

实验研究

外湿致病机理的实验研究

张六通* 梅家俊* 黄志红* 邱幸凡* 周安方* 成肇智*

摘要 将 Wistar 大白鼠随机分为 6 组:外湿组、寒湿组、湿热组、寒冷组、温热组及正常对照组,模拟自然发病,从整体功能变化、局部组织改变及生物致病因子等三方面进行研究。结果表明,外湿组大鼠免疫功能性及 Th/i 下降、巨噬细胞吞噬功能降低、粪便 SIgA 反应性增高;大便细菌总数、大肠杆菌数增加、双歧杆菌数减少;骨骼肌线粒体 ADP/O 及 RCR 降低;胃泌素分泌减少、胃动素和醛固酮分泌增加;肺、肾、胃、大小肠、肝、关节均有不同程度的病理改变。

主题词 湿邪/中医病机

六淫之湿邪是引起人体疾病的常见因素和发病条件之一,长期以来缺乏应用现代科学方法对其致病机理进行深入探讨的报道。本文在中医学外湿理论指导下,对外湿致病机理进行实验研究,让实验动物在模拟潮湿环境下自然发病,从整体功能变化、局部组织改变及生物致病因子等三方面进行研究,报告如下。

1 材料和方法

造模箱:自制。聚乙烯塑料结构,85cm×50cm×50cm,箱盖用有机玻璃制作,侧壁及箱底分别设通气孔及出水孔,加湿器:YC-D201 型,北京亚都建筑设备制品研究所与北京亚都人工环境科技公司生产。体重 160~180g 健康雄性 Wistar 大鼠 156 只,购自同济医科大学实验动物中心。156 只大鼠分 2 次预实验和 1 次正式实验。正式实验时将 96 只大鼠随机分为以下 6 组:外湿组(16 只):调节造模箱内相对湿度(RH)>90%,温度(T)18~25℃,鼠笼底铺垫 2cm 厚湿锯末(每日更换),连续刺激 12 小时/日。寒湿组(16 只):RH>90%,T=6±2℃,12 小时/日。湿热组(16 只):RH>90%,T=35±2℃,12 小时/日。寒冷组(16 只):RH=54±4%,T=2±2℃,上、下午各刺激 2 小时。温热组(16 只):RH=54±4%,T=38~40℃,上、下午各刺激 1 小时。正常对照组(16 只):RH=54±4%,T=18~25℃。各组均自由饮食,每日观察精神、活动、关节、二

便等,定时记录饮水量、体重、体温等。共观察 108 天。

2 结果

2.1 症状与体征:纳呆少饮。表 1 示,造模次日,外湿组、湿热组进食及饮水量即减少,以外湿组为甚。外湿组进食量与其它 5 组相比,差异有显著性($P<0.01$),湿热组进食量与寒冷组、温热组、正常组 3 组相比,差异亦有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);外湿组饮水量与其它 5 组相比,差异有显著性($P<0.01$),湿热组饮水量与后 4 组相比,差异亦有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。体重增长速度减慢、消瘦。消瘦为外湿组最突出的表现之一。外湿组定基增长速度(增长后体重/最初体重×100%-1)在 108 天中一直处最低水平,6 组体重增长速度依次为:正常组 103.59%>寒冷组 101.20%>寒湿组 93.34%>温热组 88.76%>湿热组 69.41%>外湿组 46.94%。除上述症状外,外湿组还出现趾(指)关节肿大、足背皮肤水肿、破溃、烦躁不安、撕咬打斗,大便不成形或稀便,精神萎靡,嗜卧懒动,呼吸粗重,毛发疏松粗糙、晦暗无光泽等症。

表 1 6 组进食、饮水量比较($\bar{X} \pm SD$)

组别	只数	进食量(g/只/日)	饮水量(ml/只/日)
外湿组	16	21.13±2.11	15.63±2.93
湿热组	16	26.33±5.10 [△]	24.07±9.05 [△]
寒湿组	16	27.25±4.87 [△]	30.10±2.30* [△]
寒冷组	16	35.2±2.10** [△]	38.20±4.10** [△]
温热组	16	30.10±4.20* [△]	45.24±3.21** [△]
正常组	16	36.13±8.43* [△]	37.63±6.71** [△]

与湿热组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与外湿组相比, $\Delta P<0.01$

2.2 免疫学指标的测定

2.2.1 粪便 SIgA 的放射免疫分析:SIgA 放免分析药盒:购自中国原子能科学研究院同位素所。FJ2008Y—自动免疫计数器:核工业部西安国营二六二厂生产。于造模第 18 天及第 50 天时准确称取 1g 新鲜粪便置试管中,与 1ml 生理盐水震荡混匀后静置片刻,离心 10 分钟,取 0.1ml 上清,按药盒说明进行测定。18 天时,外湿组、寒冷组、正常组 SIgA 指标分别为 1.64±0.96、0.41±0.06、0.47±0.05 $\mu\text{g/g}$,外湿组与后两组比较差异有显著性($P<0.01$)。50 天时,该指标由高到低的顺

* 湖北中医学院,湖北省武汉市武昌区云架桥 110 号(430061)

收稿日期:1998-05-11

表 2 造模 40 天 T 淋巴细胞亚群比较($\bar{X} \pm SD$)

组 别	只 数	PanT(%)	Th/i(%)	Ts/c(%)	Th/s(%)
外湿组	7	59.20±1.64	38.20±1.07*	20.20±1.64	1.91±0.15
寒湿组	8	56.71±3.82	41.29±4.96	25.57±8.96	1.72±0.27
正常组	8	62.88±8.49	43.63±4.10	25.75±7.78	1.78±0.12

* 与正常组比较, $P < 0.01$

序依次为:寒湿组(0.41 ± 0.14)、外湿组(0.34 ± 0.10)、湿热组(0.32 ± 0.08)、温湿组(0.27 ± 0.18)、寒冷组(0.26 ± 0.08)、正常组(0.20 ± 0.04),其中外湿组、湿热组与正常组比较差异有显著性($P < 0.01$),寒湿组与温湿组、寒冷组、正常组相比,差异亦有显著性($P < 0.05$)。

2.2.2 T 淋巴细胞亚群的测定和脾细胞 IL-2 的诱生及活性测定:小鼠抗大鼠 T 淋巴细胞单克隆抗体(MaR PanT、MaR Th/i、MaR Ts/c);由军事医学科学院基础所提供。IL-2 标准品:由中国预防医学科学院病毒所提供。IL-2 依赖性细胞株(CTLL-2);湖北医科大学微生物室引进。四甲基偶氮唑盐(MTT)、ConA 及酸化异丙醇、RPMI1640 培养液等;均为 Sigma 公司产品。间接免疫荧光法测定 T 淋巴细胞亚群^[1];具体步骤略。根据《白细胞介素 II 的基础与临床》MTT 比色法^[2]检测 IL-2 生物学活性。表 2 示,外湿组 Th/i 值与正常组相比差异有显著性($P < 0.01$),其余未见显著性差异。表 3 示,6 组造模 108 天时,IL-2 活性 OD 值前 5 组与正常组比较,有明显降低,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),寒冷、寒湿两组与外湿组相比,亦有降低,且差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 6 组造模 108 天时 IL-2 活性比较($\bar{X} \pm SD$)

组 别	只 数	OD 值
寒冷组	10	$0.51 \pm 0.07 \Delta^* *$
寒湿组	8	$0.56 \pm 0.06 \Delta^* *$
湿热组	10	$0.57 \pm 0.02^* *$
湿湿组	8	$0.58 \pm 0.04^* *$
外湿组	10	$0.62 \pm 0.04^*$
正常组	9	0.66 ± 0.03

与正常组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$;与外湿组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$

2.3 肠道菌群的检测:按常规方法^[3]检测大便总菌数及大肠杆菌数。结果外湿组造模 7 天时菌落数为 $8.12 \pm 0.03(\log_{10}^n)$,寒冷组为 $7.20 \pm 0.05(\log_{10}^n)$,正常组为 6.53 ± 0.07 ,前两组与正常组相比差异均有显著性(鼠数均为 6 只, $P < 0.01$)。另根据日本光冈知足肠道菌群检查法^[3]及魏曦等正常菌群检查方法^[4]进行双歧杆菌的厌氧培养及检测。结果造模 18 天时,大肠杆菌数

外湿组为 $7.03 \pm 0.45(\log_{10}^n)$,寒冷组为 $5.66 \pm 0.42(\log_{10}^n)$,正常组为 $5.58 \pm 0.38(\log_{10}^n)$,外湿组与正常组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。造模 25 天时,外湿组、寒湿组、湿热组、寒冷组、温湿组、正常组大肠杆菌数($\log_{10}^n$)分别为 7.06 ± 0.67 、 7.03 ± 0.79 、 7.0 ± 0.47 、 5.63 ± 0.52 、 5.52 ± 0.71 、 5.47 ± 0.45 ,前 3 组与寒冷组、温湿组、正常组相比差异均有显著性(均为 10 只, $P < 0.01$)。造模 105 天时,外湿组、寒湿组、湿热组双歧杆菌数与正常组相比,明显下降,差异有显著性($P < 0.01$)。

2.4 骨骼肌线粒体活性的测定:5'-ADP-Na₂;中科院上海生化研究所提供,批号 9015。琥珀酸钠;分析纯,上海试剂一厂,批号 910401。生物组织测氧仪;OBM-I,中国人民解放军三〇四医院与航天医学工程研究所生产。参考吴孟平^[5]及杨福愉等方法进行大鼠后肢骨骼肌线粒体的分离及线粒体活性——氧化磷酸化效率(ADP/O)和呼吸控制率(RCR)的测定(具体方法略)结果造模 40 天时,外湿组 ADP/O 与 RCR 值分别为 1.36 ± 0.20 与 2.23 ± 0.30 ,正常组分别为 2.12 ± 0.12 与 5.28 ± 0.28 ,两组间比较差异均有显著性($P < 0.01$)。

2.5 踝、趾(指)关节及周围组织、肺、肾、胃、大小肠和肝病理形态学和超微结构的观察:造模第 12 天、第 40 天、第 108 天时处死动物取肺、胃、大小肠、肾、肝、关节等,按常规法进行固定、脱水、包埋、切片、染色,在光镜及电镜下观察形态学及超微结构的改变。光镜下可见外湿组表现为大小肠粘膜糜烂,小肠绒毛上皮变性、坏死、脱落、固有膜轻一中度炎细胞浸润(以淋巴细胞为主)。肾小球淤血,甚至球囊腔轻度出血。肺炎血、肺泡壁增厚、炎细胞浸润,甚至轻一中度间质性肺炎。胃粘膜轻度糜烂,有少量炎细胞浸润。踝、趾(指)关节滑膜细胞反应性增生,排列疏松、不规则。滑膜充血、水肿、炎细胞浸润。关节周围软组织充血、水肿、炎细胞浸润、纤维组织增生。电镜下观察到外湿组肺组织胶原纤维明显增多,肺泡上皮细胞颗粒增多,嗜酸性细胞增多。肾小球基底膜增厚、足突融合。小肠粘膜炎性细胞、嗜酸性细胞浸润。肝脏线粒体肿胀、嵴变短减少紊乱,基底稀淡,甚至呈空泡样。关节成纤维细胞、滑膜细胞增生,粗面内质网增多。

3 讨论

三次实验结果均表明外湿模型进食饮水减少,体重增长速度减慢,明显消瘦,与临床表现较一致,因脾为土之脏,主运化,喜燥恶湿,湿从外受,常先因脾,健运失职,故纳呆,水湿之气有余故少饮。外湿濡渍肌肉,气血运行不畅,肌肉失养故消瘦,倦怠少动,外湿痹着关节故关节肿大,活动受限。外湿组大便性状为不成形或稀便,乃因外湿困脾,“湿胜则濡泻”也。上述症状颇类似临床感受外湿的表现,经胜湿方治疗后均有不同程度的改善,反证了模型的可靠性。

外湿组 T 淋巴细胞亚群 Th/i、IL-2 降低,Th/s 比值有增高趋势。提示外湿可降低细胞免疫功能。T 淋巴细胞亚群异常,使免疫系统功能紊乱,增加机体对病原体的易感性。而 IL-2 是近年来认识的最重要的一种淋巴因子,它可作用于表达 IL-2 受体的 T 细胞,一旦 IL-2 与相应受体结合,该 T 细胞即分化增殖为具有各种免疫功能的 T 淋巴细胞亚群,发挥各种免疫效应。同时还能直接刺激 B 细胞的增殖,诱导免疫球蛋白的分泌。因此,IL-2 在免疫应答、免疫监视和自身稳定中均有重要的调节作用。实验表明外湿、寒湿、湿热、寒冷、温热五组 IL-2 活性均降低,说明温湿度异常刺激均可导致 IL-2 活性降低,影响细胞免疫功能。对外湿组而言,其机理可能为病原微生物的大量繁殖、分泌产生酶类成分,抑制淋巴细胞的增殖,使 IL-2 活性降低。此外,Th/i 是分泌 IL-2 的主要细胞群,外湿组 Th/i 降低,Th/s 比值增高,抑制大鼠脾细胞 IL-2 的生成能力,使 IL-2 活性降低。

外湿组粪便细菌总数、大肠杆菌数显著增加,且出现较早(造模 7 天时)。正常条件下,微生物、宿主与外界环境之间处在相对平衡状态,一旦某些微生物过量繁殖,生态中就会出现不平衡状态即菌群失常。当机体抵抗力减弱时,在一般情况下不表现致病作用的菌群如大肠杆菌得到机会而损伤宿主,致使发生腹泻或其他疾病。因此,外湿致病的途径之一可能是潮湿环境影响病原微生物的繁殖和传播。

实验结果表明,外湿组、寒湿组及湿热组双歧杆菌数均减少($P < 0.05$),三组均有大便不成形或稀便,大肠杆菌数增加,其发生可能与双歧杆菌减少有关。由于双歧杆菌的减少,屏障作用减弱,乳酸、乙酸的生成减少,引起需氧或兼性厌氧菌增加,使某些肠道致病菌在肠粘膜上定植、繁殖而致腹泻。外湿组粪便 SIgA 增高,其原因可能是由于肠道细菌大量繁殖,这些大量繁殖的肠道细菌即作为抗原刺激肠粘膜,反应性引起局部分泌 SIgA 增多而对病原体提供防御,发挥局部免疫功能。此

外,SIgA 分泌增加可能还与肠道中较多未消化的食物蛋白等刺激有关。

氧化磷酸化效率(ADP/O)和呼吸控制率(RCR)是线粒体活性的主要指标,可反映线粒体的功能状况。外湿组 ADP/O 和 RCR 均降低,因此 ATP 生成减少,而 ATP 是肌肉活动时能量的直接供给者,ATP 的减少必然会导致活动减少,四肢无力。由于能量来源不足,转换效率也降低,合成也不足,因此机体处于低能消耗状态,肌肉不能获得足够的能源而消瘦。

外湿、寒湿、湿热三组趾(指)关节肿大,活动受限,光镜下关节滑膜细胞轻度增生,软组织充血、水肿、炎细胞浸润,纤维组织轻度增生;电镜下关节成纤维细胞及滑膜细胞增生,粗面内质网增多。提示关节及周围软组织存在慢性炎症改变,对致病性异物产生的一种旨在清除这种损伤因子,恢复损伤组织的复杂反应,说明外湿致痹确有其病理学基础。胃与大小肠主要表现为粘膜的糜烂,小肠绒毛上皮变性、坏死、脱落以及炎细胞浸润的慢性炎症反应,这些病理改变影响到消化吸收功能,因而可为是纳差及稀便的病理基础。线粒体结构及形态的完整性是保证其正常呼吸功能的前提。电镜下见肝线粒体肿胀,嵴短缺甚至消失,有的完全呈空泡化,其结构的改变必然影响其功能的正常与否,因此导致 ATP 的生成减少,机体不能获得足够的能量而倦怠懒动、肌肉消瘦。

通过观察潮湿环境中大鼠免疫、肠道细菌、能量代谢及病理形态学和超微结构的改变,我们认为外湿致病,是长夏湿气太过或冒雨涉水或居处卑湿,影响病原体的繁殖、传播以及代谢物的毒力,并损伤机体的抵抗力和调节适应能力如免疫、内分泌、消化、能量代谢等功能活动而致病,所以说外湿是季节气候环境、生物性致病因子及机体反应性相结合的综合概念,实验结果亦证实了这一观点。

4 参考文献

- 1 张子康主编. 医学微生物学与免疫学实验教程. 成都: 四川科技出版社, 1989: 70.
- 2 曹雪涛. 白细胞介素 2 的基础与临床. 北京: 北京科学技术出版社, 1990: 49.
- 3 光冈知足. 肠内の世界. 东京: 业文出版社, 1980: 28.
- 4 魏曦, 康白. 正常菌群与健康. 上海: 上海科技出版社, 1985: 58.
- 5 吴孟平. 大鼠骨骼肌线粒体分离的改进, 军事医学科学院院刊, 1987, 11(3): 189.

注: 本课题获国家自然科学基金资助(No. 39270818), 并获得 1997 年度国家中医药管理局中医药基础研究三等奖(J97 三 10)