

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.13.012

阴虚证动物模型的建立与评价

孙晓霞, 任威铭, 崔荣兴, 陈宁, 周雯, 战丽彬✉

南京中医药大学中医学院·中西医结合学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023

摘要 目的 建立阴虚证动物模型, 构建阴虚证动物模型系统性评价方法。方法 C57BLKS/J 小鼠随机分为正常组和阴虚证组, 每组 9 只。阴虚证组每日灌服浓度为 1 g/ml 的伤阴药 0.1 ml/10 g, 连续 4 周; 正常组灌服等体积超纯水。采用旷场实验观察小鼠中央格穿格次数、中央格停留时间百分比、旷场区运动总距离和速度; 动态监测小鼠体温变化, 并比较两组小鼠饮水量、唾液流率、粪便含水量、皮肤含水量、体质量、尿胆素原和尿胆红素、摄食量及拉力变化。结果 旷场实验中阴虚证组小鼠中央格穿格次数、中央格停留时间百分比、旷场区运动总距离和速度均明显高于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。灌服伤阴药 4 周后, 与本组 8:30 比较, 阴虚证组 15:00 左上肢和右下肢爪心温度升高, 20:00 四肢爪心温度均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常组比较, 第 4 周阴虚证组小鼠唾液流率、四肢皮肤含水量、体质量及食量均下降, 四肢爪心温度、饮水量均增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 尿胆素原弱阳性率、尿胆红素阳性率升高 ($P < 0.01$)。结论 耗伤阴液法能够成功建立阴虚证动物模型; 构建了基于“五心烦热、潮热、口干、皮肤干燥、形体消瘦、尿赤”的阴虚证典型表现的评价方法。

关键词 阴虚证; 证候模型; 模型评价

中医证候研究是中医现代化研究的重要组成部分。阴虚证是人体阴精或津液亏虚所导致的中医基本证候之一, 也是临床常见疾病如糖尿病、高血压病、慢性萎缩性胃炎、老年性痴呆等的主要中医证型^[1-3]。中医证候动物模型基于整体观念和辨证论治的中医思想, 结合病因病机等中医理论, 将人类疾病的某些特征在动物身上加以复制而成, 是探索证候发生与演变的重要载体^[4-5]。建立标准化的中医证候动物模型是中医药现代化研究的基本前提之一。阴虚证动物模型多采用模拟阴虚证主要病因或临床表现等方法进行造模, 但由于证候的主观性, 阴虚证动物模型评价目前存在标准不一致的问题, 制约了阴虚证科学内涵的研究进程^[6]。本研究采用阴虚证经典造模方法^[7]进行模型构建, 并创新性结合“五心烦热、潮热、口干、皮肤干燥、便干、形体消瘦、尿赤”等阴虚证典型表现制定评价指标, 探索阴虚证动物模型评价方法, 为实现阴

虚证模型评价的标准化与规范化提供思路。本实验已通过南京中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批号: 201910A033)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 6 周龄雄性 C57BLKS/J 小鼠 18 只, 体质量 18 ~ 20 g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2016-0010, 实验动物合格证号: 201935130。SPF 级环境饲养, 温度 (22 ± 3) °C。

1.2 药物

伤阴药, 由附子 (批号: 190425)、肉桂 (批号: 190509)、制吴茱萸 (批号: 190514) 按照 1:1:1 比例组成, 饮片购自南通三越中药饮片有限公司。煎煮前浸泡药材 30 min; 附子先煎, 煮沸 30 min 后, 再加入吴茱萸和肉桂; 水煎 2 次, 每次 1 h。浓缩至生药浓度 1 g/ml, 4 °C 保存。生药浓度根据动物与人体的每千克体重剂量折算系数^[8]进行换算后得出, 并已经本课题组前期研究^[9-10]证实使用该浓度药物效果最佳。

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1704400); 江苏省研究生科研创新计划 (KYCX21_1700)

✉ 通讯作者: zlbj@njucm.edu.cn, (025) 85811285

1.3 主要试剂和仪器

尿液分析试纸条 (苏州第壹制药有限公司, 批号: 190504)。旷场实验箱 (北京吉安得尔科技有限公司), 长、宽、高为 25 cm × 25 cm × 35 cm; DT-8838 型红外测温仪 (深圳市精海量电子科技有限公司); ACS-D11 型电子秤 (上海乾峰电子仪器有限公司); BSA224S-CW 型电子天平 (德国赛多利斯公司); VM-01S 型快速卤素水分测定仪 (江苏维科特仪器仪表有限公司); HKJ-SK03 型便携弹性水分油光皮肤测试仪 (日本 Huntkey 公司); ZS-ZL 型大小鼠抓力测试仪 (北京众实迪科技发展有限公司); 102 型皎洁牌中速定性滤纸 (抚顺市民政滤纸厂)。

1.4 分组及造模方法

18 只小鼠适应性喂养 3 天后, 通过 Excel 2019 软件生成随机数字, 根据体质量进行区组随机^[1]分为正常组和阴虚证组, 每组 9 只。每组小鼠数量结合预实验结果, 根据统计学中样本量估算方法^[2]确定。阴虚证组小鼠参照文献^[3], 根据“热盛伤阴”理论, 建立阴虚证动物模型: 每日灌服伤阴药, 灌胃量为 0.1 ml/10 g, 连续 4 周。正常组灌服等体积超纯水。

1.5 阴虚证模型评价方法

1.5.1 旷场实验 观察小鼠日常活动情况及易激惹程度。于实验最后 1 周末进行旷场实验, 实验观察小鼠的自发活动情况并测试其对开阔环境的焦虑行为, 评价阴虚证“烦躁”的程度。实验箱顶部正中固定一摄像头, 进行摄像和计时。运用自发活动视频追踪系统将旷场实验箱底部分为 25 cm × 25 cm 的 16 个方格。实验在安静环境中进行, 将小鼠轻柔置于实验箱中央区域, 记录小鼠在 5 min 内的活动情况, 包括小鼠在正中格停留时间及次数、运动距离、运动速度。每只小鼠实验结束后, 清理箱中粪便, 并用 75% 乙醇擦拭设备以消除气味对小鼠的影响。

1.5.2 体温测定 使用红外测温仪检测小鼠四肢爪心温度及胸前区温度及肛温。将仪器测温探头对准检测部位正中, 距离 1 ~ 2 cm, 每周 1 次, 评价“五心烦热”中“热”的表现。分别于 8: 30、15: 00 和 20: 00 检测小鼠四肢爪心温度, 每周 1 次, 评价阴虚证小鼠是否出现“潮热”症状。肛温用于评价小鼠出现“阴虚内热”程度。

1.5.3 饮水量、唾液流率测定 中速定性滤纸剪成半径约 2 cm、角度为 45° 的等大扇形, 重量差别

在 10% 以下, 用镊子夹持探入小鼠口中, 在舌面停留 5 s 后取出, 用电子天平称重, 每周 1 次, 检测小鼠唾液流率。唾液流率 (mg/s) = (滤纸湿重 - 滤纸干重) / 5 s。饮水量 = (每笼新加水量 - 24 h 后剩余水量) / 每笼鼠数; 评价小鼠“口干”情况。

1.5.4 粪便含水量测定 提起小鼠尾部, 轻轻按摩其肛门部, 促使其排便, 取刚排出的新鲜粪便 30 mg (2 或 3 粒) 放入快速卤素水分测定仪托盘中, 选择自动模式 105 °C 加热烘干, 记录粪便含水量数值, 每周 1 次。评价“便干”程度。

1.5.5 皮肤含水量测定 用剃毛器剔除小鼠背部大小约为 1 cm × 1 cm 毛发, 充分暴露背部皮肤, 此为背部皮肤含水量检测区。四肢皮肤含水量检测区为四肢爪心部位。使用便携弹性水分油光皮肤测试仪测定小鼠背部和四肢皮肤含水量, 每周 1 次。评价“皮肤干燥”程度。

1.5.6 尿胆素原和尿胆红素测定 采用尿液干化学分析方法检测尿液中尿胆红素及尿胆原含量。每周收集 1 次小鼠新鲜尿液, 将尿液分析试纸条充分浸入尿液, 在色标上按规定时间内与标准色标进行比色, 根据目测法读取结果并记录。检测结果表现为阴性 (-)、弱阳性 (+)、阳性 (++)、强阳性 (+++)。通过计算尿胆素原弱阳性率、尿胆红素阳性率, 反映小鼠尿液中尿胆素原及尿胆红素水平, 每周 1 次。评价“尿赤”程度。尿胆素原弱阳性率 = 尿胆素原弱阳性例数 / 总例数 × 100%。尿胆红素阳性率 = 尿胆红素阳性例数 / 总例数 × 100%。

1.5.7 食量、体质量测定 各组分笼喂养, 每日监测每笼小鼠摄食量, 计算各组小鼠每日平均食量, 每日平均食量 = (每笼新加后饲料量 24 h 后剩余饲料量) / 每笼鼠数; 评价小鼠是否出现“纳差”表现。用电子秤每周测 1 次小鼠体质量用于评价“形体消瘦”程度。

1.5.8 拉力测定 于实验第 4 周末进行拉力检测。抓力测试仪水平放置于操作台上, 将小鼠轻轻放置于抓力板上, 使四肢均处于抓力板内部区域, 抓住小鼠尾部轻轻向后牵拉, 待其抓牢抓力板后, 均匀用力匀速后拉, 直至小鼠四肢完全脱离抓力板, 记录小鼠的最大抓力。每只小鼠检测 3 次后取平均值。评价小鼠是否出现“乏力”症状。

1.6 统计学方法

采用 Graphpad 8.0 统计软件。计量资料以

($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠不同时间体质量、肛温、饮水量

表 1 示, 在灌服伤阴药第 1 周, 两组小鼠体质量差异不明显 ($P > 0.05$), 第 2~4 周阴虚证组体质量较正常组明显降低 ($P < 0.05$); 阴虚证组肛温第 1 周和第 3 周高于正常组 ($P < 0.05$); 阴虚证组饮水量第 1、2 周低于正常组, 第 3、4 周高于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 两组小鼠不同时间体质量、肛温、饮水指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

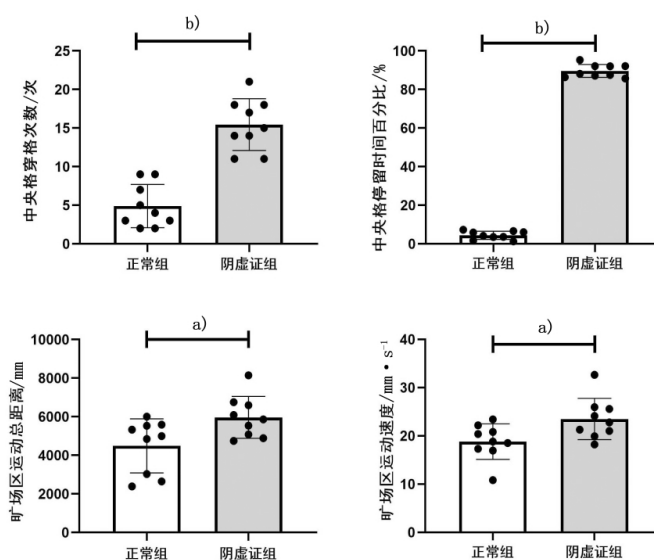
组别	时间	鼠数	体质量/g	肛温/℃	饮水量/ml
正常组	第 1 周	9	19.93 ± 1.03	36.17 ± 0.05	3.83 ± 0.01
	第 2 周	9	19.99 ± 1.13	36.30 ± 0.09	3.78 ± 0.56
	第 3 周	9	20.11 ± 1.18	36.12 ± 0.08	3.58 ± 0.16
	第 4 周	9	20.76 ± 0.91	36.21 ± 0.12	3.46 ± 0.39
阴虚证组	第 1 周	9	19.40 ± 0.49	36.31 ± 0.06 ^{a)}	3.49 ± 0.39 ^{a)}
	第 2 周	9	19.29 ± 0.93 ^{a)}	36.23 ± 0.12	3.32 ± 0.36 ^{b)}
	第 3 周	9	19.32 ± 0.77 ^{a)}	36.26 ± 0.07 ^{a)}	3.95 ± 0.43 ^{a)}
	第 4 周	9	20.03 ± 0.75 ^{a)}	36.27 ± 0.07	4.27 ± 0.42 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 两组小鼠旷场实验结果比较

灌服伤阴药期间, 阴虚证组小鼠活动度及易激惹程度高于正常组小鼠。图 1 示, 灌服伤阴药 4 周后阴虚证组小鼠的中央格穿格次数、中央格停留时间百分比、旷场区运动总距离和速度均明显高于正

常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

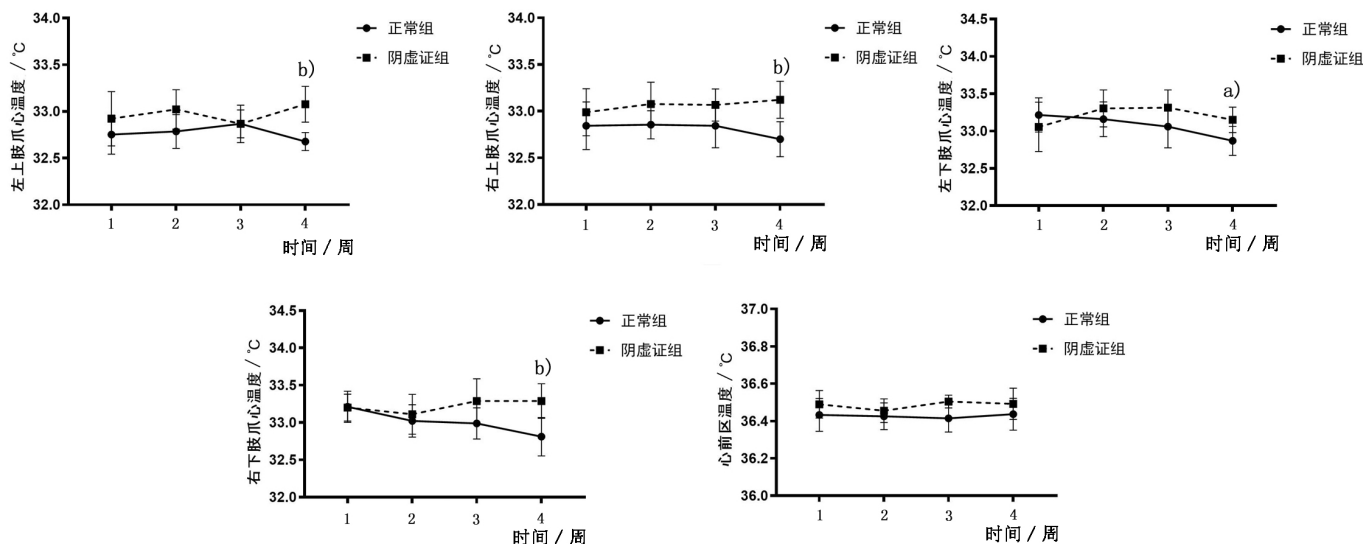
图 1 两组小鼠旷场实验结果比较

2.3 各组小鼠不同时间体温比较

图 2 示, 实验第 1~3 周, 两组四肢爪心温度及心前区温度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。第 4 周, 阴虚证组小鼠四肢爪心温度明显高于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 两组心前区温度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 两组小鼠不同时间四肢爪心温度动态变化比较

表 2 示, 与同时间正常组比较, 阴虚证组小鼠左上肢爪心温度第 2 周 20:00, 第 4 周 15:00、



注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠不同时间体温比较

表 2 各组小鼠不同时间四肢爪心温度动态变化比较

($^{\circ}\text{C}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	左上肢爪心温度	右上肢爪心温度	左下肢爪心温度	右下肢爪心温度
正常组	第 1 周	8: 30	32.62 $\pm$ 0.16	32.66 $\pm$ 0.44	33.42 $\pm$ 0.44	33.27 $\pm$ 0.37
		15: 00	32.91 $\pm$ 0.46	33.08 $\pm$ 0.41	33.37 $\pm$ 0.26	33.22 $\pm$ 0.44
		20: 00	32.93 $\pm$ 0.61	32.83 $\pm$ 0.52	33.07 $\pm$ 0.51	32.89 $\pm$ 0.59
	第 2 周	8: 30	32.82 $\pm$ 0.59	32.73 $\pm$ 0.55	33.02 $\pm$ 0.41	32.84 $\pm$ 0.38
		15: 00	33.09 $\pm$ 0.27	33.20 $\pm$ 0.31	33.33 $\pm$ 0.31	33.17 $\pm$ 0.24
		20: 00	32.71 $\pm$ 0.52	32.89 $\pm$ 0.36	33.03 $\pm$ 0.42	33.13 $\pm$ 0.47
	第 3 周	8: 30	32.74 $\pm$ 0.47	32.79 $\pm$ 0.40	32.92 $\pm$ 0.41	32.98 $\pm$ 0.35
		15: 00	32.79 $\pm$ 0.32	32.97 $\pm$ 0.21	33.07 $\pm$ 0.38	32.98 $\pm$ 0.35
		20: 00	33.08 $\pm$ 0.28	32.89 $\pm$ 0.43	33.17 $\pm$ 0.49	32.80 $\pm$ 0.61
	第 4 周	8: 30	32.61 $\pm$ 0.36	32.63 $\pm$ 0.40	32.70 $\pm$ 0.50	32.72 $\pm$ 0.59
		15: 00	32.67 $\pm$ 0.31	32.83 $\pm$ 0.27	32.72 $\pm$ 0.39	32.88 $\pm$ 0.26
		20: 00	32.71 $\pm$ 0.49	32.72 $\pm$ 0.47	33.00 $\pm$ 0.50	32.91 $\pm$ 0.50
阴虚证组	第 1 周	8: 30	32.61 $\pm$ 0.50	32.80 $\pm$ 0.38	32.72 $\pm$ 0.48 ^{b)}	32.78 $\pm$ 0.41
		15: 00	32.80 $\pm$ 0.55	33.07 $\pm$ 0.53	33.09 $\pm$ 0.38	33.27 $\pm$ 0.48
		20: 00	33.07 $\pm$ 0.53	33.02 $\pm$ 0.32	33.18 $\pm$ 0.52	33.17 $\pm$ 0.45
	第 2 周	8: 30	32.64 $\pm$ 0.39	32.52 $\pm$ 0.31	32.91 $\pm$ 0.59	32.56 $\pm$ 0.30
		15: 00	33.18 $\pm$ 0.19	33.32 $\pm$ 0.37 ^{d)}	33.34 $\pm$ 0.38	33.30 $\pm$ 0.34 ^{d)}
		20: 00	33.27 $\pm$ 0.42 ^{b) c)}	33.30 $\pm$ 0.40 ^{c)}	33.49 $\pm$ 0.45	33.36 $\pm$ 0.30 ^{d)}
	第 3 周	8: 30	32.38 $\pm$ 0.26	32.67 $\pm$ 0.33	33.48 $\pm$ 0.43 ^{a)}	33.23 $\pm$ 0.62
		15: 00	32.86 $\pm$ 0.24 ^{c)}	33.21 $\pm$ 0.28 ^{d)}	33.13 $\pm$ 0.35	33.40 $\pm$ 0.28 ^{a)}
		20: 00	33.16 $\pm$ 0.45 ^{d)}	33.10 $\pm$ 0.32 ^{c)}	33.19 $\pm$ 0.37	33.59 $\pm$ 0.56 ^{b)}
	第 4 周	8: 30	32.59 $\pm$ 0.24	32.78 $\pm$ 0.16	32.83 $\pm$ 0.15	32.83 $\pm$ 0.25
		15: 00	33.14 $\pm$ 0.31 ^{b) c)}	33.27 $\pm$ 0.30	33.20 $\pm$ 0.34 ^{a)}	33.46 $\pm$ 0.26 ^{b) c)}
		20: 00	33.30 $\pm$ 0.32 ^{a) d)}	33.41 $\pm$ 0.40 ^{b) c)}	33.42 $\pm$ 0.35 ^{c)}	33.41 $\pm$ 0.31 ^{c)}

注: a) 与同时间正常组比较, $P < 0.05$; b) 与同时间正常组比较, $P < 0.01$; c) 与本组 8: 30 温度比较, $P < 0.05$; d) 与本组 8: 30 温度比较, $P < 0.01$ 。

20: 00 均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 右上肢爪心温度第 4 周 20: 00 升高 ($P < 0.01$); 左下肢爪心温度第 1 周 8: 30 降低, 第 3 周 8: 30、第 4 周 15: 00 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 右下肢爪心温度第 3 周 15: 00、20: 00, 第 4 周 15: 00 升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其他时间点两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

阴虚证组第 1 周小鼠四肢爪心温度各时间点差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 第 2 周 15: 00 右上肢及右下肢爪心温度明显高于 8: 30 ($P < 0.01$), 20: 00 的双上肢和右下肢爪心温度高于 8: 30 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 3 周双上肢爪心温度 15: 00、20: 00 明显高于 8: 30 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 4 周, 与 8: 30 比较, 15: 00 左上肢和右下肢爪心温度升高, 20: 00 四肢爪心温度均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 8: 30 相比, 实验第 1~4 周正常组 15: 00、20: 00 四肢爪心温度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 两组小鼠不同时间唾液流率、粪便含水量及食量比较

表 3 示, 与正常组相比, 实验第 1~3 周阴虚证组唾液流率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),

第 4 周阴虚证组小鼠唾液流率明显降低 ($P < 0.01$); 两组各时间小鼠粪便含水量比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 阴虚证组各时间食量均较正常组明显降低 ($P < 0.01$)。

表 3 两组小鼠不同时间唾液流率、粪便含水量、食量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	唾液流率 /mg · s ⁻¹	粪便含水量 /%	食量/g
正常组	第 1 周	9	0.91 $\pm$ 0.54	46.73 $\pm$ 8.30	3.09 $\pm$ 0.12
	第 2 周	9	1.08 $\pm$ 0.62	42.70 $\pm$ 13.03	3.07 $\pm$ 0.15
	第 3 周	9	0.90 $\pm$ 0.29	47.20 $\pm$ 3.08	3.09 $\pm$ 0.18
	第 4 周	9	1.36 $\pm$ 0.34	42.83 $\pm$ 6.91	3.11 $\pm$ 0.12
阴虚证组	第 1 周	9	0.56 $\pm$ 0.21	45.77 $\pm$ 3.49	2.66 $\pm$ 0.11 ^{a)}
	第 2 周	9	0.69 $\pm$ 0.35	42.11 $\pm$ 5.75	2.62 $\pm$ 0.01 ^{a)}
	第 3 周	9	0.58 $\pm$ 0.27	48.05 $\pm$ 8.47	2.80 $\pm$ 0.21 ^{a)}
	第 4 周	9	0.50 $\pm$ 0.20 ^{a)}	43.24 $\pm$ 4.05	2.66 $\pm$ 0.07 ^{a)}

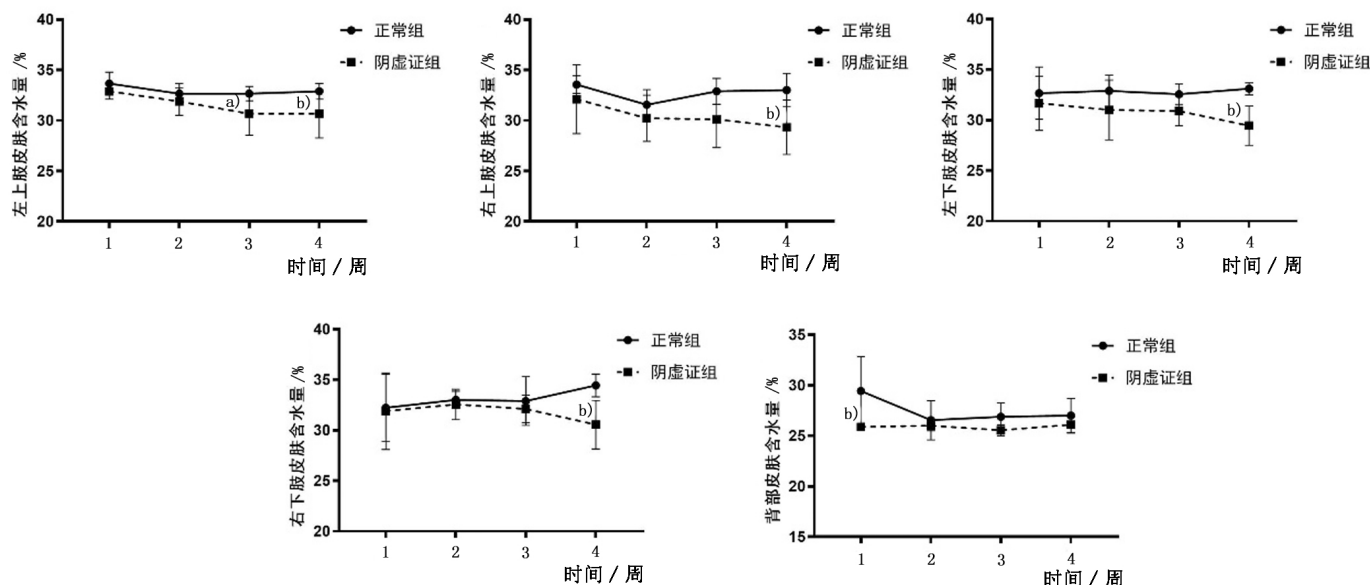
注: a) 与正常组同时间比较, $P < 0.01$ 。

2.6 两组小鼠拉力比较

实验第 4 周末, 阴虚证组小鼠拉力为 (0.12 $\pm$ 0.02) kg, 正常组为 (0.13 $\pm$ 0.01) kg, 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.7 两组小鼠不同时间皮肤含水量比较

图 3 示, 与正常组相比, 第 1、2 周阴虚证组小鼠左上肢皮肤含水量差异均无统计学意义 ($P >$



注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与正常组比较, $P < 0.01$ 。

图3 各组小鼠不同时间皮肤含水量比较

0.05), 第3、4周均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与正常组比较, 第1~3周阴虚证组小鼠右上肢、双下肢皮肤含水量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 第4周均显著降低 ($P < 0.01$); 与正常组比较, 第1周阴虚证组小鼠背部皮肤含水量降低 ($P < 0.01$), 第2~4周差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.8 两组小鼠不同时间尿胆素原及尿胆红素情况比较

表4示, 阴虚证组尿胆素原弱阳性率在第4周高于正常组, 尿胆红素阳性率在1~4周均高于正常组 ($P < 0.01$)。

表4 各组小鼠不同时间尿胆红素、尿胆素原阳性情况比较 [(%)]

组别	时间	鼠数	尿胆素原弱阳性	尿胆红素阳性
正常组	第1周	9	1 (11.1)	0
	第2周	9	1 (11.1)	0
	第3周	9	0	0
	第4周	9	0	0
阴虚证组	第1周	9	1 (11.1)	6 (66.7)
	第2周	9	1 (11.1)	7 (77.8)
	第3周	9	0	6 (66.7)
	第4周	9	2 (22.2)	8 (88.9)

3 讨论

在中医药理论指导下建立动物模型更为符合中医临床疾病的发生规律^[4]。病因学说是建立证候模型的重要基础和依据, 通过病因学说探索证候本身的动态变化过程, 是实现中医学理论突破的关

键^[5]。《医宗金鉴·删补名医方论》言“大热则伤阴。”过服辛温燥热之品导致阴液暗耗是阴虚证的主要病因之一。在众多阴虚证造模方法中, 耗伤阴液法是目前应用较为广泛、认可程度较高的一种^[6]。该方法符合中医病因学认识, 且与甲状腺素类、肾上腺素类激素造模法和去势等手术造模法相比, 病理机制单纯, 造模因素可控性强, 不会对实验动物造成器质性损伤, 并可与其他疾病模型结合使用。对于造模时间的把控是决定模型能否成功建立的重要环节。研究^[7]表明, 使用热性中药造模4周建立的阴虚证模型基本符合阴虚内热证慢性形成的要求。此外, 有学者以温燥、辛热、利水中药组成的耗阴复方连续灌胃小鼠4周, 成功制备了阴虚证动物模型^[8]。故本实验基于前期研究^[9-10, 19], 采用辛温燥热之品 (附子、肉桂、吴茱萸) 灼伤阴津, 造成体内营阴暗耗, 机体失养, 阴不制阳, 虚热内生, 成功复制了与中医理论及阴虚证临床特征较符合的阴虚证动物模型。

模型评价是证候模型研究的重中之重, 关系到动物模型的重复性、稳定性及实验结果的科学性、真实性^[20]。症状与体征是机体内在病理状态的外在表现, 是中医辨证论治的主要依据^[21], 应遵循临床证候的诊断标准, 并通过相似临床意义的等效转化以建立科学的证候模型评价方法。因此, 建立基于中医典型证候表现的系统性模型评价方法, 对于探索中医证候模型具有重要意义。阴虚证主要表现为形体消瘦、口燥咽干、五心烦热、潮热盗汗、

小便短黄、大便干结、舌红少津、少苔、脉细数等。阴不制阳，虚热内生，则见五心烦热、潮热盗汗；阴液亏虚，失于濡养，则见形体消瘦、口干、便干、尿赤等^[2]。本研究将五心烦热、潮热、口干、皮肤干燥、便干、形体消瘦、尿赤作为评判阴虚证的主要表征，结合阴虚证基本病机，基于中医典型证候表现制定了系统性模型评价方法。灌服伤阴药期间，阴虚证组小鼠活动度及易激惹程度明显高于正常小鼠，皆为虚性亢奋的表现。针对阴虚证所表现出阴虚阳亢之象，本实验通过旷场实验反映小鼠烦躁的程度。旷场实验是通过观察动物在陌生空旷环境中的自发活动以评价动物的焦虑状态。进入新环境后，动物的活动在表现趋避性的同时，又表现出对新事物的好奇与探索^[3]。中央区停留时间百分比及穿梭次数反映了小鼠对新环境的探索；旷场实验中小鼠在旷场区运动的总距离和速度反映了小鼠的自发活动情况^[4]。阴虚证组小鼠中央格穿梭次数、中央区停留时间百分比明显高于正常组，说明阴虚证小鼠进入陌生开阔环境后更焦虑。同时，阴虚证组小鼠在旷场区的运动距离及速度也高于正常组小鼠，提示灌服伤阴药 4 周后，阴虚证组小鼠的焦虑行为更为明显，相比于正常小鼠出现明显的烦躁表现。

阴虚证发热特点以午后和夜间有低热，兼见五心烦热为主，又称虚热证。手足为脾之外候，掌心属阴，阴液不足，虚火内扰，则见潮热盗汗、五心烦热等表现。《理虚元鉴·虚火伏火论》曰“其心中疼热，兼及手足心俱热者为五心烦热”，明确了五心烦热是指手足心及心胸烦热之病症。研究^[5]显示，阴虚证患者手足心温度改变与五心烦热之间具有相关性，可作为五心烦热客观表达的方法之一。本实验通过检测小鼠四肢爪心温度、心前区温度及肛温改变，更为全面地反映阴虚证小鼠模型所出现的体温变化情况。本研究发现，灌服伤阴药 4 周后阴虚证小鼠四肢爪心温度出现了明显上升，心前区温度和肛温未见显著性差异，说明阴虚证模型小鼠浅表部位体温升高较为明显。这可能与机体深部体温较为恒定，浅表体温较为多变有关。浅表体温是体温调节中枢对外界环境变化作出适应性调节的直接反映，故小鼠四肢爪心温度更显著地反映了体温的改变^[6]。此外，午后潮热是阴虚证常见临床表现。午后外界阳气渐消，阴气渐盛，可助体内不足之阴与阳相争而发热，平旦至日中，机体阳气渐生而旺，体内不足之阴无力与阳相争，故

热退。因此，本研究采用不同时间点测定小鼠体温，分别于上午、下午及夜间动态监测对温度改变感知更为敏感的四肢爪心温度，探索阴虚证模型小鼠一天内的体温变化特点。本实验结果也表明，与上午相比，下午四肢爪心温度渐升，晚间达到最高，说明小鼠体温动态变化规律与阴虚发热特点较为符合，故四肢爪心温度在一天内的动态变化可作为评价潮热的核心指标。

阴虚证还常表现为阴液不足之象，如口干、大便干燥、皮肤干燥等。本实验将饮水量及唾液流率作为口干的评价指标，粪便含水量作为大便干燥的评价指标，皮肤含水量作为皮肤干燥的评价指标。灌服伤阴药 4 周阴虚证组小鼠饮水量增加，口渴喜饮。唾液流率能够反映唾液腺分泌功能，评价口腔干燥程度^[7]。阴虚证小鼠唾液流率低于正常小鼠，说明灌服伤阴药 4 周能够导致阴虚证组小鼠出现明显的口干表现。本研究显示，两组小鼠粪便含水量差异不明显，在日后研究中应进一步探索更为有效评判大便干燥的实验方法。灌服伤阴药 4 周阴虚证组小鼠四肢皮肤含水量低于正常小鼠，说明伤阴药能够导致模型小鼠四肢皮肤干燥。造模 4 周后阴虚证模型小鼠体质量降低，明显消瘦，故本研究将体质量作为评价阴虚证形体消瘦的核心指标。阴虚证可导致机体升清泌浊功能失调，水道不畅，出现小便短黄的症状。人体尿液颜色受血红蛋白的分解产物所影响，其中尿胆素原和尿胆红素是血红蛋白的重要分解代谢产物^[8]，故本实验采用尿胆原与尿胆红素水平变化作为尿赤的评价指标。本实验结果显示，阴虚证小鼠胆红素弱阳性、阳性者显著增多，符合阴虚证尿赤的典型表现。此外，阴虚证属于虚证范畴，阴液亏损，津液匮乏，渗入血脉不足，导致血脉不利，营血不足，机体也可出现疲倦乏力、不思饮食等虚损之象，故增加了摄食量及拉力测定以评价阴虚证模型小鼠虚损表现。结果发现，阴虚证小鼠出现纳差，但体倦乏力不明显，这可能是由于本研究建立的阴虚证模型未发展到阴虚日久导致气血耗伤、脏腑机能减退阶段，故虚损之象不明显。

本研究以阴虚证典型证候表现“五心烦热、潮热、口干、皮肤干燥、便干、形体消瘦、尿赤、纳差、乏力”为依据，动态观察证候表现的变化，对系统性评价阴虚证动物模型的实验方法进行了探讨，但仍存在不足：中医舌诊是四诊合参的重要组成部分，本研究缺乏对于阴虚证动物模型舌象量化

内容。若进一步将传统中医舌诊理论与计算机图像处理技术紧密结合,可为中医证候客观化提供新方向。在模型评价方面,本研究重点关注于模型评价的宏观指标,反映阴虚证模型评价的微观指标较少。故可在本研究基础上,将系统生物学多组学技术应用于模型评价之中,将可有效反映证候特点的生物标志物等微观指标与宏观指标相结合进行探索。同时,应扩大样本量,进一步验证阴虚证动物模型及构建该模型评价方法的可重复性及客观性,不断完善阴虚证的证候评价客观指标,进一步丰富阴虚证动物模型评价体系。

参考文献

- [1] 庞国明,倪青,张芳. 2 型糖尿病病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2021, 62(4): 361-368.
- [2] 郑绍勇,丁成华. 阴虚证中医临床疾病分布的文献研究 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(6): 88-90.
- [3] 王晓晗,宋克立,刘源香. 基于现代文献的老年痴呆中医证候分布规律研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(10): 2549-2551.
- [4] 乔天阳,王阿美,刘文兰. 中医虚证动物模型的建立和评价 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(11): 923-927, 940.
- [5] 钱宏梁,潘志强,王晓敏,等. 不同剂量泼尼松龙诱发小鼠药源性虚证模型的证候特征 [J]. 中医杂志, 2019, 60(11): 957-963.
- [6] 史莹,过建春,荀运浩. 阴虚证动物模型的建立方法及造模思路评析 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 725-727.
- [7] 单思,严小军,刘红宁. 阴虚的现代研究探析 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(9): 1501-1505.
- [8] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [9] 孙晓霞,周雯,战丽彬. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠肠黏膜屏障的调控作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(10): 1233-1240.
- [10] 侯圣林,战丽彬,孙晓霞. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠空肠组织黏蛋白表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(8): 51-53.
- [11] 李志春,桂立辉. 利用 Excel 实现对实验对象随机分组的应用 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 235-236.
- [12] 方纪乾. 生物医学研究的统计方法 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 291.
- [13] 薛春苗,曹俊岭,薛润苗. 温热药造小鼠阴虚模型的建立及其对小鼠免疫方面的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(5): 318-320.
- [14] 林传权. 病证结合动物模型研究的进展及存在问题分析 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3601-3604.
- [15] 孙喜灵,姜伟炜,刘琳,等. 论中医理法方药知识创新的基础与支点 [J]. 中医杂志, 2013, 54(4): 277-279.
- [16] 叶耀辉,史毅,张博文,等. 虚热模型的研究进展 [J]. 江西中医药, 2017, 48(5): 69-72.
- [17] 王剑. 从多个阴虚病变模型研究阴虚证机理 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.
- [18] 周永生,樊雅莉,张宇鹏,等. 大鼠虚热证模型的研制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(9): 23-26.
- [19] 孙晓霞,战丽彬,侯圣林,等. 滋补脾阴方药对脾阴虚大鼠空肠葡萄糖转运蛋白 1、葡萄糖转运蛋白 5 表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(5): 660-665.
- [20] 马程功,马跃荣. 中医药证候动物模型的研究进展 [J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(1): 119-123.
- [21] 李玉洁,魏丹丹,魏茂林,等. 基于动物物质与能量代谢检测评价 3 种肾阴虚证模型建立方法 [J]. 中医学报, 2017, 32(1): 83-88.
- [22] 李灿东. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 143.
- [23] 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.
- [24] 董一昕,李腾辉,刘燕,等. 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.
- [25] 严惠芳,马居里,屈凯,等. “五心烦热”客观表达的临床探索 [J]. 陕西中医, 2010, 31(1): 34-35.
- [26] 王洪琦,梁乃津,沈炎南,等. 从体温调节角度研究阳虚恶寒阴虚发热的机理 [J]. 广州中医学院学报, 1989, 6(3): 160-163.
- [27] 朱根源. 茯苓生脉饮治疗阴虚型心力衰竭疗效观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(61): 132-133.
- [28] 周青. 不同训练水平男大学生相同负荷运动前后尿胆原变化研究 [J]. 当代体育科技, 2017, 7(1): 13-14.

The Establishment and Evaluation of Animal Model of Yin-Deficiency Syndrome

SUN Xiaoxia, REN Weiming, CUI Rongxing, CHEN Ning, ZHOU Wen, ZHAN Libin

School of Traditional Chinese Medicine & School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Objective To establish an animal model of yin-deficiency syndrome and to establish a systematic evaluation method of yin-deficiency syndrome. **Methods** C57BLKS/J mice were randomly divided into normal

group and *yin*-deficiency syndrome group, with nine rats in each group. *Yin*-deficiency syndrome group was administered with 0.1 ml/10 g body weight *yin*-damaging drugs at a concentration of 1 g/ml daily for 4 weeks, and the normal group was given the same volume of ultra-pure water. Open field test was carried out to assess the central grid-crossing times, the percentage of the central grid-staying time, the total distance and speed of movement in the open field. The body temperature of mice was dynamically monitored, and the changes of water intake, saliva flow rate, fecal water content, skin water content, body mass, urobilinogen and urinary bilirubin, food intake and tensile force were measured and compared between groups. **Results** In the open field test, the central grid-crossing times, the percentage of the central grid-staying time, the total distance and speed of movement in the open field were significantly higher in the *yin*-deficiency syndrome group than those in the normal group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After 4 weeks of administration of *yin*-damaging drugs, it was found that the claw center temperature of the upper left limb and the lower right limb increased from 8:30 a. m. to 15:00 p. m., and all four limbs had higher temperature at 20:00 p. m. compared to those at 8:30 a. m. ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the normal group, the *yin*-deficiency syndrome group had lower saliva flow rate, skin water content of the limbs, body mass and food intake, higher paw temperature of the four limbs and water intake ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), as well as higher weak-positive rate of urobilinogen and positive rate of urinary bilirubin at the 4th week ($P < 0.01$). **Conclusion** The method of consuming *yin*-fluid can be used to successfully establish an animal model of *yin*-deficiency syndrome. The evaluation method based on the typical manifestations of *yin*-deficiency syndrome, such as five vexing heat in the five centers (chest, palms and soles), tidal fever, dry mouth, dry skin, dry stool, emaciated body and red urine, has been formulated.

Keywords *yin*-deficiency syndrome; syndrome model; model evaluation

(收稿日期: 2020-05-10; 修回日期 2021-03-20)

编辑: 王利芬

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了1951年~2013年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951年~1986年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街16号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951年~1986年光盘合订本每套(4张光盘)480元

1987年~1994年光盘合订本每套(1张光盘)260元

1995年~2004年光盘合订本每套(1张光盘)280元

2005年~2013年光盘合订本每套(1张光盘)300元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统3.5-《中医杂志》(1987-1994)

系统工具 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

