

证的研究

香砂六君子汤对脾胃气虚患者外周血淋巴细胞
超微结构影响的定量分析

河南中医学院中心实验研究室 任宏义 李建国 王建合 郝万青 安春吉

脾胃气虚是虚证范畴的病证之一。虚证在免疫功能方面的研究已有不少报道,而与免疫反应有密切关系的淋巴细胞,在免疫功能紊乱时以及补虚中药治疗后,其超微结构变化定量计测的材料尚未见诸报道。这些问题对虚证本质的探讨是有一定意义的。香砂六君子汤是治疗虚寒胃痛或脾虚泄泻的有效成方。我们应用电镜图象立体学定量分析方法,对香砂六君子汤治疗脾胃气虚患者前、后的外周血淋巴细胞的改变情况进行观察,现将观察结果报告如下。

观察方法

一、病例选择

鉴于本方法分析指标多,统计处理繁重,故选择诊断明确、坚持治疗、有完整病案记载的3例脾胃气虚住院病人作为研究对象。其中男性2例,女性1例,年龄分别为22岁、40岁及54岁;临床上有胃脘疼痛、食少纳呆、食后腹胀、大便溏薄、周身乏力、舌淡苔薄白腻、脉濡细或沉细等表现;病程分别为1.5年、7年及10年。用香砂六君子汤随证加减分别治疗57天、64天及108天后均获治愈。另选我院18~19岁、身体健康的工作人员3人作为正常对照组(以下简称对照组)以资比较。

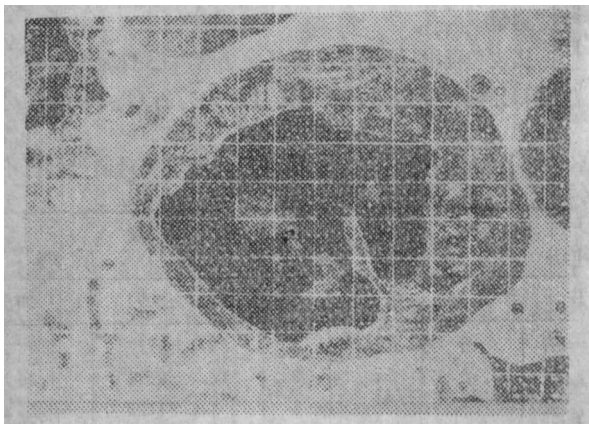
二、取样及电镜标本的制作

被检测人员均于上午9时取左上肢肘静脉血5毫升,立即加入0.75毫升抗凝剂,微摇匀,置水平离心机内,以每分钟2500转转速,离心25分钟,血液即分为三层,弃去上清液,露出白膜,缓缓加入2%戊二醛3毫升,在4℃温度下固定25分钟。取出白膜,再置于2%戊二醛内,以相同温度固定2小时。然后切取盘状标本正中间一长条,宽1毫米,断成约1立方毫米的小块,置于1%锇酸固定液中,在4℃温度下固定1.5小时,取出冲洗,丙酮脱水,Epont 812环氧树脂包埋、聚合。LKB超薄切片机切片,醋酸铀—枸橼酸铅染色,H-500电镜观察。

三、形态立体学定量方法

治疗前、后的脾胃气虚病人及健康人每例都任取5个组织包埋块,制成超薄切片。电镜下每个组织块只选择看一张切片,以免重复拍照。对选定的切片,随机拍摄完整的淋巴细胞照片4~5张。脾胃气虚患者治疗前、后各拍摄照片75张,对照组健康人摄60张,共210张。放大倍数为6500倍,并用光栅复型校正。

本研究采用测试点测量法^{〔1〕}。用照相底片制成测试格,长7厘米,宽5厘米,有10条长线及14条短线,作为测试线。线的交点共140个,作为测试点。一个测试点与一个正方格的面积相对应。将测试格与电镜底片重迭在一起放大4倍(附图)。得总放大倍数为26000倍的照片,作为原始测量的依据。对每张照片淋巴细胞的直径(最大、最小及平均直径),胞



附图 印有测试格的淋巴细胞电镜照片

核的常染色质、异染色质及高尔基复合体(GO)的体密度进行了测量。对淋巴细胞线粒体作了体密度、面密度、数密度、平均体积和比表面等五个参数的测量。由于淋巴细胞内粗面内质网(RER)数量少,且多围绕在细胞核的周围,落在测试点上的机会很少,因此,

仅作了面密度的测量。对溶酶体、核糖体等也进行了观察。按立体学定量方法计算体密度、面密度、数密度、平均体积和比表面等参数^(1~3)。

观察结果

脾胃气虚患者治疗前、后及健康人的外周血淋巴细胞多呈圆形或卵圆形,细胞表面均可见有数量不等、长短不一的微绒毛。脾胃气虚患者治疗前细胞表面的微绒毛较治疗后及健康人均多而长。胞核多呈圆形,且有深浅不等的凹陷。一般说来,核内常染色质少,异染色质多,并呈中度或高度的凝集状态。但脾胃气虚患者治疗前的常染色质比治疗后及健康人均多。胞浆内均可见有数量不多的圆形、卵圆形的线粒体。粗面内质网较少,长短不一,常环绕在细胞核周围的胞浆中,脾胃气虚患者治疗前似较治疗后及健康人为多。核糖体较丰富。高尔基复合体发育差,不常见到。胞浆中常可见到数量不等、大小不一的空泡。在个别细胞的胞浆中,尚可见到多泡体和初级溶酶体。未见中心体,这可能与放大倍率不高有关。

一、淋巴细胞直径的测量

测出淋巴细胞截面的最大直径(2a)与最小直径(2b),再以公式 $2\sqrt{ab}$ 求出平均直径。从表1看来,治疗前脾胃气虚患者的淋巴细胞截面平均直径明显高于健康人($P<0.05$);治疗后明显降低($P<0.05$),与健康人比较无显著差异($P>0.50$)。

二、淋巴细胞核常染色质、异染色质、核仁的体密度测量

从表2看出,治疗前脾胃气虚患者淋巴细胞核常染色质和异染色质的体密度均比健康人为高($P<0.01$);

表1 治疗组和对照组的淋巴细胞直径(微米)比较

组别	例数	最大直径	最小直径	平均直径
对 照 组	3	12.4±0.17	9.2±0.14	10.6±0.11
治 疗 组	3	13.4±0.17*	9.4±0.16	11.20±0.12*
治 疗 后	3	12.6±0.18	8.8±0.14	10.53±0.15
疗前-疗后	3	0.8±0.12 [△]	0.6±0.15	0.67±0.07 [△]

注:(1)表中数字为对照组和治疗组疗前、疗后均为平均值±标准误;治疗组疗前-疗后为均差值±标准误。(2)与对照组比较:* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。(3)治疗前后自身比较:△ $P<0.05$, △△ $P<0.01$ 。以下各表同。

表2 治疗组和对照组的淋巴细胞核常染色质、异染色质和核仁的体密度(%)比较

组别	例数	常染色质	异染色质	核仁
对 照 组	3	22.1±1.22	77.3±1.28	0.6±0.22
治 疗 组	3	33.0±1.03**	65.5±1.09**	1.5±0.32
治 疗 后	3	21.4±0.96	78.0±1.03	0.6±0.23
疗前-疗后	3	11.6±1.79 [△]	-12.5±2.30 [△]	0.9±0.09 ^{△△}

治疗后均显著降低($P<0.05$),与健康人相比均无差异($P>0.5$)。再从核仁的体密度来看,治疗后较治疗前明显降低($P<0.01$),与健康人比较无明显差异。

三、淋巴细胞线粒体的体密度、面密度、数密度、平均体积和比表面的测量

从表3可见治疗前脾胃气虚患者淋巴细胞线粒体的体密度和平均体积比健康人高;而外膜面密度、数

表3 治疗组和对照组淋巴细胞线粒体五个参数的测量比较

组别	例数	体密度(%)	面密度(微米 ² /微米 ³)	数密度(-微米 ³)	平均体积(微米 ³)	比表面(微米 ² /微米 ³)
对 照 组	3	12.6±0.71	1.16±0.06	0.74±0.02	0.17±0.01	9.2±0.41
治 疗 组	3	15.3±0.77	1.06±0.05	0.35±0.03***	0.44±0.03**	6.9±0.32*
治 疗 后	3	14.2±0.71	1.30±0.06	0.71±0.07	0.20±0.02	9.2±0.38
疗前-疗后	3	1.1±1.25	-0.24±0.16	-0.36±0.09	0.24±0.02 ^{△△}	-2.3±0.35 [△]

密度与比表面则比健康人低。两组比较,除面密度、体密度间的差异不显著外,其余参数皆有高度显著性或显著性。表明患者淋巴细胞浆中线粒体所占的体积比健康人之所以为大,是由于线粒体的增大所引起,而不是数量增多所造成。治疗后脾胃气虚患者线粒体的体密度、平均体积减少,而面密度、数密度和比表面增高。治

疗前后相比较,除体密度、面密度和数密度无差异外,其余二个参数皆呈高度显著性或显著性。治疗后与健康人相比,其差异皆不显著,表明治疗后线粒体的体积缩小,数量增加,恢复了正常状态。

四、淋巴细胞粗面内质网的面密度及高尔基复合体的体密度测量

表 4 治疗组和对照组淋巴细胞 RER 面密度
及 GO 体密度的测量比较

组 别	例数	RER 面密度 (微米 ² /微米 ³)	GO 体密度 (%)
对 照 组	3	0.17±0.02	0.5±0.2
治 疗 前	3	0.25±0.03	1.3±0.3
治 疗 后	3	0.17±0.02	0.7±0.3
组 疗前-疗后	3	0.08±0.04	0.6±0.22

从表 4 看出, 治疗前患者淋巴细胞粗面内质网(RER)的面密度及高尔基复合体(GO)的体密度, 比健康人为高, 但其差异无显著性($P>0.05$)。治疗后有较大的幅度降低, 但与治疗前相比其差异无显著性($P>0.1$), 与健康人比较亦无差异($P>0.5$)。这可能因病例数过少, 其差异未出现显著性之故。

五、T、B 淋巴细胞数量测定

根据扫描电镜的观察, B 淋巴细胞表面微绒毛较多而 T 淋巴细胞表面微绒毛少而光滑的特点⁽⁴⁾, 故将压在测试点上具有三个以上微绒毛者定为 B 细胞, 两个以下者定为 T 细胞。测定结果: 脾胃气虚患者治疗前 T 细胞和 B 细胞分别为 23 个和 52 个, 其比例为 1:2.26; 治疗后 T 细胞和 B 细胞分别为 47 个和 28 个, 其比例为 1:0.60。健康人的 T 细胞和 B 细胞分别为 40 个和 20 个, 其比例为 1:0.50。测定结果表明, 脾胃气虚患者治疗前与健康人相比, 前者 T、B 细胞比例失常($P<0.001$); 治疗后 T 细胞与 B 细胞的比例与健康人相近($P>0.70$)。

讨 论

从测量结果看, 脾胃气虚证患者外周血淋巴细胞的超微结构与健康人相比, 细胞明显增大, 胞核常染色质的比例增高, 核仁变大, 线粒体体积增大, 粗面内质网的数目增多、增长等。这些改变表明细胞的功能是处于活跃状态。经补虚中药香砂六君子汤治疗后, 细胞的这些改变恢复到健康人的水平。提示该方剂在调整淋巴细胞的异常功能上是有形态学基础的。

根据淋巴细胞在免疫功能上的不同, 通常把它分为能行使细胞免疫的 T 细胞, 及能产生抗体与体液免疫有关的 B 细胞两大类。脾胃气虚证患者 T 细胞减少, B 细胞增多, 其 T、B 细胞的数量比例, 与健康人及国内正常人的资料(外周血 T 细胞为 60~70%, B 细胞为 30~40%)比较, 呈现比例失常现象。这种现象是如何形成的? 我们知道, 当一个静止的淋巴细胞, 受到抗原物质刺激后, 即被激活而发生急剧变化, 出现

细胞的返幼现象⁽⁵⁾。返幼时细胞体积变大, 胞核常染色质比例增多, 核仁变大, 线粒体增多、增大, 高尔基复合体明显等, 若是 B 细胞则粗面内质网增多。由此看来, 患者 T、B 细胞数量的比例失常, B 细胞增多, 可能是 B 细胞的返幼现象所造成。提示脾胃气虚患者的细胞免疫功能是降低的, 而体液免疫功能是增高的。经香砂六君子汤的治疗, 这种 T、B 细胞的比例失常现象得到纠正, 表明香砂六君子汤还具有把紊乱的免疫功能, 调整到正常状态的功效。

关于按照淋巴细胞表面微绒毛的多少划分 T、B 细胞是否可靠的问题, 我们做了另一次实验。即用酸性 α -醋酸萘酯酶标记 T 细胞的方法, 在光学显微镜下进行了同步测定⁽⁶⁾, 结果示治疗前 3 例 T 细胞平均为 37%, B 细胞平均为 63%; 治疗后 T 细胞平均为 61%, B 细胞平均为 39%。与本组测定相符。故认为根据淋巴细胞表面微绒毛的多少, 来区分 T、B 细胞, 还是有一定价值的。

本文承蒙中国中医研究院基础理论研究所胡素坤研究员审阅并提出宝贵意见, 北京医科大学电镜室郑富盛副教授在立体学方法上给予热情指导, 并致谢意。

参 考 文 献

- (1) 郑富盛: 细胞电镜图象的立体学定量分析方法。内部资料。1984。
- (2) 牛建昭等: 中西医结合杂志 4(10): 622, 1984。
- (3) 郑富盛等: 中华物理医学杂志 6(3): 170~174, 1984。
- (4) 上海第一医学院主编: “组织胚胎学”。第一版, 114 页, 人民卫生出版社, 1978。
- (5) 白荣德: “免疫学”。173 页, 山东科技出版社, 1983。
- (6) 刘尽忠: 关于脾胃气虚证患者 T 淋巴细胞改变的观察。待发表资料。

新 书 预 告

千金美容方(中国养生丛书)方春阳编著。

本书从浩瀚的古代美容方剂中, 精选了针对“长葆青春”“面黑”“面皱”“雀斑”“毛发变白”“牙齿黄黑”等有代表性和实用价值的美容方 160 首, 并进行了通俗解说。预计 1987 年初出版。

养生导引法(中国养生丛书)明·撰人 不详, 胡伯虎、赵晓梅编。

本书是运用气功、按摩、导引方法养生治病的专著, 精选了防病治病、强身养老的导引方 119 种。适合于医学工作者和广大气功、导引爱好者参考。预计 1987 年上半年出版, 欲购以上两书者请到当地新华书店预订或与北京中医古籍出版社联系邮购。

http://www.cnki.net