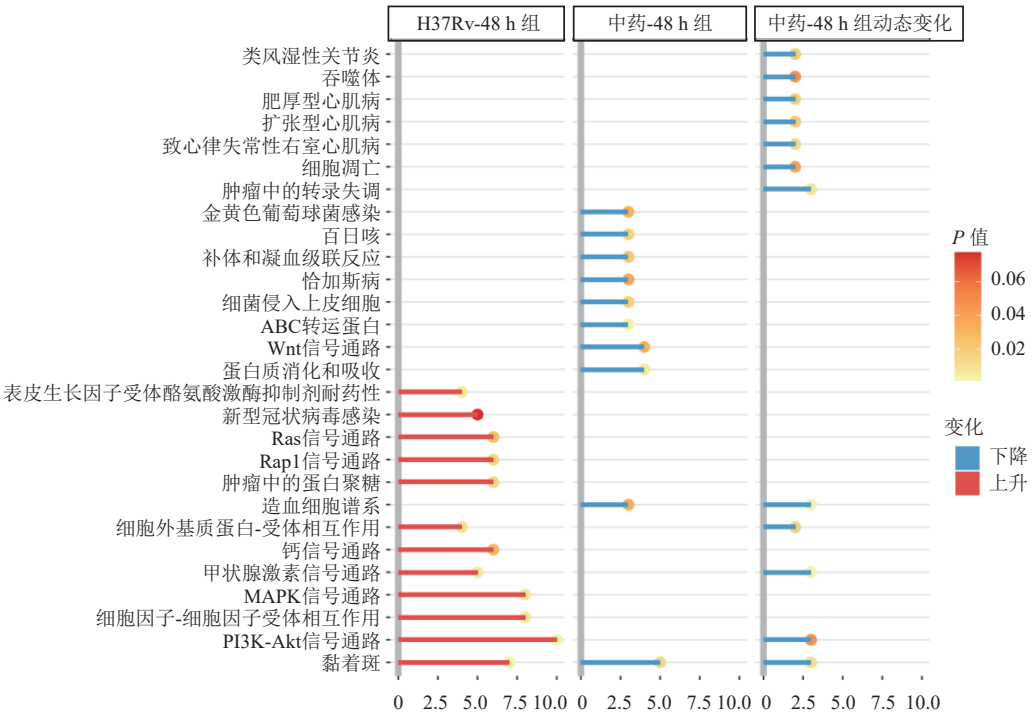


图 5 KEGG 相关信号通路

Figure 5 Related signaling pathways of KEGG

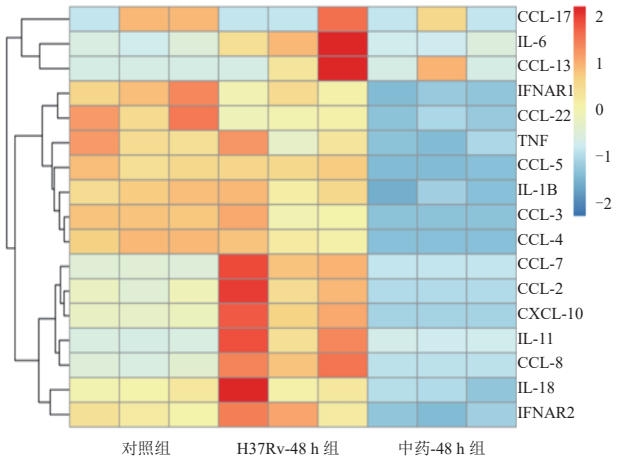


图 6 各组细胞炎症因子表达热图

Figure 6 Heat map of inflammatory cytokines expression in each group

组织损伤的重要机制[11]。细胞焦亡是一种新的细胞程序性死亡方式，其参与许多疾病的发生发展，如感染性疾病、炎症免疫性疾病以及代谢性疾病等[12—13]。其由一系列可形成炎症小体的模式识别受体触发[14]，在反应过程中细胞膜穿孔，细胞膨胀破裂，释放炎症因子 IL-1 和 IL-18，导致炎症反应[15]。既往研究显示，激活 PI3K/Akt 信号通路可启动其下游抑凋亡因子 B 细胞淋巴瘤 -2 及促凋亡因子 B 细胞淋巴瘤 -2 相关 X 蛋白[16—17]，而 caspase 家族主要参与炎症反应及诱导凋亡，激活 caspase-3 可提高细胞凋亡率，并导致 caspase 家族其他蛋白酶级联释放。有研究显示，结核杆菌可激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白炎性体以及 caspase 家族，从而通过经典途径诱导巨噬细胞焦亡，此过程对抗结核分枝杆菌天然免疫至关重要，但巨噬细胞焦亡可释放细胞内活菌，使感染传播扩散[18]。多项研究显示，PI3K/Akt 信号通路参与细胞焦亡[19]。

本研究结果显示，中和汤作用于感染 H37Rv 的 THP-1 细胞后可明显降低炎症因子表达，基因转录及生物信息分析显示，在中药的作用下，细菌感染相关的通路受抑制，随着药物处理时间的增加，结核杆菌引起的 PI3K/Akt 信号通路响应降低，细胞焦亡和自噬相关的信号通路亦受抑制。本文还存在一定不足，只在整体层面进行了初步探讨，关于 PI3K/Akt 信号通路下游调控细胞焦亡的分子机制并未涉及，其更清楚、完整的药理机制还需后续深入研究，以期为中医药临床治疗淋巴结结核提供新的生物学依据。

参考文献：

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017[R]. Geneva: World Health Organization, 2017.

[2] Park JH, Kim DW. Sonographic diagnosis of tuberculous lymphadenitisin the neck[J]. J Ultrasound Med, 2014, 33(9): 1619-1626.

[3] 唐神结, 高文. 临床结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 478.

[4] 杨国强, 张靳, 张绿浪, 等. 夏枯草膏联合常规疗法治疗颈部淋巴结核的疗效及对免疫功能和炎症因子水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(8): 914-918.

[5] Ohene SA, Bakker MI, Ojo J, *et al*. Extra-pulmonary tuberculosis: a retrospective study of patients in Accra, Ghana[J]. PLoS One, 2019, 14(1): 2096-2097.

[6] Efared B, Sidibé IS, Erregad F, *et al*. Breast tuberculosis: a report of five cases[J]. Trop Med Health, 2017, 45: 40.

[7] Boonsarngsuk V, Mangkang K, Santanirand P. Prevalenceand risk factors of drug-resistant extrapulmonary tuberculosis[J]. Clin Respir J, 2018, 12(6): 2101-2109.

[8] 梁艳辉, 赵磊. 胸腺五肽辅助治疗颈部淋巴结核对T淋巴细胞亚群及INF-γ和IL-10水平的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(12): 1336-1338.

[9] Doerflinger M, Deng Y, Whitney P, *et al*. Flexible usage and interconnectivity of diverse cell death pathways protect against intracellular infection[J]. Immunity, 2020, 53(3): 533-547.

[10] Al-Mayouf SM, Albuhairan I, Muzaffer M, *et al*. Familial aggregation of Crohn's disease and necrotizing sarcoidlike granulomatous disease[J]. Eur J Rheumatol, 2015, 2(3): 122-124.

[11] 韦双, 高维崧, 窦金萍, 等. 细胞焦亡分子机制及其调控[J]. 生物技术进展, 2023, 13(6): 868-874.

[12] Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis[J]. Mol Microbiol, 2000, 38(1): 31-40.
[13] 张星, 郑碧英, 徐军发. 巨噬细胞细胞焦亡(pyroptosis)在结核分枝杆菌感染中作用机制的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(10): 951-954.
[14] Aachoui Y, Sagulenko V, Miao EA, *et al*. Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptoticcell death, and defense against infection[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(3): 319-326.
[15] Miao EA, Raian JV, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptotic cell death[J]. Immunol Rev, 2011, 243(1): 206-214.
[16] Sengupta P, Chattopadhyay S, Chatterjee S. G-Quadruplex surveillance in *BCL-2* gene: a promising therapeutic intervention in cancer treatment[J]. Drug Discov Today, 2017, 22(8): 1165-1186.
[17] Wang H, Li J, Chi H, *et al*. MicroRNA-181c targets Bcl-2 and regulates mitochondrial morphology in myocardial cells[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(9): 2084-2097.
[18] Beckwith KS, Beckwith MS, Ullmann S, *et al*. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2270.
[19] 黎多品. PM2.5成分BbF通过激活PI3K/Akt通路致足细胞焦亡参与IMN发生的机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.

(编辑：沈佳婕)

