

肾阳虚证临床及实验研究回顾

刘尚全¹

自从1959年上海医科大学脏象研究组从肾阳虚入手,开始对肾虚、肾本质进行研究以来,人们应用多种现代的研究技术手段,从功能到形态,从宏观到微观,从组织细胞水平到分子水平对肾阳虚证进行更加广泛而深入的研究。各方面的研究表明,肾阳虚证与神经、内分泌、免疫系统的功能改变密切相关。中医的肾不同于解剖学上的肾,远远超出了西医肾脏的范畴,涉及的范围很广,是多系统和器官功能的综合表现。现对肾阳虚证的临床及实验研究作一回顾。

1. 肾阳虚证实验动物模型的研究

用动物模型进行证的中医药研究,可以弥补中医单靠临床研究的不足,从形态和功能等多方面阐述中药治疗的效果和原理,揭示中医理论的本质,并在此基础上产生新的理论和治疗方法,关于肾阳虚实验动物模型,文献已有详尽总结^[1]。

2. 肾阳虚证中枢改变

海马是脑内参与记忆贮存功能的重要部分,而海马CA3区是学习记忆的关键部位,并对衰老较为易感。益气补肾药物在提高大鼠海马、额叶去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)含量的同时改善了Alzheimer病肾阳虚模型大鼠学习记忆力^{[2][3]},进一步对大鼠海马CA3区超微结构进行研究^[4]发现老年肾虚AD鼠在亚细胞水平的变化主要表现为脂褐质数量异常增多,神经元核膜内陷形成皱褶,核内出现空泡,神经元胞浆内线粒体数目减少,形态不规则,嵴变短,部分嵴缺失和线粒体内絮状斑块。主要细胞器如高尔基体、粗面内质网有明显的变形、增宽、脱颗粒等。温阳药物则可以逆转上述变化,表现为抑制脑内脂褐质的形成和积累、促进脑细胞蛋白质的合成和改善脑部血液循环作用。使神经元内线粒体数目增多,防止线粒体嵴肿胀及变性等。

精氨酸升压素(Argipressin, AP)具有增强学习记忆功能的作用^[5],生长抑素(Somatostatin, SS)是体内具有广泛抑制作用的神经肽^[6],有文献报告^[7]下丘脑组织中SS神经元和AP神经元之间有共存的树突,它们之间有直接形态学的联系,而在功能上则相互影响,研究证实^[8]肾阳虚动物学习记忆成绩明显下降的同时下丘脑和血浆中SS和AP水平均异常,表现为AP降低而SS升高;用药后学习记忆成绩提高,同时AP升高而SS下降。

郑里翔等^[9]研究了肾阳虚模型单胺类递质及胆碱酯酶的变化,除5-HT无明显差以外,NE/DA/ACHE均有显著差异,外周NE/DA也出现类似情况。NA与警觉、睡眠、情绪等调节有关。5-HT与睡眠精神活动密切相关。5-HT、NE、DA共同维持体温恒定,参与睡眠及内分泌调节,ACHE在智力活动和记忆中起着关键作用。

3. 内分泌系统改变

沈自尹教授曾对“肾阳虚”的本质进行了系统的研究^[10],认为肾阳虚证不仅可引起下丘脑—垂体—肾上腺皮质轴(HPA)功能紊乱,而且对于不同靶腺轴(如下丘脑—垂体—甲状腺轴)的不同环节,均有不同程度的功能紊乱和退行性病变。

3.1 下丘脑

下丘脑激素的作用是通过胞内信号传导系统来实现的,反之胞内信号传导系统的改变就可能影响激素分泌,从而导致下丘脑—垂体轴的神经内分泌功能紊乱。PKA, PKC通过底物磷酸化参与许多生理活动如神经递质释放、细胞增殖分化等,它们是多外在刺激因子如激素、神经递质、生长因子等发挥作用的重要信号调节因子^{[11][12]}。研究结果表明^[13],肾阳虚大鼠下丘脑组织中PKA, PKC活性均明显降低。下丘脑组织细胞液PKA活性的变化更为明显。PKC的活性胞膜大于胞液,但胞液的下降幅度大于胞膜,提示胞液中的PKA和PKC活性可能对下丘脑神经内分泌功能变化影响更大。

生理条件下,下丘脑将从大脑传来的神经信息转变成激素信息,如分泌TRH、GnRH、CRF等。这些神经肽作用于垂体,使之分泌相应的激素而作用于各自的靶器官。在下丘脑—垂体—靶腺体轴中,各环节分泌

¹ 作者简介:刘尚全,男,上海第二医科大学03级博士研究生,研究方向内分泌代谢。

的激素又反馈调节上一环节。这些激素与靶器官上的受体结合,通过信号传导系统发挥作用。NO在中枢神经系统有广泛的分布,是近年来认识到的一种新型神经信使因子,具有多种生物效应,有调节神经内分泌的功能。NO参与下丘脑-垂体神经肽的释放,通过cGMP信号传导途径抑制下丘脑GnRH分泌与表达,NOS抑制剂可阻断神经递质的释放^[14]。通过^[15]对肾阳虚证神经内分泌功能受损状态下NO系统的变化的研究发现肾阳虚证时大鼠下丘脑nNOS表达增强。下丘脑组织NOS活性升高,血清和下丘脑组织中NO水平也明显升高,但下丘脑组织升高幅度明显高于血清,由此推测,肾阳虚证时影响了下丘脑nNOS表达,并引起NOS活性增强,被激活的NOS催化L-精氨酸生成过量的NO。NO水平的升高可能对GC的刺激作用增强,导致cGMP生成量增大,cGMP作为第二信使作用于cGMP依赖的蛋白激酶而发挥生物效应,抑制下丘脑的神经内分泌功能,导致肾阳虚证的发生。

Ca²⁺广泛分布于人体细胞内和体液中,Ca²⁺作为胞内信使“主动”参与一切外来信号调控细胞功能的信号传导过程。胞内游离钙的改变,可触发一系列生理、生化反应。许多病理或疾病现象的发生都伴随着胞内Ca²⁺浓度的异常升高,如脑缺血、癫痫、糖尿病等^[16]。胞内钙离子超载、钙离子内环境失衡是导致细胞死亡的最后的共同途径^[17]。宋春风等采用^[18]灵敏度高特异性强的第三代Ca²⁺荧光探针Fluo3AM对下丘脑-垂体-肾上腺轴和血淋巴细胞[Ca²⁺]_i进行了测定,同时测定了血清钙。结果表明,肾阳虚大鼠下丘脑、血淋巴细胞中[Ca²⁺]_i及血清钙显著升高,补肾中药右归饮能够抑制肾阳虚大鼠下丘脑、血淋巴细胞Ca²⁺及血清钙的升高。由于[Ca²⁺]_i具有第二信使的功能,且作用广泛,因此[Ca²⁺]_i的升降对调节细胞活动起着决定的作用。在生理状态下,细胞膜内外存在极大的Ca²⁺电化学梯度,胞内钙浓度为0.1μmol/L~1.0μmol/L,而胞外钙浓度比[Ca²⁺]_i高1万倍,约为1.0mmol/L。细胞维持如此大的浓度梯度,保证胞内钙稳定,主要靠细胞膜Ca²⁺极低的通透性、钙结合蛋白(如钙调素)的缓冲以及依赖质膜两侧钙泵Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶、Na⁺-Ca²⁺交换系统将Ca²⁺主动排出,或通过胞内Ca²⁺库如线粒体、内质网等摄取与贮存Ca²⁺。其中线粒体是胞内最重要的钙库之一。当[Ca²⁺]_i>1.0mmol/L时,线粒体摄钙明显增加,但[Ca²⁺]_i的调控均有一定限度,超过极限将导致[Ca²⁺]_i升高,引起细胞和线粒体钙超载,从而触发一系列有害的病理生理过程^[19],使一些依赖Ca²⁺的酶如NO合成酶、磷脂酶、蛋白水解酶及核酸酶的活性增加。通过“瀑布”式连锁反应使线粒体氧化磷酸化脱耦联,线粒体功能下降或衰竭,细胞呼吸抑制,同时影响细胞的基本代谢功能。一些研究表明,脑老化伴随着神经细胞内钙稳态的失调和细胞钙调节能力的降低,随着年龄的增加,[Ca²⁺]_i呈渐进性增加^[20]。胞内钙的增加主要通过细胞膜上钙通道开放和胞内钙库的释放而引起。胞内游离钙病理性增加后,则需要胞内的Ca²⁺调控机制发挥作用,以维持胞内钙稳态。但研究发现,随着老龄化的发生,胞内Ca²⁺调控能力逐渐衰退,如细胞膜Ca²⁺泵活性随年龄增加而显著降低,外排Ca²⁺的能力明显下降,线粒体摄钙能力也随着年龄增长逐渐衰退^[21]。有研究表明,机体老化是一种生理性肾阳虚,肾阳虚是未老先衰的一种表现。因此肾阳虚时下丘脑、血淋巴细胞的[Ca²⁺]_i及血清钙升高,可能是胞外大量Ca²⁺顺浓度梯度进入胞内,细胞膜钙泵功能降低,排出Ca²⁺的功能受损,胞内钙库线粒体、内质网等摄取、贮钙能力下降,钙代谢紊乱的结果。由于肾阳虚时下丘脑、血淋巴细胞[Ca²⁺]_i升高,激活NOS等多种酶,引起线粒体等细胞结构和功能的损伤,使细胞功能下降,特别是下丘脑、血淋巴细胞与机体的基本代谢,激素的分泌和调控以及免疫功能密切相关,下丘脑、血淋巴细胞的[Ca²⁺]_i的升高,破坏了其钙代谢的平衡,影响了下丘脑和血淋巴细胞功能,使机体的基本代谢紊乱,免疫力下降,出现一系列的肾阳虚症状。补肾中药能够调整机体的Ca²⁺稳态失衡,可能与其具有降低血清钙,调整细胞膜的钙泵活性,升高胞内钙库摄钙、贮钙能力,及抑制NOS等酶的作用有关。

正中隆起位于下丘脑内侧基底部,通过垂体柄与垂体相连。其正上方为第三脑室,额状面上为第三脑室底部膨大的三角形结构,由内到外分为内中外三层,外层为栅状带,较宽含有丰富的毛细血管,下丘脑神经分泌细胞的促垂体激素大多运输到此,再通过垂体门脉系统进入垂体前叶,中层为神经纤维,主要为下丘脑垂体束,参与垂体后叶的调控,内层即为第三脑室腔面的室管膜细胞^[22]。下丘脑的许多神经分泌核团的含有神经分泌颗粒的神经末梢中终止于正中隆起,并且正中隆起本身也存在着一些促垂体神经分泌细胞,从正中隆起的神经联系和血管分布来看,它是下丘脑-垂体-内分泌轴上传下达的关键部位,与多种激素及其他信息的传递和调控有关。近年来中医肾本质的研究表明,肾阳虚证与下丘脑-垂体-内分泌腺

轴的功能紊乱有关^[23],推测主要发病环节在下丘脑^[24],宋春风等^[25]运用扫描电镜观察了糖皮质激素醋酸可的松致肾阳虚大鼠下丘脑正中隆起室管膜细胞超微结构的变化发现肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能受抑制,室管膜细胞分泌功能下降,微绒毛分布改变,结构异常,分泌颗粒样结构几乎消失。细胞出现孔洞,这可能是室管膜细胞功能下降,细胞走向凋亡的一种形态表现。而温补肾阳中药能够直接作用于下丘脑,改善肾阳虚大鼠或老年大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)神经元和神经纤维免疫活性^[26]、CRFm RNA表达水平^[27]及下丘脑双氢睾酮(DHT)受体的亲和力^[28],进而提高HPA轴功能。同时可以改善下丘脑正中隆起室管膜细胞超微结构的损伤。

右归饮是温补肾阳的经典名方,可拮抗肾阳虚大鼠体重增长受抑和饮食摄水的减少,改善动物下丘脑单胺类递质的含量^[29];并可通过提高下丘脑CRFmRNA和CaMmRNA的表达以缓解肾阳虚证的阳虚状态^{[30][31]}。

3.2 垂体改变

垂体是机体内最重要的内分泌腺之一,它分泌多种激素,调控其他许多内分泌腺和器官的功能,并以神经和血管与下丘脑相连,因此垂体在神经与内分泌两大整合系统的相互关系中居枢纽地位。近年来,随着对中医肾本质研究的逐步深入初步,认为肾阳虚证与下丘脑-垂体-靶腺轴的功能改变密切相关^[32];宋春风等的试验^[33]则从超微结构的角度,进一步证明肾阳虚大鼠垂体前叶五种内分泌细胞,除催乳素细胞因雄性大鼠很少,未见明显变化以外,其他四种内分泌细胞-生长激素细胞、促性腺激素细胞、促甲状腺激素细胞、促肾上腺皮质激素细胞都有不同程度的粗面内质网扩张,线粒体肿胀、空化,细胞变形,核变形、固缩,而益气补肾中药能够改善这种超微结构的损伤。

超微病理学认为,具有分泌功能或蛋白质合成旺盛的细胞粗面内质网较多,并多呈平行片排列,粗面内质网池也多呈狭隙状。当细胞受到缺氧、中毒等各种损伤时,粗面内质网和滑面内质网的形态改变表现为池的非特异性扩张和裂解。在损伤较轻时,内质网较轻度扩张,粗面内质网膜上的核糖体常部分脱落于胞浆中;当细胞损伤较重时,内质网高度扩张并裂解为大泡状。与此同时,高尔基体和线粒体等其他细胞器也发生类似的扩张^[34]。从细胞的结构与功能分析,出现这些形态变化的原因可能有两个:第一,缺氧等细胞损伤首先使敏感的细胞器线粒体肿胀、空化,使线粒体的氧化磷酸化作用受到影响,致使钠泵失效,Na⁺和水分进入细胞的内质网、高尔基体,使内质网扩张、脱颗粒,高尔基体扩张。第二,细胞合成或分泌蛋白质的过程受阻,排出困难而使分泌物堆积在这些细胞器中,引起其扩张或肿胀。但不管哪种原因,最终都将导致蛋白质的分泌减少,细胞功能的下降。因此,垂体内分泌细胞超微结构的改变,必然使其功能受到严重的影响,特别是各种多肽类促激素的合成,主要是通过粗面内质网完成的,这些细胞的粗面内质网扩张和脱颗粒,说明其蛋白质合成的精确性降低,酶的结构和活性发生种种改变,激素的合成减少。再加上线粒体的肿胀、核的固缩,影响了氧化磷酸化和DNA的转录复制,致使能量供应不足,DNA的转录复制功能降低,而导致整个细胞的功能低下。宋春风等研究^[35]的结果提示肾阳虚与垂体细胞超微结构的改变及其细胞功能下降有关,益气补肾中药对肾阳虚垂体超微结构的损伤有明显的改善作用,能够恢复其细胞功能,表明益气补肾中药能够通过影响垂体的形态结构,进而调整肾阳虚的种种表征,使机体恢复正常状态。试验中还发现,五种内分泌细胞超微结构损伤程度依次为促性腺激素细胞、生长激素细胞、促甲状腺激素和促肾上腺皮质激素细胞。

3.3 甲状腺改变

下丘脑-垂体-甲状腺轴在人体的生命活动中起着重要的作用,与能量代谢、物质代谢及信息传递密切相关。有研究表明^[36],肾阳虚大鼠血清中甲状腺激素T₃、rT₃、T₄浓度明显低于正常大鼠,同时腺垂体分泌的TSH也明显低于正常大鼠。补肾壮阳中药能恢复肾阳虚大鼠血清T₃、rT₃、T₄和TSH水平。宋春风等^[37]以大剂量醋酸可的松造成大鼠肾阳虚模型,取其垂体、甲状腺制成超薄切片,进行电镜观察。发现肾阳虚大鼠垂体促甲状腺激素(TSH)细胞、甲状腺滤泡上皮细胞出现内质网、高尔基体扩张,线粒体空化,细胞变形,核的形态改变等超微结构的损伤。由于肾阳虚大鼠垂体TSH细胞、甲状腺滤泡上皮细胞细胞核降解,线粒体肿胀,嵴空化,内质网扩张,而使核的DNA复制、转录,线粒体的氧化磷酸化,内质网的蛋白质合成等功能受到影响,致使细胞的功能下降,合成和分泌激素的能力减弱,能量代谢率降低,最终导致多种器官的功能下降,而产生一系列的肾阳虚的症状,给予益气补肾中药能够减轻肾阳虚大鼠垂体

超微结构的损伤,但对甲状腺细胞超微结构损伤的保护作用甚微。因此认为肾阳虚证与垂体-甲状腺轴功能密切相关,而益气补肾中药则通过减轻垂体的超微结构损伤,调节垂体-甲状腺轴的功能,而达到纠正肾阳虚证的效应。

3.4 肾上腺改变

H P A A是神经内分泌网络的重要组成部分,对于调节机体的内稳态和各种功能都起着不可忽视的作用。中医学中的“肾”和肾上腺皮质功能的关系长期以来为中西医结合研究所重视。临床研究^[38]^[39]发现肾阳虚患者的垂体前叶-肾上腺皮质轴处于功能低下和混乱状态,糖皮质激素水平降低,并推测肾阳虚患者的糖皮质激素水平下降是由于垂体前叶功能低下。实验研究也发现^[40]动物长期应用大剂量糖皮质激素,会由于糖皮质激素的反馈抑制作用而使肾上腺皮质功能受抑制,使血浆糖皮质激素水平降低,用醋酸氢化可的松复制的肾阳虚模型大鼠的血浆皮质醇降低,测定血浆中的ACTH浓度发现肾阳虚模型大鼠垂体前叶分泌的ACTH浓度降低。给予拮抗醋酸氢化可的松对肾上腺皮质功能的反馈抑制作用的药物后,P和ACTH显著升高,钟历勇^[41]等的研究从分子水平表明,肾阳虚大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放因子(C R F)m R N A显著受抑制,补肾中药能够提高下丘脑C R F m R N A的表达量与H P A A的功能,使受抑的C R F m R N A水平在一定程度上得以恢复。对作用广泛的Ca²⁺-C a M信号系统与肾阳虚的关系进行研究发现,在糖皮质激素所致的肾阳虚大鼠下丘脑中,C a M m R N A有较高的表达,在正常大鼠下丘脑中表达不明显,温补肾阳中药能抑制肾阳虚大鼠下丘脑中C a M m R N A的过度表达。在肾上腺中,肾阳虚组与正常组相比,C a M m R N A亦显著上升。在垂体组织,肾阳虚组与正常组相比,C a M m R N A表达有上升的趋势,但没有显著的统计学意义。垂体和肾上腺组织中,补肾中药组C a M m R N A的表达均略低于肾阳虚组,亦没有统计学意义。

已有研究表明,在C a M基因的5'端非编码区有糖皮质激素的受体位点^[42]。糖皮质激素能够抑制垂体促肾上腺皮质细胞A C T H的释放,这种抑制的早期(< 2 h),能够诱导出新的m R N A和蛋白。在T淋巴细胞中发现C a M,这种多功能的Ca²⁺受体蛋白,是加入糖皮质激素地塞米松后2 h内产生的几种蛋白之一^[43]。在小鼠垂体促肾上腺皮质激素肿瘤细胞A t T 2 0 D 1 6 : 1 6细胞中,人工合成的糖皮质激素地塞米松能够迅速诱导C a M m R N A的产生,而且在加入类固醇激素的同时加入C R F,能够显著地减少这种m R N A的产生以及糖皮质激素对A C T H释放的抑制。因此,C R F能够抑制糖皮质激素对A C T H释放的抑制作用及对C a M m R N A的诱导作用^[44]。在祛除肾上腺的大鼠中,海马和皮质中的C a M m R N A显著减少。在祛除肾上腺的同时,每天给以皮质酮,则能阻碍C a M m R N A的减少^[45]。可见,C a M对H P A A的调控起着重要的作用。因此认为糖皮质激素对H P A A的抑制与C a M m R N A的产生有关。肾阳虚时下丘脑C a M m R N A的诱导,与C a R F m R N A表达抑制有着直接或间接的关系。

早在60年代邝安KUN等就发现助阳药能够对抗大剂量肾上腺皮质激素引起的耗竭作用^[46]。随后的临床实验发现,肾阳虚患者血清中17-羟皮质酮降低^[47];垂体前叶-肾上腺皮质轴功能低下,糖皮质激素水平降低^[48]。实验研究^[49]也表明,糖皮质激素所致肾阳虚大鼠血浆糖皮质激素水平降低,并直接证明了肾阳虚大鼠血浆糖皮质激素水平降低是由于垂体前叶功能受损所致。任何器官或组织机能不足必然有其物质基础,这就是细胞的形态结构的改变,严重时引起细胞的萎缩、变性或坏死。本实验结果表明,肾阳虚大鼠垂体ACTH细胞,存在着内质网扩张,线粒体肿胀、空化等超微结构损伤。肾上腺则出现束状带、网状带严重萎缩,细胞萎缩变小,束状带脂滴分布异常或消失。这些超微结构的损伤是导致肾阳虚大鼠垂体-肾上腺功能低下的重要原因,补肾中药能够改善垂体ACTH细胞的超微结构损伤,但对肾上腺皮质的改善不明显。

肾上腺皮质三个区带分泌醛固酮,主要受血管紧张素II和血浆Na⁺、K⁺浓度调控,束状带分泌糖皮质激素,网状带分泌性激素;后两带主要受垂体分泌的ACTH调控。ACTH不但促进糖皮质激素的合成与分泌,而且是维持束状带和网状带正常结构的决定因素^[50]。本实验中发现,肾阳虚大鼠垂体ACTH细胞存在着内质网、线粒体等超微结构的损伤,而ACTH细胞中内质网是合成ACTH的场所,线粒体是细胞进行氧化磷酸化、产生能量的场所。因此,这些超微结构的损伤,使得ACTH的合成和分泌受抑制,进而导致肾上腺结构的损伤,表现为肾上腺束状带和网状带细胞的萎缩,而最终导致糖皮质激素分泌受抑。由此可见,垂体-肾上腺的超微结构的异常是肾阳虚证的原因之一,补肾中药能够通过改善垂体ACTH细胞超微结构的损

伤而调整垂体-肾上腺的功能，而最终改善肾阳虚症状。

c-Fos 是一种存在于正常细胞核内的原癌基因，广泛存在于真核细胞基因组内，对正常细胞的分裂、生长、分化及信息识别起重要作用^[51]。c-Fos 的功能是通过它所编码的核内磷蛋白 Fos 实现的，Fos 是真核细胞内调控因子，在细胞信号传导过程中起重要作用。研究证实，至少有 3 种明确的第二信使能激活 c-Fos，即依赖甘油二酯的蛋白激酶 C (PKC)，cAMP 和 Ca²⁺钙调素复合物 (Ca²⁺-CaM)^[52]。这些第二信使通过激活 c-Fos 等一些原癌基因，生成多种多样的核蛋白，把第一和第二信使传来的信息与靶基因表型的改变耦连起来，进而调节靶基因的表达和转录速率，因此又称 c-Fos 为第三信使，它在第二信使和靶基因的表达中起着桥梁作用。c-Fos 是即刻早期基因 (immediate early gene) 家族中的一种，它的蛋白产物 Fos 参与多种形式的急性刺激^[53]，虽然肾阳虚是一种慢性虚损症状，但由于 c-Fos 基因蛋白产物在复杂的细胞信号传导过程中起着重要作用，特别是 c-Fos 基因上游调控序列含有若干个转录调控元件，其中位于 c-Fos 启动子上游 60 个碱基对处的钙反应元件 (CaRE) 决定了细胞钙可调节 c-Fos 表达^[54]。一些研究还表明，细胞内 Ca²⁺增加可能是不同刺激诱发 c-Fos 基因表达的共同机制，凡可使胞内 Ca²⁺增高的因素均可诱导 c-Fos 基因的表达^[55]。除此之外有研究表明，慢性重复性刺激亦可引起 Fos 表达^[56]，并且慢性应激可以诱导 c-Fos 持续表达^[57]。肾阳虚大鼠下丘脑、肾上腺细胞中 Ca²⁺浓度升高，补肾中药右归饮能够抑制这种 Ca²⁺浓度的升高，鉴于肾阳虚证与 Ca²⁺浓度的密切关系。原癌基因 c-Fos 被认为是细胞核内信号传导的第三信使，在信号传导中通过调节某些特殊基因的表达而将外界信号和基因表型改变耦连起来，各种细胞外信号通过三磷酸肌醇 (IP₃)、Ca²⁺、cAMP 等第二信使，诱导 c-Fos 的表达，其产物 Fos 蛋白与核蛋白 Jun 通过亮氨酸拉链形成异源二聚体蛋白激活因子 1 (AP₁)，AP₁可特异性地结合某些基因的特异位点，即 AP₁DNA 结合位点 TGACTA，诱导靶基因的表达，从而将细胞外信号转变为细胞内基因表达的刺激信号，起到调控基因表达的作用^[58]。进一步研究与 Ca²⁺-CaM 信号密切相关的 c-Fos 基因产物 Fos 蛋白的表达。发现肾阳虚时下丘脑视交叉上核和肾上腺皮质中 Fos 蛋白表达增强，补肾中药右归饮能够抑制这些细胞中 Fos 蛋白的表达。但垂体中均未见 Fos 蛋白表达。Fos 异常表达的确切机制尚不清楚，但许多研究表明，胞内 Ca²⁺浓度的升高均能够诱导 c-Fos 基因的表达，胞内升高的 Ca²⁺浓度，能够激活 CaM 形成 Ca²⁺-CaM 复合物，对转录因子进行磷酸化修饰，进而启动 c-Fos 等即早基因的转录^[59]。有文献报道，c-Fos/c-Jun 二聚体结合到 DNA 的特殊位点上是蛋白激酶调控系统的重要作用点^[60]，c-Fos 启动子含有一个经 CaMPK II 激活的第二顺式作用元件，这个 DNA 序列被认为是 CaMPK II 反应元件 (CaMRE)^[61]。因此，CaMPK II 能够诱导 Fos 蛋白的表达。Fos 蛋白的表达和许多生理反应有关，下丘脑室旁核区域 c-Fos 调控着心率及皮质醇的变化^[62]。其能够抑制糖皮质激素 (GC) 对 CRF 基因表达的影响，其表达与糖皮质激素在血液中的浓度有关^[63]；肾上腺切除后可加强 c-Fos 和 CRF 基因的表达^[64]。因此，fos 蛋白的过度表达与 Ca²⁺浓度的改变密切相关，包括与 Ca²⁺信号传递密切相关的 CaMmRNA 及 CaMPK，并与其所在细胞的特定功能密切相关，能够反映其所在细胞某种特定功能的变化。肾阳虚时下丘脑视交叉上核和肾上腺 Fos 蛋白的过度表达，与肾阳虚大鼠 Ca²⁺浓度的升高、CaMmRNA 表达及 CaMPK 活性的升高，具有因果关系，提示肾阳虚时某种因素可能诱发 Ca²⁺在胞内聚集，增高的 Ca²⁺又与 CaM 结合形成 Ca²⁺-CaM 复合物，激活 CaM 依赖的蛋白激酶，引起一系列的生理改变。同时由于 Ca²⁺-CaM 第二信使的改变，诱导 c-Fos 基因的表达，其表达产物 Fos 蛋白又作用于特定的靶基因而影响这些基因的表达，从而导致相应的功能改变。

下丘脑视交叉上核位于视交叉背侧，细胞小而密集，其传出纤维还到达下丘脑的其他核团，如结节区的室周核、腹内侧核、背内侧核、弓状核、漏斗核及正中隆起。其中视交叉上核至正中隆起的投射，参与腺垂体激素的分泌调节，如肾上腺皮质激素分泌的昼夜节律变化。肾阳虚大鼠下丘脑视交叉上核 Fos 蛋白表达的增加，说明肾阳虚时下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能紊乱可能与下丘脑视交叉上核 Fos 蛋白表达改变有关。肾阳虚时下丘脑视交叉上核 Fos 蛋白表达的增加，影响了下丘脑对垂体和肾上腺激素的分泌功能的调控，从而导致下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能紊乱。另有研究表明，急性应激 24h 后即观察不到 c-Fos 阳性细胞，而慢性应激可以诱导 c-Fos 持续存在^[65]。Smeyne 等^[66]用 Foslac Z 转基因小鼠证明，c-Fos 持续过度表达与细胞的凋亡有关。肾阳虚时肾上腺组织中 Fos 过度表达，以及 Ca²⁺、CaMmRNA 的升高等因素可能诱导了肾上腺组织的细胞凋亡，而出现肾阳虚的一系列症状。补肾中药可能通过抑制肾阳虚大鼠下丘脑视

交叉上核和肾上腺 Fos 蛋白的表达, 调整肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能, 抑制肾上腺细胞的凋亡, 从而改善肾阳虚的症状。

国内对肾虚的研究中已注意到肾阳虚患者主要表现为糖皮质激素的减少, 而盐皮质激素的变化不大。盐皮质激素以醛固酮为代表, 它不像糖皮质激素那样主要受垂体前叶分泌的 ACTH 的调节, 而主要受肾素-血管紧张素系统的调节, 尚未见肾阳虚模型大鼠的肾素-血管紧张素-醛固酮系统发生改变的报告。

3.5 性腺轴改变

杨明等^[66]用流式细胞仪分析男性肾阳虚不育症患者精液 DNA, 从 DNA 的单倍体量、二倍体量及多倍体数量发现患者精子以异常的二倍体和多倍体为主, 经益气补肾治疗后 DNA 单倍体数目则明显增多。病理研究发现^[67]“肾阳虚”模型组大鼠睾丸呈萎缩状态, 曲细精管退化变性, 管腔内生殖上皮变薄, 精子数目明显减少; 正常对照组及益气补肾组睾丸组织未见异常改变, 曲细精管内精子发生完全, 各级生精细胞排列规则。

4. 其他

4.1 免疫系统

白细胞介素 II (IL-2), 它是由 TH 细胞分泌的一种淋巴因子, 具有促进并维持 T 淋巴细胞在体内外的生长, 参与 B 淋巴细胞抗体产生, 诱导 NK 细胞增殖分化及产生干扰素等, 是体内重要的免疫调节物质^[68]。白细胞介素 II 的产生受神经内分泌的影响^{[69] [70] [71]}, 同时也对神经内分泌系统产生一定的作用^{[72] [73]}。检测白细胞介素 II 活性能从分子水平反映体内免疫功能状态。章建民^[74]等检测了皮质酮“肾阳虚”小鼠的有关免疫指标, 结果表明模型小鼠的 NK 活性、T 淋转、IL-2 水平及 r-IFN 活性均明显降低。^[75]实验性“肾阳虚”大鼠红细胞 C3b 受体花环率明显下降, 红细胞免疫复合物花环率则显著上升。

童光东等^[76]以温补培元方剂治疗后, 动物巨噬细胞功能、脾细胞自然杀伤 (NK) 细胞活性及刀豆素 A (ConA) 刺激的淋巴细胞掺入率 (LIR)、红细胞免疫以及白细胞介素 2 (IL-2) 含量均有显著改善。

有文献报道脂肪酸具有改变淋巴细胞膜的结构和 / 或改变淋巴细胞的功能, 参与 T-淋巴细胞的磷脂代谢等作用^[77]。观察皮质酮所致肾阳虚模型小鼠免疫功能低下与红细胞膜磷脂脂肪酸和血浆磷脂脂肪酸含量的变化的关系, 结果显示^[78]: 皮质酮所致肾阳虚模型小鼠的脂肪酸百分含量变化很大, 尤其是不饱和脂肪酸显著降低, 甚至缺乏 (血浆和红细胞膜磷脂脂肪酸均未检出二十碳四烯酸)。从另一角度来讲, 说明脂肪酸水平的高低直接影响机体的免疫功能活动。

4.2 微量元素变化

微量元素在生物体内的生物代谢过程中有着特定的作用, 它们通过构成关键酶、或作为关键酶的激动剂或抑制剂、或构成其他物质调节生物代谢而发挥作用。马威等^[79]通过用非线性映射方法分析肾阳虚模型组、益气补肾组及对照组的血液微量元素浓度。肾阳虚模型动物全血铜、铁、锌等元素含量与造模前相比均显著降低 ($P < 0.05$), 皮质醇降低; 益气补肾治疗后, 与肾阳虚模型相比, 肾阳虚症状缓解, 同时全血微量元素铜、铁、锌、锰、镉、镍等元素均显著性增高。锌是人体内作用最广泛的微量元素, 这是因为锌作为酶的辅助因子, 参与细胞内核酸的合成, 转录和翻译过程。柴立等^[80]通过统计对比, 发现造成肾虚的病因与引起微量元素锌缺乏的病因有 95% 相同, 提出锌是中医肾的物质基础; 刘锐^[81]测定了 38 例阳虚病人血中微量元素锌的含量发现, 它们都不同程度的低于正常人, 同时, 血锌的降低符合五脏虚损的情况, 即血锌含量为正常人 > 脾阳虚 > 肾阳虚 > 脾肾阳虚; 管竞环^[82]研究发现, 在常用的 8 味补肾中药中, 锌、锰的含量高低与其提高“肾阳虚”小鼠的 DNA 合成率的作用强弱呈正相关关系, 同时分析慢性肾衰脾肾阳虚患者体内微量元素变化, 发现均表现为血锌、锰、铁、磷缺乏。

4.3 脂质过氧化与抗氧化指标

中医理论认为: 肾主人体生长发育, 肾虚是衰老的重要原因。现代医学研究表明, 自由基损伤是衰老的重要原因之一。由此推论, 中医肾虚证与自由基代谢紊乱可能存在某种对应关系。临床研究发现^[83], 肾阳虚证患者红细胞 LPO 明显升高, SOD 活性明显降低, 提示红细胞脂质过氧化反应增强, 而清除氧自由基能力降低, 抗氧化能力降低。过多的超氧阴离子自由基可攻击细胞膜上的多元不饱和脂肪酸, 产生多种脂质过氧化物, 进而造成细胞膜的脂质过氧化损伤; 而超氧化物歧化酶活性降低, 又不足以催化超氧阴离子

自由基的歧化反应,不能有效清除生物氧化产生的超氧阴离子自由基,使细胞和组织免受损害。肾虚患者红细胞抗氧化能力降低将会影响红细胞的变形性及膜的流动性、通透性,使细胞内外钠、钾、镁、钙离子浓度失衡,引起机体功能障碍。吕爱平等^[84]采用经典方法复制肾虚证动物模型脂质过氧化物(LPO)含量增加,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及GSH-Px/LPO(抗氧化能力的重要参数)比值下降。温补脾肾药物具有降低LPO含量,提高GSH-Px活性及抗氧化能力的作用。^[85]肾虚大鼠晶体sod活性降低,lpo活性升高

4.4 线粒体磷脂变化

吕爱平等观察^[86]并对比了肾虚证动物模型大鼠治疗前后神经鞘磷脂(SM)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰甘油(CL)的含量变化。肾虚模型大鼠SM升高,PC下降,SM/PC比值升高。药物治疗后SM降低,PC升高。

还有一些学者从红细胞钠泵^[87]、耳蜗电位及毛细血管纹琥珀酸脱氢酶(SDH)^[88]、甲皱和皮肤微循环、能量代谢、水盐代谢、自由基等^[89]方面对肾虚进行了研究,均发现有异常。这些研究无疑开阔了肾虚证的研究思路,丰富了肾虚证的研究资料,为进一步研究肾虚证的本质奠定了基础。总之,由于中医的肾在五脏中居主要地位,不同于西医的肾,涉及的面又非常广,因此有关肾虚证的研究也非常广泛而丰富,目前主要集中在神经内分泌免疫系统,但要真正揭示肾虚证的本质,还需要作长期不懈的努力。

参考文献:

- [1] 吴启端,熊带水,梁文能. 肾虚动物模型的研究概况 中国实验方剂学杂志 2001, 7(6):54-56
- [2] 黄兆胜,孙维广,刘明平,等. 养寿丹对阿尔茨海默病肾虚模型大鼠学习记忆的影响[J]中成药, 2002;24(2):113-115.
- [3] 黄兆胜,刘明平,孙维广,等. 养寿丹对阿尔茨海默病肾虚大鼠脑神经递质的影响(J) 中国实验方剂学杂志, 2002;8(1):26-28.
- [4] 刘明平,黄兆胜,孙维广等. 养寿丹对Alzheimer病肾虚模型大鼠海马CA3区超微结构的影响. 中国老年学杂志. 2003;23(6):379-380.
- [5] 张艳萍,张世仪,张敏磊等. 中枢注射加压素的促记忆效应. 中国药理学与毒理学杂志, 1990;4(1):1.
- [6] 姜正国,程日华. 生长激素释放抑制因子临床应用的进展. 武汉医学杂志. 1987;11(3):187
- [7] 秦英,刘淑琴,张俐等. 大鼠下丘脑室旁核和室周核生长抑素神经元与加压素或神经降压素的共存—PAP与胶体金双标记免疫电镜观察. 第二军医大学学报, 1990;11(2):110.
- [8] 秦路平,石汉平,王洪斌等. 蛇床子香豆素对肾虚模型大鼠学习记忆和神经肽的影响 第二军医大学学报. 1997;18(2):147-149.
- [9] 郑里翔,刘晓庄,王莉等. 肾虚对大脑神经递质、胆碱酯酶的影响. 新中医 2002; 32(5): 31-32
- [10] 沈自尹. 肾的研究续集 [M]. 上海:上海科学技术出版社. 1990. 3-31.
- [11] Roisin, M. P. and Barkin, G. . Differential expression ofPKC isoforms in hippocampal neuronal cultures:modifications after basic FGF treatment. Neurochem Int, 1997, 30(3):267-270.
- [12] Ariane, P., Pascale, G., Wayne, B. A. et al. Effect ofphorbol ester on cyclic adenosine 3' 5' - monophosphate dependent protein kinase in PYS teratocarcinoma-derived cells and counteraction with retinoic acid. Cancer Research, 1988, 48:3993 - 3997
- [13] 高博,尹桂山. 补肾药对肾虚大鼠下丘脑组织蛋白激酶活性的影响中国中医基础医学杂志. 2000;6(1):30-33.
- [14] John EM, Vijaya BK, Mattammal M et al. Measurement of nitric oxide synthase and its mRNA in genetically obese(obob) mice [J] Lifesience, 1995, 57(1 4):1327-1331

- [15] 高博,姚玉霞,张效云等. 肾阳虚大鼠下丘脑神经元型N O S m R N A 表达及补肾药的调整作用中国中医基础医学杂志. 2001;7(8):23-24.
- [16] Biessel G. The calcium hypothesis of brain aging and nerve degenerative disorders:significance in diabetic neuropathy [J].Lifesci, 1996, 59:379-387.
- [17] Nicotea P, Bellomo G, and Orrenius S. Calcium mediated mechanisms in chemically induced cell death [J].Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1992, 32:449-462 .
- [18] 宋春风, 郑师陵, 吕佩源等补肾中药对肾阳虚大鼠下丘脑 垂体 肾上腺轴、血淋巴细胞 C a²⁺和血清钙的影响. 中国中医基础医学杂志. 2002;(5)34-36
- [19] Miller RJ. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis[J]. Prog Neurobiol 1991, 37:255-263.
- [20] Kirischuk S, Pronchuk N, Verkhatsky A, et al. Measurements of intracellular calcium sensory neurons of adult and old rats [J]. Neuroscience, 1992, 50:947-953
- [21] 卢文甫, 杨洪川, 范明, 等. Alzheimer 病患者海马中神经元退变与钙-钙调素的变化 [J]. 中华神经科杂志, 1996;29(5):289-292.
- [22] 万选才, 杨天祝, 徐承焘主编. 现代神经生物学 [M]. 北京 :北京医科大学中国协和医科大学联合出版社. 1998;432-437.
- [23] 李恩 .从慢性肾炎的辨证治疗谈阴阳学说的临床意义[J]. 湖南医药, 1980, (2):26-28.
- [24] 沈自尹. 肾阳虚证的定位研究 [J]. 中国中西医结合杂志. 1997;17(1):50-52.
- [25] 宋春风, 尹桂山, 李恩等. 右归饮对肾阳虚大鼠下丘脑正中隆起室管膜细胞的影响. 中国中医基础医学杂志, 2001;7(1):19-22
- [26] 蔡定芳, 沈自尹, 张玲娟, 等. 右归饮对皮质酮大鼠细胞免疫及细胞因子的影响 [J]. 中国免疫学杂志. 1995, 11(4):248-251 .
- [27] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 CRF 基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志. 1997, 17(1):39-41.
- [28] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究 [J]. 中医杂志. 1986, 27(4):32-36.
- [29] 蔡定芳, 沈自尹, 张玲娟, 等. 右归饮对皮质酮大鼠下丘脑单胺类递质含量以及体重饮食摄水的影响 [J]. 中国中西医结合杂志. 1995;15(12):728~731
- [30] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳, 等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 C R F 基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997;17(1):39~41.
- [31] 宋春风, 尹桂山, 孙素菊, 等. 右归饮对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴钙调素mRNA 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001;7(3):20~22.
- [32] 同 24
- [33] 宋春风, 尹桂山, 李向印等. 益气补肾中药对肾阳虚大鼠垂体超微结构的影响 . 中国中医基础医学杂志 1999;5(10):21-25.
- [34] 董郡主编. 病理学. 第 2 版 . 北京 :人民卫生出版社. 1996, 5-26.
- [35] 同 33
- [36] 秦路平, 张汉明, 张卫东, 等. 蛇床子素和蛇床子总香豆素对肾阳虚大鼠血清甲状腺激素和促甲状腺激素的影响 . 中国中西医结合杂志, 1996, 16(9):552-553
- [37] 宋春风, 尹桂山, 李恩. 补肾益气中药对肾阳虚大鼠垂体-甲状腺超微结构的影响, 中国中医基础医学杂志 1999;5(9):22-25.
- [38] 顾天爵. 肾阳虚病人中 17-羟类固醇排泄量的改变的观察. 中华内科杂志 1964, 12(4): 307-309.
- [39] 上海第一医学院. 医用生物化学. 上册. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 1979: 573-580.
- [40] 牛建昭, 张颖, 王志刚等. 绞股蓝总皂甙对肾上腺皮质改变的拮抗作用. 中国医药学报 1990;5(5):37-39.

- [41] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 C R F 基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志. 1997;17(1):39-41 .
- [42] Nojima H. Structural organization of multiple rat cal modulin genes [J] J. Mol. Biol. 1989, 208:269-282
- [43] Dowd D.R. Mac Donald P.N. Komn B.S. et al. Evidence for early induction of cal modeling gene expression in lymphocytes under going glucocorticoid mediated apoptosis[J]. J. Biol. Chem. 1991, 266(28):18423-18426.
- [44] Shipston M.J. and Antoni F.A. Early glucocorticoid induction of cal modulin and its suppression by corticotropin releaseing factor in pituitary corticotrope tumer(AtT20) cell. Biochem Biophys. Res Commun [J]. 1992, 189(3):1382-1388
- [45] Gannon, M.N. and McEwen, B.S. Distribution and regulation of cal modulin in mRNA in rat brain. Mol. Brain Res. [J]1994, 22 :186-192
- [46] 邝安 kun, 吴裕祈, 丁霆, 等 . 某些助阳药对于大剂量皮质素所致耗竭现象的影响 [J]. 中华内科杂志, 1963;2:113-116.
- [47] 姜春华, 沈自尹. 肾的研究 [M]. 第2版. 上海 :上海科学技术出版社, 1981. 213-223.
- [48] 顾天爵. 肾虚虚病人中 17 羟类固醇排泄量的改变的观察 [J]. 中华内科杂志, 1964, 12(4):307-309.
- [49] 秦路平, 张家庆, 石汉平等. 蛇床子香豆素对肾虚模型大鼠腺垂体 -肾上腺皮质功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1997;17(4):227-229.
- [50] 吴伟康, 侯灿. 电针“足三里”预防地塞米松引起肾上腺皮质萎缩的形态学研究 [J]. 中西医结合杂志, 1983;8(2):98100.
- [51] Walther D, Takemura M, Uhl G. Fos family member changes in nucleus caudalis neurons after primary efferent stimulation: enhancement of fos Band FOS [J]. Mol Brain Res, 1993, 17:155-159.
- [52] Morgan J.I., Curran T. Stimulus transcription coupling in neurons : role of cellular immediate early genes [J]. TINS, 1989, 12(11):459-462 .
- [53] Miyata S, Itoh T, Lin SH, et. al. Temporal changes of c-Fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine cells of the rat hypothalamus with restraint stress[J]. Brain Res. Bull, 1995, 37:391-395.
- [54] Sheng M, Dougan ST, McFododen G, et. al. Calcium and growth factor pathways of c-Fos transcriptional activation require distinct up stream regulatory sequences [J] Mol Cell Biol, 1988, 8:2787-2796.
- [55] Lerea LS, Mcnamara JQ. Ionotropic glutamate receptor subtypes activate c-Fos transcription by distinct calcium requiring intracellular signaling pathway [J] Neuron, 1993, 10:31-34.
- [56] Melia KR, Ryabini AE, Schroeder R, Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress [J]. J. Neurosci, 1994, 14:5929-5938.
- [57] Santa Umamoto, Koichi Noguchi. Repeated stress reduces the subsequent stress induced expression of Fos in rat brain[J]. Neuroscience Letters, 1994, 167:101-104
- [58] 同 52
- [59] Shimokawa N, Sugama S, Mitura M. Extracellular H^+ stimulates the expression of c-Fos/ c-jun mRNA through Ca^{2+} cal modulin in PC12 cells[J] Cell signal, 1998, 10(7):499-503 .
- [60] 卢晓虹, 李凌江. 即刻早期基因 c-fos 与心理应激的分子机制研究进展 [J]. 中国行为医学科学, 1998;7(1):77-79.
- [61] Kapiloff MS, Mathis JM, Nelson CA. calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase mediated

- a pathway for transcriptional regulation [J] Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:3710-3714.
- [62] Umemoto S. Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress the subsequent acute immobilization stress induced expression of immediate early genes but not that of NGFIA[J]. Neuroscience, 1997, 80:763-773
- [63] Senba E, Umemoto S, Kawai Y, et al. Differential expression of Fos family and Jun family mRNAs in the rats hypothalamus pituitary adrenal axis after immobilization stress [J]. Molec Brain Res, 1994, 24:283-294.
- [64] Imali I. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor antagonist attenuates c-Fos mRNA expression in the paraventricular nucleus after stress [J] Neuroendocrinology, 1995, 61(4):445-452.
- [65] Matsuda S. Persistent c-Fos expression in the brain of mice with chronic social stress [J] Neurosci Res, 1996, 26(2):157-170
- [66] 杨明, 王树声, 陈志强等. 中药对肾虚不育症患者精子 DNA 的影响. 现代中西医结合杂志 2002;11(10):889-891
- [67] 郭瑞新, 蔡承妹, 曾庆元等. 冬虫夏草提高“肾虚”小鼠生殖功能的实验研究. 基层中药杂志, 2002;16(2):3-5
- [68] Fletcher M. 白细胞介素 2 (IL-2) 的生化及药理学研究进展. 国外医学·免疫学分册. 1988;11(4):211
- [69] 苏宝田. 植物神经系统与内分泌对免疫应答的调节. 生理科学进展. 1987;18(2):107
- [70] Horst HJ. 类皮质醇与 IL-2 相互作用:抑制 IL-2 与 IL-2 受体结合. 国外医学. 免疫学分册 1988;11(1):48
- [71] 彭聿平. 神经系统和免疫系统间的相互作用. 国外医学·免疫学分册 1989;12(2):83
- [72] 陈其御. 免疫对内分泌的影响. 生理科学进展 1988;19(2):126
- [73] 黄林. 免疫系统的感觉功能. 国外医学·免疫学分册 1986;9(6):309
- [74] 章建民, 沈翔, 张红等. “肾虚”小鼠免疫功能变化. 浙江中医杂志 2000;(8):260
- [75] 李瑞荃, 王明芳, 潘学会等. “益视片”对实验性“肾虚”大鼠红细胞免疫功能的影响. 成都中医药大学学报. 1997;20(1):41-42
- [76] 童光东, 袁静, 刘惠玲等. 温补培元方对脾虚与脾肾虚模型细胞免疫功能的实验研究. 中国中西医结合消化杂志第. 2001;9(1):8-10
- [77] Usha Ponnappan, et al. Effect of Age on the Fatty Acid Composition of Phospholipids in Human Lymphocytes. Exper Gerontol, 1996, 31:125
- [78] 章建民, 张红, 周羽琪等. 肾虚模型小鼠红细胞膜磷脂脂肪酸含量变化观察. 浙江中医杂志. 2000;(3):128-129
- [79] 马威, 薛莎, 吴文莉. 肾虚模型血液微量元素的聚类分析. 数理医药学杂志 2000;13(2):127-128.
- [80] 柴立, 朱梅年. 肾藏精与微量元素. 微量元素, 1986;(1):32
- [81] 刘锐. 38 例阳虚病人血锌变化规律. 陕西中医. 1984;(4):8
- [82] 管竞环. 中医药理论量化与微量元素. 武汉:湖北科技出版社, 1998;263
- [83] 胡昭, 管益君, 张彩等. 慢性肾功能衰竭患者红细胞 SOD、LPO 与红细胞免疫功能关系的探讨. 山东医科大学学报, 1998, 36(1):56
- [84] 吕爱平, 李德新, 易杰等. 脾、肾虚模型大鼠脂质过氧化与抗氧化相关性的比较研究. 中国中医基础医学杂志. 2000;6(12):15-17
- [85] 潘学会, 邓亚平, 陈家发等. 肾与眼关系的实验研究——大白鼠肾虚模型血、晶体 SOD 和 LPD 含量测定. 西南国防医药. 1995;5(1):34-36
- [86] 吕爱平, 李德新, 崔家鹏等. 脾肾虚模型大鼠肝细胞线粒体磷脂组分变化的比较研究. 中医药学刊.

2003;21(1):78, 83

- [87] 查良伦, 沈自尹, 陈锐群等. 肾阳虚与红细胞钠泵活性 [J]. 中西医结合杂志, 1985;5(7):416-417.
- [88] 施建蓉, 张美莉, 柯雪帆. 右归丸对可的松模型豚鼠的影响[J]. 浙江中医杂志, 1993;7:328-330.
- [89] 李光海, 阎荣卫. 肾阳虚研究近况[J]. 河北中医学院学报, 1988;3(4):38-41.