

“益气活血方”抗内毒素休克作用的实验研究

中国医学科学院基础医学研究所病理生理室

陈祥银 西品香 张蕙莲 严仪昭

休克的主要病理生理变化是微循环障碍, 重要生命器官低灌注。由于微循环障碍, 组织缺血、缺氧等可能导致弥漫性血管内凝血 (DIC) 的发生。一旦 DIC 发生又加重休克的发展, 造成恶性循环。在休克的发病中, 近来有人认为内毒素休克早期血液动力学变化是由组胺介导的⁽¹⁾, 而后期不可逆休克则与溶酶体酶的大量释放及心肌抑制因子产生有关^(2,3)。我们以前的工作曾表明, “益气活血方”有改善微循环、抗缺氧、抑制肥大细胞释放组胺及抑制组胺对平滑肌的收缩效应等作用⁽⁴⁻⁶⁾。本文研究“益气活血方”对内毒素休克动物血压、死亡率、DIC 生化指标及溶酶体酶的影响, 以探讨该方抗休克的可能作用环节。

材 料 和 方 法

一、药物及试剂:

“益气活血方”系首都医院制作, 供静脉注射用, 由丹参 10 克, 当归 5 克, 黄芪 12 克, 益母草 6 克, 川芎 3 克组成, 含 36 克生药/10 毫升⁽⁷⁾。用药剂量: 大白鼠按 1.7 克/100 克体重静脉注入; 家兔按 1.5 克/公斤体重静脉注入。考马辛亮兰 G250 (Coomassie brilliant blue G 250), Fluka 分装, 酚酞葡萄糖醛苷 (钠) [Phenylphthalein glucuronide (sod.)] $C_{20}H_{14}O_{10}Na$, 分子量 516.41, Sigma 厂出品。

二、小白鼠内毒素中毒:

取 18~22 克小鼠, 按 400 微克/20 克体重静脉注入大肠杆菌内毒素, 注射后 1~2 小时, 小鼠出现倦怠、萎靡、排出稀便, 进而出现呼吸困难、青紫, 80% 左右动物于 24 小时内死亡。

三、家兔内毒素休克:

取 2.5~3.2 公斤雄性白色家兔, 以戊巴比妥钠 (40 毫克/公斤) 静注麻醉, 颈动脉插管测血压。静脉注大肠杆菌内毒素 7 毫克/公斤体重, 注后即刻血压下降至 30~50 毫米汞柱, 6 小时死亡率达 100%。

四、DIC 生化指标的测定:

1. 优球蛋白溶解试验: 血浆经草酸钠抗凝, 以 0.1 N HCl 分离优球蛋白, 加巴比妥钠醋酸盐缓冲液溶解之, 再加入凝血酶, 置于 37°C 水浴, 观察凝块消退时间, 即优球蛋白溶解时间。

2. 纤维蛋白原定量测定: 以 12.5% 亚硫酸钠将血浆沉淀, 分离纤维蛋白原, 加生理盐水溶解, 以考马辛亮兰法⁽⁸⁾定量测定。该方法简便、迅速且敏感。

3. 复钙时间测定: 于 5 毫升试管中, 加混合血浆 0.2 毫升, 蒸馏水 (或益气活血方) 0.2 毫升, 37°C 温育 30 分钟后加 1/4 M $CaCl_2$, 观察各管凝固时间。

4. 凝血酶时间测定: 于 5 毫升试管中, 加血浆 0.1 毫升, 蒸馏水 (或益气活血方) 0.1 毫升, 37°C 温育 10 分钟后加凝血酶 0.1 毫升, 观察凝块出现时间。

五、血浆溶酶体酶—— β -葡萄糖醛酸苷酶 (β -glucuronidase, 以下简称 β -g) 活力测定⁽⁹⁻¹¹⁾:

1. 试剂配制: 0.2 M 醋酸钠缓冲液, pH 4.5; 0.01 M 酚酞葡萄糖醛苷 (钠); 2 毫克/毫升酚酞标准品, 稀释成 200 微克/毫升备用。

2. 酶液: 取抗凝血, 离心分离血浆, 备用。

3. 测定步骤: (1) 于反应管中加 0.2 M 醋酸钠缓冲液 0.8 毫升, 酶液 0.1 毫升及 0.01 M 酚酞葡萄糖醛苷 (钠) 0.1 毫升; (2) 37°C 水浴中温育 16 小时; (3) 加 0.1 N NaOH 2.2 毫升, 终止反应并成色; (4) 用 72 型分光光度计比色, 波长 550 毫微米; (5) 对照管加酶及底物, 温育前加 NaOH 灭活酶, 标准管只加缓冲液及酚酞 20 微克。

β -g 活力以每毫升血浆每小时产生酚酞微克数表示 (即酚酞微克/毫升/小时)。

实 验 结 果

一、“益气活血方”对内毒素中毒小鼠的保护作

用:

实验用小白鼠 62 只, 随机分为两组。对照组小鼠尾静脉注内毒素 (400 微克/20 克体重); “益气活血方”组小鼠注内毒素后 5~10 分钟, 从尾静脉再注入“益气活血方”0.1 毫升, 观察 24 小时内两组动物死亡数。共做两批实验。

第一批实验, 对照组死亡 13/18 只, “益气活血方”组死亡 6/17 只; 第二批实验, 前者死亡 8/13 只, 后者死亡 4/14 只。两批实验总计, 对照组死亡 21/31 只 (67.7%), “益气活血方”组死亡 10/31 只 (32.3%)。经 χ^2 检验, 两组死亡率有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示“益气活血方”对小鼠内毒素中毒有明显保护作用。

二、“益气活血方”对血浆纤维蛋白原含量及优球蛋白溶解时间的影响:

取实验用大白鼠 24 只, 体重 200~230 克, 随机配对进行实验。测定注“益气活血方”后 15 分钟及 60 分钟血浆纤维蛋白原含量及优球蛋白溶解时间。由表 1 可见, 与对照组比较, “益气活血方”组在注药后 15 分钟及 60 分钟时, 血浆纤维蛋白原含量明显降低, 优球蛋白溶解时间明显缩短 (即纤溶活力明显增强)。

表 1 “益气活血方”对血浆纤维蛋白原含量及优球蛋白溶解时间的影响

时 间	纤维蛋白原(毫克%)		优球蛋白溶解时间(分)	
	对照组	“益气活血方”组	对照组	“益气活血方”组
15分钟	352±23.1	246±27.5*	304±13.7	220±17.1**
60分钟	345±27.1	225±18.4**	297±18.2	170±22.1**

[注] 表内数字均为 6 只动物的测定值 (均值±标准误)

* 与对照组比较 $P < 0.05$; ** 与对照组比较 $P < 0.01$

三、“益气活血方”对复钙时间及凝血酶时间的影响:

加蒸馏水的 4 只试管复钙时间为 6.0 ± 0.9 分钟 (均值±标准误), 加“益气活血方”的 4 只试管复钙时间明显延长, 均 > 60 分钟; 加蒸馏水的 4 只试管凝血酶时间为 11.2 ± 1.9 秒, 加“益气活血方”的 4 只试管凝血酶时间亦明显延长, 均 > 5 分钟。加“益气活血方”的试管出现血浆长期不凝。

四、“益气活血方”对内毒素休克家兔血压及 β -g 活力变化的影响:

实验用白色雄性家兔, 体重 2.5~3.2 公斤, 共 14 只, 随机分为两组。“益气活血方”组耳静脉注“益气活血方”后 15 分钟注内毒素, 以后每隔半小时注半

量“益气活血方”; 对照组则以生理盐水代替。两组动物均做颈动脉插管, 连续记录血压。并于注内毒素前及注后 1、2、4、6 小时分别采血, 分离血浆, 测 β -g 活力, 结果如下。

1. 血压变化: 从表 2 可见, 对照组注内毒素后即刻血压急剧下降至 30~50 毫米汞柱, 随后代偿回升, 之后又逐渐下降, 直至“0”。本组 7 只动物均在 6 小时内死亡; “益气活血方”组注内毒素后即刻, 7 只动物中有 4 只血压没有明显下降, 另外 3 只下降程度也不及对照组, 随后血压很快回升, 并在较长时间内维持于较高水平, 与对照组比较, 从注内毒素后 60 分钟到 180 分钟均有显著差别。可见, “益气活血方”可明显减弱内毒素所致的血压下降。

表 2 “益气活血方”对内毒素休克家兔血压的影响 (毫米汞柱)

时 间	对 照 组 均值±标准误(动物数)	“益气活血方”组 均值±标准误(动物数)
0 分钟	114±2.7 (7)	120±4.7 (7)
5 分钟	47±5.9 (7)	84±12.5(7)*
15 分钟	88±5.8 (7)	108±12.6(7)
30 分钟	75±6.9 (6)	103±11.5(7)
60 分钟	66±3.7 (5)	98±7.4 (7)**
90 分钟	61±4.6 (5)	96±7.4 (7)**
120 分钟	54±5.1 (5)	102±6.2 (7)***
150 分钟	46±3.3 (6)	88±15.0(7)*
180 分钟	36±7.6 (6)	101±5.4 (6)***
210 分钟	34±8.7 (5)	78±16.4(6)
240 分钟	26±10.8(5)	83±8.6 (5)**
300 分钟	14±13.1(3)	60±24.7(5)
360 分钟	0 (1)	66±33.8(3)
480 分钟		0 (1)

* 与对照组比较 $P < 0.05$; ** 与对照组比较 $P < 0.01$;

*** 与对照组比较 $P < 0.001$

2. 血浆 β -g 活力变化: 见表 3。对照组注内毒素后 10 分钟, β -g 活力无明显变化, 注后 1 小时, β -g 活力明显增高 ($P < 0.001$), 注后 2~4 小时达高峰;

表 3 “益气活血方”对内毒素休克家兔血浆 β -g 活力(酚酞微克/毫升/小时)的影响

时 间	对 照 组 均值±标准误(动物数)	“益气活血方”组 均值±标准误(动物数)
0	12.52±0.29 (7)	13.90±0.76 (7)
1 小时	38.72±2.51 (7)	31.56±4.10 (7)
2 小时	56.54±3.31 (7)	54.02±4.98 (7)
4 小时	57.73±2.79 (7)	49.53±3.95 (5)
6 小时	54.16 (1)	75.82±2.30 (2)

“益气活血方”组 β -g活力与对照组比较无明显变化。提示在本实验条件下,“益气活血方”对溶酶体酶无明显影响。

讨 论

本文以7毫克/公斤体重大肠杆菌内毒素静脉注入可形成家兔内毒素休克模型。注内毒素后即刻,动脉压急剧下降,经短暂回升,随后又渐进性下降至动物死亡。“益气活血方”事先给予,则可明显抑制内毒素所致的血压下降,并使血压在一段时间内维持于较高水平。这是很有趣的现象。“益气活血方”通过什么途径影响血压呢?这是个十分复杂的问题。如所周知,在休克发病中体液因子是十分重要的。组胺就是其中之一,曾被认为是“休克毒素”(Shock Toxin)。近来有人认为内毒素休克早期血液动力学变化是由组胺介导的,同时组胺还长时间地影响着心血管功能⁽¹⁾。我们以前的工作曾表明,“益气活血方”可抑制肥大细胞释放组胺⁽²⁾、抑制缺氧所致的肺组胺增高⁽³⁾,体外实验还表明,“益气活血方”可抑制组氨酸脱羧酶(组胺合成酶)⁽⁴⁾,同时还表明,“益气活血方”可抑制组胺的某些效应(如抑制组胺对肠道平滑肌的收缩及抑制组胺升高肺动脉压等)⁽¹²⁾。所以设想,“益气活血方”可能通过影响组胺生成、释放或阻断组胺效应等环节,从而减弱内毒素所致的血压下降。这个设想还有待探讨。

测定了内毒素休克过程中血浆 β -g活力的动态变化,发现注内毒素后1小时 β -g活力明显增高,2~4小时达高峰。我们在大鼠及犬的内毒素休克模型上也得到类似的结果。这些资料与国外报道的资料类似^(18,19)。“益气活血方”事先给予,未发现对该酶活力有明显影响。尽管在1小时, β -g活力似有减少趋势,但统计学无意义。

内毒素休克常常引起DIC发生,而DIC发生又使微循环障碍加剧,使休克加重,造成恶性循环。所以积极防治DIC对于休克具有重要意义。众所周知,正常机体纤维蛋白溶解和抗溶解处于动态平衡之中,即纤维蛋白不断产生和清除。但在病理情况下,动态平衡失调,在病理过程的不同阶段,出现高凝与出血。许多研究表明,感染、创伤、休克等应激时,血浆纤维蛋白原急剧增加,甚至可达1000毫克%,促使DIC形成,并对血液流变学产生严重影响。本实验结果表明,“益气活血方”可增强纤溶活力并降低血浆纤维蛋白原含量、延长凝血酶时间等,这些资料与国内有关报道类似^(14,15)。设想,“益气活血方”可能通过上述作用及增加cAMP含量、抑制血小板聚集、改善微循环,起到“活血化瘀”作用,而对休克及DIC产生有益的作用。

参 考 文 献

- (1) Krause SM, et al: Cir Shock 6:75, 1979.
- (2) Lefer AM: Lif Sci 19:1803, 1976.
- (3) Glenn TM, et al: New Aspects of Trasylof Therapy 5:55, 1971.
- (4) 薛金福等: 中国医学科学院学报 3 (增刊1): 12, 1981.
- (5) 许澍淮等: 中国医学科学院学报 3 (增刊1): 23, 1981.
- (6) 陈祥银等: 中国医学科学院学报 3 (增刊1): 27, 1981.
- (7) 陈祥银等: 中医杂志 22 (9): 60, 1981.
- (8) Bradford MM: Anal Biochem 72:248, 1976.
- (9) Kato K, et al: Chem Pharmaceut Bull 8:239, 1960.
- (10) Fishman WH, et al: Clin Chem Acta 15:435, 1967.
- (11) Fishman WH, et al: J Biochem 173 (2):449, 1948.
- (12) 孙仁宇等: 中国医学科学院学报 3 (增刊1): 17, 1981.
- (13) Mori K, et al: Surg Gynecol Obstet 152:427, 1981.
- (14) 中国医学科学院活血化瘀治则研究协作组: 新医药学杂志(1): 42, 1977.
- (15) 王振生: 中华内科杂志 1(6): 341, 1976.

《辽宁中医杂志》征订启事

《辽宁中医杂志》由辽宁中医学院和中华全国中医学会辽宁分会主办。本刊是体现中医特色,报道中医药及中医现代化新成果的综合性月刊。多年来深受广大读者欢迎。一九八三年本刊将增加内容,提高质量,改进版面,扩大发行。

本刊辟有中医基础理论研究、临床报道、名老中医医案、医话、古典医籍论述、针灸、气功、自学辅

导及用现代科学方法研究中医药学等十多种栏目。内容丰富,可供广大中医药人员在医疗、教学、科研中学习参考,也可供中医爱好者阅读,欢迎广大读者订阅。本刊定价0.28元,全年3.36元。本刊国内代号8—87,每月18日出版,请尽快到当地邮局(所)办理订阅手续。

编辑部地址:沈阳市北陵。