

· 实验研究 ·

清肝泻火汤对内毒素诱发家兔
肝火证的疗效和机理*

张海男 黎杏群 李学文

内容提要 采用内毒素诱发家兔肝火证模型, 观察了清肝泻火汤的疗效。实验结果表明该方具有以下作用: (1)减轻肝火证临床症状, 如皮肤温度、饮水量、呼吸、尿量、易怒、心率等明显缓解($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); (2)改善眼部症状, 裂隙灯下虹膜充血与房水混浊均显著好转($P < 0.01$); (3)减少房水炎性渗出, 房水白细胞数与蛋白含量明显降低($P < 0.01$); (4)降低血液和房水中炎症介质的浓度($P < 0.01$, $P < 0.05$); (5)病理形态学表明, 该方具有保护毛细血管和血-房水屏障, 减轻眼葡萄膜组织病理损害的作用。

关键词 清肝泻火汤 肝火证 内毒素 虹膜睫状体炎

Study on the Effect and Mechanism of Qinggan Xiehuo Decoction in Treatment of Endotoxin-induced Uveitis of Rabbits ZHANG Hai-nan, LI Xing-qun, LI Xue-wen *Institute of Integrated Medicine of TCM-WM, Hunan Medical University, Changsha(410008)*

The therapeutic efficacy of Qinggan Xiehuo Decoction (QGXHR) on rabbit model of uveitis induced by endotoxin (EIU) was observed and compared with the control. Results showed that: (1) The symptoms of Liver-Fire such as conjunctival congestion, thirsty dark urine, oliguria, irritability and rapid pulse were markedly relieved ($P < 0.05 \sim 0.01$); (2) The ophthalmic signs, iris hyperemia and aqueous humor turbidity observed through slit-lamp were improved significantly ($P < 0.01$); (3) The inflammatory infiltration, the protein content and leukocyte count in the aqueous humor decreased markedly ($P < 0.01$); (4) The concentration of inflammatory mediators in blood and aqueous humor were reduced. (5) Pathological examination showed that the QGXHR could protect the capillary, blood-aqueous barrier and alleviated the uveal damage caused by endotoxin.

Key words Qinggan Xiehuo Decoction, live fire zheng, endotoxin, iridocyclitis

为深入探讨肝火证病理生理学变化, 我们用大肠杆菌内毒素复制家兔实验性肝火证模型, 并用清肝泻火汤进行实验性治疗, 以方药测证, 探讨疗效机理。

材料与方药

1 材料

内毒素(ET): E.coli L-3880, Lot 1121-14040, 购自美国 Sigma 公司。使用前用 0.9% 生理盐水配制成 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液。

动物为健康日本大耳白兔, 雄性, 体重

1.8~2.2 kg, 由湖南医科大学附属湘雅医院实验动物中心提供。

药物制备: 清肝泻火汤由龙胆草 6 g 黄芩 10 g 栀子 10 g 生地 20 g 白芍 15 g 草决明 20 g 泽泻 15 g 生甘草 4 g 等组成。煎煮浓缩成每毫升含生药 1 g 的药液, 用 250 ml 的消毒盐水瓶分装, 置 0~4℃ 冰箱内备用。

2 方法

2.1 造模方法 取兔 32 只, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 即对照组、模型组、中药组与激素组; 实验前 1 天将动物置于室温 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 的实验室中, 以适应实验环境。动物分笼饲养, 定时定量给颗粒饲料, 自

* 国家自然科学基金资助项目

湖南医科大学中西医结合研究所(长沙 410008)

由饮水。参照 Atsushi Okumura 等制造眼虹膜睫状体炎动物模型的方法^[1]稍加改进。模型组、中药组与激素组每只家兔两后脚掌肉垫皮下各注入内毒素溶液 0.5 ml, 对照组每只家兔用同法注入等量 0.9% 生理盐水(NS)。

2.2 给药方法 中药组家兔于注射内毒素(ET)后 1 h 和 10 h 各灌服中药 1 次, 给药量根据实验动物与人体体表面积换算表^[2]换算(每次每只家兔 5.5 ml/kg), 其余各组家兔用同法灌服等容量生理盐水。激素组家兔于注射 ET 后 1 h 双眼球结膜下各注射 2.5% 醋酸氢化泼尼松(强的松龙)注射液 0.05 ml (药物剂量换算方法同上), 其余各组家兔用同法注射等容量 0.9% NS。

3 观察指标

3.1 皮肤温度 用半导体体温计测量家兔皮肤温度。将体温计探头触压家兔左耳根部皮肤, 读取体温计显示盘上的温度数值。实验前测温 2 次, 注射 ET(对照组注射 NS)后, 每隔 8 h 测温 1 次, 取 3 次测温的均数作为实验皮肤温度。

3.2 心率和呼吸 用听诊器置于家兔前胸壁上听取动物每分钟心率和呼吸频率, 实验前听诊 2 次, 注射 ET(对照组注射 NS)后, 每隔 8 h 听诊 1 次, 取 3 次听诊的均数作为实验心率和实验呼吸频率。

3.3 饮水量和尿量 量取家兔实验前 24 h 内饮水量和尿量, 注射 ET(对照组注射 NS)后, 再次量取 24 h 内饮水量和尿量, 将其作为实验饮水量和实验尿量。

3.4 血清晶体渗透压 实验前 1 h 和注射 ET(对照组注射 NS)后 24 h, 分别于家兔耳动脉采血 3 ml, 立即注入干燥试管, 常规方法分离血清, 然后按冰点渗量计说明书中方法测定血清晶体渗透压, 将检验结果分别作为基础晶体渗透压和实验晶体渗透压。

3.5 激惹试验 用一尖端光滑圆钝的木棍触碰家兔鼻唇部, 并观察其行为改变, 每次刺激时间为 2~3 min。实验前 1 h 与注射 ET 后 24 h 各刺激家兔 1 次。激惹试验结果以 4 级算法表示, 即: (-) 无反应; (+) 前肢踢木棍; (++) 嘴咬木棍; (+++) 又咬又踢木棍; (++++) 咬踢木棍并发出“咕咕”怒吼声。

3.6 眼房水各项指标检测 注射 ET(对照组注射 NS)后 24 h, 用 3% 的戊巴比妥钠溶液 1 ml/kg 从兔耳缘静脉注射麻醉家兔, 于麻醉家兔眼眶侧角巩膜缘偏内 2 mm 处平行进针 3 mm, 抽出两眼房水混

合后立即送检, 检测(1)房水白细胞: 取房水 4 μ l, 采用细胞总数计数的直接计数法计数^[3]。(2)房水蛋白含量: 取房水 100 μ l, 采用 ASCA 型全自动生化分析仪检测。(3)房水白三烯 C_4 (LTC_4): 取房水 500 μ l, 与 100 μ l 肝素-去甲二氢愈创木酸溶液混匀, 4 $^{\circ}$ C, 1000 rpm/min 离心 10 min, 取上清液, 然后按 LTC_4 放射免疫分析试剂药盒说明方法检测(药盒由中国医学科学院基础所药理室提供)。(4)房水前列腺素 E_2 (PGE_2)、前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$): 取房水 200 μ l 与 20 μ l 消炎痛-肝素溶液混匀, 然后加入 5 ml 重蒸石油醚混匀, 4 $^{\circ}$ C 300 rpm/min 离心 15 min, 吸去上浮石油醚, 加重蒸馏乙酸乙酯 5 ml, 提取样品, 4 $^{\circ}$ C 3000 rpm/min 离心 15 min, 共 2 次, 将 2 次提取的上清液合并, 然后按前列腺素系列放射免疫分析试剂药盒说明方法检测(药盒由解放军总医院基础所生化室提供)。

3.7 血清肿瘤坏死因子(TNF)测定 注射 ET(对照组注射 NS)后 24 h 于家兔耳动脉采血 2 ml, 注入预置的干燥试管中, 取血清, 然后按 TNF 放射免疫试剂药盒说明方法检测(药盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供)。

3.8 血浆 LTC_4 测定 注射 ET(对照组注射 NS)后 24 h 于家兔耳动脉采血 1.5 ml, 注入预置的 100 μ l 肝素-去甲二氢愈创木酸溶液的试管中, 4 $^{\circ}$ C 1000 rpm/min 离心 10 min, 取血浆, 然后按 LTC_4 放射免疫分析试剂药盒说明方法检测(药盒由中国医学科学院基础所药理室提供)。

3.9 眼征 实验前用裂隙灯和检眼镜检查家兔双眼。注射 ET(对照组注射 NS)后每隔 6 h 检查 1 次眼征, 将实验后 24 h 检查结果作为实验眼征。检查内容包括双眼结膜、角膜、房水、虹膜、晶状体、玻璃体和视网膜, 其中(1)虹膜病变以 4 级算法表示病变严重程度, 即(-): 虹膜血管无扩张, 虹膜血管纹理清晰; (+): 虹膜血管轻度扩张, 虹膜纹理欠清晰; (++) : 虹膜血管扩张扭曲, 虹膜纹理模糊不清, 颜色稍暗; (+++) : 虹膜颜色较暗, 上述病变进一步加重; (++++) : 虹膜颜色深暗, 血管重度扩张, 纹理模糊紊乱。(2)房水混浊程度亦用 4 级算法表示, 即(-): 房水清亮, 丁道尔氏征(-); (+): 房水中有少量细胞浮动, 丁道尔氏征(+); (++) : 房水中有中等量细胞浮动, 丁道尔氏征(++); (+++) : 房水中有大量细胞浮动, 丁道尔氏征(+++); (++++) : 房水中可见絮状渗出物, 甚至可见前房积脓或积血。

3.10 病理形态学 注射 ET(对照组注射 NS) 后 24 h 麻醉家兔, 抽完房水后迅速取出家兔双眼完整眼球, 10% 中性福尔马林溶液固定, 石蜡包埋切片, HE 染色镜检。

4 统计学处理 各组组间比较用成组资料 t 检验与方差分析, 各组前后比较用配对 t 检验与配对秩和的检验。

结 果

1 各组动物皮肤温度、心率、呼吸、饮水量、尿量和血清晶体渗透压结果 见表 1。注射 ET 后模型组家兔皮肤温度升高, 心率和呼吸增快, 24 h 饮水量增多, 24 h 尿量减少, 而血清晶体渗透压呈升高趋势, 与注 ET 前比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。其余

表 1 4 组家兔皮肤温度、呼吸、心率、饮水量、尿量、血清晶体渗透压的结果比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	皮肤温度 ($^{\circ}\text{C}$)	呼吸 (次/min)	心率	饮水量 (ml/24 h)	尿量	血清晶体渗透压 (mOsm/kg·H ₂ O)
模型	注 ET 前 37.60 ± 0.50	102.50 ± 11.65	198.80 ± 9.91	168.75 ± 70.39	62.50 ± 7.07	293.00 ± 4.81
	注 ET 后 $38.80 \pm 0.65^{*\Delta}$	$126.90 \pm 13.87^{*\Delta}$	$228.80 \pm 15.53^{*\Delta}$	$240.0 \pm 77.83^{*\Delta}$	$43.75 \pm 9.16^{*\Delta}$	$309.50 \pm 9.75^{*\Delta}$
中药	注 ET 前 37.40 ± 0.50	107.50 ± 8.86	203.80 ± 9.16	131.25 ± 45.81	67.50 ± 14.88	296.63 ± 15.93
	注 ET 后 $37.47 \pm 0.46^{\Delta}$	$110.60 \pm 10.16^{\Delta}$	$207.50 \pm 10.35^{\Delta}$	$138.75 \pm 37.58^{\Delta}$	$62.50 \pm 12.82^{\Delta}$	$301.63 \pm 10.14^{\Delta}$
激素	注 ET 前 37.50 ± 0.46	111.30 ± 8.35	203.80 ± 9.20	137.50 ± 51.75	62.50 ± 7.07	294.90 ± 10.25
	注 ET 后 $37.53 \pm 0.42^{\Delta}$	$115.0 \pm 9.26^{\Delta}$	$207.50 \pm 10.40^{\Delta}$	$143.75 \pm 41.38^{\Delta}$	$58.75 \pm 11.26^{\Delta}$	$304.0 \pm 10.65^{\Delta}$
对照	注 NS 前 37.44 ± 0.50	112.80 ± 9.13	200.0 ± 7.56	171.25 ± 71.99	72.50 ± 18.32	297.60 ± 8.48
	注 NS 后 37.48 ± 0.54	114.60 ± 7.54	205.0 ± 9.65	178.75 ± 66.64	70.0 ± 14.14	302.50 ± 11.40

注: 与本组注 ET 前比较, $*P < 0.01$; 与对照组注 NS 后比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组注 ET 后比较, $\Delta P < 0.05$; 各组均为 8 只动物

各组动物无变化。

2 4 组动物激惹试验及眼征结果 配对秩和检验表明, 注 ET 前各组动物对刺激均表现平静, 注 ET 后, 模型组动物对刺激反应强烈, 与注 ET 前比较差异显著 ($P < 0.01$); 中药组与激素组这种变化较小, 对照组无变化。注 ET 后 3 h, 模型组家兔在裂隙灯下即可见球结膜充血, 虹膜血管扩张扭曲, 且纹理模糊, 注 ET 后 8 h 房水中出现少量细胞浮动, 丁

道尔氏征(+), 上述虹膜病变更加严重, 且虹膜颜色深暗; 注 ET 后 24 h, 上述改变达到顶峰。直接检眼镜下可见晶状体前囊表面有多处渗出沉着, 视网膜血管呈现不同程度的扩张。虹膜病变程度和房水混浊程度与注 ET 前比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。中药组与激素组也可见轻度的虹膜充血和房水混浊, 但与模型组比较则病变明显减轻。对照组未发现上述病变情况。

表 2 4 组家兔房水 WBC、蛋白含量、LTC₄、PGE₂、PGF_{2 α} 变化比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	WBC(个/ μl)	蛋白含量(mg/ml)	LTC ₄ (pg/ml)	PGE ₂ (pg/ml)	PGF _{2α} (pg/ml)
模型	$32.38 \pm 7.39^{*}$	$22.40 \pm 4.35^{*}$	$0.62 \pm 0.12^{*}$	$1702.67 \pm 230.02^{*}$	$1632.20 \pm 190.62^{*}$
中药	$6.63 \pm 2.97^{\Delta}$	$4.46 \pm 2.08^{\Delta}$	$0.22 \pm 0.11^{\Delta}$	$1073.78 \pm 191.27^{\Delta}$	$1043.73 \pm 195.88^{\Delta}$
激素	$4.00 \pm 1.42^{\Delta}$	$2.75 \pm 0.89^{\Delta}$	$0.20 \pm 0.12^{\Delta}$	$1044.06 \pm 184.48^{\Delta}$	$999.46 \pm 191.98^{\Delta}$
对照	0	0.56 ± 0.19	0.18 ± 0.08	962.08 ± 176.47	987.42 ± 188.02

注: 与对照组比较, $*P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 各组均为 8 只动物

3 4 组动物房水白细胞(WBC)、蛋白含量、LTC₄、PGE₂和 PGF_{2 α} 结果 见表 2。模型组与对照组比较, 注 ET 后房水中白细胞、蛋白含量、LTC₄、PGE₂与 PGF_{2 α} 均显著升高 ($P < 0.01$); 中药组和激素组分别与模型组比较, 上述改变均明显减轻 ($P < 0.01$)。

4 4 组动物血清 TNF 和血浆 LTC₄ 测定结果 见表 3。模型组与对照组比较, 注 ET 后血清 TNF 和血浆 LTC₄ 均明显升高 ($P < 0.01$); 中药组和激素组分别与模型组比较, 上述变化均减轻。

5 病理形态学变化 光镜下见模型组动物虹膜

间质可见血管明显充血, 部分小血管中凝集的血浆蛋白呈栅栏状(斑马条纹状), 个别毛细血管破裂出血, 间质中有渗出的血浆和轻度水肿, 可见炎性细胞浸

表 3 4 组动物血清 TNF、血浆 LTC₄ 变化比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	动物数	TNF(ng/ml)	LTC ₄ (pg/ml)
模型	8	$53.96 \pm 13.82^{*}$	$0.87 \pm 0.13^{*}$
中药	8	$33.31 \pm 12.20^{\Delta\Delta}$	$0.62 \pm 0.14^{\Delta}$
激素	8	$30.91 \pm 11.46^{\Delta\Delta}$	$0.58 \pm 0.13^{\Delta}$
对照	8	13.44 ± 5.32	0.57 ± 0.11

注: 与对照组比较, $*P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

润；睫状突充血明显，血浆渗出较虹膜更加严重，部分可见出血。巩膜、角膜和脉络膜未见改变。中药组与激素组在光镜下也可见虹膜和睫状体充血渗出，少量炎性细胞浸润，但与模型组比较则明显减轻，未见出血。对照组均显示正常结构。

讨 论

清肝泻火汤是在《医宗金鉴》所载龙胆泻肝汤的基础上加减组成的，临床上用该方法治疗肝火证已取得较好疗效。方中以龙胆草、黄芩、栀子等清肝泻火药为君药；生地、白芍养阴柔肝，草决明清肝明目为臣药；泽泻等泻火下行为佐药；甘草调和诸药为使药。用此方治疗家兔实验性肝火证疗效显著，以方测证，认为本实验动物模型符合肝火证。依照本所拟定的中医肝火证辨证标准⁽⁴⁾，凡具备目赤肿痛（结膜及虹膜充血），头胀头痛，口苦口干（饮水量增多，血清晶体渗透压升高），烦躁易怒（激惹试验强阳性），轰鸣暴聋或吐衄，大便秘结和尿黄尿少，舌红苔黄脉数（心率增快）等 7 项中的 4 项，即可诊断为肝火证。我们用 ET 复制的该动物模型与肝火证确有较多相符之处，用清肝泻火汤治疗后可以减轻症状和体征，表明该方具有清肝泻火，顿挫病势的作用。

我所曾对肝火证所涉及的西医病种作过全面流行病学调查，发现急性虹膜睫状体炎最能反映肝火证病变。本实验动物模型经用清肝泻火汤治疗后，提示该方有减轻虹膜与睫状体炎症反应，保护眼血—房水屏障，减少渗出和水肿的作用。

PGs、LTs 和 TNF 等炎症介质是体内一类参与炎症反应并具有致炎作用的自体活性物质^(5,6)，它们

在炎症过程中所引起的血管反应等病理生理作用正日益受到重视。本实验模型组动物注射 ET 前后房水 PGs、LTC₄ 以及血 TNF 和血 LTC₄ 比较均有显著性差异，这与上述报道的情况相符，提示肝火证病理生理基础与炎症介质的产生和释放有关。今后对中医“气有余便是火”以及“肝火是肝阳之异常升动”等课题的深入探讨，似应包括炎症介质的量的变化。本实验中中药组经清肝泻火汤治疗后，上述炎症介质在房水和血液内的浓度均显著降低，提示该方清肝泻火机理可能是通过阻抑炎症介质的产生和释放、或拮抗介质作用来实现的，这有待进一步研究。总之，我们的研究表明，模型组家兔由于没有给予治疗，致使病情逐渐加重，中药组的各项观察指标改变均较模型组轻，提示清肝泻火汤可有效控制病情，扭转病势，保护血—房水屏障和眼葡萄膜组织。

参 考 文 献

1. Atsushi O. Endotoxin-Induced uveitis in rats: Morphological and Biochemical study. Jpn J Ophthalmol 1988; 32: 457—465.
2. 施新猷. 医学动物实验方法. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 448.
3. 魏明竟. 临床检验学. 第 1 版. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987: 188—189.
4. 陈泽奇. 肝火上炎证与肝胆湿热证临床辨证标准的研究. 黑龙江中医药 1992; (4): 12—14.
5. 毛文书. 眼科学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 127—130.
6. 王迪得. 病理生理学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 113—120.

(收稿: 1995—04—05 修回: 1995—10—12)

· 书 讯 ·

大型实用工具书《中药现代研究与临床应用》1、2 已经出版

该书是一部全面、系统、详实地反映常用中药各领域研究成果的大型专著，对常用中药化学成份、分析方法、药理作用、药剂学和炮制研究、组织培养及现代临床应用逐项进行全面的论述，特别是对近十年新的研究成果作了重点的论述，为保障全书内容更为全面，特与美国权威检索机构联网，对国外研究中药的情况进行了计算机检索，获得了大量难得的资料。全书共引用国内外论文超过 15000 篇，其中仅人参就有 500 余篇。该书具有较强的科学性、系统性和实用性，第 I 册收载中药 119 种，第 II 册收载中药 160 种。I、II 册共 279 种。该书对广大的中医药工作者，医药大专院校师生具有很大的参考意义，为中药的研制开发可提供全面系统的基础资料。欲购者请直接汇款至北京东直门内中国中医研究院针灸所收发室转阴健收 (100700)。第 I 册 88 元，第 II 册 85 元，邮购另加 15% 邮费。