

形成虚热证的中枢兴奋物质的研究

梁月华* 施天华* 任 红*

摘要 对已形成虚热证的大鼠脑进行提取、分离,经离体和整体实验筛选后证明,在附干(附子、干姜组方的简称)3部分,整体实验中促进 TSH 释放,提高 D β H 活性,离体实验有促进垂体细胞释放 TSH, LH。附干 2 促进 ACTH 释放 17-OHCS,对照组不明显。说明脑内确实含一类兴奋性物质,参与虚热证的形成。

主题词 虚热/代谢

以往对虚热证的临床观察以及动物模型的研究证明,交感神经、内分泌系统机能增强,测定脑内神经递质后,证明中枢处于兴奋提高的状态。本工作对虚热证鼠脑进行分离和提取,并用整体和离体方法筛选,探讨中枢的兴奋性物质,阐明虚热证形成本质。

1 材料与方法

1.1 动物:Wistar 雌性大鼠,体重 180~220g,随机分为对照及虚热组,对照组喂生理盐水,虚热组用附子、干姜方(简称附干,以下同此)制造虚热证模型,药物均为饮片,比例 1:1,制成 100%的水煎剂,每日 4ml(约含生药 4g),灌胃 2 周。用药前后均选动情期后第 2 日大鼠,自眼眶内取血,在第 2 周处死大鼠取脑、肾上腺、血(血清),立即放低温冰箱(-20℃)内保存。

1.2 实验及测定方法:动情周期和 17-羟皮质类固醇(17-OHCS)测定:方法参见文献^[1]。

多巴胺- β -羟化酶(D β H)的测定:主要参考 Toshiharu Nagatsu 的方法^[2]。

TSH, LH 测定:用酶免疫荧光法测定, TSH 和 LH 均与过氧化物酶结合作为标记物,根据抗原抗体竞争法,再用第 2 抗体固项珠分离,用酶免疫荧光仪在 320/405nm 波长下测定^[3]。抗原为牛-TSH 和羊-LH 免疫兔制成抗体,因抗原抗体批号不同,故测量值与以前发表的有差别。

中枢粗提取物:已形成虚热证的鼠脑,用 2N 乙酸在冰水中研磨提取后经低温高速离心(4℃, 4.8 万 rpm 30 分钟),上清液分别用 5%、50%硫酸铵沉淀,分为附干 2(5%)、附干 3(50%)、附干 4(上清液)几个部

分,冷冻干燥后进行整体和离体研究。对照组脑也同时提取,步骤与上述相同。

整体实验:雄性大鼠自眼眶内取血 2ml, 1 周后将 2mg 上述提取物溶解于生理盐水 2ml, 经腹腔注入,注射后经 6、24、48 小时取血,血清在 -20℃ 保存待测。

离体实验(垂体细胞培养实验):雄性鼠断头后,将新鲜垂体用胰蛋白酶消化后,用 Hank's 液洗去胰蛋白酶,用 199 培养液分散和稀释为 10×10^4 的浓度。取 3ml 放入培养瓶,内放 200 μ l 含有 200 μ g 提取物的生理盐水,置恒温培养箱内孵育 4 小时,离心后分别测定垂体细胞内及培养液的 TSH, LH 含量。取垂体的上清液 2ml 放入分散的肾上腺细胞内再孵育 4 小时,离心后分别测细胞内及培养液内 17-OHCS 含量,以细胞及培养液总量为 100, 计算培养液内释放的百分数,以反映垂体 ACTH 的释放机能。至于 TSH, LH 计算方法同上。

2 实验结果

2.1 虚热证动物模型:

D β H 活性:基础值为 $34.02 \pm 4.83 \mu\text{mol/L/h}$, 虚热组为 $48.30 \pm 8.78 \mu\text{mol/L/h}$ 。显示酶的活性增强,表明交感神经机能提高。

动情周期的变化:对照组在实验过程中变化不大;虚热组的动情周期基础值为 4.4 ± 0.17 日;给药后第 1、2 周分别为 4.2 ± 0.12 日和 4.1 ± 0.01 日($P < 0.05$),动情周期明显缩短。

肾上腺皮质素含量:对照组为 $0.768 \pm 0.02 \text{mg/2 个肾上腺}$, 模型组为 $0.879 \pm 0.03 \text{mg/2 个肾上腺}$ ($P < 0.05$)。根据以往的研究证明,尿内 17-OHCS 含量增多,此时肾上腺内含量多是合成增多的表现。

TSH, LH 含量:血清 TSH, 对照组 10 只大鼠为 $398.6 \pm 98.3 \mu\text{IU/ml}$, 模型组 13 只大鼠为 $423.3 \pm 112.0 \mu\text{IU/ml}$ 。血清 LH 含量;对照组 17 只大鼠为 $56.84 \pm 3.93 \text{ng/ml}$, 虚热组 17 只大鼠为 $73.84 \pm 5.19 \text{ng/ml}$ 。这些变化是提高代谢和缩短动情周期的重要因素。

以上结果证明,虚热证时交感神经系统和肾上腺、甲状腺系统机能提高,生殖机能紊乱,这些符合虚热证的临床表现。在此基础上进行中枢兴奋物质的提取和研究。

* 北京医科大学中西医结合研究室,北京市海淀区学院路(100083)

收稿日期:1997-12-12;修回日期:1998-03-04

表1 不同提取物对大鼠血清 TSH 含量、DβH 活性的影响($\bar{X} \pm S$)

指标与分组		鼠数	给药前	给药后		
				6h	24h	48h
TSH ($\mu\text{IU/ml}$)	生理盐水	5	421.5 $\pm$ 88.5	386.8 $\pm$ 82.2	264.7 $\pm$ 83.8	273.0 $\pm$ 103.0
	对照 4	5	398.6 $\pm$ 98.3	309.0 $\pm$ 49.4	459.4 $\pm$ 77.6	342.6 $\pm$ 102.0
	附干 3	7	361.5 $\pm$ 93.0	350.1 $\pm$ 97.1	457.4 $\pm$ 106.4	755.3 $\pm$ 114.5*
	附干 4	5	421.3 $\pm$ 133.0	760.0 $\pm$ 96.7	279.0 $\pm$ 67.1	494.3 $\pm$ 179.0
D β H ($\mu\text{mol/ml/h}$)	生理盐水	6	51.12 $\pm$ 32.6	47.60 $\pm$ 19.3	47.13 $\pm$ 26.6	52.80 $\pm$ 3.81
	对照 3	5	55.32 $\pm$ 27.0	62.78 $\pm$ 17.1	41.33 $\pm$ 3.11	50.80 $\pm$ 7.40
	对照 4	5	39.20 $\pm$ 13.3	42.87 $\pm$ 22.8	37.30 $\pm$ 23.3	42.58 $\pm$ 16.9
	附干 3	6	61.05 $\pm$ 13.9	103.5 $\pm$ 19.0*	28.10 $\pm$ 10.8	54.10 $\pm$ 10.8
	附干 4	5	36.10 $\pm$ 8.09	54.00 $\pm$ 26.5	25.30 $\pm$ 6.56	92.30 $\pm$ 707**

与给药前比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 表2 中枢提取物对垂体细胞 TSH、LH、ACTH 释放 17-OHCS(%)的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	TSH	LH	17-OHCS
生理盐水	29.1 $\pm$ 0.3(6)	49.06 $\pm$ 2.45(6)	59.00 $\pm$ 2.45(5)
垂体	31.7 $\pm$ 0.4(5)	49.03 $\pm$ 9.94(5)	63.30 $\pm$ 6.94(5)
对照 2			51.65 $\pm$ 7.95(5)
对照 3		50.30 $\pm$ 3.45(4)	50.45 $\pm$ 14.80(4)
对照 4		49.80 $\pm$ 4.21(5)	
附干 2	34.4 $\pm$ 3.0(4)		72.44 $\pm$ 4.93(5)*
附干 3	38.6 $\pm$ 2.9(5) Δ	67.35 $\pm$ 7.31(5)*	65.96 $\pm$ 22.81(6)
附干 4		60.10 $\pm$ 2.25(5)*	

 Δ 与生理盐水组 $P < 0.05$; *与对照组比较 $P < 0.05$

2.2 脑提取物的研究:

整体研究:大鼠注射生理盐水后 TSH 含量并不升高,对照鼠脑提取物对 TSH 的影响也不大。虚热证鼠脑沉淀的第 3 部分(附干 3)在注射后第 24、48 小时均使 TSH 升高,后者有统计学意义($P < 0.05$)。DβH 活性,附干 3 在注入第 6 小时提高,附干 4 在第 48 小时也明显提高酶活性,均有统计学意义,说明提取物有提高交感神经系统机能和 TSH 含量的作用,见表 1。

离体研究:提取物直接与垂体细胞培养后,观测对腺垂体激素释放的影响。附干 3 与生理盐水组比较, TSH 明显提高。附干 3、4 明显促进 LH 的释放,在 17-OHCS 的测定中附干 2 比对照组明显提高,见表 2。

以上结果表明,附干 3 在整体实验中促使 TSH 增多,提高 DβH 活性。离体实验中附干 3 有促进 TSH、LH 的释放作用,附干 2 有促进 ACTH 释放 17-OHCS 作用。附干 4 也促进 LH 的释放。

3 讨论

虚热证的病因有多种,但都有共同的症状。临床研究证明,虚热证心率加快,甲状腺机能增强,代谢旺盛,肾上腺机能增强,月经周期提前,促性腺激素提高,即交感神经内分泌系统机能增强。在动物模型的研究中也获得同样的结果。虚热证形成的机理是个重要的问题,以往研究证明,脑内 NE、DA 含量增多,5HT 含量减少,中枢是处于兴奋提高的状态。本工作用虚热证大鼠脑进行提取,再用离体和整体实验筛选,结果证明附干 3 部分确实有一类兴奋性的物质,它在整体实验中能促进 TSH 的释放,提高 DβH 活性;在细胞培养中,又有直接促进垂体细胞释放 TSH、LH 作用,附干 2 有促进 ACTH 释放 17-OHCS 作用。这些结果与虚热证大鼠的表现一致。而对照组脑内提取物的相应部分并无明显的上述作用,说明虚热证鼠脑内确实含有一类物质,它通过不同途径促进 TSH、LH、ACTH 的分泌并兴奋交感神经系统。我们认为这类物质参与虚热证的形成,并随着证转化而变这类提取物是一个单体,还是几个物质的协同作用,有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 梁月华,杨鸿志,任红.参芪和附姜方对神经内分泌的影响.中西医结合杂志,1993,基础理论研究特集,272.
- 2 Nagatsu T, Udenfriend S. Photometric assay dopamine- β -hydroxylase activity in human blood. Clin Chem, 1972, 18(9):980.
- 3 陈瑞冠,张桂生,孙敏.促甲状腺激素酶免疫荧光法的建立及其临床应用.中国免疫学杂志,1986,2(3):162.

注:本工作系国家自然科学基金资助项目(批准号 39370862)