

多因素复合作用与维医异常黑胆质证候模型建立的关系研究

罗玲娟¹, 哈木拉提·吾甫尔², 阿地里江·阿布力米提²

1. 新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830054

2. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830054

摘要 为研究多因素复合作用与维医异常黑胆质证候模型建立的关系,并观察其免疫功能的变化,选用健康雄性 ICR 小鼠 45 只,随机分成正常对照组、双因素组和三因素组。双因素组采用间断足底电击作为应激源(输出电压 40 ± 5 V, 不定时改变电压,间隔 0.2~0.5 s, 每天连续刺激 20 min),并置于人工气候箱(温度 10 ± 1 °C, 相对湿度 36%~40%), 干寒饲养环境(10 h/d), 普通饲料喂养, 共 21 d, 产生慢性应激; 三因素组采用与双因素组同样条件的间断足底电击及人工气候箱干寒饲养环境, 只是给予的饲料为干寒属性饲料, 共 21 d。第 21 天观察各组小鼠生物表征的变化并取实验动物外周血。应用流式细胞仪测定小鼠外周血。双因素组实验动物第 21 天出现舌有瘀苔滑; 皮毛暗淡无光泽, 蜷缩少动, 扎堆眯眼, 倦怠淡漠, 对刺激敏感度降低, 反应迟缓; 争食饮水, 大便成形而湿, 小便色清。外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 细胞百分比下降 ($P < 0.01$), $CD8^+$ 细胞百分比未见明显差异 ($P > 0.05$), $CD4^+/CD8^+$ 比值下降 ($P < 0.01$); 血清中 IL-2 的含量明显降低 ($P < 0.01$), 血清中 IL-6 的含量未见明显差异 ($P > 0.05$), 血清中 INF- γ 含量明显降低 ($P < 0.01$), 血清中 TNF- α 的含量明显升高 ($P < 0.01$)。血清中 IgM 的含量明显升高 ($P < 0.01$), IgG 的含量明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), IgA 含量明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。与三因素组相比, 双因素组实验动物外周血 T 淋巴细胞亚群 $CD4^+$ 细胞百分比未见显著差异, $CD8^+$ 细胞百分比上升 ($P < 0.01$), $CD4^+/CD8^+$ 比值下降 ($P < 0.05$)。血清中 IL-2 含量升高 ($P < 0.05$); IL-6 含量明显降低 ($P < 0.01$); IFN- γ 与 TNF- α 的含量未见显著性差异 ($P > 0.05$); 血清中 IgM 的含量明显降低 ($P < 0.01$); IgG 与 IgA 含量未见明显差异 ($P > 0.05$)。由此得出结论: ① 双因素复合作用模型动物在相同时间段表现出的生物表征、免疫功能紊乱与三因素复合作用组相比有程度上的差异, 且尚不完全符合人体异常黑胆质证候临床表现; ② 与正常对照组比较, 三因素复合作用后模型动物表现出的生物表征变化更加符合人体异常黑胆质证候临床表现, 三因素复合作用组不仅有生物表征的改变, 同时有免疫功能的紊乱; ③ 结合干寒环境、不良精神刺激、干寒属性食物等多因素复合作用所建立的异常黑胆质证候动物模型不仅符合人体异常黑胆质证候临床表现, 而且具有稳定性和可靠性。

关键词 多因素复合作用; 异常黑胆质证; 生物表征; 免疫系统

中图分类号 R927.2

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)12-0028-06

A Model of Co-effect of Multi-factor and Abnormal Savda Syndrome in Uighur Medicine

LUO Lingjuan¹, UPUR Halmurat²,

ABULIMITI Adilijiang²

1. Traditional Chinese Medicine School, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

2. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Abstract This paper studies the relationship between co-effect of multi-factor and the model of abnormal savda syndrome in Uighur medicine, by observing the immunological indicators and the changes of functional indicators of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. 45 healthy male ICR mice were randomly divided into normal control group, two-factor group, and three-factor group. The mice in two-factor group were excited with intermittent foot shock, with output voltage of 40 ± 5 V, changing from time to time, in interval of 0.2~0.5 s, in continuous stimulation 20 min everyday, and placed in cold Phytotron (at temperature 10 ± 1 °C, relative humidity 36%~40%) for 10 hours/day, and finally made to produce chronic stress. The mice in three-factor group were excited with intermittent foot shock in cold Phytotron (at temperature 10 ± 1 °C, relative humidity 36%~

收稿日期 2009-04-20

基金项目 国家杰出青年科学基金项目 (30525023)

作者简介 罗玲娟, 研究方向为维医证候生物学基础研究, 电子信箱: luolingjuan0310@126.com; 阿地里江·阿布力米提 (通信作者), 讲师, 研究方向为维吾尔医学异常黑胆质病症模型生物基础研究, 电子信箱: adilijiang1980@yahoo.com.cn

40%), and were fed dry and cool food, in a period of 21 days. The changes of biological characterization of each group were observed, with the cell percentages of CD4⁺ and CD8⁺ in experimental mice's peripheral blood being measured by flow cytometry, and the contents of IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IgM, IgG, IgA in the mice's serum being examined by ELISA on the 21th day. Results show that compared to control group, the mice in tri-factor group show petechiae, small moss, dark purple of tongue, fur lackluster, curled, reduced sensitivity to stimulation, slow response, lassitude somnolence, frequent arousals, more diet, more drink, forming stool, cervine urine on the 21th day. The percentage of CD4⁺ and CD8⁺ is decreased ($P<0.01$), the CD4⁺/CD8⁺ ratio is decreased ($P<0.05$) in peripheral blood; the contents of IFN- γ and IL-2 are decreased significantly in serum ($P<0.01$), TNF- α and IL-6 are increased significantly ($P<0.01$), IgM and IgG are increased significantly ($P<0.01$), however, IgA is decreased significantly ($P<0.01$). The mice in twi-factor group show lavender apex of tongue, fur lackluster, curled, tiredness, indifferent, reduced sensitivity to stimulation, slow to react, more diet, more drink, forming and stool wet, pale colour of urine on the 21th day. The percentage of CD4⁺ is decreased ($P<0.01$), The percentage of CD8⁺ sees no significant difference ($P>0.05$), CD4⁺/CD8⁺ ratio is decreased ($P<0.01$) in peripheral blood; compared to normal control group, the content of IL-2 in serum is decreased significantly ($P<0.01$), IL-6 sees no significant difference ($P>0.05$), INF- γ is decreased significantly ($P<0.01$), TNF- α is increased significantly ($P<0.01$), IgM and IgG are increased significantly ($P<0.01$), IgA is decreased significantly ($P<0.01$). Compared to tri-factor group, the percentage of CD4⁺ of twi-factor group in peripheral blood sees no significant difference, the percentage of CD8⁺ is increased ($P<0.01$), CD4⁺/CD8⁺ ratio is decreased ($P<0.05$), the content of IL-2 is increased in serum ($P<0.05$), IL-6 is decreased significantly ($P<0.01$), IFN- γ and TNF- α see no significant difference ($P>0.05$). It is concluded that

① Compared to normal control group, the changes in the biological characterization of tri-factor group are closer to the clinical manifestations of abnormal savda syndrome in humans, tri-factor group not only witnesses the changes of biological characterization, but also the changes of immune parameters; ② The extent of the changes of biological characterization showed by twi-factor model group is lower than that of tri-factor model group during the same period, and the changes of biological characterization are not entirely consistent with the clinical manifestations of abnormal savda syndrome in humans. At the same time, the extent of cellular and humoral immunity dysfunction is lower than that of tri-factor group; ③ The model established by co-effect of multi-factor of dry and cool environment, hostile psych-stimulation, dry and cool food and so on is not only consistent with the clinical manifestations of abnormal savda syndrome in humans, but also stable and reliable.

Keywords co-effect of multi-factor; abnormal savda syndrome; biological characterization; immune system

0 引言

维吾尔医学认为,异常黑胆质证的生成过程是异常黑胆质体液累积多器官、多系统的慢性病理过程。在干寒饮食、干寒居住环境 and 情志等多因素长期作用于机体,发生物质性气质失调而产生异常黑胆质体液。以往对肿瘤、糖尿病、高血压、哮喘等复杂性疾病的维吾尔医异常体液分型及临床研究结果表明^[1-2],上述疾病以异常黑胆质证为主要证型,而且异常黑胆质病证患者细胞免疫和体液免疫平衡紊乱程度较为严重。在对异常黑胆质证本质研究中,阿氏和努氏依据维吾尔医学基础理论,用人工气候箱模拟干寒环境,慢性足底电刺激模拟不良精神刺激和喂予特制的干寒属性饲料等因素复合作用于实验小鼠,成功模拟出了符合人体异常黑胆质证临床表现的证候动物模型^[3],并通过对该证候模型免疫学本质的探索,提出了异常黑胆质证与机体免疫功能紊乱有密切关系,既有细胞免疫功能的紊乱,又有体液免疫功能的失衡^[4]。本实验通过观察三因素组和双因素组模型动物在生物表征及其免疫功能方面的改变,以研究干寒环境、不良精神刺激、干寒属性食物等多因素复合作用才是维吾尔医异常黑胆质证候动物模型形成的经典模式。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

RQH-350 型人工气候箱(上海精宏实验设备有限公司); JXDT-1 型小鼠跳台仪(翼星实验仪器有限公司);SK-I 型快速混浊器(江魏金僵医疗设备有限公司);COULTER 流式细胞仪(美国 BECKMAN 公司);BioRad 550 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司产品);低温冰箱(日本 SONY 公司产品);低温超速离心机(美国 Beckman 公司)。

1.2 主要试剂

小鼠 CD4(FITC)、CD8(PE)荧光标记抗体;小鼠 IL-2,IL-6, INF- γ ,TNF- α ,IgA,IgM,IgG ELISA 试剂盒,均由美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories,Inc 提供。

1.3 实验动物

ICR 小鼠,雄性,体重(20 $\pm$ 2g),SPF 级,新疆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(新)2003-001。

1.4 动物分组和模型的建立

1.4.1 动物分组

选取 45 只 ICR 小鼠,将小鼠完全随机分为正常对照组、双因素(干寒环境+电刺激)组和三因素(干寒环境+电刺激+干寒食物)组。

1.4.2 动物模型的建立

1) 正常对照组:在室温下(温度 25 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C,相对湿度 60%~80%)用普通饲料饲养,随机饮水,未受任何刺激。

2) 双因素组:将小鼠置于人工气候箱(温度 10 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,相对湿度 36%~40%,10 h/d)干寒饲养环境,给予采用间断足底电击(输出电压 20~40V,不定时改变电压,间隔 0.2~0.5 s,20 min/d,一天 1 次)作为应激源,产生慢性应激;每天喂普通饲料、水,随机饮水摄食。

3) 三因素组:将小鼠置于人工气候箱(温度 10±1℃,相对湿度 36%~40%,10 h/d)干寒饲养环境,给予采用间断足底电击(输出电压 20~40 V,不定时改变电压,间隔 0.2~0.5 s,20 min/d,一天 1 次)作为应激源,产生慢性应激,并给予干寒属性饲料喂养(按每千克普通小鼠饲料中加入大麦 150 mg 和芫荽籽 150 mg,然后制成颗粒状干饲料)。

1.5 实验方法

1.5.1 生物表征的观察

给予强加因素后每天定时(10:00~24:00)观察实验小鼠一般状态。① 皮肤毛发:日光下观察;② 情绪:双因素组每天在同一时间内观察 1 次,每次 30 min,两组均于电刺激之前进行观察;③ 行为状态:安静环境下,观察 30 min,以观察该时间段内的活动为主;④ 舌象:日光下观察,每 7 d 用数码相机拍照 1 次;⑤ 尾部情况:日光下观察其色泽胖瘦;⑥ 耳色:日光下观察;⑦ 尿液:手抓小鼠,将小鼠尿液滴入培养皿上观察尿液的颜色和混浊程度;⑧ 大便状态:当日观察各组小鼠大便形状、软硬程度等状态。

1.5.2 免疫学指标测定

1.5.2.1 外周血 T 淋巴细胞亚群测定

用流式细胞术测定外周血 CD4⁺、CD8⁺。激发光为 488 nm,激光功率为 200 mV。各组小鼠在第 21 天,10:00~24:00 之间眼静脉采血,按照小鼠 CD4(FITC)、CD8(PE)荧光标记抗体

操作说明进行操作,上流式细胞仪测定小鼠外周血 CD4⁺、CD8⁺细胞百分比含量。

1.5.2.2 血清中 IL-2,IL-6,IFN-γ,TNF-α,IgM,IgG,IgA 含量的测定

各组小鼠在第 21 天 10:00~24:00 之间眼静脉采血,1 500 r/min,4℃离心分离血清,血清放置在-80℃保存待测。采用 ELISA 法测定小鼠血清 IL-2、IL-6、IFN-γ、TNF-α、IgM、IgG 和 IgA 的含量。

1.6 数据的处理

所获得数据用 SPSS11.0 软件处理,以上指标按重复测量资料的方差分析方法来进行对比,其余指标均按方差分析多组间比较,*P*<0.05 为显著性差异。

2 结果

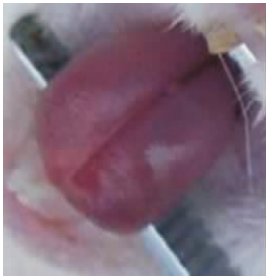
2.1 生物表征

与正常组相比,双因素组实验动物至 21 d 时出现舌有瘀斑、苔湿;皮毛暗淡少光泽;蜷缩少动,扎堆眯眼,倦怠淡漠,对刺激敏感度降低,反应迟缓;争食饮水,大便成形而湿,小便色清。而三因素组实验动物出现舌干暗紫,有瘀斑,少苔;皮毛黯淡无光泽;蜷缩少动,对刺激敏感度降低,反应迟缓,倦怠嗜睡,易惊;争食饮水,大便成形,小便色浅黄(表 1)。小鼠舌相见图 1,小鼠状态见图 2。

表 1 各实验组生物表征			
Table 1 Effect of each group on biological characterization in mice			
生物表征	正常组	双因素组	三因素组
舌苔舌象	淡红舌,薄白苔	瘀加重,苔湿(类滑苔)	舌干暗紫,有瘀斑,少苔
皮肤毛发	毛色白,有光泽	毛色暗淡无光泽	黯淡无光泽
行为状态	佳	蜷缩扎堆,少动	蜷缩少动
情绪反应	佳	倦怠,淡漠	反应迟缓
兴奋程度	对刺激敏感	反应迟钝	反应迟钝
睡眠状态	聚集	扎堆,眯眼	倦怠嗜睡,易惊
饮食状态	正常	有争抢现象	争食
饮水状态	正常	有争抢现象	有争抢现象
大便状态	成形,黏糊状	成形,半湿	成形,干湿适中
尿量性质	浅黄色,量少	色清,量可	浅黄色,量少



(a) 正常组
(a) Normal control group



(b) 双因素组第 7 天
(b) Two-factor group on the 7th day



(c) 双因素组第 14 天
(c) Two-factor group on the 14th day



(d) 双因素组第 21 天
(d) Two-factor group on the 21th day

图 1 小鼠舌相的改变

Fig. 1 Changes of the coated tongue in model

其结果可得出三因素组细胞免疫抑制程度较双因素组更为严重。

体液免疫功能改变: 三因素组 IgM 与 IgG 的含量明显升高 ($P<0.01$), 血清中 IgA 含量明显降低 ($P<0.01$); 双因素组血清中 IgG 和 IgM 的含量明显升高 ($P<0.01$), IgA 含量明显降低 ($P<0.01$), 与三因素组对比: 血清中 IgM 的含量明显降低 ($P<0.01$); IgG 的含量与 IgA 含量未见明显差异 ($P>0.05$) (表 4)。其中, 三因素组与双因素组 IgA 含量明显低于正常对照组 ($P<0.01$), 表明小鼠在应激状态下体液免疫功能表现为抑制。

细胞因子改变: 三因素组血清中 IL-2 的含量与 INF- γ 含量明显降低 ($P<0.01$), IL-6 的含量与 TNF- α 的含量明显升高 ($P<0.01$); 双因素组外周血血清中 IL-2 的含量明显低于正常对照组 ($P<0.01$), 血清中 IL-6 的含量与正常对照组相比未见明显差异 ($P>0.05$), 血清中 INF- γ 含量与正常对照组相比明显降低 ($P<0.01$), 血清中 TNF- α 的含量与正常对照组相比明显升高 ($P<0.01$)。与三因素组相比, 血清中 IL-2 含量升高 ($P<0.05$); IL-6 含量明显降低 ($P<0.01$); IFN- γ 含量与 TNF- α 的含量未见显著性差异 ($P>0.05$) (表 3), 表明三因素组在细胞因子功能改变方面较双因素组严重。

以上结果得出双因素组与三因素组均存在细胞免疫、体液免疫及细胞因子平衡的破坏和紊乱, 故双因素组也产生了部分与三因素组相似的生物表征。但是三因素组在免疫功能紊乱程度上更为严重, 因此三因素组生物表征的观察结果较双因素组更为明显, 其模型组动物生物表征中消瘦、蜷缩少动、对刺激敏感度降低、反应迟缓、倦怠嗜睡、易惊与免疫功能抑制相一致, 与维吾尔医学中异常黑胆质证候更为贴近, 与前期异常黑胆质载体动物模型研究中的生物表征一致。

4 结论

1) 双因素复合作用模型小鼠在相同时间段表现出的生物表征与三因素复合作用组相比有程度上的差异, 尚不完全符合人体异常黑胆质证候临床表现。

2) 与正常对照组比较, 三因素复合作用后模型小鼠表现出的生物表征变化更加符合人体异常黑胆质证候临床表现, 与前期文献报道一致, 三因素复合作用组不仅有生物表征的改变, 同时有免疫功能的紊乱。

3) 结合干寒环境、不良精神刺激、干寒属性食物等多因素复合作用所建立的异常黑胆质证候动物模型, 不仅符合人体异常黑胆质证候临床表现, 而且具有稳定性和可靠性。

参考文献 (References)

- [1] 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003.
Upur Halmurat. Modern research of Uighur medicine temperament, body fluid theory [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Press, 2003.
- [2] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉苏甫, 吐尔逊·吾甫尔. 维吾尔异常

体液分型与年龄、性别关系的探讨 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 61: 84-86.

Upur Halmurat, Yusup Abdiryim1, Upur Tuersun. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2003, 61: 84-86.

- [3] 哈木拉提·吾甫尔, 阿依努尔·买提斯迪克, 努尔买买提·艾买提, 等. 异常黑胆质证载体动物模型的建立及其自然恢复反证 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(10): 910-914.

Upur Halmurat, Matsidik Aynur, Amal Nurmammad, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(10): 910-914.

- [4] 努尔买买提·艾买提, 哈木拉提·吾甫尔, 阿迪力, 等. 异常黑胆质载体动物模型免疫学本质的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(12): 903-907.

Amat Nurmammad, Upur Halmurat, Adili, et al. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2006, 12(12): 903-907.

- [5] 伊沙克江·穆罕穆德. 中国医学百科全书·维吾尔医学分卷 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民卫生出版社, 1985: 259-270.

Mohammad Ishakejiang. Chinese encyclopedia of medicine (Uighur medicine volume) [M]. Urumqi: Xinjiang People's Sanitary Press, 1985: 259-270.

- [6] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 胡尔西旦·尼可孜, 等. 异常黑胆质载体动物肿瘤模型的建立及神经内分泌免疫指标的改变 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(5): 376-381.

Zhang Li, Upur Halmurat, Nikazi Huexidan, et al. *International Journal of Pathology and Clinical Medicine*, 2007, 27(5): 376-381.

- [7] 阿依努尔·买提斯迪克, 尼加提·热合曼, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 异常黑胆质载体动物模型下丘脑-垂体-肾上腺组织形态学观察 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(10): 914-916.

Matsidik Aynur, Rahman Nijit, Upur Halmurat, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(10): 914-916.

- [8] 阿地力江·阿不力米提, 胡汉华, 艾来提·米吉提, 等. 异常黑胆质成熟剂对异常黑胆质载体动物模型下丘脑-垂体-肾上腺轴细胞超微结构的影响 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(3): 185-191.

Abilmit Adiljan, Hu Hanhua, Mijit Hairat, et al. *Int Pathol Clin Med*, 2007, 27(3): 185-191.

- [9] 哈木拉提·吾甫尔, 阿依努尔·买提斯迪克, 努尔买买提·艾买提, 等. 异常黑胆质证载体动物模型的建立及其自然恢复反证 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(10): 910-914.

Upur Halmurat, Matsidik Aynur, Amal Nurmammad, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(10): 910-914.

- [10] Won R, Jung S J, Park Y G, et al. Crossed-withdrawal reflex in a rat model of neuropathic pain: implications in neural plasticity [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 369(3): 239-244.

- [11] Fomicheva E E, Nemirovich-Danchenko E A, Korneva E A. Immuno-protective effects of prolactin during stress-induced immune dysfunction [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2004, 137(6): 544-547.

- [12] Maddock C, Pariante C M. How does stress affect you? An overview of stress, immunity, depression and disease [J]. *Epidemiol Psychiatr Soc*, 2001, 10(3): 153-162.

- [13] Moynihan J A. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity [J]. *Brain, Behavior and Immunity*, 2003, 17: 11-16.

(责任编辑 李慧政)