

寒体与热体的实验研究(II)*

——寒体与热体大鼠淋巴细胞体外增殖及DNA损伤后复制能力的比较观察

上海中医学院(上海 200032)

丁锦发 钱汝红 匡调元** 张伟荣 沈雁 李伯勤 应馨萍 肖颐 张俊

内容提要 从Wistar大鼠的自然群体中筛选出热体、寒体与常体大鼠,作为研究对象。用动物的外周血和脾脏作材料,通过细胞体外培养、紫外线损伤、同位素掺入及液闪测定等方法,观察比较各组大鼠脾淋巴细胞的体外增殖能力,外周淋巴细胞DNA损伤后的复制合成能力。结果表明,在此两项实验指标中,热体大鼠比寒体大鼠具有更高的水平,而常体大鼠居中。因而从一个方面证实了《灵枢》所称“其身多热者易已;多寒者,难已”的科学性。

关键词 体质 热体 寒体 DNA 复制合成 细胞增殖

中医学自《内经》以来,曾从各种不同角度对体质问题作过比较深刻的独特的论述。近年来,有人发表了“体质病理学研究”⁽¹⁾,对中医体质学说作了比较系统的论述,并强调指出,“得病后之恢复难易也与体质有关”。但此说并未获得现代科学实验的证明。我们以此为线索,研究了热体大鼠与寒体大鼠在外周淋巴细胞DNA损伤后的复制合成能力及脾淋巴细胞体外增殖能力方面的差异,结果报告如下。

材料与方 法

一、动物来源:Wistar雄性大鼠由上海医科大学放射医学研究所提供,体重300g左右,用WMY-01型数字温度计测量动物后肢腋心表面温度方法⁽²⁾,从自然群体中筛选出寒体、热体与常体大鼠。其中寒体者后肢腋心表面温度较自然群体的平均温度低1°C以下,热体者较自然群体的平均温度高1°C以上,常体者相当于自然群体平均温度,上下不超过0.2°C,每组各筛选出动物7只。

二、大鼠外周淋巴细胞DNA经紫外线(UV)损伤后复制合成能力的测定:动物经乌拉坦轻度麻醉后,以无菌操作从主动脉取血(肝素抗凝)。每只大鼠取血0.5ml,混入5ml的培养液(内含小牛血清20%,ConA10μg/ml,青霉素100u/ml,链霉素100μg/ml,VitB₁₂0.5mg/ml)。将上述细胞悬液1ml置于φ32mm小培养皿中,共4皿,其中3皿用UV作定量照射,以损伤淋巴细胞的DNA,所用紫外线剂量分别为

200erg/mm², 900erg/mm²和3600erg/mm²。另1只小培养皿作对照,不经紫外线照射。在所有小培养皿中加入氚标记的胸腺嘧啶核苷(³H-TdR,上海原子核研究所生产,比活度23ci/mM),终浓度5μci/ml。摇匀后放入37°C的CO₂培养箱培养72小时。用常规方法进行细胞收集与每分闪烁值(cpm)测定⁽³⁾。经紫外线照射后各样品的cpm值除以未经照射对照样品的cpm所得之值,即为该样品在定量紫外线损伤后细胞DNA的复制合成水平。所有数据经t检验统计。

三、大鼠脾淋巴细胞体外增殖能力的测定:无菌操作取得大鼠脾脏,去筋膜,用小号注射器芯在100目消毒尼龙网上研磨,滤得脾淋巴细胞,经Hank's液洗涤二次,计数后用含有20%小牛血清、4μg/ml ConA、2mM谷氨酰胺、适量青霉素及链霉素的RPMI 1640培养液配制成4×10⁶/ml浓度的细胞悬液。将细胞悬液注入3块96孔细胞培养板,每只动物在每块培养板上注3孔(其中复孔2只),每孔注入0.3ml。同时在每孔中加入³H-TdR,终浓度5μci/ml。3块培养板在37°C的CO₂培养箱中分别放置1天、3天、6天。培养结束后的细胞收集与cpm测定方法同上。

结 果

一、不同剂量紫外线照射后三种大鼠³H-TdR掺入指数的比较:如表1所示,经紫外线损伤培养3天后常体、热体与寒体大鼠淋巴细胞DNA的³H-TdR掺入量均比不经紫外线照射的对照组下降,随着紫外线剂量增高,淋巴细胞的³H-TdR掺入量下降加剧。同时发现,在中等剂量与高等剂量紫外线照射下,热体大鼠

*国家自然科学基金资助课题; **课题负责人

外周淋巴细胞DNA的 ^3H -TdR掺入量下降水平,要比寒体者小,这表明,热体大鼠淋巴细胞DNA在受紫外线损伤后有较高的复制合成能力,而寒体大鼠的复制合成能力相对较小,两者差异显著。但在低剂量紫外线损伤下,热体与寒体淋巴细胞的 ^3H -TdR掺入量没有显著差异。

表1 经不同剂量UV(erg/mm²)损伤后大鼠 ^3H -TdR掺入指数比较 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

组别	^3H -TdR掺入指数		
	200	900	3600
常体	0.89 $\pm$ 0.17	0.49 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.07
热体	0.86 $\pm$ 0.07**	0.71 $\pm$ 0.08*	0.52 $\pm$ 0.09*
寒体	0.84 $\pm$ 0.12	0.44 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.07

注:每组动物数均为7,下表同;与寒体相比,

** $P > 0.05$, * $P < 0.05$

二、体外培养不同天数后三种大鼠 ^3H -TdR掺入量比较:如表2所示,在大鼠脾淋巴细胞的体外培养中,第1天时 ^3H -TdR的掺入较少,第3天时掺入达到高峰,第6天时的掺入则又下降。与寒体大鼠比较,热体大鼠脾淋巴细胞有更高的 ^3H -TdR掺入,两组差异显著。常体大鼠脾淋巴细胞的 ^3H -TdR掺入水平居中,即低于热体者而高于寒体者。

表2 体外培养不同天数后大鼠 ^3H -TdR掺入量比较 (cpm, $\bar{x} \pm S\bar{x}$)

组别	^3H -TdR掺入量		
	1天	3天	6天
常体	9382 $\pm$ 1776	109228 $\pm$ 13476	32790 $\pm$ 893
热体	10781 $\pm$ 2256*	134282 $\pm$ 21058 Δ	37657 $\pm$ 7646 $\Delta\Delta$
寒体	5357 $\pm$ 817	48156 $\pm$ 11344	26021 $\pm$ 3077

注:与寒体比较, * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.02$

讨 论

在大鼠外周血体外培养中,由于加入了分裂素ConA,促使淋巴细胞母细胞化,进入增殖阶段,而其他颗粒白细胞因均属终末分化细胞,不会进入增殖期,也不会有DNA修复发生⁽⁴⁾,因此本实验经液闪仪测得之cpm值为外周淋巴细胞中 ^3H -TdR的掺入水平,它反映了外周淋巴细胞DNA的复制合成水平。在未经紫外线损伤的样品中,培养3天后淋巴细胞经过增殖, ^3H -TdR大量掺入DNA的复制合成,因此测得cpm值较高。而经紫外线损伤的样品,因淋巴细胞DNA受到损伤,产生许多胸腺嘧啶二聚体,其中一

些细胞因不能修复损伤的DNA或修复能力较差,丧失了复制合成能力,不进入增殖阶段;另一些细胞则因对损伤的DNA具有一定修复能力,能进行DNA复制,细胞进入增殖阶段。由于经紫外线损伤的细胞其复制能力总体来讲比未经紫外线损伤的细胞差,所以 ^3H -TdR掺入DNA合成较少,测得之cpm值较低。从表1可以看出,当紫外线照射剂量较小时,淋巴细胞受损较少,各组动物的复制情况相差不大,因此测得cpm值较接近未经紫外线损伤样品,热体与寒体动物没有明显差异。当紫外线剂量增高时,细胞受损较甚,复制情况较差,测得cpm值较小,远离未经紫外线照射样品。比较热体动物与寒体动物,发现在紫外线剂量增高时,寒体者之cpm值下降更甚,两者差异显著。这可能提示:寒体大鼠外周淋巴细胞DNA更易受到紫外线损伤或损伤后的修复能力较差,进而影响了细胞增殖能力;而热体大鼠的外周淋巴细胞DNA可能受损较少,或虽遭同样损伤但有较强的修复能力,因而有较多细胞进入增殖, ^3H -TdR掺入相对较多,cpm值相对较高。本实验中该指标在常体与寒体中并无显著差异,其原因尚待进一步探讨。

分裂素ConA能使脾淋巴细胞在体外培养中进入旺盛的增殖状态⁽⁵⁾,本实验在培养的第3天达到增殖高潮,因为在这一天收集的细胞中所测得的cpm值最高,而后者是反映 ^3H -TdR掺入DNA复制情况,进而反映细胞增殖状态的⁽⁶⁾。在培养的第6天,cpm值陡然下降,这可能是由于培养基的限制。有限容积的培养液已不能满足大量增殖细胞的继续生长需要,使许多细胞得不到起码的营养而死亡,一些原已掺入到淋巴细胞DNA的 ^3H -TdR,随着细胞的解体而在细胞收集时被大量蒸馏水冲洗,与其他游离状态 ^3H -TdR一起通过滤膜孔,所以最后测得留在细胞核DNA上的 ^3H -TdR掺入数变小,cpm值下降。但如比较体质不同的动物,发现热体大鼠脾淋巴细胞的体外增殖曲线图位于寒体者之上,即在相同培养时间内热体大鼠有较高的cpm值,寒体动物只有较低的cpm值,而常体动物居中。在培养1天后,热体大鼠与寒体大鼠的cpm比值为2.01,3天后两者的比值为2.79,6天后的比值是1.45,且数据统计差异显著。这说明,热体大鼠脾淋巴细胞的体外增殖水平高于寒体大鼠。同时从表2中还可发现,热体大鼠脾淋巴细胞培养3天后的cpm值是培养1天后cpm值的12.5倍,而寒体大鼠培养3天后的cpm值是培养1天后的8.9倍,表明热体大鼠脾淋巴细胞在体外增殖的速率也比寒体者高。

中医学认为,体质可有热体、寒体之分。《灵

枢·痛论》早有“同时而伤，其身多热者，易已；多寒者，难已”的论断⁽⁷⁾。匡氏也提出了“得病后之恢复难易与体质有关”⁽¹⁾之说。从现代细胞生物学观点看，细胞代谢需要有不断的能量供应，以满足其在生长、分裂、分化、传导与修复过程中对各种类型能量的消耗⁽⁸⁾。显然，热体动物细胞的能量供应优于寒体动物，因此热体动物细胞的生长能力与受损伤后的修复能力当高于寒体者，这是客观规律。本实验显示热体动物脾淋巴细胞的体外增殖能力与外周淋巴细胞DNA受损后的复制合成能力均高于寒体动物，这从一个方面证实了《灵枢》论断的科学性，也为匡氏之说提供了实验根据。

参 考 文 献

1. 盛调元. 体质病理学研究. 成都中医学院学报 1978; 2:

- 3.
2. 张伟荣, 等. 寒体与热体的实验研究(1). 中西医结合杂志 1991; 11(8).
3. 丁耀发, 等. 还精煎对机体DNA损伤修复能力的影响. 中西医结合杂志 1989; 9(11):647.
4. Ringborg V, et al. Ultraviolet-induced DNA repair synthesis lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukemia. Cancer Lett 1977; 3:31.
5. Licastro F, et al. Modulatory effect of nicotinamide on unscheduled DNA synthesis in lymphocytes from young and old mice. Mech, Age Develop 1986; 35:123.
6. 张明伟, 等. 测定粒单系集落刺激因子的³H-TdR掺入的微量培养法. 细胞生物学杂志 1988; 10(3):130.
7. 陈璧疏, 等. 灵枢经白话解. 北京: 人民卫生出版社, 1962:382.
8. 安布罗斯 EJ, 等. 细胞生物学. 上海实验生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1977:13.

130例医源性疾病的病因分析

中国中医研究院西苑医院(北京 100091) 邢哲斌

在防治疾病过程中, 由于某种因素, 又引起了新的疾病, 或加重了原患疾病, 或招致死亡, 这些均属医源性疾病。本文就作者近十多年来在临床中诊疗观察的130例医源性疾病, 加以重点分析。

资料来源 130例中有117例是在本院诊疗中积累的, 其余13例是在业余诊疗中收集的。其中男性58例, 女性72例, 年龄最小2岁, 最大72岁。

病因分类及数量分布 根据致病原因和发病环节, 将130例医源性疾病分为15类, 其中: 药物性者42例, 占32.3%; 误诊误治性者25例, 占19.23%; 手术性者11例, 占8.46%; 气功性者9例, 占6.9%; 自医性者7例, 占5.38%; 防病及注射输液性者各6例, 各占4.62%; 推拿及精神性者各5例, 各占3.85%; 责任性者4例, 占3.08%; 化放疗性者3例, 占2.31%; 诊断措施、院内感染及器材性者各2例, 各占1.54%; 输血性者1例, 占0.77%。说明医源性疾病可由诊疗中的任何因素引起, 也可发生在诊疗过程中的任何环节。

数量分布, 以药物、误诊误治、手术、气功及自医等引起者为多, 共占总数的72.3%, 提示它们是医源性疾病的多发因素。

重点分析

一、药物致病: 药物性医源病于本文居首位, 表明

滥用药物是严重的。在42例病例中, 西药引起者34例, 中药引起者8例, 前者为后者的4倍多, 说明西药用的较中药多, 西药较中药毒副反应大。而在西药所致病例中, 抗生素引起者20例, 激素引起者5例, 共为西药所致病例的73.52%。上述事实提示医者用药要合理, 对抗生素和激素等的应用更要谨慎。

二、气功致病: 气功性医源病于本文有9例, 居第四位。其中有精神障碍3例、心率紊乱1例、失眠2例、肢体乱动3例。气功性医源病如此之多, 与近年来社会上掀起的“气功热”、气功流派多、练功不当、气功防治疾病尚无规范及少数人借此搞迷信有关。因此, 对气功防治疾病, 应认真研究, 加以规范, 推出简便易行、效果好、偏差少的功法。并加强正确宣传和取缔非法活动。

三、中西医致病比较: 在130例15类医源性疾病中, 西医引起者97例13类, 中医引起者33例8类, 在已知死亡的10例患者中, 西医引起者9例, 中医引起者1例。充分说明, 西医引起的医源性疾病, 比中医数量大、种类多、危害重。其差别原因是: 西医的诊疗机构广、手段多及西药毒副反应大; 中医在《内经》“治未病”的思想指导下, 从理论到实践形成了重视防治医源性疾病的医学体系, 如中医配方中的“佐”药, 可以抵消“君臣”药的毒副作用, 以防医源性疾病发生。

Prevention and Treatment of Isoproterenol Induced Ventricular Fibrillation in Rats

by Aqueous Extract of *Salvia miltiorrhiza*

Cheng Yeuk-yuen(郑若玄), Fong Sam-man(方三曼), Hon Po-min(韩宝铭),

Lee Chi-ming(李志明), Chang Hson-mou(张雄谋)

Chinese Medicinal Material Research Centre, the Chinese University of Hong Kong

Acute fatal ventricular fibrillation (VF) in male Sprague-Dawley rats was induced by subcutaneous injection of isoproterenol (1 mg or 5 mg/kg body weight) to two groups of rats of different body weights (525 ± 21 g or 387 ± 11 g) respectively. VF occurred in all control rats resulting in 96% death with only 4% spontaneously reverted and survived. Pretreatment of animals, with or without pentobarbital anaesthesia, with an aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* (SM-H, i. p., 5 g herb/kg body weight) significantly reduced J-point displacement and VF induced by isoproterenol. Survival rate was significantly raised compared with the control ($P < 0.05$). Immediate intravenous injection of SM-H (5 g herb/kg body weight) to poisoned rats which developed VF caused 71% of them to recover temporarily their sinus rhythm and significantly prolonged their survival time ($P < 0.05$).

Key Words *Salvia miltiorrhiza*, isoproterenol, ventricular fibrillation

(Original article on page 543)

Effects of *Cordyceps sinensis*, Rhubarb and Serum Renotropin on Tubular Epithelial Cells Growth

Tian Jin(田 劲); Chen Xiang-mei(陈香美), Li Lei-shi(黎磊石)

Dept. of Nephrology, Beijing 301 Hospital, Beijing (100853)

Primary cultured rat tubular epithelium was utilized to investigate the effect of *Cordyceps sinensis* (CS) on cellular proliferation and metabolism. Judging from incorporation rate of ^3H -TdR, it was found that the addition of serum containing CS metabolites into the culture media could promote the DNA synthesis of tubular cells profoundly ($P < 0.001$). In association with its beneficial effects on gentamycin nephrotoxicity in vivo study, it is indicated that CS could enhance the regeneration of injured tubular cells. In addition, sera obtained from 5/6 nephrectomized rats (5/6 NT) and rhubarb treated rats were studied to see their effects on tubular cells growth. The results showed that the serum of 5/6NT rats could promote the DNA synthesis of tubular epithelium, while the presence of experimental serum of rhubarb in culture media markedly inhibited the DNA synthesis of cells.

Key Words *Cordyceps sinensis*, rhubarb, nephrectomy, tubular epithelial cell

(Original article on page 547)

The Experimental Study of The Heat and Cold Constitutional Types (II)

A Comparative Observation on the Heat and Cold Constitutional Type Rats

on the DNA Replication Capacity after Ultraviolet Damage and the

Proliferation Capacity of the Lymphocytes in vitro

Ding Yong-fa(丁镛发), Qian Ru-hong(钱汝红), Kung Diao-yuan(匡调元), et al

Shanghai College of TCM, Shanghai (200032)

The cold-constitutional and the heat-constitutional type had selected in Wistar rats as the object of study. Using peripheral blood and spleen as materials by means of ultraviolet injury, isotope incorporation, cells incubation in vitro and liquid scintillation counting, the capacity of peripheral lymphocytes DNA replication after damage with ultraviolet radiation and the capacity of the spleen lymphocytes proliferation in vitro was observed. The results showed that the both capacities mentioned above were higher in the heat constitutional type rat than that in the cold type. It is suggested that the following conclusion in the Lingshu Jing(灵枢经) is correct: "the capacity of tissue repair is higher in the heat constitutional type than in the cold."

Key Words constitution, heat-constitutional type, cold-constitutional type, DNA replication synthesis, cells proliferation

(Original article on page 550)