

虚寒证鼠服温热药后脑、垂体和肾上腺内 5-羟色胺及去甲肾上腺素神经元和神经纤维的变化

李 良¹ 刘国贞¹ 梁月华²

摘要 为了研究用温阳及补气两种温热药治疗虚寒证大鼠后,其脑及肾上腺内 5-羟色胺(5-HT)及去甲肾上腺素(NE)神经元以及垂体内神经纤维的递质含量变化,采用免疫组织化学的方法进行神经元及纤维形态学观察及定量分析,用荧光测定法测量脑内两种递质的含量。结果温阳与补气药均使全脑的 5-HT 细胞及纤维着色变浅,NE 细胞及纤维的染色加深。垂体内 NE 纤维递质含量增多,5-HT 递质含量减少。肾上腺髓质内变化不明显。全脑的 NE 含量增加而 5-HT 的含量减少。说明温阳、补气药均能提高脑各区 NE 神经元递质的合成释放,并抑制 5-HT 的合成释放,两类药物作用效果无明显差别,上述的形态学改变与机能变化一致。

主题词 虚寒/中医药疗法 温阳益气 虚寒/代谢

实验证明,虚寒证鼠交感神经系统机能降低,脑、内脏、尿内去甲肾上腺素(NE)含量普遍降低,而 5-羟色胺(5-HT)的含量整体提高^[1,2]。丘脑下部及垂体内均有 NE、5-HT 神经纤维的分布,它们对内分泌及免疫机能均有很重要的调节作用^[3,4]。温阳药是治疗虚寒证的重要药物,而补气药也常有相似的作用,关于这方面的研究已有一些报道^[5,6]。但用温热药治疗前后大鼠脑、垂体及肾上腺髓质内 NE、5-HT 神经系统有哪些形态学变化,则尚未见报道。本工作侧重用免疫组织化学方法来观察丘脑下部、脑干、垂体及肾上腺内 5-HT、NE 神经元及神经纤维的形态学变化,同时测量脑各区递质含量,比较形态与机能的关系。

1 材料与方法

1.1 动物的准备:Wistar 雌性大鼠,体重 200~250g,在正常日光周期,室温 16~20℃ 喂养,饮食不限。对照组:喂生理盐水。虚寒证组以知母、石膏(简称知石)按 3:4 比例配方,喂药 3 周制成模型,模型分为 3 组,模型组不进行治疗,治疗 1 组予附子、干姜(简称附干)按 1:1 比例配方,治疗 2 组予党参、黄芪(简称参芪),按 1:1 比例配方。以上复方制成 100% 水煎剂,每日喂药 4ml(约含 4g 生药),治疗 2 周后与对照组及模型组同时处死取材。上述每组实验动物各 20 只,5 只用于形

态学研究,15 只用于递质测定。

1.2 切片的制备:大鼠用乙醚麻醉,经心脏灌注固定(固定液:10%多聚甲醛,0.1%戊二醛,0.3%苦味酸,0.1M(pH=7.0)磷酸缓冲液配成 250ml)1 小时后,分别取脑、垂体及肾上腺。组织放在后固定液内(上述固定液中去掉戊二醛)3~4 小时后,置换入含 30%蔗糖的磷酸缓冲液,4℃ 过夜。将脑自视交叉向皮层垂直切下去掉前脑,自丘脑下部后缘向皮层垂直切开,去掉部分大脑皮层,此为间脑区(含丘脑、丘脑下部),余下部分去掉脊髓、小脑,则为脑干(包括四叠体、桥脑、延髓)。间脑区及脑干均作冠状切片。垂体和肾上腺均作水平切片。恒冷箱连续切片,片厚 40μm,准备做免疫组化染色。

1.3 免疫组织化学染色:使用美国 ZYMED 公司生产的 SP_{TM}试剂盒。切片经 3% H₂O₂ 孵育,去除内源性过氧化物酶活性,用 5% 正常羊血清封闭,去掉外源性过氧化物酶。第一抗体用 5-HT(1:300)和酪氨酸羟化酶(TH)(1:500)单克隆抗体(抗体均由美国 ZYMED 公司提供,利用 TH 反应 NE 神经元的分布),4℃ 振荡孵育过夜。生物素化第二抗体(1:300),37℃ 孵育 1 小时,辣根酶标记链霉卵白素(1:300),37℃ 孵育 1 小时,最后 DAB 显色。

1.4 定量分析:用 Leitz MPV-COMBI 型纤维分光光度计测定神经元胞体 OD 值。

1.5 脑神经递质测定:大鼠经断头后立即取脑,置-20℃ 冰箱内保存。将脑置于冰盒上,分区方法与上述同,分别称重,按 100mg 用 4ml 酸性正丁醇的比例磨成匀浆提取,离心 5 分钟后转入 0.1M HCl 内,分别经邻苯二甲醛和碘溶液氧化后形成荧光,用荧光分光光度计测定,5-HT 波长为 360/470nm,NE 波长为 395/475nm,方法参考文献^[7]。

2 实验结果

脑内变化包括细胞形态变化和 5-HT、NE 递质变化。

5-HT 细胞形态变化:对照组脑干中的缝际核处可见 5-HT 神经元的分布。细胞较大,多角形,可见轴突,细胞核处因无免疫反应而呈圆形空白区,胞浆内可见 5-HT 棕色反应颗粒,其它区未见 5-HT 神经

基金项目:国家自然科学基金资助课题(39370862)

1 首都医科大学病理解剖学教研室,北京市右安门外西头条 10 号(100054)

2 北京医科大学中西医结合研究室

收稿日期:1999-11-19;修回日期:2000-03-06

胞。虚寒模型组脑干 5-HT 细胞着色比同区对照组深。用附干和参芪复方治疗后,5-HT 染色均比同区模型组浅。用纤维分光光度计定量测定并经统计学分析(t 检验),模型组与对照组之间,两治疗组与模型组之间差异有显著性(P 均 <0.01),两治疗组之间无明显差异($P>0.05$)。见表 1(图略)。

表 1 脑神经元染色定量分析(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	TH	5-HT
对照组	5	0.801 $\pm$ 0.036	0.732 $\pm$ 0.073
虚寒模型组	5	0.550 $\pm$ 0.117*	0.987 $\pm$ 0.032*
治疗 1 组	5	0.768 $\pm$ 0.072 Δ	0.704 $\pm$ 0.076 Δ
治疗 2 组	5	0.748 $\pm$ 0.065 Δ	0.786 $\pm$ 0.056 Δ

与对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$ 。下同

NE 细胞形态变化:对照组在膈区、丘脑下部的室旁核、弓状核、脑干的桥脑部位的背侧区和腹外侧区可见 NE 神经元的分布,细胞体积较大,多角形,可见轴突,胞浆内有 TH 棕色反应颗粒。虚寒模型组在上述区域内均可见 TH 阳性细胞,但细胞着色较浅。用温热药治疗后,以上各区的神经元染色加深。经染色定量测定及统计学分析(t 检验),模型组与对照组之间及治疗组与模型组之间差异有显著性(P 均 <0.01),两治疗组之间无明显差异($P>0.05$)。结果见表 1(图略)。

5-HT、NE 递质含量变化:经用荧光分光光度计测定脑内各区递质含量,虚寒证时脑内 NE 含量降低,而全脑 5-HT 含量却增多。用温阳和补气药均能提高脑内 NE 含量,而温热药却使 5-HT 的含量减少。见表 2。

表 2 脑神 NE、5-HT 含量($\mu\text{g/g}$ 湿重, $\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	NE	5-HT
对照组	10	1054.0 $\pm$ 95.0	850.3 $\pm$ 60.2
模型组	11	698.7 $\pm$ 81.5*	978.2 $\pm$ 84.8*
附干组	11	1282.9 $\pm$ 33.4 Δ	734.9 $\pm$ 37.6 Δ
参芪组	11	935.5 $\pm$ 62.0 Δ	784.6 $\pm$ 53.9 Δ

表内各组测量是全脑总含量

垂体的改变:5-HT 神经纤维在垂体的中间叶和神经叶内均有分布,模型组神经纤维染色较深,用温热药治疗后染色转浅。NE 神经纤维在中间叶较多,神经叶内也有分布,模型组染色略浅,给温热药后染色转深,腺垂体未见 NE、5-HT 神经纤维。图略。

肾上腺的改变:对照组与模型组在肾上腺髓质内均可见 5-HT 和 TH 阳性细胞,细胞大,圆形,细胞核部位呈空白区,胞浆内充满棕褐色反应颗粒,定量分析结果两组区分不大。用温热药治疗后,染色变化也不甚明显(图略)。

3 讨论

虚寒证表现为较多系统机能状态低下,虚寒证的形成有多种因素,其中单胺类神经元的机能变化对内分泌及免疫功能有很大影响。以往的研究已经证明,虚寒证时整体的交感神经机能低下,但 5-HT 神经系统机能增强。这些均与神经元胞体内递质的合成和释放有关。本工作结果从形态学角度证明了所参与的细胞及纤维以及它们所在的部位。

NE 细胞在对照组的膈区、丘脑下部、室旁核、弓状核及脑干等处均能染出 TH 颗粒,此结果与以往的工作一致^[3,8]。模型组在上述区内均可发现阳性细胞,但染色较浅,定量测定结果表明,模型组 OD 值明显降低,而用温热药治疗后细胞的 OD 值均增多,表明温热药可使胞体内递质合成增多,这与脑内 NE 含量的测定结果是一致的。因此虚寒证时全脑各区的 NE 神经胞体内的递质合成均受抑制,而温热药有提高脑各区 NE 神经元合成和释放的功能。

5-HT 细胞存在于脑干的缝际核处,在对照组完全可以染出,模型组细胞染色较深,递质测量结果含量也比对照组增多,表明递质合成增加。曾报道在动物处死前预先注射 L-色氨酸及优降宁各 200mg/kg,使神经元内 5-HT 合成增多,并抑制其降解,在丘脑下部室旁核处可见 5-HT 神经元^[3]。而本实验模型组中,在室旁核处未见 5-HT 阳性细胞,说明虚寒证虽然可使 5-HT 合成增多,但其增加的量较微弱,尚不足以在切片中显色,这也是形态研究的不足之处。用温热药治疗后,染色均变浅,说明温热药可以减少该递质的合成。

对照组垂体中间叶和神经叶有 5-HT 及 NE 神经纤维分布,此结果与以往报道一致^[3,6]。模型组 NE 纤维着色比对照组略浅,5-HT 纤维染色较深,温热药治疗后,NE 纤维染色比模型组略深,而 5-HT 纤维转浅,此结果与间脑区的递质变化一致。因此可以认为温热药可以影响丘脑下部 5-HT、NE 神经元递质的合成,并通过神经纤维深入垂体,直接调整垂体机能活动。本实验也从形态学角度更进一步说明,温热药通过提高脑内各区 NE 神经系统的机能状态并通过增强对垂体机能的调控作用是温热药对虚寒证神经内分泌调整治疗的重要机理。

肾上腺髓质内可见大量含有 NE、5-HT 的细胞,染色较深,定量分析结果各组间差别不大。但曾有实验测定尿内 NE、E、5-HT 含量证明,虚寒证模型尿内 NE 排出量减少,用温热药治疗以后排出量增多。而 5-HT 在虚寒证模型尿内排出量增多,经治疗后能恢

复,这也说明肾上腺髓质参与证的形成及温热药的治疗作用。

总之,虚寒证时脑内各级 NE 神经元递质的合成与释放减少,而 5-HT 各级神经元递质的合成与释放增多,同时在垂体及肾上腺内也有一致的变化。温阳与补气药有提高各级 NE 神经元递质的合成与释放作用,同时降低各级 5-HT 神经元递质的合成与释放,并通过神经纤维来调整垂体及肾上腺等内分泌机能,起到治疗作用,然而这两类温热药的作用效果差别并不大。

参考文献

- 1 梁月华,李薪萍,任红. 寒证和热证脑、脊髓、内脏 NE、DA、5-HT 含量变化. 中医杂志,1991,28(12):68-70.
- 2 梁月华,王晶. 寒凉药与温热药对交感神经及代谢机能的影响. 北京

医科大学学报,1987,19(1):54-56.

- 3 李良,梁月华,刘国贞. 大鼠脑、垂体和肾上腺内 5-羟色胺及去甲肾上腺素神经元和纤维的分布. 首都医科大学学报,1998,19(4):301-304.
- 4 李良,梁月华. 用温热药治疗寒证大鼠时垂体激素细胞的免疫组织化学变化. 首都医科大学学报,1994,16(1):7-10.
- 5 宋辉,梁月华,任红. 温阳和补气药对虚寒证大鼠神经内分泌的影响. 中国中药杂志,1997,22(3):182-184.
- 6 梁月华,杨鸿志,任红. 参芪和附姜方对神经内分泌的影响. 中西医结合杂志基础理论研究特集,1993,(13):272-274.
- 7 Curzon G, Green AR. Rapid method for the determination of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in small regions of rat brain. Br J Pharmacol,1970,39(3):653-655.
- 8 李良,梁月华,刘国贞. 寒凉和温热药对丘脑下部、垂体和肾上腺内 NE、5-HT 神经元和纤维影响的形态研究. 中国中药杂志,1999,24(6):360-362.

便秘病验案 3 则

邓泽潭*

1 理肺开秘法

杨某,女,52岁,1996年3月26日初诊。患者近10年来,大便一直不畅,数日一行,曾服大黄苏打片、果导等药,只能取效一时,旋即如故。有哮喘病史,夜间咳嗽较甚、胸闷、腹胀、口干,舌红、苔薄,脉细。试用桔梗汤加减以提肺气,养肺阴。处方:桔梗 12g,紫苏 10g,紫菀 10g,党参 12g,太子参 12g,麦冬 12g,枳壳 6g,杏仁 10g。

服上药 3 剂后大便 1 次,仍干结、口干、咳嗽胸闷稍减,继服上方加生地黄 15g。5 剂后诸症消失,大便变软通畅。继投上方 15 剂后,已每日解大便 1 次,随访 1 年未曾复发。

按:此例便秘,乃肺气虚,致气机升降失常,大肠传导迟缓。肺为水之源,脾之运化水液的作用有赖于肺气宣发和肃降功能的协调,肺失宣降,水液不行,则肠道干枯而大便难行。前人有“开上窍以通下窍”,即理肺开秘法。方中桔梗、紫苏、紫菀理肺平喘,又润肠通便,与诸药合用,有提肺气、养肺阴之功,使肺阴复而津还肠润,肺气足而魄门启闭有度。

2 益脾补肾法

王某,男,70岁,1994年11月14日初诊。患者便秘 20 余年,大便 5~8 日一行,便秘甚时需服麻仁丸。近几年来便秘逐渐加重,10 日不能行便 1 次,需蹲厕 1 小时以上。自觉腹部胀满闭塞难忍,曾服苦寒泻下、增液润肠等中药不效。症见神疲乏力,面色无华,语音低微,形体消瘦,腰膝酸痛,纳呆口干,舌淡、苔薄,脉弱。治用补中益气汤加减以益脾补肾。处方:太子参 15g,沙参 12g,生白术 15g,黄芪 20g,升麻 6g,当归 12g,白芍 15g,肉苁蓉 20g,怀牛膝 12g。

服上方 3 剂后,大便仍不能自解,自觉乏力纳食好转,故前方加首乌 15g,白术的用量加至 30g,威灵仙 15g。服上方 3 剂,

大便自排 1 次,较软,精神转佳,口干、腰膝酸痛均有好转。原方白术加至 50g。连服 20 剂,每 1~2 日解软便 1 次,诸症消失,继以前方巩固。随访半年未再复发。

按:此例便秘,由脾气虚,运化不健,生化之源不足,再加上年老肾衰,常用苦寒泻下之品使气虚津伤,肾失温煦滋润,则大便秘结,故益脾补肾法是治疗老年性顽固性便秘的大法。方用补中益气汤加肉苁蓉、何首乌、牛膝,可补脾虚益其中气,补肾虚润其肠道。方中用生白术加至 50g,肉苁蓉 20g,笔者认为,治病必求其源,便秘之源在于脾胃,脾胃之药首推生白术。肾失温煦滋润首推肉苁蓉,可补中有润。本方双补脾肾,不燥不寒,能加强脾肾对大肠宣导运化,推动排便。对老年久病或久服泻药形成脾肾双虚便秘有较好的作用。

3 活血行气法

徐某,男,33岁,1997年6月18日。患者于今年1月间行阑尾切除术,半年来经常下腹胀痛,排气排便不畅。2周前曾在某医院诊断为肠粘连、不完全性梗阻,灌肠后得以缓解。近5日腹部胀满,疼痛难忍,疼有定处、拒按,食后必吐,大便不行,排气极少,舌质紫暗,脉涩。治用血府逐瘀汤加减,以活血逐瘀,行气止痛。处方:当归 12g,生地黄 15g,赤芍 12g,川芎 9g,桃仁 12g,牛膝 15g,枳实 12g,大黄 20g,芒硝 20g(后下)。

服 2 剂后,排少量干燥黑便,腹痛减轻,前方去大黄、芒硝、枳实,加紫草 15g、延胡索 10g、木香 10g。服 3 剂后,排气正常,解大便 2 次,腹部平软能食,腹痛消失,原方加丹参 12g,药后腹痛未发作,大便自调。继前方巩固 10 天,随访 1 年未再复发。

按:此例便秘,由大肠气机不利,血行瘀滞,络脉痹阻,则气滞血瘀,临床则见腹痛拒按、排气不畅、大便不通。故以活血行气而立法。方中当归、生地黄、桃仁润肠通便生津,红花、川芎、丹参、赤芍活血逐瘀,木香、延胡索行气止痛,大黄、枳实、芒硝荡涤肠胃,紫草解毒散结。对手术后肠粘连有一定疗效。

* 安徽省五河县肛肠病医院,五河县淮河路 43 号(233300)

收稿日期:2000-03-03

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

A Clinical Observation on Treating 17 Cases with Osteoporosis by Yi Shen Zhuang Gu He Ji

Gong Ling, Wang Mingyue, Cao Junqing, et al.

51 cases of osteoporosis were put on clinical trial in our OPD and randomly assigned to TCM treatment group (N=17), TCM control group and blank group. The total effective rate in the TCM treatment group obtained was 94.1% and the significantly effective rate achieved 88.2%. After the treatment, the density of the osseous tissue increased by 3.4%, main symptoms improved markedly, the serum calcium increased and the urine pyridine phenol decreased. All the findings were superior than that in the rest two groups. This composite is effective and safe (no side reactions) and worth put into large sale production.

Authors' add: Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053

Key words: osteoporosis/TCM therapy @Yi Shen Zhuang Gu He Ji

(Original article on page 606)

Ultrastructural Study on Apoplema in Termination of Early Pregnancy by Pai Pei Tang and Mifepristone

Wang Qing, Zhao Hong, Wang Shilin, et al.

To elucidate the mechanism of Pai Pei Tang in combination with mifepristone in termination of early pregnancy, samples of apoplema (5 each) were collected from the Pai Pei Tang group, mifepristone group, Pai Pei Tang and mifepristone group (N=68) and routine artificial abortion group (N=22). We found that atrophy of the decidua and chorion was the utmost in the Pai Pei Tang and mifepristone group under the electron microscope. The result suggested that Pai Pei Tang could induce degenerative and atrophic changes in the decidua and affect the chorion directly.

Authors' add: Gynecology department, Sino-Japanese Friendship Hospital, Beijing

Key words: decidua/ultrastructure chorion/ultrastructure @Pai Pei Tang

(Original article on page 612)

A Study on Fu Zheng Hua Yu Fang and its Ingredients on Production of Collagen in the Liver

Liu Chenghai, Wang Xiaoling, Wang Zhennan, et al.

To explore the effect of Fu Zheng Hua Yu Fang and its ingredient (s) on collagen production we cultured the astrocytes isolated from the dimethyl nitrosamine-induced rat fibrosis model in serum with the extract of the complete

prescription and its ingredient (s) and observed their effect in treating the model rats. The ingredients included those for strengthening the body resistance, those for removing stasis, that of Cordyceps, that of Radix Salviae Miltiorrhizae and that of Radix Salviae Miltiorrhizae plus Cordyceps. The results showed that though inhibition of proliferation and activation of the astrocytes was found in all the groups, the effect of the extract of drugs for removing stasis was the strongest. Similarly, inhibition of production of collagen type I and expression of its mRNA was found in all the groups while the effect of drugs for strengthening the body resistance was the strongest. In treating the model rats, the complete prescription was the strongest in reducing the collagen deposition and hydroxyproline content. Combination of drugs for removing stasis with those for strengthening body resistance could further reduce the formation of collagen. The prescription proved to be a comprehensive one in inhibiting collagen production.

Authors' add: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Shanghai 200032

Key words: compatibility of TCM drugs liver/pharmacological action @ Fu Zheng Hua Yu Fang

(Original article on page 620)

A Quantitative Analysis of 5-hydroxytryptamine and Norepinephrine Content in the Brain, Hypophysis and Adrenals in Cold-deficiency Rats Administered with Drugs Warm and Hot in Properties

Li Liang, Liu Guozhen, Liang Yuehua

Content of the neurotransmitters 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and Norepinephrine (NE) in the neurons of the brain and adrenals and in the nerve fibers of the hypophysis after administration of drugs warm and hot in properties in the cold-deficiency rats were studied immunohistochemically and fluorimetrically. The results showed that both drugs for warming yang and replenishing qi could similarly increase the content of norepinephrine and decrease the content of 5-hydroxytryptamine in the neurons in the brain and in the nerve fibers of the hypophysis. Their content in the adrenal medulla did not show significant change.

Authors' add: Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054

Key words: cold deficiency syndrome/TCM treatment warming yang and supplementing qi, cold deficiency/metabolism

(Original article on page 623)