

“热毒清”注射液拆方的药效学研究^{*}

李鸣真 叶望云 杨明炜 张艳萍 王开富
徐丽君 屠庆年 邓益明 林宝英 章菊花

(同济医科大学附属同济医院, 同济医大中西医结合研究所 武汉 430030)

摘要 热毒清乃由 4 味清热解毒药制成的注射液, 选择解热、抗炎、抗内毒素、抗氧自由基、免疫功能和保护细胞器六个方面 13 项指标, 比较观察其与方内各单味药的作用, 结果热毒清的作用最为全面和强大, 可见组方之科学性。

关键词 复方 金银花 大青叶 蒲公英 鱼腥草

Pharmacodynamic Study on Analysis of 4 Individual Component Herbs in Reduqing Injection

*Li Mingzhen, Ye Wangyun, Yang Mingwei, Zhang Yanping, Wang Kaifu,
Xu Lijun, Tu Qingnian, Den Yiming, Lin Baoying, Zhang Juhua
(Tongji Hospital, and Institute of Integrated TCM & WM,
Tongji Medical University, Wuhan, 430030)*

Abstract: Reduqing (RDQ) is an injection composed of four "heat-clearing and detoxifying" Chinese herbs. In this paper, the antipyretic, anti-inflammatory, anti-endotoxin, anti-oxygen free radicals, and immunological and organelles-protected effects of RDQ and its four individual component herbs were comparatively observed. The results showed the effects of RDQ as a whole was most potent as compared with its individual ingredients, suggesting a scientific composition of the 4 ingredients in RDQ.

Key words: compound prescription, Flos lonicerae, Folium isatidis, Herba taraxaci, Herba houttuyniae

热毒清注射液 (RDQ, 原名抗炎 6 号) 是由等量金银花、大青叶、蒲公英、鱼腥草制成。临床治疗多种急性细菌/病毒感染, 疗效在

85% 左右, 实验证明其具有多方面功能, 研究已达亚细胞水平^[1-6]。为判定该方组方是否科学, 特选择有代表性的药效学指标作拆方

• 卫生部科学研究资助项目

研究,比较该复方和方内各单味药的作用强度,报告于下:

1 材料

1.1 动物 健康大耳白兔,体重 1.8~2.5kg;昆明小鼠,体重 18~22g;Wistar 大鼠,体重 180~200g;均由同济医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验用药 100%(含生药 g/ml)热毒清注射液(批号:930801,931111),25%金银花、大青叶、蒲公英、鱼腥草注射液(批号:均 930801),皆用相同水煎醇沉工艺制备,由本研究所中药制剂室提供。

1.3 其他材料 精制大肠杆菌内毒素(LPS,批号:930201)由上海生物制品研究所提供,四乙氧基丙烷(TEP)为日本和光纯药株式会社产品;5'-ADP-Na₂ 为华美生物技术

公司产品;邻苯三酚和其他试剂均为国产分析纯品。

2 方法与结果

2.1 解热试验 健康大耳白兔 48 只,随机分为 8 组。于实验前测肛温 3 次,取平均值作为基础体温,除正常对照组外,家兔均静注内毒素 0.1μg/kg 制作发热模型。制模后 0.5h 测肛温,并分别静注 RDQ,金银花、大青叶、蒲公英、鱼腥草注射液,或生理盐水(NS)各 5ml/kg,阳性对照组肌注安痛定 0.5ml/kg。继每 h 测肛温一次,共 4 次。结果安痛定组于给药后 1h 即显著退热;RDQ、金银花、蒲公英组 2h 亦退热明显;大青叶、鱼腥草组未见明显解热效应,与 RDQ 组比较差异显著($P < 0.01, < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组对家兔内毒素性发热反应的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	致热后 0.5h $\Delta T(C)$	给药后(h) $\Delta T(C)$			
			1	2	3	4
模 型	7	0.46±0.15	0.99±0.18	0.87±0.25	0.44±0.33	0.19±0.20
安痛定	5	0.45±0.13	0.52±0.27*	0.19±0.31**	-0.01±0.19**	0.02±0.22
热毒清	7	0.36±0.14	0.82±0.19	0.43±0.13**	0.16±0.13	0.05±0.15
金银花	6	0.35±0.10	0.76±0.25	0.48±0.17**	0.26±0.15	0.17±0.12
蒲公英	6	0.38±0.15	0.92±0.21	0.48±0.28**	0.25±0.26	0.08±0.28
大青叶	6	0.47±0.23	1.08±0.26	0.89±0.33 $\Delta\Delta$	0.54±0.27 Δ	0.21±0.30
鱼腥草	6	0.39±0.14	1.07±0.33	0.69±0.25 Δ	0.42±0.28	0.20±0.22
正常对照	5	0.02±0.04	0.05±0.04**	0.01±0.02**	0.01±0.05**	-0.01±0.02

ΔT : 为减去基础肛温的体温差值 与模型组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

各单味药与热毒清组比: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ (表 2、3、4、7 同)

2.2 抗炎试验 昆明小鼠 108 只,随机分为模型组、RDQ 组和前述 4 味单味中药组。于实验前 3 天始每天给小鼠灌胃给药 2 次,每次 1ml,模型组则灌等量 NS。按《药理实验方法学》^[7]作巴豆油所致耳肿试验。结果可见:与模型组比较,RDQ 组和大青叶组耳肿程度明显较轻($P < 0.01$),蒲公英组也有所减轻($P < 0.05$);金银花组、鱼腥草组与模型组之间差异则无显著性($P > 0.05$),即其抗炎作用明显逊于复方 RDQ 组($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 各组对小鼠耳肿的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠数	耳肿程度(mg)
模 型	18	5.228±1.250
热毒清	18	3.806±0.981**
金银花	18	4.461±0.793 Δ
大青叶	18	3.732±0.935**
蒲公英	18	4.133±1.227*
鱼腥草	18	4.668±1.421 Δ

2.3 抗内毒素试验

2.3.1 体外试验:抗内毒素的电镜观察 将 LPS 溶于 pH 为 7.2 之 0.1M Tris 缓冲液中,使其浓度为 4mg/ml,取此 LPS 液各 0.2ml 置 7 只试管中,分别加入 Tris 缓冲液、多粘菌素 B(浓度为 1mg/ml)、RDQ、和前述 4 种单味中药注射液各 0.2ml,混匀后置 37 C 水浴中孵育 60min,然后按 Lopes 法^[8]制成滴片作电镜观察,每分标本作 2 张滴片,每张滴片随机观察 5 个网眼,共 3 批实验。结果可见大肠杆菌 O₁₁₁B₄LPS 呈网状结构;经多粘菌素 B 处理者完全丧失原结构而崩解成短杆状、短片状;经 RDQ、大青叶、鱼腥草处理者也大部分失去网状结构;而经金银花、蒲

公英处理者则甚少出现上述改变(表 3)。

2.3.2 体内实验:对 LPS 性播散性血管内凝血(DIC)家兔肾小球微血栓形成的影响 健康大耳白兔 61 只,随机分为 8 组。除正常对照组 5 只不予任何处理外,余 7 组家兔均间隔 24h 2 次静注 LPS,剂量分别为 15、35mg/kg,使产生全身性施瓦茨曼反应(Generalized Shwartzman Reaction)作为 DIC 模型,第 1 次静注 LPS 的同时,各组分别静注 NS, RDQ, 前述 4 种单味中药注射液 5ml/kg, NS5ml/kg+地塞米松 1mg/kg, 继每 12h 静注 1 次,共 3 次。于第 2 次注射 LPS 后 12h 处死动物,取右肾常规固定切片作 Mallary 纤维素染色,用光镜检查,参照 Latour 法^[9]统计肾小球微血栓之检出率及含微血栓密度,结果模型组大部分动物肾小球毛细血管内有大量纤维素微血栓形成,地塞米松组仅少数动物可见,微血栓密度亦低,与模型组差异非常显著(P<0.01),中药各组中仅蒲公英组作用不明显,余均低于模型组;且各单味药中除鱼腥草组肾小球微血栓检出率接近 RDQ 组之外,余均不同程度地弱于 RDQ 组(P<0.05, <0.01)(表 4)。

表 3 各组对大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 内毒素结构的影响

组别	观察网眼数	发现被裂解网眼数	裂解率 (%)
Tris buffer	30	4	13.3
多粘菌素 B	30	30	100.0*
热毒清	30	22	73.3*
金银花	30	7	23.3 [△]
大青叶	30	18	60.0*
蒲公英	30	5	16.7 [△]
鱼腥草	30	21	70.0*

与 Tris buffer 比 *P<0.01

表 4 各组对内毒素性 DIC 家兔肾小球微血栓形成的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	DIC 发生率 (%)	肾小球微血栓检出率 (%)	肾小球含微血栓密度 (%)
模型	8	62.5	53.8±2.5	45.6±1.2
地塞米松	8	25.0	13.3±1.7**	7.1±0.6**
热毒清	8	37.5	24.3±2.1**	16.9±0.9**
金银花	8	50.0	45.0±2.5 ^{△△}	40.9±1.2 ^{△△}
大青叶	8	37.5	32.0±2.3 ^{**△}	31.4±1.2 ^{**△△}
蒲公英	8	62.5	53.3±2.5 ^{△△}	50.7±1.2 ^{△△}
鱼腥草	8	37.5	26.8±2.2**	24.0±1.1 ^{**△△}
正常对照	5	0	0	0

2.4 免疫试验

2.4.1 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 昆明小鼠 96 只,随机分为 NS 组、ROQ 组、和前述组方内 4 种单味药组共 6 组,于给

药前一天每只小鼠腹腔注射 0.5% 淀粉 NS 刺激腹腔巨噬细胞,继分别灌胃给药,每次 0.8ml,每日二次,对照组则灌等量 NS。于第 4 天上午给每只小鼠腹腔注射 5% 鸡红细胞

悬液 0.5ml, 30min 后颈椎脱臼法处死动物, 腹腔注射 NS 5ml, 洗出含巨噬细胞的腹腔液, 涂片, 用 Giemsa 染色观察巨噬细胞吞噬率和吞噬指数。结果与 NS 组比较, RDQ 组二指标均提高非常明显 ($P < 0.001$); 大青叶和蒲公英组亦有明显提高 ($P < 0.01$); 而金银花和鱼腥草组则提高不明显。至于各单味药组与复方 RDQ 组比较, 作用均较弱, 差异非常显著 ($P < 0.01$) (表 5)。

表 5 各组对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠数	吞噬率(%)	吞噬指数
生理盐水	16	19.62 ± 2.49	0.31 ± 0.02
热毒清	16	42.32 ± 3.84**	0.69 ± 0.04**
金银花	16	20.03 ± 2.72 [△]	0.33 ± 0.03 [△]
大青叶	16	26.54 ± 4.01* [△]	0.48 ± 0.05* [△]
蒲公英	16	26.39 ± 4.05* [△]	0.47 ± 0.02* [△]
鱼腥草	16	21.94 ± 2.09 [△]	0.31 ± 0.03 [△]

与生理盐水组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4.2 对小鼠血清溶菌酶含量的影响 昆明小鼠 72 只, 如上法随机分为 6 组。于实验前 3 天给小鼠分别灌胃给药 0.5ml, 每日 2 次; 对照组给等量自来水。3 天后将小鼠断头处死采血约 2ml 离心, 取血清 25 μ l 加入琼脂平板小孔内, 置 25 C 恒温箱 18h 测定溶菌环直径, 按标准曲线查出溶菌酶含量。结果各用

表 7 各组血浆 LPO、红细胞 SOD 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	家兔数	LPO(n mol MDA/ml)	SOD(U/g Hb)
模型	7	13.04 ± 1.74	1512.64 ± 147.24
热毒清	7	7.83 ± 1.15**	1945.41 ± 225.21**
金银花	7	9.06 ± 1.55* [△]	1803.93 ± 125.79** [△]
大青叶	7	8.93 ± 1.68* [△]	1706.83 ± 268.74* [△]
蒲公英	7	8.44 ± 1.79* [△]	1794.67 ± 117.93* [△]
鱼腥草	7	10.89 ± 1.94* ^{△△}	1662.98 ± 85.69* ^{△△}
地塞米松	7	7.40 ± 1.54**	1929.84 ± 253.76**
正常对照	7	7.68 ± 1.09**	1888.79 ± 80.16**

2.6 保护细胞器实验

2.6.1 保护肝线粒体实验 家兔 64 只, 随

药组与对照组比较均有明显提高, 而以 RDQ 组最为显著 ($P < 0.001$); 但方内各单味药作用强度均不如复方 RDQ, 差异非常显著 ($P < 0.01$) (表 6)。

表 6 各组对小鼠血清溶菌酶含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	小鼠数	溶菌酶含量(μ g/ml)
对照	12	5.65 ± 0.72
热毒清	12	179.01 ± 8.83**
金银花	12	13.93 ± 0.88* ^{△△}
大青叶	12	27.22 ± 2.99* ^{△△}
蒲公英	12	28.83 ± 3.52* ^{△△}
鱼腥草	12	32.36 ± 7.42* ^{△△}

与对照组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

2.5 抗氧自由基试验 健康大耳白兔 56 只, 随机分为 8 组、塑制 DIC 模型及分组处理如实验 2.3.2。各组家兔于第 2 次注射 LPS 后 12h 自耳中央动脉采血, 用 TBA 显色法测过氧化物脂质(LPO)代谢终末产物丙二醛(MDA)^[10], 用邻苯三酚自氧化法测红细胞超氧化物歧化酶(SOD)^[11]。结果模型组血浆 LPO 明显升高, 红细胞 SOD 明显降低; 各用药组 LPO 均明显低于模型组, SOD 均明显高于模型组 ($P < 0.05$), 而以 RDQ 组和地塞米松组最为显著 ($P < 0.01$); 另各单味中药组的作用强度均不如复方 RDQ 组, 差异具有显著意义 ($P < 0.05$, < 0.01) (表 7)。

机分为 8 组同上述实验, 于第 2 次注射 LPS 后 12h 颈动脉放血处死家兔, 立即取右叶肝

组织置冰浴的等渗蔗糖分离液中洗净,剪碎匀浆,继在 GL-20 型低温高速离心机上差速离心分离线粒体,用 Estabrook 法^[10]测定线粒体呼吸功能,有 ADP 时的线粒体呼吸耗氧为呼吸态 III (Respiratory state III, RS₃),无 ADP 者为呼吸态 IV (RS₄),RS₃ 与 RS₄ 的比值则为呼吸控制率 (Respiratory control ratio,

RCR)。结果反映线粒体结构完整性及其功能的关键指标 RCR,模型组明显下降,RDQ 组和地塞米松组接近正常,与模型组比较差异非常显著(P<0.01);RDQ 方内各单味药则与模型组无显著差异,而明显低于复方 RDQ (P<0.01)(表 8)。

表 8 各组对线粒体呼吸功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	家兔数	RS ₃	RS ₄	RCR
模型	8	69.68±33.96	38.36±11.75	2.37±1.26
热毒清	8	137.07±38.15*	26.63±13.69*	4.47±1.28*
金银花	8	73.65±30.93 [△]	35.10±9.42 [△]	2.78±1.26 [△]
大青叶	8	77.62±20.35 [△]	32.56±12.81 [△]	2.98±1.22 [△]
蒲公英	8	72.74±22.10 [△]	35.51±1.71 [△]	1.60±1.25 [△]
鱼腥草	8	77.53±56.63 [△]	34.63±8.27 [△]	2.65±1.22 [△]
地塞米松	8	134.36±40.07*	26.62±8.91*	4.32±1.27*
正常对照	8	138.36±47.49*	23.38±7.69*	4.79±1.35*

与模型组比较 *P<0.01 各单味药组与热毒清组比较 [△]P<0.01

2.6.2 体外保护溶酶体试验 断头处死 Wistar 大鼠,迅速取出肝组织在冰浴中剪碎、匀浆,在 GL-20 型低温高速离心机上差速离心得溶酶体沉淀,以 pH6.5 之 0.25M 蔗糖稀释成原肝 0.1g/ml 备用。将每试管内加入 10ml 溶酶体悬浮液,分别再加入 0.1ml 前述不同中药制剂,空白对照组加 NS,37℃温育 80min,再次离心后测上清液中标志酶活性,以了解溶酶体膜的破损情况,实验重复 9~

10 次。用 4-氨基安替比林法^[11]测酸性磷酸酶(ACP)活性,单位为金氏单位/蛋白 μg;按 Kong-Jey 改良法^[12]测 β-葡萄糖苷酸酶(β-G)活性,单位为 nmol/ml/h 蛋白 μg。所有结果均以总酶活中上清液酶活的百分比即酶活比表示。结果与空白对照组比较,除 RDQ 组 ACP 和 β-G 之酶活比均显著较低外(P<0.05),方内各单味药均无统计学意义(表 9)。

表 9 各组对肝溶酶体标志酶的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	ACP 酶活比	β-G 酶活比
空白对照	9	0.4967±0.2032	14.28±2.71
热毒清	9	0.3867±0.1840*	11.58±3.19*
大青叶	9	0.4400±0.2409	12.61±0.99
鱼腥草	9	0.4167±0.2178	13.17±2.97
空白对照	10	0.2590±0.1686	14.00±8.80
金银花	10	0.2920±0.1481	12.24±6.62
蒲公英	10	0.2070±0.0917	11.17±5.96

与空白对照组比较 *P<0.05

3 讨论

RDQ 是我校自制的清热解毒制剂,为考

察组方是否科学,乃选择有代表性的解热、抗炎、抗内毒素、增强机体免疫功能、抗氧自由基和保护重要细胞器等6个方面共13项具体指标,对比观察复方RDQ和方内各单味药注射液的作用和作用强度。结果可见(表10),复方RDQ全面地具备多方面功能,而组方中各单味药则均作用较少,按其所具作用多少排序于下:RDQ(13项)>大青叶(9项)>蒲公英(7项)>金银花和鱼腥草(均6项),且在保护细胞器方面,唯RDQ复方作用明显,方内任何单味中药均不具备此作用。

至于作用强度方面,各单味中药组均作用较弱,许多药理作用与RDQ复方存在着显著差异($P < 0.05, < 0.01$)。这些结果表明:复方RDQ中并无任何某单味中药起主导作用,而可能是方内4味中药的协同作用而发挥药效,亦即此4味中药的集合效应,乃能使RDQ复方的作用更为全面、更为强大,从而可见RDQ组方的科学性。由此也提示当前研究中医药时,加强对中药复方的研究即方剂学的研究是非常重要的。

表10 热毒清复方和方内各单味药有关作用强度测试比较($\bar{x} \pm s$)

测试项目	热毒清	方内各单味药			
		金银花	大青叶	蒲公英	鱼腥草
解热试验	(++)	(++)	(-)* *	(++)	(-)*
抗炎试验	(++)	(-)*	(++)	(+)	(-)*
拮抗内毒素	(++)	(-)* *	(++)	(-)* *	(++)
肾小球微血栓检出率	(++)	(+)* *	(++)*	(-)* *	(++)
肾小球微血栓密度	(++)	(+)* *	(++)* *	(-)* *	(++)* *
对免疫功能	(+++)	(-)* *	(+)*	(+)*	(-)* *
巨噬细胞吞噬率	(+++)	(-)* *	(+)*	(+)*	(-)* *
巨噬细胞吞噬指数	(+++)	(-)* *	(+)*	(+)*	(-)* *
血清溶菌酶含量	(+++)	(+)* *	(+)* *	(+)* *	(+)* *
抗自由基	(++)	(+)*	(+)*	(+)*	(+)* *
红细胞SOD	(++)	(++)*	(+)*	(+)*	(+)* *
保护细胞器	(++)	(-)* *	(-)* *	(-)* *	(-)* *
减少溶酶体酶ACP释放 Δ	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
减少溶酶体酶 β -G释放 Δ	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

注:1. 与模型组比较:(-)无作用 $P > 0.05$, (+)有作用 $P < 0.05$, (++)作用明显 $P < 0.01$, (+++)作用非常明显 $P < 0.001$ 。2. 与热毒清组比较:* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。3. Δ 此项未与热毒清组作比较

参考文献

[1]林菊生,李鸣真,叶望云等. 中西医结合杂志 1986;6(7): 425

[2]李鸣真,叶望云,皇甫永穆等. 中西医结合杂志 1989;9(7): 412

[3]涂胜豪,李鸣真,叶望云. 中国中西医结合杂志 1992;12(4): 226

[4]陆付耳,章菊花,李鸣真等. 中西医结合杂志 1991;11(6): 362

[5]罗明,李鸣真,叶望云等. 中国危重病急救医学 1995;7(4): 193

[6]吴艳栋,李鸣真,张艳萍等. 中国中西医结合杂志 1995;15(6): 356

[7]徐叔云,卞如濂,陈修主编. 药理实验方法学. 第一版. 北京:人民卫生出版社,1982: 532

[8]Lopes J, Inniss WE. J Bacteriol 1969;100(2): 1128

[9]Latour JG, Mckey DG, Nasu K, et al. Am J Genecol 1972;113(2): 863

[10]Estabrook RW, Volume X. New Yark: Aca-

demic press. 1967 : 41

[11]武汉医学院第二附属医院检验科. 实用临床医学检验. 第一版. 武汉:湖北科学技术出版社, 1983 : 333

[12]Kong-Jey HO, Le-Hong HO. Enzyme 1980; 25 (6) : 361

(收稿:1996—04—19)