

• 实验研究 •

淫羊藿肉苁蓉对羟基脲所致“阳虚”
动物脱氧核糖核酸合成率的作用

第二军医大学第一附属医院中医科 刘福春 丁光霞 李菊仙

内容提要 本文选用羟基脲制造“阳虚”动物模型，用 ^3H -TdR 体内掺入 DNA 的方法，研究淫羊藿肉苁蓉对“阳虚”动物 DNA 合成率的作用。作者认为羟基脲因其抑制核苷酸在二磷酸化水平的还原反应而导致 DNA 合成率降低，蛋白质、能量代谢紊乱造成“阳虚”；淫羊藿肉苁蓉可能含有一种激活核苷酸还原酶的生物活因子，因而能显著地提高“阳虚”动物 DNA 合成率。

在活细胞的各种组分中，核酸是最基本的组分之一，它包含了遗传信息，并参与这些信息在细胞内的表达，从而控制代谢过程。我们以前的研究证明中医的阳虚本质之一是核酸代谢低下⁽¹⁾，为了进一步研究阳虚病变中核酸代谢的变化，我们选用核苷酸还原酶抑制剂羟基脲制造“阳虚”动物模型⁽²⁾，用氚标记的胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR)体内掺入脱氧核糖核酸(DNA)的方法，研究助阳药淫羊藿、肉苁蓉对“阳虚”动物的作用，现将研究结果报告如下。

材料和方法

1. 动物：用我校动物房自养之昆明种雄性小白鼠，体重在 25~30g 之间共 64 只。分 3 组：“阳虚”组(23 只)每日喂羟基脲 7.5mg/0.75ml；淫羊藿、肉苁蓉组(以下简称助阳药组，21 只)，每日喂羟基脲 7.5mg/0.5ml 加淫羊藿、肉苁蓉合剂 0.5g/0.25ml；正常对照组(20 只)，每日喂生理盐水 0.75ml/只，以上均为胃管喂饲。其中 29 只参加耐冻实验，25 只进行体内 TdR 掺入试验，死亡 8 只，正常对照组提取 DNA 时标本损失 2 只。

2. “阳虚”动物造型：按已报告之方法⁽²⁾用羟基脲 7.5mg/日/只(济南制药厂出品)，按每组需要不同分别制成 7.5mg/0.75ml 及 7.5mg/0.5ml。以出现“阳虚”症状为准，本实验均为实验第 13 天，进行各项指标的检测。

3. 助阳药淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim 和肉苁蓉 *Gistanche Salsa* G. Beck，均由上海药材公司供应。二味各取 50g，加水 1,000ml，煎 2 小时倒出头煎，加水 500ml 再煎，取一、二煎液混合浓缩为 100ml，即 1g/ml。

4. 耐冻实验：各组动物喂养到第 13 天，分别放入分格铁笼盛装，每格 1~2 只，同时放进摄氏零下 5~6°C 冰箱中，每隔 15 分钟观察一次，以小鼠触之无反应为“冻僵”时间，记录，比较其冻僵时间。

5. DNA 提取方法：(1) 提取粗制 DNA 按 Kay 氏法改良⁽³⁾。(2) DNA 纯化：按 Marmur 法⁽⁴⁾将粗制 DNA 溶于 0.1 SSC 液中(0.15M 氯化钠，0.015M 柠檬酸三钠 pH7.3) 加等体积氯仿-异戊醇(V=24:1)振荡 20 分钟，3,200 转/分，离心 30 分钟，精确记取上清液，用 95% 乙醇抽提，再分别用 75% 和 95% 乙醇洗涤，挤干，复溶于 10 倍体积的 SSC 液中(先加 9 倍 0.1 SSC 液，后加 1 倍 10×SSC 液，最终为 1×SSC 液)，置冰箱待测。

6. DNA 含量测定：用紫外分光光度法测定 DNA 含量。取 DNA 定溶液 1ml 加 5% 高氯酸 4ml 混匀，以 5% 高氯酸作空白管用 751 分光光度计测 OD_{260nm} 值。

7. ^3H -TdR 掺入法：实验第 13 天，每只小鼠处死前 1 小时腹腔内注射 ^3H -TdR 0.5ml(含 10 μCi 比活 24 Ci/mmol ，上海原子核所供应)，按上述方法提取 DNA，最后取 DNA 定溶液 0.2ml 加入 10ml 闪烁液(PPO 4g，POPOP 0.2g，二甲苯、乙二醇乙醚按 3:1 配制 1,000 ml) 用 TRI-CARB 460CD 型液体闪烁计数器测定其脉冲值，按每毫克 DNA 每分钟脉冲值计数。

结 果

1. 动物外观：喂饲羟基脲的小白鼠“阳虚”组于第 13 天均已出现活动迟缓、萎靡、蹒跚、体毛枯疏、皮肉懈松、尾巴发凉，个别小鼠呈片状脱毛等症状。而同时加用淫羊藿、肉苁蓉合剂的小白鼠基本没有上述症

状,与对照组一样体胖、毛润、动作灵活,二者形成明显对照。

2. 动物死亡率: 实验期各组动物均有部分死亡, 对照组 20 只、“阳虚”组 23 只、助阳药组 21 只, 各死亡 1、5、2 只, 死亡率分别为 5%、21%、9%。可见“阳虚”组比其他两组死亡率均高。

3. 体重变化: 实验前后各组动物平均体重比较如表 1。

表 1 各组动物体重变化(g/只)

	动物数	试验前	试验后	差数
对照组	19	27.0	33.5	+6.5
阳虚组	18	28.1	27.0	-1.1
助阳药组	19	27.4	32.8	+5.4

可见对照组和助阳药组有几乎同样的体重增加, 而“阳虚”组则体重减轻。

4. 耐冻实验: 各组动物一部分参加耐冻实验, 其结果如表 2。

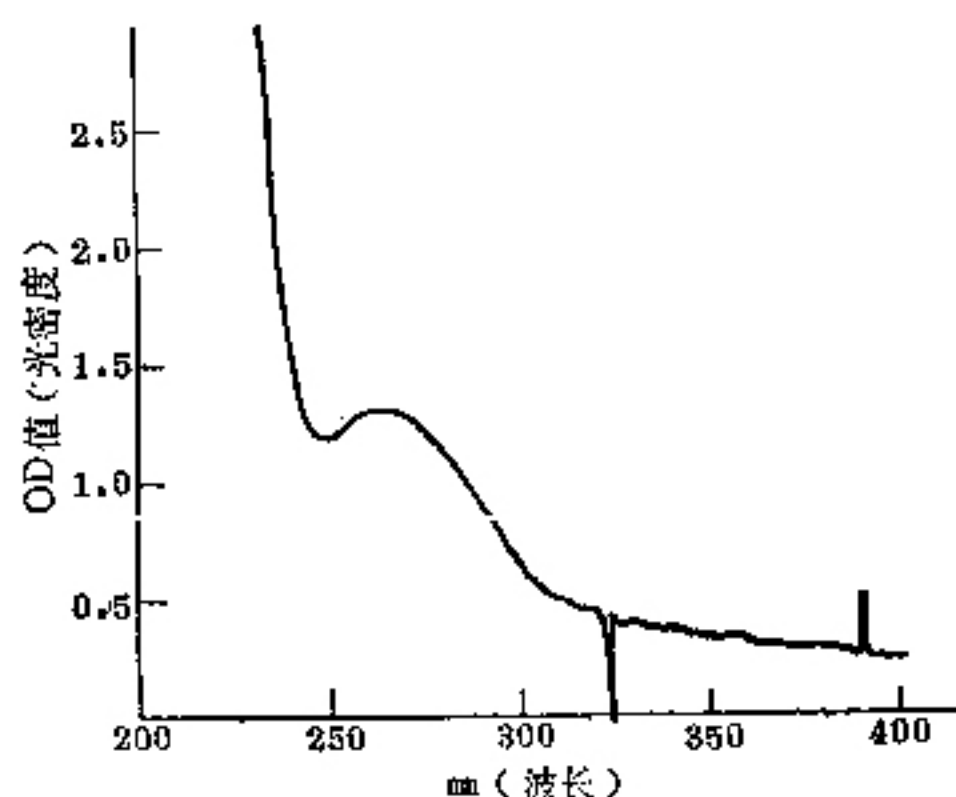
表 2 各组动物耐冻时间比较(M±SE)

	动物数	耐冻时间(分)
对照组	9	172.5±15.5
阳虚组	10	119.5±6.7*
助阳药组	10	206.0±12.3

* 与对照组比较 $P < 0.05$ ($df = 17$, $t = 2.398$)

淫羊藿、肉苁蓉温肾助阳药不但能纠正羟基脲所致“阳虚”动物的耐寒力, 甚至超过了正常对照组, 这与邝安堃等实验结果一致⁽⁵⁾。“阳虚”动物耐寒力明显低于对照组。

5. DNA 含量与鉴定: 对用本法提取 DNA 经用 SP8 100 型紫外分光光度计做吸收曲线鉴定如附图:



附图 用 SP8—100 型紫外分光光度计所测“阳虚”小鼠肝脾 DNA 吸收曲线, 在 260 nm 吸收值最大。

证明在 OD260nm 有最大吸收值, 无杂峰, 与小牛胸腺 DNA 曲线相似, 纯度合乎要求。另外, 所测得 DNA 含量对照组为 $192 \pm 28 \mu\text{g}$ (均值±标准误)/每克肝脾, 与国外文献比较接近⁽⁶⁾。

6. 肝脾 DNA 合成率: 用前述方法测定各组小鼠 ^3H -TdR 掺入 DNA 的合成率如表 3。

表 3 各组动物 DNA 合成率(M±SE)

	动物数	cpm/mg · DNA/分
对照组(N)	8	11,560±1,980
阳虚组(H)	8	5,600± 848*
助阳药组(Y)	9	9,900±1,660**

* N:H $P < 0.05$ ** N:Y $P > 0.05$

N:H $df = 14$ $t_{0.05} = 2.148$ $t = 2.546$ $P < 0.05$

Y:H $df = 15$ $t_{0.05} = 2.131$ $t = 2.194$ $P < 0.05$

可见“阳虚”组小鼠肝脾 DNA 合成率明显降低, 与助阳药组和对照组相比差别显著 (分别为 $P < 0.05$), 说明助阳药能显著提高“阳虚”小鼠 DNA 的合成率, 此结果 (对照组) 与大浦彦吉氏所作的人参提取物 (Prostisol) 同类工作中的对照组完全一致⁽⁷⁾。

讨 论

1. 关于“阳虚”病态动物: 阳虚研究中的动物模型, 沿用较多的是氢化考的松所致“阳虚”模型⁽⁵⁾, 对此国内存有争论。本文所报告的用羟基脲制造“阳虚”病态动物, 从实验结果可见体重减轻, 死亡率较高, 耐冻时间短, ^3H -TdR 掺入低, 虽然与对照组均有明显差异, 但其程度较之氢化考的松之“阳虚”已大为缓和⁽²⁾, 且“阳虚”病态形成慢, 治疗时间长, 这些似可模拟临床某些阳虚病态过程, 而某些人把模型误解为是临床“阳虚”的翻版, 这是不必要的, 也是不可能的。

2. 淫羊藿、肉苁蓉合剂的作用机制: 淫羊藿、肉苁蓉都是常用的助阳药, 具有补肝肾, 益精气, 补而不峻, 治疗“男子绝阳不兴, 女子绝阴不产”等作用⁽⁸⁾, 此二味在处方中常配合用, 可以加强疗效。而我们以前的工作发现, 它们都对氢化考的松所致“阳虚”小鼠下降之 DNA 合成率有提高作用, 但对正常动物却无此作用⁽⁹⁾。这种只有病态才有治疗作用, 中医理论叫“调节阴阳, 以平为期”, 淫羊藿、肉苁蓉对核酸代谢的作用正是这种理论的一个佐证。

羟基脲的作用环节主要是抑制核苷酸还原酶⁽¹⁰⁾, 而此酶的催化反应, 主要是将核苷二磷酸还原为脱氧核苷二磷酸, 即将胞苷二磷酸 (CDP), 尿苷二磷酸 (UDP)、鸟苷二磷酸 (GDP)、腺苷二磷酸 (ADP) 还原成

dCDP(d=脱氧,下同),dUDP、dGDP和dADP,这一步必须有核苷酸还原酶参与,随着DNA复制的开始,核糖核苷酸还原酶的活力上升(在组织培养的小鼠胚胎同步细胞内上升7倍),与此同时,脱氧胸苷激酶的活力也上升(约100倍),其结果是脱氧核苷酸增加,此过程仅在DNA复制期保持一定水平⁽¹⁾,因此可以认为淫羊藿、肉苁蓉合剂中可能含有一种激活核苷酸还原酶的生物活性因子,从而拮抗了羟基脲对核苷酸还原酶的抑制作用,保证了核苷酸还原成脱氧核苷酸,并促进TdR掺入DNA,最终促进DNA的生物合成。这可能是淫羊藿、肉苁蓉的一个主要作用机制。

3.多指标观察:本实验采用了多指标观察,在观察³H-TdR掺入DNA的合成率时,同时进行耐冻实验,记录体重、死亡率等生理指标,其中几项指标均有一定相关性,³H-TdR掺入值高,则体重增加,耐冻时间长,死亡率低;掺入值低,则恰恰相反,因此基本上可以排除诸如中药刺激胃纳等原因引起的作用,经过对小鼠血细胞的检验亦可排除因羟基脲对造血功能抑制而导致的血虚⁽²⁾。助阳药的功能可能是促进核酸的合成率,促进蛋白质的合成,调节细胞代谢,这可能是助阳药发挥作用的基础。

(本工作承蒙防护教研室郑秀龙教授、赵芳同志帮助,生化教研室储中录讲师审阅文章,同位素室潘文舟医师进行液

闪测定,一并致谢)

参 考 文 献

- 1.张家庆,等。“阳虚”动物脱氧核糖核酸合成率和助阳药作用的研究。中医杂志1982;23(3):64.
- 2.刘福春,等。用羟基脲制造“阳虚”动物模型的实验研究。参加中国中西医结合研究会首届学术交流会资料。第1版。上海:中西医结合研究会上海分会,1981:60—61.
- 3.Kay E, et al. The isolation of DNA from calf thymus. J Am Chem Soc 1952; 74: 1724.
4. Marmur J, et al. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol 1961; 3:208.
- 5.邝安堃,等。某些助阳药对于大剂量皮质素所致耗竭现象的影响。中华内科杂志1963; 11:113.
6. Johnson RM, et al. A relationship of vitamin E to nucleic acid metabolism. J Biol Chem 1951; 193: 743.
- 7.大浦彦吉,等。人参成份((Prostisol)の精制と骨髓細胞の生合成促进作用。和汉药シソポジウム1972; 6:42.
- 8.明.李时珍.本草纲目。12卷。第1版。北京:人民卫生出版社,1977:727—728.
- 9.张家庆,等。助阳药对“阳虚”动物脱氧核糖核酸合成率的作用。中医杂志1982; 23(9):61.
10. Adamg RLP, et al. Hydroxyurea. J Biol Chem 1967; 242: 1314.
- 11.哈贝尔斯基著,李宗岍译。核酸生化与功能。第1版。上海人民出版社,1981:119—120.

α -细辛醚抗癫痫作用动物实验及机理探讨(摘要)

无锡市卫生局职工医科大学药理教研组 赵士正

α -细辛醚(α -Asaron)系从石菖蒲(*Acorus gramineus* Soland)挥发油中分离所得。

动物实验:1.抗电惊厥试验:将体重18~22g小鼠70只分为7组,每组10只。一组为空白赋型剂对照组,另一组为苯妥英钠50mg/kg,其余5组分别为 α -细辛醚90、115、130、140和150mg/kg,均为腹腔注射,30分钟后均给予50Hz,12.5mA,220V、0.2''交流电刺激。实验结果: α -细辛醚具有抗电惊厥作用,至140mg/kg即能与50mg/kg苯妥英钠的抗惊厥作用相同。

2.抗戊四氮惊厥试验:将体重18~22g小鼠30只分为3组,每组10只,一组为空白赋型剂对照组,一组为苯妥英钠50mg/kg,另一组为 α -细辛醚140mg/kg,三组均为腹腔注射,30分钟后,再分别腹腔注射戊四氮38mg/kg。实验结果: α -细辛醚140mg/kg完全能对抗戊四氮38mg/kg所引起的抽搐。

3.抗家兔侧脑室给乙酰胆碱(以下称Ach)致惊厥试验:取体重2~3kg家兔30只,分为三组,每组10

只,固定,按常规头部消毒,局麻,于头顶正中切口40mm,暴露颅骨,于冠状缝左侧4mm处钻透颅骨,安装侧脑室给药插管,用牙托粉固定。然后三组动物分别于耳静脉注射 α -细辛醚140mg/kg、香兰素200mg/kg、生理盐水1ml/kg,5分钟后于侧脑室插管均给1 μ M Ach 20~30 μ l。实验结果: α -细辛醚140mg/kg能完全对抗侧脑室给Ach致惊厥大发作,香兰素则呈部分对抗作用。经统计学处理两者呈显著性差异($P<0.05$)。

上述实验表明 α -细辛醚具有抗电惊厥、戊四氮惊厥、侧脑室给Ach惊厥作用,提示 α -细辛醚可用于癫痫大发作,小发作的临床治疗。作者提出,石菖蒲中医主要用于痰浊证,天麻主要用于肝风证(香兰素为天麻有效成份类似物),是否中医认为的“痰浊”和体内Ach机能亢进有关?而 α -细辛醚则较适用于“痰浊”型癫痫的治疗。本人对90例癫痫大发作作用 α -细辛醚治疗观察,痰浊型与肝风型有效率分别为94.4%和66.6%($P<0.05$)。

Effects of Codonopsis Pilosulae-Astragalus Injection on the Cyclic Nucleotide Levels and the Phosphodiesterase Activity in Platelets

Chai Zhinan (柴枝楠), Liao Jiazhen (廖家楨), et al

Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing College of TCM, Beijing

It has been demonstrated that ADP-induced platelet aggregation in patients with coronary heart disease (CHD) was inhibited by Codonopsis Pilosulae-Astragalus Injection (CP-A), a drug of TCM for the treatment of CHD in our laboratory recently. In order to study the mechanism responsible for the effects of CP-A on platelets, the cAMP and cGMP levels in platelets in patients with CHD (N=15) were measured by radioimmunoassay method before and after a single dose of 60 ml CP-A (content of CP-A 30 gm each) intravenously, or 5% glucose 60 ml as control (N=9). The results showed that the cAMP and cGMP levels were increased by CP-A, from 20.89 ± 3.7 to 30.0 ± 3.0 PM/ 10^9 PLA ($P < 0.02$), 3.3 ± 1.0 to 5.4 ± 1.2 PM/ 10^9 PLA ($P < 0.05$). In the experiment in vitro (N=16), the cAMP and cGMP levels were also increased, but were not so in that of glucose control group. When the cAMP level in platelets is raised, many platelet functions are inhibited. The results of the present study suggest that CP-A inhibits the platelet aggregation by increasing the cAMP level in platelets. The activity of PDE in platelet was inhibited by CP-A, which is responsible for the increase of cyclic nucleotide levels.

(Original article on page 486)

The Effects of *Epimedium Sagittatum* and *Cistanche Deserticola* on DNA Synthesis in "Yang-Insufficiency" Animal model Induced by Hydroxyurea

Liu Fuchun (刘福春), Ding Guangxia (丁光霞), et al

Department of TCM, First Teaching Hospital, Second Military Medical College, Shanghai

The effects of Yang-invigorating drugs *Epimedium sagittatum* and *Cistanche deserticola* on "Yang-insufficiency" mice were studied with a new "Yang-insufficiency" animal model induced by hydroxyurea as an inhibitor of nucleotide reductase. The animal used were divided into three groups: (1) the normal control group (8 animals), (2) the "Yang-insufficiency" group (8 animals), (3) the group with "Yang-insufficiency" treated with *Epimedium sagittatum* and *Cistanche deserticola* (9 animals). The rates of DNA synthesis in the liver and spleen (cpm/mg of DNA/minute, $M \pm SE$) of the groups were found to be $11,560 \pm 1,980$, $5,600 \pm 848$ and $9,900 \pm 1,660$ respectively. This rate of the "Yang-insufficiency" group was significantly lowered ($P < 0.05$). It can be seen that *Epimedium sagittatum* and *Cistanche deserticola* can raise the rate of DNA synthesis of the "Yang-insufficiency" animals, and thus improve the conditions of the animals.

The "Yang-insufficiency" caused by hydroxyurea is believed to be due to inhibition of the activity of nucleotide reductase, which keeps four kinds of nucleotide at the diphosphate level, unable to be reduced to DNA, and thus leads to the reduction of DNA synthesis, bringing on disturbance in metabolism of protein and fat and symptoms of "Yang-insufficiency". *Epimedium sagittatum* and *Cistanche deserticola* might contain certain biotical active agent, which could activate nucleotide reductase, counteract the inhibiting hydroxyurea and keep normal metabolism of DNA in the body.

(Original Article on page 488)

Five Cases of Sporadic Encephalitis Treated with Nantong Snake-Root Tablets

Chen Zian (陈自安)

Neuropathy Section, Nantong Neuropathy and Psychiatry Hospital, Nantong, Jiangsu Province

The incidence of sporadic encephalitis in China has been rather high. It is usually treated with cortical hormone. This paper reports for the first time cases of sporadic encephalitis treated with Nantong Snake-Root Tablets, which are prepared by Ji Desheng, China's snake-bite doctor and expert, according to his secret prescription. All the cases were cured. The tablets began to work 3 to 6 days after administration. The patients were clinically healed 7 to 18 days after taking the medicine. Normal EEG was restored 7 to 14 days after medication. In all the five cases the tablets were administered orally, three times a day, ten tablets each time. No side-effects or remaining symptoms or signs were found when the patients were discharged from the hospital.

Compared with a group of fifty cases of the same disease treated with cortical hormone and symptomatic and palliative treatment, the cases treated with Nantong Snake-Root Tablets showed better results, with quicker and better effect, shorter course of treatment, no side-effects, less expenses and more convenience in remedy administration. As a new method to treat sporadic encephalitis, it serves a good example to integrate traditional Chinese and western medicine.

(Original article on page 492)