

中药方剂研究

中药复方对小白鼠氢化考的松模型肝组织的组织学与组织化学研究 ——右归丸及补中益气丸等的研究

上海中医学院组织胚胎学教研组

施玉华 马正立 汪丽亚 施九皋 蒋丽华 陈 计 姜 明 杨美玲 李家琪

我们曾用大剂量醋酸氢化考的松造成小白鼠“阳虚”模型，以助阳药进行实验性治疗，研究肝、脾、舌等的组织学、组织化学及电镜结构的变化^(1~3)。本实验研究中药古方右归丸及补中益气丸等对上述动物模型的作用，重点进行肝的组织学及组织化学研究，附带观察脾、胸腺及肾上腺的变化。

材料与方法

一、材料与分组

实验动物为25~30克重雄性小白鼠，共340只，分两批进行实验。实验用中药均为市售成品。补中益气丸为兰州制药厂产品，右归丸为上海中国制药厂产品，六味地黄丸为长沙市中药一厂产品。以上三种成品，实验前均加水，煎为汤剂备用。

二、分组及给药方法

第一批实验（实验Ⅰ）：共165只小白鼠。分为四组，即正常对照组、氢化考的松Ⅰ组（简称氢考Ⅰ组）、补中益气丸Ⅰ组（简称补气丸Ⅰ组）和右归丸Ⅰ组。除正常对照组外，其余三组动物均每天肌注氢化考的松0.8毫克/只。补气丸Ⅰ组动物每天灌服补中益气丸煎剂0.5毫升（含生药0.035克，为人用量的20倍），右归丸Ⅰ组动物每天灌服右归丸煎剂0.5毫升（含生药0.12克，为人用量的20倍）。各组动物均于实验的第3、6、9天分批处死，进行组织学观察。

第二批实验（实验Ⅱ）：共175只小白鼠。分为五组，即正常对照组、氢化考的松Ⅱ组（简称氢考Ⅱ组）、补中益气丸Ⅱ组（简称补气丸Ⅱ组）、右归丸Ⅱ组和六味地黄丸+右归丸Ⅱ组（简称六右丸Ⅱ组）。除正常对照组外，其余四组动物均每天肌注氢化考的松0.8毫克/只，共5天。补气丸Ⅱ组和右归丸Ⅱ组动

物，实验期间分别每天灌服补中益气丸煎剂和右归丸煎剂，给药剂量与实验Ⅰ同。六右丸Ⅱ组动物在实验的第1、2天，每天灌服六味地黄丸煎剂0.5毫升（含生药0.15克，为人用量的20倍），第3天起每天灌服右归丸煎剂，给药剂量同实验Ⅰ。各组动物均于实验的第5、10、13天分别处死，进行组织学观察。

三、取材及染色方法

以颈椎脱位法处死动物后立即取材（肝、脾、胸腺、肾上腺）。将各同种组织同时放置于一个金属组织台上，用恒冷箱切片机切片，然后用组织化学方法分别染色。

1. 肝染色：肝HE染色，Hotchkiss PAS法显示糖原，甲绿派若宁法显示核糖核酸（RNA），Gomori钙法显示硷性磷酸酶（AKP），Gomori铅法显示酸性磷酸酶（ACP），Pearse显示琥珀酸脱氢酶（SDH），Nitro BT显示谷氨酸脱氢酶（GDH）⁽⁴⁾，Glennier四唑盐法显示单胺氧化酶（MAO）⁽⁵⁾，Wachstein法显示三磷酸腺苷酶（ATPase）⁽⁴⁾，Wachstein铅法显示5-核苷酸酶（5-Nase）⁽⁵⁾，Wachstein铅法显示葡萄糖-6磷酸酶（G-6-P）⁽⁵⁾，Pearse法显示葡萄糖-6磷酸脱氢酶（G-6-PH）⁽⁵⁾，MTT法显示乳酸脱氢酶（LDH）⁽⁶⁾，以 α -Naphthyl acetate法显示非特异性酯酶（N-Ease）⁽⁶⁾，亚铁氰化铜法显示胆碱脂酶（ChE）⁽⁶⁾。

2. 脾、胸腺、肾上腺染色：均HE染色，甲绿派若宁法显示脾RNA， α -Naphthyl acetate法显示肾上腺非特异性酯酶。

实验结果

一、肝脏的变化

1. 肝细胞的组织结构变化: 经 HE 染色正常对照组肝细胞呈多角形, 细胞质内含嗜碱性颗粒, 细胞核较大, 染色质疏松, 核仁清楚 (图 1, 图在封三, 下同)。氢考组 3、5、6、9 天肝细胞发生不同程度的变性, 细胞可以肿大, 发生空泡及脂肪变性, 细胞核比较浓缩, 有些动物的肝组织比较正常; 氢考 II 组 10、13 天时, 肝细胞有一定程度的恢复, 接近正常, 但较正常对照组仍有差别 (图 2)。补气丸组 3、5、6 天时, 肝细胞结构与同期氢考组相似; 补气丸 I 组 9 天时则比较正常 (图 3)。六右丸 II 组 5、10、13 天时与同期氢考组比较肝细胞结构最接近正常。各期右归丸组动物的肝组织均较同期氢考组的病损为轻 (图 4)。

2. 肝细胞核糖核酸 (RNA) 的变化: 正常对照组肝细胞中含有丰富的红色 RNA 颗粒 (图 5)。氢考组 3、5、6、9 天时肝细胞的 RNA 含量下降 (图 6); 氢考 II 组 10、13 天时 RNA 含量与正常对照组相接近。补气丸组 3、5、6、9 天时 RNA 含量均较同期氢考组的含量多。右归丸组 3、5、6 天和六右丸 II 组 5 天时, 其 RNA 含量均与同期氢考组相接近 (图 7), 而右归丸 I 组 9 天时则较同期氢考 I 组含量高 (图 8)。各复方治疗组在第 10、13 天时, 其 RNA 含量均与正常对照组相近。

3. 肝细胞 5-核苷酸酶 (5-Nase) 的变化: 正常对照组肝细胞 5-Nase 反应比较弱, 肝小叶中央约 2/3 反应弱, 小叶周围反应强, 肝细胞中充满黑色的反应颗粒、细胞膜, 核及核仁反应强, 小叶间血管壁反应较强。实验第 3 天氢考组酶反应较正常对照组低, 而各复方治疗组酶反应则显著上升, 甚至可以超过正常对照组; 第 5 天六右丸 II 组低于氢考 II 组, 补气丸 II 组、右归丸 II 组高于氢考 II 组; 第 9 天, 各复方治疗组均高于氢考 I 组; 第 10、13 天各复方治疗组除六右丸 II 组外, 均高于氢考 II 组。

4. 肝细胞谷氨酸脱氢酶 (GDH) 的变化: 正常对照组肝细胞中充满黑色细颗粒, 细胞核阴性; 小叶中央约 1/2 反应弱, 小叶周围约 1/2 反应较强, 但分区现象不明显, 小叶间结缔组织只有极少量的细颗粒。实验第 5、10 天, 氢考 II 组酶反应显著降低, 而此时各复方治疗组均较同期氢考组强。

5. 肝细胞琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的变化: 正常对照组肝细胞内 SDH 呈中等反应, 肝细胞中散布着紫蓝色反应颗粒, 核阴性反应, 内皮细胞及枯否细胞也有反应颗粒。小叶分区明显, 小叶中央约 2/3 反应弱, 小叶周围约 1/3 反应强。氢考组 3、5、6、9 天

时酶反应稍高于氢考组; 5、9 天时显著高于氢考组; 6 天时低于氢考 I 组。右归丸 I 组 3 天时酶反应与氢考组相似; 5、6、9 天时高于氢考组; 10 天时低于氢考组。六右丸 II 组 5、10 天时均高于氢考 II 组。

6. 肝细胞三磷酸腺苷酶 (ATPase) 的变化: 正常对照组肝细胞小管壁为阳性反应, 呈棕黑色细网格状, 血管边缘反应强阳性, 少数血窦亦呈阳性反应。正常对照组、氢考组及各复方治疗组间无显著差别。

7. 肝细胞单胺氧化酶 (MAO) 的变化: 正常对照组酶反应较强, 肝细胞中充满黑色反应颗粒, 小叶中央反应稍弱, 小叶周围反应稍强。氢考组 3、5、6、9 天时肝细胞酶反应逐步下降; 氢考 II 组 10、13 天时酶反应有所上升, 但仍低于正常对照组。实验第 3 天各复方治疗组酶反应与氢考 I 组近似; 第 5、6 天均高于氢考组; 第 9 天补气丸 I 组、右归丸 I 组酶反应高于氢考 I 组; 第 10、13 天各复方治疗组酶反应明显上升, 甚至超过正常对照组。

8. 肝细胞糖原 (PAS) 的变化: 正常对照组肝细胞内含有丰富的鲜红色 PAS 阳性颗粒, 呈不规则团块状分布。氢考组 3、5、9 天时肝细胞糖原含量较正常对照组增高, 同期各复方治疗组较氢考组更增高; 氢考 I 组 6 天时与正常对照组相似。第一批实验各复方治疗组除补气丸 I 组 9 天外, 肝细胞糖原含量均低于氢考 I 组。第二批实验 10、13 天时, 氢考 II 组肝细胞糖原含量下降低于正常对照组; 除补气丸 II 组肝细胞糖原含量高于正常对照组外, 其余各复方治疗组均低于正常对照组, 尤以右归丸 II 组为甚。

9. 肝细胞葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 的变化: 正常对照组肝细胞充满棕黑色反应颗粒, 核阴性。在肝小叶内 G-6-P 的分布分区明显, 小叶中央约 2/3 反应较弱, 小叶周围 1/3 反应较强; 间质阴性。氢考组 3、5、6、9 天时肝细胞 G-6-P 反应均下降, 同期各复方治疗组反应均上升, 有的甚至超过正常对照组。实验第 10 天氢考 II 组和各复方治疗组酶反应均与正常对照组相近。

10. 肝细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PH) 的变化: 正常对照组 G-6-PH 反应较强, 肝细胞中充满黑色的细颗粒, 核阴性反应。肝小叶 G-6-PH 的反应分区明显, 小叶中央约 2/3 反应弱, 小叶边缘约 1/3 反应强。实验第 5 天, 氢考 II 组 G-6-PH 反应降低, 各复方治疗组均较氢考 II 组反应增强; 第 10 天氢考 II 组肝细胞酶反应回升, 但仍较正常对照组为低, 而此时各复方治疗组酶反应回升, 超过正常对照组。

11. 肝细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 的变化: 肝细胞中充满细小的黑色反应颗粒, 细胞核阴性, 肝小叶分区现象不明显, 中央静脉内皮细胞有细小反应颗粒, 血管内皮细胞也为阳性反应。氢考 I 组 3、9 天及氢考 II 组 5、10、13 天时 LDH 反应降低, 同期各复方治疗组酶反应均较氢考组增强。

12. 肝细胞酸性磷酸酶 (ACP) 的变化: 正常肝细胞 ACP 呈中等反应, 枯否细胞 ACP 呈强阳性反应, 细胞内有密集细小的棕黑色反应颗粒。正常对照组肝组织内枯否细胞数量较多也较大 (图 9)。各期氢考组枯否细胞 ACP 反应均有下降, 枯否细胞数量少而且体积小 (图 10)。除右归丸 II 组 5 天及补气丸 II 组 10 天外, 其余各复方治疗组的各期 ACP 反应均较同期氢考组高, 枯否细胞大而且多 (图 11~12)。

13. 肝细胞碱性磷酸酶 (AKP) 的变化: 正常肝组织 AKP 呈弱反应, 仅肝小叶周围的毛细胆管被染成浅黑色的细线条。氢考 I 组 3 天时肝细胞 AKP 反应无显著变化; 5、9、10 天时 AKP 反应上升, 肝小叶周围的毛细胆管内 AKP 反应明显增加, 染成黑色线条。第一批实验各复方治疗组 3 天时 AKP 反应上升; 9 天时均较同期氢考 I 组高。第二批实验 5 天时各复方治疗组均较同期氢考 II 组低; 10 天时补气丸 II 组、六右丸 II 组均低于同期氢考 II 组, 右归丸 II 组则升高。

14. 肝细胞非特异性酯酶 (N-Ease) 的变化: 正常对照组肝细胞 N-Ease 反应强, 充满红棕色细颗粒, 核阴性, 肝小叶无明显的分区现象, 中央静脉、结缔组织均为阴性反应, 小叶间胆管上皮及内皮细胞反应极微弱。氢考组肝细胞 N-Ease 反应均下降, 氢考 II 组 10 天时酶反应显著加强。各复方治疗组与同期氢考组相比较, 实验第 3 天右归丸 I 组较氢考 I 组反应强, 补气丸 I 组则较氢考 I 组低; 第 5 天补气丸 II 组及六右丸 II 组反应高于氢考 II 组, 右归丸 II 组与氢考 II 组相似; 第 6 天补气丸 I 组、右归丸 I 组低于氢考 I 组; 第 9 天补气丸 I 组低于氢考 I 组, 右归丸 I 组则高于氢考 I 组; 第 10 天右归丸 II 组低于氢考 II 组, 补气丸 II 组、六右丸 II 组则高于氢考 II 组。

15. 肝细胞胆碱酯酶 (ChE) 的变化: 正常对照组肝细胞中充满棕红色的反应颗粒, 核阴性。实验第 5 天氢考 II 组酶活性显著下降; 除右归丸 II 组外, 其他各复方治疗组均较氢考 II 组高; 第 10、13 天氢考 II 组酶活性上升接近正常; 而此时各复方治疗组则均较同期氢考 II 组为低, 以右归丸 II 组为最低。

(二) 脾脏组织结构的变化

正常对照组脾脏内白髓含量丰富, 脾小体明显, 淋巴细胞密集。各期氢考组脾脏白髓变少, 脾小体变小, 淋巴细胞亦少。右归丸 I 组 3、6 天时脾脏白髓淋巴细胞均较氢考 I 组多; 9 天则较氢考 I 组少。补气丸 I 组 9 天时较氢考 I 组多。

三、胸腺的组织结构变化

正常对照组胸腺大, 小叶清楚, 淋巴细胞非常丰富, 实验第 3、6、9 天, 氢考 I 组胸腺显著缩小, 淋巴细胞含量逐渐下降; 补气丸 I 组胸腺淋巴细胞含量较氢考 I 组稍多。右归丸 I 组 3、6 天时胸腺淋巴细胞含量较氢考 I 组稍多; 9 天则较氢考 I 组少, 但此时各复方治疗组与正常对照组比较, 胸腺的体积缩小显著, 淋巴细胞减少也非常显著。

四、肾上腺的变化

1. 肾上腺的组织结构 (HE 染色) 变化: 正常对照组肾上腺皮质厚, 可清楚区分球状带、束状带及网状带, 束状带细胞内含大小不等的脂滴, 网状带脂滴较少且小。氢考组皮质束状带变薄, 各复方治疗组束状带也变薄, 与氢考组无显著区别。髓质无显著变化。

2. 肾上腺 N-Ease 的变化: 正常对照组皮质细胞各带有红棕色反应颗粒, 以球状带较多, 束状带较少, 髓质阴性。实验第 5 天氢考 II 组酶反应降低, 右归丸 II 组与氢考 II 组相似, 补气丸 II 组及六右丸 II 组酶反应均较氢考 II 组稍高。第 10、13 天氢考 II 组酶活性继续下降, 而此时各复方治疗组则均较氢考 II 组高。

讨 论

用大剂量醋酸氢化考的松进行小白鼠造型, 经 3、5、6、9 天后, 肝细胞发生不同程度的空泡及脂肪变性。连续注射 5 天氢化考的松后, 在第 10、13 天各有不同程度的恢复。氢化考的松可使肝细胞内多种成分发生变化。肌注氢化考的松 5、6、9 天, 肝细胞 RNA 含量下降。氢化考的松使肝细胞 GDH、MAO、SDH、ACP、LDH、G-6-PH、G-6-P 及 N-Ease、ChE 酶活性均有所下降, 与文献报道基本一致^(1,7~10,13,14)。氢化考的松使肝细胞 ATPase 反应变化不明显, 使 AKP、5-Nase 反应不规则。本实验氢化考的松使 G-6-P 下降而一些文献报道可使 G-6-P 上升^(11,13,16), 这可能与本实验所用剂量较大有关。氢化考的松使脾脏、胸腺缩小, 淋巴细胞减少, 肾上腺皮质束状带萎缩, 这些结果与文献报道一致^(12,14)。

用中药复方补中益气丸、右归丸、六味地黄丸+右归丸治疗, 对动物肝细胞有一定的保护作用, 对

肝细胞内各成分均有一定的调节作用,可以使RNA含量上升,使下降的GDH、SDH、MAO、LDH、G-6-PH、G-6-P、ACP、N-Ease等成分上升,使肝细胞糖原有所下降,而5-Nase、AKP、ATPase反应不规则、不稳定。上述中药复方对脾脏、淋巴细胞也有一定的保护作用;对胸腺淋巴细胞也有一些作用,但不明显;可以使肾上腺N-Ease有一些增高,但不显著,对肾上腺皮质结构亦无显著作用。

肾上腺皮质激素对糖代谢有重要的调节作用,通过促进糖原异生及降低葡萄糖的分解及利用,使肝细胞内糖原增加^(10,17)。LDH是糖原分解的酶^(4,8),本实验氢化考的松使之下降,中药复方则能使LDH上升,也使下降的G-6-P上升,说明中药复方可能有促进糖代谢的作用。

戊糖途径在细胞代谢中有其重要性。G-6-PH是戊糖合成途径的酶,使戊糖合成核糖及去氧核糖,且为NADPH的主要来源^(4,8)。氢化考的松使G-6-PH下降,中药复方则能使之上升。中药复方并能使下降的RNA含量上升,所以中药复方可能有调整DNA、RNA及蛋白质的合成作用,对机体的代谢有重要意义,与我们过去的工作相符⁽¹⁾。

中药复方能促使受氢化考的松作用而降低的水解酶ACP、氧化酶MAO及脱氢酶SDH、GDH上升,说明复方对肝细胞有保护作用。SDH、GDH、MAO均是与线粒体膜结合的酶^(4,8),氢化考的松使之下降,并能使线粒体肿胀,嵴溶解消失⁽²⁾,复方能使这些成分上升。表明复方对线粒体有恢复和再生作用,从而提高细胞的氧化供能的机能,这可能是复方纠正动物虚证的机转之一。

单胺氧化酶能使有毒胺氧化脱胺,并破坏身体有害的肾上腺素和5-羟色胺等,在调节细胞代谢中起重要作用^(4,8)。氢化考的松可使之下降,而复方则可使之恢复,说明中药复方对促进机体的代谢及解毒起重要作用。

糖皮质激素阻碍巨噬细胞的吞噬作用,可能与溶酶体有关⁽¹⁶⁾。肝组织的枯否细胞ACP反应增强,而ACP是溶酶体内主要的酶,氢化考的松使枯否细胞变小、变少,ACP反应减弱,复方便使枯否细胞增多、变大,ACP反应增强,所以复方可能也有增强巨噬细胞的作用。氢化考的松使脾脏淋巴细胞溶解消失^(17,18),中药对脾脏有一定的保护作用,这与我们过去的工作相符⁽¹⁾,说明中药复方对提高机体免疫有一定的作用。

本实验所用的右归丸、补中益气丸均是祖国医学

著名的补益方剂,根据“虚则补之”、“损者益之”的治疗原则,在临床上可用以治疗虚损不足诸证,通过扶助正气,使机体恢复抗病能力,达到去除病邪治愈疾病的目的^(19,20)。本实验证实这二个方剂都有不同程度地保护肝、脾等器官,使受氢化考的松影响而变化的肝细胞中多种成分得到调整,使之接近正常。结合上述中医理论,这些补益方剂可能对机体的组织细胞和基本结构成分有普遍的增强保护作用,进而促进机体代谢,提高机体免疫能力,达到消除各种虚弱证候、增强身体素质的目的,值得进一步研究探讨。

我们曾用氢化考的松动物模型研究过助阳药对它的作用,证明助阳药对氢化考的松引起肝、脾、舌等组织的形态、组化、电镜结构的变化,有一定的调节作用^(1~3)。本实验证明右归丸、补中益气丸、六味地黄丸+右归丸对氢化考的松引起的组织结构及组织化学变化也同样有不同程度的调节作用。从药物的反证说明,氢化考的松造成的小白鼠虚损模型,有虚损偏阳虚及偏气虚的症状。气属于阳,气虚与阳虚的性质基本相同,只是存在程度上的不同,在症候上表现有很多共同之处⁽²¹⁾,所以补中益气丸与右归丸在一定程度上对氢化考的松模型的作用有相似之处。

参 考 文 献

- (1) 上海中医学院正常人体学教研组: 新医药学杂志 (9): 33, 1977。
- (2) 上海中医学院组胚教研组等: 上海中医药杂志 (2): 6, 1980。
- (3) 施玉华等: 上海中医药杂志 (5): 45, 1980。
- (4) Chayen J, et al: Practical Histochemistry. John Wiley Sons Ltd, 1973。
- (5) Bancroft JD: Histochemical Techniques. Butterworths, 2nd ed, 1975。
- (6) 中国医学科学院分院: 组织化学。内部资料, 1977。
- (7) Antopol W: Proc Soc Exp Biol and Med 73:262, 1950。
- (8) Lowe CU, et al: Ana: Rec 115:247, 1953。
- (9) Lowe CU, et al: Proc Soc Exp Biol and Med 78: 818, 1951。
- (10) Chiquoine AD: J Histochem Cytochem 1:429, 1953。
- (11) Weber GA, et al: Endocrinology 58:40, 1956。
- (12) Turner CD, et al: General endocrinology: WB Saunders company, 6th ed, p 341, 1976。
- (13) 黄长恩: 解剖学报 6:209, 1963。
- (14) 黄长恩: 解剖学报 7:374, 1964。
- (15) 邝安堃等: 临床内分泌学。上海科学技术出版社, 第353~361页, 1979。
- (16) 中山医学院: 药理学。第276~288页, 人民卫生出版社, 1979。
- (17) 黄长恩: 解剖学报 9(1):17, 1966。
- (18) Molomut N, et al: Proc Soc Exp Biol and Med 73:416, 1950。
- (19) 上海中医学院: 方剂学。第223页, 上海人民卫生出版社, 1974。
- (20) 上海中医学院: 中草药学。第510页, 上海人民出版社, 1974。
- (21) 上海中医学院: 中医学基础。第163页, 上海人民卫生出版社, 1974。

中药复方对小白鼠氢化考的松模型肝组织的 组织学与组织化学研究

(正文见第 62 ~ 65 页)

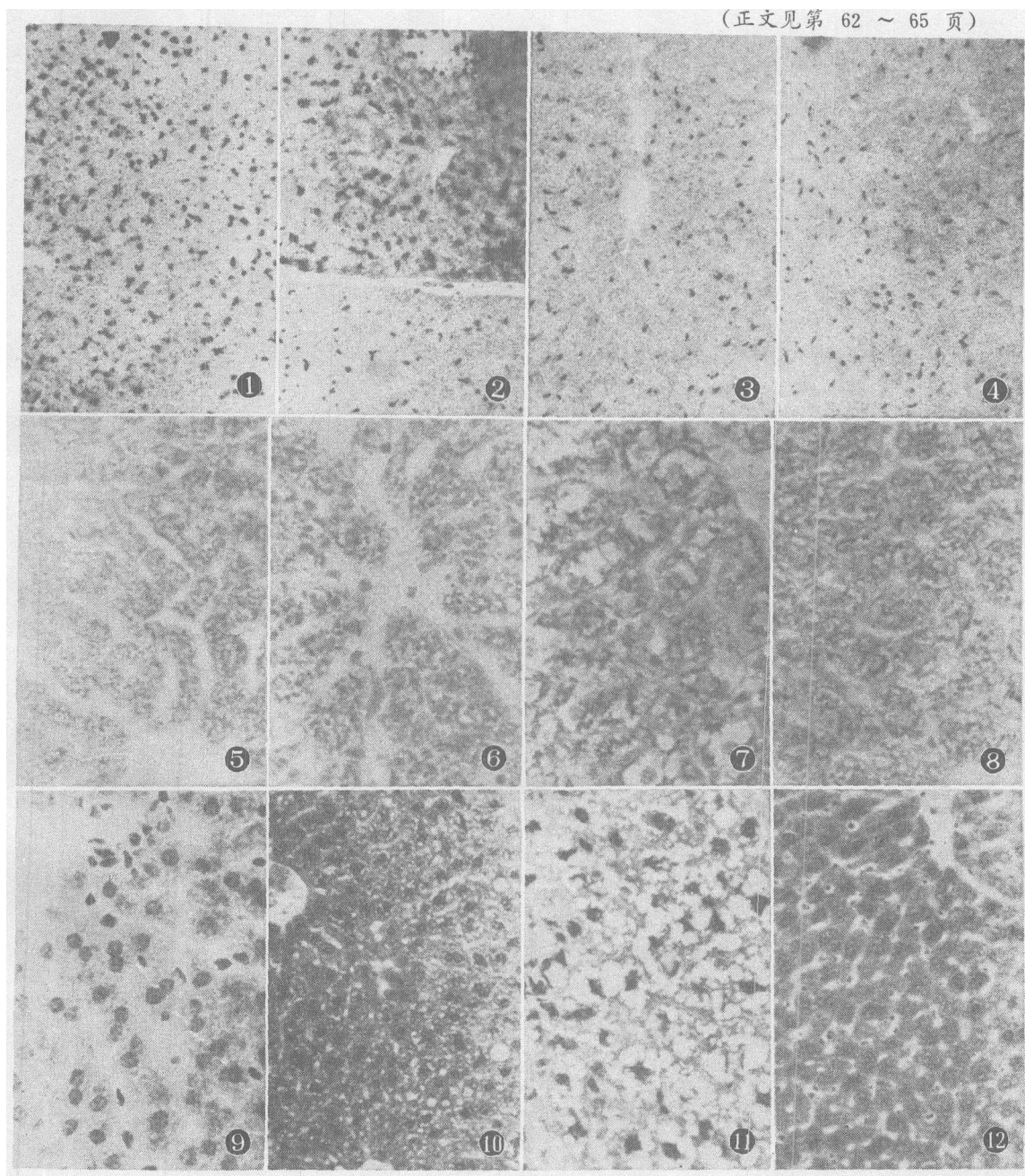


图 1 正常对照组第 9 天肝组织的正常结构。200× 图 2 氢考Ⅱ组第 10 天肝细胞结构较正常对照组仍有差别。400× 图 3 补气丸Ⅰ组第 9 天肝组织结构比较正常。200× 图 4 右归丸Ⅱ组第 10 天肝细胞结构较同期氢考Ⅱ组为正常。400× 图 5 正常对照组第 9 天肝细胞内含丰富的 RNA 颗粒。400× 图 6 氢考Ⅰ组第 9 天肝细胞 RNA 含量下降。400× 图 7 右归丸Ⅱ组第 5 天肝细胞 RNA 含量与同期氢考Ⅱ组相近。400× 图 8 右归丸Ⅰ组第 9 天肝细胞 RNA 含量较同期氢考组高。400× 图 9 正常对照组肝细胞 ACP 呈中等反应, 枯否细胞较多也较大。100× 图 10 氢考Ⅰ组第 9 天肝细胞 ACP 反应有所下降, 枯否细胞数量少而且体积小。100× 图 11 补气丸Ⅰ组第 9 天 (照片下半部) 枯否细胞大而且多, 接近正常对照组 (照片上半部)。100× 图 12 右归丸Ⅰ组第 9 天枯否细胞大而且多, 接近正常。100×