

基础理论研究

肝郁证的动物实验研究

——激怒刺激对大白鼠血液流变学的影响

中国中医研究院中医基础理论研究所

须惠仁 傅湘琦 向丽华
陈燕萍 刘金红 逯波

肝郁证的产生,主要是由情志不遂所致。情绪的变化,反复或强烈的精神刺激,超越了肝的调节限度,就会导致气机失常,而首先是肝的气机运行失常则成气郁,进而可致血行不畅⁽¹⁾而成血瘀。肝郁与血瘀是郁证中二个紧密相关的病理过程。我们曾对典型肝郁证病人进行了血液流变学、血小板显微结构等多项观察,初步证实上述中医理论的临床客观性^(2,3)。

为了深入揭示肝郁气滞致血瘀的实质,有必要复现与临床现象尽可能接近的“肝郁证动物”模型进行分析。这种复现的难点在于致病因素要求单纯的情志异常,而这是人类所特有的高级神经活动的特点,动物难以完全模拟;另一个难点是病证必须突出表现为血瘀证,而不能夹杂有明显的其他证候。关于肝郁证的动物实验研究,国内外就动物模型作了一些探索,但几乎都局限于药物造模,因而难以排除严重的药物中毒性反应⁽⁴⁻⁶⁾。因此我们不采用与临床实际相差甚远的各种中西医的药物造模方法,而用大鼠打斗这种较为自然的激怒刺激来复现“怒伤肝致血瘀”的临床现象来制造肝郁证动物模型。

材料和方法

一、激怒刺激的方法和分组

大鼠属性情暴躁而易于激怒的动物,只要给以低强度刺激就能引发大鼠间剧烈打斗。用电刺激或夹尾刺激引发大鼠打斗的模型是药理学中测定药物镇静作用的常用方法⁽⁴⁾。我们将雄性 Wistar 远交系大鼠,体重 300~400 克,3~7 只置于同笼,用纱布包裹尖端的止血钳夹鼠尾巴,令其与其他大鼠厮打会很快激怒全笼的大鼠。每次刺激 30 分钟,每隔 3 小时刺激一次,每天刺激 4 次。激怒刺激 2 天后进行各项实验指标的观察。造模组 60 只大鼠,对照组(不给予任何刺

激) 56 只大鼠。

为了观察舒肝理气药的治疗作用进行了该药的复健反证实验。设造模组 10 只,给以激怒刺激;给药组 9 只,在激怒刺激的同时灌胃给药。药用柴胡 100 克、白芍 150 克、枳壳 100 克、川芎 100 克、香附 100 克、甘草 60 克,制成水煎剂,把 6 剂药浓缩成 200 毫升,以临床成人剂量的 50 倍给药,每天灌药(10 毫升)一次,给药 2 天后测定各项指标。

二、观测项目和方法

本实验观察 10 项血液流变学指标并作血小板超微结构的电镜观察。

1. 血液粘度:采用 HAAKE RV 100/CV 100 流变仪测定 37℃ 下抗凝血的流动曲线,由曲线中选择 21 秒⁻¹和 210 秒⁻¹为低切变率和高切变率的代表。另外,又在 ELD 型粘度测定仪上,分别以四种切速进行测定,作了重复试验。

2. 血浆粘度:采用上海医疗器械十厂生产的毛细管粘度计测定 37℃ 下的血浆粘度。

3. 血浆比粘度:采用日产 ELD 型粘度测定仪进行。

4. 红细胞比容:采用微量毛细管离心法。用日本 KUBOTA-120A 血细胞比容离心机,于 15000×g 下离心 5 分钟。

5. 红细胞聚集指数:用低切变率与高切变率下血液粘度的比值作为红细胞聚集的指数⁽⁷⁾。

6. 血浆热沉淀蛋白的测定:采用微量毛细管沉淀离心法⁽⁴⁾。

7. 复钙时间(tr):取 0.5 ml 枸橼酸钠抗凝血加 1.25% 氯化钙 100 μl,混匀后用流变仪测定恒定低切变率下的粘度,粘度的上升代表凝血过程开始即复钙时间⁽⁹⁾。

8. 粘度上升率, 方法同复钙时间测定。记录血栓形成过程中粘度的依时变化率($d\eta/dt$), 可反映凝血过程的情况⁽¹⁰⁾。

9. 血小板聚集及定量的形态观察: 采用国产 XSN-R II 型体外血栓形成及血小板粘附两用仪测定血小板聚集率, 并用 Sony 显示电视系统, 定量测定扩大型和圆树型血小板的百分率。

10. 血沉测定: 采用 KVBOTA KH-120 II 型血球压积、血沉测定仪测定血沉。

11. 血小板超微结构的电镜观察: 选用造模大鼠 10 只, 实验采用粘附聚集血小板整体标本制作法。用剪刀剪去大鼠尾梢部, 取其尾部末梢血一滴, 放入 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 在试管内摇匀。立即将抗凝血铺于有 Fomval 膜的铜网上, 37°C 温育 8 分钟后, 用 Tyrode 氏液反复冲洗铜网, 再用 4% 戊二醛磷酸缓冲液固定 5 分钟, 蒸馏水反复冲洗铜网, 待自然干燥后置 H-500 透射电镜观察并摄影。

结 果

一、激怒刺激时动物的行为观察

用包有纱布的血管钳夹一大鼠的尾巴, 立即放开, 可使大鼠暴怒, 并寻衅与其他大鼠打斗而激怒全笼大鼠。其状为所有大鼠竖立对峙, 前肢离地, 互相撕咬, 并发出“呼呼”的怒叫声。随激怒刺激次数的增加, 撕咬加剧, 在头部和尾部时见抓咬伤, 个别大鼠甚至被咬掉下颌。为了避免动物破皮损伤所带来的强烈疼痛刺激和并发的炎症干扰, 我们控制的刺激强度以不破皮流血为度。每次给激怒刺激半小时后, 其暴怒状态仍可持续数小时乃至整夜。采用上述方法连续给激怒刺激 3 天后, 大鼠间剧烈撕咬减弱, 饮水和吃食也明显减少, 甚至不思饮食, 多呈困倦状, 毛发变暗、枯黄, 体重随之下降, 这时似出现了某些脾虚证的症候。

二、激怒刺激时动物血液流变学指标变化的观察

表 1 显示, 激怒动物的血小板聚集率有极其明显的升高, 其扩大型血小板的含量要比对照组多 58%, 而正常的圆树型血小板数量又比对照组显著减少。以五种切变速度测定全血粘度的结果显示, 暴怒大鼠的每一种切变率所显示的全血粘度都明显地高于对照组, 只有在 210 秒^{-1} 的高切变率测试条件下, 全血粘度有升高趋势而无统计学显著性。造模动物的血浆比粘度极其明显地高于对照组, 复钙时间比对照组有明显的延长, 其相应的粘度上升率、红细胞比容则明显的减小, 血沉极显著地快于对照组。

表 1 激怒刺激对大鼠血液流变学指标的影响

检测项目	对照组(56只) M $\pm$ SD	造模组(60只) M $\pm$ SD
血小板聚集率(%)	28.63 $\pm$ 4.52	44.61 $\pm$ 7.31***
血小板扩大型(%)	13.75 $\pm$ 2.17	21.72 $\pm$ 3.23***
血小板圆树型(%)	86.25 $\pm$ 2.17	78.22 $\pm$ 3.12***
血沉(毫米/小时)	2.21 $\pm$ 1.78	11.32 $\pm$ 6.15***
全血粘度 1.92 秒^{-1}	26.15 $\pm$ 3.69	32.37 $\pm$ 5.85***
9.6 秒^{-1}	10.21 $\pm$ 1.37	13.90 $\pm$ 2.57***
21 秒^{-1}	6.22 $\pm$ 1.91	7.14 $\pm$ 2.86*
38.4 秒^{-1}	7.71 $\pm$ 1.66	10.01 $\pm$ 2.15***
192 秒^{-1}	5.23 $\pm$ 1.21	6.65 $\pm$ 0.72***
210 秒^{-1}	4.33 $\pm$ 0.84	4.64 $\pm$ 1.22
红细胞比容(%)	40.8 $\pm$ 3.18	38.5 $\pm$ 4.25**
血浆比粘度	1.65 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.09***
血浆粘度(毫帕秒)	0.95 $\pm$ 0.04	1.05 $\pm$ 0.06***
红细胞聚集指数	7.02 $\pm$ 1.53	7.48 $\pm$ 2.37
复钙时间(分)	0.94 $\pm$ 0.13	1.33 $\pm$ 0.46***
热沉蛋白(%)	3.42 $\pm$ 1.46	6.40 $\pm$ 2.81***
粘度上升率(帕秒/分)	3190 $\pm$ 870	808 $\pm$ 608***

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

三、舒肝理气药复健的反证实验

本实验为动物在激怒刺激的同时给服舒肝理气药, 观察舒肝理气药对激怒刺激大鼠血液流变学指标变化的影响。表 2 显示, 在激怒刺激的 2 天中, 给药组的水小板聚集明显下降, 其扩大型的水小板含量也明显减少, 同时正常的圆树型血小板含量明显增多。但在其他的血液流变学指标方面, 并没有显示出明显的规律性影响。

表 2 舒肝理气药对激怒刺激大鼠血液流变学影响

检测项目	造模组(10只) M $\pm$ SD	给药组(9只) M $\pm$ SD
血小板聚集率(%)	52.23 $\pm$ 3.79	42.00 $\pm$ 1.92**
血小板扩大型(%)	24.44 $\pm$ 2.14	20.22 $\pm$ 2.72*
血小板圆树型(%)	74.56 $\pm$ 2.14	79.11 $\pm$ 3.85*
血沉(毫米/小时)	12.38 $\pm$ 5.60	11.44 $\pm$ 5.10
血球压积(%)	36.89 $\pm$ 2.52	36.22 $\pm$ 1.39
全血粘度 1.92 秒^{-1}	31.69 $\pm$ 5.64	33.50 $\pm$ 8.73
9.6 秒^{-1}	14.41 $\pm$ 2.80	14.78 $\pm$ 3.39
38.4 秒^{-1}	11.26 $\pm$ 2.30	11.59 $\pm$ 2.72
192 秒^{-1}	6.88 $\pm$ 0.46	6.89
血浆比粘度	1.88 $\pm$ 0.08	1.84 $\pm$ 0.11

与造模组比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

四、电镜下血小板超微结构的变化

电镜下所见之血小板超微结构的形态主要有以下几类, 血小板带有树枝状突起和许多微突, 并且以粘

连聚集者为多,这是便于血小板粘附的特异现象;血小板异于正常形态,而呈各种形态的突起,如卷曲状或锥体型的血小板突起。

讨 论

中医重视郁证,认为百病皆生于郁。《内经》首先提出“五郁”,“五郁”中的“木郁”,就人体而言就是肝郁。肝司疏泄,性喜条达。由于情志不遂或精神刺激可以导致肝的气机阻滞形成肝郁,而肝气郁滞又可使血行不畅⁽¹⁾,导致血瘀形成。可见肝郁与血瘀是郁证中二个紧密相关的病理过程。

我们在临床研究中观察到,肝郁证病人的舌细胞、微循环等指标呈现明显的血瘀证的变化⁽²⁾。本实验试图用动物实验,模拟临床肝郁证以探索肝郁气滞导致血瘀证的机理。我们之所以选择大鼠作为造模动物有以下几点考虑:一是大鼠性情暴躁,易激怒,适合制造怒伤肝致血瘀的模型;二是大鼠的凝血过程与人类较为接近且较其他动物具有高凝倾向;三是大鼠便于多学科综合研究。本模型从病因学的角度来看,控制了较为单一的致病因素,即激怒刺激(情绪刺激),这与临床的肝郁证的病因是比较接近的。血液流变学的改变是临床确定血瘀证的主要指标之一⁽¹¹⁾,我们采用的分析指标,能够较完整地反映血液的流变性质,并能够反映出凝血系统的功能,从而能够较客观地确定怒伤肝的肝郁证造模动物是否产生了血瘀证。

实验结果表明,大鼠撕打的激怒刺激能引起血液流变学一系列指标产生极为明显的改变,而这种改变是血瘀证的特性之一。这表现在全血粘度(在不同切变率的条件下测定)多有很明显的增高,即使在最高切变率时的测定值也有增高的趋势;其次是激怒动物的血浆粘度升高也极为显著。在凝血指标方面,存在着极为明显的高凝过程,这反映在激怒刺激2天后,大鼠的热沉蛋白含量明显升高,同时决定凝血主要因素的血小板聚集率也呈现升高,高凝状态时的扩大型血小板数量显著增多。

实验结果还表明,血瘀的发生与发展可能存在着时相性的改变。暴怒刺激2天后的大鼠确实存在着如上所述的血液高粘和高凝状态所特有的指标改变,但是我们所测定的复钙时间(tr)及其相关的粘度上升率表明, tr 延长, $d\eta/dt$ 减少,即血液的凝血时间是延长的,血液可能处于低凝状态中。这个看似矛盾的实验结果和廖福龙等在外伤致血瘀的大鼠模型和内毒素致瘀的大鼠模型二个研究中的结果基本一致^(12,13)。他们的结果是造模后先出现短时间的高凝状态,3小时

后即开始向低凝状态转化,造模后1~2天最为明显,表现为 tr 延长和 $d\eta/dt$ 的减少。低凝的出现可以认为是高凝状态的后果,即凝血因子的消耗或耗竭所致。至于血浆热沉蛋白的增多,并不完全反映纤维蛋白原的含量,其中也包含了纤维蛋白原在高凝状态以后的降解产物的结果。血液的低凝相并不表示已经解聚,局部肿块仍在发展,而血小板聚集也依然在升高。这提示了血瘀并不意味着持续的直线上升的血液高凝状态的过程,它有一个依时相变化的发展过程;而且还要考虑到局部的血瘀状态和整体的血凝状态的发展并不是完全一致的,比如局部组织器官的血瘀状态还在发展,而全身血液可能已进入低凝相状态了。

我们在临床上应用舒肝理气药治疗肝郁证病人取得较好的疗效。在2天激怒刺激期间给以舒肝理气药的结果表明,该药对于血小板有较大的影响,用药后血小板聚集率非常明显地降低,与血瘀证有密切关系的扩大型血小板的数量很明显地减少,而圆球形正常血小板的数量明显地增多了。但对于其他血粘度指标及凝血因素的指标还没有发现明显的规律性作用。

激怒刺激2天后,大鼠血小板超微结构的形态,多数不再是较光滑的流线型状态,也少有正常的分离状态,而是呈现血小板被“激活”以后的“粘性变态”,即原先无粘附的静止状态的血小板,伸出伪足变为栗刺状或树枝状,同时发生粘附聚集。这很可能成为我们所见到的激怒刺激后大鼠血液粘稠度增大的主要原因之一⁽¹⁴⁾。

血小板激活会触发凝血系统,当血小板释放血小板第四因子并暴露第三因子后,凝血系统的蛋白酶就会被激活,在被激活的血小板周围很快会出现血纤维蛋白纤丝。我们在暴怒刺激后的大鼠身上观察到血内纤维蛋白原极其明显地增多,很可能是出于上述原因。

激怒刺激会引起大鼠血液流变学产生血瘀证倾向的改变,这种改变用注射大剂量肾上腺素也能同样产生,可以认为怒伤肝的肝郁证动物血液内的肾上腺素的分泌含量定有异常的增加。而激活血小板的特异性因素主要是肾上腺素、去甲肾上腺素和5-羟色胺。我们在临床上已经观察到,肝郁证患者血内5-羟色胺含量有明显的升高。我们正在进行的激怒动物血内儿茶酚胺含量的测定初步显示,该物质有明显的增高,因此激怒刺激后的大鼠,血小板被激活的“粘性变态”很可能是起因于情志异常,引起血液内单胺类物质和5-羟色胺的升高所致。而这两类物质都是血小板本身含有的物质,在血小板被激活后,可出现正反馈式的

释放, 换言之, 这类物质具有从已经激活的血小板向未激活的血小板传递信息的能力, 而使血管内的全部血小板都被激活, 最后导致明显的血瘀证⁽¹⁴⁾。我们认为这可能是肝失疏泄功能导致血瘀证的重要机理之一。

综上所述, 我们根据临床上中医的某些证候表现及有关的指标研究观察所获得的结果, 采用了相应的手段, 在动物身上予以复现, 对情志异常(激怒)引起肝气郁滞而致血瘀的过程, 进行了血液流变学的系统研究和血小板超微结构的电镜观察, 发现暴怒致瘀的现象在动物身上确是存在的。这种肝郁证的动物模型比之药物造模更接近于临床的病因和病症, 对深入进行肝郁证的实验研究提供了较为理想的分析工具。

本研究得到廖福龙教授和翁维良教授的协助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- (1) 张问渠, 等. 肝郁证的理论及临床研究. 湖北中医杂志 1987; (5):2.
- (2) 张问渠, 等. 高血压病肝郁证的临床研究. 中西医结合

- 杂志 1987; 7(7):396.
- (3) 杜如竹. 中医“证”的动物模型研制的思路和方法初探. 辽宁中医杂志 1985; (3):43.
- (4) 湖南医学院附一院中医基础理论研究室. 肝郁脾虚的理论与实验研究. 湖南医学院学报 1985; (4):349.
- (5) 山西中医研究所. 强肝软坚汤治疗肝硬化的实验研究. 内部资料, 1977.
- (6) 上海第一医学院药理学系, 等. 药理学实验指导. 浙江, 浙江医科大学出版社. 1980:22.
- (7) 廖福龙, 等. 血液流变学在诊断及预防医学中的应用. 第一版. 北京科学出版社, 1981:345.
- (8) Dintenfass L, et al. Re-evaluation of heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation; effect of abnormal proteins and plasma viscosity. J Clin Path 1976; 29:130.
- (9) 廖福龙, 等. 血栓形成的流变学指标研究. 内部资料, 1984.
- (10) 李文, 等. 凝血过程的旋转粘度测定法与血栓弹力图法的比较. 中华血液学杂志 1988; 9(7):427.
- (11) 王阶, 等. 血瘀证诊断标准的研究. 中西医结合杂志 1988; 8(10):585.
- (12) 廖福龙, 等. 外伤致血瘀的大鼠模型. 中西医结合杂志, 1989年基础理论研究特集, 31页.
- (13) 廖福龙, 等. 血瘀证动物模型的研究. 山西医药杂志 1988; 17(2):81.
- (14) 施密特著, 廖福龙译. 图解血液流变学. 第一版. 北京科学出版社, 1989:69.

健脾安神法治疗小儿遗尿症

鞍山市中医院 刘 毅

遗尿为儿科临床所常见, 多为神经系统调节失常所引起(先天性膀胱裂者除外)。西药疗效不甚理想。笔者依据祖国医学整体辨证的指导思想, 应用健脾安神法治疗本病50余例, 效果颇佳。现举两例介绍于下:

例1: 金某, 男, 10岁。1987年7月22日初诊。患儿自幼遗尿至今, 每夜遗尿3~4次。昼日尿频、量少, 精神紧张时更甚, 睡眠不安, 遗尿后不能自醒, 纳可, 便调, 望诊见面黄形瘦, 口周微青, 舌淡苔白, 脉沉微数。腰椎摄片未见异常。治以健脾安神, 固摄止遗。方选归脾汤加味: 党参、黄芪、茯苓、远志、龙眼肉、五味子、炒白术各10克, 生龙牡各20克, 酸枣仁、桑螵蛸各15克, 生姜2片, 大枣5枚。五剂, 水煎服。复诊时遗尿次数减至每夜1~2次, 眠安, 继服上方五剂。三诊时遗尿次数减至每周1~2次, 续服前方五剂而愈。随访一年无复发。

例2: 李某, 女, 14岁。1988年2月19日初诊。患儿二年前曾自滑梯上跌下, 当晚出现遗尿, 此后每夜

1~2次, 持续至今。曾经针灸及汤药治疗, 效果不显。伴有尿频、量少、睡眠欠安, 舌淡苔薄白, 脉沉稍数。腰椎摄片未见异常。治以健脾安神, 固摄止遗。归脾汤加味: 党参、五味子、龙眼肉、酸枣仁、桑螵蛸各15克, 黄芪20克, 生龙牡各30克, 茯苓、远志各10克, 罂粟壳5克, 生姜2片, 大枣5枚。五剂, 水煎服。复诊时遗尿次数减至每周一次, 继用五剂而愈。随访半年无复发。

讨论: 祖国医学传统理论认为, 遗尿多责之于脾、肾虚寒, 膀胱开合失司, 且与小儿睡眠过熟有关。选方常用桑螵蛸散或补中益气汤加益智仁、菖蒲等开窍醒神药物。但依笔者临床观察, 遗尿症患儿相当一部分并非睡眠过熟, 而属睡眠欠安。遵循祖国医学整体辨证的宗旨, 试用归脾汤加安神收涩之品, 竟获佳效。方中党参、黄芪益气升提, 茯苓利湿宁心安神, 五味子、龙眼肉、枣仁收涩安神, 桑螵蛸收涩固肾, 生龙牡、罂粟壳镇摄固涩, 生姜、大枣调补脾胃。诸药合用, 共奏益气健脾、安神固涩之功。