清营汤对内毒素致热家兔的作用及其机制

徐向东[1], 赵珠祥[2], 赵海霞[1*]
(1. 山东省中医院, 济南 250011; 2. 胜利石油管理局河口医院, 山东 东营 257200)

[摘要] **目的**:探讨清营汤对内毒素发热家兔的作用及其机制。**方法**:将 48 只新西兰大白兔随机分为空白组、模型组、清营汤低、高剂量组(10,20 $g \cdot kg^{-1}$),造模前,空白、模型两组分别 ig 等量生理盐水,清营汤低、高剂量组分别 ig 不同剂量药物,每日 1 次,连续 5 d,第六日,除空白组外,其余 3 组分别通过耳缘静脉注入大肠杆菌内毒素方法复制发热家兔模型,观察各组动物症状及体温变化;采用放免法测定血浆血栓素 B_2(TXB_2)、6-酮-前列腺素 F1α(6-keto-PGF1α)及血清肿瘤坏死因子(TNF-α)的含量;采用发色底物法测定血浆组织纤溶酶原激活物(t-PA)和组织纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)的活性。**结果**:与空白组相比,模型组家兔体温,TXB_2,TNF-α,PAI 显著上升($P<0.01$),6-keto-PGF1α,t-PA 显著下降($P<0.01$);与模型组相比,清营汤高、低剂量组家兔体温,TXB_2,TNF-α,PAI 明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),6-keto-PGF1α,t-PA 明显上升($P<0.05$ 或$P<0.01$)。清营汤高、低剂量均对内毒素性发热家兔有显著的解热效应($P<0.05$ 或 $P<0.01$),均可明显抑制发热家兔 TNFα,TXB_2 的含量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),降低 PAI 的活性($P<0.01$),提高 6-keto-PGF1α 的含量和 t-PA 的活性($P<0.01$)。**结论**:清营汤对内毒素性发热家兔有解热化瘀的作用,可能通过抑制发热家兔致热性细胞因子的释放,调节血管内皮细胞的分泌功能而发挥其解热化瘀的作用。

[关键词] 内毒素; 发热; 清营汤; 家兔
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0220-04
[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0909.005.html
[网络出版时间] 2012-10-12 9:09

The Effect and Mechanism of the Qingying Decoction on Endotoxin Induced Fever in Rabbits

XU Xiang-dong[1], *ZHAO Zhu-xiang*[2], *ZHAO Hai-xia*[1*]
(1. *Shandong University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital*, *Ji'nan* 250011, *China*;
2. *Shengli Oilfield Hekou Hospital*, *Dongying* 257200, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect and mechanism of Qingying decoction on endotoxin fever in rabbits. **Method**: First, rabbit fever model was established by Escherichia coli endotoxin. Then rabbits were treated with Qing Ying decoction high dose, low dose to observe the animals symptoms and changes of body temperature; and tumor necrosis factor (TNF-α) content in serum, thromboxane B_2 (TXB_2) and 6-ketone-prostaglandin F1 alpha (6-keto-PGF1α) levels were measured in plasma by radioimmunoassay, and, and plasma tissue plasminogen activator (t-PA), and tissue plasminogen activator inhibitor (PAI) activity were determined by chromogenic substrate method. **Result**: Qingying decoction of both high dose group and low dose group had a significant antipyretic effect on endotoxin fever in rabbits ($P<0.01$), could markedly inhibit TNF-α, TXB_2 levels

[收稿日期] 20120523(003)
[基金项目] 山东省自然科学基金(Y2006C113)
[第一作者] 徐向东,主管药师,硕士,从事中药新药开发及中药炮制原理的研究,Tel:13793188391,E-mail: zhengsanxiasd@126.com
[通讯作者] * 赵海霞,主任药师,博士后,从事中药新药开发及中药炮制原理的研究,Tel: 13793188011,E-mail: zhaohx1115@126.com

($P<0.05$ or $P<0.01$) and lower PAI activity ($P<0.01$), increase 6-keto-PGF1α content and t-PA activity ($P<0.01$) in fever rabbits. **Conclusion**: Qingying decoction has antipyretic circulation effect on endotoxin fever in rabbits. It may play the role of antipyretic circulation by inhibiting the release of pyrogenic cytokines and regulating the secretory function of vascular endothelial cells in febrile rabbits.

[**Key words**] endotoxin; fever; Qingying decoction; rabbit

清营汤是治疗温病营分证的代表方,应用于临床具有明显的清营泄热,活血化瘀之效应,常用于乙型脑炎、流行性脑脊髓膜炎、败血症或其他热性病证属热入营分者。本实验在成功复制发热家兔模型基础上,观察内毒素致热家兔模型的作用及机制。

1 材料

1.1 药物 清营汤(《温病条辨》)药物组成:水牛角 30 g,玄参 9 g,麦冬 9 g,黄连 5 g,连翘 6 g,生地黄 15 g,竹叶心 3 g,丹参 6 g,银花 9 g。以上药物均购自山东省中医院,并经本校中药鉴定教研室鉴定。药物先用冷水浸泡 0.5 h,其中水牛角须先煎 30 min。全方煎煮 0.5 h 后,滤出药汁,药渣加入清水再煎 15 min过滤取汁,将两次所滤药液混合后过滤并浓缩,然后用 60% 醇沉 24 h 后再过滤一次,浓缩至生药与药液之比为 1∶1时即可。所有药物的家兔用量按人和动物间等效剂量换算方法折算[1],得出家兔的清营汤等效剂量为 5 $g \cdot kg^{-1}$。

1.2 动物 普通级新西兰白兔 32 只,雌雄各半,体重 1.5 ~2.5 kg,由山东省农业科学院动物实验室提供,许可证号 SCXK(鲁)20040013。

1.3 试剂与仪器 大肠杆菌内毒素(ET, *Escherichia coli* 0127:B8)购于 Sigma Aldrich 公司;血清型:0127:B8,用前以生理盐水稀释成 5 $\mu g \cdot mL^{-1}$的溶液。6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGFI)、血栓素 B_2(TXB_2)试剂盒,中国人民解放军总医院科技开发中心放免所提供(批号 20070326) 血浆组织纤溶酶原激活物(t-PA)和组织纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)试剂盒(福建太阳生物技术公司)。标准温度计,上海医用仪表厂;微量移液器,德国艾本德(eppendorf); DDL-5 低温离心机,上海安亭科学仪器厂生产;MDF-D5410 三洋低温冰箱,日本三洋公司生产; 381MC 型酶标仪,上海三科仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模与体温测定 将 32 只家兔随机分为正常组、模型组、清营汤高剂量组、清营汤低剂量组,每组各 8 只。适应性喂养 1 d。造模前 24 h 将动物置于家兔固定箱内,测温时将涂有石蜡油的体温计,插入直肠内待动物稳定后记录体温,每隔 30 min测温 1 次,取 3 次的均值作为家兔基础体温。取平均数进行统计处理,条件齐同者纳入实验程序。第 3 天,清营汤高剂量组、低剂量组(20, 10 $g \cdot kg^{-1}$)分别以等效剂量 4 倍、2 倍的药物 ig 1 次,正常组、模型组灌等量生理盐水,连续 5 d,第 7 晚喂饲后各组禁食禁水。第 8 天,除正常组外,其余各组动物皆按照文献方法进行造模[2],即后两组每只动物由耳缘静脉注入大肠杆菌内毒素液 200 $\mu g \cdot kg^{-1}$,正常组注入等量生理盐水。观察各组动物的耳、皮肤、结膜、舌、渴饮、摄食、神志及全身状态等的变化情况。观察各组动物分别于造模后 5h 内体温,每 0.5 h 各测定肛温一次。体温测试采用 ST-1 型数字体温计(上海医用仪表厂)。观察 3 h 温差(ΔT_3 = 体温上升的最高值一基础体温值)及 5 h 体温指数(TRI_5 = 体温变化曲线下面积)。

2.2 检测指标 5 h 后由颈动脉采血,取 4 mL 血,加入 2% EDTA-Na_2 抗凝的试管中,颠倒摇匀后置于 4 ℃ 3 000 $r \cdot min^{-1}$的离心机中离心 10 min,吸取上层血浆,保存于 −70 ℃ 冰箱中,按试剂盒说明书测定血浆 6-酮-前列腺素 F1a(6-keto-PGF1α)和血栓素 B_2(TXB_2)含量。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的检测均采用双抗体夹心 ELlSA 法。

2.3 统计方法 实验数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,$P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 症状与体征 模型组动物在造模后 30 min 至 1 h 左右开始发热,并出现耸毛、发抖、蜷缩;2 h 后模型组体温明显上升,呼吸急促,部分家兔出现稀便;3 h 体温达到最高点,大部分家兔出现呼吸困难,口唇紫绀,结膜充血,精神萎靡,瘫卧或抽搐惊跳,舌质紫暗或呈紫灰色,但结膜及皮下未见出血点及瘀斑,耳缘注射处也未见出血。清营汤低剂量组家兔上述表现不如模型组严重,仍可见呼吸急促,心跳加快,舌质偏红;清营汤高剂量组家兔可见呼吸急促、精神差,但无心跳快、结膜充血及舌质偏红。正常组家兔均未见上述异常表现。

3.2 对内毒素致热家兔体温的影响 除正常组外,

其余各组在 0.5 h 后体温逐渐上升,在 3 h 左右达最高值;与正常组相比较,模型组家兔体温明显升高($P<0.01$),即内毒素有致热作用;与模型组相比较,清营汤高、低剂量组均能显著降低发热家兔体温指数($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 1。

3.3 对内毒素致热家兔 TXB_2, 6-keto-PGF1α, TNF-α 水平影响 与正常组相比,模型组 TXB, TNF-α 明显升高($P<0.01$),6-keto-PGFla 明显下降($P<0.01$)。清营汤高、低剂量组 TXB, TNF-α 明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),6-keto-PGFla 明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),尤以清营汤高剂量组作用明显。见表 2。

表 1 清营汤对内毒素性发热家兔体温 $\Delta T3$ 及 TRI5 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/g·kg^{-1}	ΔT_3/℃	TRI_5/cm^2
正常	–	0.26 ± 0.02	8.27 ± 3.40
模型	–	$1.78\pm0.26^{2)}$	$53.26\pm17.33^{2)}$
清营汤	10	$1.22\pm0.21^{2,3)}$	$26.07\pm4.54^{2,3)}$
	20	$0.64\pm0.31^{1,3)}$	$15.07\pm5.64^{1,4)}$

注:与正常组相比$^{1)}$ $P<0.05$, $^{2)}$ $P<0.01$;与模型组相比$^{3)}$ $P<0.05$, $^{4)}$ $P<0.01$(表 2~3 同)。

表 2 清营汤对内毒素性发热家兔血浆 TXB_2, 6-keto-PGF1α, TNF-α 水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量 /g·kg^{-1}	TXB2 /ng·L^{-1}	6-keto-PGF1α /ng·L^{-1}	TNF-α /μg·L^{-1}
正常	–	110.2 ± 16.5	174.1 ± 123.1	6.3 ± 1.4
模型	–	$419.0\pm67.0^{2)}$	$70.0\pm53.9^{2)}$	$22.2\pm2.1^{2)}$
清营汤	10	$289.2\pm54.9^{2,3)}$	$101.9\pm23.7^{2,3)}$	$14.6\pm2.7^{2,3)}$
	20	$185.7\pm36.6^{1,4)}$	$136.4\pm45.9^{1,4)}$	$10.5\pm1.9^{1,4)}$

3.4 对 t-PA 和 PAI 活性的影响 与正常组相比,模型组 t-PA 显著下降($P<0.01$),PAI 显著升高($P<0.01$),清营汤高、低剂量组均能提高 t-PA,降低 PAI,尤以高剂量组作用明显。见表 3。

表 3 清营汤对 t-PA 和 PAI 活性的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/g·kg^{-1}	t-PA/U·mL^{-1}	PAI/mg·L^{-1}
正常	–	1.39 ± 0.15	8.72 ± 0.35
模型	–	$0.51\pm0.18^{2)}$	$18.86\pm0.91^{2)}$
清营汤	10	$0.81\pm0.29^{3)}$	$13.76\pm1.01^{3)}$
	20	$1.18\pm0.20^{4)}$	$10.80\pm0.81^{4)}$

4 讨论

营分证是温病发展一个重要阶段,是以营热炽盛,耗伤阴液为其病机特点。温病发展至营分,热毒炽盛,煎灼津液,脉道失充,血行不畅,导致血瘀[3]。研究表明,TNF-α 是一种内生致热原[4],可直接刺激体温调节中枢或间接诱导巨噬细胞分泌大量 IL-l 引起发热[5]。

研究表明,血管内皮细胞可分泌众多活性物质如 TXB_2, 6-Keto-PGF1α, t-PA 和 PAI 等[6],血瘀证的病理改变基础可能与血管内皮细胞损伤密切相关[7-8]。内毒素[9]可直接损伤血管内皮细胞,血管内皮细胞损伤后合成、分泌纤溶物质 t-PA 减少,而其相对应的抗纤溶活性物质 PAI 合成、分泌增多,导致循环血液中 t-PA 和 PAI 活性平衡的失调,从而激活了促凝系统;同时损伤的内皮细胞可激活血小板,促使 TXB_2 释放增加,6-keto-PGF1α 生成减少,则 TXB_2/6-keto-PGF1α 平衡失调,促发血小板再聚集,甚至形成动脉性血栓[10]。

本实验研究结果显示:模型组 TNF-α 明显升高,说明内毒素可以导致血管内皮损伤并导致家兔发热;TXB_2 明显升高,6-keto-PGF1α 降低,说明内皮损伤导致 TXB_2/6-keto-PGF1α 平衡失调,促进血小板再聚集,凝血倾向增加;t-PA 活性降低,PAI 活性增高,说明循环血液中纤溶系统平衡的失调,导致血液凝固。清营汤组均能明显抑制 TNF-α, TXB_2 的含量升高($P<0.05\sim P<0.01$),降低 PAI 的活性($P<0.01$),提高 6-keto-PGF1α 的含量和 t-PA 的活性($P<0.01$),说明清营汤是通过减少 TNF-α 的释放,减少对体温中枢的刺激来达到解热效应的,通过调节纤溶系统及 TXB_2/6-keto-PGF1α 平衡,抑制血液的凝固来达到活血化瘀的作用。

本实验研究结果表明,清营汤对内毒素致热家兔有解热化瘀的作用,可能通过抑制发热家兔致热性细胞因子的释放[11],调节血管内皮细胞的分泌功能而发挥其解热化瘀的作用。

[参考文献]

[1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2005:202.
[2] 杨爱东,沈庆法,郭永洁,等. 清热化瘀方对内毒素血症家兔细胞因子的影响[J]. 中国中医急症,2005,14(12):1199.
[3] 郭选贤,刘俊芳,张华锴. 温病卫分证辨证规律初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):278.
[4] 刘妍,张平,李明,等. 补肾方对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠 T 辅助细胞 1,17 和调节性 T 细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):116.

士的宁对多巴胺能神经元的保护作用

杨洋[1],周德生[2*],Wolf-Dieter RAUSCH[3],黄政德[1],胡华[2], 柯立芝[1]
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院神经内科 长沙 410007;
3. Department of Biomedical Sciences Veterinary Medical University Vienna Veterinaerplatz,
1 A-1210 Vienna, Austria)

[摘要] **目的**:选择 2 种神经毒物 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP^+)和谷氨酸在体外诱导多巴胺能神经元退行性损伤,并检测士的宁对此细胞的药理毒理作用,及对其退行性损伤的协同作用或拮抗作用。**方法**:采用孕 14 d 小鼠,取出胎鼠中脑,分离出多巴胺能神经元,调整细胞密度 7.5×10^5/mL,于 5% CO_2,37 ℃,100% 湿度条件培养,于体外培养的第 10 天分别加入士的宁 0.1, 1, 5, 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$,MPP^+ 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$,谷氨酸 500 $\mu mol\cdot L^{-1}$作用 48 h,第 12 天染色。选取细胞数,神经元树突长度和数量作为观察指标,并做出分析。**结果**:士的宁对未损伤的多巴胺能神经元在 48 h 培养过程中无毒性影响。在 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$士的宁作用下,多巴胺能神经元数量明显高于对照组($P<0.05$);在 5 ~ 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$士的宁作用下,树突数量与对照组相比也有明显提高($P<0.05$)。士的宁(10 $\mu mol\cdot L^{-1}$)和 MPP^+ 共同培养 48 h 后,细胞计数明显高于 MPP^+ 单独培养组($P<0.05$);这种保护作用更为明显的表现在细胞形态学变化方面,在 10 $\mu mol\cdot L^{-1}$的士的宁剂量下,神经树突长度明显高于 MPP^+ 单独培养组($P<0.05$);神经树突的数量在 5 $\mu mol\cdot L^{-1}$士的宁作用下与 MPP^+ 单独培养组相比有明显增加($P<0.05$)。在对谷氨酸(500 $\mu mol\cdot L^{-1}$)诱导的神经元损伤模型中,与谷氨酸组相比,10 $\mu mol\cdot L^{-1}$的士的宁对所有的观察指标的数值都有递增影响 ($P<0.05$)。**结论**:首次证实士的宁具有可在体外刺激中脑分离出的多巴胺能神经元的生长,并且对此神经元退行性损伤有保护作用。

[关键词] 士的宁; 1-甲基-4-苯基吡啶离子; 谷氨酸; 神经退行性病变; 神经保护
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0223-05
[网络出版地址] http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0908.001.html
[网络出版时间] 2012-10-12 9:08

Protective Effect of Strychnine on Dopaminergic Neurons

YANG Yang[1], *ZHOU De-sheng*[2*], *Wolf-Dieter RAUSCH*[3], *HUANG Zheng-de*[1], *HU Hua*[2], *KE Li-zhi*[1]
(1. *Hunan University of Traditional Chinese Medicine* (*TCM*), *Changsha* 410007, *China*;

[收稿日期] 20120606(010)
[基金项目] 中国奥地利合作项目(CN:18/2007)
[第一作者] 杨洋, 博士生, 医师, 从事神经系统疾病的中西医结合防治研究, Tel:13508485937, E-mail:antonyyangoo1@126.com
[通讯作者] * 周德生, 博士, 主任医师, 教授, 从事神经系统疾病的中西医结合防治研究, Tel:13755102347, E-mail:Zds1101@tom.com

[5] 陈聪,马成,肖璐. 柴胡葛根配伍对发热大鼠体温和血清 IL-1β 含量、MPO 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 207.
[6] 韩东,廖福龙,李文,等. 补阳还五汤及拆方对血栓形成大鼠梗塞灶、血管损伤半暗区、血浆 t-PA、PAI 活性及 ET 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(2): 21.
[7] 吴朝栋,李鸣真,龚非力. 内毒素诱生的细胞因子及其作用研究进展[J]. 国外医学:免疫学分册,1995, 12 (1):11.
[8] 黄芬,刘沛. 肿瘤坏死因子在急性感染性疾病中的研究进展[J]. 中国实用内科杂志,1994,14(3):171.
[9] 张顺财. 内毒素基础与临床[M]. 北京:科学出版社, 2003:76.
[10] Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice[J]. Prog Lipid Res,2000,39:289.
[11] 梁卫,蔡鹰,张丽玲,等. 清热化瘀滋阴方对狼疮患者外周血淋巴细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):116.

[责任编辑 聂淑琴]