

• 实验研究 •

“热毒清”注射液对家兔内毒素DIC生物效应的拮抗作用

同济医科大学中西医结合研究所 林菊生 李鸣真 叶望云

内容提要 本文通过动物实验,观察了“热毒清”注射液对以大肠杆菌内毒素在家兔体内所制作的 DIC 动物模型病理生理过程的影响。血液学和形态学的结果表明,本制剂对内毒素的 DIC 生物效应具有拮抗作用。文中并就其拮抗机制作了初步探讨。根据体外抗内毒素实验、对枯否氏细胞形态的电镜观察以及其他作者的研究工作,推测可能是通过直接降解内毒素,增强单核-吞噬细胞系统的吞噬功能以及提高 C_3 旁路活性而发挥作用的。

我院研制的“热毒清”静脉注射液(简称“热毒清”,原名“抗炎 6 号”),由金银花、蒲公英、大青叶、鱼腥草四味清热解毒中草药组成。多年来应用于临床,治疗细菌感染性疾病效果良好。其中,对革兰氏阴性杆菌所致的疾病疗效较为显著^①。体外实验表明,本制剂对多种细菌,包括革兰氏阴性杆菌具有一定的抗菌作用^{②,③}。然而,单以抗菌似难圆满解释其作用机制,因为临床用量难以达到实验室的有效抗菌浓度。联系到中医热性病所表现出的某些“热毒证”,与现代医学内毒素血症的临床表现颇为相似。从而启示我们,“清热解毒”是否解细菌内毒素之毒?“热毒清”是否具有拮抗细菌内毒素生物效应的作用?本实验通过观察其对以大肠杆菌内毒素在家兔体内所制作的弥漫性血管内凝血(DIC)病理模型的影响来回答这个问题,并就其拮抗机制作初步探讨。

材料和方法

体内抗内毒素实验:实验动物选用 2.0~2.5kg 的日本大耳白雄性家兔 40 只。随机分为四组。除正常对照组外,每只动物均相隔 24 小时,两次耳缘静脉注射精制大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 内毒素(由上海生物制品研究所提供)。剂量分别为 50 μ g、100 μ g (含于 1.5ml 生理盐水中)。按处理之不同分为:

一、生理盐水组:共 12 只。耳缘静脉注射生理盐水每次 20ml,共四次,其中两次分别于注射内毒素后立即给予,另两次在相隔 24 小时期间给予。

二、地塞米松组:共 12 只。只在第二次给内毒素之前 2 小时,按 1 mg/kg 的剂量(含于 20ml 生理盐水中)从耳缘静脉给予。

三、“热毒清”组:共 12 只。每次给“热毒清”

20ml。给药途径、次数和时相均同生理盐水组。

四、正常对照组:共 4 只。不给内毒素,亦不作其他任何处理。

观测指标:

一、血液学检查:每只动物均于实验前(第一次给内毒素前)与实验后(第二次给内毒素后 4 小时)行心脏穿刺抽血,作血小板计数(Blood Platelet Count,简称 BPC)、凝血酶原时间(Prothrombin Time,简称 PT)、纤维蛋白原定量(Fibrinogen 简称 FG)和血浆鱼精蛋白副凝固试验(Plasma Protamine Paracoagulation test,简称 3P test)检查。

二、形态学检查:(1)光学显微镜(简称光镜)检查:所有动物均于第二次心脏穿刺抽取血样本后,立即以破坏延髓法处死,取肾、肝、肺等脏器,以 10% 中性福尔马林固定,制成切片后作 HE 染色,同时作磷钨酸苏木素(Phosphotungstic acid-Hematoxylin,简称 PTAH)染色。病理切片的观察和结果统计,参照 Latour 氏法^④进行。(2)电子显微镜(简称电镜)检查:每组动物随机抽取 3 只,作肾(右肾皮质)、肝(右中央叶)的电镜观察。

体外抗内毒素实验:首先将内毒素溶于 0.1M 的 Tris 缓冲液(pH 为 7.2)中,使浓度成 2mg/ml。取此样品 0.5ml,分别与 0.5ml 的 Tris 缓冲液、多粘菌素 B(内含 25 μ g)、10%的“热毒清”在小试管中混匀,置 37°C 水浴中孵育 60 分钟。然后,按照 Lopes 氏的方法^⑤制成滴片作电镜观察。

实验结果

体内实验结果:

一、血液学方面:各组动物纤维蛋白原定量实验

前后变化均无统计学意义 ($P>0.05$)。血小板计数、凝血酶原时间和 3P 试验实验前后的变化, 见表 1。

表 1 实验前后 BPC、PT、3P 试验的比较 ($M\pm SE$)

	BPC(万/mm ³)		PT (秒)		3P test	
	实验前	实验后	实验前	实验后	(+)	(-)
生理盐水组 (n=12)	28.25 ± 1.77	11.47 ^{**} ± 1.88	6.25 ± 0.13	9.33 ^{**} ± 0.40	10 (83.3%)	2 (16.7%)
地塞米松组 (n=12)	27.50 ± 1.16	24.92 ± 1.90	6.67 ± 0.31	7.25 ± 0.35	2 (16.7%)	10 [*] (83.3%)
“热毒清”组 (n=12)	28.92 ± 1.42	26.67 ± 2.48	6.58 ± 0.34	7.42 ± 0.47	3 (25.0%)	9 [*] (75%)
正常对照组 (n=4)	29.00 ± 0.91	27.00 ± 0.53	6.00 ± 0.00	7.25 ± 0.28	0	4 (100%)

注: 自身对照 $**P<0.001$, 其余 P 值均 >0.05 ; 与生理盐水组对照 $*P<0.01$; n=动物数

二、形态学方面:

1. 光镜检查结果: 生理盐水组大部分动物肾小球毛细血管、肺泡壁毛细血管以及肝窦中有大量的纤维素微血栓形成, 而地塞米松组和“热毒清”组发生纤维素微血栓的动物数目明显为少且程度亦明显为轻。根据肾脏切片观察结果, 将各组动物 DIC 发生率及其严重程度列于表 2 进行比较。

表 2 DIC 发生率及其严重程度的比较 ($M\pm SE$)

	n	DIC 发生率 (%)	发生纤维素微血栓的肾小球检出率 (%)	每个肾小球纤维素密度平均指数 (%)
生理盐水组	12	83.3	77.3 \pm 11.0	60.7 \pm 10.5
地塞米松组	12	16.7 [*]	8.5 \pm 6.1 ^{**}	2.6 \pm 1.9 [*]
“热毒清”组	12	25.0 [*]	14.8 \pm 8.4 ^{**}	6.2 \pm 3.9 ^{**}
正常对照组	4	0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

注: 与生理盐水组对照: $*P<0.01$, $**P<0.001$; n=动物数

2. 电镜观察结果: 生理盐水组动物肾小球毛细血管和肝窦中有大量条索状的纤维素, 并混有聚集的血小板。毛细血管内皮细胞脱落甚或崩解。肝细胞肿胀变圆, 细胞间隙增宽, 桥粒、紧密连接离解。肝细胞线粒体肿胀, 嵴模糊, 基质颗粒减少, 出现层状小体, 呈空泡变。粗面内浆网明显增生, 池明显扩张, 池中出现不规则的絮状致密团块, 出现脱粒现象。糖原明显减少。而“热毒清”组动物肾小球毛细血管和肝窦中仅偶见少量纤维素。内皮细胞轻度肿胀, 未发现脱落和崩解。肝细胞形态基本正常。部分线粒体轻度肿胀, 未见空泡变。局部区域粗面内浆网轻度扩张, 未见脱粒现象。糖原较丰富。同时还观察到本组动物肝脏枯否氏细胞中, 次级溶酶体增多, 溶酶体中可

见被吞噬的纤维素。枯否氏细胞中还含有大的吞噬空泡及被吞噬的红细胞。而生理盐水组枯否氏细胞中, 以初级溶酶体为主, 未见吞噬空泡和被吞噬的异物。

体外实验结果: 电镜下, 大肠杆菌 O₁₁₁B₄ 内毒素呈链状结构。经多粘菌素 B 处理的内毒素完全丧失原来的链状结构而呈杆状, 短片段甚至完全解聚。经“热毒清”处理的内毒素, 大部分也失去链状结构, 呈杆状, 短片段或完全解聚。

讨 论

一、关于动物模型的评价

为了观察“热毒清”对内毒素 DIC 生物效应的作用, 首先必须建立理想的 DIC 动物模型。有关这一模型的制作方法很多^(6~10)。国外一些研究者认为, 处于全身施瓦茨曼反应 (Generalized Schwartzman Reaction 简称 GSR) 状态的动物, 其病理生理改变更接近于临床⁽¹¹⁾。有人认为, 这是研究 DIC 最好的实验模型之一⁽¹²⁾。

本实验生理盐水组动物四项血液学指标, 三项均有意义。至于纤维蛋白原变化不大, 可能与血样本的采取时相有关。这时, 病理生理过程处于急性 DIC 的高凝期, 尽管在广泛纤维素微血栓形成过程中, 大量的纤维蛋白原被消耗, 但是, 由于肝脏尚保持产生纤维蛋白原的代偿能力, 因此, 血液中仍维持在正常水平。虽然无明显降低, 仍可建立 DIC 的诊断。

形态学的观察结果也有力地支持了这一点。光镜检查表明, 生理盐水组动物肾、肝、肺微循环中有大量的纤维素微血栓。电镜也观察到, 肾小球毛细血管和肝窦中有大量的纤维素, 而且出现毛细血管内皮细胞和肝细胞的损伤。这些均证实 DIC 的病变, 说明本实验动物模型是成功的。

二、“热毒清”对内毒素 DIC 生物效应的拮抗作用

糖皮质激素能够预防 GSR 的发生, 本实验结果再一次验证了这一作用。同时也提示“热毒清”对内毒素的 DIC 生物效应具有拮抗作用。表现在“热毒清”组动物四项血液学指标, 实验前后变化均无显著差异; 形态学方面, 本组动物 DIC 发生率及其严重程度均非常明显地低于生理盐水组; 细胞的损伤也比生理盐水组轻微得多。

三、“热毒清”拮抗内毒素 DIC 生物效应的机理探讨

1. 对内毒素的直接降解作用: 本实验体外部分结

果表明,经“热毒清”处理的大肠杆菌内毒素大部分失去原来链状结构,而被裂解成杆状、短片段或完全解聚。已有实验指出,这些被裂解的内毒素失去原来的生物活性^(13~14)。从而提示本制剂对内毒素具有一定程度的直接降解作用。

2.对单核-吞噬细胞系统(Mononuclear Phagocyte System,简称 MPS)功能的增强作用:肝内枯否氏细胞是 MPS 的重要组成部分。肝脏摄取和清除血液中异物主要依赖枯否氏细胞。但其吞噬能力也有一定限度。如吞噬活动暂停,则处于所谓“吞噬阻断”(phagocytosis blockade)状态⁽¹⁵⁾。本实验生理盐水组动物的枯否氏细胞似处于这一状态。而“热毒清”组则呈吞噬增强。这样,当第一次注射内毒素后 MPS 不致被阻断,仍然能对第二次注射的内毒素进行吞噬,即使微量凝血因子被激活而产生少量纤维素,也能及时对其进行清除,使得 DIC 不致发生,即使发生,程度亦轻。

3.通过提高补体 C₃旁路活性的作用:已有的研究工作表明,本制剂能够提高补体 C₃旁路的活性⁽¹⁶⁾。补体活化后,一方面参与血清对内毒素的解毒⁽¹⁷⁾,另一方面,还可通过调理作用,促进 MPS 非特异性地对内毒素进行吞噬清除⁽¹⁸⁾。

(本工作承蒙医大武忠弼教授指导并作电镜观察;病理解剖教研室彭杰青副教授对光镜部分作了指导和鉴定;工作中还得到刘绍春、王慧君、石松波、韩用华、林宝英、吴荣庆、杨芙蓉、章菊花等同志的热心协助,在此一并致谢)

参 考 文 献

1. 武汉医学院第二附属医院中西医结合治疗急腹症小组。中药“抗炎6号”注射液治疗急腹症200例小结。武汉医学院学报1975; 1:83。
2. 武汉医学院第二附属医院中西医结合急腹症小组,等。中药“抗炎6号”注射液的实验研究。武汉医学院学报1977; 6:7。
3. 薛绍华,等。抗炎6号静脉注射液改良制剂的体外抑菌作用实验研究。武汉医学院学报1980; 2:65。

4. Latour JG, et al. Prevention of the generalized shwartzman reaction by glucocorticoids. Am J Obst-et Gynecol 1972; 113(7):863.
5. Lopes J, et al. Electron microscopy of effect of polymyxin on escherichia coli lipopolysaccharide. J Bacterial 1969; 100(2):1128.
6. Latour JG, et al. Prevention by glucocorticoids of disseminated intravascular coagulation induced by endotoxin: mechanisms. J Lab Clin Med 1975; 85:934.
7. Kramer W, et al. Effect of platelet antiserum on the activation of intravascular coagulation by endotoxin. Thrombosis Research 1977; 10(1): 47.
8. 宋善俊,等。播散性血管内凝血的实验研究 I. 家兔DIC模型的建立。中华血液学杂志 1980; 1(4):199。
9. 刘爱国,摘译。测定 DIC 患者血清补体的意义。国外医学·生理病理科学分册1982; 2(4):224。
10. 王振生,等。家兔急性弥漫性血管内凝血模型的建立及实验诊断指标的探讨。中华医学杂志 1985; 65(2): 114。
11. 陈信达,摘译。内毒素对大鼠微循环和淋巴动力学的影响。国外医学·生理病理科学分册1982; 2(3):170。
12. Latour JG, et al. Corticosteroids and the generalized shwartzman reaction. Am J Path 1971; 65(1): 189。
13. Tarmina DF, et al. Modification of selected host-reactive properties of endotoxin by treatment with sodium deoxycholate. J Bacteriol 1968; 96(5): 1611。
14. James J, et al. Effect of polymyxin B sulfate on endotoxin activity in a gram-negative septicemia model. Pediat Res 1979; 13: 48。
15. 上海第一医学院,主编。组织学。第1版。北京:人民卫生出版社,1981:734-737。
16. 薛绍华,等。中药“抗炎6号”注射液抗感染作用机理的实验研究 I. 对非特异性免疫功能的影响。武汉医学院学报1984; 4: 286。
17. Kent J, et al. The requirement for serum complement in the detoxification of bacterial endotoxin. J Immun 1972; 108(3): 611。
18. 王季午,等。主编。萤试验在医学上的应用。第1版。杭州:浙江科学技术出版社,1983:92-93。

· 新药介绍 ·

治疗消化道溃疡病新药“珍珠胃安丸”

珍珠胃安丸为广州白云山制药厂的新产品。本品主要由珍珠层粉、甘草、陈皮、徐长卿、豆豉姜等中药组成。具有健脾和中、制酸止痛、收敛生肌等功效。主要用于治疗胃及十二指肠溃疡病。本品为水丸。每瓶30g,每次1.5g,每日4次,饭后及睡前口服。

1个月为1疗程。经中国人民解放军一五七医院、广州军区总医院、广东省人民医院、广州市第一人民医院临床观察210例,治愈率达85.7%,有效率达94.3%。是目前国内治疗消化道溃疡病的有效新药。

(吴广宁)

Observation on TCM-WM Therapy in Treating 124 Nephrotic Syndrome Patients with Control

Wang Xiuzhen (王秀珍), Cheng Chuanxun (程传勋), et al

Xin Xiang Prefecture Hospital, Henan Province

From 1971 to 1981, 124 cases of children suffering from nephrotic syndrome were treated in our hospital. They were treated with corticosteroid, nitrogen mustard, cyclophosphamide combined with traditional Chinese medicine in groups of various combinations. In 80 cases treated with prednisone acetate and traditional Chinese herbs, 44 cases were cured with curative rate of 55%. In 22 cases treated with the combined therapy of nitrogen mustard, prednisone acetate and traditional herbs, 20 cases (90.91%) were cured. And finally in another 22 cases with cyclophosphamide, prednisone acetate and traditional herbs, 14 cases (63.64%) were cured. The therapeutic effect of the second group seemed to be the best one.

The combined therapy and some problems on the administration of traditional Chinese herbs with western drugs are discussed. (Original article on page 422)

Antagonistic Action of Re Du Qing Injection (热毒清注射液) on the Biological Activity of Endotoxin Induced DIC

Lin Jusheng (林菊生), Li Mingzhen (李鸣真), Ye Wangyun (叶望云)

TCM Dept. of Tong Ji Hospital, Tong Ji Medical University, Wuhan

In this paper, an investigation was made on the therapeutic mechanism of heat-clearing and detoxifying Chinese medicinal preparation, Re Du Qing Injection, through animal experiments. According to the principle of generalized Shwartzman reaction, an animal model of DIC was established in rabbits by injecting the endotoxin of *Escherichia Coli*, and then the effect of preparation on pathophysiological process of DIC was observed. The hematological results indicated that the control group of normal saline was characterized by changes of DIC, but most of the changes of Re Du Qing treated group were not of statistical significance. Moreover, the morphological results showed that the DIC incidence and its severity were markedly lower in the Re Du Qing treated group than the control. Under electron microscope, the damage to endothelial cells of glomerular capillaries and liver cells in the Re Du Qing treated group was mild in comparison with control. These findings suggested that the preparation possess antagonistic action on the biological activity of endotoxin induced DIC.

The mechanism of the antagonistic action was also preliminarily discussed. According to the in vitro experiments, observation on morphology of Kupffer's cells with electron microscope, and other author's study, an inference was drawn that the antagonistic action may take place through degrading endotoxin directly, intensifying phagocytosis of MPS and increasing the activity of alternative complement pathway.

(Original article on page 425)

Experimental Studies on the Mechanism of Inhibition upon Thrombus Formation and Blood Coagulation in Vitro with Sheng-Mai Injection (生脉注射液)

Xu Qingyuan (许青媛), et al

Shaanxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Xi'an

Sheng-Mai injection was injected intravenously into eleven rabbits with a dosage of 2ml/kg. Before and two hours after injection, blood was drawn from the rabbit heart directly for the determination of extracorporeal thrombus formation, platelet function, blood coagulation and fibrinolytic activity. The results were as follows: (1) The time of thrombus formation was prolonged ($P < 0.001$). The length of thrombus shortened and its weight decreased. All these changes indicated that the thrombus formation was inhibited by this drug. (2) The platelet count was unchanged, the ADP induced platelet aggregation rate and the ratio of peripheral platelet aggregation were not significantly influenced. (3) The prolonged prothrombin time and prothrombin consumption time indicated that the blood coagulation was inhibited. The effect of the drug may exert on both the intrinsic and extrinsic coagulation system. (4) The plasma fibrinogen was decreased, but there were no significant changes in the thrombin and the euglobulinolysis time. All these results suggest that the Sheng-Mai injection possesses an inhibitory function on extracorporeal thrombus formation and blood coagulation, it exerts a weak promotion to the fibrinolytic function, but does not influence the platelet counts and their functions. (Original article on page 428)