

清营汤对营热阴伤证动物模型的作用及其机理

翟玉祥, 卞慧敏, 杨 进, 马 健, 龚婕宁, 刘学风

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

摘要: 为探讨清营汤治疗温病营分证的作用及其机理。用地塞米松、速尿和大肠杆菌内毒素复制“营热阴伤证”家兔模型, 以清营汤治疗后, 观测体温、血液流变性、凝血指标、脑脊液肌磷酸激酶(CK)、血浆超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化脂质(MDA)、血清电解质等的变化。结果显示, 清营汤能显著抑制模型兔体温上升、全血黏度增高和血小板数减少, 降低血小板聚集率, 使缩短的 PT 延长, 抑制体外血栓的形成, 提高组织纤溶酶原激活物(t-PA)含量, 减少纤溶酶原激活抑制物(PAI)含量, 提高 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 调节血清电解质浓度。表明清营汤具有多方面的药理作用, 包括调节体温, 降低血液黏度及血小板聚集能力, 调节凝血和纤溶机能, 提高机体抗过氧化能力, 抵御自由基的损伤, 并能维护体内电解质的稳定。

关键词: 清营汤; 营热阴伤证; 血液流变学; t-PA/PAI; 血清 Na^+ K^+

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)05-0053-04

清营汤是治疗温病营分证的代表方, 为了进一步探讨该方的作用及其机理, 本文在成功复制实验性家兔营热阴伤证动物模型的基础上, 观察了清营汤对实验性营热阴伤证家兔的作用。并对其机理进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂 清营汤(《温病条辨》)药物组成: 水牛角 30g 玄参 9g 麦冬 9g 黄连 5g 连翘 6g 生地 15g 竹叶心 3g 丹参 6g 银花 9g。增液汤: 生地 15g 玄参 9g 麦冬 9g。以上药物均购自南京市药材公司, 并经本校中药鉴定教研室鉴定。药物先用冷水浸泡 0.5h, 其中水牛角须先煎 30min。全方煎煮 0.5h 后, 滤出药汁, 药渣加入清水再煎 15min 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 24h 后再过滤一次, 浓缩至生药与药液之比为 1:1 时即可。

地塞米松磷酸钠注射液, 无锡市第四制药厂出品, 批号为: 941103。速尿(呋喃苯胺酸注射液), 无锡市第七制药厂出品, 产品批号为: 940529。Sigma 公司产精制大肠杆菌内毒素(LPS), 血清型: 0127:B8, 用前以生理盐水稀释成 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

1.2 实验动物 健康大耳白家兔 40 只, 体重 2~2.5kg, 雌雄不拘, 雌兔不孕, 由南京中医药大学实验动物中心提供。

1.3 实验方法 将 40 只家兔随机分为对照组、模型组、清营汤组和增液汤组, 每组各 10 只。适应性喂养 2d。造模前分别连续测定肛温三次, 每次间隔 1h, 连续 3d。取平均数进行统计处理, 条件齐同者纳入实验程序。除对照组外, 其余各组动物皆按照文献方法进行造模^[1], 即以地塞米松每日 2.5mg/kg 后肢肌肉注射, 对照组注以等量生理盐水, 连续 7d。第 3d 起, 清营汤组、增液汤组动物分别以等效剂量 5 倍的药物灌胃(清营汤 17.6g/kg, 增液汤 6.3g/kg), 对照组和模型组则以同量的生理盐水代替, 连续 5d。第 7d 晚喂饲后各组皆禁食禁水。第 8 天模型组和清营汤组皆由后肢肌肉注射速尿 2.5mL/kg, 2h 后, 经耳缘静脉缓缓注入 LPS 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在注射 LPS 前及其后 1 2 3 4 5h 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 3h 温差(Δ_3)及 5h 发热指数(TRI_5)的变化, Δ_3 为注射 LPS 后 3h 家兔体温与其基础体温的差值, TRI_5 指 5h 发热曲线与基线间的面积, 参照 1983 年全国高等医药院校协作教材《病理生理学实验指导·发热》所载方法计算。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。5h 后由颈动脉采血并抽取脑脊液检测有关指标, 随后处死所有动物, 采集组织标本。

全血黏度和血浆黏度用成都产 NXE-1 型锥板式黏度计测定。血沉、红细胞压积用温氏管法测定。体外血栓检测用 XX-3 型血栓检测仪(上海医科大学研制, 南汇林青医学仪器厂生产)按翁氏方法^[2]测

定。凝血酶原时间(PT)、白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)用上海华山医院提供的试剂盒和方法进行测定。血浆纤维蛋白原(Fg)测定按文献^[3]的方法略加改进。血小板计数(BPC)用兔颈动脉放血的方法,用毛细管取血 20μL,加入血小板稀释液中,用直接计算法进行计数。血小板聚集试验(PAgT)用塑料试管自兔颈动脉取血 1.8mL,加 3.8% 枸橼酸钠 0.2mL 抗凝,1000rpm 离心 5min,吸取上层富血小板血浆(PRP,血小板计数在 18~20 万/mm³之间)待测。再将所剩血液 3000rpm 离心 10min,吸取上清液为贫血小板血浆(PPP)。以 ADP(最终浓度为 2nmol/L)为诱导剂,按文献方法^[4],用镇江科达仪器厂生产的 KD-200 型血小板聚集仪测定血小板聚集率。组织纤溶酶原激活物测定(t-PA)和纤溶酶原激活抑制物测定(PAI)采用福建太阳生物技术公司提供的试剂盒和测试方法。脑脊液肌磷酸激酶(CK)、血浆 SOD 和 MDA 浓度测定采用南京建成生物工程公司提供的试剂盒和方法进行检测。

表 1 注射 LPS 5μg/kg 后各组家兔温差(Δ₃)及 5h 发热指数(TRI₅)比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	Δ ₃	TRI ₅
对照组		9	0.246 ± 0.023	7.268 ± 3.401
模型组		9	1.633 ± 0.269 ⁴⁾	55.261 ± 17.334 ⁴⁾
清营汤组	17.6	10	0.706 ± 0.065 ^{2, 4)}	16.573 ± 4.377 ²⁾
增液汤组	6.3	10	0.965 ± 0.275 ^{2, 4)}	34.194 ± 13.657 ^{2, 4)}

注:与模型组相比¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与对照组相比³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(下同)

2.2 清营汤对模型家兔血小板数量及聚集功能的影响 造模后血小板数量明显减少,血小板聚集功

1.4 数据处理 所有实验数据皆由计算机数理统计软件包进行处理。组间差异采用方差分析,各组间两两比较采用 Newmar-Keuls 检验。

2 结果

2.1 症状与体征 注射地塞米松后,各组家兔体温皆有不同程度的升高,体重略有减轻,注射速尿后小便增多;注射 LPS 30min 左右,各组家兔开始发热,并出现耸毛、蜷缩;2h 后模型组体温上升最为明显,呼吸急促,部分家兔出现稀便;3h 左右,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。清营汤组大部分家兔比较清醒、活跃,舌质未见明显异常。增液汤组家兔上述表现虽不如模型组严重,但仍可见到呼吸急促、精神委顿及结膜轻度充血,舌质偏红。正常组家兔均未见上述异常表现。温差(Δ₃)及 5h 发热指数(TRI₅)见表 1。

能增强。清营汤能增加模型家兔血小板数量,抑制血小板聚集率,增液汤亦有相同作用,见表 2。

表 2 各组家兔血小板计数(BPC)及血小板聚集率(PAgT)比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	BPC(万/mm ³)	PAgT(%)	
				1min	Max
对照组		10	28.650 ± 2.688	28.854 ± 12.735	25.046 ± 11.905
模型组		9	8.550 ± 1.092 ⁴⁾	27.023 ± 8.369	41.773 ± 5.481 ⁴⁾
清营汤组	17.6	10	25.300 ± 2.058 ²⁾	29.795 ± 9.577	27.994 ± 8.827 ¹⁾
增液汤组	6.3	10	22.500 ± 2.593 ²⁾	28.932 ± 12.044	27.592 ± 9.779 ¹⁾

2.3 清营汤对凝血因子部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和纤维蛋白原(Fg)的影响 模型组 PT 明显缩短,Fg 明显减少,APTT 无明显变化。清

营汤能延长 PT,增加 Fg 的含量,增液汤亦具有类似作用,见表 3。

表 3 各组家兔 PT、APTT 和 Fg 比较表($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	PT(S)	APTT(S)	Fg(g/L)
对照组		10	9.600 ± 0.699	25.125 ± 1.808	4.529 ± 1.544
模型组		9	7.800 ± 1.398 ⁴⁾	25.250 ± 2.435	2.812 ± 0.546 ³⁾
清营汤组	17.6	10	9.441 ± 0.726 ²⁾	28.100 ± 3.604	4.368 ± 1.305 ¹⁾
增液汤组	6.3	10	9.100 ± 0.738 ¹⁾	25.800 ± 3.553	4.374 ± 1.216 ¹⁾

2.4 清营汤对模型家兔纤溶系统的影响 造模后 酶原激活抑制物(PAI)明显增加;清营汤、增液汤皆家兔组织纤溶酶原激活物(t-PA)明显减少,而纤溶可抑制 t-PA 的减少和 PAI 的增加,见表 4。

表 4 各组家兔血清 t-PA 和 PAI 比较表($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量(g/kg)	n	t-PA(IU/mL)	PAI(AU/mL)
对照组		10	1.065 ±0.191	7.958 ±0.276
模型组		9	0.829 ±0.106 ⁴⁾	8.612 ±0.594 ³⁾
清营汤组	17.6	10	1.008 ±0.143 ¹⁾	7.964 ±0.304 ²⁾
增液汤组	6.3	10	0.985 ±0.137 ¹⁾	8.002 ±0.424 ²⁾

2.5 清营汤对模型家兔全血及血浆黏度的影响 汤均能明显抑制模型家兔全血黏度和血浆黏度的升高,尤以增液汤作用更为显著,见表 5。
模型家兔高切、低切变率下的全血黏度和血浆黏度均明显升高,红细胞压积变化不明显。清营汤、增液

表 5 各组家兔全血和血浆比黏度比较表($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量(g/kg)	n	全血比黏度(mPa. s)		血浆比黏度	红细胞压积
			高切(384S-1)	低切(5.75S-1)	(mPa. s)	(%)
对照组		10	4.071 ±0.447	16.443 ±13.140	1.868 ±0.306	35.944 ±2.651
模型组		9	5.077 ±0.709 ³⁾	57.813 ±20.592 ⁴⁾	3.333 ±0.650 ⁴⁾	36.438 ±4.880
清营汤组	17.6	9	4.075 ±0.774 ¹⁾	22.932 ±16.090 ²⁾	2.303 ±0.644 ²⁾	35.000 ±3.000
增液汤组	6.3	9	4.240 ±0.493 ²⁾	17.272 ±11.976 ²⁾	1.984 ±0.409 ²⁾ ★	35.167 ±2.681

与清营汤组相比 ★*P* < 0.05

2.6 清营汤对模型家兔体外血栓形成的影响 造 抑制血栓的形成,增液汤虽亦能减轻血栓的湿重和模后家兔血栓湿重和干重明显增加,使用清营汤能干重但仍明显高于对照组,见表 6。

表 6 各组家兔体外血栓湿重和干重比较表($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量(g/kg)	n	湿重(g)	干重(g)
对照组		9	26.796 ±14.805	11.654 ± 6.096
模型组		9	77.971 ±14.519 ⁴⁾	29.109 ±10.324 ⁴⁾
清营汤组	17.6	10	32.138 ±17.964 ²⁾	14.392 ± 4.570 ²⁾
增液汤组	6.3	10	46.105 ±14.358 ^{2,3)}	19.357 ± 4.657 ^{2,3)}

2.7 清营汤对模型家兔脑脊液肌磷酸激酶(CK)、血浆超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化脂质产物丙二醛(MDA)含量的影响 模型家兔脑脊液 CK 活性 MDA 含量明显增加,SOD 活性显著下降;清营汤、增液汤组家兔脑脊液 CK 活性 MDA 含量明显下降,SOD 活性明显增加,但增液汤组 CK 活性仍显著高于对照组,见表 7。

表 7 各组家兔脑脊液 CK、血清 SOD 和 MDA 比较表($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量(g/kg)	n	CK(IU/L)	SOD(u/mL)	MDA(nmol/mL)
对照组		10	26.600 ±11.364	350.225 ±60.172	2.551 ±0.240
模型组		9	157.800 ±81.819 ⁴⁾	226.640 ±66.022 ⁴⁾	3.562 ±0.439 ⁴⁾
清营汤组	17.6	10	61.000 ±16.918 ²⁾	342.511 ±62.474 ²⁾	2.673 ±0.539 ²⁾
增液汤组	6.3	10	77.500 ±17.393 ^{2,3)}	325.550 ±77.894 ²⁾	2.904 ±0.505 ²⁾

2.8 清营汤对模型家兔血清电解质 Na⁺、K⁺ 含量的影响 造模后家兔血清 Na⁺、K⁺ 均显著减少,清营汤、增液汤组的血清 Na⁺、K⁺ 水平均有所恢复,见表 8。

2.9 脏器大体解剖及肺脏病理形态学观察 大体解剖发现,病理对照组家兔肺脏可见明显的瘀斑和少量散在出血点,部位犹以前部及下部为多;肝、脾饱满呈暗紫色;肾脏肿胀、色暗、肾包膜易剥离。清营汤组家兔大体观察与正常对照组相似,无明显异常变化。增液汤组动物虽没有模型组那样严重,但仍有明显的改变,其大部分家兔的肺脏可见少量瘀斑。

表 8 各组家兔血清电解质 Na⁺、K⁺ 含量比较表($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量(g/kg)	n	K ⁺ (mmol/mL)	Na ⁺ (mmol/mL)
对照组		9	4. 916 ± 0. 374	136. 900 ± 17. 616
模型组		9	3. 277 ± 0. 318 ⁴⁾	117. 300 ± 11. 412 ⁴⁾
清营汤组	17. 6	10	4. 583 ± 0. 444 ²⁾	134. 900 ± 9. 433 ²⁾
增液汤组	6. 3	10	4. 510 ± 0. 391 ^{2, 3)}	131. 600 ± 9. 594 ²⁾

光镜观察发现模型组肺脏病理改变显著,肺泡腔内可见炎性细胞浸润、血浆渗出、及泡壁塌陷;肺泡壁及间质内毛细血管和小血管瘀血、出血明显,并可见小血栓存在。增液汤组肺泡腔内偶见少量炎性细胞浸润和血浆渗出;肺泡壁及间质内仍可见少量毛细血管瘀血和微血栓形成。清营汤组家兔仅在肺泡壁毛细血管内偶见有少量瘀血,余无异常发现。对照组无明显异常变化。

3 讨论

营分证是温病病程发展的重要阶段,其病机以营热炽盛,耗伤营阴为特点。吴鞠通创制的清营汤是温病营分证治疗的代表方,不仅能“急清营中之热,而保高中之虚”。从实验结果可以看出,清营汤组家兔与模型组相比,发热程度明显较轻,一般情况良好,说明清营汤具有较好的清营泄热作用,并略优于增液汤。

体外血栓形成试验通过直观地在体外再现血栓的形成,综合地反映了血液凝固性的高低。从实验结果来看,清营汤组家兔无论是血栓的湿重还是干重皆显著低于模型组,以致与对照组之间无显著性差异,而增液汤虽可降低血栓的湿重和干重但与对照组相较仍有显著差异。其机理可能与清营汤能明显抑制血小板数量的下降和聚集能力的上升;能明显抑制模型家兔 PT 缩短,并能有效地抑制模型家兔血浆纤维蛋白原含量的降低有关。清营汤还能明显抑制血浆内 PAI 的活性,提高血浆 t-PA 的活性,从而调节并改善模型家兔体内的凝血和纤溶状态,这种对凝血和纤溶系统的调节作用可能是清营汤消散营分瘀血的重要机理之一。

模型组全血比黏度变化与红细胞压积不一致,可能与模型家兔红细胞聚集能力增加及红细胞消耗有关。清营汤可明显抑制模型家兔全血黏度的上升,其机理可能在于提高红细胞膜的变形能力,以及降低红细胞和血小板的聚集能力。血浆比黏度的高低与血液中多种蛋白质和脂类物质的浓度有关,模型组血浆比黏度升高而纤维蛋白原下降,但清营汤

能在抑制纤维蛋白原下降的同时降低血浆比黏度,其作用机理尚不清楚,有待进一步研究。

MDA 是自由基作用于游离或不饱和脂肪酸后形成的过氧化物,其含量高低能间接地反映自由基在体内的代谢变化,是了解自由基所致机体损伤程度的重要标志。模型家兔血清 MDA 含量增加, SOD 活力明显下降,反映了机体组织出现了严重的损伤。清营汤能显著降低血浆中 MDA 的含量,提高 SOD 的活力,提示其具有保护组织免受损伤的作用。脑脊液中 CK 的含量变化反映了中枢神经系统的损伤程度,它与营分证心营损伤的病理变化具有一定的联系。清营汤、增液汤组家兔脑脊液 CK 的活力明显低于模型组,其中清营汤组与对照组无明显差异,而增液汤与对照组之间差异显著,提示清营汤对中枢神经损伤的防治作用优于增液汤。

血清 K⁺、Na⁺ 的含量变化从一个侧面反映了该模型营分阴伤的病理实质。模型家兔血清 K⁺、Na⁺ 皆有所降低,而清营汤、增液汤均可抑制其降低,但增液汤组 K⁺ 的恢复程度略逊于清营汤组,提示清营汤具有较好的维护血清电解质含量稳定的作用。

综上所述,清营汤具有清热养阴、活血化瘀等多种效应,对实验性家兔营热阴伤证动物模型具有较好的防治作用,其作用机理是多方面的,包括调节模型动物的体温状态,降低血液黏度及血小板聚集能力,调节凝血和纤溶机能,提高机体抗过氧化能力,抵御自由基对组织的损伤,并能维护体内电解质代谢的稳定等。

参考文献:

[1] 翟玉祥,卞慧敏,杨进,等. 温病营热阴伤证动物模型的建立[J]. 中国中医基础杂志, 1998, 4(4): 42.
[2] 翁维良,廖福龙,吴云鹏. 血液流变学研究方法及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 224.
[3] 邓家栋. 血液病实验诊断[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985. 258.
[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 564-565, 569-571.