

3.6 对胰岛素水平的影响:各给药组对胰岛素水平的影响与模型组比较无统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 结果见表5。

表5 参果消渴胶囊对糖尿病大鼠血清胰岛素水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of Shenguo Xiaoke Capsule on insulin level in diabetic rats serum ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $g \cdot kg^{-1}$ )	动物/只	胰岛素 ( $\mu g \cdot L^{-1}$ )
正常对照	—	10	41.21 ± 17.30
模型	—	8	18.14 ± 4.29
消渴丸	2.0	9	22.09 ± 8.75
参果消渴胶囊	0.52	10	26.00 ± 18.06
	0.26	9	19.61 ± 6.63
	0.13	8	19.77 ± 7.87

3.7 胰腺病理检查结果:正常对照组大鼠胰腺的胰岛易见,醛复红染色示 $\beta$ 细胞数量较多。STZ 导致大鼠胰岛破坏,使其数目减少,体积变小,分泌胰岛素的 $\beta$ 细胞明显减少。模型组胰岛数目减少,体积缩

小,尤其 $\beta$ 细胞数明显减少,消渴丸组及参果消渴胶囊各剂量组胰岛数目、体积及 $\beta$ 细胞数未见明显改善趋势。

#### 4 讨论

参果消渴胶囊大、中剂量组可使高血糖大鼠血糖水平下降,具有明显统计学意义 ( $P < 0.05$ );可使全血高切比黏度、全血低切比黏度下降,与模型组比较具有明显统计学意义 ( $P < 0.05, 0.01$ );可使血浆黏度明显下降,与模型组比较具有明显统计学意义 ( $P < 0.05$ ),并可改善其血液流变学。参果消渴胶囊作用与消渴丸相似。

#### References:

- [1] Zhang S C. *China Ginseng* (中国人参) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Education Publishing House, 1992.
- [2] Zhang S C. Recent advances on chemistry and pharmacology of the fruit of *Panax ginseng* [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res* (特产科学实验), 1984(2): 32-35.

## 热毒清对内毒素化家兔凝血指标的影响及机制

高永林<sup>1</sup>, 李春梅<sup>1,2</sup>, 吴立夫<sup>3</sup>, 刘志峰<sup>1,2\*</sup>, 刘珂<sup>1,2</sup>

(1. 山东省天然药物工程技术研究中心, 山东烟台 264003; 2. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 3. 贵州大学, 贵州贵阳 550025)

内毒素(ET)是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的一种大分子结构成分,在细菌死亡裂解后释放出来,可导致人发热、休克、弥漫性血管内凝血(DIC)和多器官的病理损害,形成难以治愈的临床危症<sup>[1,2]</sup>。这些疾病均以内毒素为发病、加重或影响预后的因素,因而形成一类新型疾病——内毒素性疾病。文献报道清热解毒类中药有抗内毒素作用<sup>[3]</sup>。热毒清是中药清热解毒复方注射液,由金银花、蒲公英、大青叶等中药组成,用于治疗急性感染性疾病效果良好。本实验通过动物模型,观察热毒清注射液对内毒素所致动物凝血指标的影响,并探讨其作用机制,为临床上内毒素性疾病的药物特别是中药的筛选提供理论依据。

### 1 材料

1.1 处方及制备:取金银花、蒲公英、大青叶、鱼腥草各100g,水提醇沉,取上清液,挥去乙醇,得各药

液,浓缩至所需浓度,按一定比例混合,使含金银花、蒲公英、大青叶、鱼腥草生药分别为0.2、0.2、0.3和0.3g/mL。用0.22 $\mu m$ 的微过滤器滤过到安瓶中封口保存备用。

1.2 动物:健康哈尔滨白兔,体重(1.75 ± 0.25)kg,雌雄各半,由山东省天然药物工程技术研究中心提供。

1.3 试剂:精制大肠杆菌O<sub>111</sub>B<sub>4</sub>内毒素(批号990301,卫生部上海生物制品研究所产品),临用前用灭菌生理盐水配成10 $\mu g/mL$ 溶液;活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)试剂盒(上海太阳生物试剂公司);鲎试剂(批号010817,湛江海洋生物制品厂);0.5%甲苯胺蓝(TB),蒸馏水配制备用。

1.4 仪器:722—光栅分光光度计(上海分析仪器总厂);MC—1000单通道血凝仪(德国德高公司)。

收稿日期:2004-04-15

作者简介:高永林(1976—),男,硕士,内蒙古鄂尔多斯人,从事新药药理和毒理学研究。

\* 通讯作者 Tel: (0535) 6717618-8652 E-mail: lzhf@luye-pharm.com

## 2 方法与结果

2.1 分组与给药:40 只健康哈尔滨白兔随机分为阴性对照组、模型 I 组、模型 II 组、热毒清 I 组和热毒清 II 组,每组 8 只。两模型组和两热毒清组家兔一次性 iv 大肠杆菌 O<sub>111</sub>B<sub>4</sub> 内毒素生理盐水溶液,模型 I 组和热毒清 I 组剂量为 10 mL/kg (10 μg/kg),模型 II 组和热毒清 II 组剂量为 7.5 mL/kg (7.5 μg/kg)。两热毒清组家兔 iv 内毒素后再 iv 热毒清注射液,热毒清 I 组 7.5 mL/kg,热毒清 II 组 5.0 mL/kg。模型 I、II 组和热毒清 II 组家兔另外补充 iv 适量生理盐水。阴性对照组家兔 iv 与上述各组同体积生理盐水。

2.2 对内毒素化家兔凝血指标的影响:按文献方

表 1 凝血指标变化 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Changes of bleeding coagulation index ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	出血时间/s	凝血时间/s	血小板个数 /( $1 \times 10^4 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	PT/s	APTT/s	纤维蛋白原 /( $\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ )
对照	67.50±21.21	86.25±19.23	38.08±6.30	12.25±1.39	18.75±1.75	413.93±46.14
模型 I	191.25±81.71**	292.50±69.44**	18.06±4.46**	14.86±3.58	29.14±7.01	207.27±87.94**
热毒清 I	82.50±26.59 $\Delta$	116.15±40.69 $\Delta\Delta$	27.44±14.00	11.88±1.96	23.50±3.70	284.53±79.18**
模型 II	153.75±82.45**	258.00±103.92**	15.05±4.71**	14.14±3.02	25.14±7.69	173.75±35.23**
热毒清 II	112.50±44.64*	172.50±88.92* $\Delta$	26.87±3.87** $\Delta\Delta$	12.50±1.51	23.63±2.45	187.80±49.64**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与相应模型组比较:  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs corresponding model group

橡胶钠抗凝,分离血浆,备用。处死动物,肉眼观察肾脏、心脏、肺脏和肝脏组织变化,并用中性福尔马林固定,常规石蜡切片,HE 染色和甲紫染色 (MV)。显微镜观察各组织微血管中微血栓的发生情况,并计算出各组家兔 DIC 发生率,结果见表 2。模型组家兔各组织器官有严重的出血病变,热毒清组家兔病变明显减轻。模型组家兔肾小球毛细血管、心脏微血管、肺泡壁毛细血管以及肝中央静脉可见由纤维素、中性粒细胞、肿胀溶解的红细胞及血小板等组成的微血栓。热毒清组家兔虽然也有类似病变,但发生比例明显下降。阴性对照组均未出现类似变化。

2.4 对内毒素的体内、外降解作用

2.4.1 体内实验:在血凝板每排第 1 孔加入阴性对照组、模型 I 组和热毒清 I 组各家兔血浆 20 μL,第 2 孔至第 12 孔每孔加细菌内毒素检查用水 10 μL,再从第 1 孔吸取 10 μL 加入第 2 孔,混合均匀后,再吸取 10 μL 加入第 3 孔,依此倍比稀释到第 12 孔,由第 12 孔吸取 10 μL 弃掉。每孔中家兔血浆的稀释倍数分别为 1:1、1:2……1:2 048。向每孔中加入鲎试剂 20 μL,充分振荡 30 s 后,用除热原的玻板覆盖,置 37℃ 恒温箱 75 min。将血凝板从恒温箱中取出,向各孔中加 5% 甲苯胺蓝 10 μL,5~

法<sup>[4]</sup>测定①出血、凝血时间;②血小板计数;③活化部分凝血活酶时间 (APTT);④凝血酶原时间 (PT);按文献方法<sup>[5]</sup>测定蛋白原含量,结果见表 1。与阴性对照组比较,两模型组家兔出血时间和凝血时间均极显著延长,血小板计数和纤维蛋白原含量均极显著减少,但 APTT 和 PT 差异不显著;与相应模型组比较,两热毒清组家兔的凝血时间显著或极显著缩短,热毒清 I 组家兔的出血时间亦显著缩短,热毒清 II 组家兔的血小板计数极显著升高。

纤维蛋白原 = [测定管 A 值 × 0.05 × 标准血清蛋白浓度 (g/100 mL) × 1 000] / (标准管 A 值 × 0.5)

标准血清蛋白质量分数为 4.96%

2.3 对 DIC 形成的影响:家兔心脏采血,3.8% 枸

表 2 各组家兔 DIC 发生比例

Table 2 Ratio of DIC in each rabbit groups

组别	血栓形成部位			
	肾脏	心脏	肺脏	肝脏
对照	0/8	0/8	0/8	0/8
模型 I	7/8**	7/8**	8/8**	5/8**
热毒清 I	3/8 $\Delta\Delta$	3/8 $\Delta\Delta$	3/8 $\Delta\Delta$	1/8 $\Delta\Delta$
模型 II	7/8**	6/8**	7/8**	4/8**
热毒清 II	4/8*	3/8	4/8*	1/8

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

与相应模型组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

$\Delta\Delta P < 0.01$  vs corresponding model group

10 min 后,竖起板观察。判定标准:“+”表示有蓝色凝胶形成,且附于孔底;“-”表示无蓝色凝胶形成,混合液沿孔壁流下;“±”表示开始有凝胶形成,片刻后凝胶下流。结果见表 3。可见,热毒清在体内对内毒素有较强的拮抗作用。阴性对照组各家兔血浆鲎试验结果为阴性。模型 I 组家兔血浆被稀释到 1:512 时,仍有 (1/8 家兔) 内毒素被检出。而热毒清 I 组各家兔血浆稀释到 1:64 时,鲎试验结果已呈阴性。结果表明,热毒清 I 组家兔血浆内毒素含量较模型 I 组减少了 16 倍左右。

2.4.2 体外实验:在血凝板 3 排的每排第 1 孔加

热毒清注射液 20 μL,第2孔至第12孔每孔加细菌内毒素检查用水 10 μL,按2.4.1项方法作倍比稀释,而后各孔加入 10 μg/mL 内毒素生理盐水溶液 10 μL,后继操作同2.4.1项,结果见表4。结果表

明:在体外,热毒清对内毒素也有一定的破坏作用。3批实验中,热毒清注射液分别被稀释到 1:8、1:16和 1:32 时鲎试验才显示阳性反应,表明热毒清被稀释 16 倍左右时在体外对内毒素仍有降解作用。

表3 热毒清对内毒素的体内破坏作用

Table 3 Destructive effect of Reduqing Injection on ET in vivo

组别	血浆稀释倍数												
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
模型 I	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	5/8	4/8	1/8	-	-	-
热毒清 I	8/8	8/8	8/8	6/8	5/8	2/8	-	-	-	-	-	-	-

表4 热毒清对内毒素的体外破坏作用

Table 4 Destructive effect of Reduqing Injection on ET in vitro

组别	热毒清稀释倍数												
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
第1批	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
第2批	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
第3批	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+

3 讨论

内毒素生物活性复杂,对人体作用广泛,能使脏腑组织发生严重病变,它在机体内消耗大量凝血因子而引起休克、DIC 和多器官功能衰竭等。因此拮抗内毒素及阻断或减弱其介导的损伤具有重要意义。本实验结果表明,模型组家兔心脏、肾脏等器官出现广泛的微血栓,其原因是因为内毒素激活了机体凝血系统,消耗大量凝血因子所致,这一结果与凝血指标的改变是一致的。文献报道,热毒清注射液具有破坏内毒素的结构,拮抗其生物活性作用,所以热毒清组家兔各器官中微血栓形成显著减少、凝血指标亦得到明显改善。近年来,中医药工作者在中药拮抗内毒素活性方面做了大量工作,本实验采用家兔 iv 大肠杆菌内毒素,复制施瓦茨曼动物模型,从血液角度对热毒清预防内毒素所致凝血指标改变进行了分析,并通过体内、外实验进一步证实热毒清能拮抗内毒素所致 DIC 生物效应、可以改善机体血液学

指标的变化,减少家兔组织器官中微血栓的形成,从而减轻脏器组织病理损害,保护内脏器官。

References:

- [1] Otterbein L, Chin B Y, Otterbein S L, et al. Mechanism of hemoglobin-induced protection against endotoxemia in rats: a ferritin-independent pathway [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272 (116): 268-275.
- [2] Ziegler E J, Fisher C J, Spring C L, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(7): 429-436.
- [3] Li M Z, Ye W Y. Pharmacodynamic study on analysis of 4 individual component herbs in Reduqing injection [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1996, 2(6): 24-30.
- [4] Shanghai Medical Laboratory. *Examination of Clinical Biochemistry* (临床生化检验) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1979.
- [5] Shi J R, Jia S Y. *Clinical Examination Handbook* (临床检验手册) [M]. Jinan: Shandong Science and Technology Publishing House, 1998.

欢迎订阅《中草药》杂志 2004 年增刊

为了加速中药现代化进程,促进中药产业的技术创新,我部编辑出版了以“新技术在中药现代化中的应用”为主要内容的增刊。该增刊共收载论文 120 篇,总字数约 50 万字,每本定价 60 元,另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjipr.com

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail: zcyzzbjb@tjipr.com