

· 学术探讨 ·

血虚证的临床及实验研究探讨

何东初¹ 黎明辉¹ 梁毅² 欧敏² 潘杨³ 方邦江² 陈如泉^{2△}

血虚证是中医常见证候之一。近年来,陈如泉教授带领血虚证课题组对它的实质进行过一系列的临床和实验研究,取得了可喜的成绩。本文总结了我们的课题组及部分国内同道近十年来的有关研究报道如下。

1 血虚证的流行病学调查

刘卫民等⁽¹⁾对河北省承德地区及湖北省武汉市的 17 家单位的 3 312 人进行了血虚证的流行病学调查。结果表明:血虚证的总体患病率为 5.53%,与血虚证发病有关的 8 个有意义的因素按顺序分别是:情感因素、饮食失宜、后天体质状况、疾病病程、失血病史、生育因素、药毒损伤及先天性体质。在年龄分布上,不同年龄组均可发病,但在 49 岁以上,其发病百分率则明显增加,体现出年老之人,体质渐弱,气血不足,更易患血虚证。调查中的另一突出特点是,女性血虚患者明显多于男性(女 8.02%,男 2.79%)。这与女子“以血为本,以血为用”的理论是一致的,也是由妇女的经、带、胎产等生理特点所产生的直接影响。

一般认为,中医血虚证与现代医学的贫血是两个不同的概念,调查发现,中医血虚证患者中,有 51.2% 有西医的各类不同贫血,体现出中医血虚证与西医贫血既有区别又有联系。

2 血虚证的实验研究

2.1 血虚证与免疫功能 血虚与免疫功能的研究,已经取得了较大的进展,其研究内容包括细胞免疫、体液免疫、红细胞免疫等方面。

陈如泉等⁽²⁾对 34 例临床血虚证患者的红细胞免疫功能进行了检测。结果表明血虚证患者的红细胞 C3b 受体花环率明显减少,而红细胞免疫复合物花环率明显升高,提示血虚证的红细胞免疫功能呈低下状态,而且其功能状态随血虚程度不同而存在差异,即重度血虚证红细胞免疫功能最低,中度次之,轻度则较接近正常。其原因可能是血虚证的病理实质中包含着红细胞数量和质量的下降,从而减少或影响了红细胞膜的 C3b 受体的数量和功能,使其清除血循环中免疫复

合物的能力下降。同时,对 24 只用慢性放血、饥饿失宜制作的血虚证家兔模型的红细胞免疫功能进行前后对照观测,也得到了与临床血虚证患者相同的结果。

对 T 淋巴细胞及其亚群的检测提示,血虚证患者的总 T 细胞减少,辅助/效应 T 细胞减少,而抑制/杀伤 T 细胞不减少,相应使辅助 T 细胞/抑制 T 细胞比值变小,反映出血虚证患者 T 淋巴细胞的关系失调。同样,24 只血虚家兔的 T 淋巴细胞转化能力, 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。

动物实验还显示,造模后的血虚家兔,通过灌服四物汤 3~4 周后,不仅其血虚症状、体征等均有不同程度的恢复,而且红细胞免疫功能、T 淋转、B 淋转、B 淋巴细胞 Zc 花环率等也得到相应地改善。

陈玉春⁽³⁾观察到,血虚小鼠的脾淋巴细胞及混合淋巴细胞产生的白细胞介素-2(IL-2)明显减少,而灌服当归补血汤后可显著促进 IL-2 产生。吴琦等⁽⁴⁾采取⁶⁰Co 照射小鼠进行小鼠血虚证的研究,经照射后的小鼠其脾细胞对 ConA 的增殖反应明显降低。山东中医学院黄文玉等⁽⁵⁾观察了黄芪、当归、党参、补骨脂、枸杞子为主构成的补血方对 L₁₂₁₀ 小鼠 NK 细胞活性的影响,结果表明补血方可显著提高 L₁₂₁₀ 小鼠 NK 细胞活性,并推断其可能是通过促进机体产生 IFN 和 IL-2 而使 NK 细胞易于被激活,从而发挥其杀伤瘤细胞的效应。

通过以上论述可以看出,血虚证患者以及血虚动物模型,存在不同程度的免疫功能低下或紊乱,而养血补血方药则可增强或改善机体的免疫功能。

2.2 血虚证与骨髓造血系统

2.2.1 血虚证与骨髓造血细胞 梁毅等⁽⁶⁾用免疫介导法制出的小鼠血虚模型,其骨髓红系祖细胞(CFU-E、BFU-E)和粒单系祖细胞(CFU-GM)在体外培养环境下其集落形成均显著减少。与骨髓有核细胞数下降呈一致性,反映出骨髓造血功能的衰竭,其发病机制可能在于(1)电离辐射直接损害造血干细胞,使之有源于 CFU-S 阶段的造血生成能力缺陷;(2)其体内产生了有造血抑制效应的细胞及血浆抑制活性物。而应用中药复方地甘口服液(大剂量的炙甘草、熟地黄

1. 广州军区武汉医院(武汉 430070) 2. 湖北中医学院 3. 武汉大学

等组成) 四物口服液对免疫介导的血虚小鼠模型进行治疗, 然后对小鼠的骨髓细胞体外培养, 发现两种复方均能促进 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 集落的形成, 表明两种口服液均能使损伤的骨髓造血干细胞继续分化与增殖, 从而改善骨髓的造血功能。但是, 用不同浓度的复方及不同组合的配方灌服受损小鼠, 其骨髓培养效果存在一定差异。100% 浓度的地甘口服液治疗组小鼠其骨髓细胞体外培养 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 集落的形成明显多于 200% 浓度组及四物口服液组。综合放血血虚证小鼠模型体外培养 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 集落形成亦呈明显下降, 但各治疗组均有良好的治疗效果, 其间不存在差异。分析上述原因可能是多重复合因素激发体内产生过多的负调节影响的细胞因子或影响到造血干细胞的质素, 从而使体外分化增殖的效率下降。研究还表明, 针对综合放血作出的血虚小鼠模型, 地甘口服液(两种浓度)和四物口服液均有良好的治疗效果, 不仅能有效地改善体征、红细胞计数及骨髓有核细胞计数, 还能明显地恢复其造血干细胞的分化增强功能, 使骨髓细胞体外培养 CFU-E、BFU-E、CFU-GM 集落形成正常水平。

2.2.2 血虚证与骨髓造血微环境 梁毅的研究还表明⁽⁶⁾ 免疫介导血虚证模型 CFU-F 形成缓慢, 数量明显减少, 维持时间短, 形态有异常, 甚至存在形成缺陷, 其基质层对正常小鼠骨髓细胞 CFU-GM 的生长支持力明显下降, 而经两种不同中药复方治疗后, 表现为地甘口服液组小鼠 CFU-F 集落形成显著增加, 优于四物口服液组, 且对正常小鼠骨髓细胞 CFU-GM 的支持力明显高于四物口服液组。综合放血血虚证模型在 CFU-F 集落形成上, 则表现为异常增多, 同样也存在形态异常及存活时间短等, 对 CFU-GM 的支持力并不随其 CFU-F 集落的增多而增强。地甘口服液和四物口服液对综合放血血虚模型, 效果良好, 均可使异常增高的 CFU-F 集落数恢复到正常范围内。

2.3 血虚证与血清肿瘤坏死因子(TNF)、IL-2 无论是免疫介导法还是综合放血法, 所制作出的血虚证小鼠模型, 均表现出血清 TNF、IL-2 水平的增高, 与正常小鼠比较差异呈现显著性。由于选择造模的方法不同, 其模型形成的机制有着一定的区别, 免疫介导法所出现的造血抑制效应, 明确强于综合放血法的血虚证模型, 这与我们所掌握了一些文献报道是一致的。

应用地甘口服液和四物口服液均可使过高的 TNF 和 IL-2 降低, 或恢复正常。

2.4 血虚证与胸腺、脾脏基质细胞 我们课题组对正常血虚证小鼠模型胸腺、脾脏单细胞悬液进行基

质细胞培养, 发现在免疫介导血虚证实验中, 其模型组的 CFU-F 形成缓慢, 数量减少, 维持时间短, 并有形态缺陷, 经两种中药复方治疗后, 其胸腺、脾脏基质细胞集落均有不同程度的增加, 但地甘口服液(100%) 组明显优于四物口服液组。综合放血血虚证模型的 CFU-F 却异常增生, 同样也存在形态缺陷和寿命缩短等, 但经两种中药复方治疗后, 其胸腺、脾脏 CFU-F 集落形成均能恢复到正常, 两方间不存在差异。这与我们以往的研究发现(地甘口服液具有升高白细胞、增加 T 淋巴细胞数量、促进 T 淋巴细胞活化和促进脾内免疫细胞聚集作用; 四物汤有改善血虚证 T 淋巴细胞紊乱, 提高红细胞免疫功能) 相符。

2.5 血虚证与脾脏红系细胞、胸腺细胞的流式细胞仪(FACS)分析 细胞凋亡也是造血细胞自然死亡的一种主要形式。我们对免疫介导造模的血虚证小鼠脾脏红系细胞的 FACS 定量分析发现, 其凋亡率明显高于正常对照组, DNA 凝胶电泳同样呈现凋亡特异的梯形带。两组治疗均能降低红系细胞凋亡的百分率, 但地甘口服液较四物口服液作用更佳。本研究还发现, 模型组小鼠胸腺细胞绝大部分停留在 G_0/G_1 期, S 期和 $G_2 + M$ 期细胞显著减少, 与正常对照组比较差异有显著性。DNA 的定量测定和凝胶电泳分析均显示模型组小鼠胸腺细胞凋亡十分突出。两种中药复方均能促进小鼠胸腺细胞的分化增殖, 降低细胞的凋亡率, 但地甘口服液(100%) 的效果明显优于四物口服液。

2.6 血虚证与红细胞膜酶的研究 血虚证与红细胞膜酶功能的缺陷有着直接的关系, 其膜蛋白酶含量的减少, 以及清除自由基活性的降低, 都可能促使血虚证的发生。我们⁽⁷⁾报道了 30 例血虚证患者红细胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶的活性显著低于 30 例正常人, 且细胞内相关的 $[Ca^{2+}]$ 和 $[Na^+]$ 升高。同时发现该酶的活性与患者血虚的程度密切相关。临床 30 例血虚证患者经四物汤治疗 4 周后, 其 ATP 酶活性显著增高, 提示四物汤补血的机理与提高红细胞膜 ATP 酶活性有关。同时进行的动物实验也得出了相同的结论。

欧敏等⁽⁸⁾通过临床及动物实验发现, 血虚证患者和血虚家兔模型均表现出超氧化物歧化酶(SOD)活力的降低, 而过氧化脂质(LPO)水平增高, 认为在血虚状态下, 红细胞膜 ATP 的来源障碍, 新陈代谢降低, 机体清除自由基能力降低, 自由基过剩累积, 细胞膜的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应, 从而导致 SOD 下降, LPO 水平上升。

血谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)和血硒(Se)在机

体抗氧化防御机制中同样起着举足轻重的作用。方邦江^[9]研究表明:血虚证患者的血 GSH-Px 活性与血 Se 均呈显著下降,从而导致机体抗氧化系统对自由基的清除力减弱。另外,对 20 只血虚家兔进行研究,一种能产生自由基的酶——XOD 活性明显高于正常对照组。

2.7 血虚证与红细胞变形性及微循环 为深入探讨血虚证微循环改变的机理,欧敏^[10]进一步观察了 30 例血虚患者及 20 只血虚家兔模型的红细胞变形性,认为决定红细胞变形程度的 3 个因素(红细胞膜的粘弹性、细胞内液粘度、细胞几何形态),其中任何一项因素异常可影响红细胞的变形性。实验表明:无论血虚证患者,还是血虚证家兔,其红细胞变形性呈不同程度的降低,原因可能与血浆 LPO 水平增高及红细胞膜 ATP 酶的合成减少有关。研究还提示:血虚证患者是否贫血其红细胞变形性无明显差异。

2.8 血虚证与微量元素 微量元素有广泛的生理功能,参与体内多种酶的合成、催化和代谢过程。陈如泉等^[2]对 30 例血虚证患者的多种血清微量元素进行了检测,结果表明:血虚证患者血清中的 Cu、Zn、Fe、Mg、Mn、Ca 和 Se 水平显著下降。其中具有刺激或参与造血功能的 Cu、Zn、Fe 3 种元素的缺乏,反映出血虚状态时造血系统的造血功能可能受到影响。与上述结论稍有不同的是,方邦江^[9]的研究提示血虚证时血清 Se 的含量明显降低,而血 Mn 的含量却显著上升,并认为 Se 作为机体的抗氧化剂,其含量减少可导致自由基清除力的减弱,促使血虚证的形成和发展。

2.9 其他有关资料表明 血虚证与心脏储备功能及血液动力学有一定的关系。研究发现血虚证及气血两虚患者的心脏储备功能较差,血管紧张性低下,提示潜在的功能不足。在血液流变学方面,血虚患者的血液流变学发生变化,其全血粘度(高切、低切)、红细胞压积、血沉均明显低于正常组。王平等^[11]报道了在一组老年血虚证患者研究中,还发现血清和血浆粘度也见明显降低,但男女间有明显不同,男性患者血浆粘度下降十分突出,而女性仅见轻度降低;在还原比粘度上,男女之间也有不同表现,女性全血还原比粘度高、低切均有意义,而男性则无统计学意义;其原因可能与男女体质、病种以及血虚程度有关。另外在血虚家兔实验中,结果表明其全血粘度明显下降,以低切较敏感,红细胞比容降低,组织水分渗入,血液处于稀释状态而呈现出稀、淡、清的血液流变学特征。分组治疗的结果表明补血中药生血胶囊、四物汤有升高血液粘度、改善血液低粘状态的功效。

“发为血之余”,为探讨血液与毛发的关系,刘建文等^[12]借助现代科学技术中材料力学的强度、脆性测定原理及光学扫描电镜技术,研究血虚证患者头发强度及超微结构变化。结果显示:血虚证患者的头发应力强度和应变强度均明显低于正常人,其超微结构改变主要表现为毛小皮纹路紊乱、边缘不整、缺损,毛小皮剥离、洞状损伤,毛干鼓状膨大,以及毛干赘生物等。为血虚证提供了一项新的客观标志。

3 血虚证动物模型

上海中医研究所于 1977 年采用特制毛细吸管从小鼠眶后静脉放血,结合适当限食,首次制作出血虚小鼠模型,其主要特征为毛皮疏松、缺乏光泽、体重下降、萎靡不振、少动,红细胞计数及血红蛋白含量均明显低于正常组。王平等^[13]采用耳静脉放血的方法建立家兔血虚证模型。分别从免疫学、血液流变学、红细胞膜酶、红细胞变形性、微量元素等方面对该模型进行了研究。

采用注射化学药物制作血虚模型,更多见于以观察补血方药作用机理为主的研究中。谢鸣^[14]分别采用环磷酰胺及马利兰腹腔注射的方法制作出小鼠血虚证模型,然后比较填精补血方和活血生血方对骨髓造血系统功能及骨髓造血环境的影响。我们引进免疫介导法及综合放血法,同时观察这两种血虚证模型的骨髓造血系统、造血微环境及脾脏胸腺的细胞凋亡情况,并观察了地甘口服液及四物汤口服液对上述血虚模型的不同影响。

4 评述与展望

4.1 以血虚证为专题进行的研究至今已有近 10 年来的历史,我们在陈如泉教授的指导下对血虚证实质的研究从简单的外周血细胞计数、心功能检测、血液流变学变化、微量元素含量、免疫球蛋白检测、淋巴细胞转化试验等逐步深入到红细胞膜酶、红细胞变形性、红细胞免疫、T 淋巴细胞及分类、IL-2、骨髓造血系统及造血微环境、胸腺、脾脏细胞凋亡等,广泛地揭示了血虚证的实质,为临床诊断、治疗、预后判断提供了客观的指导。

4.2 血虚证的流行病学调查,是应用现代流行病学手段来探讨中医证候的分布及病因,分别从地区、病因、年龄、性别等方面广泛调查了血虚证的发病,为疾病的预防和防治提供了有意义的指导,丰富发展了中医学理论。

4.3 血虚动物模型 制作动物模型是研究证候的关键,但以上所述的各种制模手段,存在着动物血虚证模型与人体血虚证候的差别。人的血虚证多因失血过多,新血未生,或脾胃生血不足,或久病不愈、营血消

耗过多等多种因素所致,病程较长。而现有的大部分制模方法存在一定的片面性,如急、慢性放血或化学药物注射等造成的血虚模型,虽然具有血虚证的某些症状,但血虚证的舌脉表现反映不出来。因此,应从中医的传统理论观点出发,设计出多种因素导致的复合模型,我们采用的复合放血法就是通过放血、饮食不节损伤脾胃及劳累过度等综合方法制出了血虚模型。它是以血虚证的症状、体征及客观指标作为造模标准,以传统的补血方如四物汤等作为造模的反证依据。为血虚证模型的研制较为公认的制作方法,但中医血虚证表现于西医多种疾病,不可能用某一种制模方法概括并符合各种血虚见证。

4.4 血虚证实质的研究 通过以往的研究,血虚证实质的探讨已渗透到现代医学研究的许多方面,内容逐渐深化、广泛。现代医学认为,血液主要有血细胞成分与非血细胞成分,因此,血虚证的实质研究,可以从血细胞的生化、功能、结构、形态以及动力学、免疫学、骨髓造血系统等方面,深入研究血虚证的实质及发病机理。中医血虚证实质的研究,要求既符合中医理论思想,又不断运用现代科学技术和方法加以阐述,这已成为当前中西医结合的基本模式,但如何有机地融合中西医理论思想却是问题的关键。结合以往研究的成果,我们认为,中医血虚证的进一步研究,可以着眼于以下几个方面。

4.4.1 尽管动物模型在当前还不能准确地反映出人体血虚证的全部实质,但作为替代实验对象,其作用仍十分重要。应结合中医病因病机理论,不断改进和发展,使其逐步类似原型,并对其进行更深更多层次的形态学、分子生物学等研究,为临床研究奠定基础。

4.4.2 基于血虚证动物模型的局限性,临床血虚证的研究则应不断加强,可广泛借鉴现代医学的研究手段,重点从造血系统的形态学和功能、免疫调节因子、红细胞酶谱血细胞凋亡、造血细胞与粘附分子、细胞周期调控、基因表达等更深层次加以阐述。

4.4.3 无论从中医疾病角度,还是现代医学疾病角度,中医血虚证不单纯属某一疾病,而是表现于临床各科的多种疾病。为深入研究血虚证实质,可运用某一种或多种检测指标,研究不同疾病血虚证的变化规律,既可一个病一个病进行系统观察,也可在不同疾病

之间进行对照观察。临床实际中,可见到单纯血虚证,也可见到血虚证兼夹不同证候,如虚寒兼寒凝证,血虚兼气虚证、血虚兼血瘀证等,故了解单纯血虚证与血虚兼夹证的客观指标变化情况也大有研究的必要。

参 考 文 献

1. 刘卫民, 韩艳须, 陈如泉. 血虚证病因学调查. 中国中医基础医学杂志 1995 ;1(2):48—49.
2. 陈如泉, 梁毅, 欧敏, 等. 血虚证红细胞免疫功能和变形性、淋巴细胞转化功能及自由机代谢的研究. 中西医结合实用临床急救 1999 ;4:151—153.
3. 陈玉春. 当归补血汤对血虚小鼠产生 IL-2 影响的实验研究. 中国中药杂志 1994 ;19(12):739—740.
4. 吴琦, 王娟娟, 赵琳. 当归补血汤及其单味药对⁶⁰Co 照射小鼠免疫功能的影响. 北京中医学院学报 1993 ;16(4):53—55.
5. 黄文玉, 刘缓, 钟鸣, 等. 中药复方对 L₁₂₁₀ 白血病小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响. 山东中医学院学报 1994 ;18(4):274—275.
6. 梁毅, 鲁新华, 陈如泉. 中药复方对免疫介导小鼠再生障碍性贫血祖细胞的影响. 中国中医基础医学杂志 1999 ;5(6):13—15.
7. 何东初, 刘玉茂, 陈如泉. 血虚证患者红细胞 ATPase 及四物汤对其影响的研究. 辽宁中医杂志 1996 ;23(11):483—485.
8. 欧敏, 陈如泉. 血虚家兔模型红细胞变形与 SOD、LPO 变化的实验研究. 湖北中医杂志 1996 ;18(3):52—54.
9. 方邦江, 陈如泉. 血虚证血谷胱甘肽过氧化物、血硒改变的临床研究. 四川中医 1994 ;12(2):5—6.
10. 欧敏. 血虚家兔模型红细胞变形性与 SOD、LOP 变化的实验研究. 辽宁中医杂志 1996 ;23(3):13—15.
11. 王平, 陈如泉. 老年血虚证血液流变学变化规律初探. 湖北中医杂志 1992 ;14(6):31—33.
12. 刘建文, 陈如泉. 发与血关系的实验研究. 河南中医 1994 ;14(2):82.
13. 王平, 朱明方. 放血和饥饿致家兔血虚斑点模型的造模及实验研究. 中西医结合杂志 1991 ;11(基础理论研究特集):342—345.
14. 谢鸣. 中医补血法的实验研究. 填精补血方和活血生血方对环磷酸胺损伤小鼠骨髓作用的电镜观察. 北京中医学院学报 1991 (4):36—39.

(收稿 2000-05-08 修回 2000-09-25)