

王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4味汤对温病湿热模型、炎症反应因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的影响

王雪峰 韩雪梅 任存霞

(内蒙古医科大学中医学院中医临床基础教研室,呼和浩特,010059)

摘要 目的:通过动物实验观察王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4味汤对大鼠湿热模型、炎症反应因子血清白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的作用影响。方法:建立大鼠湿热炎症反应模型,设空白组、模型组、对照药组、中药组、蒙药组分别采取不同处理方法观察记录各项指标,血清细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 检测采用酶联免疫吸附法(ELISA)。结果:中蒙医温病经典方在治疗大鼠湿热症状上具有可靠疗效,尤其在改善大鼠进食饮水减少,大便稀软,口角眼角分泌物增多等方面有显著成效。ELISA 检测显示对照药组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 无意义,中药组 TNF- α 有统计学意义($P < 0.01$),对 IL-1 β 、IL-6 无意义($P > 0.05$),蒙药组 TNF- α 有统计学意义($P < 0.01$)、IL-6 有统计学意义($P < 0.05$),对 IL-1 β 无意义($P > 0.05$)。结论:王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4味汤在解除湿热症状上有切实可靠的作用,对腹腔炎症反应引起的发热及炎症反应,虽然细胞因子血清检测没有得出有力检验数据支持,但动物模型治疗后期各项体征监测都有好转。ELISA 检测显示中药组 TNF- α 有统计学意义($P < 0.01$);蒙药组 TNF- α 有统计学意义($P < 0.01$)、IL-6 有统计学意义($P < 0.05$)。

关键词 王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4味汤;湿热模型;IL-1 β ;IL-6;TNF- α

Wangshilianpu Drink Plus Talcum, Baical Skullcap Root and Yindari-4 Decoction Treating Animal Model of Warm Disease with Damp-heat Syndrome and Its Effects on the Inflammation Factors of IL-1 β , IL-6 and TNF- α

Wang Xuefeng, Han Xuemei, Ren Cunxia

(Department of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohot 010059, China)

Abstract Objective: To observe Wangshilianpu drink plus talcum, baical skullcap root and Yindari-4 decoction treating rat models with damp-heat syndrome, and its effect on inflammatory factors of Factors of IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Methods:** Damp heat inflammation of rats model was set up, and there were four groups of rats including the blank group, model group, control group, the Chinese medicine group, and Mongolian medicine group. Different treatments were conducted and index, serum cytokines beta, IL-6, IL-1 TNF alpha test were observed by using enzyme-linked immunosorbent (ELISA). **Results:** The classic prescriptions of Chinese and Mongolian medicine treating warm diseases had reliable efficacy in the treatment of rats with damp-heat symptoms, especially in improving the reduced intake of water, runny stool and spat canthus secretion. ELISA detection showed that there was no significant improvement in the control group in terms of IL-1 β , IL-6 and TNF- α ; Chinese traditional medicine group showed obvious difference in terms of TNF- α ($P < 0.01$), and there was no significant improvement on IL-1 beta and IL-6 ($P > 0.05$); the Mongolian group showed significant improvement on IL-6 ($P < 0.05$) and TNF- α ($P < 0.01$), and no significant difference on IL-1 β ($P > 0.05$). **Conclusion:** Wangshilianpu drink plus talcum, baical skullcap root and Yindari-4 decoction on relieving symptoms of damp-heat syndrome is practical and reliable. As for fever and inflammation caused by abdominal inflammation, although cytokines serum does not draw strong inspection data support, but the animal models have better physical signs in the late phase of treatment. ELISA detection shows that Chinese traditional medicine group has obvious difference in TNF alpha ($P < 0.01$), and the Mongolian medicine group has obvious improvement in TNF alpha ($P < 0.01$) and significant improvement in IL-6 ($P < 0.05$).

Key Words Wangshilianpu drink plus talcum, Baical skullcap root and Yindari-4 decoction; Damp-heat syndrome; IL-1 β ; IL-6; TNF- α

中图分类号: R285.6 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.11.033

通过现代科技手段和实验研究,对中蒙医温病学经典有效代表方剂王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4味汤对湿热模型、炎症反应因子的影响进行研究。

在体外抗轮状病毒、抗腹泻、抗菌、解热(湿热模型)的实验研究的基础上,深入开展系统的动物实验研究,目的是进一步研究对湿热模型、炎症反应因子白细胞介

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金重点项目(编号:2010Zd34)

作者简介:王雪峰(1987—),男,内蒙古医科大学2012级在读研究生

通信作者:韩雪梅(1956—),女,本科,教授,硕士研究生导师,研究方向:中医温病方药的临床应用与实验研究, E-mail: hanxuemeihaohao@sina.com

素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响。为发挥中蒙医温病学有效方剂治疗临床某些病毒感染、细菌性感染、混合性感染等病症的“双抗作用”优势,扩大临床应用范围提供可靠、科学的实验依据。

1 实验材料与方法

1.1 动物与饲料 Wistar 大鼠 74 只,雌雄各半,体重(180 $\pm$ 20) g,清洁级,购自内蒙古大学实验动物研究中心,动物许可证:SCXK(蒙)2002-0001。普通固体饲料,购自内蒙古大学实验动物研究中心。高脂饲料:每千克普通饲料粉碎后掺加猪油 100 g、蛋黄粉 80 g、胆固醇 25 g、胆酸钠 2 g^[1],塑形烘干。

1.2 药物 王氏连朴饮加滑石、黄芩(制厚朴 6 g、炒川黄连姜汁 9 g、石菖蒲 3 g、制半夏 3 g、炒香豉 9 g、焦山栀 9 g、芦根 20 g、滑石 9 g、黄芩 9 g),以上中药购自内蒙古自治区中医院,按文献方法^[2]制备浓缩成 1 g/mL 的水煎液,根据实验需要调制所需浓度;茵达日-4 味汤(连翘 40 g、麦冬 25 g、拳参 35 g、关木通 35 g),购自内蒙古医科大学附属中蒙医院,为散剂,用时微煮,制成混悬液备用。柴连口服液,哈药集团三精制药股份有限公司生产,批号:08112114。

1.3 菌株及试剂 大肠埃希氏菌,中国药品生物制品鉴定所,菌号 44101。用营养琼脂斜面培养 24 h,传代 2 次,接种到平皿培养 24 h,生理盐水洗脱,麦氏比浊稀释为 10⁹/mL 浓度。主要试剂:1) IL-1、IL-6、TNF- α 用 ELISA 检测试剂盒检测,北京高博兴业科技有限公司;2) 氯化钡,天津市飞船化学试剂科技有限公司生产;3) 硫酸,北京兴青红精细化学品科技有限公司生产;4) 蛋黄粉、胆酸钠、胆固醇(郑州天健食品科技有限公司)。

1.4 主要仪器 清净工作台 SW-CJ-2FD(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),生化培养箱 SPX-150(上海申贤恒温设备厂),4 $^{\circ}$ C 实验室冰箱,旋转蒸发器(上海雅荣生化仪器设备有限公司),电子天平,高压蒸汽灭菌锅,高速离心机,电子体温计,多用温湿度计,空气加湿器,酶标仪;造模温箱自制(木箱结构,箱子侧壁顶盖分别留孔换气)。

1.5 实验方法

1.5.1 分组 雌雄分笼饲养,大鼠称重,适应性饲养期间淘汰一只不合格雄鼠。随机分为 5 组,空白组 13 只、对照药组 14 只、中药组 14 只、蒙药组 14 只、模型组 18 只。自然环境,正常饮食,自由摄食进水适应性饲养 7 d,每天定期清洁。

1.5.2 造模 空白组:自然环境正常饮食饲养;模型

组:自然环境下适应性喂养 7 d 后放入造模温箱用高脂饲料喂养。温箱相对湿度 85%,温度 33 $^{\circ}$ C,每天造模时间 16 h,在大鼠出现湿热症状后大肠杆菌 10⁹/(mL $\cdot$ 200 g)腹腔注射^[3-4],继续放入温箱造模观察 3 d;中药组:过程同模型组,注射大肠杆菌后灌服王氏连朴饮加黄芩、滑石方 2 g/(mL $\cdot$ 200 g),分 2 次灌服,早晚各 1 次;蒙药组:过程同中药组治疗药物换成茵达日-4 味汤;对照药组:过程同中药组治疗药物换成柴连口服液治疗。

1.5.3 观察指标及检测方法 观察湿热模型的各项体征(体温、倦怠嗜卧与否、反应力、活动力、活动量、毛发、饮食饮水、排便次数、形状;眼神、口角与眼角出现分泌物、阴部红肿、等体征现象)体温测量在电子体温计顶端涂少许液体石蜡,轻缓送入大鼠肛门 20 cm 左右,其他体征 1 次记录。检测目标为 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6,各组都在湿热模型组感染大肠杆菌后第 3 天处死并心脏取血 5 mL,4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,4 $^{\circ}$ C 保存,待测。各细胞因子测定严格按 ELISA 试剂盒说明书操作。

2 实验结果

2.1 观察湿热模型的各项体征 大鼠在造模开始 12 d 左右陆续出现倦怠嗜卧,反应迟钝,活动力下降,活动量减少,毛发暗淡枯槁,饮食饮水减少,排便次数增多且大便稀软,眼无光彩、无神,口角与眼角出现分泌物,阴部红肿等体征现象,表明出现湿热症状。温箱造模两周(出现湿热症状后第 3 天)进行腹腔注射大肠杆菌,后开始药物处理、体温监测、特征记录,每次体温测量间隔 4~6 h,中间随时观察各项体征,直至治疗结束。在腹腔感染后 6~30 h 上述湿热症状和炎性反应表现发展迅速并达到最为严重程度^[5],表明造模成功。在 19~35 时段雌性模型组与蒙药组各出现 2 例死亡大鼠。此段时间大鼠聚堆静卧基本无活动,饮食饮水基本为零,毛发枯槁蓬松不洁净,口角与眼角分泌物不能自洁,肛门括约肌松弛,大便基本不成形,大小便有残留。治疗感染 30 h 后各项观察体征开始好转,治疗中后期活动量增加,饮食饮水明显好转增多后期基本恢复正常进食饮水,大便基本恢复正常略为稀软,眼角口角无明显分泌物且有自洁能力,毛发没恢复光泽,肛门括约肌基本恢复正常,阴部红肿减轻。

2.2 炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的检测及 SPSS 统计 正式试验 73 只大鼠,实验造模过程中没有大鼠死亡,注射大肠杆菌开始药物治疗后蒙药组死 2 只、模型组死亡 2 只皆为雌性,雄性对照组死亡一只(麻醉取血时被同笼未麻醉大鼠啃食),最终取得全血标本 68

份进行血清 ELISA 检测。

表 1 各组大鼠平均体温

组别	对照药	中药组	蒙药组	模型组	空白组
1 月 10 日 10 点	38.34	38.45	38.35	38.58	未测
1 月 11 日 13 点	38.49	38.74	38.74	39.01	37.83
1 月 11 日 22 点	38.25	38.24	38.56	38.44	未测
1 月 12 日 3 点	38.24	38.28	38.18	38.30	38.02
1 月 12 日 8 点	38.25	38.22	38.21	38.46	37.57
1 月 12 日 13 点	38.33	38.35	38.00	38.21	37.48
1 月 12 日 18 点	38.51	38.51	38.57	38.51	37.99
1 月 13 日 2 点	37.94	38.29	38.10	37.88	38.14
1 月 13 日 8 点	38.36	38.36	38.33	38.41	38.50
1 月 13 日 13 点	38.49	38.52	38.79	38.46	38.25
1 月 13 日 19 点	38.61	38.61	38.69	38.64	38.31
1 月 14 日 0 点	38.28	38.15	37.94	38.06	38.42
1 月 14 日 5 点	38.09	38.30	38.23	38.16	37.94

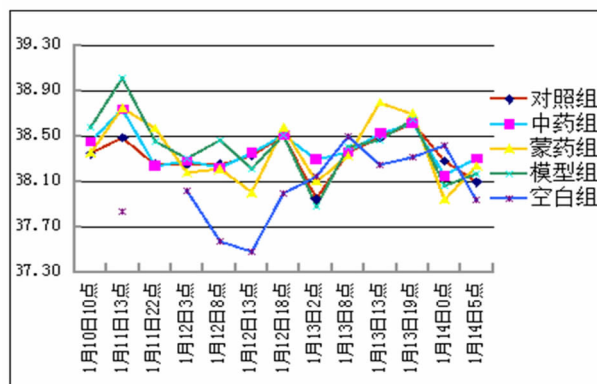


图 1 大鼠平均体温走势图

表 2 血清检测各组与空白组比较

对比组别	各检测目标 P 值比较		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6
空白组与模型组	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
模型组与蒙药组	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P < 0.05$
模型组与中药组	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
模型组与对照药组	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

由血清检测表可看出,模型组与空白组 P 值均 < 0.05 有统计学意义,认为模型组与空白组有差异,其中 TNF- α 组 P 值 < 0.01 有统计学意义,造模成功中药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 检测 P 值 < 0.01 ,有明显统计学意义,对 IL-1 β 、IL-6 检测皆 $P > 0.05$,无统计学意义。蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 、IL-6 比较可看出 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$,有统计学意义,对 IL-1 β , $P > 0.05$ 不具有统计学意义。对照药治疗组对 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 血清因子影响 P 值都大于 0.05 不具有统计学意义。

3 结论

1) 王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤在解除湿热症状上有切实可靠的作用。2) 中药治疗组对温

病发热炎症反应模型血清 TNF- α 检测 P 值 < 0.01 ,有明显统计学意义,对 IL-1 β 、IL-6 检测皆 $P > 0.05$,无统计学意义。蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 、IL-6 比较可看出 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$,有统计学意义,对 IL-1 β , $P > 0.05$ 不具有统计学意义。

4 讨论

在临床中发热、炎症反应可由很多种原因引起,是一种很常见的症状,疾病的发展过程中细菌感染引起的发热最为常见。现代医学认为发热的机制可以大致概括为,外源性致热原进入机体产生内源性致热原作用于体温调节中枢使体温调节中枢功能障碍,体温调定点上移而引起体温升高。与发热有关的细胞因子主要有白介素-1 家族及 IL-1 受体拮抗蛋白、肿瘤坏死因子- α 、白介素-6^[6]、干扰素^[7],其中 IL-1 尤其是 IL-1 β 是参与多种致热原性发热的重要细胞因子^[8], TNF- α 是介导炎症反应反应的主要细胞因子是重要的内生性致热原,也是一个比较重要的前炎症反应因子及抗肿瘤因子^[9]。TNF- α 能进一步诱导 IL-6 等细胞因子的产生,这些促炎性细胞因子参与体内急性反应、发热反应、引起趋化肽释放等,还可使内皮细胞活化而导致血管通透性增加^[10]。

王氏连朴饮出自《霍乱论》,由著名医家王士雄创制。由制厚朴、黄连、石菖蒲、制半夏、香豉、焦山栀、芦根组成,后世温病学家在本方基础上加滑石、黄芩,沿用至今。本方具有辛开苦降,清热化湿的功效,是治疗湿热性疾病的代表方,最初为治疗湿热霍乱主方,目前临床治疗湿热中阻等病证,以发热汗出不解,心中烦闷,脘痞腹胀,呕吐腹泻,便溏色黄,口渴不欲多饮,尿赤涩,舌红,苔黄腻,脉滑数等症状为主。蒙医温病学方剂茵达日-4 味汤又名音达日-西汤,是蒙药临床的传统方剂,茵达日-4 味汤在蒙药经典古籍《四部医典》中有明确记载,由连翘、麦冬、拳参、木通组成,具有清热、解毒、止泻的功效,主治肠热痢疾、腹痛、腹泻等病证,用于小肠热证,是蒙医临床治疗热泻的经典方剂。

大鼠湿热模型并炎症反应的实验研究表明中蒙医温病经典方在治疗大鼠湿热症状上具有明显效果,尤其在改善因湿热导致大鼠进食饮水减少,大便稀软,口角眼角分泌物增多方面在经过 2 d 治疗后已有明显成效。在治疗的第 2 天大鼠因湿热引起的诸多症状都有不同程度缓解改善^[11],因湿热性疾病属临床难治性、顽固性疾病,中蒙医温病经典方王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤对湿热模型的症状的显著改善,再一次验证了中蒙医药治疗湿热的综合生物效应,即多

靶点、多途径、多作用的结果。温病湿热模型的湿与热偏重不同^[12]也影响着 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量^[13]。有报道表明在轮状病毒感染时宿主发生特异性和非特异性免疫反应,而 IL-6、IL-1 β 以及 TNF- α 是感染早期非特异性及随后发生的抗原特异性免疫间的功能性桥梁,在不同时期其含量也不同^[14]。实验药物的剂量对中医药治疗疾病也有重要影响^[15]。

通过实验可以认定王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤在解除湿热症状上有切实可靠的作用。对腹腔炎症反应引起的发热及炎症反应,在动物模型治疗后期各项体征监测都有好转。中药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 检测 P 值 <0.01 ,有明显统计学意义,蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 TNF- α 、IL-6 比较可看出 $P<0.01$ 、 $P<0.05$,有显著统计学意义。此结果进一步揭示了王氏连朴饮加滑石、黄芩;茵达日-4 味汤在抗炎中分子生物学的作用机制。中药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 IL-1 β 、IL-6 检测 $P>0.05$,无统计学意义;蒙药治疗组对温病发热炎症反应模型血清 IL-1 β 、 $P>0.05$ 不具有统计学意义,推测这可能与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 在机体中作用时间、在血清中存在时段不同有关,或药物达到预定效果治疗时间不够等有关。

参考文献

- [1]周璇,程方平.清热化湿方对温病湿热证模型大鼠血清 TNF- α IL-1 β SIgA 的影响[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(2):142-143.
- [2]陈奇.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:436-437.

(上接第 1523 页)

降低糖尿病血管病变大鼠的 IgM、提升其 IgG,有效调节了糖尿病血管病变大鼠免疫状态。

参考文献

- [1]陆再英,钟南山.内科学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2008:659-660.
- [2]王云飞,阙华发.不同中医证型糖尿病足坏疽患者血管内皮与血小板及免疫功能指标的变化[J].上海中医药大学学报,2010,24(2):37-40.
- [3]周有利,毛达勇.2 型糖尿病并血管病变患者免疫功能研究[J].微循环学杂志,2004,14(3):56-57.
- [4]林敏,陈平.2 型糖尿病足坏疽患者血清免疫球蛋白及 IgG 亚类的观察[J].四川医学,2002,23(9):904-905.
- [5]GUPTA D,VARMA S,KHANDELWAL R L. Long term effects of tumor necrosis factor alpha treatment to ninsulin signaling pathway in HepG2 cells and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB[J]. J Cell Bio Chem,2007,100(3):593-607.
- [6]周智广.应重视糖尿病免疫学的研究与应用[J].中国糖尿病杂志,2006,14(4):241-242.

- [3]吴仕九,杨运高,杨钦河,等.温病湿热证动物模型的研制及清热祛湿法机理的探讨[J].中国中医药科技,1999,6(2):65-67,5.
- [4]林兴栋,刘叶,李华锋,等.2 种不同生物致病因子致温病湿热证动物模型分子免疫学特征研究[J].新中医,2012,44(12):135-137.
- [5]张志明,刘叶,金冬梅.温病湿热证与免疫功能关系的研究进展[J].中华中医药学刊,2014,32(1):99-101.
- [6]武凯歌,文小敏,洪冰,等.王氏连朴饮对脾胃湿热证大鼠血清 IL-2、IL-6 等的影响[J].江苏中医药,2010,42(5):71-72.
- [7]唐晓峰,薛漫清,王晖,等.大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J].广东药学院学报,2009,25(3):327-封3.
- [8]Kozak W,Kluger MJ,Soszynski D,et al. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice[J]. Ann N Y Acad Sci,1998,29(856):33-34.
- [9]周林,杨慧,艾有生,等.中药单体抗 TNF- α 介导的炎症反应机制研究进展[J].南昌大学学报:医学版,2013,53(3):72-75,78.
- [10]田中秋,邓立普. TNF- α 、IL-6 在全身炎症反应综合征表达的研究进展[J].蛇志,2008,20(4):275-278.
- [11]赵威,宋群利,叶仁群,等.加味胃苓汤治疗湿热型原发性肾病综合征水肿期疗效及其对炎症因子的影响[J].广州中医药大学学报,2014,31(1):28-31.
- [12]何雪萍,吕军影,阙铁生,等.清热祛湿法对温病湿热证大鼠舌及胃组织 AQP-1 表达的影响[J].时珍国医国药,2014,25(6):1515-1519.
- [13]温珠明,曾代文.炎症性肠病湿热转化的免疫学基础研究[J].实用医院临床杂志,2013,10(3):50-53.
- [14]布月青,董胜英.轮状病毒肠炎 IL-1 β 、IL-6、IL-12、TNF- α 的变化及意义[J].实用预防医学,2006,13(4):859-861.
- [15]谭永振,武凯歌,张竞之,等.王氏连朴饮对脾胃湿热证大鼠行为、肾上腺指数及血清 Cort 的影响[J].现代生物医学进展,2012,12(14):2622,2623-2625.

(2014-05-27 收稿 责任编辑:徐颖)

- [7]周智广.再谈糖尿病免疫学研究趋向[J].临床医药实践,2008,18(5):70-71.
- [8]马西文,常志文.补体与糖尿病血管病变[J].中国老年学杂志,2009,29(9):1174-1176.
- [9]李妮,周微雅,王虹.细胞免疫和体液免疫在糖尿病周围神经病变患者免疫状态的观察[J].中华临床医药杂志,2001,2(7):1-4.
- [10]渠胜英,施晓红.免疫细胞因子在 2 型糖尿病周围神经病变大鼠血清中的表达[J].中国糖尿病杂志,2014,22(3):264-267.
- [11]Acosta JB,del Barco DG,Vera DC,et al. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds[J]. Int wound J,2008,5(4):530-539.
- [12]徐冬岩.老年 2 型糖尿病感染患者血清免疫学指标观察[J].中国老年学杂志,2006,26(7):908.
- [13]张兰蓉,魏丹蕾,周毅业,等.0 级糖尿病足中医证型与凝血和免疫因子的相关性研究[J].世界中医药,2014,9(8):1017-1019.
- [14]奚九一,李真,范冠杰,等.糖尿病中医防治指南糖尿病足[J].中华中医药现代远程教育,2011,9(19):140-143.
- [15]许济群,王绵之.方剂学[M].上海:上海科学技术出版社,2007:85.

(2014-08-01 收稿 责任编辑:张文婷)