

肝郁证实验动物模型研究的现状及存在的问题

董宇, 彭成*

(成都中医药大学, 成都 610075)

关键词: 肝郁证; 实验动物模型

中图分类号: Q95-33

文献标识码: A

文章编号: 1000-7083(2004)01-0064-03

肝郁证 (syndrome of stagnation of the liver-qi), 是由于情志不遂, 致肝疏泄不及, 肝气郁结所表现的证候。随着生活节奏的加快, 生活压力的增加, 人们受到外界的各种压力越来越大。情志不畅、肝气不疏成为临床上常见的病因。据统计, 中医五脏中发病率最高的是肝脏^[1]。故有必要建立以动物为主体的模型来进行实验研究。但毕竟动物与人不同, 能否制造出与人的肝郁证相符的动物模型是个难点, 是值得我们思考的问题。

1 肝郁证动物模型的研究现状

自 1979 年湖南医学院用 Ccl_4 注射法建立肝郁证动物模型以来, 目前已经大约有 5 类肝郁证动物模型, 现论述如下:

1.1 Ccl_4 注射法肝郁脾虚模型

①小鼠 Ccl_4 急性中毒实验 选用体重 25~30g 雄性小鼠, 于第 1、6 日皮下注射 10% Ccl_4 糠油溶液, 每次剂量为 0.1ml/10kg 体重计算, 对照组注射等量生理盐水, 于第 8 日处死动物取材。

②大鼠 Ccl_4 急性中毒实验 选取体重 220~300g 雄性大鼠, 在第 1、4 日皮下注射纯 Ccl_4 花生油溶液, 每次剂量 0.5ml/100g 体重计算, 对照组注射等量生理盐水, 于第 6 天处死动物取材。

③大鼠 Ccl_4 慢性中毒实验 取雄性大鼠 (体重同上), 皮下注射 Ccl_4 花生油溶液, 每次剂量 0.5ml/10g 体重, 每周 2 次, 共 4 周, 首次剂量加倍, 第 30 天时处死动物取材, 对照组注射等量生理盐水。

结果发现: 模型组表现体毛干枯, 眼常闭着, 挣扎无力, 食欲降低, 体重减轻, 大便变软, 色较浅, 少数呈稀糊状。死后见肝显著肿大, 肝细胞坏死; 谷丙转氨酶 (SGT) 显著增高, 血清溴磺酞钠 (BSP) 储留量显著异常, 血清白蛋白明显降低, β 球蛋白增高, 肝灌注速度稍减慢^[2]。用疏肝健脾、行气活血为主的复方柴胡注射液治疗,

各项指标均有所好转^[3]。

1.2 夹尾法急性激怒致肝郁证模型

雄性 Wistar 远交系大鼠, 体重 300~400g, 3~7 只置于同笼, 用尖端缠有纱布的止血钳夹其中一只大鼠尾部, 令其与其他大鼠撕打, 间接激怒全笼大鼠, 用间接激怒大鼠作实验用鼠, 每次刺激 30min, 以不破皮流血为度, 每隔 3 小时刺激一次, 每天 4 次, 造模 2 天。

实验结果: 钳夹大鼠尾部时全笼大鼠激怒, 随刺激次数增加, 撕咬加剧, 3 天后, 大鼠间剧烈撕咬减弱, 饮水、食量减少, 身倦, 毛发变暗、枯黄, 体重下降。生化检查: 血小板聚集率明显升高, 全血粘度、血浆比粘度升高, 复钙时间延长, 红细胞比容减小, 血沉加快。电镜下血小板超微结构的变化: 血小板带有树枝状突起和许多微突, 并以粘连聚集者为多^[4]。对胃肠运动的研究: 胃残留率增高, 小肠推进率降低, 血浆 SS 水平增高^[5]。

1.3 捆绑式肝郁证动物模型

Wistar 大鼠, 雄性体重 $240 \pm 28\text{g}$ 。将大鼠用细条束四肢, 使行走困难, 活动受限, 然后定时观察记录大鼠状态, 时间 1 周。模型大鼠呈现: 胡须下垂, 叫声尖细, 贴边扎堆及活动、饮食减少等志和行为改变^[6]。肝组织、血浆丙二醛 (MDA) 明显增高, 肝组织、红细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 减少^[7]。肝细胞超微结构观察显示: 线粒体明显肿胀, 基质减少, 部分溶解, 内外膜结构不清, 核膜模糊, 染色质减少, 细胞膜融合, 胞浆内成分严重脱落^[8]。血浆 TBX_2 升高, 6-Keto-PGF_{1 α} 降低, $\text{TBX}_2/6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 比值升高, 红细胞膜流动性降低^[9,10]。

1.4 艾叶注射法肝郁脾虚模型

①小鼠模型: 小鼠, 雌雄各半, 体重 19~28g。50% 艾叶注射液腹腔注射, 每日 0.6ml, 45 天造模完成。

②大鼠模型: 大鼠, 100% 艾叶注射液 2ml 腹腔注射, 每日一次, 40 天造模成功。

结果: 模型动物易怒, 好斗, 咬人, 进食量少, 体重

收稿日期: 2003-06-17 修回日期: 2003-12-16

基金项目: 国家自然科学基金项目, 批准号: 39970928

*通讯作者, 成都中医药大学实验动物研究中心, 成都市十二桥路 37 号, 610075 pengchengcao@163.com

增加慢。病理检查：小鼠肝脏有灶性坏死，大鼠肝细胞肿胀，胞浆疏松出现颗粒，门区有嗜酸细胞浸润，中央静脉充血^[11]。

1.5 模具激怒肝郁模型

雌性 Wistar 大鼠，体重 300~400g，用两块厚 0.2cm、直径 4cm 的红色有机玻璃组成类似颈部枷锁形模具。模具可根据动物大小进行调节。戴模具（单笼饲养）7 天。结果：动物戴模具后暴跳，抓咬笼具，不断嘶叫。5 天后反映迟钝，行为迟缓。动物眼睛眯小，有眼屎，毛色枯黄，粪便小、干、少。尾呈棕色并有鳞片出现，消瘦，体重减轻，全血粘度升高^[12]。

2 动物模型存在的问题及解决思路

实验动物在生命科学中总是作为人的替身承担着效果和安全评价^[13]。实验动物有关疾病动物模型设计的原则有 5 点：①标准化原则：包括实验动物的标准化和动物模型的标准化。②相似性原则：复制的动物模型要与人类疾病相似。③重复性原则：理想的模型是稳定的、可以重复的。④实用性原则：能适用于临床，选用动物时要尽量选用小型化的动物。⑤经济性原则：不要盲目的选择大动物、不要盲目的选择近交系^[14]。

证候动物模型是在动物体上模拟和复制人类各种临床证候，故而决定了动物模型的诊断依据必须与临床证候的诊断依据一致。由于动物与人的某些差异，模型的诊断依据可在上述前提下做非原则性的变通，以更好地贯彻临床旨意。中医证的动物模型诊断依据包括症状（本证）、病因（正证）、治疗（反证）、相关因素（佐证）、客观指标（佐证）5 个方面^[15]。郑氏^[16]也说在模型方法的设计上应尽可能靠近中医传统病因，在症状诊断上要制定符合动物特征的、统一的诊断标准，在客观指标的确定上应根据中医理论选择与本证相关性更高、特异性更强的实验指标，在反证方药的选择上应力求标准化。

在以上理论的指导下可知，肝郁证动物模型就是要在情志刺激下制作出相应的、特定的、类似于人的行为变化的动物模型。目前肝郁证的动物模型距实际应用和人们的认识有一定的距离，主要存在以下几个问题：①缺乏对“本证”的认识。如前所述 CCl₄ 注射法、艾叶注射法，用单一的药物中毒法造出的模型，是否还属于肝郁的范畴，值得考虑；②肝郁证的致病因素是什么？《素问·阴阳应象大论》虽然对“怒伤肝”法制造的模型，是否符合该证的发病原因和临床表现呢？③是否可以用躯体刺激来替代精神刺激？肝郁证作为典型的情志病症，其病因是精神刺激。目前的肝郁模型都为躯体刺激性模型，如何评价这种情志表现，是否符合精神刺激所造成的情志改变？只有认清这些问题，才能制造出能让人接受并且实用的模型。

彭氏^[17]指出中医证候动物模型应在中医理论指导下，尽量选择符合中医病因学说的造模因子，建立符合临床病

证各项指标要求的实用的、稳定的、可靠的、可重复的动物模型，并且经复健治疗，能纠正模型动物的疾病。据此乔明琦^[18]提出解决问题的两个方面：①首先对肝郁模型的原形进行深入研究，把握证的准确的含义与范围，按科研设计进行病因、发病机理及临床表现研究，建立肝郁证的诊断标准及可能的客观指标；②对实验动物的生物学特性及其对肝郁证的表现进行研究和预试。肝气郁是肝疏泄不及所致，以情绪抑郁，功能偏低为特点的始发证，导致肝疏泄不及的主要原因为“郁怒”，即受到刺激有气不能发泄而压抑体内的愤恨，故造模法为“郁怒”。至于刺激因素多为非自然状态，躯体刺激与精神刺激的分化程度及定量也要解决^[19]，要尽量使用自然或接近自然的刺激因素^[20]。其评判标准我们可以借鉴西医抑郁证动物模型的评判标准^[21]，包括表现有效性、预期有效性和结构有效性。

动物在实验中作为人的替身与人存在着差别，但亦不可否认二者之间的可比性，人们可从这种比较中获得生命奥秘的启进和提高生命质量的真理。建立肝郁证动物模型必须在中医理论指导下进行。在完善动物模型的同时，也要完善评价动物模型的评价标准。

3 参考文献

- [1]车桂英,等.肝郁气滞证发病学及病因学探讨[J].黑龙江中医药,1989,(5):8.
- [2]湖南医学院附属第一医院基础理论研究室.肝郁脾虚的理论与实验研究[J].湖南医学院学报,1979,4(3):131.
- [3]湖南医学院附属第一医院基础理论研究室.复方柴芪注射液治疗实验性“肝郁脾虚”时有关机能生化及形态学研究[J].湖南医学院学报,1979,4(3):144.
- [4]须惠仁,傅湘琦,向丽华,等.肝郁证的动物模型研究——激怒刺激对大鼠血液流变学的影响[J].中医杂志,1991,(6)364.
- [5]聂丹丽,陈嘉屿,崔大汇,等.胃动灵对肝郁、脾虚大鼠模型胃肠运动影响的实验研究[J].陕西中医,2000,21(6):283.
- [6]乔明琦,张惠云,陈雨振,等.肝郁证动物模型研究的理论思考[J].中国医药学报,1997,12(5):42.
- [7]吕志平,刘承才.“肝郁”大鼠的脂质过氧化反应及逍遥散的保护作用[J].山东中医学院学报,1995;19(3):199.
- [8]吕志平,刘承才.肝郁动物模型肝细胞线粒体超微结构观察[J].湖南中医杂志,2000,16(5):61.
- [9]吕志平,刘承才.肝郁致瘀机理探讨[J].中医杂志,2000,41(6):367.
- [10]吕志平,刘承才.“肝郁”大鼠血浆 TXA₂、PGI₂ 水平与肝微循环变化及逍遥散作用[J].中国微循环,2000,4(3):160.
- [11]顾永华,彭绵.中医肝郁证研究概况[J].成都中医药大学学报,1987,10(3):56.

肾小球肾炎动物模型研究概况

张仲林, 彭成*

(成都中医药大学 610075)

摘要:肾小球肾炎(glomerulonephritis, GN)是泌尿系统的常见病、多发病,分为急性肾小球肾炎和慢性肾小球肾炎。本文对内源性肾小球肾炎和外源性肾小球肾炎动物模型的造模机理、造模方法等方面进行了归纳和总结。

关键词:肾小球肾炎;动物模型;造模机理;造模方法

中图分类号:Q95-33

文献标识码:A

文章编号:1000-7083(2004)01-0066-04

1900 年 Linderman 首先倡导应用动物进行有关肾炎的实验研究。他应用兔肾免疫豚鼠,然后将其血清注射健康家兔,引起蛋白尿及尿毒症,病理检查呈肾小管上皮细胞坏死。这一工作开创了实验性肾炎研究的新途径^[1]。下面从动物模型的造模机理、理论依据、造模方法等方面进行归纳综述。

1 内源性肾小球肾炎模型的研究

此型肾炎模型的抗原来自肾小球,根据抗原的种属是否相同又可分为同种免疫性抗肾小球基膜肾炎、异种免疫性抗肾小球基膜肾炎;根据致病的产物不同又可分为抗基膜性肾炎和免疫复合物性肾炎;免疫复合物性肾炎又可分为原位和循环复合物性肾炎。

1.1 肾源性肾小球肾炎模型的研究

1.1.1 同种免疫性抗肾小球基膜肾炎的研究 本型机理:动物由自体抗肾抗体或自体抗原抗体复合物刺激引起肾小球基膜产生免疫反应形成肾炎。

王照明等^[2]建立主动型 Heymann 肾炎模型:参照 Edgington 的方法提取抗原物质 Fx-IA;取雄性 SpragueDawley(SD)大鼠,模型组每只大鼠首次经后足垫注射经弗氏完全佐剂充分乳化的 Fx-IA 15mg,2 周后经背部皮下加强免疫一次,剂量为首次免疫量的一半。孙永宁^[3]先用肾皮质匀浆

加弗氏完全佐剂制备乳化液,腹腔注射同种大鼠的肾皮质加弗氏完全佐剂乳液,每次 2ml/只,每 2 周注射 1 次,造模 14 周共注射 7 次,可造成实验大鼠 HN 肾炎模型。

1.1.2 异种免疫性抗肾小球基膜肾炎的研究 本型机理:用甲种动物的肾皮质匀浆免疫乙种动物,使后者产生抗甲种动物的抗肾血清(抗肾抗体),然后将这种抗肾血清注射给健康的甲种动物,而使其产生肾炎。

杨念生等^[4]用 SD 大鼠,实验前 5 天皮下注射 5mg 正常兔免疫球蛋白和弗氏完全佐剂预免疫,5 天后静脉注射 10ml/kg 兔抗大鼠肾小球基底膜(GBM)抗血清(肾毒血清),制造出大鼠抗肾小球基底膜肾炎模型。彭建中等^[5]复制改进型肾毒血清性肾小球肾炎动物模型:70mg 兔 IgG 溶于 7ml 生理盐水中与 13ml 弗氏不完全佐剂充分混匀,每只大鼠 0.22ml 皮下多点注射。5 天后一次性尾静脉注射兔抗大鼠肾毒血清 3ml/kg。毕柳等^[6]报道,英国 Kazuhiro N 等用牛肾小球基底膜免疫 Wistar-kyoto 大鼠造成实验性自身免疫抗肾小球基底膜肾小球肾炎。戴春笋等^[7]先制备大鼠 GBM 抗原,并用大鼠 GBM 抗原制备兔抗鼠 GBM 抗血清及提纯家兔 IgG,最后用兔抗鼠 GBM 抗血清及兔 IgG 建立大鼠抗 GBM 肾炎模型:取 Wistar 雄性大鼠,将正常兔 IgG 与弗氏不完全佐剂充分混匀制成油包水剂,以 1mg/100g 注入

收稿日期:2003-11-19 修回日期:2004-01-14 作者电子邮件:zhongling9231.student@sina.com

* 通讯作者,成都市十二桥路 37 号,610075, E-mail: pengchengcao@163.com

[12] 陈小野. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京:中国协和医科大学、北京医科大学联合出版社,1993:263.

[13] 朱清华,祝庆蕃. 实验动物学[M]. 广东:广东高等教育出版社,1999:1~18.

[14] 彭成. 实验动物学教材[M]. 成都中医药大学研究生教材,2000.

[15] 陈小野. 证候动物模型诊断依据的设想与评价[J]. 中国医药学报,1987,2(1):50.

[16] 郑小伟. 脏腑兼病症动物模型研究[J]. 浙江中医学院学报,2000,24(6):7.

[17] 彭成,曹小玉. 试论中医证候动物模型的研究技术[J]. 成都中医学院学报,1989,12(3):44.

[18] 严进,王春安,叶阿莉,等. 躯体性应激和心理性应激对大鼠血浆皮质酮变化的影响[J]. 心理学报,1991,4:418.

[19] 严进,王春安,陈宜张,等. 心理应激引起大鼠行为、血浆皮质酮及脑区氨基酸水平的变化[J]. 第二军医大学学报,1997,18(4):330.

[20] 李则宜,李凌江. 应激动物模型设计的成败与思考[J]. 中国行为医学科学,2002,11(13):105.