

实验研究

“阳虚”动物脱氧核糖核酸合成率和助阳药作用的研究

中国人民解放军第二军医大学长海医院中医科

张家庆 刘福春 丁光霞 李菊仙 翟美芙

用液体闪烁法测量低能量粒子的放射性是近二十年来发展的一项新技术。用此技术来测定氚标记的胸腺嘧啶核苷(以下简称 $^3\text{H-TdR}$)掺入脱氧核糖核酸(以下简称DNA)的掺入率可认为是初步具有分子水平的工作。国内已有用此方法研究“阴虚”动物及滋阴药作用的报告⁽¹⁾。至于“阳虚”动物研究尚未见详细的报告。现将我们从1977年起用此方法研究“阳虚”动物以及助阳药和益气助阳药的初步结果,报告如下。

材料与方法

一、动物分组:

用本校自养之雄性小白鼠305只,每只体重25~30克。分五组:正常对照组(43只),助阳药组(45只),“阳虚”组(73只),“阳虚”+助阳药组(76只),“阳虚”+益气助阳药组(68只)。

二、药物制备:

实验用药物均由上海药材公司供应。

(1)助阳药:附子、肉桂、淫羊藿、肉苁蓉各25克。附子加水300毫升,先煎1小时,以后加入其他三味药,分2次共加水1350毫升,共煎5.5小时,将2次煎液混合,浓缩成100毫升,即每毫升含生药1克。

(2)益气助阳药:党参、黄芪各50克,附子25克,肉桂12.5克。煎法同前,浓缩至100毫升,即每毫升含生药1.37克。

三、实验方法:

“阳虚”造型动物每天臀部肌肉注射醋酸氢化考的松(华北制药厂出品)1次,共10天,剂量为0.75毫克/只/天。助阳药组、“阳虚”+助阳药组和“阳虚”+益气助阳药组分别由胃管给药0.5毫升/只/天;正常对照组和“阳虚”组均喂以等容量的生理盐水。

实验第10天,每只小鼠腹腔注射 $^3\text{H-TdR}$ 0.3毫升(含6微居里),注射后1小时杀死动物,取出肝脾

组织,按照Kay等法⁽²⁾改良,提取DNA。先将新鲜肝脾用冷生理盐水洗净,滤纸吸干,称重。在冰浴中剪碎,置于匀浆器中,加冷匀浆液(0.15 M NaCl、0.1 M EDTA、pH 7.5~8)磨成匀浆。将匀浆以纱布过滤,滤液经3500转/分离心15分钟。其上清液为细胞质等碎片,沉淀部分为细胞核。取细胞核部分加2毫升匀浆液,搅匀,放置达室温,加纯化的十二烷基磺酸钠(SDS),使其最终浓度为1.6%。于三角烧瓶中加入玻璃珠振荡摇匀,再加固体氯化钠,使氯化钠浓度达1 M,振荡20分钟后,加入等体积氯仿,再剧烈振荡20分钟。以3500转/分离心15分钟。取上层水相加入2倍体积的冷无水酒精,即可见DNA呈胶状链析出,用玻璃棒卷出此白色纤维即为粗制DNA。以丙酮、乙醚冲洗,干燥后称重,取其中4~9毫克DNA,加甲酸0.2毫升,水浴加温70~80℃,经3~4小时消化后,以 H_2O_2 脱色。加闪烁液(PBD、甲醚二甲苯),用国产FJ-553型液体闪烁计数器测定其脉冲值,按每毫克DNA每分钟的脉冲值计算。

结 果

一、动物外观:

小白鼠经肌注氢化考的松以后,“阳虚”组于1周左右出现活动迟缓、萎靡、蜷缩、弓背、体毛枯疏、尾部突出、眼睁不开,甚至眼瞎等症状。而“阳虚”+益气助阳药组、“阳虚”+助阳药组,虽然也有上述表现,但程度较轻,介于“阳虚”组和正常对照组之间。正常对照组和助阳药组则活动良好,毛有光泽,反应灵活。

二、动物死亡率:

实验期间各组均有一部分动物死亡。正常对照组、助阳药组、“阳虚”组、“阳虚”+助阳药组和“阳虚”+益气助阳药组动物10天内的死亡率分别为2.3%(1/43)、2.2%(1/45)、28.8%(21/73)、35.5%(27/76)和54.4%(37/68)。正常对照组与助阳药组的死亡率相

比较,无显著性差异($P>0.05$);该两组与其他同用氢化考的松的三组相比较,不论加用中药与否,死亡率都有非常显著差异($P<0.001$)。说明死亡主要是因为氢化考的松的影响,而中药对死亡率并无明显的改善。甚至益气助阳药还加重了死亡率,但这问题有待进一步验证。

三、动物体重变化:

实验前后各组的平均体重比较,正常对照组改变不大,助阳药组实验前28.2克/只,10天后30克/只,体重平均增加1.8克/只。“阳虚”组实验前、后体重分别为27.3克/只、24.9克/只,平均减轻2.4克/只;但“阳虚”加用助阳药组则基本无改变,治疗前、后分别为26.9克/只、27.4克/只。

四、肝脾组织改变情况:

“阳虚”组动物肝脾体积缩小,颜色较淡,特别是脾脏只有正常对照组脾脏的1/4~1/5;而“阳虚”加中药的两组大部分动物的肝脾变化不如“阳虚”组那样明显,基本上接近正常对照组,仅个别动物脾脏变薄缩小。

各组取2~3只动物的肝脾进行HE染色,观察肝脾组织学改变。结果“阳虚”组见肝小叶分离,肝细胞索断裂,肝细胞退行性变和脂肪性变明显而广泛;脾脏见巨核细胞较多,网织内皮细胞增生肥大。而应用中药的几个组,肝脾组织学检查多在正常范围内,说明助阳药能减轻氢化考的松对肝脾组织的损害。

五、肝脾DNA合成率:

用前述方法测定各组10天后成活小鼠肝脾DNA合成率。测定结果,正常对照组(42只)、助阳药组(44只)、“阳虚”组(52只)、“阳虚”+助阳药组(49只)和“阳虚”+益气助阳药组(31只)分别为 355 ± 29.5 (均值±标准误,下同)、 386 ± 23.7 、 175 ± 24.7 、 296 ± 22.5 和 359 ± 24.1 脉冲值/分/毫克DNA。“阳虚”组的小鼠肝脾DNA合成率明显减少,与正常对照组或“阳虚”加中药两组者相比较均有非常显著差别($P<0.001$)

讨 论

一、关于方法学问题:

目前对用同位素掺入法液体闪烁计数测定DNA合成率的方法有不同意见,对于它是否代表分子水平有怀疑。国内有些单位用此法所得结果波动较大,也不好解释。但是国外至今用此法研究药物对DNA合成的影响者仍不少^[8~10],甚至用此法研究中药人参对DNA的作用^[8~10],说明此方法仍是一个比较好的方法。不过国外近年来多用纯种细胞组织培养作材料,直

接测定细胞滤过后在滤纸上的放射性,以后再用另法测DNA的含量^[6,7];也有在活体动物身上作的实验,在分离肝细胞核后,在滤纸上测定细胞核的放射性;当然也有在提取DNA后测DNA的放射性的^[8,9]。因此,我们认为分离出DNA以后再测放射性的方法,仍是可取的。根据我们的经验,只要方法学的条件控制严格,所得的结果还是可靠的,也是可以重复的。但必须指出,实验所得的DNA合成率是放射性同位素的脉冲值,它仅仅是个相对值,而不是绝对值,因此只能用来和其他组相比。本测定法尽管DNA的回收率和纯度并不理想,但只要各组条件相同,测定的结果还是可以作对比的。

二、关于“阳虚”动物模型问题:

用肾上腺皮质激素造成“阳虚”动物模型在国内已用了二十多年。我们曾试用过各种较大剂量氢化考的松,所见到的小白鼠衰竭表现与国内报告的相一致,但剂量较大者死亡率较高,眼瞎和尾突出(可能是睾丸突出)也较多见,有的动物反应异常,甚至互相咬死。我们所用剂量为0.75毫克/只/天,较邝氏等^[11]所用者略高。此种动物模型表现与人的“阳虚”表现极相似,且可用助阳药特别是温肾阳药部分纠正,故尤其类似“肾阳虚”。但临床病人的“阳虚”往往经过相当长的时间,或久病致虚,或阴损及阳等才形成,情况相当复杂。而这种动物模型仅仅1周左右即可形成,所用的激素剂量按体重计算是相当大的。故此“阳虚”应是一种急性的药物反应,与临床所见“阳虚”不尽相同。因此,我们认为这种“阳虚”模型不如称为“氢化考的松”模型或“皮质醇”模型更为科学和符合实际。慢性的“阳虚”模型有待将来进一步研究摸索。

三、“阳虚”模型对DNA合成的影响:

从本实验的结果来看,“阳虚”组的DNA合成率明显减少,与正常对照组或“阳虚”加中药组相比较,差别都是非常显著,有统计学意义。此结果与其他单位类似工作结果相同^[12],也与上海中医学院用组织化学所作的结果一致^[11]。国外用氢化考的松或地塞米松所进行的实验也都证明这二种药物能抑制DNA的合成^[3~7]。

单纯应用助阳药组的DNA合成率与正常对照组相仿,而“阳虚”+助阳药组却可使DNA合成率增加到接近正常水平,“阳虚”+益气助阳药组DNA合成率则完全接近正常,效果更为明显。但是加用中药来纠正“阳虚”却不能减少动物提前死亡率。这可能与氢化考的松剂量较大,死亡率高,也可能为给药到第10天时,DNA的合成率虽有纠正,但一些生命中枢

所受影响在短期内尚未能得以纠正之故。至于加用益气助阳药组动物死亡率较加用助阳药组更高,目前尚难圆满解释,很可能与我们只用了附子、肉桂,未用肉苁蓉、淫羊藿有关,有待将来进一步研究。

四、助阳药和益气助阳药对 DNA 合成的影响:

从本实验来看,这些中药都可使 DNA 合成率增加。但是这种增加对 DNA 合成率已下降者才明显,对正常动物影响不大。这很可能与所用药物的剂量有关。我们过去曾观察过少量动物,把益气助阳药剂量增加一倍,结果 DNA 合成率反而有所下降,且死亡率更高。这提示我们中药剂量使用要适当,不可盲目地使用大剂量。至于益气药我们未作单独的实验,根据日本 Oura 等的报告⁽¹⁰⁾认为人参提取物能增加肝 RNA 和蛋白质的合成,但不能增加 DNA 的合成。而以后 Yamamoto 等^(8,9)研究认为,人参提取物对骨髓和睾丸细胞不论在活体或试管内都能增加 DNA、RNA、蛋白质以及脂肪的合成。这似可说明加用益气助阳药组的 DNA 合成率较加用助阳药组为高,但经统计学处理差别还不够明显。

五、中医“肾”与 DNA 的关系:

古人认为“肾”是先天之本,生命之所系,生长、发育全赖于肾,是非常重要的。甚至认为“肾之盛则寿延,肾之衰则寿夭⁽¹³⁾”。而现代医学认为核酸是机体组织中非常重要的物质, RNA 决定蛋白质的生物合成, DNA 影响 RNA 的合成,它们又与遗传信息、免疫等有关。从动物表现来看,氢化考的松形成的“阳虚”模型基本上是“肾阳虚”。中医认为“久病及肾”,重病、久病均伴有“劳损”、“虚损”症状,这些都和全身代谢有关。联系肾阴虚模型和滋阴药也影响核酸代谢,使 DNA 合成率先上升,后下降,最终都减少的报告⁽¹⁾,结合本实验结果,说明“肾阳虚”、“肾阴虚”等实质都可能包含了核酸代谢的异常这样一个本质问题。因此,我们认为,核酸代谢可能是“肾”

本质的一个重要方面,值得进一步研究。

林薇同志参加了初期技术工作,特此致谢。

参 考 文 献

- (1) 上海中医学院正常人体学教研组: 新医学杂志 (9): 417, 1977.
- (2) Kay E, et al: The isolation of DNA from calf thymus. J Am Chem Soc 74:1724, 1952.
- (3) Sanfacon R, et al: Dexamethasone treatment of the guinea pig fetus: its effects on the incorporation of ³H-thymidine into deoxyribonucleic acid. Am J Obst Gyn 127:745, 1977.
- (4) Linebaugh BE & Rillema JA: Actions of insulin and hydrocortisone on macromolecular synthesis in primary epithelial cell cultures from mouse mammary glands. Endocrinol 105(3):806, 1979.
- (5) Segel GB, et al: Glucocorticoid suppression of human lymphocyte DNA synthesis; influence of phytohemagglutinin concentration. J Lab Clin Med 95(4):624, 1980.
- (6) Yang JA, et al: Inhibition of DNA synthesis in cultured lymphocytes and tumor cells by extracts of Betelnuts, Tobacco and Miang leaf, Plant substances associated with cancer of the ororespiratory epithelium. Cancer Res 39:4802, 1979.
- (7) Fodge DW & Rubin H: Differential effects of glucocorticoids on DNA synthesis in normal and virus-transformed chick embryo cells. Nature 257 (5529):804, 1975.
- (8) Yamamoto M, et al: Stimulatory effect of Panax ginseng principles on DNA, RNA, protein and lipid synthesis in rat bone marrow. Arzneim-Forsch 27(6):1169, 1977.
- (9) Yamamoto M, et al: Stimulatory effect of Panax ginseng principles on DNA and protein synthesis in rat testes. Arzneim-Forsch 27(2):1404, 1977.
- (10) Oura H, et al: Synthesis and characterization of nuclear RNA induced by Radix ginseng extract in rat liver. Chem Pharm Bull 19(8): 1598, 1971.
- (11) 邱安堃等: 中华内科杂志 (11):113, 1963.
- (12) 刘亚光: 陕西新医药(6):1, 1977.
- (13) 明·虞抟: 医学正传. 卷1, 第9页, 人民卫生出版社, 北京, 1965.

《中西医结合杂志》扩大征订及补购启事

由中国中西医结合研究会和中医研究院主办的全国性医学期刊《中西医结合杂志》创刊以来,深受国内外读者欢迎,1982年度发行量猛增。

1982年下半年,本刊将扩大发行,适当调整版面,进一步提高科学性和实用性,理论与实际结合,提高与普及结合,增加临床诊疗经验、普及中西医结合知识和专题讨论等内容,以崭新面貌适应中西医结合事业的发展和广大读者的需要,成为您学习和探索中西医结合的良师益友。欢迎您及时到当地邮局订阅。期刊代号2-52。

很多读者来信反映,苦于没有购得本刊创刊号,本刊将为您提供方便,有需补购1981年第1期(创刊号)、第2期及1982年第1、2期者,特别是各地图书馆、资料室,需完善资料,补齐本杂志刊期者,请速与编辑部联系函购,每期0.45元,外埠每册加邮费6分、本市加3分。来函及汇款请寄:北京西苑《中西医结合杂志》编辑部收,并注明所需刊期。