

清瘟败毒饮对脓毒症大鼠血清降钙素原及 C-反应蛋白水平的影响

胡云霞¹ 赵智强² 杨洁¹ 陈明祺³ 王醒³

(1. 溧阳市中医院重症医学科, 江苏 溧阳 213300; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210029;

3. 江苏省中医院重症医学科, 江苏 南京 210029)

【摘要】 目的 观察清瘟败毒饮对脓毒症大鼠血清降钙素原(PCT)和 C-反应蛋白(CRP)水平的影响, 探讨清热解毒法治疗脓毒症的机制。**方法** 将 50 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组($n=5$)、模型组($n=25$)及清热解毒组($n=20$)。采用腹腔注射脂多糖(LPS) 5 mg/kg 制备脓毒症大鼠模型; 对照组给予等量生理盐水。清热解毒组于制模后 2 h 首次给予清瘟败毒饮(生石膏 30 g, 生地黄 10 g, 水牛角 15 g, 黄连 4 g, 山栀子 5 g, 桔梗 5 g, 黄芩 5 g, 知母 5 g, 赤芍 5 g, 玄参 5 g, 连翘 5 g, 甘草 5 g, 牡丹皮 5 g, 竹叶 5 g) 0.01 mL/g, 其余给药时间为每日 08:00~09:00, 每日 1 次; 模型组给予等量温开水灌胃。对照组、模型组及清热解毒组于制模后不同时间点各取 5 只大鼠经腹主动脉取血, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清 PCT、CRP 水平; 留取肺、肠组织标本, 光镜下观察组织病理学改变。**结果** 与对照组比较, 制模后 2 h 模型组 PCT 水平即明显增高(ng/L : 332.32 ± 22.85 比 70.46 ± 3.18 , $P < 0.01$), 并持续到制模后 72 h。制模后 2、8、48 h 对照组和模型组 CRP 水平比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 制模后 24 h、72 h 模型组明显低于对照组($\mu\text{g/L}$: 281.34 ± 32.81 、 237.84 ± 41.42 比 350.09 ± 56.67 , $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。制模后 8 h、24 h 模型组和清热解毒组 PCT 比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 清热解毒组制模后 48 h 起 PCT 明显低于模型组(ng/L : 321.57 ± 28.00 比 358.12 ± 10.14 , $P < 0.05$), 并持续到制模后 72 h(ng/L : 269.50 ± 49.10 比 347.69 ± 26.90 , $P < 0.05$)。清热解毒组制模后 8 h 起 CRP 水平即明显低于模型组($\mu\text{g/L}$: 232.73 ± 13.29 比 335.35 ± 53.78 , $P < 0.05$), 制模后 72 h 两组比较差异仍有统计学意义($\mu\text{g/L}$: 177.31 ± 6.70 比 237.84 ± 41.42 , $P < 0.05$)。与模型组比较, 清热解毒组肺组织炎性细胞浸润减少, 肠黏膜炎症及间质水肿减轻。**结论** 清热解毒法可有效降低 LPS 诱导的脓毒症大鼠血清 PCT、CRP 水平; 改善炎性细胞在组织中的浸润, 从而起到保护组织器官的作用。

【关键词】 脓毒症; 清热解毒法; 降钙素原; C-反应蛋白

An experimental study of influence of Qingwen Baidu decoction on serum procalcitonin and C-reactive protein levels in septic rats Hu Yunxia*, Zhao Zhiqiang, Yang Jie, Chen Mingqi, Wang Xing. *Department of Critical Care Medicine, Liyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liyang 213300, Jiangsu, China
Corresponding author: Wang Xing, Email: wangxing1964@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of Qingwen Baidu decoction (QBD) on serum procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) levels in septic rats and study the mechanism of heat-clearing and detoxifying method for treatment of sepsis. **Methods** Fifty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group ($n = 5$), model group ($n = 25$), and heat-clearing and detoxifying experimental group (experimental group, $n = 20$). The septic model was reproduced by intra-peritoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg). In control group, an equal volume of normal saline was given. After modeling for 2 hours, the heat-clearing and detoxifying experimental group received QBD the first time (composition of the decoction: Gypsum Fibrosum Recens 30 g, Rehmanniae Radix 10 g, Bubali Cornu 15 g, Coptidis Rhizoma 4 g, Gardeniae Fructus 5 g, Platycodonis Radix 5 g, Scutellariae Radix 5 g, Anemarrhenae Rhizoma 5 g, Paeoniae Radix Rubra 5 g, Scrophulariae Radix 5 g, Forsythiae Fructus 5 g, Glycyrrhizae Radix 5 g, Moutan Cortex 5 g, Lophatheri Herba 5 g) by gavage (0.01 mL/g); the rest administration time was 08:00 to 09:00, once a day. The rats in model group were given an equal volume of warm water by gavage. At different time points after modeling, the blood of 5 rats in control group, model group, and experimental group was collected from the abdominal aorta. The serum PCT and CRP levels were tested by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the pathological changes in lung and intestinal tissue were observed under a light microscope. **Results** Compared with the control group, the PCT level of the model group after modeling for 2 hours was significantly increased (ng/L : 332.32 ± 22.85 vs. 70.46 ± 3.18 , $P < 0.01$), this situation continued until 72 hours after modeling. CRP level in the comparison between the control and model groups did not have statistical significant difference at 2, 8, and 48 hours after modeling (all $P > 0.05$). The level of CRP in model group was lower than that of control group at 24 hours and 72 hours after modeling ($\mu\text{g/L}$: 281.34 ± 32.81 , 237.84 ± 41.42 vs. 350.09 ± 56.67 , $P < 0.05$ and $P < 0.01$). There were

no statistically significant differences in PCT levels between model group and experimental group after modeling for 8 hours and 24 hours (both $P > 0.05$). The PCT level of experimental group was significantly lower than that of model group beginning from 48 hours after modeling (ng/L: 321.57 ± 28.00 vs. 358.12 ± 10.14 , $P < 0.05$), and this situation continued until 72 hours after modeling (ng/L: 269.50 ± 49.10 vs. 347.69 ± 26.90 , $P < 0.05$). The CRP level of experimental group was significantly lower than that of model group beginning from 8 hours after modeling ($\mu\text{g/L}$: 232.73 ± 13.29 vs. 335.35 ± 53.78 , $P < 0.05$), this statistical significant difference between the two groups persisted until 72 hours after modeling ($\mu\text{g/L}$: 177.31 ± 6.70 vs. 237.84 ± 41.42 , $P < 0.05$). Compared to those in the model group, the lung tissue inflammatory cell infiltration, the intestinal mucosal inflammation and interstitial edema were milder in the experimental group. **Conclusion** Heat-clearing and detoxifying therapy can effectively reduce the serum PCT and CRP levels of septic rats induced by LPS, and it can alleviate the infiltration of inflammatory cells in lung tissues so as to play a role in protection of tissue organ.

【Key words】 Sepsis; Heat-clearing and detoxifying method; Procalcitonin; C-reactive protein

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),是感染、创伤、烧伤、休克等临床急危重症患者常见的并发症,其诱发的脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)已成为重症医学科的主要死因^[1-3]。随着中医领域对脓毒症研究的不断深入,“毒”邪作为一种危害人体较强烈的致病因素逐步得到认识,并作为中医病因病机学说的重要因素被提出,针对毒邪采用解毒法、排毒法、抗毒法等治疗方法临床疗效显著^[4]。本研究观察清热解毒法对脂多糖(LPS)诱导的脓毒症大鼠血清降钙素原(PCT)、C-反应蛋白(CRP)水平的影响,并通过观察大鼠肺、肠组织病理学改变情况,进一步探讨清热解毒法对脓毒症全身炎症反应的调节机制,以期为临床治疗脓毒症提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及药物:选择 50 只雄性 SD 大鼠,体质量 190~230 g,购自解放军南京军区南京总医院动物实验中心,许可证号:SYXK(苏)2012-0047,动物合格证号:SCXK(军)2007-012。选用清瘟败毒饮^[5-6]作为清热解毒法代表方(生石膏 30 g,生地 10 g,水牛角 15 g,黄连 4 g,山栀子 5 g,桔梗 5 g,黄芩 5 g,知母 5 g,赤芍 5 g,玄参 5 g,连翘 5 g,甘草 5 g,牡丹皮 5 g,竹叶 5 g),药材为南京中医药大学门诊部同一批次产品,煎制成 500 mL 药液,含生药约 3 g/mL。实验前加温开水稀释至 1.5 g/mL,恒温保存。实验时大鼠灌胃剂量为成人每日剂量的 8 倍,即 1.45 g/100 g(约 0.01 mL/g)。

1.2 动物模型的建立:大鼠制模前 1 d 禁食,称重,采用左侧腹腔注射 LPS(来源于大肠杆菌 055:B5,美国 Sigma 公司,货号 L-2880)5 mg/kg,即 1 mL/kg 建立脓毒症模型^[7-9]。方法:将 40 mg LPS 溶于生理盐水中,定容至 8 mL,浓度为 5 mg/mL。对照组腹腔注射等量生理盐水。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 动物分组与给药:将 50 只大鼠按随机数字表法分为对照组($n=5$)、模型组($n=25$)及清热解毒组($n=20$)。对照组及模型组于制模后 2 h 各处死 5 只大鼠用于观察 LPS 脓毒症模型大鼠 PCT、CRP 的变化。清热解毒组给予清瘟败毒饮 0.01 mL/g 灌胃,首次给药时间为制模后 2 h,其余给药时间为每日 08:00~09:00,每日 1 次;剩余 20 只模型组大鼠给予等量温开水灌胃。模型组和清热解毒组分别于制模后 8、24、48、72 h 各处死 5 只大鼠,用于观察清瘟败毒饮对脓毒症大鼠的治疗作用。

1.4 检测指标及方法:左腹腔注射 0.3% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉大鼠后腹主动脉取血^[10],离心取上清液,于 -20℃ 冻存备检。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清 PCT、CRP 浓度。处死大鼠后取右肺中叶及幽门下方 3~4 cm 十二指肠,在 10% 甲醛水溶液中固定 24 h 后,矢状切面取厚约 5 mm 肺及肠组织,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理学改变。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 13.0 软件进行数据分析;计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多时间点比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 检验;两独立样本比较,方差齐采用独立样本 t 检验,方差不齐采用非参数检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间血清 PCT、CRP 水平比较(表 1):制模后 2 h 起模型组血清 PCT 水平即明显高于对照组,持续到制模后 72 h($P < 0.01$)。对照组和模型组制模后 2、8、48 h CRP 水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),制模后 24 h、72 h 模型组明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。制模后 8 h 和 24 h,清热解毒组 PCT 水平与模型组比较差异无统计学

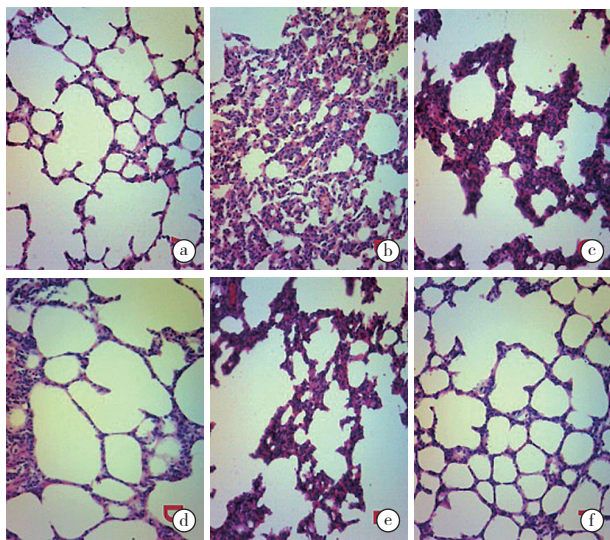
意义($P>0.05$);制模后 48 h 和 72 h,清热解毒组 PCT 水平较模型组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。制模后 8、24、48 及 72 h 时,清热解毒组 CRP 水平均较模型组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1 各组不同时间点血清 PCT、CRP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	制模后时间	动物数(只)	PCT(ng/L)	CRP(μ g/L)
对照组	2 h	5	70.46 $\pm$ 3.18	350.09 $\pm$ 56.67
模型组	2 h	5	332.32 $\pm$ 22.85 ^a	399.29 $\pm$ 61.23
	8 h	5	389.89 $\pm$ 20.45 ^a	335.35 $\pm$ 53.78
	24 h	5	395.23 $\pm$ 94.91 ^a	281.34 $\pm$ 32.81 ^b
	48 h	5	358.12 $\pm$ 10.14 ^a	320.68 $\pm$ 16.94
	72 h	5	347.69 $\pm$ 26.90 ^a	237.84 $\pm$ 41.42 ^a
清热解毒组	8 h	5	381.59 $\pm$ 56.72 ^a	232.73 $\pm$ 13.29 ^{ad}
	24 h	5	459.36 $\pm$ 79.35 ^a	203.47 $\pm$ 36.41 ^{ac}
	48 h	5	321.57 $\pm$ 28.00 ^{ac}	195.25 $\pm$ 5.20 ^{ad}
	72 h	5	269.50 $\pm$ 49.10 ^{ac}	177.31 $\pm$ 6.70 ^{ac}

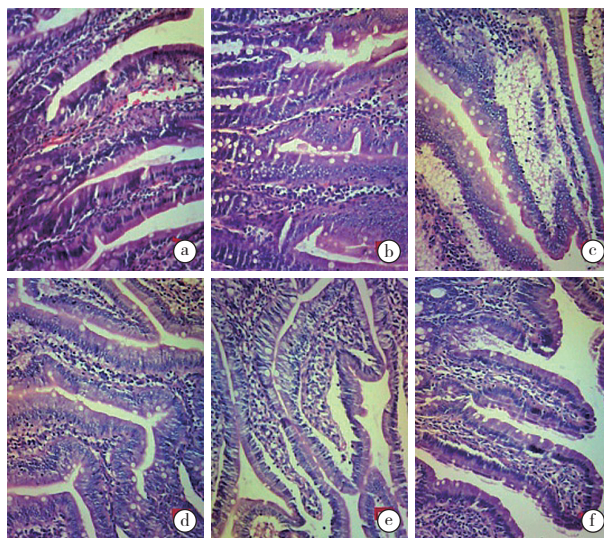
注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组同期比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

2.2 光镜下观察肺、肠组织病理学改变(图 1~2):与对照组比较,制模后 2、24 及 72 h 模型组表现为肺泡隔明显增厚、肺泡扩张、间质可见中等量炎性细胞浸润;肠黏膜中度炎症,间质水肿较明显。制模后 24 h 及 72 h 清热解毒组表现为肺泡轻度扩张,间质散在少量炎性细胞浸润;肠黏膜轻中度炎症,间质轻度水肿。



(a): 对照组; (b): 模型组; (c): 制模后 24 h 模型组;
(d): 制模后 24 h 清热解毒组; (e): 制模后 72 h 模型组;
(f): 制模后 72 h 清热解毒组

图 1 光镜下观察肺组织病理学改变(HE 染色 高倍放大)



(a): 对照组; (b): 模型组; (c): 制模后 24 h 模型组;
(d): 制模后 24 h 清热解毒组; (e): 制模后 72 h 模型组;
(f): 制模后 72 h 清热解毒组

图 2 光镜下观察肠组织病理学改变(HE 染色 高倍放大)

3 讨论

脓毒症所诱发的脓毒性休克、MODS 已成为重症医学科的主要死因,早期识别脓毒症对降低病死率起重要作用,而 PCT、CRP 已被纳入脓毒症 2001 年新诊断标准中^[11-12]。各种原因所致的组织损伤均可致 CRP 浓度升高,其水平与炎症的出现及严重程度相关^[13]。PCT 在全身细菌性感染时明显升高,其浓度随感染的严重程度而递增,可用于鉴别诊断及评估疾病严重程度^[14-16]。孙萍等^[17]研究脓毒症患者白细胞计数及血清 PCT 和 CRP 的动态变化发现, PCT 与疾病严重程度呈显著正相关。Jain 等^[18]研究认为, PCT 可作为脓毒症的预后指标。因此,本研究选用 PCT、CRP 作为检测指标与目前国内研究一致。

治疗脓毒症需要多种手段综合起来,中医药治疗是其中一个重要措施。目前认为,脓毒症的基本病机是“正虚毒损,络脉瘀阻”^[19-21]。“毒”作为脓毒症的重要致病因素被研究,毒邪所致脓毒症多比较暴戾、凶顽、难治,易造成脏腑功能紊乱^[22-23]。毒邪常依附于痰、热、瘀、湿等邪毒而致病,临床症状复杂,如依附于热者,热毒燔灼可见高热、烦躁、昏愦、苔黄、脉数等^[24-25]。治疗毒邪的方法包括解毒法、排毒法、抗毒法等。解毒法包括两种法则:一则祛邪即寓解毒,邪衰而不能生毒,且毒少依附,易于分解,如热甚成毒者,选用石膏、黄芩等药物苦寒直折、清其邪热,杜绝其产毒之源;二则选用具有直接解

毒功效的药物,如具有解热毒作用的大青叶、蒲公英等^[26]。研究发现,清瘟败毒饮具有抑制过度免疫应答及调节炎症反应的作用^[27-28]。清瘟败毒饮集辛寒清气之白虎汤、苦寒泻水之黄连解毒汤、轻清宣气之连翘、竹叶、桔梗以及清营凉血之犀角地黄汤加玄参组成,“此大寒解毒之剂,重用石膏,先平甚者,而诸经之火,自无不安矣”^[29]。方中含大量清热之品以祛除热邪,邪去则毒不能自生,毒亦少有依附;亦含解毒功效之玄参、黄芩、黄柏等,故选用清瘟败毒饮作为清热处理法的代表方剂。

在脓毒症发生发展过程中,炎症反应起到了重要作用,过度的炎症反应易引起组织自身受损、毛细血管弥漫性损伤、器官功能障碍甚至衰竭等临床表现^[30-31]。本研究结果显示,清热解毒组与模型组比较,制模后 8 h 及 24 h PCT 水平差异无统计学意义,至 48 h 时清热解毒组较模型组明显降低,提示清热解毒法在治疗 48 h 后逐渐显效。在治疗早期未能显示出疗效的原因,考虑可能与药物尚未达到有效浓度,或与大鼠机体对 LPS 诱导的反应强烈有关。制模后 8、24、48、72 h 两组 CRP 水平比较差异均有统计学意义,提示疗效良好。同时本研究观察到,清热解毒组肺组织炎性细胞浸润减少,肠黏膜炎症及间质水肿减轻。

综上所述,清瘟败毒饮具有降低脓毒症大鼠血清 PCT、CRP 水平,改善大鼠肺、肠组织病理学表现的作用,且这种作用或将在脓毒症中后期更为显著,可以认为,清热解毒法可有效调节脓毒症的炎症反应。由于本研究动物数少,上述结论是否具有可重复性,以及清热解毒法对脓毒症大鼠生命体征、免疫功能等方面的影响还需进一步研究证实。

参考文献

- [1] Briegel J, Mohnle P. International guidelines of the Surviving Sepsis Campaign: update 2012 [J]. *Anaesthesist*, 2013, 62(4): 304-309.
- [2] Artero A, Zaragoza R, Camarena JJ, et al. Prognostic factors of mortality in patients with community-acquired bloodstream infection with severe sepsis and septic shock [J]. *J Crit Care*, 2010, 25(2): 276-281.
- [3] 姚咏明,盛志勇. 脓毒症防治学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 1.
- [4] 赵智强. 中医毒邪学说与疑难病治疗 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 8.
- [5] 于征森,刘志辉,陈晶,等. 清瘟败毒饮对温病暑热证大鼠炎症介质的影响 [J]. *中药药理与临床*, 210, 26(3): 3-6.
- [6] 张弛,宋乃光. 治疫三名方比较研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(8): 514-516, 528.
- [7] Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1): 137-143.
- [8] 高晓刚,陈德昌. 动物模型在脓毒症研究中的意义 [J]. *中国急救医学*, 2006, 26(10): 685-686.
- [9] 齐海宇,肖红丽,阴赅宏,等. 内毒素血症急性肝损伤的特点及致病机制 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(2): 144-146.
- [10] 张栋. 不同麻醉药对大鼠麻醉效果的比较 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(1): 19-20.
- [11] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31(4): 1250-1256.
- [12] 陈炜,赵磊,牛素平,等. 不同炎症因子对细菌性血流感染所致脓毒症患者的早期诊断价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(3): 165-170.
- [13] 简序,王金和,程佩兰. C 反应蛋白的临床研究进展 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(5): 471-473.
- [14] 呼新建,常晓悦. 降钙素原的研究进展 [J]. *医学综述*, 2010, 16(12): 1795-1797.
- [15] 奚晶晶,王红,杨钧. 降钙素原在脓症患者中的动态变化及中药干预的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(6): 327-329.
- [16] 赵栋,周建新,原口刚,等. 降钙素原在心脏术后感染性与非感染性全身炎症反应综合征的鉴别诊断价值 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 478-483.
- [17] 孙萍,王东强,刘伟,等. 脓症患者白细胞计数及血清降钙素原和 C-反应蛋白的动态变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 516-518.
- [18] Jain S, Sinha S, Sharma SK, et al. Procalcitonin as a prognostic marker for sepsis: a prospective observational study [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 458.
- [19] 李雅飞,尤可. 脓毒症中医病机及治则探讨 [J]. *河南中医*, 2009, 29(3): 236-237.
- [20] 李成强,常毓颖,沈勤康. 脓毒症的中医药治疗研究进展 [J]. *中国中医急症*, 2011, 20(7): 1120-1122.
- [21] 张云松,朱晓林. 从毒瘀虚论治脓毒症 [J]. *山西中医*, 2012, 28(7): 1-3.
- [22] 赵昌林. 论毒邪病因学说 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(1): 80-83.
- [23] 胡云霞,王醒. 略论脓毒症中“毒”的形成与致病 [J]. *中国中医急症*, 2013, 22(4): 599, 606.
- [24] 张平平,王庆树,李志军,等. 血必净注射液对脓症患者凝血功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(3): 198-200.
- [25] 孙茜,李银平. 血必净治疗脓毒症凝血功能障碍的研究进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(6): 476-480.
- [26] 赵智强. 略论毒邪的致病特点、界定与治疗 [J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 2003, 19(2): 73-75.
- [27] 冷建春,罗燕,郭小刚. 清瘟败毒饮对脓毒症的疗效及对部分血清免疫学指标的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(3): 758-760.
- [28] 冷建春,王卫星,李巧林,等. 清瘟败毒饮治疗脓毒症疗效观察及对细胞因子的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2009, 16(6): 11-13.
- [29] 王文远,杨进. 余师愚《疫疹一得》治疫思想探析 [J]. *吉林中医药*, 2011, 31(6): 499-501.
- [30] Lewis DH, Chan DL, Pinheiro D, et al. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells [J]. *J Vet Intern Med*, 2012, 26(3): 457-482.
- [31] 陈明祺,鲁俊,程璐,等. 四逆汤对脓毒症大鼠炎症反应及免疫功能的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(3): 188-192.

(收稿日期: 2014-08-12)

(本文编辑: 李银平)