

证的研究

温病湿热证湿热量化的相关性实验研究

吴仕九¹ 廖礼兵² 文小敏³ 徐 萌⁴

摘要 目的:为探讨温病湿热证湿热量化的实验方法,在以往研究基础上,筛选出相关性强的量化指标。方法:通过复制湿热证动物模型,采用 Bradford 方法测定水通道蛋白 2(AQP2)含量,放免法检测内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP),一步双抗夹心酶联免疫法检测粒细胞集落刺激因子(G-CSF),比色法检测中分子(MMS)和巯基(R-SH)物质等。结果:湿热证模型组 AQP2 水平较正常组明显降低,用清香散治疗后 AQP2 水平基本恢复正常,与正常组接近。湿热证模型组 ET 水平较正常对照组明显升高,而 CGRP 较正常组降低($P<0.01$)。湿热证模型大鼠血中 G-CSF、MMS 升高,而 R-SH 水平降低,经清香散治疗 1 周后,大鼠血中 G-CSF、MMS 及 R-SH 基本恢复正常,模型对照组 G-CSF 阳性率升高。结论:AQP2 与 ET、CGRP、G-CSF、R-SH、MMS 分别可作为“湿”偏重、“热”偏重、“湿热病因”的相关性量化指标。这些技术指标对湿热定性、量化,清热祛湿药物的研究以及湿热证“证”本质的深入探讨有重要意义。

主题词 湿热/诊断 温病/诊断 @ 湿热量化

温病湿热证的病因为湿热病邪,由于湿与热的性质,一属阴一属阳,从而决定了湿热证在发展过程中,其辨证分型必须以湿与热的偏重,决定其“清热”为主或“祛湿”为主的治疗大法。湿热证初期表现卫气同病,多为湿重热轻,随着病程进展,湿邪渐化热,到中期有湿重于热、湿热并重、热重于湿等病理表现。而后期有伤阳、伤阴的不同转归。既往对湿热证湿热偏重的依据,着重于临床辨证,强调舌苔颜色与润燥的变化及脉象的改变等,缺乏客观化评价指标,不利于临床辨证,特别是清热祛湿类药物的研制和药理实验的可重复性研究^[1]。因此在湿热证辨证中,准确量化湿热轻重,对病情的预后,理法方药确定均有重大意义。近 10 余年在国家中医药局、省科委的系列基金资助下,我们在成功研制湿热证动物模型的基础上^[2,3],从动物症状学、分子生物学、细胞学、病理学等角度,对温病湿热证

湿热量化进行系列研究,本文报告以指标检测为主,从中筛选出相关性强的指标,实验研究结果如下。

1 实验材料

1.1 动物:Wistar 大鼠由华南实验动物中心提供,普通级,雌雄各半,体重 185~223g。

1.2 饲料:用高糖高脂饲料,即普通饲料加 5%~10% 蜂蜜、12% 猪油配成,由华南实验动物中心提供。

1.3 仪器:造模箱(由第一军医大学医疗器械修配厂制造,型号 Z-1 型,自动恒温恒湿),放射免疫 γ 计数器(SN-682)、可见分光光度计(UV-754 型)、酶标仪(奥地利 Clini Bio 128C 型)、低速离心机(北京医用离心机厂 LD5-2A 型)等。

1.4 细菌:鼠伤寒沙门氏菌,菌号 460894,军事医学科学院提供。

1.5 试剂:降钙素基因相关肽放免药盒(CGRP RIA KIT,批号 D5120)、内皮素放免药盒(ET RIA KIT,批号 D5114)、G-CSF 酶联免疫检测试剂盒(批号 D5062)均购自邦定泰克生物技术有限公司。

1.6 清香散主要组成:香薷、地胆草、柴胡、石菖蒲、郁金、白术、茯苓等。制备:水煎,醇提,浓缩,将水煎与醇提所得药汁混合浓缩,与水煎回收的蒸馏液配成 1g 生药/ml 浓度的药液,保存备用。

2 实验方法

2.1 造模方法:将 Wistar 大鼠 32 只随机分为正常对照组、湿热模型组、清香散组、水对照组 4 组,每组 8 只。正常对照组:自然环境、普通饲料饲养。其余 3 组均按以下方法造模:先以高糖高脂饲料饲养 10 天,然后将大鼠置于造模箱中(温度 35℃,相对湿度 95%),于入箱后第 96h 以伤寒杆菌(10^9 /ml)灌胃 1 次(2ml/只),第 120h 再灌菌 1 次(1ml/只),之后移出置自然环境饲养 1 天。3 组入造模箱时间相同。清香散组:造模后移出至自然环境,以清香散煎剂灌胃,每日 1 次,共 7 天。水对照组:造模后,移出至自然环境,正常饮食,等量水灌胃,每日 1 次,共 7 天。湿热证模型组:造模后移出置自然环境饲养 1 天后处死。

2.2 检测方法:采用 Bradford 方法测定水通道蛋白 2

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究基金(111188)

1 中国人民解放军第一军医大学中医系,广州市同和(510515)

2 中国人民武装警察部队广东省总队医院

3 广州中医药大学 2001 级博士

4 第一军医大学南方医院

收稿日期:2002-07-16;修回日期:2002-09-23

(AQP2)含量;采用放免法检测降钙素基因相关肽(CGPR)和内皮素(ET);采用一步双抗夹心酶联免疫法检测粒细胞集落刺激因子(G-CSF);采用比色法检测中分子(MMS)和巯基(R-SH)物质。

3 结果

3.1 湿热证大鼠模型肾内髓及尿液 AQP2 蛋白含量的变化

3.1.1 大鼠尿液 AQP2 蛋白含量与肾脏表达量之间的相关性:文献报道尿液 AQP2 蛋白的排出量与肾脏 AQP2 蛋白的表达量有着良好的相关性,提示尿液 AQP2 的含量可以反映肾脏 AQP2 蛋白的表达水平。我们将测得的每一只大鼠尿液 AQP2 蛋白光密度与肾脏 AQP2 蛋白光密度(稀释 10 000 倍后)进行直线回归分析发现,其直线回归方程为 $y = 1.057x + 0.00008$,相关系数 $r = 0.625 (P < 0.01)$ 。进一步证明了肾脏 AQP2 与尿液 AQP2 蛋白之间良好的相关性。

3.1.2 各组 AQP2 蛋白含量变化:湿热证模型组 AQP2 水平较正常组明显降低,而给予清香散后 AQP2 水平基本恢复,与正常组接近。见表 1。

3.2 湿热证大鼠模型 ET 和 CGRP 水平的变化

3.2.1 各组大鼠 ET、CGRP 水平比较:湿热模型组 ET 水平较正常对照组明显升高,而 CGRP 较正常组降低($P < 0.01$)。说明湿热证大鼠模型体内 ET、CGRP 水平发生明显变化。清香散对湿热证大鼠血中 ET、CGRP 含量可进行调节。给予清香散后,血中 ET 含量接近正常水平,CGRP 水平也有明显上升,但与正常对照组仍有显著差异。见表 2。

3.2.2 血浆 ET 与 CGRP 的相关性:正常对照组 ET 和 CGRP 水平呈正相关($r = 0.8052, P < 0.01$);而湿热模型组 ET 与 CGRP 水平呈负相关($r = -0.7057, P < 0.01$);清香散组 ET 与 CGRP 水平呈正相关($r = 0.8314$)。

3.3 清香散清热利湿与抗感染的相关研究:表 3 示,湿热证大鼠的粒细胞集落刺激因子阳性率明显高于正常对照组($P < 0.01$),与清香散组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。

3.4 各组大鼠血清 R-SH、MMS 水平变化比较:湿热模型组的巯基水平比正常对照组低,统计学意义显著($P < 0.01$),说明模拟湿热证发病因素的造模方法使大鼠血中 MMS 升高而使 R-SH 水平降低。给予清香散 1 周后,大鼠血中 MMS 及 R-SH 基本恢复正常,与正常对照组间差异并无显著性($P > 0.05$),表明清香散提高巯基水平,降低 G-CSF 阳性率,通过清热祛湿机理平衡湿热证所致的异常。见表 4。

表 1 各组 AQP2 光密度值比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	尿液 AQP2	肾脏 AQP2
正常对照组	8	3477.5 ± 88.6	3603.7 ± 85.3
湿热证模型组	8	3318.7 ± 54.3* Δ	3472.5 ± 63.6** Δ
清香散组	8	3438.7 ± 138.9	3773.7 ± 285.6
水对照组	8	3387.5 ± 102.9	3552.5 ± 118.2

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与清香散组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组 ET、CGRP 水平比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ET	CGRP
正常对照组	8	4.17 ± 0.47	91.13 ± 1.72
湿热证模型组	8	18.82 ± 1.95** Δ	53.80 ± 3.29** Δ
清香散组	8	4.98 ± 0.85*	74.92 ± 2.23**
水对照组	8	18.60 ± 1.36** Δ	54.21 ± 2.45** Δ

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与清香散组比较, $\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠 G-CSF 血浆阳性率比较

组别	鼠数	阳性(只)	阴性(只)	阳性率(%)
正常对照组	8	0	8	0
湿热证模型组	8	6	2	75
清香散组	8	1	7	12.5
水对照组	8	5	3	62.5
合计	32	12	20	37.5

表 4 各组大鼠血清 R-SH、MMS 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	R-SH(mol/L)	MMS(OD 值)
正常对照组	8	136.52 ± 4.06	180.39 ± 3.27
湿热模型组	8	126.70 ± 4.75* Δ	207.96 ± 7.62* Δ
清香散组	8	139.53 ± 3.42	176.54 ± 3.49
水对照组	8	123.15 ± 4.51* Δ	209.21 ± 2.52* Δ

与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与清香散组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

湿热证“湿”的量化与 AQP2:AQP2 是近年来发现存在于肾脏集合管的重要的调节水重吸收的关键蛋白之一^[4]。在许多出现水潴留的病理生理状态下,如在充血性心力衰竭时肾脏 AQP2 表达明显增加^[5],提示 AQP2 可以调节细胞内外的水平衡,在机体水平衡中起着重要作用。本实验研究表明,湿热证模型大鼠体内肾内髓和尿液 AQP2 蛋白的表达量明显减少,这可作为“湿热”之邪侵袭机体时发生的一种特殊的病理改变。同时,直线回归分析又进一步证明肾内髓 AQP2 与尿液 AQP2 蛋白之间的良好相关性,因此尿液 AQP2 蛋白的排出量明显降低,说明其向外利水的生理作用受限,导致“湿”的累积。AQP2 对于湿热证“湿”的形成、湿的量化、湿的偏重具有重要的作用。

湿热证“热”的量化与 ET、CGRP:发热是温病湿热证的症状之一,由于机体在热和潮湿环境下,湿、热邪共患,脾胃功能失调,受到细菌、病毒等生物因子

所侵袭,发生一系列生理病理改变。ET^[6,7]、CGRP^[8,9]是血管活性类物质,通过调节全身血管收缩与舒张,改变血液循环血流量及机体散热系统,控制机体体温调节中枢的调定点上移与下移,直接影响着体温变化:实验发现湿热模型组 ET 水平较正常对照组明显升高,而 CGRP 较正常组降低($P<0.01$),二者呈负相关。证明湿热证模型大鼠体温的升高与体内 ET 水平的升高及 CGRP 的下降相关,ET 升高、CGRP 下降使得全身血管收缩明显大于舒张,散热系统受抑而产热增加,湿热证模型动物均有发热的症状,其“热”的机制、热的量化、热的偏重与 ET、CGRP 的这种血管—中枢—血管的反馈式调控密切相关。

湿热病因与 G-CSF、R-SH、MMS:中医“湿热证”包括现代医学多种传染病与感染性疾病。湿热大鼠模型的体液处于一定感染状态,“湿”、“热”合邪可能促使机体产生免疫应答,刺激白细胞系统表达 G-CSF。G-CSF 能调节粒细胞的干细胞存活、增殖、分化并能增强成熟粒细胞功能。在抗感染的非特异性细胞免疫中起着极为重要的作用。正常情况下,人体 G-CSF 水平较低,而当致病因子侵入后,体内 G-CSF 水平迅速升高,可较正常值高 1 000 倍以上,感染控制后又降至正常。因此,测定体液中 G-CSF 水平对诊断有无致病因子感染存在及指导抗感染药物的合理运用有较大的临床意义。本实验研究发现,湿热证大鼠模型经香散治疗后,G-CSF 水平迅速降至正常水平。R-SH 和 MMS 常常是两个成对出现的与感染、中毒等密切相关的分子指标^[10]。我们在研究中发现,湿热证大鼠血中 R-SH 下降而 MMS 物质升高,两者呈负相关。香散清热利湿的机理与免疫调节和细胞保护机制密切相关^[11,12]。

湿热状态下 MMS、R-SH、G-CSF 等指标的变化,与湿、热、致病因子等综合因素的作用密切相关,在湿热证病理过程中能体现湿热证病情轻重程度。

参考文献

- 1 吴仕九. 湿热证的研究方向及其探讨. 中国中医急症, 1994, (3): 86-87.
- 2 吴仕九, 杨运高, 杨钦河, 等. 温病湿热证动物模型的研制及清热祛湿法机理的探讨. 中国中医药科技, 1999, 6(2): 65-67.
- 3 吴仕九, 杨运高, 佟丽, 等. 中医湿热证证候模型的应用研究. 中医杂志, 2001, 42(9): 553-555.
- 4 Nielsen S, Agre P. The aquaporin family of water channels in kidney. Kidney Int, 1995, 48(4): 1057-1068.
- 5 Xu DL, Martin PY, Ohara M, et al. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1500-1505.
- 6 Nguyen BN, Johnson JA. The role of endothelin in heart failure and hypertension. Pharmacotherapy, 1998, 18(4): 706-719.
- 7 Oliver Z, Jessika Q, Thomas S, et al. Alterations of the cardiac endothelin system in human end stage heart failure. Circulation, 1998, 98(suppl 1): 2898-2904.
- 8 Stemini C, Reeve JR, Bracha N, et al. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immuno reactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. Gastroenterology, 1987, 93(3): 852-862.
- 9 Amara SG, Jonas V, Rosenfold MG, et al. Alternative RNA Processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature, 1982, 298(5871): 240-244.
- 10 李铁, 张席锦. 巯基物质在氧自由基损伤离体胃粘膜细胞中的作用. 生理学报, 1992, 44(4): 386-393.
- 11 徐平西. 中分子研究现状. 生命的化学, 1998, 8(3): 28.
- 12 杨运高, 吴仕九. 温病湿热证动物模型研制的方法学比较. 中国中医基础医学杂志, 1998, (4): 172-174.

北京市东方中医药培训中心

2003 年全国名老中医治疗疑难病经验高级专修班招生通知

1. 注重信誉:北京市东方中医药培训中心由中华中医药学会继续教育部主管,中国中医研究院、中医杂志社主办,专门举办国家级继续教育学习班和专病研讨班,其中 2002 年系列高级专修班深获各地学员好评。

2. 雄厚师资:依托中华中医药学会、中国中医研究院和中医杂志社在科研、临床、教学和学术方面的独有优势,集各科著名权威、专家、博导,面对面传授,浓缩理论与实践精华,突出实用与提高。学会一招,办一专科,兴一医院,造福一方。

3. 中西结合专题突出:

(1) 2003 年 9 月 25 日~30 日在北京举办“全国痹证高级专修班”,由路志正、房定亚等教授主讲。

(2) 2003 年 9 月 25 日~30 日在北京举办“全国中医临床专病专治高级专修班”,由李俊龙、杜怀棠等教授主讲。

(3) 2003 年 10 月 16 日~21 日在北京举办“全国针药并用专病专治高级专修班”,由李传杰、魏明丰等教授主讲。

(4) 2003 年 10 月 30 日~11 月 4 日在北京举办“手穴诊疗培训班”

(5) 2003 年 11 月 6 日~11 日在北京举办“全国中西医结合治疗皮肤病及中医美容高级专修班”,由庄国康、许毓、周达春等教授主讲。

4. 收费合理准时开班:以上各班每期学费 680 元,第 1 天均为报到日,学习期间酌情安排临床见习。学习结业后颁发中英文对照结业证书(盖钢印)和国家继续教育学分证书,升职晋级,全国通用。凡参加专修班学员的优秀论文将优先于《中医杂志》每年正式出版的增刊中发表。欲学习者请先交报名费 10 元(注明班别),附个人简历(注明学历、职称、电话等)。我中心收到报名函后即做排名和安排,经审查合格,即发入学通知。

以上培训班报名联系地址:北京东城区北新仓 18 号中医杂志社北京市东方中医药培训中心,邮政编码:100700。

电话:(010)64013009,传真:(010)64050201。联系人:梅丽。

广告批准号:京教社广字(东城)2002156 号 京教社广字(东城)2003012 号

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Changes of Intestinal Mucosal Barrier Function and Interference Action of Compound Dachengqi Decoction in the Patient of Excess Syndrome of Yangming Fu-Organs

Chen Hailong, Feng Limin, Guan Fenglin

Objective: To explore the mechanism of changes of intestinal mucosal barrier function and protective action of Compound Dachengqi Decoction on intestinal mucosal barrier function in the patient of excess syndrome of Yangming Fu-organs. **Methods:** 20 cases of excess syndrome of Yangming Fu-organs were randomly divided into 2 groups. One group was treated by routine method, and another was treated by Chinese herbs Compound Dachengqi Decoction on the basis of routine treatment, for 5 consecutive days. Blood diamine oxidase (DAO) activity and endotoxin (ET) content, the ratio of urine excretion rates of milk fructose and mannitol (M/L) and intestinal mucosal permeability were investigated. Additionally, 10 healthy subjects were used as normal control group. **Results:** As compared with the control group, M/L ratio in urine, blood DAO activity and ET content in the patient of excess syndrome of Yangming Fu-organs significantly increased. After treatment by Compound Dachengqi Decoction, all the above mentioned indexes significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** In the patient of excess syndrome of Yangming Fu-organs, intestinal mucosa is injured and the intestinal mucosal permeability increases, and Compound Dachengqi Decoction can decrease the intestinal mucosal permeability, protect intestinal mucosal barrier function and effectively decrease blood endotoxin content.

Author's address: The First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalinan 116011

Key Words: Excess syndrome of Yangming/TCM therapy, Compound Dachengqi Decoction/treatment application

(Original article on page 672)

Effects of Xinglou Chengqi Decoction on Serum Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Contents in the Patient of Acute Cerebral Infarction

Ma Yunzhi, Wu Jitao

Objective: To explore further the mechanism of Xinglou Chengqi Decoction for treatment of cerebral infarction. **Methods:** Serum tumor necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO) contents were determined in 65 cases of acute cerebral infarction (ACI) who took Xinglou Chengqi Decoction, 45 cases of acute cerebral infarction and 20 healthy subjects. **Results:** Serum TNF and NO

contents in the patient of ACI were significantly higher than those in healthy subjects. One week later, serum TNF and NO contents in two groups of ACI patients decreased, and in treatment group it is reduced more obviously, with a significantly difference as compared with control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xinglou Chengqi Decoction can decrease serum TNF and NO level in the patient of ACI, which might be one of the mechanisms of Xinglou Chengqi Decoction for treatment of acute cerebral infarction.

Author's address: The First Hospital Affiliated to Henan College of TCM, Zhengzhou 450000

Key Words: Cerebral infarction/TCM therapy, TNF/metabolism, @Xinglou Chengqi Decoction

(Original article on page 674)

Experimental Study on Correlativity of Damp-heat Quantification in Damp-Heat Syndrome of Epidemic Febrile Disease

Wu Shijiu, Liao Libing, Wen Xiaomin, et al.

Objective: To explore experimental methods for damp-heat quantification in damp-heat syndrome of epidemic febrile disease and scan highly correlative quantification indexes. **Methods:** AQP2, endothelin (ET), calcitonin-gene related peptide (CGRP) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), middle molecular substance (MMS) and hydrosulfide substances (R-SH) were determined in the damp-heat animal model. **Results:** AQP2 level in damp-heat model group was significantly lower than that in normal control group, and after treatment by Qingxiang Powder it was restored basically to the normal level. ET level in damp-heat model group was higher and CGRP was lower than that in normal group ($P < 0.01$). Blood G-CSF and MMS increased and R-SH level decreased in the damp-heat rats. After treatment of one week by Qingxiang Powder, blood G-CSF, MMS and R-SH basically restored to normal, and G-CSF positive rate increased in model control group. **Conclusion:** AQP2, ET, CGRP, G-CSF, R-SH and MMS can be respectively used as correlative quantification indexes for the patient with "more dampness", "more heat" and "the cause of disease of damp-heat".

Author's address: Department of TCM, The First Military Medical University of PLA, Guangzhou 510515

Key Words: Dampness-heat/diagnosis, Epidemic febrile disease/diagnosis, @Quantification of damp-heat

(Original article on page 688)