

本文引用:董一昕,李腾辉,刘燕,孙天石,张楚焱,黄翔,李卫红.两种脾气虚证模型大鼠临床证候特征比较[J].湖南中医药大学学报,2020,40(2):150-154.

两种脾气虚证模型大鼠临床证候特征的比较

董一昕,李腾辉,刘燕,孙天石,张楚焱,黄翔,李卫红*
(北京中医药大学中医学院,北京 100029)

[摘要] **目的** 对比研究复合因素法与利血平皮下注射法所致脾气虚证模型大鼠的临床证候特征。**方法** 将30只雄性SD大鼠随机分为正常组、复合因素组及利血平组,分别采用两种方式造模后,通过一般体征指标及证候量化评分评价临床证候表现;旷场实验评价大鼠心理及自主活动;检测血清D-木糖含量判断消化吸收能力。**结果** 与正常组相比,两模型组大鼠证候量化评分总积分及各单项均升高($P<0.05$, $P<0.001$),且利血平组各个单项及总积分均高于复合因素组($P<0.05$);两组大鼠自主活动均较正常组减少($P<0.05$);与复合因素组相比,利血平组穿格次数、中央区停留时间、活动距离下降尤为明显($P<0.001$);与正常组相比,两组大鼠血清D-木糖含量均下降($P<0.01$),两模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 两种造模方式都可造成大鼠脾气虚证候,但其临床证候表现有所不同,实验时应结合需求进行选择。

[关键词] 脾气虚证;动物模型;复合因素法;利血平

[中图分类号] R965.1

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.02.006

Comparison of Clinical Syndromes of Two Spleen-Qi Deficiency Syndrome Models in Rats

DONG Yixin, LI Tenghui, LIU Yan, SUN Tianshi, ZHANG Chujun, HUANG Xiang, LI Weihong*

(School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To compare the characteristics of clinical syndromes of spleen-Qi deficiency syndromes by compound factor method and reserpine subcutaneous injection method. **Methods** A total of 30 male SD rats were randomly divided into a normal group, a compound factor group, a reserpine group. After modeling by these two methods, general characteristics of rats and syndrome quantification score was carried out to assess clinical syndromes. Open-field test was operated to evaluate the psychological and autonomous activities of rats. Content of D-xylose in rat serum was detected to evaluate the digestion and absorption function. **Results** Compared with the normal group, individual and total scores of syndrome quantification in 2 model groups were increased ($P<0.05$, $P<0.001$). The scores in the reserpine group were higher than the compound factor group ($P<0.05$). The spontaneous activity of model rats were reduced than that of the normal group ($P<0.05$). Compared with the compound factor group, the times of passing through the grille, the duration of staying at the central grille, and the movement distance were decreased significantly in reserpine group ($P<0.001$). The serum D-xylose content of the model rats was significantly decreased than that of the normal group ($P<0.01$), but there was no significant difference between the 2 model groups ($P>0.05$). **Conclusion** Both model methods can cause spleen deficiency syndrome in rats, but each has its own clinical syndromes, which could be selected according to experimental requirement.

[Keywords] spleen-Qi deficiency syndrome; animal model; compound factor method; reserpine

[收稿日期] 2019-02-14

[基金项目] 北京中医药新奥奖励基金课题(2017-XAJLJJ-002)。

[作者简介] 董一昕,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗脑病的基础研究。

[通讯作者] *李卫红,女,教授,硕士研究生导师, E-mail:liweihong.403@163.com。

脾气虚证是临床常见的中医证候,以面黄食少、便溏或泄泻、神疲乏力、少气懒言、舌淡苔白、脉虚弱为临床辨证要点。近年来对于脾气虚证的现代病理生理学基础进行了很多研究,尤其是脾气虚证动物模型的制备在脾虚证的研究中占有重要作用。自从1979年北京师范大学张启元教授^[1]以“泻下伤脾”的方式用大黄水煎液灌胃建立小鼠脾虚证模型以来,针对脾气虚证造模方法的研究日趋丰富。目前常用的造模方法主要有三大类:一是单因素造模法,如中药灌胃苦寒泻下法、小平台站立或力竭游泳等方法;二是多因素复合造模方法,常在饮食失节、过度劳倦、束缚应激、苦寒泻下等方式中选择2~3种叠加处理造模^[2];三为西药理化因素造模,如皮下注射利血平法、秋水仙碱饲喂法、X射线照射法等^[3]。这些方法都有各自的优势和弊端。本实验中从临床证候表现及生化指标方面对常用的“小承气汤灌胃+力竭游泳+隔日断食复合因素造模法”和“利血平皮下注射造模法”进行了对比研究。

1 材料

1.1 动物

健康雄性SD大鼠30只,体质量(120±20)g,由北京市斯贝福生物有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2016-0002。

1.2 药物及试剂

利血平粉末(货号:RH45599-1g,美国Bioruler公司),小承气汤配方颗粒(组成:大黄12g,枳实9g,枳实9g,厚朴6g),每克复方配方颗粒含有6.7g生药,由北京中医药大学第三附属医院提供。冰醋酸(G73562B,上海泰坦化学有限公司)、D-(+)-木糖(RB10118,美国Bioruler公司)、D-木糖测试盒(A035,南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 动物分组

适应性饲养3d后,将30只大鼠随机分为3组:正常组、小承气汤灌胃+力竭游泳+隔日断食复合因素造模组(简称复合因素组)、利血平皮下注射造模组(简称利血平组),每组10只。

2.2 两种模型制备及正常组处理

复合因素组:采用小承气汤灌胃、力竭游泳、隔日断食3种复合因素造模。具体为:将小承气汤配方颗粒配成0.35g/mL的溶液,每日上午10:00给予灌胃,给药剂量为5.25g/(kg·d),每日下午14:00将动物负载自身体质量10%的重物,放入水深约50cm、水温20℃的水池中游泳至力竭(即鼻尖完全没入水面以下5s以上判断为力竭状态);隔日上午撤去饲料,24h后再添加饲料。

利血平组:采用利血平皮下注射进行造模。以乙酸溶解利血平配成0.1mg/mL的利血平乙酸溶液,生理盐水稀释后,每天按照0.5mg/kg的剂量颈部皮下注射给药。

正常组:不造模,每日以与复合因素组同等容量,用去离子水灌胃,并在颈部皮下注射与利血平组同等容量的生理盐水,期间正常饮食饮水。

上述3组处理时间均为14d。

2.3 指标检测

2.3.1 一般情况观察 造模期间观察大鼠一般情况,如日常理毛、毛色、行为状态、活跃程度、摄食、体质量变化、大便次数与性状等。

2.3.2 症状量化积分 利用文献报道大鼠脾虚证候量化积分量表^[4-5](根据卫生部《中药治疗脾虚证的临床研究指导原则》^[6-7]的相关标准制定),对模型大鼠症状进行量化评分。见表1。

表1 脾气虚证大鼠模型症状量化积分表

症状评分	大便性状	摄食量情况	体质量增长率	精神状态	皮毛情况
0分	大便成形	正常	≥10.0%	精神饱满,反应敏捷,拉尾抵抗试验#持续时间>1min	皮毛色泽油亮
1分	便软,拉尾排便反应阳性*	摄食量减少10%~20%	7.0%~9.9%	肢体稍倦,反应较敏捷,拉尾抵抗试验#持续时间30~60s	皮毛颜色暗淡
2分	便稀,拉尾排便反应阳性*	摄食量减少20%~40%	4.0%~6.9%	乏力,眯眼,拉尾抵抗试验#持续时间5~30s	皮毛粗糙不荣,出现掉毛现象
3分	便溏,肛周污浊,拉尾排便反应强阳性*	摄食量降低超过50%,甚则不食	<4.0%	嗜睡,扎堆,闭眼,拉尾抵抗试验#持续时间<5s	枯槁无光,颜色暗淡,掉毛现象严重

注:*拉尾排便试验:一手固定鼠笼,另一手抓住大鼠尾巴中部向后上方提起约1min。若1min内有粪便排出即为阳性;#拉尾抵抗力实验:手提大鼠尾巴中部使之悬空,大鼠摇晃挣扎时开始计时直至大鼠无力旋转挣扎时为止。

2.3.3 行为学实验 造模结束后进行旷场实验,在安静的环境下将动物放入旷场箱内底面中心,底面区域被分割成25个4 cm×4 cm的方块,在正上方2 m处架摄像头同时进行摄像和计时。观察大鼠在场内活动情况,记录并分析各组大鼠在中央区停留时间百分比、旷场内行走格数、站立次数、活动距离等。

2.3.4 血清D-木糖含量检测 行为学检测结束后,将各组大鼠禁食不禁水饲养24 h,按照1 mg/0.1 kg的剂量灌服3%D-(+)-木糖水溶液,1 h后尾静脉取血检测D-木糖含量以评价消化道的吸收功能。

2.4 统计学处理

数据描述均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,用ANOVA进行单因素方差分析,均数间两两比较用SNK法进行多重比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察

造模期间正常组大鼠活动正常、体格健壮、大便正常、背毛光泽紧密、无掉毛现象;两模型组大鼠从造模第3天开始出现不同程度的扎堆无力、摄食量减少;在第1周结束时利血平组大鼠开始出现明显肛周污秽症状,而复合因素组症状不明显;两周造模结束后,复合因素组大鼠消瘦乏力、反应迟缓、大便稀软、进食量减少;利血平组症状更加明显。见图1。



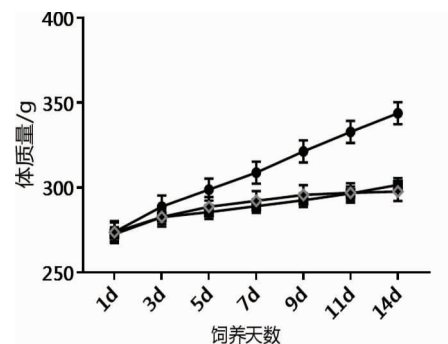
注:A.正常组;B.复合因素组;C.利血平组

图1 3组大鼠肛周情况对比

3.2 大鼠症状量化评分

各组大鼠体质量变化,两周内正常组大鼠体质量平稳上升,而两模型组从造模第3天开始体质量

就较正常组有所下降。造模第1周复合因素组大鼠体质量增长速度较利血平组慢,从第2周开始利血平组大鼠消瘦情况明显,体质量增长速度减慢,从总体变化来看,两模型组与正常组相比体质量均出现明显下降。见图2。



注:●-正常组;■-复合因素组;◆-利血平组

图2 各组大鼠体质量变化比较

根据量化积分表对动物临床证候表现进行评价,结果如表2所示,与正常组相比,两种模型大鼠的大便性状、摄食量情况、体质量增长率、精神状态、皮毛情况积分均显著升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$),总积分也显著高于正常组($P<0.001$),说明两种造模方法均诱导出了脾气虚证的典型表现。两模型组之间进行比较,利血平组在各个单项及总积分均高于复合因素组,提示利血平诱导的脾气虚证症状更为明显。

3.3 旷场实验

与正常组比较,两模型组的各项指标都有明显变化,其中穿格次数、活动距离、平均速度、站立次数均降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$),复合因素组中央区停留时间显著升高($P<0.01$),利血平组,中央区停留时间减少($P<0.01$)。两模型组相比,利血平组穿格次数、中央区停留时间、活动距离显著小于复合因素组($P<0.001$)。各组大鼠典型的运动轨迹如图3所示,正常组大鼠活动较多,活动区域以角落和四周为主,两组模型大鼠活动明显减少,尤其以利血平组变化更为显著,甚至没有形成闭合运动区域。复合因素组中心区域活动次数明显增多。见表3。

表2 各组大鼠脾气虚症状量化积分情况($\bar{x}\pm s$,分)

组别	n	大便性状	摄食量情况	体质量增长率	精神状态	皮毛情况	积分合计
正常组	10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.30±0.48	0.20±0.42	0.10±0.31	0.60±0.70
复合因素组	8	1.75±0.71*	2.00±0.53*	1.75±0.71*	1.63±0.52*	1.38±0.52	8.50±1.31***
利血平组	9	2.78±0.46***▲▲	2.89±0.35***▲▲	2.67±0.52***▲▲	2.67±0.52***▲▲	2.89±0.35***▲▲▲	13.89±0.93***▲▲▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与复合因素组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,▲▲▲ $P<0.001$

表 3 各组大鼠旷场实验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿格/次	中央区停留时间/s	活动距离/cm	平均速度/($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	站立/次
正常组	10	186.67±38.00	22.80±4.66	3 648.07±24.74	12.17±1.08	26.00±2.65
复合因素组	8	109.79±38.89*	33.62±4.52**	2 379.69±18.27***	7.96±0.60*	17.67±3.06*
利血平组	9	64.33±41.30***▲▲▲	4.80±3.42***▲▲▲	1 833.32±21.77***▲▲▲	6.11±0.74*	15.67±3.06*

注:同一时间段,与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与复合因素组比较,▲▲▲ $P<0.001$

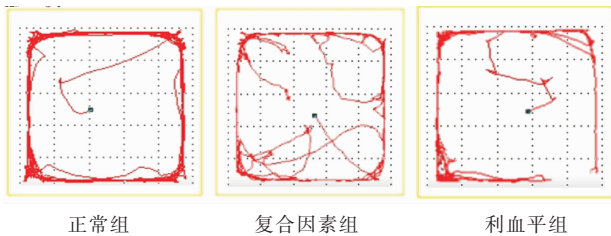


图 3 大鼠旷场内典型运动轨迹

3.4 血清 D-木糖含量

D-木糖溶液灌胃 1 h 后,检测血清 D-木糖含量,可反映大鼠胃肠的吸收功能。造模后两模型组大鼠血清 D-木糖含量均下降,与正常组比较差异具有显著统计学意义($P<0.01$);而两模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 D-木糖含量($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	n	D-木糖
正常组	10	0.79±0.03
复合因素组	8	0.41±0.03**
利血平组	9	0.39±0.01**

注:同一时间段,与正常组比较,** $P<0.01$

4 讨论

中医学理论中的“脾”具有主运化、统血、升清功能,藏意主思,为“气血生化之源”,其生理功能应包括现代医学中胃、脾、肝胆甚至大脑等脏器的部分生理功能。脾气虚证是临床最为常见的证候之一^[4],其病因多为先天禀赋不足、饮食不节、忧思劳倦过度等。现代研究表明脾虚状态下机体存在胃排空率、胃动素等水平降低^[8],能量代谢下降^[9]等多种病理改变。近年来对脾气虚证的证候实质以及健脾益气中药的药理机制研究日趋丰富,因此建立理想的动物模型尤为重要。

目前脾气虚证的造模方法多种多样,大概分为两大类,一类为模拟中医脾气虚证的病因,单一或多因素叠加进行造模,使动物出现符合脾气虚证的临床特征,但多因素叠加造模操作规范性不强,模型稳定性欠佳;另一类为西药理化因素造模,多利用西药

不良反应造成与中医脾气虚类似症状。以利血平为例,利血平属于肾上腺能神经阻断剂,可耗竭动物体内去甲肾上腺素及 5-羟色胺等的儿茶酚胺类递质,出现交感神经功能下降,副交感神经相对亢进的现象,进而表现出“脾气虚”症状,但此造模方式是否能反映脾气虚证实质还有待进一步研究。因此,本实验选用多因素复合叠加及利血平注射两种方式作为常用造模方式的代表,通过大鼠一般情况观察、症状量化评分、行为学实验、血清 D-木糖含量等指标,从临床证候以及血清生化指标角度进行评价,为脾气虚证的实验研究提供参考。

实验表明两种模型动物均出现了脾气虚类似症状,症状量化评分较正常组有明显升高。两模型组比较,利血平组摄食量、大便性状等各单项指标评分均高于复合因素组,且此组在造模后期便溏严重,理毛等自主行为次数明显降低,皮毛杂乱并粘有较多污秽。

旷场实验通过大鼠在陌生空旷场地的反应探究大鼠心理和自主活动能力,是目前最常用的行为学监测方法^[10]。大鼠进入新环境后的心理基本会经历紧张、兴奋、探索、适应等过程,其活动既表现一定的趋避性,又具有对新事物的好奇性及探索性^[11],故大鼠前期在旷场内因畏惧陌生环境多“贴墙”活动,适应后开始尝试通过中心区域。其中运动平均速度和运动距离反映了动物的活动情况;中央区停留时间代表动物启动活动的潜伏时长,反映动物对陌生环境的好奇程度;站立、理毛次数等说明动物对周围环境的满意程度,当动物精神不佳或抑郁时其上述指标会有所改变。脾气虚证常出现倦怠乏力、注意力不集中等精神症状可通过旷场实验加以评测。本实验结果显示,正常组大鼠在箱体内活动的区域主要以角落和四周为主,运动距离长,速度快,在中央区域的停留时间较短,后期垂直活动较多;而两模型组大鼠运动距离缩短,平均速度明显降低,提示模型大鼠倦怠乏力症状明显;站立次数下降,提示中枢神经系

统的兴奋性降低;通过比较两造模组运动距离和穿梭次数,提示皮下注射利血平更容易导致动物出现倦怠乏力的症状;复合因素组中央区停留时间明显高于正常组,提示该组大鼠的好奇和探索性较强,而利血平组显著低于正常组,反映了该组大鼠反应淡漠,喜欢蜷缩趋避。

D-木糖是一种五碳糖,口服后以易化扩散的形式在小肠中的空肠上段吸收^[12],不能被肝脏代谢,最终经过肾脏排出,因而血清D-木糖含量的高低可以良好地反映机体消化吸收机能的变化,这一指标经常作为脾虚模型建立是否成功的参考^[5]。本实验的结果显示两种模型大鼠的血清D-木糖含量均明显降低,说明这两种造模方法都可造成大鼠消化吸收功能下降。

综上,两种造模方式均可使模型动物出现类似“脾气虚”临床表现,但复合因素造模法更符合中医脾气虚证的病因理论,而利血平组症状更为严重,尤其是神志功能的改变,利血平组更为明显。而且在实验观察中发现,造模结束后,复合因素组的大鼠在3~4周内大部分症状都出现了不同程度的恢复,而利血平组自愈者较少,模型稳定性相对较好。总而言之,传统的基于中医病因因素造模方法与利血平皮下注射的造模方式都可以造成实验动物出现脾气虚的证候,实验时应结合需求选择更合适的造模方法,从而更好地促进脾气虚证的深入研究。

参考文献

- [1] 北京师范大学生物系消化生理教研组.脾虚证动物模型的建立及其实质的探讨[J].北京师范大学学报(自然科学版),1979(1):115.
- [2] 蒋 萃,李白雪,袁世清,等.脾虚证大鼠模型的制备方法研究进展及评价[J].环球中医药,2018,11(8):1333-1336.
- [3] 李亚欢,张冬梅,王淑艳,等.脾虚证动物模型研制概况[J].中医药导报,2019,25(1):100-102.
- [4] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等.大鼠、小鼠辨证的思路与方法[J].中国比较医学杂志,2009,19(10):53-59,85.
- [5] 易受乡,彭 艳,彭 芬,等.艾灸对脾虚大鼠小肠上皮线粒体超微结构及呼吸链酶含量的影响[J].世界华人消化杂志,2011,19(29):3028-3034.
- [6] 中华人民共和国卫生部药政局.中药治疗脾虚证的临床研究指导原则[J].中国医药学报,1988(5):71-72.
- [7] 张声生,胡 玲,李茹柳.脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志,2017,58(17):1525-1530.
- [8] 郭 蕾,李 强,陈少丽,等.补中益气汤“要药”的配伍对脾虚大鼠胃肠动力影响的机制研究[J].中华中医药学刊,2018,36(9):2156-2160.
- [9] 张亚敏,林文津,徐小妹,等.泽泻对脾虚大鼠骨骼肌线粒体结构的影响[J].中国医学创新,2018,15(5):1-4.
- [10] 连利军,李晓红,冯雯倩,等.逍遥散对慢性应激肝郁脾虚证大鼠行为学及学习记忆能力的影响[J].世界中医药,2018,13(6):1506-1509,1517.
- [11] 王维刚,刘震泽,吴文婷,等.小鼠动物实验方法系列专题(七)旷场实验在小鼠行为分析中的应用[J].中国细胞生物学学报,2011,33(11):1191-1196.
- [12] 黄 辰,李 瑛,赵 妍,等.脾虚证动物模型评价方法评述[J].辽宁中医杂志,2018,45(2):433-437,447.

(本文编辑 杨 瑛)