

## · 证的研究 ·

# 细菌性肺炎痰热证模型的建立与评价

李建生 张艳霞 周红艳 余海滨 乔翠霞

(河南中医学院老年医学研究所, 河南省郑州市金水路1号, 450008)

**[摘要]** **目的** 建立、评价模拟临床证候的细菌性肺炎痰热证模型。**方法** 采用气管插管细菌滴注法建立细菌性肺炎模型, 并给予热环境风热刺激制备细菌性肺炎痰热证模型。将 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、肺炎组、热证组、模型组、方证对应组、方证非对应组, 每组12只。观察大鼠一般状况、肺组织病理损伤, 放射免疫法测定血肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、皮质醇(Cor)及支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)、细胞间黏附分子1(ICAM-1)的水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组、热证组、肺炎组、方证对应组、方证非对应组血中E、NE、Cor及BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1水平均升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 以模型组升高最明显( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 方证对应组、方证非对应组E、NE、Cor及BALF中TNF- $\alpha$ 、IL-6、ICAM-1水平均下降, 方证对应组下降更明显( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** 采用细菌滴注和风热刺激结合模型的方法建立细菌性肺炎痰热证模型是可行的。

**[关键词]** 细菌性肺炎; 痰热证; 炎症因子

## Establishment and Evaluation of Phlegm-heat Syndrome Models of Bacterial Pneumonia

LI Jiansheng, ZHANG Yanxia, ZHOU Hongyan, et al.

(Geriatrics Institute of Henan University of TCM, Zhengzhou 450008)

**ABSTRACT** **Objective** To set up and evaluate the analogous phlegm-heat syndrome models of bacterial pneumonia. **Methods** The bacterial pneumonia models were set up by bacteria instillation method through tracheal intubation, of them the phlegm heat syndrome models were made by giving wind heat stimulation in a hot environment. The rats were randomized into normal control group, pneumonia group, heat syndrome group, model group, recipe-manifestation corresponding group, and recipe-manifestation non-corresponding group, with 12 rats in each. The general state of rats and pathological injury of lung tissues were observed. Radioimmunoassay was used to detect the blood epinephrine (E), norepinephrine (NE), cortisol (Cor), and the contents of TNF- $\alpha$  IL-6 and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results** Compared with the normal control group, the blood E, NE, and Cor, and the contents of TNF- $\alpha$  IL-6, and ICAM-1 in BALF of model group, heat syndrome group, pneumonia group, recipe-manifestation corresponding group, and recipe-manifestation non-corresponding group were all increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), with the most significant increase in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the blood E, NE, and Cor, and the contents of TNF- $\alpha$  IL-6, and ICAM-1 in BALF of recipe-manifestation corresponding group and recipe-manifestation non-corresponding group were all decreased, with the most significant decrease in the recipe-manifestation corresponding group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** To adopt the method of TCM etiology in combination with disease model to set up the heat syndrome model of bacterial pneumonia is practical.

**Key Words** Bacterial Pneumonia; Phlegm heat syndrome; Inflammatory factor

肺炎是临床常见的呼吸道感染性疾病, 其发病率、死亡率高, 2002年占全球疾病负担的6%<sup>[1]</sup>, 其中以细菌性肺炎最为常见。以往制备细菌性肺炎模型往往是单一因素造模, 仅具备了细菌性肺炎的病理特征, 本研究拟采用细菌性肺炎模型与热环境风热刺激相结合以建立模拟临床证候的病证结合模型。

## 1 材料

### 1.1 实验动物及分组

Wistar 大鼠72只, 雌雄各半, 2月龄, 体重(200±20)g, 由河南省实验动物中心提供[清洁级, 合格证号: SCXK(豫)2005-0001]。按随机数字表法将大鼠分为6组, 即正常对照组、热证组、肺炎组、肺炎痰热证组(简称模型组)、方证对应治疗组(简称方证对应组), 方证非对应治疗组(简称方证非对应组), 每组12只。

### 1.2 试剂与仪器

肺炎克雷伯杆菌由北京生物制品检验鉴定所提供

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划资助项目

(2006HANCET-0594-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net)

通讯作者: 李建生, lj-js8@163.com, (0371) 65676568

(菌号:46114),营养琼脂平板培养后用无菌生理盐水稀释至 $1.5 \times 10^8$  cfu/ml。肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子1 (ICAM-1)、白细胞介素6 (IL-6) (批号20081030)试剂盒均购置于中国人民解放军总医院科技开发中心放免所。101-2型鼓风干燥箱购置于上海市仪器厂。

### 1.3 药物

清金化痰汤出自《医学统旨》:黄芩、栀子各4.5g,桔梗6g,麦冬、桑皮、贝母、知母、瓜蒌仁、橘红、茯苓各3g,甘草1.2g;桑白皮汤出自《医林方》:桑白皮、半夏、紫苏子、杏仁、贝母、栀子、黄芩、黄连各2.4g;二陈汤出自《太平惠民和剂局方》:半夏、橘红各15g,茯苓9g,甘草4.5g;三子养亲汤出自《韩氏医通》:莱菔子、白芥子、紫苏子各9g;以上药物皆由河南中医学院第一附属医院制剂室提供并鉴定(根据1979年全国中医处方用药计量单位规定换算药物剂量)。取清金化痰汤合桑白皮汤,加相当于药材量10倍的冷水浸泡1h,煮沸30min,过滤;药渣加3倍水继续煎煮,煮沸20min,过滤;合并两次滤液,用文火煎煮,浓缩成1g/ml水煎液,4℃冰箱保存备用。二陈汤合三子养亲汤水煎剂制作方法同上。

将两组药物清金化痰汤合桑白皮汤、二陈汤合三子养亲汤分别根据成人日服剂量,按动物体表面积比率换算等效剂量<sup>[2]</sup>,计算出大鼠日服量:清金化痰汤合桑白皮汤为 $5.067 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,二陈汤合三子养亲汤为 $6.345 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

## 2 方法

### 2.1 模型的制备

参照张均田主编的《现代药理实验方法学》<sup>[3]</sup>,以气管插管法制备细菌性肺炎模型。用10%水合氯醛2.8ml/kg给大鼠腹腔注射,使动物麻醉后,仰卧于试验台,呈30°倾斜位置,用1mm软金属钝针管与粗细相似塑料管连接,微量注射器吸菌液0.3ml(浓度为 $1.5 \times 10^8$  cfu/ml),注入套管内。此时感染的动物保持原位10min,使套管内菌液由于重力作用流入支气管和肺泡内,以达到肺部感染。

模型组、方证对应组、方证非对应组大鼠于第1~9天置于温度( $38 \pm 1$ )℃、相对湿度50%、风速0.7m/s的鼓风干燥箱中进行风热刺激,每天两次,每次30min,连续9天,在第9天经气管插管注入肺炎克雷伯杆菌0.3ml。热证组仅进行风热刺激;肺炎组仅进行细菌滴注;正常对照组不做任何处理。

### 2.2 给药方法

方证对应组第7天开始给予清金化痰汤合桑白皮汤水煎剂灌胃,每鼠 $5.067 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,每日1次,连续5

天;方证非对应组第7天开始给予二陈汤合三子养亲汤水煎剂灌胃,每鼠 $6.345 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,每日1次,连续5天;热证组、肺炎组第7天开始给予相同体积的生理盐水灌胃,每日1次,连续5天。正常对照组不做任何处理。所有动物于造模第11天取材。

### 2.3 观察指标和方法

2.3.1 一般状态 包括神色、活动状况、被毛、呼吸、体温、自主活动等。

2.3.2 外周血白细胞(WBC)和中性粒细胞(PMN)含量测定 将大鼠至于固定盒中,露出鼠尾,用酒精涂搽鼠尾,待鼠尾静脉充分充血后抽取静脉血0.1ml,注入含EDTA-K<sub>2</sub>管内编号并记录,测定PMN。

2.3.3 肺组织病理 开胸,迅速摘取右肺,经10%甲醛溶液固定,经HE染色,显微镜观察。

2.3.4 血中肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)、皮质醇(Cor)含量测定 暴露腹主动脉,取动脉血约5ml,离心分离血清和血浆,置于一30℃冰箱保存。采用放射免疫法测定。

2.3.5 支气管肺泡灌洗液(BALF)中IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$ 含量测定 开胸,迅速取出左肺,用输液管套管插入左主支气管约3~4cm,加以固定,自制灌洗针以3ml生理盐水经输液管套管注入肺腔,轻轻翻动左肺组织,抽回再灌注,反复抽注3次,最后抽出灌洗液为肺泡灌洗1次,共灌洗3次,收集总灌洗液至试管内,4℃离心(3500r/min、10min),取上清液。采用放射免疫法测定。

### 2.4 统计学方法

所有数据采用SPSS 13.0统计分析软件处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 一般状态

正常对照组大鼠营养不良,肌肉丰满,体格健壮,被毛有光泽,活动能力强,饮食正常,体重逐渐增加,呼吸平稳,无气促现象,体温正常,无任何特殊表现;热证组大鼠被毛无光泽、活动明显增加,时常在笼中四处爬动,躁动不安,叫声响亮,捉拿时挣扎明显,易咬人,饮水增多,小便黄赤,体温升高;肺炎组大鼠呼吸困难,呼吸喘促,活动减少,被毛无光泽;模型组大鼠体温明显升高,烦渴,呼吸困难,被毛无光泽,饮水增多,毛发脱落,症状较重;方证对应组症状较模型组明显减轻,被毛欠润泽,无毛发脱落,活动减少,饮食减少,体温趋于正常。方证非对应组体温稍下降,呼吸困难、喘促较模型组稍减轻,较方证对应组症状重。

3.2 各组大鼠体温变化比较

表1示,第9天模型组、热证组、方证对应组、方证非对应组大鼠体温均较正常组升高,尤以模型组升高明显( $P<0.01$ );方证对应组、方证非对应组较模型组均下降,方证对应组下降更明显( $P<0.05$ )。第11天模型组、热证组、肺炎组、方证对应组、方证非对应组大鼠体温均较正常对照组升高,以模型组升高最明显( $P<0.01$ );方证对应组、方证非对应组较模型组均下降,并且方证对应组优于方证非对应组( $P<0.01$ )。

表1 各组大鼠不同时间体温变化比较(℃,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 第1天        | 第9天          | 第11天           |
|--------|----|------------|--------------|----------------|
| 正常对照组  | 12 | 37.34±0.67 | 37.45±0.60   | 37.45±0.48     |
| 热证组    | 12 | 37.46±0.59 | 38.74±0.43*  | 38.85±0.42*    |
| 肺炎组    | 12 | 37.58±0.65 | 37.71±0.54   | 38.67±0.68*    |
| 模型组    | 12 | 37.60±0.47 | 39.00±0.45*▲ | 39.30±0.57*△▲  |
| 方证对应组  | 12 | 37.42±0.52 | 38.50±0.43*★ | 38.16±0.44*★★◇ |
| 方证非对应组 | 12 | 37.60±0.49 | 38.47±0.48*★ | 38.76±0.43*★   |

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与热证组比较,△ $P<0.05$ ;与肺炎组比较,▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,★ $P<0.05$ ,★★ $P<0.01$ ;与方证非对应组比较,◇ $P<0.01$

3.3 各组大鼠血 WBC、PMN、E、NE 和 Cor 含量比较

表2示,热证组、肺炎组、模型组、方证对应组、方证非对应组 WBC、PMN 均较正常对照组升高,以模型组升高最明显( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );方证对应组 WBC、PMN 较模型组降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),方证非对应组与模型之间无统计学差异( $P>0.05$ )。热证组、肺炎组、模型组、方证对应组、方证非对应组血中 E、NE、

表2 各组大鼠血 WBC、PMN 及 E、NE、Cor 比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | WBC( $\times 10^9/L$ ) | PMN(%)         | E(ng/ml)         | NE(ng/ml)       | Cor(ng/ml)     |
|--------|----|------------------------|----------------|------------------|-----------------|----------------|
| 正常对照组  | 12 | 13.09±1.88             | 15.71±1.76     | 20.77±4.14       | 18.56±4.56      | 18.80±5.12     |
| 热证组    | 12 | 17.85±2.72**           | 23.36±3.41**   | 37.37±3.50**     | 33.43±8.55**    | 36.59±11.98**  |
| 肺炎组    | 12 | 21.32±2.60**           | 23.62±2.88**   | 39.09±5.64**     | 34.74±9.81**    | 36.83±8.91**   |
| 模型组    | 12 | 28.87±4.58**△▲▲        | 26.84±5.05**△▲ | 48.58±6.89**△△▲▲ | 43.26±7.33**△△▲ | 46.24±9.00**△▲ |
| 方证对应组  | 12 | 15.09±2.02*★◇          | 19.10±2.74*★★◇ | 33.14±6.03*★★◇   | 25.55±6.24*★★◇  | 28.27±7.91*★◇  |
| 方证非对应组 | 12 | 19.32±3.25**           | 26.50±4.29**   | 42.10±7.89**★    | 35.88±8.46**    | 38.92±9.89**   |

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与热证组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与肺炎组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,★ $P<0.05$ ,★★ $P<0.01$ ;与方证非对应组比较,◇ $P<0.01$

表3 各组大鼠 BALF 中 TNF-α、IL-6、ICAM-1 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | IL-6(pg/ml)       | TNF-α(ng/ml)     | ICAM-1(pg/ml)   |
|--------|----|-------------------|------------------|-----------------|
| 正常对照组  | 12 | 88.39±9.96        | 20.11±1.54       | 89.44±7.34      |
| 热证组    | 12 | 115.76±11.65**    | 34.40±1.78**     | 153.67±18.16**  |
| 肺炎组    | 12 | 119.95±11.39**    | 38.02±2.09**     | 158.78±15.80**  |
| 模型组    | 12 | 131.31±12.46**△△▲ | 46.12±2.65**△△▲▲ | 167.93±15.02**△ |
| 方证对应组  | 12 | 104.73±12.21*★◇   | 26.07±1.28*★★◇   | 133.66±13.13*★◇ |
| 方证非对应组 | 12 | 127.08±14.99**    | 44.23±2.74**     | 162.38±12.65**  |

注:与正常对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与热证组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与肺炎组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,★ $P<0.01$ ;与方证非对应组比较,◇ $P<0.01$

Cor 水平均高于正常对照组,以模型组升高最为明显( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );方证对应组、方证非对应组 E、NE、Cor 水平较模型组均下降,但以方证对应组下降更显著( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

3.4 各组大鼠 BALF 中 IL-6、TNF-α、ICAM-1 变化比较

表3示,热证组、肺炎组、模型组、方证对应组、方证非对应组 BALF 中 IL-6、TNF-α、ICAM-1 水平均较正常对照组升高,以模型组升高最明显( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );方证对应组、方证非对应组 BALF 中 IL-6、TNF-α、ICAM-1 水平较模型组均下降,但以方证对应组下降更显著( $P<0.01$ )。

3.5 肺组织病理形态改变

正常对照组大鼠肺各级支气管、肺泡以及肺间质的组织结构均为正常。肺炎组肺泡结构大部分被破坏,肺泡壁血管明显充血、水肿,肺泡壁较正常对照组明显增厚,大量炎症细胞浸润,严重浸润的区域连成片,有纤维性增生。热证组各级支气管有轻度慢性炎症,肺泡囊、肺泡管扩张,肺泡上皮退行性变,肺间质轻度胶原增生,其肺泡壁血管轻度充血、水肿,肺泡间隔较正常增厚。模型组肺泡结构破坏严重,大量的炎症细胞浸润,肺泡壁血管充血、水肿,肺泡壁明显增厚,病变严重区域并连成片,有纤维性增生。方证非对应组各级支气管轻中度慢性炎症,肺泡囊、肺泡管中度扩张,肺泡上皮退行性改变,肺泡壁血管中度充血、水肿,支气管周围、小叶间和肺泡间隔结缔组织血管周围,有中度炎症

细胞浸润,较模型组有减轻。方证对应组各级支气管轻度炎症,肺泡壁血管轻度充血、水肿,有少量炎性细胞浸润,肺泡壁轻度增厚,较方证非对应组肺组织病理损伤轻。

#### 4 讨论

细菌性肺炎多属于中医学的“风温”、“咳嗽”、“风温肺热”等病范畴,多因风热病邪外袭引起,痰热、热毒常常贯穿于细菌性肺炎的病理过程<sup>[4-6]</sup>,表现为痰热互结,壅滞于肺。本研究模拟痰热证自然发病因素,给予大鼠热环境风热刺激制备痰热证模型。本研究显示,痰热证大鼠出现发热、烦渴、喘促、躁动不安,而无发抖、蜷缩、耸毛等症状,与痰热证患者临床症状相符合。以往研究表明<sup>[7]</sup>,热证时中枢兴奋性及交感神经紧张性增加,肾上腺皮质、髓质功能亢进等。本实验结果显示,热证组、模型组大鼠 E、NE、Cor 较正常对照组升高,模型组升高更明显。提示热环境风热刺激可致大鼠中枢兴奋性及交感-肾上腺机能活动增加,促进皮质醇分泌增加,模型符合热证表现。

痰热证还可见于西医学的支气管哮喘、肺原性心脏病等疾病。因此,还需要对该模型增加致病因素,达到病证结合的目的。通过气管插管给大鼠肺部滴注细菌,大鼠出现烦躁、呼吸困难、喘促、体温升高,与临床细菌性肺炎发作患者症状相似。细菌性肺炎的发病机制可能与炎性细胞因子如 TNF- $\alpha$ IL-6、ICAM-1 等释放有关<sup>[8-9]</sup>。本研究显示,肺炎组、模型组较正常对照组明显升高,模型组升高明显。提示细菌性肺炎结合热环境风热刺激致大鼠 TNF- $\alpha$ IL-6、ICAM-1 水平升高,介导炎症反应,表现为大量炎症细胞浸润、炎性介质释放,肺泡血管充血水肿、渗出,致肺组织损伤明显。

采用药物的反证治疗,根据其疗效及相关实验指标变化,有助于评价病证结合模型是否成功。清金化痰汤合桑白皮汤主治咳嗽、喘证之痰热壅肺<sup>[10]</sup>,本研究结果显示,方证对应组即清金化痰汤合桑白皮汤治疗组大鼠烦躁程度、体温较模型组明显降低,E、NE、Cor 及 BALF 中 TNF- $\alpha$ IL-6、ICAM-1 水平较模型组明显降低,提示方证对应药物明显抑制交感神经兴奋、拮抗 TNF- $\alpha$ IL-6、ICAM-1 释放,减轻肺损伤,大鼠痰热证症状逐渐消失。二陈汤合三子养亲汤主治咳嗽、喘证之痰浊阻肺证<sup>[10]</sup>,但对痰热证无明显效果。本实验方证非对应组采用二陈汤合三子养亲汤,结果显示,大鼠血 E、NE、Cor 及 BALF 中 TNF- $\alpha$ IL-6、ICAM-1 水平较模型组降低,但无统计学意义,大鼠痰热证表现无明显改善。通过对比方证对应与方证非对应药物的治疗效果,提示该细菌性肺炎结合热环境风热刺激模型符合

中医痰热证候。

#### 参考文献

- [1] Mizgerd JP. Lung infection: a public health priority [J]. PLoS Med, 2006, 3(2): e76.
- [2] 陈奇. 中药药理实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 205-208.
- [3] 张均田. 现代药理实验方法学 [M]. 北京: 中国协和医科大学北京医科大学联合出版社, 1998: 1420-1421.
- [4] 李建生. 老年人肺炎的特点与治疗 [J]. 河南中医, 2000, 20(6): 1-4.
- [5] 金妙文, 汪红. 大叶性肺炎的分型辨治 [J]. 辽宁中医杂志, 2000, 27(8): 350-351.
- [6] 付国华. 中药治疗老年性肺炎临床体会 [J]. 陕西中医, 2003, 24(4): 381-382.
- [7] 梁月华. 寒凉药与温热药对交感神经肾上腺及代谢机能的影响 [J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(1): 53.
- [8] Legg JP, Hussain IR, Warner JA, et al. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(6): 633-639.
- [9] Wu CL, Chan MC, Chang GC, et al. Etiology and cytokine expression in patients requiring mechanical ventilation due to severe community-acquired pneumonia [J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105(1): 49-55.
- [10] 王永炎. 中医内科学 [M]. 6版. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 54-74.

(收稿日期: 2008-12-26; 修回日期: 2009-05-20)

[编辑: 邓媛]



### 真空式全自动煎药器

海元牌真空式全自动煎药器是专利产品, 专利号: 200720116054X。本产品采用电加热, 在密闭状态下可一次煎煮完成整剂中草药。采用特殊轻质耐高温玻璃真空煎煮, 符合卫生标准。利用真空原理挤压药物, 使中药有效成分得到充分析出, 浓度高, 成分均匀, 煎完后不必人工榨药, 自动控制药量、电源定时、调高低温3种控制系统。采用高效率的加热器, 加热均匀, 热效率高, 省时、省电。产品有: 3000ml 真空式全自动、3000ml 陶瓷全自动, 适用于家庭; 7000ml-Ⅱ型、7000ml-Ⅲ型、12000ml、14000ml、18000ml、25000ml 真空式全自动, 适用于中小型中医院。产品还有简易封袋机, 高温药液真空包装袋。

天津市塘云塑胶有限公司, 地址: 天津市塘沽区邓善沽金光路1998号, 电话: 022-25391437、25391741, 手机: 13212071778、13821868189, 邮编: 300455。

