

血虚动物模型的进一步探讨

——溶血性贫血对大鼠血细胞化学和肝脏的组织化学观察

北京中医学院组织胚胎教研室 贲长恩 李叔庚 杨美娟

气、血是中医基础理论的一个重要组成部分，气和血是人体生命活动的动力和源泉，它既是脏腑功能的反应，又是脏腑活动的产物，所以说，气、血是人体生命活动的物质基础。但要阐明气血的本质及其相互关系，实验研究是不可缺少的途径，而要进行实验研究，必须先解决模拟动物模型这一重要课题。本实验是在过去工作的基础上^(1,2)，继续以乙酰苯肼(APH)造成动物体内溶血性贫血，观察其血象、血细胞化学和肝脏组织化学改变，以求对血虚动物模型的进一步探讨，提供实验形态学基础。

材料和方法

实验共用雄性大白鼠50只，体重在180~250克，喂以普通饲料，自由饮水。

实验分6批进行，每批分对照组和实验组。对照组动物不加任何处理；实验组动物分别于实验的第1、4、7天皮下注射2% APH生理盐水溶液，第1次剂量为1毫升/100克体重，第2、3次剂量减半为0.5毫升/100克体重。

每日上午尾部取血涂片或测定血红蛋白、计数红细胞和白细胞总数。用煌焦油蓝染色，显示网织红细胞，甲基紫染色显示海氏小体(Heinz body)。用Gomori氏Ca-Co法显示中性粒细胞的碱性磷酸酶(ALP)，硝酸铅法显示酸性磷酸酶(ACP)，Padykula-Hermen氏法显示三磷酸腺苷酸酶(ATP酶)，Nachlas氏法显示琥珀酸脱氢酶(SDH)，Wachstein氏法显示葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P)。此外还在实验的第3、6、9天，快速断头取肝脏固定于Formalin液或Carnoy氏液中，显示一般结构、核糖核酸和糖原。以新鲜恒冷切片Gomori氏法显示ALP，Lillie氏法显示ACP，Wachstein-Meisel氏法显示ATP酶，Nachlas氏法显示SDH，Groff氏法显示细胞色素氧化酶(CCO)，Gluener氏法显示单胺氧化酶(MAO)。

观察结果

一、动物的一般体征

正常大鼠神气矫健，行动敏捷，眼睛明亮，呈鲜粉红色，鼻唇洁净潮润呈淡粉红色，尾圆色粉红，背腰平直，被毛光泽而密。实验大鼠在注射APH后第3天开始出现神疲乏力，行动迟缓，嗜睡，团缩弓腰，喘促心悸，面、眼、耳、尾苍白而凉，毛蓬竖而少光泽，血暗红，尿黄。剖腹观察，肝、脾肿大，尤以脾脏肿大更为显著，呈暗红色。

二、血液学观察

注射APH后，血红蛋白和红细胞急剧下降，但网织红细胞、海氏小体和白细胞总数则显著增多，显示出贫血性血虚状态(见表1)。

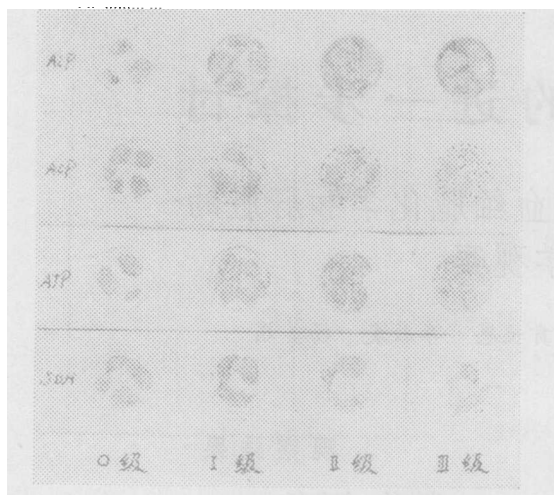
表1 血液学实验指标的改变

测定项目	文献记载 ⁽³⁾ 正常值	实验测得 正常值	注射APH 后1~7日
血红蛋白(克%)	16.6	13.5~14.5	4~7
红细胞(万/毫米 ³)	800	775	200~400
白细胞(千/毫米 ³)	5~15	4.5~5.5	30~39
网织红细胞(%)	0.2	4~5	85~95
海氏小体(%)	0	0	30~38

三、血细胞化学观察

以中性粒细胞为例显示ALP、ACP、ATP酶、SDH和G-6-P，每只动物计数100个细胞。正常和实验动物各种酶的活性反应，阴性者以0级表示，阳性者以酶的反应强度，按下列分级标准，分别以I级、II级、III级表示之(见附图)。

I级：酶反应物(颗粒)仅位于细胞质周边，活性较弱。ATP酶呈浅棕黄色。ACP呈浅褐色。ALP呈淡灰黑色。SDH为淡紫蓝色颗粒(<10粒)，约占胞质的1/3。G-6-P呈浅棕色颗粒(<10粒)，颗粒呈散在



附图 示中性粒细胞各种酶活性的分布

分布。

Ⅱ级：酶反应物占据胞质的大部分，活性较强。ATP酶呈棕黄色。ACP呈褐色。ALP呈浅黑色。SDH呈紫蓝色颗粒（10~20粒），占胞质的1/3~1/2。G-6-P呈深棕色颗粒（10~20粒），散在分布。

Ⅲ级：酶反应物几乎占据全部胞质，活性很强。ATP酶呈深棕黄色。ACP呈深褐色。ALP呈黑色。SDH呈紫蓝色颗粒（>20粒）。G-6-P呈深棕色（>20粒），成群分布。

中性粒细胞内各种酶的阴性率和阳性率，在正常动物和实验动物中没有多大差别，但实验动物的阳性Ⅱ级和Ⅲ级较正常动物者明显升高，尤其是Ⅱ级酶活性增高得更显著（见表2）。

表2 中性粒细胞各种酶活性变化

测定结果	正常组 (%)				实验组 (%)			
	ALP	ACP	ATP	SDH	ALP	ACP	ATP	SDH
阴性	25.6	29.8	47.1	45.6	23.3	26.1	48.8	57.3
阳性Ⅰ级	52.9	49.7	52.0	52.2	4.6	12.1	26.1	23.9
阳性Ⅱ级	19.9	19.6	0.9	2.2	66.0	59.6	25.1	18.8
阳性Ⅲ级	1.6	0.9	0	0	6.1	2.2	1.0	0

四、肝脏组织化学观察

核糖核酸（RNA）：正常肝细胞质内RNA多呈颗粒状，鲜红，有分带现象，中央带多于周边带。核为蓝绿色，核仁红色。枯氏细胞质内含少量RNA颗粒。实验第3天和第6天，RNA颗粒就减少，肝小叶周边带明显减少，常呈“低染色区”。

糖原：正常肝细胞质内糖原呈大小不等的圆形紫红色颗粒，周边带略多于中央带。实验第3天和第6

天，糖原减少；实验第9天中央带肝细胞内糖原开始恢复。

碱性磷酸酶（ALP）：正常肝中ALP活性较弱，主要呈现于胆小管处，为黑色细粒条状，分带明显，周边带强于中央带。枯氏细胞呈弱阳性反应（插图1-上，图在封三，下同）。实验第3天和第6天，酶活性明显增高；第9天酶活性仍维持较高水平，周边带更为显著。枯氏细胞呈强阳性（插图1-下）。

酸性磷酸酶（ACP）：正常情况下ACP主要分布于胆小管及其周围，为棕褐色颗粒，连成网格状。枯氏细胞呈阳性。实验第3天，酶活性颗粒减少；实验第6天和第9天胆小管断断续续，不成网状。

三磷酸腺苷酸酶（ATP酶）：ATP酶主要分布于胆小管区，呈棕黑色，连成网格状，周边带酶活性最强，中间带次之，中央带最弱。枯氏细胞呈弱阳性（插图2-上）。实验第3天，酶活性开始减弱；实验第9天，酶活性减弱更加明显（插图2-下）。

葡萄糖-6-磷酸酶（G-6-P）：酶活性颗粒主要分布于肝细胞质内，分布较为均匀，呈棕黄色的粗大颗粒，无分带现象（插图3-上）。实验第3天，中央带和中间带肝细胞内酶活性减弱，呈淡黄色；实验第9天酶活性减弱更为明显（插图3-下）。

琥珀酸脱氢酶（SDH）：正常情况下SDH主要分布于肝细胞质内，酶活性颗粒呈深紫蓝色，周边带反应强于中央带（插图4-上）。实验第3天和第6天，中央带酶活性减弱，周边带酶活性变化不大；实验第9天开始恢复（插图4-下）。

单胺氧化酶（MAO）：MAO也分布于肝细胞质内，酶活性颗粒呈深紫蓝色，均匀分布，无分带现象。实验第3天和第6天，酶活性减弱，呈浅紫蓝色；实验第9天更弱，呈灰蓝色。

细胞色素氧化酶（CCO）：CCO也分布于肝细胞质内，酶活性颗粒呈深蓝色，均匀分布，无分带现象，实验第3天和第6天，酶活性减弱，呈淡蓝色；实验第9天酶活性减弱更加明显。

讨 论

本实验用乙酰苯肼（APH）造成动物体内溶血性贫血，其所引起的症状，如神疲乏力，行动迟缓，团缩弓腰，喘促心悸，面、眼、耳、尾苍白而凉等和血象的变化，如血红蛋白和红细胞迅速下降，而白细胞、网织红细胞和海氏小体则急剧增多，这些均反映了动物血虚证的主要特征^(4,5)。Kozlov (1978)⁽⁶⁾曾给大白鼠注射APH引起贫血，证明此时可引起骨髓造血干细胞

发生变化,使造血干细胞从骨髓向脾脏转移,故在代偿期呈现血细胞增多,红细胞因中毒破坏而减少,而白细胞和网织红细胞则急剧增多,本实验结果与之相符。

关于海氏小体的报道⁽⁵⁻⁸⁾,早在1882年Riess氏发现亚氯酸钾可使红细胞变性中毒,出现球状体或小颗粒。Heinz氏(1890)应用脂肪族或芳香族胺引起实验性贫血,产生包涵体,用苯胍的衍生物也同样产生贫血的包涵体,称此为海氏小体。现已知许多药物所致的溶血性贫血,或使血红蛋白变性者,多有海氏小体的出现,所以海氏小体的出现是溶血性贫血的重要指标,关于溶血与海氏小体出现的机制,曾有过许多报道⁽⁹⁻¹⁸⁾。Carson氏认为由于红细胞内缺乏葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH),可影响红细胞内磷酸戊糖代谢过程中还原型辅酶II(NADPH)的形成。NADPH是谷胱甘肽还原酶的辅酶(GSH),后者对维持红细胞膜的完整性具有重要作用,所以当贫血的红细胞内缺乏G-6-PDH时,使氧化型GSH不易转变为还原型的GSH,GSH生成减少,红细胞膜的稳定性下降,于是便产生溶血现象。

关于中性粒细胞中ALP的报道⁽¹⁵⁻²²⁾都证明各种贫血、出血、外伤、化脓性感染、妊娠、类白血病、淋巴瘤以及注射肾上腺皮质激素等均可引起中性粒细胞中ALP活性增高,并常伴有白细胞总数的增加。本实验结果与之相符。其酶活性增高的原因,目前认为与垂体-肾上腺皮质功能增强有关。但John氏(1977)⁽²⁸⁾认为ALP活性与中性粒细胞内第21对染色体有关,并证明酶活性可由第21对染色体基因所控制。

关于血细胞中SDH的研究报道较少。对酶活性反应意见也不统一。Souza氏(1959)⁽²⁴⁾、Quaglini氏(1960)⁽²⁶⁾指出仅淋巴细胞和单核细胞呈SDH阳性反应,中性粒细胞为阴性。王声远等^(48,51)认为在孵育液配制适当的条件下,大部分成熟的中性粒细胞均呈SDH阳性反应,每个细胞中有2~10个酶活性颗粒。本实验结果显示正常组中性粒细胞呈SDH阳性反应者为54.4%,酶活性颗粒为5~60颗。作者认为中性粒细胞中SDH阳性反应情况可能有如下三个因素:①孵育液配制适当,新鲜;②孵育液内加适量酶活性保护剂——聚乙烯吡咯烷酮(P.V.P);③与Nitro-BT的质量和浓度有关。

本实验所用APH是一种强氧化剂,它对红细胞具有缓慢的进行性氧化损伤作用^(10,14)。而还原型GSH具有抗氧化剂作用,保护红细胞膜上的蛋白质及酶中

必需基团-SH免受氧化而失活,使红细胞保持一定的稳定性,进行正常代谢,而NADPH可使红细胞中已形成的高铁血红蛋白还原成血红蛋白,以维持其正常功能。综上所述,APH可能是直接作用于红细胞膜,并干扰了红细胞中的G-6-PDH,进而使NADPH生成障碍,GSH生成减少,使红细胞膜的稳定性遭到破坏,高铁血红蛋白不易被还原而堆积、凝集成变性的珠蛋白小体(即海氏小体),促使红细胞崩溃,造成溶血性贫血。

注射APH后,肝脏肿大,呈暗红色。镜下看到肝小叶结构破坏,肝细胞排列紊乱,肝血窦扩大,肝细胞轻度肿胀,细胞质内核糖核酸和糖原明显减少,肝小叶间呈现“低染色区”。此种表现随实验天数的增加而更加明显,停注APH后可恢复。本文所观察的结果与某些药物所引起的肝中毒的改变基本相似⁽¹⁷⁻²⁰⁾。

肝脏的ALP活性可随注射APH次数和实验天数的延长而增强,这是因为在贫血、出血、外伤、感染等情况下,肝内ALP合成增加,故酶活性增高。ACP、ATP酶和G-6-P的活性则相反,随注射APH次数的增加而明显下降。

氧化还原酶-SDH、MAO、CCO的活性均在注射APH后呈现明显的下降。酶活性降低的机制可能是因肝细胞内氧化还原酶主要存在于线粒体内,APH造成的贫血动物,由于缺氧,体内代谢降低,肝细胞内线粒体也处于缺氧状态,其氧化磷酸化作用减弱,ATP和磷酸肌酸减少,线粒体膜的通透性增强,其主动转运机能失调,钠和氯离子及水进入线粒体内,引起线粒体肿胀,内膜破裂,故酶活性降低。

综上所述,可以说本实验所做的动物模型,虽然不能完全代表中医的血虚证,但它是属于血虚证的范畴,并反映了血虚证的主要特征。

小 结

本实验共用正常大白鼠50只,体重180~250克,皮下注射APH造成实验性溶血性贫血。观察了血液形态和血细胞化学以及肝脏的组织化学。本实验动物模型虽然不能完全代表中医的血虚证,但它是属于血虚证的范畴,并反映了血虚证的主要特征。

注射APH后,血液中血红蛋白和红细胞计数明显下降,但白细胞、网织红细胞和海氏小体却急剧增多。中性粒细胞中的ACP、ALP、ATP酶、SDH活性反应均不同程度地高于正常。

注射APH后,肝小叶结构明显破坏,肝细胞肿胀,肝血窦扩大,窦内含有大量含铁血黄素。肝细胞

内核糖核酸和糖原颗粒, 随 APH 注射次数的增加而逐渐减少。除 ALP 活性明显增高外, ACP、ATP 酶、G-6-P 以及 SDH、MAO、CCO 活性则随 APH 注射次数的增多而逐渐减弱。

文中简略讨论了 APH 对肝脏的毒性影响和各种酶活性变化的机理。

参 考 文 献

- (1) 贾长恩、叶百宽: 血虚动物模型的初步探讨。待发表资料, 1979。
- (2) 俞慧珠等: 虚损动物模型的初步建立。待发表资料, 1979。
- (3) 第四军医大学: 医学实验常用动物的使用与管理方法。内部资料, 1974。
- (4) 北京中医学院主编: 中医学基础。上海科技出版社, 1979。
- (5) Kozlov VA, et al: ради обнoлогия 18:(2), 287, 1978。
- (6) Dacie JV: Reticulocytosis in hemolytic anemia. Hemolytic anemia. 2nd ed p 25-27, 1960。
- (7) Peisach J, et al: Biochem and Biophysiol Acta 393:(2), 404, 1978。
- (8) Dacie JV: Congenital hemolytic anemia associated with Heinz body formation. Hemolytic anemia. 2nd ed p 95, 1960。
- (9) Carson PE, et al: Science 124:484, 1956。
- (10) Beutler E: Blood 14:103, 1959。
- (11) Godbery B: J Biological chemistry 251:3045, 1976。
- (12) Dern RJ, et al: J Lab Clin Med 45:30, 1955。
- (13) Beutler E: J Lab Clin Med 45:286, 1955。
- (14) Azen FA and Schilling RF: J Lab Clin Med 63:122, 1964。
- (15) Monis MD, et al: J Histochem Cytochem 6:91, 1958。
- (16) Kaplow LS: Blood 10:102, 1955。
- (17) Gomori G: Arch Path (Chicago) 32:189, 1941。
- (18) 于一: 天津医药杂志(2):361, 1962。
- (19) 于一: 天津医药杂志, 输血及血液学附刊(1):117, 1963。
- (20) 华锋: 中华内科杂志 12(7): 653, 1964。
- (21) 廖跃庭等: 中华内科杂志 11(8): 611, 1963。
- (22) 程广泽等: 天津医药杂志 6(12):1037, 1964。
- (23) John B: Cytochemistry of blood cell, Laboratory medicine hematology 5 th ed. p 201, 1977。
- (24) Souza EJ: J, Histochem Cytochem 7:77, 1959。
- (25) Quaglini D: Nature, 187:85, 1960。
- (26) 王声远: 中华内科杂志 20(6):356, 1962。
- (27) 石爱荣等: 解剖学报 6(1):9, 1963。
- (28) 李肇特等: 解剖学报 5(3-4):288, 1965。
- (29) 贾长恩等: 新医药学杂志(3):44, 1978。
- (30) 北京中医学院组织胚胎教研室: 新医药学杂志(11):38, 1976。
- (31) 小松英昭和古泽新平: 临床病理(日)增刊, 32-34: 特集第 34 号, 67, 1978。

介 绍 中 药 兜 肚 治 疗 胃 寒 痛

南通市中医院 吴震西

方药及用法: 草芩、干姜各 15 克, 甘松、山柰、细辛、肉桂、吴茱萸、白芷各 10 克, 大茴香 6 克, 艾叶 30 克。以上共研细末, 用柔软的棉布摺成 20 厘米见方的兜肚形状, 内层铺少许棉花, 将药末均匀撒上, 外层加一块塑料薄膜, 然后用线密密缝好, 防止药末堆积或漏出, 日夜兜于胃脘部, 一个半月为一疗程。如未痊愈, 须更换新药续兜一个疗程。

适应症: 胃脘隐隐作痛, 得食则缓, 泛吐清水, 胃部有冷感, 喜暖喜按, 或兼有大便溏薄, 四肢不温, 病程较久, 脉细, 苔白, 舌淡。中医辨证属脾胃虚寒型者适用本方法治疗。

病例一: 胡××, 女, 34 岁, 市计量所干部。患胃下垂 6 年, 经常纳少, 脘腹胀满, 大便不实, 入秋以后即觉胃痛, 并有冷感, 得热则舒, 时或泛吐清水, 头昏倦, 四肢不温, 形体消瘦, 脉细弱, 苔薄白, 舌边有齿印, 畏服煎剂, 嘱用中药兜肚治疗, 一个半月后诸恙减轻, 食欲渐振, 续用一个疗程, 症状

完全消失, 经 2 年随访, 病未再发。

病例二: 顾××, 女, 30 岁, 晶体管厂工人。胃痛已 5、6 年, 冬季发作较频, 呕吐吞酸, 喜热喜按, 曾作钡餐检查, 诊为慢性肥厚性胃炎, 服中药可暂时缓解, 脉来弦细, 舌淡苔白, 用中药兜肚治疗后即觉脘部温暖舒适, 胃痛明显减轻, 连兜两个疗程, 后因其他疾病来诊, 诉胃痛已愈, 入冬亦未发作。

体会: 本方均为温中散寒, 理气止痛之药, 适宜于辨证属胃寒痛患者。由于本病属慢性疾患, 长期服药诸多不便, 用此法治疗药力经常持久, 确能徐缓图功, 深受患者乐用。

兜肚必须紧贴胃脘部皮肤, 衬衣穿于兜肚外面, 以使药力直达病所。兜肚外层(即靠内衣的一面)必须用塑料薄膜隔绝, 以防药物气味外散而降低药效。兜肚外面可做一层薄布外罩, 以便经常更换洗涤。保持清洁。

(吴自强整理)

血虚动物模型的进一步探讨——溶血性贫血对大鼠 血细胞化学和肝脏的组织化学观察（插图）

（正文见第69页~72页）

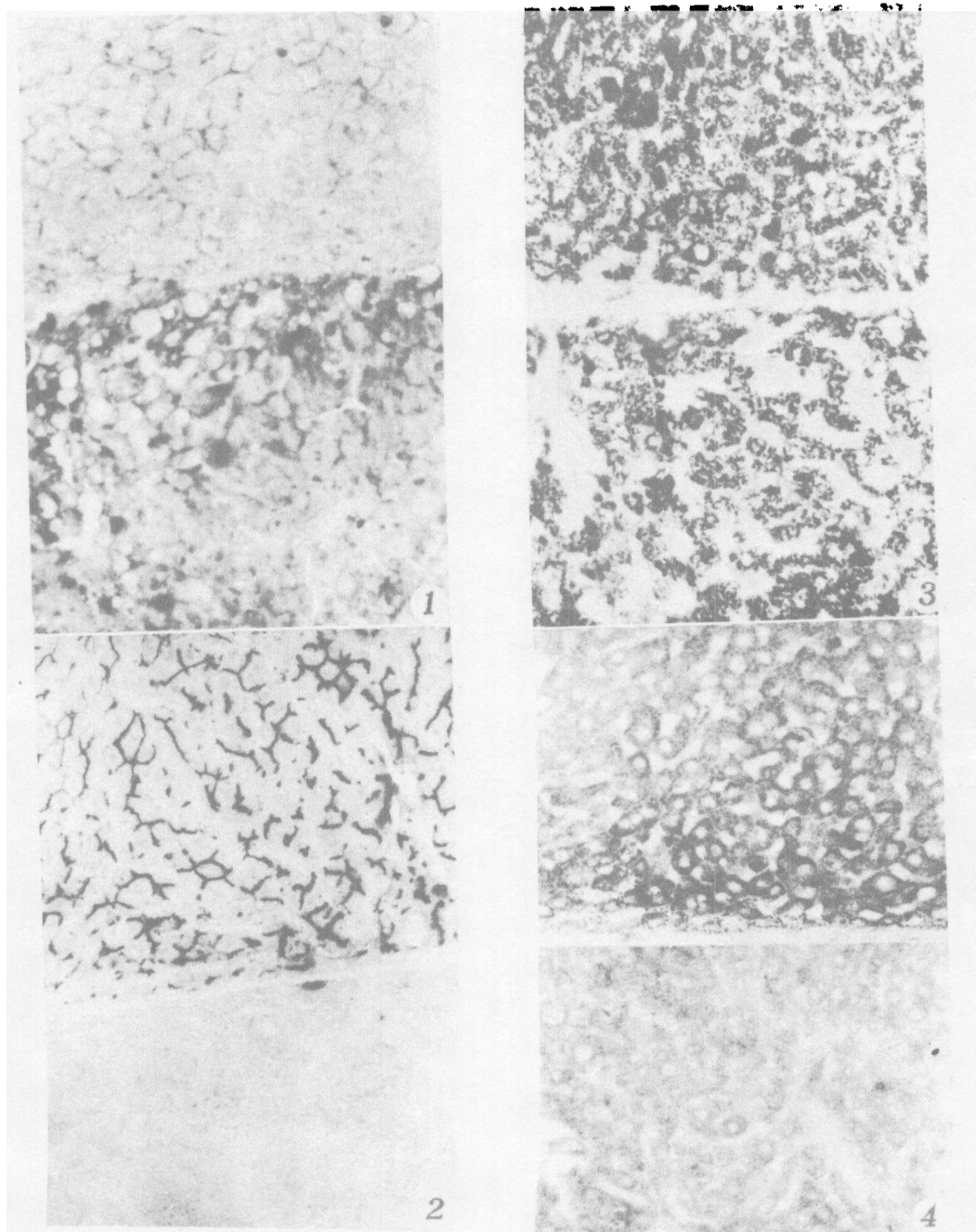


图 1 上示正常肝脏ALP的分布情况；下示注射APH后ALP的分布情况(600×) 图 2
上示正常肝脏ATP酶的分布情况；下示注射APH后ATP酶的分布情况(600×) 图 3 上示正
常肝脏G-6-P的分布情况；下示注射APH后G-6-P的分布情况；(600×) 图 4 上示正常肝脏
SDH的分布情况；下示注射APH后SDH的分布情况(600×)