

·综述·

本文引用:卢林竹,胡志希,李琳,黄鑫玲,凌志强,左世国,刘思凯,李杰.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):570-573.

“以方测证”法在动物模型研究中的运用

卢林竹,胡志希,李琳*,黄鑫玲,凌志强,左世国,刘思凯,李杰
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕近年来“以方测证”法广泛运用于实验动物证型研究,推动中医药研究发展的同时也引起了不少质疑。现针对近年来的相关文献,从理论基础、存在的问题、改进的方案与设想等方面进行综述,旨在为以后的实验研究提供新的思路。

〔关键词〕以方测证;动物模型;证型;方证对应

〔中图分类号〕R285.5;R521 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.05.028

Application of "Syndrome Differentiation through Formula Effect Assessment" in Experimental Animals Models Research

LU Linzhu, HU Zhixi, LI Lin*, HUANG Xinling, LING Zhiqiang, ZUO Shiguo, LIU Sikai, LI Jie
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 In recent years, the method of "Syndrome Differentiation through Formula Effect Assessment" is widely applied to the study of the syndrome types of experimental animals, which is of great significance to the research and development of traditional Chinese medicine. This paper is reviewed from the theoretical basis, existing problems, improved scheme and assumption based on the related literatures, which could provide new thought for experimental research.

〔Keywords〕 syndrome differentiation through formula effect assessment; animal models; pattern of syndrome; coordination between formula and pattern

实验动物模型的应用对医学的发展有重要影响,也是现代中医学研究领域不可或缺的手段。随着现代中医证候学的不断发展,关于实验动物的研究逐渐深入,目前建立动物证型模型的途径主要有两种^[1],一是正向思维,即尽可能的收集动物“四诊资料”,据此来判断证型^[2];二是逆向思维,即“以方测证”。“以方测证”或“以药测证”是基于方证对应理论,依据方剂的功效或其组成药物的功效,推测或反证其对应证候的属性^[3],应用于实验动物模型中,首先要建立某种预设证的模型,再给予针对

预设证的方剂,对由方药处理后的模型动物进行观测,经统计学方法分析后,确认方药能够改善可能与预设证有关的异常指标,据此来判定该模型为预设证模型^[4]。鉴于建立动物模型的工作将对今后中医诊断学领域的研究以及方药的临床应用意义重大,本文就近年来“以方测证”的关键问题进行了系统的分析和综述。

1 理论基础

“以方测证”作为一种方法,最初应用于中医理

〔收稿日期〕2016-06-23

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81373550,81503627);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目;湖南省教育厅基金项目(15C1054)。

〔作者简介〕卢林竹,女,在读本科生,研究方向:心血管病证本质与规律研究。

〔通讯作者〕*李琳,女,助教,主要从事心血管病证本质与规律研究,E-mail: lilin6527@qq.com

论文献研究中^[5]。《伤寒论》第351条:“手足厥寒,脉细欲绝者,当归四逆汤主之。”仅从原文所描述的一脉一症中,很难判断当归四逆汤所对应的证型和主治的具体病症,而《伤寒论》《金匱要略》中类似于此的条文比比皆是,因此后世学者、医家大多采用“以方测证”的方法进行反证,根据反证的结果和临床经验成功地完善了中医学方证理论体系。

从方法学的角度来讲,“以方测证”法具有“方证对应”的逻辑基础^[5]。有是证则用是方,方药与证候具有直接的对应关系,临床上无论采用何种辨证方法,最终必须病证相合、药证相符,才能取得临床疗效^[6]。而由于动物实验的不确定性和中医证候的复杂性,利用方药进行反证便十分重要,更有学者认为在中医“证”的动物模型中,方药治疗是检验“证”的最可靠方法^[7]。

2 动物实验中的运用

中医诊断主要依靠“望、闻、问、切”来辨证论治,而由于人体与实验动物的差异性,中医诊断中的四诊资料在实验过程中难以获取,以至于往往无证可辨。因此,“以方测证”推测动物的证型成为近年来中医动物实验的重要手段,而大部分学者的研究思路主要集中于以下几点。

2.1 验证动物模型

杨雯晴等使用“以方测证”法验证原发性高血压动物模型具有肝阳上亢证的特点^[8];刘莹等复制肾气虚哮喘大鼠病证结合模型并利用益肾喘宁片反证^[9];刘欣等通过右归丸“以方测证”确定以1.25 mL/(kg·d)薄荷油造模21 d的大鼠在一定程度上可以模拟临床阳虚证的状态^[10];黄晶晶等探讨高浓度番泻叶灌胃及负重游泳构建腹泻病气阴两虚证模型并通过“以方测证”反证建模成功^[11];郑兆晔等从“以方测证”的角度验证肺纤维化(气虚血瘀证)大鼠模型制作成功^[12]。

2.2 讨论证候属性

樊讯通过“以方测证”法证明心梗后心衰心阳虚证候大鼠在证候上兼有脾阳虚水停之证,可能为脾阳虚兼水停,或心脾两虚兼水停^[13];柴程芝等以慢性间歇性缺氧为造模手段,诱导动物表现出消瘦,烦躁,脉细数等气阴两虚证的临床特点,并采用生脉散及丹参类方在不同时程加以干预,动态考察模型的证候属性^[14];李世建等通过“以方测证”的方法,采用高效液相法观察大鼠中枢神经递质(5-HT、NE、E、

DA)及放免法检测血中ACTH的含量变化,初步推测对氯苯丙胺酸所致大鼠失眠模型的证候属性与中医心肾不交型类似^[15];林辉利用“以方测证”法,选取具有活血化瘀、补气、行气、清利湿热以及养阴作用的代表方剂对抗CCL₄对肝纤维化模型大鼠造成的慢性肝损伤,推测肝硬化形成以前的慢性肝损伤中医病机可能为湿热、气滞以及阴虚^[16];姜楠等用“以方测证”法探讨糖代谢异常的代谢综合征(MS)大鼠可能出现痰热互结证、阴虚热盛证、肝胃郁热证、血瘀络证^[17]。

2.3 反向验证药物的疗效

高昂等探索脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立方法并观察四神丸加味对模型的治疗效果,发现四神丸加味可以改善模型大鼠的相关症状及体征^[18];王英娜等由低碘致甲减机体的构建发现补中益气汤可以较好地改善甲状腺功能及形态^[19];边艳琴通过“以方测证”法阐明了茵陈蒿汤、茵陈五苓散和栀子柏皮汤都可以改善大鼠肝纤维化,但综合比较茵陈蒿汤组作用最优^[20]。

2.4 比较同病异治中不同药物的疗效差异

巨少华等基于“以方测证”思路,以佐剂性关节炎大鼠疾病模型为载体,平行比较寒热主证不同的乌头汤、白虎加桂枝汤和桂枝芍药知母汤的药效及机制异同,为中医“同病异治”提供实验依据^[21]。

3 存在的问题

3.1 实验对照设立不合理,缺乏排他性

宋红等学者在建立脾气虚证大鼠模型中用“以方测证”法来反证造模成功与否,选择方剂时只选用了黄芪建中汤,并未设立其他方剂的对照组或空白组^[22],惯性地排除了其他潜在证候,不具有严谨的排他性,得出的结论容易受到质疑,缺乏说服力。当然,已经有学者注意到这一点,但纵观现有的实验研究资料,设立对照仍过于简单,存在很多不合理的因素,实验方案有待进一步改进。

3.2 检测指标不具有特异性

很多学者在微观辨证与宏观辨证相结合的方面发现了很多微观指标,然而这些指标大部分都缺少中医学特色,也不能够广泛运用于中医学实验,缺少普遍性。同时,由于人与实验动物的差异性,这些能够反映实验动物证型的理化指标是否可以同样反映人的证型也有待商榷。

3.3 “方证对应”具有相对性

中医方与证之间的关系并不是锁定关系,一个证型有许多方剂可以进行治疗,均可取得疗效,但疗效有差异,因此方证之间的相关性蕴涵着相关程度大小的问题,只有用药配伍与特定病证的病机高度相关的治疗方药才可能取得最好的疗效,然而在现代中医证候模型研究中,仅以某方治疗某动物模型有效来判定模型的方证性质显然是不可靠的,因为实际上作用于该模型的有效方剂可能不只是一个^[4]。另外,“方证对应”的相对性也体现在中医的辨证类型的多样性(八纲辨证、脏腑辨证、气血津液辨证等),由于辨证思路的差异,造成了相关的评价标准更加难以把握。

3.4 方药具有多效用性

由方药的多效性可知,同一个方剂往往有不同的作用,如益气健脾、补血养心的归脾汤既能治疗心脾两虚证,又能治疗脾不统血证,那么在“以方测证”时,归脾汤所对应的动物证型究竟是心脾两虚证还是脾不统血证?方证并不能一一对应,因而缺乏特异性。

3.5 在逻辑学上“以方测证”是“无效”的

有学者认为“以方测证”法不是“永真式”的,“以病机命名的证候”与“以方剂命名的证候”不具有同一性,“以方测证”有可能得到“以病机命名的证候”与“以方剂命名的证候”相互交叉的部分,但那是偶然而非必然^[23];由于方药对于证型并没有一对一的关系,而药物反证无效不一定不对证,故而这种“以方测证”的认定不具有特异性^[24]。

4 改进的方案及设想

4.1 建立合适的对照组

以研究慢性肾衰大鼠模型为例:分别建立慢性肾病模型组、温补肾阳方药验证组、滋肾阴清热方药验证组、正常对照组,用腺嘌呤制高尿酸血症肾损害模型,分别用龟鹿补肾口服液、知柏地黄丸、生理盐水灌胃,观察血清尿素、肌酐含量,并与正常对照组对比,结果证明腺嘌呤所致慢性肾功能衰竭动物模型属于中医肾阳虚证候模型^[25]。另外有学者建议应用“类疗对照”“拆方对照”“同一方剂在不同证的对照”“推测性对照”“同一疾病同一证型中,功效部分相同或类似的方剂效应对照”等方法来完善以方测证的内容^[3]。如涂星根据“拆方对照”原理,将成功的

肠预激综合征腹泻型(IBS-D)模型随机分为四逆散组、痛泻要方组、肠激安方组和模型对照组,另取正常大鼠作为空白对照^[26]。

4.2 或可引用生物代谢组学,选择检测指标

代谢组学采用全面而系统的方法来理解生理病理过程,与中医的整体观和“司外揣内”的思维模式有诸多相通之处。其研究思路为:生物体系受刺激或扰动后(如将某个特定的基因变异或环境变化后),其内源性代谢产物在种类、数量上将产生规律性变化^[27]。王米渠等用基因芯片法发现寒证的基因表达谱有显著差异,在59条差异表达基因中,大多数与代谢(能量代谢、蛋白质代谢等)有关^[28];张北华发现IBS-D肝郁脾虚证大鼠模型结肠和脑组织中存在大量差异表达的蛋白,部分蛋白与临床报道一致,该模型具备IBS-D的病理特征^[29];罗和古等建立大鼠肝郁脾虚模型,通过代谢组学,可以找到中医证候的生物学基础^[30-31];童宁宁对慢性胃炎湿热蕴脾证患者和正常组唾液进行了代谢产物分析,两组代谢产物有明显区别,说明慢性胃炎湿热蕴脾证同唾液代谢产物有一定的相关性^[32];朱晓霞以前期蛋白质组学结果作为切入点,提出 β -arrestin2是介导PP2A-Akt-mTOR、ERK-BDNF信号通路、调控肝郁海马突触可塑性的关键分子,是肝郁证形成的新靶标^[33]。

4.3 多角度、多层次、多方位、多指标相结合

例如模型动物的表现,方药对模型动物症状的改善情况,各层次上的微观指标改变,以及各对照观察组的各项指标变化进行比较等^[34]。如杨雯晴等提出,对原发性高血压肝阳上亢证的判定从以下角度协同进行:从中药药物的反证进行推测,与证候相关的理化指标,以及模型动物的宏观体征与行为表现^[5]。并可以考虑通过病症证的手段以及利用药物的性味归经等特点完善“以方测证”的实验思路。

4.4 选择经典方剂

如阴虚状态使用六味地黄丸、左归丸来治疗反证,而阳虚状态则常用右归丸、金匱肾气丸等经典方及附子、肉桂、巴戟天、淫羊藿等药物^[35]。自由加减的方剂没有统一的标准,容易发生歧义,不具有说服力^[1,5,36]。

动物实验方法被引入中医药研究领域实际上是新的科学技术与中医学理论的碰撞和融合,其中难免会有波折,而“以方测证”法虽然在实验过程中暴露了诸多问题,但因其简便易行、效果明显等优点,

仍然被广泛运用。我们应当采取科学的、积极的态度,认真审视与理性分析“以方测证”的研究中存在的各种问题,使其在中医药研究中发挥更大的价值。

参考文献:

- [1] 朱龙. 浅议“以方测证”法在中医动物模型研究中的运用[J]. 甘肃中医, 2009, 22(12): 18-19.
- [2] 刘士敬, 朱倩. 大鼠胃饲秋水仙碱脾气虚模型研究[J]. 中医杂志, 1997, 38(5): 300.
- [3] 唐任欢, 杨洪军, 黄璐琦. “以方测证”方法应用的反思[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 259-260.
- [4] 刘玥, 谢鸣. 关于“以方测证”方法的思考[J]. 中医杂志, 2007, 48(5): 459-461.
- [5] 乐智卿, 陶平, 占雪平, 等. “以药测证”应用于动脉粥样硬化证候模型研究的可行性分析及存在问题[C]. 第二届江西省科协学术年会第三十六分会场暨江西省中医药学会 2012 年学术年会论文集. 2012: 296-299.
- [6] 王阶, 张兰凤, 王永炎, 等. 方证对应理论源流及临床研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(4): 13-17.
- [7] 傅晓晴. 现代医学疾病动物模型中医“证”的诊断研究思路[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(10): 868-870.
- [8] 杨雯晴, 王晓冰, 李运伦. 原发性高血压肝阳上亢证动物模型的评价与思考[J]. 山东中医杂志, 2015, (06).
- [9] 刘莹, 朱洪达, 郑小伟. 肾气虚哮喘大鼠模型建立的探索[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(10): 2365-2367.
- [10] 刘欣, 崔一然, 刘小青, 等. 右归丸干预薄荷油诱导大鼠阳虚状态的研究[J]. 中药材, 2015, 33(8): 1702-1704.
- [11] 黄晶晶, 陈炜, 赵琼, 等. 腹泻病气阴两虚证病证结合模型构建及以方测证研究[J]. 成都中医药大学学报, 2016, 39(1): 34-38.
- [12] 郑兆晔, 刘恩顺, 廉富, 等. 肺纤维化(气虚血瘀证)大鼠模型造模方法新探索[J]. 天津中医药, 2013, 30(11): 678-680.
- [13] 樊讯. 《伤寒论》温阳三方干预心肌梗后心衰心阳虚证候大鼠心室重构的比较研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2011.
- [14] 柴程芝, 寇俊萍, 王文萍, 等. 基于中医临床诊疗模式构建气阴两虚证动物模型的构想与初步探索[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2012, 14(3): 1590-1594.
- [15] 全世建, 林杏娥, 刘妮. PCPA 大鼠失眠模型的证候属性研究[J]. 中医药学刊, 2006(3): 450-451.
- [16] 林辉. “以方测证”法探讨 CCL₄ 慢性肝损伤中医病机的实验研究[J]. 中医临床研究, 2011, 3(21): 6-7.
- [17] 姜楠, 张冰冰, 蒲纪, 等. 糖代谢异常代谢综合征大鼠中医证型的以方测证法研究(I)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17): 211-216.
- [18] 高昂, 朱莹, 郑洁. 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立及四神丸加味的反证效果[J]. 中医药导报, 2016, 22(7): 28-31.
- [19] 王英娜, 牛亚欧, 李贺, 等. 原发性甲状腺功能减退症的以方测证研究[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 04: 635-637.
- [20] 边艳琴. 茵陈蒿汤及其组分复方抗肝纤维化的效应机制研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2012.
- [21] 巨少华, 陈欢, 魏江平, 等. 基于“以方测证”思路的治疗经方抗类风湿性关节炎大鼠的比较药理学研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 4-7.
- [22] 宋红, 郑小伟, 王颖. 多因素复合建立脾气虚证大鼠模型及以方测证研究[J]. 浙江中医杂志, 2008(3): 136-138.
- [23] 贾春华, 王永炎, 黄启福, 等. 以方测证法不可行论[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(12): 1549-1550.
- [24] 赵慧辉, 郭书文, 王伟. 病证结合动物模型判定标准的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(6): 365-367+373.
- [25] 孙景波, 华荣, 曾星, 等. 用以药测证原理研究慢性肾衰大鼠模型的中医证候属性[J]. 现代中医药, 2004(2): 61-63.
- [26] 涂星. 疏肝健脾止泻复方中药对 IBS-D 模型大鼠神经-内分泌-免疫网络的调控机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [27] 符强, 何立群, 黄迪, 等. 基于代谢组学的肾虚证本质研究设想[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(6): 1203-1204.
- [28] 贾伟, 蒋健, 刘平, 等. 代谢组学在中医药复杂理论体系研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8): 621-624.
- [29] 张北华. IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [30] 罗和古, 陈家旭. 代谢组学技术与中医证候的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(5): 3-5.
- [31] 罗和古, 丁杰, 岳广欣, 等. 大鼠肝郁脾虚证的代谢组学研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3): 307-313.
- [32] 童宁宁. 慢性胃炎湿热蕴脾证唾液代谢组的初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [33] 朱晓霞. 逍遥散调控海马 β -arrestin 2 介导的信号通路改善肝郁证的机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [34] 田金洲, 王永炎, 时晶, 等. 证候模型研究的思路[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(6): 18-21.
- [35] 严惠芳, 马居里. 对肾阴虚证动物实验研究的理性思考[J]. 中医药学刊, 2004(6): 998-999.
- [36] 倪莉, 张冰. 糖皮质激素诱导阴虚阳虚状态动物模型的再认识[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(5): 327-330.

(本文编辑 杨瑛)