

证的研究

用过劳和饮食失节法塑造大白鼠 脾气虚证模型的研究

——生化免疫病理和超微结构观察

中国中医研究院基础理论研究所

谢仰洲¹ 陈琦涛¹ 谢宗岑¹ 杨云¹ 李佩丽¹ 林燕² 徐淑玲²
潘小苏² 关崇芬² 曾晓莲³ 王安民³ 李小禾³ 朱观煦⁴ 庞大本⁴
傅湘琦⁵ 侯燕鸣⁵ 郭琳⁶

我们以劳倦伤脾、劳则气耗以及饮食失节脾胃乃伤等中医基础理论为指导，以劳倦伤脾为主，佐以饮食失节、甘肥过度塑造大白鼠脾气虚证，并对此造模动物进行了生物化学、免疫学、病理形态学和电镜等各项指标的观察。现将观察结果报道如下。

材料与方法

一、动物及分组

采用Wistar雄性大白鼠60只，体重120~150克，分为两大组，造模组40只，正常对照组20只。

二、造模方法

第一阶段：为造模阶段约3周左右。造模大鼠隔天在跑步机上跑步30分钟，造成过劳损伤，再佐以饮食失节、甘肥过度。于单日精炼猪油灌胃，一日2次，共6毫升；双日喂大白菜，不限量，自由进水。正常对照组喂普通块料，不限量，自由进水。第20天时活杀部分造模组及正常对照组动物，取样进行各项指标测定。

第二阶段：即造模组动物自然恢复及治疗阶段，约4周左右。自然恢复组从第4周开始改喂普通块料，以观察其自然恢复情况；四君子汤组除喂块料外，另加喂四君子汤，每日一次3毫升（相当于生药1克/1毫升）灌胃，以观察其治疗情况。正常对照组处理同第一阶段。各组动物均于第50天全部活杀，取样进行各项指标测定。

在第一、二阶段隔天进行体重、体温测定，并观察其毛色、精神状态、活动情况等。

实验结果

一、一般表现

造模大鼠逐渐出现体重下降，体温降低，毛变疏松、粗糙，毛色枯焦无光泽，足蹠及鼻尖出现苍白，动物表现乏力，倦怠，闭目，喜扎堆，但无便秘；待至第21天前个别动物发生死亡，判定为造模阶段结束。

二、体重

大鼠于造模后第3天体重开始下降，于第3周末体重下降最为明显，由原平均体重143.6克下降到100.7克，平均下降30.0%；而正常对照组体重则呈直线上升，由原平均体重140.5克上升到244.9克，平均增长74.3%。第二阶段末体重，四君子汤组8只鼠为 247.8 ± 6.18 克（平均值±标准误，下同），自然恢复组8只鼠为 269.4 ± 12.23 克，均有逐渐增长的趋势，但尚未达到正常对照组9只鼠的水平（ 318.3 ± 13.6 克）。二组与正常对照组比较均有显著差异，但四君子汤组与自然恢复组之间则无显著差异。

三、体温

正常对照组动物体温较恒定，维持在 36°C 左右，而造模组体温第一阶段平均下降 1.5°C ；而在第二阶段，自然恢复组和四君子汤组动物的体温则逐渐恢复到原有的水平。

1生化室；2免疫室；3病理室；4医学工程室；5电镜室；6北京中医学院电镜室

四、耐力(游泳)测验

在造模后的第18天进行第一次耐力测验,水温为18~22℃,分别记录游泳时间。疲劳的判断标准是以全身下沉、没顶为“不能继续坚持游泳”。其结果为正常对照组9只鼠平均游泳时间为46.25±5.10分钟,而造模组9只鼠平均游泳时间为8.89±1.20分钟,两组耐力差别非常显著($P<0.001$)。在第二阶段(第50天时),与上述相同条件下,再次测验其耐力,其结果为正常对照组平均游泳时间为103分钟,四君子汤组平均为114分钟,自然恢复组为98分钟;三组间无明显差异,表明三组动物体力基本在同一水平上。

五、生物化学观察

1. 能量代谢:基本上按 Lessler氏方法⁽¹⁾,稍加改进;并按照 Clark 氏氧电极法,利用国产测氧仪与

日立记录仪联用,测定大鼠肝细胞线粒体的磷/氧比值(ADP/O)、呼吸控制率(RCR)和氧耗量(毫微克原子氧/分钟/毫克蛋白);线粒体蛋白质含量用双缩脲法测定。

从表1结果分析,第一阶段(第18天),正常对照组与造模组之间的ADP/O比值,差别显著,表明造模组大鼠肝细胞线粒体的能量代谢受到一定程度的影响,能量代谢有降低趋势,同时体温下降,体重减轻,耐力下降,并出现乏力、精神不振、喜扎堆、倦缩等动作,这与供能不足有密切关系。在第二阶段(第50天),自然恢复组的ADP/O比值和呼吸控制率均较正常对照组、四君子汤组为低,虽无显著差别,但表明其能量代谢尚未恢复到正常应有的水平。

2. 肝糖元含量测定:采用蒽酮比色方法测定⁽²⁾。结果第一阶段正常对照组9只鼠为198.7±23.0微克/

表1 大鼠肝细胞线粒体氧化磷酸化测定

测定项目	第一 阶 段		第 二 阶 段		
	正常对照组	造 模 组	正常对照组	四君子汤组	自然恢复组
磷/氧比值	1.51±0.05(9)	1.24±0.10*(8)	1.31±0.10(6)	1.33±0.03(5)	1.22±0.06(5)
呼吸控制率	1.73±0.11(9)	1.97±0.16(8)	1.75±0.02(6)	1.66±0.16(5)	1.53±0.05(5)
耗氧量(状态III)	34.1±3.20(9)	53.80±9.70(8)	43.40±3.78(6)	45.50±4.66(5)	46.30±6.85(5)
耗氧量(状态IV)	23.2±2.80(9)	37.60±10.30(8)	26.50±1.23(6)	29.00±5.52(5)	25.80±2.18(5)

注:表内数字为均值±标准误(动物数);* 与正常对照组比较 $P<0.05$

毫克肝湿重,造模组8只鼠为189.6±28.1,两组间无显著差别($P>0.05$)。表明此时模型动物对糖的吸收合成能力尚未降低。第二阶段正常对照组9只鼠为223.5±16.5,四君子汤组7只鼠为223.0±34.9,自然恢复组7只鼠为170.5±26.7;自然恢复组的肝糖元含量低于正常对照组和四君子汤组,虽无显著差别,但这一趋势也说明自然恢复组动物肝脏对糖元的合成能力尚未完全恢复。

3. 血浆皮质酮含量测定:采用上海内分泌研究所的³H-标记放射免疫皮质酮药箱进行测定,并使用L-9800型Beckman液体闪烁测定仪测定cpm。第一阶段,正常对照组6只鼠血浆皮质酮含量为10.15±2.74微克%,造模组8只鼠为3.64±1.35微克%,两组比较差别显著($P<0.05$)。第二阶段,正常对照组8只鼠为8.84±1.71微克%,而自然恢复组7只鼠为4.37±1.47微克%,两组比较差别不显著($P>0.05$);四君子汤组7只鼠为11.41±2.65微克%,与正常组比较,差别不显著($P>0.05$);而自然恢复组与四君子汤组比较,差别显著($P<0.05$)。以上情况说明四

君子汤发挥了补脾作用,因而使血浆皮质酮含量迅速增长,而且超过正常水平,而自然恢复组没有采取任何措施,让其自然恢复,故其水平偏低。

4. 其他:此外,还进行了血清淀粉酶活力和血清蛋白成分含量的测定。除血清淀粉酶活力在第一阶段中正常对照组和造模组比较,造模组明显高于正常对照组($P<0.01$)外,其他无明显差别。而血清蛋白成分(%)测定,各阶段均无明显差别(资料略)。

六、免疫学的改变

各组动物在第一、二阶段的免疫功能改变情况见表2。第一阶段,造模组的红细胞总数及血红蛋白含量均明显低于对照组($P<0.01$),这表明造模组大鼠呈现明显的贫血状态,这与造模组动物的体征所见完全一致;造模组大鼠的E-玫瑰花结形成率明显低于对照组($P<0.01$);而淋巴细胞酯酶染色率(%),两组结果近似,未见有差异。第二阶段,四君子汤组及自然恢复组大鼠的红细胞总数、血红蛋白含量、E-玫瑰花结形成率均有不同程度的升高,与正常对照组比较,无明显差异。

表 2 各组动物免疫功能改变情况

测定项目	第一阶段		第二阶段		
	正常对照组	造模组	正常对照组	自然恢复组	四君子汤组
血红蛋白(克%)	11.44±0.41 (9)	9.29±0.38*(9)	12.50±0.40 (9)	12.30±0.80(9)	12.60±0.50 (9)
红细胞(万/毫米 ³)	691.70±68.10(9)	459.50±34.00*(9)	662.20±21.00(8)	639.00±7.70(8)	651.10±14.30(8)
淋巴细胞酯酶染色率(%)	64.10±4.10 (8)	67.40±1.80(8)	63.70±2.60 (8)	60.60±0.40(8)	62.70±2.70 (8)
E-玫瑰花结形成率(%)	39.90±2.80 (8)	26.80±2.30*(8)	42.20±5.10 (8)	42.70±4.70(8)	44.50±4.60 (8)

注：表内数字为均值±标准误(动物数)；* 与正常对照组比较 $P < 0.01$

七、病理形态学的改变

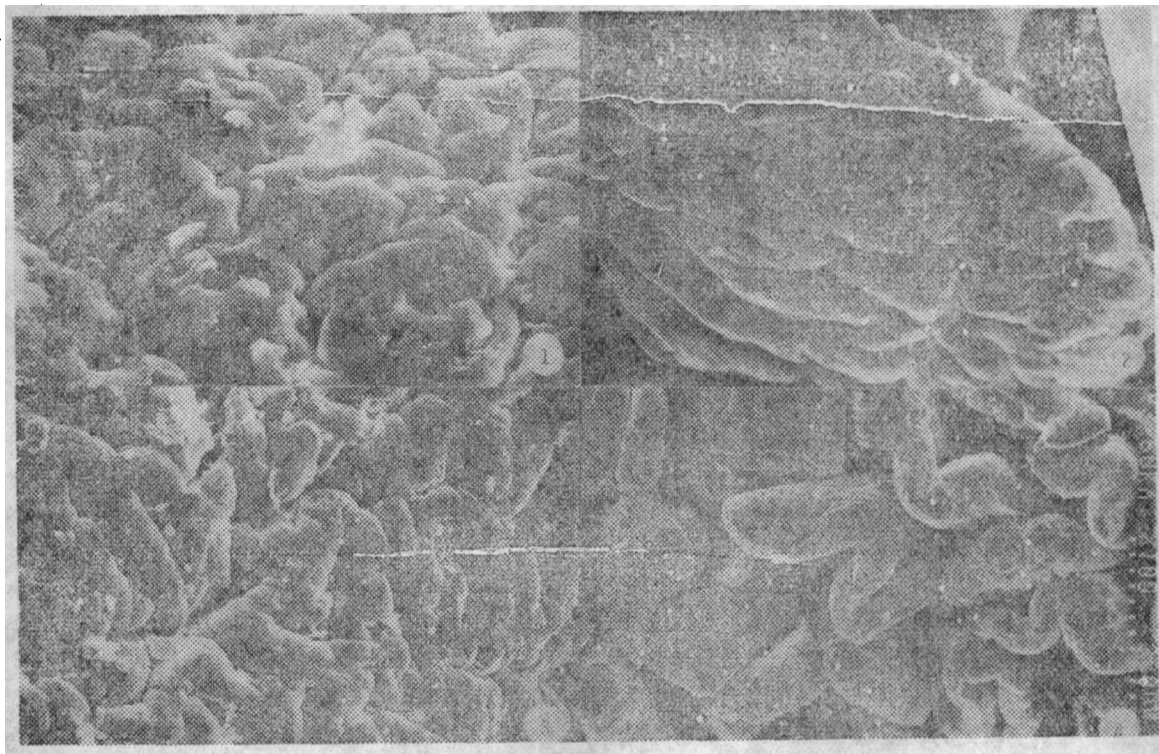
第一阶段，造模组大鼠神经系统尸体解剖，大体和镜下可见各脏器（如心、肺、肝、脾、肾、肾上腺及胸腺）萎缩及实质脏器实质细胞有轻重程度不等的混浊肿胀、脂肪变性和水泡变性；实质脏器中又以肝脏重量减轻最为明显，造模组 14 只鼠平均重量为 5.81 ± 0.42 克，正常对照组 22 只鼠为 11.35 ± 0.49 克，差别十分显著 ($P < 0.001$)。镜下可见肝细胞体积缩小，肝板薄，少数肝板排列紊乱。免疫器官中脾脏和胸腺萎缩明显，造模组 13 只鼠的脾平均重量为 0.25 ± 0.07 克，对照组 21 只鼠为 0.86 ± 0.11 克，两组比较差别十分显著 ($P < 0.001$)。造模组 14 只鼠胸腺平均重量为 0.22 ± 0.037 克，对照组 22 只鼠为 0.465 ± 0.027 克，两组比较差异十分显著 ($P < 0.001$)。镜下可见胸腺细胞和脾 T-细胞区淋巴细胞的减少和消失。在第二阶

段中正常对照组、四君子汤组和自然恢复组的尸检大体所见无明显差别，仅自然恢复组肝脏镜下所见，肝细胞明显增生，肝板增厚，肝细胞排列紊乱。

八、超微结构的改变

1. 线粒体超微结构的变化：在透射电镜下，饥饿与过劳损伤造成的肝细胞线粒体的变化为线粒体嵴大部分或全部消失。服用四君子汤后可见其嵴数目增多，排列整齐；如不服任何药物，待其自然恢复，可看到动物过劳损伤和饮食失节的因素消除后，线粒体嵴也能逐渐恢复，只是速度较慢，说明机体本身也存在着一定的修复能力。这种自身修复能力加上扶正固本中药的促进作用之后，能促使机体较快地趋向于正常状态，这些观察与生化所得结果是一致的。

2. 胃肠道系统超微结构的改变：在扫描电镜下造模组动物的胃粘膜上皮由略隆起的上皮细胞形成凸出



皱襞,皱襞互连接成小区状结构,在小区周围凹陷较深。上皮细胞表面电镜下放大1000倍时,可找到溃烂灶(照片1)。在肠粘膜上皮表面呈凸出的小块状皱襞,小块大小不等,肠粘膜上皮的游离缘,看到有破溃的小区(照片2)。对照组的胃粘膜细胞排列构成皱襞状,细胞界限不太清晰,由上皮细胞连成的小区状结构较实验组为大。肠粘膜上皮看不到糜烂破溃的病灶,肠绒毛整齐,上皮细胞界限清晰。四君子汤组大鼠胃粘膜上皮细胞恢复接近对照组的胃粘膜,但小区呈明显分界,小区形状虽与造模组略有不同,上皮隆起的表面稍增大一些,但是上皮细胞表面有些破溃恢复的痕迹(照片3)。肠粘膜上皮绒毛整齐,上皮细胞所造成的小区界限清晰,上皮细胞表面无溃烂现象(照片4)。自然恢复组大鼠的胃粘膜上皮,连成光滑的大区,粘膜上皮接近于扩张伸展状,可以看到上皮细胞破溃恢复的痕迹。肠粘膜上皮绒毛较整齐,上皮细胞连成的粘膜小区界限清晰,可见到肠绒毛游离缘破溃部修复的痕迹。

讨 论

近几年来国内学者塑造脾气虚证多采用苦寒攻下药物,如大黄、玄明粉等泻下药物而使动物致虚。1983年黄氏^[3]等用油脂灌胃及饲喂甘蓝菜造成小白鼠脾虚证。而本实验以过劳和饮食失节、甘肥过度为共同致病因子而使大白鼠形成脾气虚证。这种造模方法的特点,首先是以“劳则气耗”、“形体劳倦则脾病,脾病则怠惰、嗜卧、四肢不收……”以及“若饮食失节、寒温不适,则脾胃乃伤”等中医基本理论作为造模的指导思想,采用多项致病因素制造动物模型;其次是造模时间约3周左右,较一般泻下法造模时间为长。本法所塑造的大白鼠脾气虚证动物模型除未见便溏外,其他见证基本上符合临床上脾气虚证的判断标准。此外,本实验若适当地加重过劳程度和增大四君子汤的用量,有可能使本模型更臻完善。

在造模组出现体温下降、体重减轻、乏力、精神不振、困倦缩以及喜扎堆等见证的同时,肝细胞线粒体的氧化磷酸化的效率受到明显的影响,ADP/O比值明显下降,这表明其氧化能力未受到影响,而其磷酸化的作用却受到损害。第二阶段给予四君子汤后,线粒体氧化磷酸化的能力恢复到正常水平,自然恢复组也能逐渐恢复,但速度较缓慢。从本实验肝细胞线粒体超微结构情况分析,正常对照组动物肝线粒体嵴保持完整,而造模组动物肝线粒体嵴大部分或全部消失。当给予四君子汤后线粒体嵴的结构迅速得到

恢复,嵴的数目增多,排列整齐,而自然恢复组的嵴当消除致病因子后,也能逐渐恢复,只是速度较慢,这说明机体也有一定的修复能力。这些结果与生化观察所得结果是一致的。

从病理形态改变看,造模组的免疫器官中除脾脏和胸腺萎缩较明显外,两者平均重量也较正常对照组为轻,而且差别明显,同时镜下也见到造模组动物的胸腺细胞和脾T-细胞区淋巴细胞的减少和消失,这与免疫功能指标即E-玫瑰花结形成率(%)的明显下降基本上是一致的。

我们认为用多学科、多层次、多指标的方法来探索证的本质,是中医基础理论研究的一个重要组成部分。通过综合性的研究,从一系列虚证指标中找出能反映脾虚证本质的特异性指标,这对脾虚证的研究,无疑具有重大意义。本文对造模动物进行了形态与功能等多指标观察,获得了一些反映虚证的共性指标,从中寻找特异性指标,以揭示脾虚证的本质,则是今后应努力的方向。

(谢仰洲执笔)

参 考 文 献

- (1) Lessler, M A: Methods of biochemical analysis Vol 17, P 1, 1969.
- (2) 北京大学生物系生化教研室:生化实验指导。第30页, 1983。
- (3) 黄柄山等:中西医结合杂志3(5):295, 1983。

烫火伤验方一则

江西省崇义县中医院 郭运胜

一、药物组成:苦参90克,连翘30克,地榆90克,黄连90克。研成极细粉,装入瓶内备用。用时以香油300毫升,将药粉调入油中调匀。

二、治疗方法:可将上药直接涂于创面,起泡者可用无菌针头穿破。浅Ⅰ度烫火伤未感染者,可很快止痛,一般在7天左右痊愈。轻度感染者,深Ⅱ度烫火伤者均可在9~11天创面结痂脱落,疗效满意。

三、病例介绍:肖××,男,27岁。被开水烫伤整个脸部、双手起泡、脱皮,部分创面感染并有大量脓性分泌物。体温38.8℃。诊为深Ⅱ度烫伤合并感染,面积为14%。经简单清创后,使用本烫伤药,未用抗生素类药物。第二天体温降至37.4℃,创面干燥;第7天创面结痂脱落;第9天痊愈出院。