

四种“虚证”模型的建立及其与环核苷酸系统的关系

上海第二医学院基础部同位素实验室

夏宗勤 胡镇球* 胡雅凡 李伟毅 鲍为民 俞莺莺

上海第二医学院药理教研组

易宁育 余逸民** 姚渭珍 张怡萍

内容提要 用小鼠造成四种病理模型：甲状腺素型(体内甲状腺素过多)；他巴唑型(甲状腺功能抑制)；氢考 I 型(肾上腺皮质激素过多)；氢考 II 型(肾上腺皮质机能抑制)。以 β 激动剂造成血浆 cAMP 升高，以 M 胆碱激动剂造成血浆 cGMP 升高，并以助阳药(附子、肉桂)，滋阴药(生地、龟板)作实验性治疗。结果表明，甲状腺素型及氢考 I 型 cAMP 系统反应性升高，滋阴药使之改善，他巴唑型及氢考 II 型 cGMP 系统反应性升高或 cAMP 反应性降低，助阳药使之改善。故初步认为前两种属“阴虚”模型，后两种属“阳虚”模型。

近年来，在用现代科学技术探讨中医基本理论的工作中，“虚证”，特别是阴虚和阳虚的本质是颇受注意的一个方面。我们曾对几种疾病的患者进行观察，发现阴虚时血浆 cAMP 升高，即 cAMP 占优势，阳虚时 cAMP/cGMP 比值下降，即 cGMP 占优势⁽¹⁾。其他学者对某些疾病的研究有类似结果⁽²⁾。为此，我们模拟临床常见的几种虚证病人，制造了四种病理模型，尝试用药物治疗反证的办法分析每种模型属于何种“虚证”，并观察各种模型用中药处理前后，其 cAMP 系统和 cGMP 系统对 β -肾上腺素能或 M-胆碱能激动剂的反应性。此种观察指标比单纯作 cAMP 或 cGMP 的定量灵敏，而且有可能对疾病时或药物作用下变化的环节提供进一步的信息。

方 法

一、动物模型：本院繁殖的 CFW 系小鼠，或杂种窝小鼠配对分组，雌性，7~8 周龄开始造型，采用的方法为：(1)甲状腺素型：每日皮下注射 L-甲状腺素钠盐 0.4mg/鼠，共 4~5 天；(2)他巴唑型：用 0.03% 他巴唑水溶液代替饮水，共 2~3 个月；(3)糖皮质激素过多型(以下简称氢考 I 型)：每日后肢肌肉注射醋酸氢化考的松 1.25mg/鼠，共 4 天；(4)肾上腺皮质功能抑制型(以下简称氢考 II 型)：每日后肢肌肉注射醋酸氢化考的松 1.25mg/鼠，连续 9 天后停药 72 小时。

* 江西医学院进修教师。

** 药理教研组研究生。

二、中药：附子、肉桂、生地、龟板、仙灵脾、肉苁蓉，全部由上海市药材公司按科研规格挑选，一次供应。分别按中医传统方法水煎制成附子肉桂合剂及生地或生地龟板合剂，浓缩至每 ml 相当于生药 1g。用灌胃法给药，每次 0.6~1.0ml/鼠(视体重而定)。甲状腺素型及氢考 I 型于造型前一天起每天给药一次，他巴唑型在造型成功(耗氧率降低)后每天给药一次，10~14 天后进行实验；氢考 II 型在停止注射氢考后每天给药 2 次，共喂药 3 天。对照动物每天同时灌水。

三、环核苷酸测定方法：小鼠断头放血，EDTA 抗凝并分出血浆。cAMP 用蛋白激酶放射竞争分析法⁽³⁾，cGMP 用放射免疫分析法^(5,6)测定。³H 放射性测定用 YSJ-76 型自动液体闪烁计数器测量，测量的相对标准误差控制在 $\pm 5\%$ 内，复管差异超过 20% 者舍弃。

四、激动剂的应用⁽³⁾： β -肾上腺素能激动剂采用异丙基肾上腺素(以下简称异丙)，实验前一次皮下注射每克体重 0.09~0.20 μ g(各批实验具体剂量见结果部分)。预初实验表明，注射异丙后 5~15 分钟血浆 cAMP 为高峰，随即逐渐下降(图 1)，故以下实验均在注射异丙后 10 分钟断头采血，以反映 cAMP 系统对异丙刺激的反应强度。

M-胆碱能激动剂采用氮甲酰胆碱(以下简称氮甲)，实验前一次皮下注射 0.20~0.40 μ g/g 体重(各批实验具体剂量见结果部分)。预初实验表明，注射后 5~10 分钟血浆 cGMP 为高峰(图 2)，故正式实验均在 6 分钟时断头采血测血浆 cGMP。

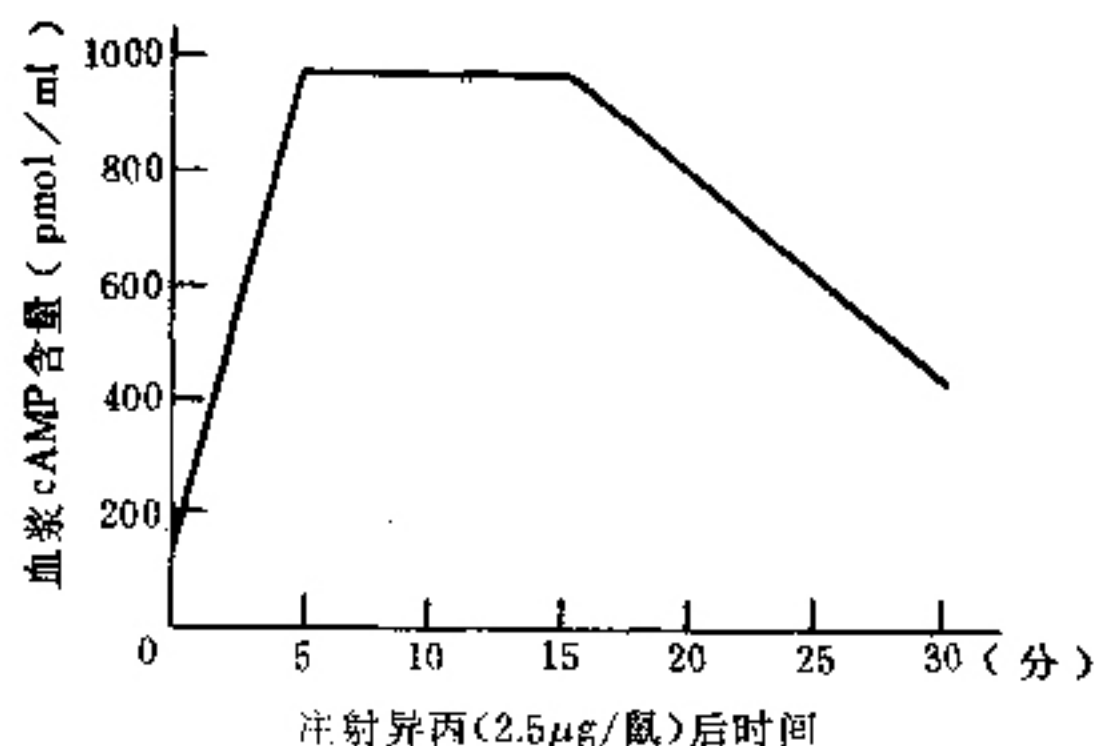


图1 小鼠一次皮下注射异丙后血浆cAMP含量的时相变化, 每次实验12只小鼠分四个时相点, 图中数据为6次实验的均值。

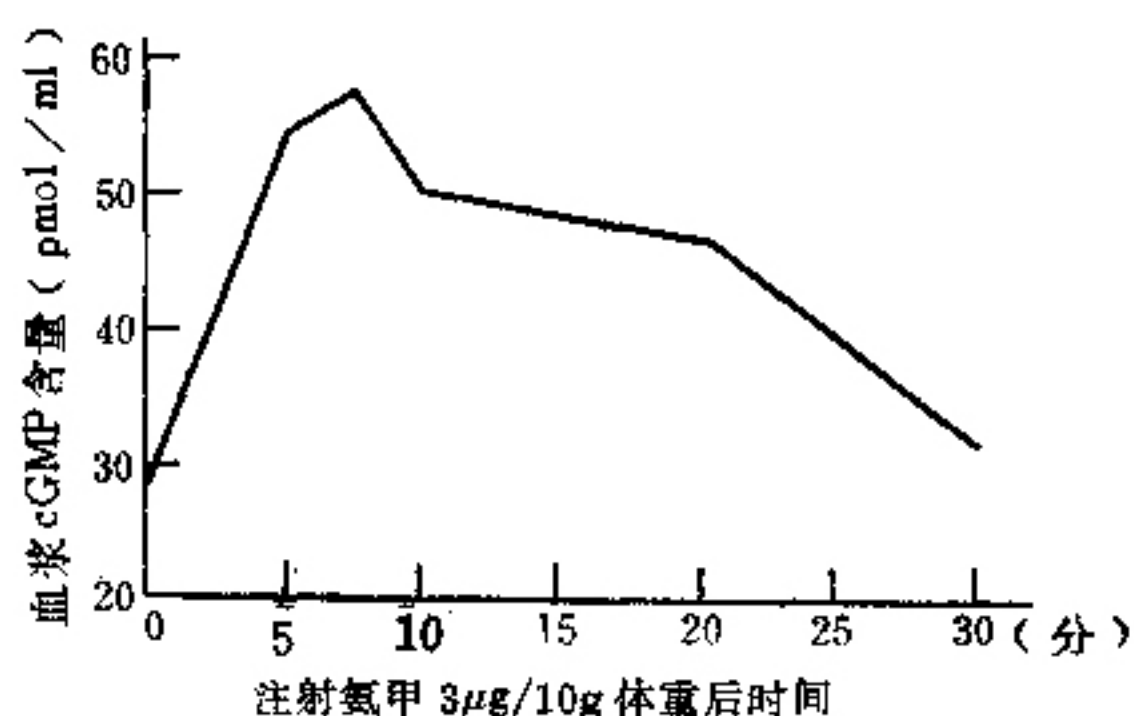


图2 小鼠一次皮下注射氨甲后血浆cGMP的时相变化。每点为3只小鼠的均值。

实验结果

一、甲状腺素模型: 在耗氧率增加的同时, 注射异丙后血浆cAMP峰值明显高于正常动物。同时喂服附子肉桂者其耗氧率进一步升高, 注射异丙后的cAMP升高也更显著。生地的作用相反, 耗氧率降低, 异丙所致血浆cAMP的升高低于不服药的模型(图3及表1)。

表1 甲状腺素型模型注射异丙后血浆cAMP的峰值

实验组别		异丙剂量 μg/g 体重	对照组 血浆cAMP 峰值 pmol/ml	处理组 血浆cAMP 峰值 pmol/ml	测验 结果
对照	处理				
正常	模型	0.09	384±86* (10)	630±134 (11)	p<0.001
模型	模型+桂附	0.09	725±161 (23)	979±308 (19)	p<0.01
模型	模型+生地	0.09	596±156 (23)	489±109 (22)	p<0.001

* 为M±SD, 括号内为动物数, 以下各表同

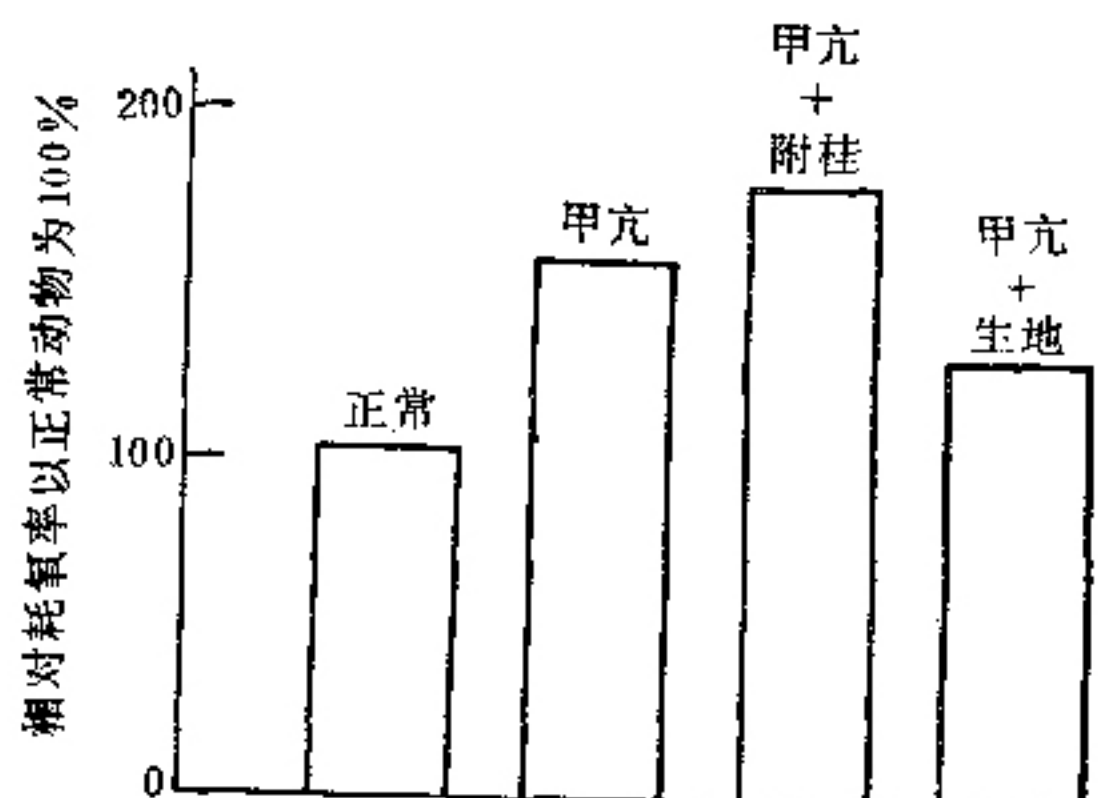


图3 甲状腺素型动物的耗氧率及不同中药的影响。(耗氧率在动物处死前一天测定, 每组6~10只小鼠在密闭代谢笼中用水置换法求出一定时间的耗氧量, 再算成O₂ml/24h/g体重)

同样的甲状腺素模型注射氨甲后血浆cGMP峰值与正常动物无显著差异, 服用附桂合剂或生龟合剂也无明显变化。

二、他巴唑模型: 小鼠连续口服他巴唑2~3个月后耗氧率明显降低, 注射氨甲后血浆cGMP峰值明显高于正常, 但在本文所用实验条件下, 注射异丙后血浆cAMP峰值与正常动物无差别。给此类模型喂服附子肉桂后耗氧率升高, 注射氨甲后血浆cGMP峰值降低。生地龟板作用相反, 耗氧率无明显改变, cGMP峰值则比不用药的模型更高(图4、表2)。

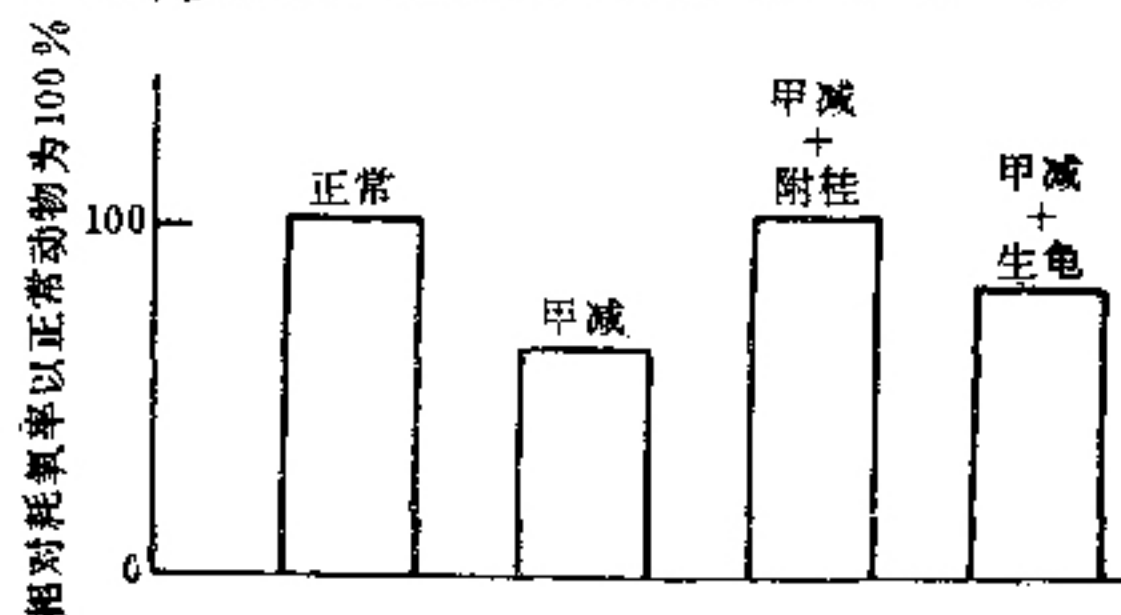


图4 他巴唑型模型的耗氧率变化以及不同中药的影响(耗氧率测定方法同图3)

表2 他巴唑型模型注射氨甲后血浆cGMP的峰值

实验组别		氨甲剂量 μg/g 体重	对照组 血浆cGMP 峰值 pmol/ml	处理组 血浆cGMP 峰值 pmol/ml	测验 结果
对照	处理				
正常	甲减	0.29	95±29 (17)	145±61 (15)	p<0.01
甲减	甲减+附桂	0.36	185±40 (20)	158±32 (20)	p<0.05
甲减	甲减+生龟	0.36	185±40 (20)	240±93 (16)	p<0.05

三、氢考 I 型及氢考 II 型模型：氢考 I 型动物注射异丙的结果与甲状腺素模型相似，其血浆 cAMP 峰值明显高于正常，喂服生龟合剂使峰值降低。氢考 II 型相反，注射异丙后血浆中 cAMP 含量的升高低于正常动物，附桂合剂能使之明显提高(表 3)。

表3 氢考 I 型及氢考 II 型模型注射异丙后血浆 cAMP 峰值的实验数据

实验组别		异丙剂量 μg/g 体重	对照组 血浆 cAMP 峰值 pmol/ml	处理组 血浆 cAMP 峰值 pmol/ml	t 测验 结果
对照	处 理				
正常	氢考 I	0.09	364±100 (39)	653±254 (39)	p<0.001
正常	氢考 II	0.09	382±101 (20)	301±117 (20)	p<0.05
氢考 I	氢考 I + 生龟	0.20	1245±240 (13)	1011±183 (16)	p<0.01
氢考 II	氢考 II + 附桂	0.09	334±202 (23)	698±353 (26)	p<0.001

讨 论

一、中医理论研究需要可靠的病理模型，对小动物通过望闻问切进行辨证实际上有困难，比较可行的办法是药物反证法，即用不同药物进行治疗，根据有无疗效及是否恶化来进行诊断分型。反证的结果还应与临床规律基本相符。本文四种模型中，甲状腺素型及氢考 I 型用滋阴药后指标有改善，助阳药反使之恶化，提示此二种模型属“阴虚”范畴。临床上绝大多数甲亢病人都有阴虚证候，长期服用皮质激素及肾上腺皮质机能亢进者也大多数有明显的阴虚证候。他巴唑型及氢考 II 型则相反，用助阳药后指标改善，滋阴药则使之恶化，提示此二种模型属“阳虚”范畴。这和临床上甲减病人多属阳虚，皮质激素停药综合征及肾上腺皮质机能低下者也多辨证为阳虚，也是相符的。因此，可以认为这四种模型分别属于“阴虚”、“阳虚”而作为研究“虚证”的一种工具。

二、本文观察的指标，是用外源性 β 激动剂或 M 激动剂引起的 cAMP 或 cGMP 升高，升高的幅度很大。病理动物或药物作用下发生的变化幅度也很大，远远超过不用激动剂时可能发生的变化幅度（例如同样的他巴唑模型，不用 M 激动剂时 cGMP 平均升高 26 pmol/ml，而用激动剂时平均升高约 60 pmol/ml）。因此，实验结果强烈提示，上述四种模型环核苷酸系统的变化不是继发于整体调节机制的变化，而是细胞对相应激动剂的反应发生了变化，而有关中药的作用则可能是由于改变细胞的反应性。上述看法从中医中药的研

究中虽还没有直接证据，但从现代西医的研究中可以找到一些实验材料支持这种看法。例如，甲亢时体内儿茶酚胺可以不增加，却表现出一系列 β-肾上腺素能刺激的症状⁽⁷⁾；大鼠注射甲状腺激素可使心肌 β 受体数增加⁽⁸⁾；甲减时可出现脂肪细胞对儿茶酚胺的反应性降低，β 受体数也减少⁽⁹⁾。现有资料并不说明所有疾病时的“阴虚”、“阳虚”都是由于细胞反应性的改变，但是沿着这一方向深入研究对阐明某些疾病时“阴虚”、“阳虚”的机制，及阐明助阳药、滋阴药的作用机制，很可能是有帮助的。

参 考 文 献

1. 夏宗勤, 等. 中医“虚证”理论的初步探讨(阴虚和阳虚病人血浆环核苷酸含量变化的比较). 中医杂志 1979; 11:2.
2. 邱安堃, 等. 阳虚(甲状腺功能减退)和阴虚(甲状腺功能亢进)病人血浆环核苷酸的对比. 中医杂志 1979; 7:21.
3. Michio Ui et al. An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small volumes of Plasma and tissues. In: P. Hamet, H. Sands, Advances in Cyclic Nucleotide Research, Vol. 12, Raven Press, New York, 1980:25.
4. 中国科学院生化研究所, 等. 饱和分析法测定 3', 5'-环-磷酸腺苷(cAMP). 生物化学和生物物理学报 1976; 8: 169.
5. 戴腾昌, 等. 环-磷酸鸟苷(cGMP)抗原抗体制备及放射免疫分析法的建立. 核技术 1981; 3:27.
6. 夏宗勤, 等. 高比度氚标记琥珀酰环-磷酸鸟苷(³H-S cGMP)的制备及其在环-磷酸鸟苷(cGMP)放射免疫分析法中的应用. 中华核医学杂志 1982; 2(2):91.
7. Hoffman B B, et al. Radioligand binding studies of adrenergic receptors: New insights into molecular and physiological regulation. Ann. Rev. Pharmacology Toxicology, 1980; 20:581.
8. Jacobson B, et al. Beta-adrenergic receptors in human fat cells -characterization and studies in altered thyroid status. In: P. Hamet, H. Sands, Advances in Cyclic Nucleotides Research, Vol. 12, Raven Press, New York, 1980:424.
9. Grossman B, et al. Effects of beta blockade on the peripheral manifestations of thyrotoxicosis. Ann. Intern. Med. 1971; 74:875.

CFU-D growth could be enhanced by 9 of the 12 drugs of the 6 pairs when they were further assayed separately. The majority of the 6 pairs or 9 single drugs have the property of tonifying the kidney. The results of our observation further support the belief that kidney tonics are effective in treating aplastic anemia.

(Original article on page 533)

Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae on Calcium Deposition in Experimental Fracture Healing

Zhang Juying (张菊英), Liu Jilan (刘季兰), Chai Benfu (柴本甫)

Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai

⁴⁵Ca deposition in the femur and tibia of normal mice and the effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on ⁴⁵Ca deposition following fracture of the right middle femur were studied in three groups of mice, totalling 54 in number.

1. Normal group: The upper, middle and lower thirds of the left and right femora showed identical calcium deposition rates with highest value in the lower thirds. The calcium deposition rate was highest in the upper third of the tibia.

2. Fracture-saline group: Following standardized fracture of the right middle femur, deposition of calcium in the middle third increased considerably throughout the experiment (5, 7, 9, 13 post-fracture days) and showed high statistical significance as compared with the corresponding values in the normal group. This shows that in keeping with the new bone formation in the fracture region, there was massive deposition of calcium salts. On the contrary, the calcium deposition in the upper and lower thirds of the femur and in the tibia decreased significantly as compared with the corresponding values in the normal group. This shows that the bone tissue adjoining the fracture region provided calcium to meet the increased demand in the callus formation through a decrease in deposition or an increase in absorption of calcium.

3. Fracture-Radix Salviae Miltiorrhizae group. Following the fracture of the right middle femur and the administration of Radix Salviae Miltiorrhizae, the increase in calcium deposition of the middle third of the right femur continued, while the decrease in calcium deposition in the upper and middle thirds of the right femur and in the tibia was aggravated. This clearly manifests that Radix Salviae Miltiorrhizae could transfer more calcium from the bone tissue adjoining the fracture region than it did in the saline group, so as to meet the increased need of calcium for the callus. Thus fracture healing could be expedited.

(Original article on page 536)

Experimental Investigation of the Effect of Dried and Prepared Notoginseng on the Serum Lipids

Chen Guozhen (陈国珍), Li Yunshan (李运珊), et al

Kunming Medical College, Kunming

Notoginseng (Pseudoginseng) is one of the best Chinese drugs. It is used as hemostatic and anodyne, for eliminating blood stasis and reducing swelling. We studied the effect of dried and prepared notoginseng on the serum lipids, and have found that they differ a great deal in this respect. Prepared Notoginseng, or Notoginseng treated with high temperature, was found to be able to raise serum cholesterol, triglyceride and β -lipoprotein levels of rats fed on high cholesterol and high fat diet, while dried raw Notoginseng able to inhibit the increase of lipids levels to some extent. Notoginseng, therefore, is not a good hypolipidemic.

(Original article on page 540)

The Changes of Cyclic AMP System and Cyclic GMP System Studied with Four Types of Animal Models

Xia Zongqin (夏宗勤), Yi Ningyu (易宁育), Yu Yimin (余逸明), et al

Isotope Laboratory and Department of Pharmacology, Shanghai Second Medical College, Shanghai

Four types of animal pathological models were established in mice and used in the study of the role of cyclic nucleotides in "Deficiency syndromes" of traditional Chinese medicine.

In thyroxin model (produced by subcutaneous injection of L-thyroxin) the peak value of plasma cAMP induced by isoproterenol was significantly higher than that of normal mice, and was further elevated by oral administration of decoction I (Radix Aconitin Preparata+Cortex Cinnamomi), but was depressed by decoction II (Radix Rehmanniae) and decoction III (Radix Rehmanniae+Plastrum Testudinis). In tapazol model (produced by administration of tapazol in drinking water), the peak value of cGMP after injecting carbachol was higher than normal. Decoction I decreased this value while decoction III increased it.

Two types of hydrocortisone models were also used. In type I (produced by intramuscular injection of hydrocortisone), there was a change of cAMP system similar to that observed in thyroxin model, together with similar responses to decoction I and III. In type II (produced by withdrawal of hydrocortisone after continuous administration of the drug) the plasma cAMP peak after injecting isoproterenol was lower than