凉膈散、银翘散对早期脓毒症炎症因子干预作用比较研究

何宜荣[1],赵国荣,肖碧跃[1],何 栋[2],贺又舜[1],艾碧琛[1]*
(1.湖南中医药大学中医学院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学研究生院,湖南 长沙 410208)

〔**摘要**〕**目的** 观察凉膈散、银翘散对早期脓毒症炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-10 的不同干预作用。**方法** 将 40 只新西兰大耳白兔随机分成空白对照组、模型组、银翘散治疗组、凉膈散治疗组、地塞米松对照组,采用耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素的方法建立脓毒症模型,造模 0.5 h 后药物干预,4 h 后观察兔一般情况及体温,检测血浆内毒素、促炎因子 IL-1β、TNF-α 及抗炎因子 IL-10 水平。**结果** 银翘散组兔全身情况好转,体温、血浆内毒素、IL-1β、TNF-α 的水平均比模型组降低(P<0.01 or 0.05);凉膈散组兔全身症状加重,体温、血浆内毒素、IL-1β、TNF-α、IL-10 与模型组差异无统计学意义(P>0.05)。**结论** 银翘散能抑制早期脓毒症卫分证相关阶段促炎因子 IL-1β、TNF-α 的释放而减轻炎症反应、改善症状,但凉膈散不能抑制 IL-1β、TNF-α 释放、减轻炎症反应。

〔**关键词**〕银翘散;凉膈散;脓毒症;卫分证;炎症因子
〔**中图分类号**〕R285.5;R631+.2 〔**文献标识码**〕A 〔**文章编号**〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.12.002

Comparisons of the Effects of Liangge Powder and Yinqiao Powder on Inflammatory Cytokines in Early Stage of Sepsis

*HE Yirong[1], ZHAO Guorong[1], XIAO Biyue[1], HE Dong[2], HE Youshun[1], AI Bichen[1]**
(1. College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔**Abstract**〕 **Objective** To observe different effects of Liangge Powder and Yinqiao Powder on inflammatory cytokines IL-1β, TNF -α and IL -10 in early stage of sepsis. **Methods** 40 rabbits were randomly divided into blank control group, model group, Yinqiao Powder therapy group, Liangge Powder therapy group and dexamethasone control group. The sepsis model was established by injecting LPS into rabbits´ ear vein, which was given drug intervention after 0.5 h of modeling. After 4 h of modeling, the general conditions, temperatures, levels of plasma endotoxin, IL-1β, TNF-α and IL-10 were observed. **Results** Symtoms in Yinqiao Powder therapy groups were relieved, and their temperatures, levels of plasma endotoxin, IL-1β and TNF-α decreased compared with model group (P<0.01 or P<0.05). Symptoms in Liangge Powder therapy group turned into more serious, levels of plasma endotoxin, IL-1β, TNF-α and IL-10 had no significant difference compared to model group (P>0.05). **Conclusion** Yinqiao Powder can inhibit the releases of pro-inflammatory cytokines of IL-1β and TNF-α in Weifen syndrome related phase of early stage of sepsis, and it can reduce the inflammatory reaction and relieve the symptoms, while Liangge Powder can not.

〔**Keywords**〕 Yinqiao Powder; Liangge Powder; sepsis; Weifen syndrome; inflammatory cytokines

脓毒症是感染导致宿主过度炎症反应的一组临床表现综合征,是严重感染、烧伤、休克、创伤、大手术后常见的并发症,也是危重患者重要的死亡原因。脓毒症常可导致全身炎性反应综合征(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)、多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome,

〔**收稿日期**〕2016-06-21
〔**基金项目**〕国家自然科学基金项目(30801473,81603535),湖南省自然科学基金项目(14JJ3119),湖南中医药大学“中医经典理论与经方应用研究”科技创新团队项目,湖南中医药大学中医临床基础重点学科。
〔**作者简介**〕何宜荣,男,硕士,讲师,研究方向:温病经典方药防治肝病及感染性疾病的临床及实验研究。
〔**通讯作者**〕* 艾碧琛,女,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:52304421@qq.com。

MODS)等,尽管抗感染和器官功能支持技术取得了较大进步,但其病死率仍很高,已成为现代医学面临的常见而复杂的难题。脓毒症的发病机制涉及全身炎症网络效应、免疫功能障碍、凝血异常、代谢紊乱甚至基因多态性等多个方面,其中全身炎症网络效应尤为突出,但随之提出的许多方法诸如 IL-1 受体拮抗剂、IL-8 单克隆抗体、肿瘤坏死因子拮抗剂等,并未能取得预期效果。

临床中不乏治疗脓毒症有效的中医治法与方药,但其调节炎症网络机制尚未阐明,且多是基于脓毒症轻症(早期)、重症、或危急重症而治,未明确辨证,未有效体现“病证结合,方证对应”,在一定程度上影响了疗效的提高。本课题组在以往内毒素血症与卫气营血辨证相关性研究基础上[1-3]开展动物实验,以早期脓毒症卫分证相关阶段为切入点,比较银翘散、凉膈散对早期脓毒症炎症网络的不同干预作用,初步尝试将临床证实有效的脓毒症治法方药与卫气营血辨证相联系,以使脓毒症的中医治疗更具针对性,也有利于建立脓毒症中医辨证论治诊疗方案。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 普通级新西兰大耳白兔,雌雄不拘,雌兔未孕,体质量 1.8~2.0 kg,由长沙市东创实验动物科技服务部提供,动物许可证号:SCXK(湘)2013-0004。饲养温度 24~27 ℃,单笼饲养,自由饮食和摄水,适应性喂养 3 d。

1.1.2 药物 银翘散:连翘 30 g,金银花 30 g,桔梗 18 g,薄荷 18 g,竹叶 12 g,生甘草 15 g,荆芥穗 12 g,淡豆豉 15 g,牛蒡子 18 g,芦根煎汤[4]。凉膈散:川大黄 9 g,朴硝 9 g,甘草 9 g,山栀子仁 5 g,薄荷 5 g,黄芩 5 g,连翘 18 g,竹叶 5 g,白蜜 5 g[4],均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供;地塞米松片为浙江仙琚制药股份有限公司生产,批号 140543。灌胃前一天地塞米松片以蒸馏水溶解,银翘散、凉膈散按常规煎煮方法煎煮,根据体表面积-剂量换算法[5]计算每公斤体质量给药量,然后按 10 mL/kg灌胃量配制成相应浓度的药液,4 ℃保存备用。

1.1.3 试剂 大肠杆菌内毒素 Escherichia coli 0111:B4 购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司(生产批号 114M4009V),无菌条件下用生理盐水配制成 20 μg/mL 的溶液,使用前以温水温浴至 39 ℃。内毒素检测鲎试剂盒购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司(生产批号 140430)。IL-1β、TNF-α、IL-10 ELISA Kit 购自武汉博士德生物工程有限公司(批号分别为 EK0393,EK0527,EK 0417)。

1.1.4 主要仪器与设备 MK3 酶标仪(芬兰 LABSYSTEMS 集团),UV-1900PC 紫外分光光度计(美析),KDC-2046 低温大容量离心机(中国科学技术大学科技实业总公司中佳光电仪器分公司),ELT-13V-85V34 超低温冰箱(美国 HARRIS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 将 40 只兔子先按性别和体质量分层,后按样本分配随机数字表法分成 5 组,每组 8 只,分别为空白对照组、模型组、银翘散治疗组(以下简称“银翘散组”)、凉膈散治疗组(以下简称“凉膈散组”)、地塞米松对照组(以下简称“地塞米松组”)。

1.2.2 造模 在脓毒症中,失控的炎性反应、免疫功能紊乱等均由内毒素直接或间接触发[6],脓毒症模型采用前期以兔耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素初步建立的内毒素血症卫分证、气分证、营血分证相关模型(兔耳缘静脉注射 10 μg/kg 的内毒素后至两小时的阶段与卫分证相关)[1-3]。模型组、银翘散组、凉膈散组、地塞米松组均经耳缘静脉注射内毒素 10 μg/kg 造模,空白组注射等容量生理盐水。

1.2.3 给药 根据体表面积-剂量换算法[5]计算,银翘散每公斤兔每次给药量为 4.1 g,根据兔灌胃容量 10 mL/kg 将凉膈散配制成浓度为 0.041 g/mL 的药液;凉膈散每公斤兔每次给药量为 1.7 g,根据兔灌胃容量 10 mL/kg 将凉膈散配制成浓度为 0.17 g/mL 的药液;地塞米松每公斤兔每次给药量为 0.036 mg,按 10 mL/kg灌胃容量配制成0.0 036 mg/mL 的药液。注射内毒素后 0.5 h,银翘散组、凉膈散组、地塞米松组分别给予相应药物灌胃 10 mL/kg,空白组与模型组则以等容量温开水灌胃,各组均灌胃 1 次。

1.2.4 实验观察 观察期从注射内毒素开始至注射后 4 h。(1)一般情况观察:兔的全身状态、精神状态、饮水及进食情况、大小便、皮肤、耳廓、结膜、舌象等变化;(2)体温:实验前 24 h 内测体温 3 次,取平均值为基础体温。注射内毒素 4 h 测体温,计算各组发热净增值(△T)平均值,△T=实时体温-基础体温;(3)血浆内毒素及炎症因子:第 4 小时对各组兔进行心脏采血 20 mL,其中 5 mL 放入无热原肝素抗

凝管，低温离心机中 3 000 r/min 提取血浆，放入无热原管，按照试剂盒说明书操作步骤检测血浆内毒素（终点显色法）。另 15 mL 以低温离心机 3 000 r/min 离心 10 min，常规分离血清，于-70 ℃冰箱内冻存，采用 ELISA 法集中成批检测 IL-1β、TNF-α、IL-10，按试剂盒说明书进行检测。

1.2.5　统计方法　采用 spss 19.0 软件进行统计分析。所有实验数据换算成"$\bar{x}\pm s$"表示，进行单因素方差分析，若方差齐，进一步组间两两比较用 t 检验。若方差不齐，则用非参数检验的 Tamhane´sT2 法，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1　一般情况观察

注射内毒素后 0.5 h，模型组、银翘散组、凉膈散组、地塞米松组兔出现懒动、少食少饮，部分兔出现耸毛、发抖、喷嚏，大小便正常。药物干预后，银翘散组、地塞米松组兔全身情况逐渐好转；模型组、凉膈散组耸毛、发抖、喷嚏逐渐消失，仍懒动、蜷缩、少食少饮，在 2~3 h 后活动逐渐增加，饮水增加，小便黄、少，部分兔出现便溏、水样便或黏液便，呼吸、心率增加。空白组兔未见上述表现。各组兔在观察期均未见明显球结膜充血、耳廓及皮下出血点。

2.2　各组发热净增值（△T）比较

与空白组比较，模型组、凉膈散组体温升高（$P<0.01$），地塞米松组及银翘散组差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组比较，地塞米松组及银翘散组体温升高不明显（$P<0.01$），凉膈散组差异无统计学意义（$P>0.05$）；凉膈散组体温比地塞米松组及银翘散组体温升高（$P<0.01$）；地塞米松组与银翘散组之间差异无统计学意义（$P>0.05$），结果见表 1。

2.3　各组血浆内毒素水平比较

与空白组比较，模型组、凉膈散组内毒素水平升高（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）；与模型组比较，凉膈散组差异无统计学意义（$P>0.05$）；地塞米松组、银翘散组内毒素水平升高不明显（$P<0.01$），与地塞米松组和银翘散组比较，凉膈散组内毒素水平升高（$P<0.05$）；地塞米松组与银翘散组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表 1。

2.4　各组血清 IL-1β、TNF-α、IL-10 水平比较

与空白组比较，各组 IL-1β、TNF-α 均升高，模型组、凉膈散组 IL-10 升高（$P<0.05$）；与模型组比较，地塞米松组 IL-1β、TNF-α、IL-10 降低（$P<0.01$ 或 $P<0.05$），银翘散组 IL-1β、TNF-α、IL-10 均降低（$P<0.01$ 或 $P<0.05$），凉膈散组 IL-1β、TNF-α、IL-10 差异无统计学意义（$P>0.05$）；与地塞米松组比较，银翘散组 IL-1β、TNF-α、IL-10 差异无统计学意义（$P>0.05$），凉膈散组 IL-1β、TNF-α、IL-10 升高（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）；与银翘散组比较，凉膈散组 IL-1β、TNF-α、IL-10 升高（$P<0.01$ 或 $P<0.05$）。结果见表 2。

表 1　各组发热净增值（△T）、血浆内毒素比较　（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	△T	内毒素（EU/mL）
空白组	0.05±0.03	0.26±0.09
模型组	1.25±0.47**	0.45±0.17**
地塞米松组	0.08±0.06△△	0.30±0.11△
银翘散组	0.07±0.04△	0.28±0.23△
凉膈散组	1.40±0.63**▲▲○○	0.37±0.16*▲○
F 值	19.64	6.11
P 值	<0.001	<0.01

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与地塞米松组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$；与银翘散组比较，○$P<0.05$，○○$P<0.01$。

表 2　各组血清 IL-1β、TNF-α、IL-10 水平比较　（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	IL-1β(pg/mL)	TNF-α(ng/mL)	IL-10(pg/mL)
空白组	18.25±4.12	0.56±0.21	26.55±16.21
模型组	42.32±9.26**	1.07±1.13**	35.49±9.25*
地塞米松组	23.47±9.11*△△	0.72±0.51*△	22.25±10.40△△
银翘散组	21.99±6.58*△△	0.79±0.44*△	25.11±13.50△
凉膈散组	36.67±10.45**▲▲○○	0.95±0.88**▲○	34.27±15.61*▲▲○○
F 值	17.63	6.98	11.39
P 值	<0.001	<0.01	<0.001

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与地塞米松组比较，▲$P<0.05$，▲▲$P<0.01$；与银翘散组比较，○$P<0.05$，○○$P<0.01$。

3 讨论

中医学没有脓毒症的概念，因其由感染所致，以发热为核心征象，还常见心动过速、呼吸急促等症状，故属中医学"外感热病"范畴，脓毒性休克和 MODS 则属于"厥证"、"脱证"。叶天士创立的卫气营血辨证至今 300 多年，一直有效指导临床辨证治疗外感热病，"卫之后方言气，营之后方言血"，由卫而气而营而血，是病邪由浅入深，病情由轻转重的变化过程。脓毒症 SIRS 至严重脓毒症或脓毒性休克、MODS 是一动态的连续过程，其演变规律类似卫气营血的变化，故现在多数学者认为脓毒症与卫气营

血辨证各阶段证候的表现存在大致对应关系：脓毒症前驱期或急性典型期之早期与卫分证类似，急性典型期与气分证类似，SIRS 阶段主要表现类似气分证乃至营分证的一些特点，严重脓毒症、脓毒性休克及后期发展的 MODS 则类似营分证或者血分证[6-7]。

研究表明在脓毒症中，失控的炎性反应、免疫功能紊乱、高代谢状态及多器官功能损害均由内毒素直接或间接触发[8]。内毒素主要通过促使单核-巨噬细胞等释放大量炎性细胞因子，脓毒症早期主要是感染引起的以大量促炎介质释放为主要特征的炎症反应综合征期，此期细胞免疫状态是增高的。早期主要产生 TNF-α、IL-1β 等前炎症细胞因子激发 SIRS，之后随着脓毒症促炎反应发展，机体启动代偿性抗炎反应机制，产生 IL-10 等抗炎细胞因子以拮抗过度产生的前炎症细胞因子[9]。促炎反应/抗炎反应动态变化可造成机体的免疫病理损伤。故 TNF-α、IL-1β、IL-10 三者是 SIRS 的重要动态监测指标。银翘散出自清代医家吴鞠通所著《温病条辨》，为辛凉平剂，具有辛凉解表、清热解毒之功效，主治风温初起，现代研究发现银翘散有明显的抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏的作用，是温病卫分证临床常用方剂；糖皮质激素具有强大的抗炎作用，可显著改善脓毒症患者的预后，小剂量糖皮质激素（如地塞米松）常用于脓毒症治疗。本实验给兔注射内毒素造脓毒症模型，注射内毒素 1 h 后给予银翘散、地塞米松干预治疗，结果发现银翘散组体温下降，全身情况好转，同时银翘散降低了血浆内毒素、促炎因子 IL-1β、TNF-α 的水平，与地塞米松组无明显差异。可见在此阶段银翘散发挥了较好的治疗作用，其作用机制之一是通过抑制促炎因子的释放而减轻炎症反应。这反过来也提示兔耳缘静脉注射内毒素后的 1 h 阶段与卫分证相关，与前期实验结果一致[1-3]。

凉膈散出自《太平惠民和剂局方》，泻火通便、清上泄下，能有效抑制内毒素导致的炎症反应、减轻组织病理损害、降低死亡率，从功效来看属于气分证的“清气法”。实验中给兔注射内毒素后 1 h 以凉膈散灌胃后至 4 h，兔体温升高，全身症状无缓解，并且进一步加重，血浆内毒素、促炎因子 IL-1β、TNF-α 水平没有降低，与模型组差异不显著，根据前期研究结果，此期相当于已进入脓毒症气分证相关阶段[1-3]，说明凉膈散未能及时控制病情发展。此外，IL-10 为抗炎因子，感染初期尚不足以调动机体的自我调节机制来促进抗炎因子的释放，IL-10 水平并不会升高，随病情加重、炎症反应增强才会逐渐释放出来。本实验中银翘散组、地塞米松组 IL-10 与空白组无差异，而模型组、凉膈散组 IL-10 升高，这也说明此阶段应用凉膈散不能控制病情发展。可见，尽管有实验研究证实加味凉膈散在早期脓毒症解毒抗炎、攻邪安正方面显示出良好的治疗作用，能有效防止脓毒症的进一步恶化[10]，但若过早应用，即在脓毒症早期的卫分证阶段即用凉膈散来“清”，则违背了叶天士“到气才可清气”之意，可能会使邪气被凉遏而无法外达，此期应用凉膈散则弊大于利，而银翘散的辛凉解表之法才更合适。这从另一个角度说明卫气营血理论指导感染性疾病的治疗疗效卓著，是因为在不同阶段根据不同证候采用不同的方法治疗，这正是叶天士“在卫汗之可也，到气才可清气”的辨证施治内涵之一。

参考文献：

[1] 艾碧琛，赵国荣，贺又舜，等.卫气营血阶段性与内毒素血症兔不同时相症状、体征的相关性研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2011，31(3)：20-23.

[2] 赵国荣，艾碧琛，贺又舜，等.内毒素血症兔症状、体征动态变化与卫气营血传变的相关性[J].中医杂志，2011，52(15)：1305-1307.

[3] 艾碧琛，贺又舜，赵国荣，等.内毒素血症兔血浆内毒素及组织病理动态改变与卫气营血辨证相关性研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2011，18(10):35-37.

[4] 李 飞.中医药学高级丛书·方剂学 [M]. 2 版.北京：人民卫生出版社，2011:183，499.

[5] 贺石林.中医科研设计与统计学[M].长沙：湖南科学技术出版社. 2012：48-49.

[6] Feng MJ, Shi F, Qiu C, et al. MicroRNA-181a, -146a and -146b in spleen CD4+ T lymphocytes play proinflammatory roles in a murine model of asthma [J]. International Immunopharmacolog, 2012, 13(3): 347-353.

[7] 杨 广，张敏州，郭力恒，等.从卫气营血辨证看全身炎症综合征[J].时珍国医国药，2008，19(2)：392-393.

[8] 曾凡鹏，陈锦河，陈冬莲.养阴清热方对严重脓毒症患者免疫功能及预后的影响[J].中国临床研究，2014，27(1)：16-18.

[9] 王鹿杰，薛庆亮，刘杜姣，等.脓毒症机体免疫变化及治疗的研究进展[J].临床肺科杂志，2013，18(2)：325-327.

[10] 梁 勇，曹书华，王勇强，等.加味凉膈散对脓毒症患者血小板活化及凝血功能影响的临床研究[J].辽宁中医杂志，2010，37(7)：1289-1291.

（本文编辑 杨 瑛）