

# 脉络宁注射液对脂多糖与角叉菜胶诱导 热毒血瘀证模型大鼠的影响

黎同明\*, 邓敏贞

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:研究脉络宁注射液对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与角叉菜胶(carrageenan, Ca)联合诱导“热毒血瘀证”模型大鼠的影响。方法:随机将50只SPF级SD雄性大鼠分为5组,即空白对照组,模型对照组和脉络宁低、中、高剂量组(3.75, 15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>)。空白对照组和模型对照组腹腔注射等容量的注射用生理盐水,脉络宁低、中、高剂量组分别腹腔注射脉络宁注射液(3.75, 15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>),连续14 d,每天1次。给药到12 d,除空白组外,其余各组大鼠腹腔注射Ca(50 mg·kg<sup>-1</sup>)16 h后,再尾静脉注射LPS(5 μg·kg<sup>-1</sup>),24 h后大鼠尾部出现淤血现象为模型建立成功。给药第14天,禁食12 h,自由饮水,10%水合氯醛麻醉大鼠,从腹主动脉取血和取肝、脾。竞争性抑制法检测血清白介素-6(IL-6),固相夹心法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α),检测全血黏度、血浆黏度、血浆凝血酶原时间(PT)和血小板聚集率,光镜下观察肝脏和脾脏的病理变化。结果:与模型组比较,脉络宁各剂量组的IL-6和TNF-α含量都相应减少( $P < 0.05$ ),全血黏度、血浆黏度和血小板聚集率都降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),血浆凝血酶原时间增长( $P < 0.01$ ),且呈量效依赖变化,肝脏和脾脏的炎症和淤血症状有一定的改善。结论:脉络宁注射液对LPS/Ca诱导“热毒血瘀证”模型大鼠的有一定的改善作用。

**[关键词]** 脉络宁注射液; 脂多糖; 角叉菜胶; 热毒血瘀证; 炎症; 血液流变学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0223-04

## Effect of Mailuoning Injection on Noxious Heat Stasis Syndrome Rat Model Induced by Lipopolysaccharide in Combination with Carrageenan

LI Tong-ming\*, DENG Min-zhen

(Guangzhou University of Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of mailuoning injection on noxious heat stasis syndrome rat

**[收稿日期]** 20120826(012)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(K2100027)

**[通讯作者]** \*黎同明,副教授,从事方剂配伍规律与理论及方药药理研究, Tel:020-39358092, E-mail: ltmwgx@yahoo.com.cn

### [参考文献]

- [1] 王晓趁,董银兰,赵岗,等.复方乌骨藤胶囊对恶性肿瘤化疗的增效作用[J].临床医药实践,2010,19(5):594.
- [2] 董银兰,赵岗,宋延平,等.复方乌骨藤胶囊与环磷酰胺合用治疗Lewis肺癌研究增效减毒作用[J].陕西医学杂志,2010,39(11):1461.
- [3] 张晓双,宋延平,张恩户.复方乌骨藤胶囊对60Coy照射S180荷瘤小鼠的增效减毒作用[J].中药药理与临床,2012,28(3):97.
- [4] 徐叔云,卞如瀛,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003:365.
- [5] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:223.
- [6] 王玉炯,张贤,吕玉玲.肿瘤坏死因子的体外诱生及检测[J].甘肃畜牧兽医,1998,28(1):11.
- [7] 张爱琴,马胜林,孙在典,等.康莱特注射液对Lewis肺癌小鼠免疫功能的影响[J].浙江中西医结合杂志,2007,17(4):199.
- [8] 贾英杰,李小江,杨佩颖,等.消岩汤不同时段联合化疗对Lewis肺癌小鼠免疫功能的影响[J].天津中医药,2010,27(4):312.
- [9] 宁安红,曹倩,黄敏,等.灵芝多糖对荷瘤小鼠免疫系统的影响[J].中国微生态学杂志,2004,16(1):13.

[责任编辑 聂淑琴]

model induced by lipopolysaccharide (LPS) in combination with carrageenan (Ca). **Method:** Fifty SPF SD male rats were randomly divided into five groups, namely blank control group the model control group and Mailuoning of low, medium and high dose group ( $3.75, 15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The animals in the model group were pretreated with Ca ip at the doses of  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and then treated by LPS iv at the doses of  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  sixteen hours later, while the control group was given normal saline (NS). After 24 hours, the apprence of congestion in rat tails was considered as successfully established models. Blank control group and model control group were injected with the same capacity of NS, mailuoning low, medium and high dose groups were injected intraperitoneally mailuoning injection ( $3.75, 15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), for 14 consecutive days, once a day. Then they were fasted for 12 h. The blood, liver and spleen were collected. The serum interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected. Meanwhile whole blood viscosity, plasma viscosity, plasma thrombin original time (PT) and platelet aggregation rate and the histopathology of the liver and spleen were observed. **Result:** The mailuoning groups reduced IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), whole blood viscosity, plasma viscosity and platelet aggregation rate were lower ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), prothrombin time increase ( $P < 0.01$ ), and the liver and spleen had no obvious inflammation and congestion. **Conclusion:** Mailuoning injection has a certain therapeutic effect on the noxious heat stasis syndrome rat model induced by lipopolysaccharide in combination with carrageenan.

[**Key words**] Mailuoning injection; lipopolysaccharide; carrageenan; noxious heat stagnation syndrome; inflammation; hemorheology

脉络宁注射液(Mailuoning injection)是在著名医方《四妙永安汤》的基础上研究成的中药复方注射剂,由牛膝、玄参、麦冬、石斛等中药组成,具有滋补肝肾、养阴清热、活血化痰的功效。《金匱要略》中便有记载:“热之所过,其血必凝”。热毒血瘀证是中医学温病营(血)分证中常见的一种由热盛引起的证候,温病发展到营血分阶段而出现的热毒炽盛与瘀血交结的病理状态<sup>[1]</sup>。本研究用 LPS/Ca 诱导“热毒血瘀证”大鼠模型,观察脉络宁注射液对热毒血瘀证的治疗效果。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠 50 只,雄性,SPF 级,体重  $180 \sim 220 \text{ g}$ ,由广东省实验动物监测所提供,实验动物生产许可证号 SCXK(粤)2008-0020。实验前先将动物适应性饲养 3 d,大鼠自由饮水、进食标准大鼠饲料;房内适度通风,采光良好,室温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,湿度  $55\% \pm 5\%$ 。

**1.2 药物与试剂** 脉络宁注射液(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批号 20111243),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,来源于大肠杆菌 0111:B4),角叉菜胶(Carrageenan, Ca 美国 Sigma 公司, type I, C1013),0.9% 氯化钠注射液(四平巨能药业有限公司,批号 B11090309),水合氯醛(天津市福晨化学试剂厂,批号 20110512),甲醛(分析纯,天津市大茂化学试剂厂,批号 20110711),白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因

子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 检测试剂盒(批号 BV-E12052504, BV-E12052505, BIOVALUE 公司)。

**1.3 仪器** FA2004N 型电子天平(上海民桥精密化学仪器有限公司),RT-2100 型 Rayto 酶标仪(北京五洲东方科技发展有限公司),赛科希德 SA-5000 自动血流变测试仪(北京寒科希特科技发展有限公司),TE2000-S 型 Nikon 倒置荧光相差数码相机显微镜,KM2255 型全自动石蜡切片机,TP1020 型全自动生物组织脱水机,EG1140 型石蜡包埋机,5010 型全自动染色机(均为德国徕卡公司),BX50 型生物显微镜(日本奥林巴斯),YABO200 型漂烘片机(中国雅博公司),MIAS 型医学图像分析管理系统(中国北航公司),560CA 型全自动多功能血小板检测仪(美国 Chrono-log 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** Ca 注射液用无热源生理盐水配制成,水浴溶解,质量浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;LPS 注射液用无热源生理盐水配制成,质量浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大鼠 ip Ca ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )16 h 后,再尾静脉注射 LPS( $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),此时作为实验的 0,24 h 后大鼠尾部出现淤血现象为模型建立成功。

**2.2 分组与给药** 将 SD 雄性大鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,即空白对照组,模型对照组,脉络宁低剂量组,脉络宁中剂量组,脉络宁高剂量组。脉络宁各剂量组分别 ip  $3.75, 15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每天

1次,连续给药14d;空白对照组和模型对照组ip等容积的生理盐水,每天1次,连续14d。给药到12d,模型组和脉络宁各剂量组的大鼠,按上述造模方法造模。空白对照组腹腔注射等容积的生理盐水16h后,尾静脉注射等容积的无热源生理盐水。给药第14天,各组处死前禁食12h,自由饮水,10%水合氯醛麻醉大鼠,从腹主动脉取血,分别于非抗凝的离心管、肝素钠抗凝和枸橼酸钠抗凝的血液生化管存放,取材(肝脏、脾脏)。

### 2.3 检测指标测定

**2.3.1 生化指标测定** 非抗凝的离心管中的动脉血,离心( $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,15 min)取血清,采用竞争性抑制法检测IL-6和固相夹心法检测TNF- $\alpha$ ,按酶联免疫分析试剂盒说明书操作。

**2.3.2 血液流变学和凝血指标测定** 动脉血分别存放于肝素钠抗凝和枸橼酸钠抗凝的血液生化管中,将血样送往广州中医药大学第一附属医院检验科检测全血黏度,血浆黏度,血浆凝血酶原时间和血小板聚集率(采用比浊法)。

**2.4 组织病理学检查** 将大鼠的肝脏和脾脏,放入10%的甲醛中保存,将组织送往广州中医药大学第一附属医院病理科做病理切片和检查。

**2.5 统计学处理** 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件处理,组间采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对热毒血瘀大鼠生化指标的影响** 与空白对照组比较,模型对照组的IL-6和TNF- $\alpha$ 含量都增加( $P<0.01$ ),而脉络宁中剂量组的IL-6含量和低剂量组的TNF- $\alpha$ 含量都减少( $P<0.05$ );与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的IL-6和TNF- $\alpha$ 的含量都减少( $P<0.05$ ),见表1。

表1 脉络宁注射液对热毒血瘀大鼠的

IL-6和TNF- $\alpha$ 影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

$\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-6	TNF- $\alpha$
空白对照	-	$3.46\pm 0.33$	$1.79\pm 0.18$
模型对照	-	$4.52\pm 0.70^{2)}$	$3.12\pm 0.89^{2)}$
脉络宁	3.75	$3.83\pm 0.31^{3)}$	$2.29\pm 0.43^{1,3)}$
	7.5	$3.68\pm 0.37^{1,3)}$	$2.06\pm 0.44^{3)}$
	15	$3.48\pm 0.61^{3)}$	$1.80\pm 0.15^{3)}$

**3.2 脉络宁注射液对热毒血瘀大鼠的血液流变学和凝血4项影响** 与空白对照组比较,模型对照组的全血黏度、血浆黏度、血浆凝血酶原时间和血小板聚集率都增加( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的全血黏度都降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),以及脉络宁高剂量组血浆黏度和血小板聚集率都降低( $P<0.05$ ),脉络宁高剂量组血浆凝血酶原时间都增加( $P<0.05$ ),见表2。

表2 脉络宁注射液对热毒血瘀大鼠的全血黏度、血浆黏度、血浆凝血酶原时间和血小板聚集率影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	全血黏度/ $\text{mPa}\cdot\text{s}$			血浆黏度 $/\text{mPa}\cdot\text{s}$	血浆凝血 酶原时间/ $\text{s}$	血小板聚集率 $/\%$
		$3\ \text{s}^{-1}$	$30\ \text{s}^{-1}$	$200\ \text{s}^{-1}$			
空白对照	-	$9.16\pm 1.16$	$4.56\pm 0.52$	$3.78\pm 0.44$	$1.27\pm 0.03$	$9.03\pm 0.21$	$58.43\pm 15.82$
模型对照	-	$12.33\pm 1.46^{1)}$	$6.15\pm 0.72^{1)}$	$5.08\pm 0.62^{1)}$	$1.38\pm 0.02^{2)}$	$7.73\pm 0.40^{2)}$	$65.83\pm 14.91^{2)}$
脉络宁	3.75	$8.63\pm 1.02^{3)}$	$5.18\pm 0.33^{3)}$	$4.26\pm 0.23^{3)}$	$1.35\pm 0.02$	$7.70\pm 0.50$	$64.10\pm 13.80$
脉络宁	15	$8.63\pm 1.27^{4)}$	$4.72\pm 0.66^{4)}$	$3.58\pm 0.53^{4)}$	$1.34\pm 0.08$	$8.10\pm 1.47$	$63.33\pm 15.07$
	30	$8.36\pm 3.97^{3)}$	$3.75\pm 0.45^{3)}$	$3.30\pm 0.30^{3)}$	$1.30\pm 0.05^{3)}$	$8.66\pm 0.40^{3)}$	$62.32\pm 19.73^{3)}$

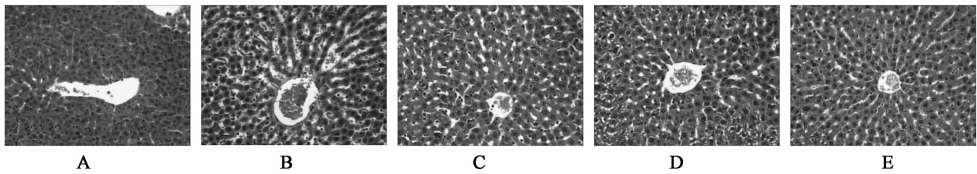
**3.3 对热毒血瘀大鼠的组织病理观察** 肉眼观察肝、脾脏均有不同程度的肿胀、瘀血、出血,肝、脾表面呈暗紫色。光镜观察图1结果显示:肝脏:与空白对照组比较,模型对照组肝炎性细胞浸润较多,静脉高度淤血,肝细胞混浊肿胀、胞浆疏松;与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的肝脏的炎性细胞浸润相应减少,淤血和血栓情况相应减缓,呈量效依赖变化。

图2结果显示:脾脏:与空白对照组比较,模型对照组红髓内脾窦和白髓小血管高度淤血,见少数

微血栓,骨髓部淋巴细胞增生和浸润较多;与模型对照组比较,脉络宁各剂量组的脾脏的淤血相应减缓,淋巴细胞增生和浸润相应减少,呈量效依赖变化。

## 4 讨论

中医理论认为内毒素应属于热邪、毒邪因素,本研究是通过角叉菜胶和脂多糖联合作用制成的热毒血瘀模型<sup>[2]</sup>,使其有更明显血栓和血瘀表现,与在临床上甚为常见的热毒亢盛而导致血瘀者的热毒血瘀证比较相似,其机制符合中医学中外感温毒疫邪后邪毒灼伤津血,血受熏灼则凝结瘀塞,从而致热



A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. 脉络宁 3.75 mg·kg<sup>-1</sup>; D. 脉络宁 7.5 mg·kg<sup>-1</sup>; E. 脉络宁 15 mg·kg<sup>-1</sup>组(图2同)  
图1 脉络宁注射液对热毒血瘀大鼠的肝脏组织形态的影响(HE, ×200)

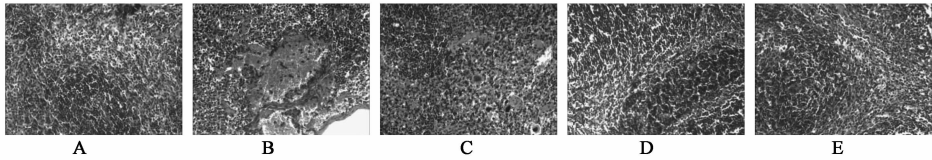


图2 脉络宁注射液对热毒血瘀大鼠的脾脏组织形态的影响(HE, ×200)

毒血瘀的观点。从中医的观点来说,“毒邪”包括外来毒邪和内生毒邪, LPS/Ca 血栓模型所使用的内毒素为外来之毒, 作用于机体以后产生内源性的炎性因子以及血栓素等对机体有害的物质, 属于内生毒邪。本模型提供直接的证据证明了“毒邪”是血栓形成的直接致病因素<sup>[3]</sup>, 因此在其的治疗中必须加入驱除“毒邪”(抗炎)的措施。

血清 IL-6 作为一个重要的炎性因子, 在炎症反应、抗感染及损伤等过程中发挥多种生物学作用<sup>[4]</sup>, TNF- $\alpha$  是炎症反应中起主导作用的炎性因子, 可导致血管损伤和血栓形成<sup>[5]</sup>。本研究结果表明, 与空白对照组比较, 模型对照组的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量增加 ( $P < 0.05$ ), 全血黏度、血浆黏度和血小板聚集率都增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 血浆凝血酶原时间缩短 ( $P < 0.01$ ), 还有其肝脏和脾脏都有比较明显的炎症和淤血症状, 由此可知 LPS/Ca 诱导的“热毒血瘀证”模型建立成功。与模型对照组比较, 脉络宁各剂量组的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量都相应减少 ( $P < 0.05$ ), 全血黏度、血浆黏度和血小板聚集率都降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 血浆凝血酶原时间增长 ( $P < 0.01$ ), 且呈量效依赖变化, 还有其肝脏

和脾脏都有比较明显的炎症和淤血症状有一定的改善。综上所述, 脉络宁注射液对 LPS/Ca 诱导的“热毒血瘀证”模型有一定治疗效果, 可为热毒血瘀证临床治疗提供实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 赵庭勇. 温病热毒血瘀证证治浅探[J]. 湖北中医杂志, 2010, 32(6): 58.
- [2] 梁爱华, 丁晓霜, 李文, 等. 血瘀证与血栓形成病证结合动物模型的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1613.
- [3] 梁爱华, 黄璐琦, 于长安, 等. LPS/Ca 诱导血栓形成与血瘀证病证结合模型的炎症机制[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 45.
- [4] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23(1): 21.
- [5] Miller A M, McPhaden A R, Preston A, et al. TNF alpha increases the inflammatory response to vascular balloon injury without accelerating neointimal formation [J]. Atherosclerosis, 2005, 179(1): 51.

[责任编辑 聂淑琴]