

“气血注射液”对溶血性贫血大白鼠 脾脏的组织化学研究

北京中医学院组织胚胎教研室 张 颖

导师: 贾长恩 俞慧珠

贫血是临床上常见的病症, 中医辨证属于血虚的范畴。它不仅是血液或造血系统的疾患, 而且对机体的其它器官和组织也产生重要的影响。贫血的种类很多, 溶血性贫血是其中之一, 患者最明显的体征之一是脾脏肿大。本室在探讨血虚动物模型的实验过程中也观察到, 乙酰苯肼造成溶血性贫血的大鼠有明显的脾肿大^(1,2)。本实验在造成大白鼠溶血性贫血的基础上, 给予“气血注射液”治疗, 观察该药物对脾脏组织化学的影响, 从而为研究与阐明气血本质提供实验形态学依据。

材料和方法

实验用体重为180~250克成年雄性大白鼠100只。其中, 实验组40只, 治疗组44只, 对照组16只。各组动物饲养条件相同, 自由进食和饮水。实验组和治疗组动物均于实验的第1、4、7天经皮下注射2%N-乙酰苯肼(APH)**, 首次剂量为20毫克/100克体重, 以后两次注射剂量减半。治疗组动物于实验第1天开始, 每日口服“气血注射液”1毫升/100克体重。对照组皮下注射生理盐水。观察动物一般体征, 取末梢血, 测血红蛋白含量及红细胞计数, 并于实验第3、6、9、13天分批将动物断头处死。

取脾脏组织块, 用Carnoy氏液固定, 石蜡包埋, 切片厚5微米, 分别观察: (1) 核酸: Kurnik氏甲绿一派若宁法显示, 以水解法及核糖核酸酶消化法做对照; (2) 糖原: McManus氏PAS反应⁽³⁾显示; (3) 蛋白质结合-SH: Barrnett和Seligman氏D. D. D法⁽⁴⁾显示。

取新鲜脾组织块, 用干冰骤冷, 恒冷切片, 厚5微米, 进行酶的组织化学反应: (1) 琥珀酸脱氢酶: Nachlas N-BT法⁽⁵⁾显示; (2) 谷氨酸脱氢酶: Hess Scarpelli和Pearse法⁽⁶⁾显示; (3) 酸性磷酸酶: Lillie铅法显示; (4) 三磷酸腺苷酶: Wachstein and Mei-

sel法⁽⁷⁾显示; (5) 葡萄糖-6-磷酸酶: Wachstein and Meisel法⁽⁸⁾显示; (6) 非特异性酯酶: Yam and Crosby法⁽⁹⁻¹¹⁾显示; (7) 抗氟化物酯酶: Davis and Ornstein氏法^(10,11,12)显示。

观察结果

一、一般体征

实验动物注射APH后, 第2天即明显表现出进食减少, 精神萎靡, 目不圆睁, 眼球由红亮转为色淡无光, 耳鼻及四肢尖端略显苍白, 烦渴, 体重减轻……。随注射次数增加, 上述表现日趋严重, 并伴有尾部发凉, 毛蓬松无光且大量脱落, 心跳及呼吸加速, 反应迟钝; 多数动物的阴囊皮肤皱缩, 辜丸隐缩到腹腔内。上述变化于实验第9天时最突出。此后, 动物进入恢复期, 体重逐日增加, 精神状况逐渐好转。实验组动物贫血严重, 第3天时最甚, 其末梢血液血红蛋白含量可由正常时的11.9克%降至3.7克%。治疗组动物与实验组动物相比, 于实验初期, 动物的一般体征未见明显差异, 第6天以后, 治疗组动物则表现出精神较好, 尾部由凉转暖, 体重恢复较迅速, 贫血程度较轻, 其末梢血液血红蛋白含量由正常时的12.9克%降至第3天的5.7克%, 以后各天的血红蛋白含量也均较实验组者为高。

二、组织化学观察

1. 核酸: 正常大鼠脾小体生发中心多数为大、中淋巴细胞, 胞质与核仁中有丰富的核糖核酸(RNA), 被派若宁染成深粉红色, 脾小体其它部位RNA含量较少。红髓脾索内RNA含量很少的小淋巴细胞较多, 而大、中淋巴细胞较少; 此外, 还可见一些聚集成堆的晚幼红细胞及少量处于分裂期的细胞, 胞质内含有

* 气血注射液由黄芪、当归、人参三味药提取制成, 浓度为1克/毫升, 北京中医学院制剂教研室制。

** 本实验所用APH为北京化工厂产品, 实验试剂三级。

丰富的 RNA。实验动物注射 APH 后第 6~9 天, 脾红髓内大、中淋巴细胞明显增多, 聚集成堆分布于脾索各处; 处于分裂期的细胞和幼稚的红细胞数目增多。上述变化均使红髓的 RNA 含量明显地增加。治疗动物与实验动物比较, 在实验的第 6~9 天, 前者红髓脾索内大、中淋巴细胞的嗜派若宁性较强, 细胞质染色较深, 处于分裂期的细胞数目较多。上述变化均使治疗动物脾红髓的 RNA 含量比实验动物稍多。实验第 13 天, 治疗动物脾红髓中的陈旧性含铁血黄素含量较实验动物者少。

2. 蛋白质结合—SH、糖原、琥珀酸脱氢酶(SDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、三磷酸腺苷酶(ATP 酶): 治疗动物与实验动物比较, 脾脏内的蛋白质结合—SH、糖原的含量以及 SDH、GDH、ATP 酶的活性均无明显差异。

3. 酸性磷酸酶(ACP): 正常大鼠脾脏内, 此酶的活性分布是红髓活性大于白髓活性。脾小体生发中心和网状带只有少数细胞呈 ACP+, 在脾红髓的脾索周围, 因巨噬细胞较多, 故此处的酶活性较强。实验动物注射 APH 后第 3 天, 由于巨噬细胞体积增大, 但细胞内的酶活性颗粒并未明显增多, 故使巨噬细胞染色较正常稍浅。第 6 天以后, 巨噬细胞数量明显增多, 体积增大, 细胞内的酶活性明显增强, 加之脾红髓中的中性粒细胞数量增多, 细胞的酶活性增强, 因而脾红髓的 ACP 活性逐渐增强。据观察第 6 天时脾红髓的 ACP 活性稍高于正常水平, 第 9 天达高峰, 第 13 天略有下降, 但仍高于正常。治疗组动物脾脏 ACP 活性与实验组比较, 于 3~9 天时差别不明显。但到第 13 天时, 治疗动物脾红髓的 ACP 活性明显高于实验组动物(见封三图 1、2), 其主要原因是治疗组动物脾红髓内的巨噬细胞酶活性较强。

本实验还对脾脏内的中性粒细胞 ACP 活性变化进行了观察, 并参考碱性磷酸酶分级积分法^[18], 将实验动物、治疗动物和正常动物的脾脏内中性粒细胞的 ACP 活性分别进行比较。结果是: 实验动物的中性粒细胞 ACP 活性积分高于正常动物; 第 3~6 天治疗组动物稍高于实验动物(表 1)。

4. 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P): 正常大鼠脾脏中, 此酶的活性分布是红髓活性大于白髓活性。淋巴细胞和巨噬细胞的 G-6-P 活性都是 $\pm \sim +$, 脾索内皮细胞 $++$ 。实验动物注射 APH 后 3~6 天, 脾红髓的 G-6-P 活性有所下降。其主要原因是脾索内的淋巴细胞减少, 巨噬细胞的体积虽然增大, 但细胞的酶活性并未明显增加。第 9 天时由于巨噬细胞的数量、体积及其

表 1 实验组和治疗组大鼠脾脏内中性粒细胞 ACP 活性积分值的测定

测定时间	实验组 均值±标准差 (动物数)	治疗组 均值±标准差 (动物数)
实验第 3 天	249.0±27.88(3)	270.0±2.83(2)**
实验第 6 天	276.7±8.97(3)*	296.5±2.12(2)**
实验第 9 天	303.0±25.16(3)**	309.0±13.45(3)**
实验第 13 天	268.0±11.31(2)	258.5±0.71(2)*

对照组为 4 只健康大鼠, 其 ACP 活性积分值为 235.50±10.50(均值±标准差)。* 与对照组比较 $P<0.05$; ** 与对照组比较 $P<0.01$

酶活性均明显增加, 大多数巨噬细胞的酶活性显示为 $++ \sim +$, 因此, 脾红髓的 G-6-P 活性较前增强, 接近于正常水平。至第 13 天时仍稍高于正常水平。治疗组动物在实验的第 3~9 天, 脾红髓的 G-6-P 活性变化规律及其强弱程度均与实验组动物无明显差异。至第 13 天时, 治疗动物的酶活性稍强于实验组动物(见封三图 3、5), 其主要原因是由于巨噬细胞内的酶活性较强。

5. 非特异性酯酶(n-E): 正常脾脏中, 此酶活性分布是红髓活性大于白髓活性。红髓脾索中的部分细胞呈 $\pm \sim +$ 。实验动物注射 APH 后, 脾红髓的酶活性明显增强, 此种变化与注射 APH 的次数相平行, 第 9 天达高峰, 13 天时有所下降, 但仍高于正常水平。上述变化主要是由于巨噬细胞的数量、体积及其酶活性改变而引起的。治疗组动物脾红髓的 n-E 活性与实验组动物比较, 于实验第 3~9 天时未见明显差异, 至第 13 天治疗组的酶活性明显增强(见封三图 5), 这主要是由于巨噬细胞的酶活性较强所致。

6. 抗氟化物酯酶(Fluoride-resistant esterase): 本方法使用氟化钠将脾脏内其它细胞的非特异性酯酶全部抑制, 只有巨噬细胞的酯酶活性仍保留之, 并显示为 $\pm \sim +$ 反应。所以, 此法对巨噬细胞具有特异性。在正常大鼠脾脏内此酶活性很弱, 其分布是红髓活性大于白髓活性。白髓脾小体生发中心只有少数巨噬细胞, 此酶活性呈弱阳性; 红髓脾索内有较多的巨噬细胞, 其酶活性呈 $\pm \sim +$ 。实验动物注射 APH 后, 脾红髓内此酶活性由于巨噬细胞数量增多、体积增大, 酶活性明显增强, 其变化规律与 n-E 相同。普通光镜下观察, 在实验的第 3、6、9 天治疗动物与实验组动物比较, 脾红髓的酶活性未见明显差异。13 天时, 治疗组动物的酶活性明显地高于实验动物(见封三图 6)。但经 Leitz-MPV₂ 型显微分光光度计双波法定量测定巨噬细胞内抗氟化物酯酶活性的结果表明, 在实验的

第3、6、9、13天, 治疗组动物脾红髓巨噬细胞中的抗氟化物酯酶活性都比相应实验组动物增强, 其中以13天时的差别最明显。经统计学处理均有显著差异(表2)。

表2 APH溶血时大鼠脾脏巨噬细胞内抗氟化物酯酶活性的测定

测定时间	实验组 均值±标准差 (细胞数)	治疗组 均值±标准差 (细胞数)
实验第3天	79.30±0.205(100)*	118.01±0.166(100)** [△]
实验第6天	101.22±0.210(100)*	132.37±0.186(100)** [△]
实验第9天	216.59±0.371(100)*	222.97±0.417(100)** [△]
实验第13天	99.81±0.238(100)*	152.32±0.191(100)** [△]

对照组为健康大鼠, 其脾红髓内100个巨噬细胞的抗氟化物酯酶活性为10.67±0.101单位(均值±标准差)。* 与对照组比较 $P<0.01$; [△] 与实验组比较 $P<0.01$

讨 论

一、动物注射APH后, 其末梢血液血红蛋白含量和红细胞计数急剧下降⁽¹⁾, 表明动物产生急性重度贫血。与此同时, 动物还表现出粘膜和角爪苍白、毛发无光泽并大量脱落、体重减轻、乏力、尾凉及反应迟钝等体征, 均与贫血患者的体征相似, 也与中医血虚的某些证候相似。上述各种表现除有血虚证候外, 还有气虚的证候, 这表明APH溶血性贫血的大鼠有血虚和气虚的征候同时存在。

治疗组动物的贫血程度较轻, 于实验第6天后表现出一般状态较佳, 说明“气血注射液”对溶血性贫血具有一定的治疗作用。该注射液兼有人参黄芪汤和当归补血汤之功效, 既能补气, 又能益气生血, 治疗贫血可得到较好疗效。

二、治疗动物与实验动物比较, 脾脏的组织化学变化也表现出一定的差异。首先, 治疗动物脾红髓中的RNA含量稍多于实验动物, 表现为脾索内大、中淋巴细胞的RNA含量稍多, 派若宁染色较深, 说明这些细胞的蛋白质合成代谢旺盛; 脾索内处于分裂期的细胞数目较多, 说明细胞分裂增生活跃。上述变化均表明治疗动物脾脏的造血功能较旺盛, 这有利于贫血症状的改善, 也有利于脾脏组织结构的恢复。

治疗动物的上述变化与实验中所用的“气血注射液”有关。此注射液中的大补元气, 具有补脾益气之功效, 气能生血, 通过补气可以达到生血的目的。据近代研究, 从人参中分离出一种含多种人参甙的成分⁽¹⁴⁾, 它具有促进DNA、RNA、蛋白质和脂质

合成的作用, 还能促使骨髓细胞分裂增生。治疗组动物脾红髓中的RNA含量较多就可能与此种作用有关。

三、在观察脾脏内ACP、G-6-P、n-E、抗氟化物酯酶等组化反应时发现, 在实验第3、6、9天, 于普通光镜下治疗组动物与相应的实验组动物相比, 其脾红髓内的上述几种酶活性并无明显差异, 但在第13天时, 上述几种酶活性治疗组动物则明显地高于实验组动物, 主要表现为巨噬细胞的酶活性较强。这些酶都是与巨噬细胞的吞噬、“消化”功能有关的酶⁽¹⁵⁾。由此可以说明“气血注射液”确实有使溶血的大鼠脾脏内巨噬细胞吞噬功能增强的作用。

近年来, 一些实验研究证明黄芪和当归补血汤对巨噬细胞的吞噬功能有促进作用^(15,16)。黄芪可促使培养细胞中的溶酶体明显增加, 细胞活力和ACP活性增强⁽¹⁷⁾, 这些结论与本实验结果是一致的。

四、在普通光镜下观察, 于实验第3、6、9天时, 治疗动物脾红髓内的抗氟化物酯酶活性与实验动物比较无明显差异。但用显微分光光度计进行定量观测的结果则有所不同, 即在整个实验过程中, 治疗组动物脾脏巨噬细胞内的抗氟化物酯酶活性均比实验组动物增强。以上两种观察结果不同的原因可能在于: 注射APH后第3~9天, 实验组动物脾脏巨噬细胞的抗氟化物酯酶活性也有极明显的增强, 因而造成治疗组动物与实验组动物之间的差别难以在普通光镜下加以区别; 中药的药理作用发挥比较慢, 在实验的初期未能充分显示出药物的治疗作用。第9天以后, 实验组动物巨噬细胞的酶活性很快降低, 而治疗组动物却由于气血注射液的作用而使酶活性仍维持在较高水平, 所以, 第13天时二者的酶活性相差较大, 以至在普通光镜下能够区别出来。显微分光光度计测定结果显示, 第3、6、9天时, 治疗与实验组巨噬细胞的酶活性差值较小, 而第13天时的差值较大, 这是符合上述的变化规律的。由此可知, 过去在比较组织化学反应结果时, 于普通光镜下看不出明显差异的, 并非真正没有差异, 而是由于肉眼分辨能力有限, 不能觉察到较小的差别之故。据此推测, ACP、G-6-P、n-E等酶在治疗组动物脾脏巨噬细胞内的活性在整个实验过程中均比实验组的强。可以认为, “气血注射液”可使溶血性贫血大鼠脾脏红髓内的ACP、G-6-P、n-E及抗氟化物酯酶等水解酶的活性增强。

小 结

用体重180~250克雄性大白鼠100只, 皮下注射APH造成急性溶血性贫血, 并对其中部分动物给

予口服“气血注射液”进行治疗, 观察动物的一般体征及其脾脏的组织化学变化, 比较治疗动物与实验组动物的差异, 从而探讨“气血注射液”对溶血性贫血的治疗作用。实验中还应用了显微分光光度计定量测定了巨噬细胞内抗氟化物酯酶活性。

实验中观察到, 治疗动物的一般状况较好, 贫血程度较轻, 脾红髓的RNA含量较多, ACP、G-6-P、n-E、抗氟化物酯酶等水解酶的活性较实验组动物为强。由此认为, “气血注射液”的补气生血作用除可改善溶血性贫血动物的一般状况、减轻贫血程度外, 还可增强巨噬细胞的吞噬功能, 从而增强了机体的非特异性免疫功能。

参 考 文 献

- (1) 贾长恩、叶百宽: 上海中医药杂志 (6):38, 1981。
- (2) 贾长恩等: 中医杂志 (6):69, 1981。
- (3) McManus JFA: Stain Tech 23:99, 1948。
- (4) Barka T, et al: Histochemistry Theory, Practice

and Bibliography. Harper & Row Publishers Inc New York, 1963。

- (5) 皮尔斯 (马仲魁、郑仁凤等译): 组织化学。人民卫生出版社, 1965。
- (6) Wachstein M, et al: Am J Clin Path 27:13, 1957。
- (7) Wachstein M, et al: J Histochem Cytochem 4: 592, 1956。
- (8) Davis BJ, et al: J Histochem Cytochem 20:1049, 1972。
- (9) Barka T, et al: J Histochem Cytochem 10:741, 1962。
- (10) Yam LT, et al: Am J Clin Pathol 55:283, 1971。
- (11) Davis BJ, et al: J Histochem Cytochem 7:297, 1959。
- (12) 北京医学院编: 血液组织化学。内部资料。1961。
- (13) 北京中医学院主编: 中医学基础。上海科学技术出版社, 1978。
- (14) 张颖: 实验性溶血性贫血对大白鼠脾脏影响的组织化学研究。待发表, 1981。
- (15) 张蕴芬等: 新医药学杂志 (3):56, 1979。
- (16) 北京结核病研究所同位素实验室: 新医药学杂志 (8):13, 1974。
- (17) 洪涛主编: 生物医学超微结构与电子显微镜术。科学出版社, 1980。

以化痰扶正法治疗慢性阻塞性肺部疾病 37 例

上海市中医医院 陈孝伯 张毓慧

慢性阻塞性肺部疾病, 包括慢性支气管炎、支气管哮喘、阻塞性肺气肿及肺原性心脏病, 统属祖国医学哮喘病范畴。从 1981 年 5 月起, 我院呼吸病门诊选择了具有舌质紫暗、舌下静脉曲张等明显瘀阻现象的“慢阻肺”病人 37 例, 根据辨病与辨证相结合的原则, 应用活血化痰药物进行治疗, 并观察治疗前后血液流变学的变化, 现报道如下:

一、一般资料: 本组 37 例, 男 27 例, 女 10 例, 年龄 20~29 岁 3 例, 30~39 岁 1 例, 40~49 岁 3 例, 50~59 岁 12 例, 60~69 岁 14 例, 70~79 岁 4 例; 属单纯性慢性支气管炎 22 例, 哮喘性慢性支气管炎 15 例, 其中合并肺气肿 14 例, 肺原性心脏病 10 例, 支气管扩张 1 例。在治疗过程中, 对咳、喘、痰等症状进行临床观察, 对连续用药 1.5~2 个月以上者, 作为统计对象。

二、治疗方法: 蓬莪术 15 克, 及己 3~6 克, 马鞭草 15 克。偏气虚或阳虚者加四叶参 20 克, 炒白术 15 克, 鹿含草 20 克; 偏阴虚者加北沙参 15 克, 淮山药 12 克, 五味子 6 克; 表虚自汗易感冒者加黄芪或玉屏风散等。每日 1 剂, 水煎, 分 2 次服。

三、治疗结果: 本组显效 16 例, 占 43.3%; 有效 16 例, 占 43.3%; 无效 5 例, 占 13.4%; 总有效

率为 86.6%。

在用本法治疗前后, 我们还观察了红细胞压积、全血比粘度、还原粘度、血浆比粘度、纤维蛋白原、血沉、血沉方程 K 值等血液流变学指标。结果, 除血球压积原属正常范围而治疗后无明显变化外, 其余六项指标均较治疗前 (治疗前该六项指标均较正常值明显增高) 明显降低 ($P < 0.05 \sim 0.001$)。

四、体会: 我们根据“慢阻肺”的特点, 选用蓬莪术、及己、马鞭草三味较强的活血化痰药为基本方, 既有活血利窍、清热解毒之力, 兼有止咳化痰、利水消肿之功。但及己据《本草纲目》记载, 性味苦平有毒, 临床应用时剂量应严格掌握, 切不可过量。祖国医学认为该病其标在肺, 其根在脾肾, 因此在治标的同时, 要注意标本兼顾, 扶正固本, 偏气虚或阳虚者, 补肺脾肾三脏之阳气, 选用四叶参补肺气, 白术补脾气, 鹿含草温肾阳。四叶参即山海螺, 《名医别录》记载其味甘温, 益气长肌肉, 用之既能补肺益气, 且有润肺祛痰、排脓解毒作用; 偏阴虚者补肺脾肾三脏之阴, 选用北沙参养肺阴, 淮山药补脾阴, 五味子滋肾阴。俾化痰而不伤正, 扶正而不碍邪, 以冀瘀去正复, 阴阳平衡, 气血调和。从本文观察的治疗后血液流变学的明显变化, 也进一步说明了该方的治疗作用。

气血注射液对溶血性贫血大鼠脾脏的组织化学研究

(正文见第71~74页)

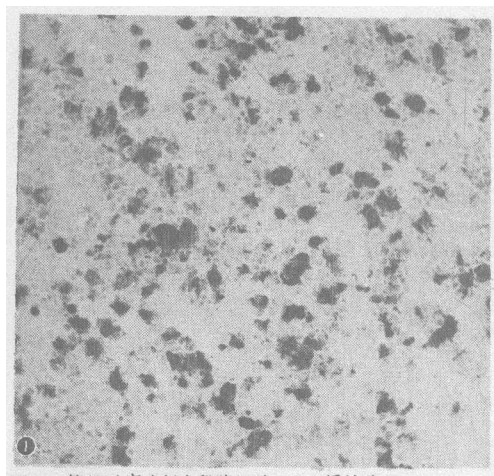


图 1 第13天实验组大鼠脾红髓ACP活性分布。×250

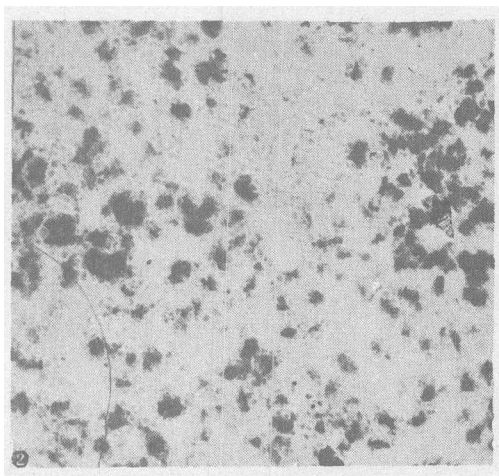


图 2 第13天气血注射液组大鼠脾ACP活性分布。×250

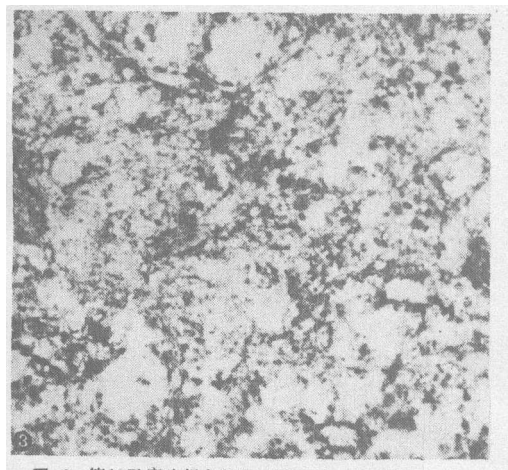


图 3 第13天实验组大鼠脾红髓G-6-P活性。×250

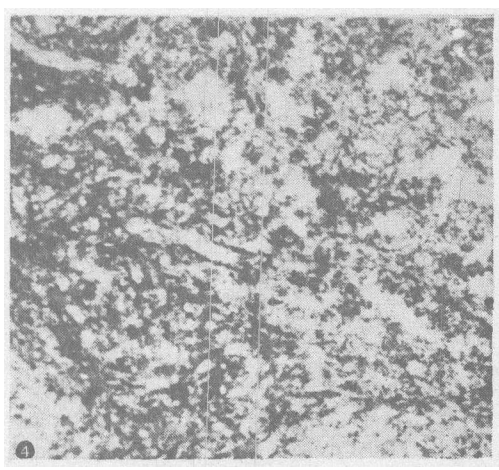


图 4 第13天气血注射液组大鼠脾红髓G-6-P活性。×250

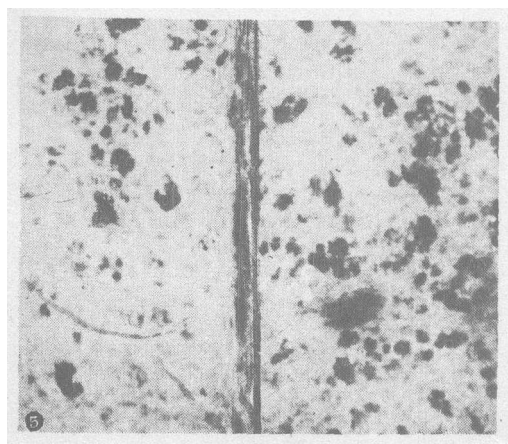


图 5 第13天实验组大鼠(左)与气血注射液组(右)
脾红髓n-E活性比较。×250

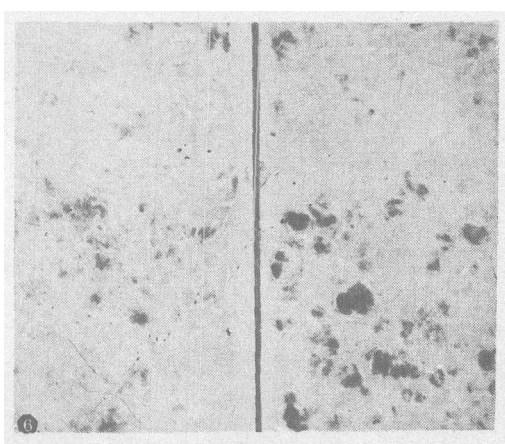


图 6 第13天实验组大鼠(左)与气血注射液组(右)
脾红髓抗胆碱酯酶活性比较。×250