

肾虚血瘀证树鼩动物模型构建初探

郭尔楚¹ 黄金兰² 陈奔¹ 郭茜茜¹ 冯晓桃³ 钟振国¹

(1 广西中医药大学新药研究开发中心, 南宁, 530001; 2 徐州医科大学药学院, 徐州, 221004;

3 广西中医药大学广西中医药科学实验中心, 南宁, 530001)

摘要 目的:探索肾虚血瘀证树鼩动物模型的制做方法。方法:将树鼩随机分为对照组、模型1组(腹腔注射氢化可的松结合肾上腺素)和模型2组(腹腔注射氢化可的松结合角又菜胶),5只/组,通过观察树鼩表征、脏器指数、血液流变学、下丘脑-垂体-靶腺轴(甲状腺轴、性腺轴)激素水平的变化情况评判肾虚血瘀证模型是否建立。结果:造模后动物均出现“耗竭”现象,肾、前列腺、脾、睾丸不同程度肿大,模型2组甲状腺萎缩;模型1组血清中雌二醇(E2)和睾酮(T)水平及模型2组中甲状腺激素(FT3、FT4)、E2水平显著下降;血液流变学结果显示模型2组血液黏度和红细胞压积增高,而模型1组无显著变化。结论:腹腔注射氢化可的松与肾上腺素的方法能够较好地模拟肾虚血瘀证树鼩动物模型。

关键词 肾虚血瘀;树鼩;动物模型

Study on Tree Shrews Model of Kidney Deficiency and Blood Stasis

Guo Erchu¹, Huang Jinlan², Chen Ben¹, Guo Xixi¹, Feng Xiaotiao³, Zhong Zhenguo¹

(1 Center of Research & Development of New Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2 Department of Pharmacology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; 3 Science experiment center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract Objective: To explore the way to establish the kidney and blood stasis model in tree shrew. **Methods:** Tree shrews were randomly divided into 3 groups: normal group, model group 1 (injection of Hydrocortisone and Adrenaline) and model group 2 (injection of Hydrocortisone and Carrageenan). The kidney deficiency and blood stasis model was evaluated by observation of representation of tree shrews, detecting visceral index, hemorheology parameters and the level of hypothalamus-pituitary-target gland axis (thyroid axis, gonad axis). **Results:** The animal been treated all appeared “exhausted” phenomenon, the kidney, prostate, spleen, testis of the model groups were swelling, but the thyroid in model group 2 was atrophied. The levels of E2 and T in model group 1, levels of FT3, FT4 and E2 in model group 2 declined remarkably. The results of hemorheology showed that the blood viscosity and hematocrit increased in model group 1. **Conclusion:** The tree shrews model of kidney deficiency and blood stagnation can be established by injection of hydrocortisone and adrenaline.

Key Words Kidney deficiency and blood stasis; Tree shrew; Model

中图分类号:R228 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.003

树鼩(学名: *Tupaia belangeri*, tree shrew), 树鼩科树鼩属的动物, 分布在东南亚各国。树鼩是一种新型实验动物, 由于其解剖特征近似于人类, 已成功建立了多种人类疾病的动物模型, 并在病毒学、神经生物学、生殖生物学和社会心理学等方面有相当广泛的应用和研究^[1-2]。肾虚血瘀是目前中医较为常见的证候, 肾虚导致血瘀, 血瘀所致肾虚, 即肾虚与血瘀并见。研究发现, 肾虚血瘀与糖尿病^[3]、冠心病^[4]、高血压^[5]、慢性炎症反应^[6]等的发病有明显关系, 是各种慢性疾病某一特定阶段的共同病理变化和致病原因。目前, 对于肾虚血瘀证动物模型的

较多是由多个中医证候或病证结合引起的研究。因此, 建立稳定、重复性强的肾虚血瘀证动物模型, 能够为相关疾病治疗药物的研发提供强有力载体。研究表明, 树鼩因其许多分子与细胞结构近似人类, 具有与人相似的脑神经和视觉神经, 目前已成功用于多种人类病毒感染的动物模型的建立, 而利用树鼩构建肾虚血瘀证动物模型尚未有探索, 我们以树鼩为研究对象, 初步探索建立肾虚血瘀证动物模型的方法, 为各种慢性疾病的科研研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 10~12个月龄中缅树鼩滇西亚种,

基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻1347003-1)

作者简介:郭尔楚,男,助教,硕士学位,研究方向:新药研究与开发,E-mail:1050457662@qq.com

通信作者:钟振国,男,医学博士,研究方向:新药研究与开发,单位:广西中医药大学新药研究开发中心,地址:广西南宁市明秀东路179号广西中医药大学,邮编:530001,E-mail:gxtcmuzg@163.com

雄性,体重 120 ~ 140 g,由昆明医科大学实验动物学部提供(动物许可证号:SCXK(滇)K2013-0002)。

1.2 主要试剂与仪器 盐酸肾上腺素注射液(远大医药(中国)有限公司,批号:131204);氢化可的松注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号:1312071);角叉菜胶(Sigma公司,批号:CAS9000-07-1);水合氯醛(成都市科龙化工试剂厂,批号:20130513)。化学发光仪(UniCel DxI,型号800);血流变快测仪(重庆维多科技有限公司,FASCO系列-2050A)。

1.3 分组与造模 将树鼩随机分对照组、肾虚血瘀证树鼩动物模型1组(以下简称模型1组)和肾虚血瘀证树鼩动物模型2组(以下简称模型2组),5只/组。模型1、2组在第1~3天每天腹腔注射氢化可的松(1 mg/100 g);第4~5天继续腹腔注射氢化可的松(1.5 mg/100 g);第6~8天,模型1组每天腹腔注射肾上腺素(1mg/100 g),模型2组每天腹腔注射角叉菜胶(7.5 mg/100 g),对照组每天注射等量的生理盐水。

1.4 观察指标

1.4.1 树鼩表征变化 包括树鼩行为、体征观察及体重变化。

1.4.2 树鼩血液流变学变化 第7天,腹主动脉抽血,血液流变仪检测各组动物全血黏度、还原黏度、血浆黏度、红细胞压积、卡松黏度、卡松屈服应力以及纤维蛋白原的变化。

1.4.3 树鼩下丘脑-垂体-靶腺轴(甲状腺轴、性腺轴)变化 血液流变学检测后,将血液以3 000 r/min速度离心5 min,取上清液,化学发光法测定检测各组动物血液三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、雌二醇(E2)、睾酮(T)的含量。

1.4.4 树鼩脏器指数比较 动物称重、取血后,称取各组动物肾、前列腺、脾、甲状腺、睾丸重量,按公式[脏器指数 = 脏器湿重(g)/树鼩体重(100 g)]计算其相关指数。

1.5 统计学方法 所有数据均采用SPSS 19.0统计软件进行处理,计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据采用方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩行为、表征观察及体重变化 对照组树鼩反应灵敏、喜动、动作灵活、皮毛光泽,大便正常。模型1组和模型2组树鼩均出现明显的精神萎靡、倦怠、身体蜷缩、竖毛、少动、喜卧、皮毛蓬乱无光泽,大便干结症状。体重增加,模型1组树鼩体重变化明显高于对照组[(123.25 ± 4.99)g, (109.60 ± 6.58)g, $P = 0.024$],模型2组树鼩体重变化与对照组相似[(111.20 ± 10.20)g, (109.60 ± 6.58)g, $P = 0.751$]。

2.2 血液流变学变化

2.2.1 不同切变率状态下血液黏度的比较 与对照组比较,模型1组和模型2组树鼩还原黏度和全血黏度在不同切变率状态下均有不同程度升高,其中模型1组树鼩还原高切(100/s)黏度和全血黏度(100/s、40/s、10/s)显著高于对照组($P < 0.05$)。见表1。

2.2.2 血浆黏度、红细胞压积、卡松黏度、卡松屈服应力级纤维蛋白原的比较 由表2可知,与对照组比较,模型1组和模型2组血浆黏度、红细胞压积、卡松黏度、卡松屈服应力及纤维蛋白原均有不同程度升高,其中模型1组的各项指标差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 不同切变率状态下还原黏度、全血黏度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	还原黏度(mpa · s)			全血黏度(mpa · s)			
	高切(100/s)	中切(40/s)	低切 I (1/s)	高切(100/s)	中切(40/s)	低切 I (10/s)	低切 II (1/s)
对照组	6.7 ± 0.61	9.43 ± 0.63	22.33 ± 2.04	2.57 ± 0.19	3.05 ± 0.20	5.61 ± 0.52	6.24 ± 0.58
模型1组	7.61 ± 0.54*	9.96 ± 0.64	23.86 ± 0.53	3.2 ± 0.52*	3.95 ± 0.44*	7.0 ± 1.11*	7.8 ± 1.24*
模型2组	7.07 ± 0.64	9.36 ± 0.74	24.10 ± 0.88	2.77 ± 0.43	3.18 ± 0.52	6.29 ± 0.92	6.99 ± 1.02

注:与对照组比较 * $P < 0.05$ 。

表2 各组血浆黏度、红细胞压积、还原黏度、卡松黏度、卡松屈服应力及纤维蛋白原的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆黏度(mpa · s)	红细胞压积(L/L)	卡松黏度(mpa · s)	卡松屈服应力(mpa)	纤维蛋白原(g/L)
对照组	0.98 ± 0.20	0.23 ± 0.01	1.12 ± 0.34	6.33 ± 0.59	2.05 ± 0.42
模型1组	1.36 ± 0.19*	0.28 ± 0.05*	1.53 ± 0.21*	7.99 ± 1.26*	2.87 ± 0.39*
模型2组	1.02 ± 0.79	0.24 ± 0.04	1.43 ± 0.19	7.10 ± 1.03	2.17 ± 0.16

注:与对照组比较 * $P < 0.05$ 。

表3 各组树鼩脏器指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肾指数	脾指数	甲状腺指数	前列腺指数	睾丸指数
对照组	7.92 ± 0.37	1.65 ± 0.52	3.36 ± 0.32	0.15 ± 0.04	0.56 ± 0.11
模型1组	8.52 ± 0.26	2.33 ± 0.43	3.23 ± 0.19	0.23 ± 0.03*	0.54 ± 0.09
模型2组	8.56 ± 0.45*	2.25 ± 0.09	2.54 ± 0.19*	0.39 ± 0.03**	0.72 ± 0.05

注:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.3 脏器指数比较 与对照组比较,模型1组和模型2组的肾指数、脾指数、前列腺指数和睾丸指数数值均升高,其中模型2组的肾指数、模型1组与模型2组的前列腺指数差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而模型1组和模型2组的甲状腺指数数值偏低,数模型2组降低显著($P < 0.05$)。

2.2.4 血清中 FT3、FT4、E2、T 的比较 与对照组比较,模型1组的 FT3、E2 和 T 及模型2组的 FT3、FT4、E2 均有所下降,其中模型1组的 E2、T 水平,模型2组中的 FT3、FT4、E2 的变化差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表4 各组树鼩血清中 FT3、FT4、E2、T 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	FT3 (pmol/L)	FT4 (pmo/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/mL)
对照组	3.88 ± 0.64	8.01 ± 0.66	30.77 ± 5.95	5.46 ± 0.45
模型1组	3.28 ± 0.41	8.47 ± 0.96	20.11 ± 2.91*	1.97 ± 0.23*
模型2组	2.44 ± 0.47*	5.01 ± 1.40*	17.48 ± 2.10*	7.83 ± 2.20

注:与对照组比较 * $P < 0.05$ 。

3 讨论

肾上腺皮质激素法是最早用于制造肾虚动物模型的方法^[7],通过大剂量外源性皮质激素早期能使机体呈烦躁等肾阴虚表现,但由于肾上腺皮质激素可使促肾上腺皮质激素释放受抑制,而使类固醇激素分泌减少,所以出现一系列如体温下降、活动减少、反应迟钝、弓背蜷缩、畏寒、体毛稀疏无光泽等一系列“耗竭”现象,即出现“阴损及阳”的转变。根据《中医虚证辨证参考标准》^[8]中对虚证动物模型的诊断标准,我们观察到模型1组和模型2组树鼩精神萎靡、倦怠、身体蜷缩、竖毛、少动、喜卧、皮毛蓬乱无光泽,大便干结症状及体重增加症状,因此,本实验由氢化可的松诱导的肾虚证模型是符合要求的。

中医认为肾为先天之本,肾虚与下丘脑-垂体-靶腺轴(肾上腺轴、甲状腺轴、性腺轴)的紊乱^[9]、免疫功能下降有关。药物干预后,我们比较了对照组、模型组树鼩肾脏、脾、甲状腺、前列腺和睾丸的重量,发现与对照组比较,模型1组和模型2组的肾指数、脾指数、前列腺指数和睾丸指数数值均有不同程度的升高,说明模型动物的肾脏、脾、甲状腺、前列腺和睾丸均有不同程度的肿大,而模型1组和模型2组

的甲状腺指数数值偏低,数模型2组降低显著($P < 0.05$),提示模型2组的甲状腺有一定的萎缩现象。针对激素水平的变化,我们主要对下丘脑-垂体-甲状腺轴和下丘脑-垂体-性腺轴进行相关生化指标的测定。数据显示,与对照组比较,模型1组的 FT3 水平有下降趋势,模型2组 FT3 和 FT4 的变化下降明显($P < 0.05$)。模型1组雌二醇和睾酮水平均明显下降($P < 0.05$),模型2组中的雌二醇水平明显下降($P < 0.05$),但睾酮水平差异无统计学意义。因此,从甲状腺功能和生殖系统功能指标上评判,模型1组和模型2组在一定程度上均符合肾虚模型的要求。

李积敏在《肾虚血瘀论》认为久病则虚,虚则气血运行不畅,气血运行不畅则易产生瘀滞。瘀滞形成,则阻碍机体气血生新不顺,则机体虚弱更甚。可见肾虚与血瘀是相辅相成的。本研究过量使用氢化可的松制成肾阳虚模型的基础上分别加用肾上腺素^[10]和角叉菜胶^[11]建立血瘀模型,血液流变学考证血瘀模型的建立与否。在血液流变学检测中,全血黏度是反映血液流变学特性的直观指标,而影响全血黏度的因素有红细胞压积、血浆黏度、红细胞聚集性、红细胞变形性、血小板的凝聚性和黏附性等。实验结果显示,除了中、低切还原黏度外,模型1组树鼩的血液流变学指标与对照组比较,均明显升高($P < 0.05$),提示模型1组树鼩的血液黏度和红细胞压积增高,变形性降低等血流缓慢、循环障碍特点,血液呈现浓、黏、聚、凝的状态,符合中医血瘀证血液流变学之共性,而模型2组各项血液流变学指标与对照组比较均无差异。由此可知,模型1组造模方法能较好初步建立血瘀证树鼩模型。

综上实验结果,模型1组表现出良好的肾虚和血瘀征象,证实腹腔注射氢化可的松结合皮下注射肾上腺素的方法可较好地模拟肾虚血瘀证树鼩动物模型。

参考文献

- [1] 彭燕章,叶智彰,邹如金,等. 树鼩生物学[M]. 昆明:云南科技出版社,1991:1-4.
- [2] 徐新平,陈红波,贲昆龙. 树鼩在医学生物学中的应用[J]. 中国实验动物学报,2005,13(3):187-191.

(下接第2222页)

析系统”,结合计算机图像分析技术,对树鼩舌底、足爪、鼻唇部皮肤表征指标进行量化(即采用 RGB 值分离组合测量,通过对体表 R(红)、G(绿)、B(蓝)值的分析,反映体表颜色的变化规律)。实验结果表明,随着剂量的增加,舌底 R% 逐渐降低,G% 和 B% 逐渐上升,舌底颜色由正常的肉红色向紫色转变;足爪皮肤和鼻唇部皮肤的 R% 逐渐下降,G% 和 B% 逐渐上升,足爪颜色由肉红色向紫黑色转变,鼻唇部皮肤颜色由肉红色向深紫色转变,这与肉眼所观察到的现象是一致的。从表征角度上看,高剂量组角叉菜胶所诱导的血瘀树鼩模型更符合要求。

血液流变学的异常是血瘀证的重要病理基础之一,大多数血瘀证可导致血液浓、黏、聚、凝状态,通过对血液流变学指标的检测,可反应血液的流动性和粘滞性以及血液中红细胞和小板的聚集性、变形性等。郭淑贞^[10]等以血液流变学及超声评价小型猪冠心病血瘀证模型,赵玲^[11]等也从血液流变学的改变分析肾上腺素致大鼠血瘀证的建立,李路丹^[12]等以血糖值及血液流变学作为指标研究鬼箭羽对 2 型糖尿病血瘀证大鼠的影响。血液流变学已普遍作为血瘀证研究的重要指标。研究结果显示,高剂量组的全血黏度、红细胞压积、红细胞聚集指数、卡松屈服应力和血浆黏度均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),红细胞电泳时间显著延长($P < 0.01$),而红细胞变形指数降低($P < 0.01$),提示高剂量组血液呈高黏、浓稠的状态。

凝血四项归属于血栓性疾病检查,亦可作为检测血瘀证高凝状态的生化指标。从实验结果我们看出,中、高剂量组的 APTT、PT、TT 明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 FIB 含量增加($P < 0.01$);低剂量组的各项指标差异无统计学意义,提示中、高剂量组血液的呈高凝状态。

综合上述研究结果,我们认为高剂量的角叉菜胶 75 mg/(kg · d)连续 3 d 腹腔注射所诱导的血瘀树鼩模型更符合中医血瘀的要求,本研究将为建立角叉菜胶复制血瘀证树鼩模型的方法和条件以及今后药物干预机制的研究提供了实验依据。

参考文献

[1] FAN Y, HUANG ZY, CAO CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
 [2] 杜正彩,郝二伟,邓家刚. 寒凝血瘀证模型大鼠中医表征指标量化研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(7): 566-569.
 [3] 梁爱华,丁晓霜,李文,等. 血瘀证与血栓形成病证结合动物模型的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1613-1616.
 [4] 郝二伟,邓家刚,杜正彩,等. 平性药桃仁对寒热不同血瘀证大鼠 cAMP-PKA 信号通路的影响[J]. 中药材, 2013, 36(5): 780-783.
 [5] 范玉明,李瑞芬. 真人大造浓缩丸对角叉菜胶诱发小鼠尾部血管致瘀模型的作用[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(3): 5-6.
 [6] 杜金行,史载祥. 血瘀证中西医结合诊疗指南(修订稿)[C]. 第八次全国中西医结合血瘀证及活血化瘀研究学术大会论文集, 2010: 37-43.
 [7] 张永涛,梁嵘,王召平,等. 884 例体检人群舌色数字图像应用不同颜色模型比较[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(3): 207-209.
 [8] 许家伦,张志枫,费兆馥,等. 舌象数字图像采集条件的实验观测[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(1): 23-27.
 [9] 刘文兰,张炎,李秀惠. 亚健康状态及慢性乙型肝炎肝肾阴虚证色诊客观化比较研究[J]. 陕西中医, 2004, 30(1): 27-28.
 [10] 郭淑贞,王伟,刘涛,等. 小型猪冠心病(心肌缺血)血瘀证模型血液流变学及超声评价[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 702-705.
 [11] 赵玲,魏海峰,李雅莉,等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188-190.
 [12] 李路丹,谢梦洲,赵蒙蒙,等. 鬼箭羽对 2 型糖尿病血瘀证大鼠血糖及血液流变学的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2011, 36(2): 128-132.

(2016-10-17 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2218 页)

[3] 王静. 糖尿病肾虚证与血瘀证的相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.
 [4] 季向东,姜俊香,姜延,等. 参乌冠心颗粒治疗冠心病心绞痛肾虚血瘀证 60 例临床观察[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 9(25): 391-394.
 [5] 马民. 老年男性高血压病与中医肾虚血瘀证相关性研究[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(6): 511-512.
 [6] 卢敏,张波,邹震,等. 藤黄健骨片治疗膝关节骨性关节炎肾虚血瘀证的多中心临床观察[J]. 中国中医院骨伤科杂志, 2012, 20(7): 14-16.
 [7] 邝安莹. 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): 113-119.
 [8] 沈自尹. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中国中西医结合杂志, 1986(10): 598.
 [9] 沈自尹,王文健,陈响,等. 中肾阳虚证的下丘脑-垂体-甲状腺、性腺、肾上腺皮质轴功能的对比观察[J]. 医学研究通讯, 1983(10): 21-22.
 [10] 赵玲,魏海峰,李雅莉,等. 从血液流变学的改变分析肾上腺素致血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 188-190.
 [11] 张俊林,刘旭海,孙萍. 不同种类角叉菜胶诱导小鼠血栓模型的实验研究[J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(2): 68-69.

(2016-10-17 收稿 责任编辑:洪志强)