

易培养成功。

大鼠体外肝细胞的培养首先要考虑的是如何获得高活率的大量游离肝实质细胞。为达到这一目地,必然要选用合适的分离条件,消化酶是非常重要的问题。一般认为,胶原酶只消化细胞间质而对细胞无明显损伤,所以分离培养肝细胞效果最好^[4]。我们实验结果证明,在近似生理条件下,在体和离体消化时,型胶原酶最佳浓度为 0.03%,作用 10 min 为宜。若其浓度过高,难以控制准确的作用时间;过低,也会因作和时间过长,增加细胞死亡率。最适胶原酶浓度为 0.03%。

此外,在肝细胞培养中,适用合适的培养条件及培养液同样也是重要的。肝细胞培养的生长条件要求严格,一般要求成分有丰富的营养物、丰富介质的应用,对于肝细胞的贴壁率及保持其多边形态是有准备的^[5]。通过比较应用,选用 DMEM - F12 培养液使肝细胞的贴壁及形态优于 199 或 1640 一类的基础培养液。

确定准确可行的肝细胞体外分离培养方法是获得较好的体外实验模型的重要手段,对肝细胞的药理或毒理研究具有重要意义。

参考文献

- 1 张全志,于洋,姜诞宁,等.大鼠游离肝细胞悬液的制备及应用.第二军医大学学报,1986;7(3):199
- 2 Berry MN and Firend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cell. J cell Biol 1969; 43: 506
- 3 Ingpbretsen WR, et al. A raped method for isolation of large quantities of rat Liner parenchymal cells with high anabolic rats. Biochem Biophy Res Commun, 1972; 47: 403
- 4 唐志敏,杨玲,金文银,等.原代培养大鼠肝细胞分离方法比较研究.中西医结合肝病杂志,1999;9(4):19
- 5 洪文清,盛和章.成年大鼠肝细胞的分离及培养.军事医学科学院院刊,1993;17(1):57

(收稿日期:2000-12-05)

犊鼻穴灌流异搏定对针刺大鼠足三里穴镇痛效应的影响

李桂兰 郭义 王秀云 徐汤萍
(天津中医学院 300193)

中图分类号:R245.9⁺9 文献标识码:A 文章编号:1005-1180(2001)02-0024-02

我们以前实验发现,当在内关穴及心包经其它穴位注射 Ca^{2+} 通道阻断剂,或在足三里及胃经上穴位注射 Ca^{2+} 通道阻断剂,均可使针刺效应丧失。提示我们,在针效的产生过程中, Ca^{2+} 参与经络活动与 Ca^{2+} 通道有关。由于穴位注射的方法不能连续给药,很难保证整个针刺过程中都能阻断 Ca^{2+} 通道,因此,我们又使用蠕动灌流的方法,连续给药,观察当灌流胃经犊鼻穴时,对针刺足三里效应有何影响,现将实验结果报告如下。

1 犊鼻穴灌流异搏定对针刺足三里穴效应的影响

1.1 材料与方 健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 200 ~ 250 g。将大鼠放在特制的布袋中,将三通管中终端带有塑料小囊的一端经口腔送至胃中,一端连接注射器注入空气,一端连接水银检压计。当注入空气时塑料小囊膨胀引起胃扩张,胃扩张引起大鼠胃胀痛,当其不能耐受时则挣扎嘶叫,以此时水银检压计的读数作

为痛阈值。用此法重复两次挑选出确有镇痛效应的大鼠(即针刺时大鼠痛阈提高值在 20 mm Hg 以上者为针刺镇痛效果显著者)。实验时将挑选的大鼠每分钟测痛阈 1 次,以连测 3 次的平均值为基础痛阈。随后在犊鼻穴刺入特制的灌流探头(外径约为 0.5 mm),连接微量蠕动灌流泵(MASTER FLEX 美国产),从一端灌入浓度为 10 mM 的异搏定溶液,从另一端流出,灌流速度为 0.23 ml/分,连续灌流 30 分钟。从灌流开始即针刺“足三里”穴,施以平补平泻手法,至 15 分钟时留针至 30 分钟。其间每 5 分钟测痛阈 1 次,以基础痛阈与针层痛阈变化的百分数的均数进行统计学处理, *t* 检验。

1.2 实验结果 用灌流法在犊鼻穴灌流异搏定溶液,针刺足三里穴的镇痛效应消失,与基础痛阈相比,针后痛阈变化无统计学差异($P > 0.05$)。

2 委中穴灌流异搏定对针刺足三里穴效应的影响

2.1 材料与方 法 灌流穴位改为委中穴,其它均同前。

2.2 实验结果 当在委中穴灌流异搏定时,针刺足三里穴的效应尚存在,与基础痛阈相比较,针后痛阈的变化仍具有显著的统计学差异。

3 讨 论

1) 我们以前的大量实验结果表明,当络合掉针刺部位或相应经脉线上的 Ca^{2+} 后,针刺效应大都丧失,揭示 Ca^{2+} 是针效产生的一个关键环节,是经络活动的重要物质基础之一。现有的大量研究结果表明,细胞内 Ca^{2+} 与细胞外 Ca^{2+} 的性质迥然不同,在细胞外, Ca^{2+} 是“被动”参与需钙过程,非“启动因子”;相反,细胞内 Ca^{2+} 则起“主动”作用,生理性的刺激可引起细胞内游离 Ca^{2+} 的变化,从而触发一系列生理生化反应。而细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化往往是由细胞外 Ca^{2+} 经细胞膜上的电压门控性 Ca^{2+} 通道进入细胞内引起的,因此,要研究 Ca^{2+} 参与经络活动的过程,就势必要涉及到 Ca^{2+} 通道。

2) 本实验结果表明,当在犊鼻穴灌流异搏定时,针刺足三里的效应消失;而在距犊鼻穴不远的委中穴灌流异搏定时,针刺效应尚存。异搏定为常用的钙通道阻

断剂,这与我们以前用注射法获得实验结果一致。蠕动灌流法可使灌流区域始终保持一定量、一定浓度的异搏定,这对保证实验的准确性具有重要的意义。说明 Ca^{2+} 参与经络活动与细胞膜上的 Ca^{2+} 通道具有密切的关系。

3) 需要提出的是,我们使用的异搏定为经典的钙通道阻断剂,浓度为 100 mM,用双重蒸馏去离子水配制,基本不含其它成分,当以 0.23 ml/min 的速度灌流时,当异搏定阻断 Ca^{2+} 通道的同时,也会影响局部微环境的体液分布状态。那问题是,针刺效应的丧失,是阻断 Ca^{2+} 通道的结果,还是改变局部微环境体液分布的结果?异搏定尚有其它作用,针效的丧失究竟是其何种作用所致?凡此种种,有待更进一步研究。

参考文献

- 1 郭义,王秀云,徐汤萍,等. 经络活动与外周经路上钙离子相关性研究. 针刺研究, 1998; 23(4): 251
- 2 胡翔龙主编. 中国经络现代研究. 北京: 人民卫生出版社, 1990; 210~247.

(收稿日期: 2000-02-01)

(上接第 10 页)

子等均为健脾益胃之品,由此龚氏益寿养元重视脾胃的思想可略见一斑。

2 察安危全在于胃气

龚氏精研《内经》、《难经》之旨,取法金元诸家学说,并有所发挥。他在《寿世保元》中专立脾胃论一章。认为“失脾胃得,仓廩之官也,属土以滋众,安谷以济百骸,故位于中宫,职司南政,旺于四季,体应四肢。……万物滋生,人之一元,三焦之气,五脏六腑之脉,统宗于胃,故人以胃气为本也。凡善调脾胃者,当惜其气,气健则升降不失其度,气弱则稽滞矣”。为使后世学者掌握其精义,因而避繁就简,结合个人临证经验,总结为三点:“盖内伤之要,有三致焉。一曰饮食劳倦即伤脾,此常人之患也,因而气血不足,胃脘之阳不举,宜补中益气汤主之。二曰嗜欲二伤脾,此富贵之患也,瓷以厚味,则生痰而泥膈,纵其情欲,则耗精而散气,……故吞酸而便难,胸膈渐觉补舒

爽,宜加味六君子汤,加红花三分、知母(盐炒)一钱主之。三曰饮食自倍,肠胃乃伤者,劳力者之患也,宜保和丸、三因和中丸权之”。在治疗上则强调以养心健脾舒肝为求本之治,因为“心火,脾土之母,肝木,脾土之贼,木曰曲直作酸”,故“心气和则脾土荣昌,……舒肝则胃气畅矣”。并指出世俗之医多偏于用旧方香燥耗气之药,只知枳术丸为脾胃之要药,而不知其有剥削真气之虞,“凡治内伤,不知惜气者,诚实实虚虚之谓,学者宜致思焉”,力倡家传之三因和中健脾丸,认为其为调护脾胃通用之剂。龚氏认为:“运食进,元气也,生血气进,饮食也,无时不在,无时不然”;“胃气亏则五脏六腑之气亦馁矣”,提出“善用药物,必以胃药助之”的论点。龚氏脾胃论的核心即在于“察安危,全在于胃气”。

(收稿日期: 2000-05-22)