

• 综述 •

血虚证实质及四物汤反证研究

高 月 (军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 概述了血虚证动物模型研究现状及存在的问题, 提出模型的选择及指标观测应根据受试药特点而定。另从血虚证实质角度探讨了该模型的病理生理反应机制, 用四物汤进行了反证研究。

关键词: 血虚证动物模型; 实质; 四物汤

中图分类号: R22 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2003)04-0058-03

The Effect of Siwu Tang on Blood Deficiency Model and its Mechanisms

GAO Yue

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: To introduce and analysis the blood deficiency model and its problems. The aim of the study is to provide clues for choosing different models and investigate the mechanisms of Siwu Tang on it.

Key words: blood deficiency model; mechanisms; Siwu Tang

中医“证”的动物模型研究关键有两个方面: 一为模型本身是否能体现该“证”的临床意义及其病理生理变化实质, 是否能量化? 另一为模型本身所体现的病理生理反应本质能否被相对应的代表方剂所逆转。以此验证模型的可靠性及实用性, 为同类方剂的现代化研究提供实验基础。本文在现有血虚证动物模型研究的基础上, 重点探讨血虚证分子实质及其四物汤对其的反证, 以期丰富该模型的研究内容。

1 血虚证动物模型研究概述

血虚证动物模型的制作方法有多种。最早始于70年代的放血疗法, 此后相继有放射损伤, 化学损伤, 营养性饥饿等方法造成的血虚证模型^[1]。上述方法各有其优缺点, 如放血疗法可有效降低外周血中全血细胞的数量, 但放血量难以精确控制, 模型间有很大差别; 化学损伤性模型多采用乙酰苯肼所致的溶血性贫血模型和环磷酰胺所致的白细胞减少性贫血模型, 虽方法简单, 但乙酰苯肼主要对红细胞有缓慢进行性氧化损伤作用, 但却使红细胞和白细胞代偿性增高, 而环磷酰胺对红细胞的作用不如其对白细胞的影响明显, 而且给药剂量及给药次数若控制不好, 便不能完全反映其病理本质。辐射造模可造成白细胞下降和骨髓造血损伤, 是比较好的一种造模方法, 但照射剂量是此模型的关键所在, 因照射剂量小达不到损伤要求, 而剂量大, 骨髓造血损伤严重受抑, 中医药治疗难以逆转。因此近几年对血虚证模型的研究, 以综合造模为主, 如采用乙酰苯肼 60mg/kg 和环磷酰胺 160mg/kg 分次给药的方法联合造成血虚证模型^[2], 另一种综合造模

法采用放血, 控制饮食和劳倦的方法进行^[3]。如此可以较全面地反映血虚证证候特点, 拉近与临床的距离, 考虑化学损伤和照射损伤所致动物血虚证模型的损伤特点, 照射损伤着重在骨髓造血的损伤, 化学损伤着重表现在外周血各血液成分的下降, 受国家自然科学基金“中医血虚证模型分子基础研究”项目资助, 我们观察了两种损伤模型证实质的变化, 并用临床常用补血名方四物汤进行了反证。

2 血虚证与外周血及四物汤反证

采用⁶⁰Co γ 射线全身一次性照射, 剂量分别为 2.5Gy, 5.5Gy 和 7.5Gy, 剂量率为 161.2~164.8 伦/分, 照前测定各组小鼠外周血各血液成分正常值, 照后分别于 1、3、5、7、9、11、15、19 继续动态观察照后模型小鼠各成分的改变, 结果提示此模型小鼠以对外周血白细胞的影响最为明显, 并随照射剂量加大, 外周血白细胞下降越明显。红细胞, 血小板等指标亦下降, 但下降幅度不及白细胞明显。四物汤照后立即灌胃给药连续 7d, 可以逆转 3.5 和 5.5Gy 照射所致该模型小鼠外周血的下降, 使照后第 5、7、9、11 天的白细胞数和第 15 天后的血小板数明显高于对照组, 而对 7.5Gy 照射所致的损伤不能逆转。250mg/kg 环磷酰胺一次给药或 50mg/kg 连续给药 5d, 均可使动物外周血在一定程度上下降, 但以白细胞影响最为明显^[4,5]。

3 血虚证与造血祖细胞及四物汤反证

3.5Gy, 5.5Gy, 7.5Gy⁶⁰Co γ 射线照射所致骨髓造血损伤和外周血各血液成分的下降可以较全面反应其血虚证本质, 表现在骨髓造血祖细胞 CFU-GM, CFU-E, BFU-E, CFU-Meg 和 CFU-Mix 下降, 但 7.5Gy γ 射线照射, 骨髓造血功能严重受抑, 骨髓有核细胞极少, 四物汤对其无任何治疗作用; 而对 5.5Gy

照射所致的损伤恢复只有在动物预防给予四物汤连续 7d 后,方能在一定程度刺激粒系、红系和巨核系造血祖细胞的增生,促进造血恢复^[6]。提示 3.5Gy 照射剂量为此种模型制作的最佳照射剂量,便于中药补血类方剂及单药的药效学评价。环磷酰胺给药造模以 250mg/kg 一次性给药为宜,药后各造血祖细胞集落均明显受抑,四物汤亦能在一定程度上发生逆转,但效果不及对照射损伤模型的治疗效果明显^[8]。

4 血虚证与细胞凋亡及四物汤反证

细胞凋亡介入了多种生理、病理过程,与造血器官的发育、成熟及血液系统疾病密切相关。2.5Gy, 5.5Gy 和 7.5Gy 射线照射后,动物骨髓和脾脏细胞出现典型的凋亡,表现为核固缩,核碎裂及凋亡小体的形成等,并且以 24h 以内最为明显,随后凋亡细胞逐渐减少,7d 左右基本消失;与此同时,24h 之内各剂量组小鼠骨髓和脾脏细胞 DNA 凝胶电泳出现明显梯状带,随着时间的推移,梯状带减弱、消失。上述造血细胞形态学及 DNA 的变化与血虚证的严重程度呈正相关,细胞凋亡越明显,小鼠血虚证越严重,但造血细胞凋亡出现的时间与血虚证的程度无关,即无论照射剂量大小,凋亡都发生在血虚出现的早期^[4]。四物汤预防给药连续 7d 对 5.5Gy 射线照射所致的细胞凋亡有明显抑制作用,而治疗给药在第 7d 和第 10d 均未检测到细胞凋亡的典型条带,这与受照小鼠凋亡发生的时相有关。提示细胞凋亡是一典型的血虚证分子本质,但对补血类中药方剂的验证,以预防给药最为恰当。

5 血虚证与细胞周期及四物汤反证

照射和环磷酰胺给药后均能使骨髓细胞周期紊乱,但各有其变化特点。5.5Gy 照射后,小鼠骨髓细胞 G₂/M 期比例先升高后降低,第 7d 恢复正常。S 期细胞比例先降低后升高,7d 后恢复正常。照后 12-18h, G₀/G₁ 期阻滞,而四物汤治疗给药后骨髓细胞在 G₂/M 期阻滞比例降低, S 期细胞增多,说明四物汤能促进骨髓细胞由 G₀ 期进入 S 期,促进骨髓细胞 DNA 合成以促进增殖^[9]。

环磷酰胺所致血虚证模型随剂量不同而各有其变化特点。小剂量 CTX 给药后,小鼠骨髓细胞在第 1d 时 G₀ 期阻滞, S 期细胞减少,骨髓细胞增殖受抑,第 3d 时 CTX 刺激骨髓细胞增殖, G₂/M 和 S 期细胞增多。G₂/M 期细胞在给药后第 5d 达峰, S 期细胞在药后第 7d 达峰,药后 10d 骨髓细胞增殖受抑, G₀ 期阻滞, G₂/M 和 S 期细胞减少,而加大环磷酰胺的给药剂量后, G₂/M 期细胞在药后第 3d 既达峰, S 期细胞亦提前至第 5d 达峰,给药 7d 时 G₂/M 和 S 期细胞下降至正常^[10]。

6 血虚证与 CD34⁺ 细胞及四物汤反证

CD34 分子是一种高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白,选择地表达于造血干细胞和造血祖细胞的表面,随细胞的分化成熟而逐渐减弱直至消失, CD34 造血细胞即包含造血干细胞和造血祖细胞,骨髓中 CD34⁺ 细胞的比例,可反映骨髓中造血干祖细胞的数量,探讨 CD34⁺ 细胞与血虚证的关系,无疑对

揭示血虚证实质具有重要意义。3.5Gy 射线造模后,小鼠骨髓中的 CD34⁺ 细胞的比例明显减少,连续给予四物汤治疗 7d 后, CD34⁺ 细胞的比例较模型对照组明显升高,表明 3.5Gy 射线造模后,小鼠骨髓中干、祖细胞数量降低,四物汤对骨髓中造血干、祖细胞数量的回升有明显促进作用^[8]。此外,还观察了 3.5Gy、5.5Gy 和 7.5Gy 照射后对 CD34⁺ 细胞比例的影响,提示吸收剂量越大, CD34⁺ 细胞比例下降越明显^[8]。而环磷酰胺给药所致的动物模型其 CD34⁺ 细胞的变化随给药剂量的不同而呈现不同的变化特点^[10]。

7 血虚证实质与其它

对血虚证实质研究,已有相关的诸多报导,比较集中的研究在如下几个方面:血虚证与免疫功能的研究,包括细胞免疫,体液免疫和红细胞免疫等方面,血虚证患者总 T 细胞减少,动物机体的 T、B 淋巴细胞转化能力, B 淋巴细胞 Zc 花环率均明显低于正常,此外血虚证患者 T 细胞亚群,白细胞介素-2 水平和自然杀伤细胞活性减低,而给予补血类方剂后,可以提高其活性^[11,12];张氏认为血虚证患者心脏储备功能下降,血管紧张度低下^[13];丁氏观察血虚证小鼠血流态持续,部分呈虚线状,血呈淡红色,有片状渗出,视野模糊,有颗粒聚集^[14];欧氏^[15]认为血虚证机体 ATP 来源障碍,新陈代谢机能降低,机体清除自由基活性减低,自由基过剩积累, LPO 增多, SOD 低于正常;另观察到血虚证大鼠血清中微量元素含量比正常组低,给予补血类中药后,各项指标得到改善;何氏^[11]认为血虚证与红细胞膜酶功能的缺陷有直接关系,其膜蛋白酶减少,清除自由基活性降低。血虚证实质研究较广,相关报导还涉及与胸腺、脾脏基质细胞、肿瘤坏死因子、骨髓造血微环境等,这些研究无疑对推动血虚证的证本质研究,探讨补血类中药的作用机制起了积极作用。

8 小结与展望

血虚证,是血液亏虚,脏腑百脉失养,以体表肌肤粘膜组织呈现淡白以及全身虚弱为特征的证候群,它不等同于现代医学的贫血。现代医学的再生障碍性贫血、缺铁性贫血、溶血性贫血、白细胞减少症等均属于血虚证范畴。因此血虚证是一整体的、综合的病证,涵盖了现代医学以血虚特征为主要表现的多种疾病。

血虚证的研究从 70 年代始至今已有 20 多年的历史。在模型的制作方面经历了由单纯放血、化学损伤、放射损伤、饥饿疗法到综合放血,饮食不节和劳倦,以及放、化损伤和化、化损伤结合的过程,以使其更符合中医临床血虚证的发病机制。在证实质的探讨上,亦从简单的外周血细胞计数,心功能检测,血液流变学变化,微量元素的含量,免疫球蛋白检测,淋巴细胞转化试验,红细胞膜酶,红细胞免疫, T 淋巴细胞,白细胞介素-2 等逐步深入到骨髓造血祖细胞,细胞周期,细胞凋亡, CD34⁺ 细胞表达等分子基础的改变方面,这为探讨补血类中药的作用机理具有十分重要的意义。但中医证候学研究是一个复杂的体系,血虚证候学也是如此,任何模型的建立都不能全面反映中医理论指导下的血虚证本质,只有把证候学研究当成一种系统工程,利用相应的技术方法从

整体、细胞、分子水平进行深入,才能在一定程度上揭示其本质。多年来,我们课题组正是基于这一宗旨,对血虚证进行了多水平的系统观察。下一步的工作将采用基因芯片技术和双向电泳实验方法,探讨血虚证模型在基因和蛋白质水平上的变化,以丰富血虚证实质内容。此外,我们试图与临床结合,在中医理论的指导下,比较临床血虚证病人和血虚证动物模型在相关指标上的异同,为补血类中药的作用机理研究提供基础。

参考文献:

- [1] 梁毅,鲁新华,陈如泉. 中医血虚证研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(1): 16-18.
- [2] 金若敏,宁炼,陈长勋,等. 血虚模型动物制备及当归补血汤的作用研究[J]. 中成药, 2001, 23(4): 268-271.
- [3] 梁毅,方碧琴,鲁新华. 血虚证小鼠模型的制作及评价[J]. 湖北中医杂志, 2001, 23(9): 3-5.
- [4] 刘永学,高月,陶来宝,等. 造血细胞凋亡在射线诱发小鼠血虚证中的作用[J]. 深圳中西医结合杂志, 2000, 10(1): 14.
- [5] 路晓钦,高月,刘永学,等. 四物汤对辐射小鼠造血影响机制的初步探讨[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(4): 216-218.
- [6] 路晓钦,高月,谭洪玲,等. 四物汤及其单药对血虚证小鼠造血的改善作用及其机制初探[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(2): 38-41.
- [7] 路晓钦,高月,谭洪玲,等. 四物汤及其三味药组方对 γ 射线照射致血虚证小鼠造血系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 35-38.
- [8] 马增春,高月,刘永学,等. 四物汤对 γ 射线照射致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 41-44.
- [9] 马增春,高月,刘永学,等. 辐射小鼠骨髓中CD34⁺细胞的变化及其意义[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21(1): 12-15.
- [10] 马增春,高月,刘永学,等. 环磷酰胺所致血虚证小鼠骨髓CD34⁺细胞的变化[J]. 中国基础医学杂志, 2001, 7: 42-44.
- [11] 何东初,黎明辉,梁毅,等. 血虚证的临床及实验研究探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6): 473-476.
- [12] 高月,吕秋军,付艳荣,等. 中医血虚证动物模型研究[J]. 中国药理学会通讯, 1999, 16(1): 30.
- [13] 张镜人,杨虚天,张蓓莉,等. 气虚或血虚患者的心功能血液动力学变化[J]. 上海中医药杂志, 1983, (4): 43.
- [14] 丁钰熊,王家冲,龙楚喻,等. 鹿茸精注射液治疗血虚动物的实验研究[J]. 中成药, 1991, 13(1): 27-28.
- [15] 欧敏,陈如泉. 血虚家兔模型红细胞变形性与SOD、LPO变化的实验研究[J]. 湖北中医杂志, 1996, 18(3): 52.