

思路与方法

脾气虚脾不统血证候动物模型的研究思路

彭成* 罗光宇*

主题词 脾气虚 脾不统血 疾病模型, 动物

脾气虚脾不统血证候动物模型研究, 是国家中医药管理局重点资助项目。笔者根据中医理论, 结合现代科学研究方法, 选用4种动物(小鼠、大鼠、豚鼠、家兔), 18种造模方法, 50多项实验指标, 筛选建立脾不统血证候动物模型。在偏食法塑造“脾气虚证动物模型”的基础上, 用过酸法模拟成“脾不统血黑便证(上消化道出血)动物模型”, 醇酒法模拟成“脾不统血便血证(下消化道出血)动物模型”, 破血法模拟成“脾不统血肌衄证(肌肤出血)动物模型”, 并应用多学科的手段和方法, 研究脾气虚脾不统血证候动物模型的生物学特征。

1 造模方法的选择与定量

以中医饮食不节, 过食五味, 损伤脾胃的理论为指导, 尽量选择符合中医病因学的造模方法。

1.1 偏食所致动物脾虚的研究: 我们用9种方法, 8批实验, 筛选出偏食酒、醋为造模诱发因素。酒为燥烈之品, “痛饮则伤神耗血, 损胃忘精”(《本草纲目》), “劳其脾胃”(《食物本草》); 醋为味酸之剂, “味过于酸, 肝气以津, 脾气乃绝”(《素问·生气通天论》), “欲令脾实, 食勿太酸”(《素问·刺法论》)。酒醋是损伤脾胃的重要因素。我们用50%医用乙醇1ml/100g体重, 保宁醋或山西白醋(pH3)1ml/100g体重诱发wistar大鼠和英国三色短毛豚鼠, 用保宁醋或山西白醋(pH3)1ml/100g体重诱发SD大鼠, 使之出现脾气虚证。

1.2 出血诱发因素的探索: 偏食所致动物脾虚的研究发现, 脾气虚并非一定出现脾不统血。笔者研究认为, 脾气虚是脾不统血的基础, 但脾气虚衰不易直接造成气虚不摄血的病理变化, 出血要有诱发因素; 出血部位不同, 诱发因素各异。

因而, 我们在偏食脾虚动物模型的基础上, 又采用多种方法、数十批次实验, 诱发动物出血。有的方法根本不出血, 有的方法出血率仅为20~50%, 只有味酸法

(1%阿斯匹林1ml/100g体重灌胃)诱发酒醋脾虚wistar大鼠出现脾不统血黑便证(单用如此少量的阿斯匹林不出血)。醇酒之法(50%医用乙醇1ml/100g体重灌肠)诱发食醋脾虚SD大鼠出现脾不统血便血证, 破血之法(水蛭粉50mg/100g体重胃饲)诱发酒醋脾虚英国三色短毛豚鼠出现脾不统血肌衄证, 出血率达95%以上。

所以, 笔者认为, 脾气虚证动物模型的造模方法为酒醋或食醋灌胃, 脾不统血黑便证动物模型的造模方法为酒醋加阿斯匹林灌胃, 脾不统血便血证动物模型的造模方法为醋灌胃、酒灌肠, 脾不统血肌衄证动物模型的造模方法为酒醋加水蛭粉胃饲。

2 模型指标的选择及建立

2.1 模型宏观辨证指标的选择与建立: 模型宏观辨证是模型判断方面中最重要的因素, 是模型成立的关键。我们根据卫生部药政局颁布的《中药新药治疗脾虚证的临床研究指导原则》中脾气虚证、脾不统血证的辨证标准, 结合动物的生理、病理特征, 尽量客观、准确地建立模型宏观指标体系。笔者选用摄食量、大便秘结、腹形、自发活动、体重、体温六项作为脾气虚证的宏观判断指标, 脾气虚证的宏观指标加慢性出血, 作为脾不统血的宏观指标体系。

实验结果表明, 偏食脾气虚证动物模型, 出现摄食量减少、大便异常、腹胀、自发活动次数减少、体重减轻、体温下降等类同人类脾气虚证的表现, 与对照组比较, 差异明显。按中医脾气虚证进行诊断辨证, 可以判定模型动物为脾气虚证。

脾不统血黑便证动物模型, 除出现上述脾气虚证的表现外, 还有大便隐血试验阳性, 胃、十二指肠点状或片状出血, 可见为数不等、大小不一的溃疡; 脾不统血便血证动物模型, 除出现脾气虚证和大便隐血外, 结肠、直肠还可见粘膜糜烂、溃疡及出血; 脾不统血肌衄证动物模型, 除出现脾气虚证外, 还有腹部及四肢内侧皮下瘀点、瘀斑, 与对照组比较, 各项指标有显著性或极显著性差异。按中医脾不统血证进行诊断辨证, 可以判定模型动物为脾不统血证。

* 成都中医药大学, 成都市十二桥路37号(610075)

收稿日期: 1995-03-08

2.2 模型微观指标的选择与建立: 根据脾主运化升清, 脾主生血统血的中医理论, 结合临床研究实践, 建立脾气虚和脾不统血证候动物模型的微观指标体系。

实验表明, 偏食脾虚模型动物以胃、十二指肠、空肠等消化系统损害为主, 其中胃、肠粘膜萎缩、水肿及炎性细胞浸润; 胃壁细胞线粒体混浊, 嵴消失; 小肠吸收细胞线粒体嵴断裂, 微绒毛变短变细, 排列紊乱; 胃肠琥珀酸脱氢酶(SDH)、碱性磷酸酶(AKP)活性明显下降。免疫系统胸腺皮质萎缩, 髓质网状上皮细胞PAS物减少; 脾脏T、B细胞区缩小; RBC-C₃b受体粘附力降低。内分泌系统中肾上腺皮质变薄, 束状带细胞内脂质减少或消失, 胞浆红染; 甲状腺萎缩, 血浆T₄浓度降低。生殖系统中睾丸曲细精管内生精细胞层次减少, 精子数量减少; 卵泡发育障碍, 子宫内膜萎缩等多系统、多器官损害。

脾不统血黑便证(上消化道出血)模型动物可见, 胃、十二指肠点状或片状出血, 可见为数不等、大小不一的溃疡, 胃、十二指肠充血、水肿; 胃肠粘膜萎缩, 中性粘液减少, SDH、AKP活性降低; 胃酶原细胞质中有空泡, 酶原颗粒缩小, 十二指肠吸收细胞顶端微绒毛脱落、稀疏、变短。出凝血时间延长, 血红蛋白含量、红细胞总数、血小板计数下降, 凝血酶原时间、复钙时间延长。中枢免疫器官胸腺皮质淋巴细胞、髓质PAS阳性物质减少; 周围免疫器官脾脏T、B细胞区缩小; 免疫细胞减少, RBC-C₃b受体花环率、RBC-IC花环率降低。睾丸曲细精管内生精细胞层次减少, 精子数减少; 子宫内膜上皮细胞萎缩等病变。

脾不统血便血证(下消化道出血)模型动物可见, 直肠、结肠炎变明显, 粘膜有糜烂、大小不等的溃疡、出血、萎缩等病变, 粘膜下有出血、铁反应阳性; 结肠、直肠酸性粘液升高, 中性粘液降低; 空肠、直肠SDH、AKP活性降低, 表面微绒毛稀疏、脱落、长短不一、排列紊乱, 上皮细胞线粒体肿胀、嵴变浅。血液红细胞、白细胞、血小板减少, 出血时间、凝血时间延长, 凝血酶原时间、复钙时间延长, 纤维蛋白原降低, 全血粘度降低等血液学、血液流变学的变化。胸腺皮质变薄, 髓质PAS阳性物减少, 胸腺小体减少; 脾脏T、B细胞区缩小; 外周白细胞、淋巴细胞减少; RBC-C₃b受体花环率、RBC-IC花环率降低。心、肝、肾、肾上腺、脑均有不同程度的萎缩, 肝糖原减少, 舌尖肥大细胞数减少, 睾丸曲细精管内生精细胞层次减少等变化。

脾不统血肌衄证(肌肤出血)模型动物可见, 全身皮下、肌肉散见点状或片状出血, 以胸腹四肢内侧多

见。外周红细胞、白细胞、血红蛋白、红细胞压积降低, 凝血酶原时间、复钙时间延长, 全血粘度降低等血液学、血液流变学的指标呈出血现象的改变。胃粘膜萎缩, 表面微绒毛减少、脱落、粘液颗粒减少, 线粒体肿大、嵴消失, 酶原颗粒减少; 空肠炎变明显, 中性粘液降低, 肠微绒毛排列紊乱, 线粒体减少、嵴断裂或消失; 肝糖原减少, 脾脏T、B细胞区缩小等病变。

3 动物模型的复健及其佐证

复健治疗(又称反证治疗), 是进一步论证动物模型成立的重要因素。当建立稳定的动物模型后, 用相对应的方药进行治疗, 以判断模型是否成立。

偏食脾虚动物模型, 用四君子汤反证治疗, 病得以纠正, 与自然恢复组动物(动物造模后让其自然恢复, 不用药物治疗)比较有明显差异, 提示模型复健治疗成功。脾不统血黑便证、便血证、肌衄证动物模型, 用归脾丸或归脾丸加止血药(白及、三七)反证治疗, 病得以消除, 反证成功。

4 动物模型的稳定及其控制

模型是否稳定, 关系到模型能否运用, 能否作为脾气虚、脾不统血证特异性指标、病理机制、方药作用机理的研究基础。

笔者确定脾气虚证、脾不统血黑便证、便血证、肌衄证动物模型诱发因素之后, 又作了数批实验, 对造模因子进行定量, 造模环境进行控制, 造模时间进行探索, 自然恢复、反证治疗时间进行摸索, 使模型各项指标定量, 模型稳定可靠。并应用脾气虚、脾不统血证系列动物模型研究健脾益气方药、益气摄血方药的药效作用, 使动物模型更趋稳定。结果表明, 主要补气药人参、党参、黄芪、白术、山药、大枣, 补气方剂四君子汤、健脾益气散均能改善脾虚病变, 但又各具特点; 归脾丸加止血药对脾不统血黑便证的治疗作用优于单用归脾丸; 黄土汤加止血药对脾不统血便血证的治疗优于归脾丸加止血药。

5 小结

通过以上研究, 笔者认为: (1) 中医证候动物模型评价的重要因素是造模方法是否符合中医理论, 指标体系和反证治疗是否符合中医临床, 模型是否稳定可靠; (2) 脾气虚证动物模型内部结构、功能、代谢的变化, 以消化系统损害为主, 以胃肠屏障作用和胃肠细胞线粒体损害为病理基础, 以小肠吸收功能障碍为病变核心, 并累及免疫系统、内分泌系统、生殖系统等多系统、多器官损害; (3) 脾不统血是在脾气虚证的基础上, 出现血管、血液、血液流变等血循、血凝的障碍。其病理机制有待进一步深入研究。