

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.08.016

卫气虚证大鼠模型的建立及玉屏风散的反证效果

贾琳¹, 王亚利^{1*}, 张明全², 王鑫国³, 刘湘¹, 吴园园¹, 李博林¹, 闫翠环¹, 曹文利³

(1. 河北医科大学研究生学院, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050031; 2. 河北中医学院基础医学院; 3. 河北中医学院实验中心)

摘要 目的 探索卫气虚证动物模型的建立方法并观察玉屏风散对该模型的反证效果。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、环磷酰胺组、寒热刺激组、疲劳寒热组、中药干预组, 每组 10 只。正常对照组常规饲养; 环磷酰胺组腹腔注射环磷酰胺 10 mg/kg, 每日 1 次; 寒热刺激组寒热交替刺激造模, 每日 1 次; 疲劳寒热组以疲劳联合寒热交替法造模; 中药干预组造模方法同疲劳寒热组, 每日造模后灌服玉屏风散颗粒 25 g/kg, 每日 1 次。各组均连续 7 天。观察各组大鼠一般情况及行为学表现, 判断各造模方法与中医卫气虚证的相似度。比较各组大鼠体重、胸腺、脾脏指数、体外巨噬细胞吞噬功能、脾脏白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 6 (IL-6) 水平。结果 通过对各组大鼠行为学观察发现, 疲劳寒热组大鼠模型更接近中医卫气虚证的宏观证候评定标准。与正常对照组比较, 环磷酰胺组、疲劳寒热组、中药干预组大鼠体重显著降低 ($P < 0.05$); 与寒热刺激组比较, 疲劳寒热组体重显著降低 ($P < 0.05$); 与疲劳寒热组比较, 中药干预组体重显著升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 其余各组胸腺、脾脏指数, 巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 脾脏 IL-2、IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与疲劳寒热组比较, 中药干预组胸腺、脾脏指数, 巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 脾脏 IL-2、IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。结论 疲劳联合寒热交替法造模是较好的中医卫气虚证大鼠模型造模方法, 可被玉屏风散反证。

关键词 卫气虚; 证候模型; 疲劳; 寒热刺激; 玉屏风散

随着人们生活节奏的加快和生活方式的改变, 与卫气虚弱相关的疾病呈逐年上升的趋势^[1], 已成为目前研究的热点。动物模型是开展中医证候研究的有力手段。为深入开展卫气虚证的基础研究, 复制出更能体现中医证候特点的卫气虚证模型, 我们从行为学、免疫指标、药物反证等多方面对卫气虚证动物模型进行了观察, 报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

50 只健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 160 ~ 200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

玉屏风散中药配方颗粒由广州一方制药有限公司

生产, 批号: 黄芪 310027T, 白术: 309040T, 防风: 310232T。黄芪、白术、防风的比例为 2 : 2 : 1, 以蒸馏水配制, 浓度为 1.667 g/ml。注射用环磷酰胺: 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 12122725, 0.2 g/支, 稀释成 20 mg/ml 浓度。

1.3 主要仪器及试剂

HM-200 型电子分析天平 (日本 A&D 公司), MDF-382E 型超低温保存箱 (日本三洋公司), 自制 50 cm × 30 cm × 40 cm 游泳池 (水深 25 cm), FYL-YS-60L 型冰柜 (福意联公司), YHW-4101S 型恒温箱 (天津泰斯特仪器有限公司), DY89-4 型电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司), 1-45K 型高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司), FJ-2021 型 γ -放射免疫计数器 (西安二六二厂), 白细胞介素 2 (IL-2)、白细胞介素 6 (IL-6) 免疫分析试剂 (北京北方生物技术研究所, 批号: 20140726)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81150030)

* 通讯作者: wang1955@163.com, (0311) 86261276

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药方法

将 50 只 SD 大鼠适应性喂养 7 天, 用随机数字表法分为正常对照组、环磷酰胺组、寒热刺激组、疲劳寒热组、中药干预组, 每组 10 只。正常对照组: 常规饲养。环磷酰胺组: 为免疫功能低下模型对照组, 腹腔注射低剂量环磷酰胺 10 mg/kg [4], 每日 1 次。寒热刺激组: 寒热交替刺激造模 [5], 将大鼠先放入 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温箱中 15 min, 30 min 后将大鼠放入 -20°C 中 20 min, 每日 1 次。疲劳寒热组: 疲劳联合寒热交替法造模, 大鼠首先在 20°C 水中游泳 30 min [6], 然后取出常规饲养室饲养 [室温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$], min 后再行寒热交替刺激造模, 每日 1 次。中药干预组: 造模同疲劳寒热组, 每日造模后灌服玉屏风散中药配方颗粒 25 g/kg (按动物与人药物换算公式 [4] 计算所得, 相当于成人剂量的 10 倍), 每日 1 次。环磷酰胺组、寒热刺激组和疲劳寒热组每日造模后均灌服等量等温纯净水。各组均连续 7 天。

2.2 模型宏观证候评定标准

卫气虚证大鼠模型评定标准 [2,3]: 蜷缩、扎堆、怕冷、恶风; 背毛凌乱、无光泽、汗出明显; 咳嗽、有痰鸣音及鼻分泌物; 反应迟钝、懒动。

2.3 观察指标及方法

1) 观察各组大鼠的一般情况及行为学表现。
2) 测定体重、胸腺质量、脾脏质量, 并计算胸腺指数及脾脏指数, 免疫器官指数 = 免疫器官质量/体重 $\times 100\%$ 。
3) 体外巨噬细胞吞噬功能检测 [4]: 各组大鼠腹腔注射 1% 鸡红细胞悬液 1 ml, 30 min 后, 再腹腔注射生理盐水 1 ml, 断颈处死大鼠, 吸取腹腔液, 涂片, 1: 1 丙酮甲醇固定 5 min, Gimesa 染色, 油镜观察。计算体外巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数。巨噬细胞吞噬百分率 = 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/巨噬细胞总数 $\times 100\%$; 巨噬细胞吞噬指数 = 被吞噬的鸡红细胞总数/巨噬细胞总

数 $\times 100\%$ 。4) 采用放射免疫分析法测定脾脏 IL-2、IL-6 含量。

2.4 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件处理数据, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间均数差异性比较符合正态分布者采用 t 检验, 非正态分布者采用非参数统计分析。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况及行为学表现

正常对照组大鼠背毛顺滑, 无明显汗出, 无咳嗽痰鸣, 无鼻分泌物; 环磷酰胺组大鼠背毛凌乱, 咳嗽, 有鼻分泌物, 揉鼻, 较活跃; 寒热刺激组大鼠蜷缩、扎堆, 背毛微显凌乱, 微汗出, 偶有咳嗽, 不活跃; 疲劳寒热组大鼠蜷缩、扎堆、发抖较重, 背毛凌乱, 有明显汗出, 咳嗽, 有鼻分泌物, 懒动; 中药干预组大鼠行为与疲劳寒热组相似, 较疲劳寒热组症状轻。可见, 疲劳寒热组大鼠模型更接近卫气虚证的宏观证候评定标准。

3.2 各组大鼠体重、胸腺、脾脏指数、体外巨噬细胞吞噬功能及脾脏 IL-2、IL-6 水平比较

表 1 示, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组、疲劳寒热组、中药干预组大鼠体重显著降低 ($P < 0.05$), 寒热刺激组大鼠体重无显著变化 ($P > 0.05$); 与寒热刺激组比较, 疲劳寒热组体重显著降低 ($P < 0.05$); 与疲劳寒热组比较, 中药干预组体重显著升高 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 其余各组胸腺、脾脏指数, 巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 脾脏 IL-2、IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与寒热刺激组比较, 疲劳寒热组胸腺、脾脏指数, 巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 脾脏 IL-2、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与疲劳寒热组比较, 中药干预组胸腺、脾脏指数, 巨噬细胞吞噬率及吞噬指数, 脾脏 IL-2、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠体重、胸腺、脾脏指数、巨噬细胞吞噬率及脾脏 IL-2、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重 (g)	胸腺指数 (mg/g)	脾脏指数 (mg/g)	巨噬细胞吞噬率 (%)	巨噬细胞吞噬指数 (%)	IL-2 (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
正常对照组	10	220.07 $\pm$ 11.15	2.026 $\pm$ 0.109	3.401 $\pm$ 0.261	45.96 $\pm$ 4.98	61.97 $\pm$ 4.26	0.356 $\pm$ 0.012	24.895 $\pm$ 1.250
环磷酰胺组	10	139.56 $\pm$ 7.98*	1.126 $\pm$ 0.061*	1.704 $\pm$ 0.159*	27.86 $\pm$ 2.81*	31.98 $\pm$ 3.18*	0.192 $\pm$ 0.025*	15.878 $\pm$ 1.511*
寒热刺激组	10	218.95 $\pm$ 8.54	1.852 $\pm$ 0.075*	3.102 $\pm$ 0.223*	38.09 $\pm$ 3.95*	50.66 $\pm$ 3.93*	0.298 $\pm$ 0.031*	22.052 $\pm$ 1.891*
疲劳寒热组	10	141.12 $\pm$ 7.61* Δ	1.161 $\pm$ 0.093* Δ	1.638 $\pm$ 0.245* Δ	28.24 $\pm$ 3.76* Δ	33.05 $\pm$ 3.46* Δ	0.187 $\pm$ 0.019* Δ	16.012 $\pm$ 1.634* Δ
中药干预组	10	170.09 $\pm$ 5.18* Δ	1.678 $\pm$ 0.098* Δ	2.109 $\pm$ 0.199* Δ	37.85 $\pm$ 4.20* Δ	50.03 $\pm$ 2.77* Δ	0.289 $\pm$ 0.022* Δ	21.639 $\pm$ 1.222* Δ

注: IL-2, 白细胞介素 2; IL-6, 白细胞介素 6; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与寒热刺激组比较, $\Delta P < 0.05$; 与疲劳寒热组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

卫气是行于脉外而具有保卫作用的气。《灵枢·本藏》曰：“卫气者，所以温分肉，充皮肤，肥腠理，司关合者也”，即是对卫气防御外邪、温养全身、调节排汗功能的概括。现代医学多认为卫气与机体免疫、热代谢、神经-内分泌等相关，尤其认为卫气属于机体免疫功能的一部分，是人体卫外功能的第一道屏障^[1]。

胸腺和脾脏为机体重要的免疫器官，其中脾脏是机体最大的免疫器官，含有大量的 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞，其中活化的 T 细胞可产生 IL-2，IL-2 是免疫调节的核心物质，是所有 T 细胞亚群的生长因子，可活化并促进 T 细胞增殖，并产生 γ -干扰素 (INF- γ)、白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 5 (IL-5)、IL-6 等，还可促使 B 细胞增殖及产生免疫球蛋白，增强巨噬细胞、NK 细胞的免疫活性^[2]。IL-6 由巨噬细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等产生，可促进 B 细胞的活化与增殖，扩大 NK 细胞的杀伤能力，具有典型的干扰素样活性，可启动抗病毒及抗肿瘤作用^[3]。可见，IL-2 和 IL-6 是体内两种重要的细胞因子，在免疫功能调节方面起着至关重要的作用^[4]。而巨噬细胞在机体非特异性免疫中具有重要作用，其吞噬异物的能力在一定程度上反映了机体免疫水平的高低。因此，我们选用胸腺、脾脏指数，体外巨噬细胞吞噬率，脾脏 IL-2、IL-6 水平等作为观察指标。

目前应用较多的卫气虚证的动物模型为寒热交替刺激模型。方素萍等^[5]将昆明种小鼠放入 $-(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 中 20 min，然后常规饲养室饲养 [室温 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$]，4 h 后将小鼠放入 $(40 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中 15 min，每天 1 次，连续 5 天。李娜^[6]以 SD 大鼠为研究对象，考虑到大鼠耐受性较小鼠更强，故将造模时间延长至 7 天。该模型的造模依据为：寒为阴邪，易伤在表之卫阳，再加温热刺激，热性升腾，伤津耗气，进一步导致在表的卫气受损。环磷酸胺造模为西医化学因素造模方法，该模型在中医卫气虚证^[7]、脾虚证^[8]、血虚证^[9]等各种虚证模型中被复制，但与中医的证候理论又有一定差距。疲劳因素是卫气虚证形成的重要原因，疲劳为害，可致人体功能长时间处于兴奋状态，消耗正气，“劳则气耗”；又因脾主四肢，劳则四肢过用伤脾，脾为气血生化之源，脾伤则卫气来源亏乏，在此基础上予寒热交替刺激，所造成的卫气虚证模型与其

病因及病理更加贴近。

本研究结果显示，环磷酸胺组大鼠造模后无蜷缩、扎堆、懒动等表现，提示以单纯免疫抑制剂制作卫气虚证模型结果不是很理想。与寒热刺激组相比，疲劳寒热组大鼠造模后蜷缩、扎堆、背毛凌乱、汗出、咳嗽、鼻分泌物等症状均较重，提示在卫气温养全身、调节排汗、防御外邪等功能上比较，疲劳寒热组所造模型较寒热刺激组更为理想，与中医卫气虚损证候更相符。疲劳寒热组大鼠体重、胸腺指数、脾脏指数、体外巨噬细胞吞噬功能、脾脏细胞因子含量均较正常对照组显著下降；与环磷酸胺组比较，疲劳寒热组和寒热刺激组各指标差异无统计学意义，提示疲劳寒热组和寒热刺激组大鼠所致的机体免疫防御功能低下程度相当；与寒热刺激组比较，疲劳寒热组各指标均显著下降，提示疲劳寒热组的造模方法较寒热刺激组更有效、更能引起大鼠免疫防御功能低下。中药干预组较疲劳寒热组各项指标显著升高，显示了卫气虚证的代表性方剂玉屏风散的治疗效果，从而反证出模型的卫气虚本质。综上，我们从因、证、方 3 个方面建立了卫气虚证动物模型，为今后卫气虚证动物实验的开展提供了参考依据。

参考文献

- [1] 王洪琦,李建国,马晶,等. 卫气虚弱与机体免疫机制相关性研究 [J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(12):3-4.
- [2] 李娜. 卫气与神经传导相关性的理论和实验研究 [D]. 武汉:湖北中医学院,2009.
- [3] 洪肖娟,吴曦,冉茜. 慢性疲劳综合征动物模型制作与检测 [J]. 辽宁中医杂志,2011,38(4):737-739.
- [4] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学 [M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2005:48-49.
- [5] 区永欣,邝杰钊,王洪琦,等. 卫气理论的实验研究 [J]. 广州中医学院学报,1992,9(3):135-140.
- [6] 陈奇. 中药药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1993:315.
- [7] 李建国,王洪琦. 卫气学说研究进展 [J]. 安徽中医学院学报,2002,21(1):61-63.
- [8] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京:科技出版社,2000:54.
- [9] 赵楠,杨敏,丁娟,等. 脱水式热暴露对大鼠生理指标和 IL-2、IL-6 及 IgG 含量的影响 [J]. 宁夏医科大学学报,2013,35(11):1212-1214.
- [10] 王军,苏海涛,孙丽梅,等. 小柴胡汤对免疫抑制小鼠细胞因子影响的研究 [J]. 中华中医药学刊,2013,31

(10):2242-2245.

〔1〕方素萍,吕鑫霞,陈玉英,等. 卫益颗粒(玉屏风散)对小鼠冷热刺激适应能力的影响〔J〕. 中国实验方剂学杂志,2003,9(3):33-35.

〔2〕王禾,吉慧敏,韩立军,等. 环磷酰胺模型中医证型属

性的实验研究〔J〕. 中国中医基础医学杂志,1996,2(5):46-49.

〔3〕李冬,李宏宇,黄晓巍,等. 鹿皮胶对环磷酰胺所致血虚动物模型影响的实验研究〔J〕. 长春中医药大学学报,2010,26(5):652-652.

Modeling Rat with *Weiqi* Deficiency Syndrome and Disproving Effect of *Yupingfeng San* (玉屏风散)

JIA Lin¹, WANG Yali¹, ZHANG Mingquan², WANG Xinguo³, LIU Xiang¹, WU Yuanyuan¹, LI Bolin¹, YAN Cuihuan¹, CAO Wenli³.

(1. Graduate Scholl of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050031; 2. College of Basis Medicine, Hebei University of Chinese Medicine; 3. Experimental Center, Hebei University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the modeling methods of animal models of Defensive-qi deficiency syndrome, and to observe the disproof effect of *Yupingfeng San* on the rat models. **Methods** Fifty sprague-dawley rats were randomized into normal control group (group A), cyclophosphamide group (group B), cold and hot stimulation group (group C), fatigue with cold and hot stimulation group (group D), and Chinese Traditional Medicine group (group E), with ten rats in each group. In group A, rats were fed routinely; in group B, 10 mg/kg of cyclophosphamide was intraperitoneal injected to the rats every day; cold and hot stimulation was given to the rats once a day in group C; and made rats swim to fatigue, and then gave cold and hot stimulation once daily to the rats in group D and group E. In addition, *Yupingfeng San* 25 g/kg was given to rats in group E once day. Each group was treated for seven days. After then general condition and behavior-expressing of rats were observed in each group, the similarity between the results by each modeling method and *Weiqi* deficiency syndrome was estimated, and the body weight, thymus index, spleen index, phagocytic function of extracorporeal macrophage, and spleen levels of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-6 (IL-6) were compared between groups. **Result** It was found in behavior-expressing of rats that the model of fatigue with cold and hot stimulation in Group D was more close to the macroscopic evaluation standard of *Weiqi* deficiency syndrome. Compared with group A, body weight of rats reduced significantly in group B, D, and E ($P < 0.05$). Compared with group C, body weight of rats reduced significantly in group D ($P < 0.05$). Compared with group D, body weight of rats increased remarkably in group E ($P < 0.05$). In addition, compared with group A, thymus index and spleen index, phagocytic rate and phagocytic index of macrophage, and levels of IL-2 and IL-6 reduced significantly in group B, C, D, and E ($P < 0.05$). Compared with group D, thymus index and spleen index, phagocytic rate and phagocytic index of macrophage, and levels of IL-2 and IL-6 increases significantly in group E ($P < 0.05$). **Conclusion** Fatigue with cold and hot stimulation is a preferable method to establish rat model with *Weiqi* deficiency syndrome. This conclusion can be disproved by *Yupingfeng San*.

Keywords *Weiqi* deficiency; syndrome model; fatigue; cold and hot stimulation; *Yupingfeng San*

(收稿日期: 2014-09-11; 修回日期: 2014-11-22)

编辑: 王利芬

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951-1986 年(4 张光盘) 480 元; 1987-1994 年(1 张光盘) 260 元; 1995-2004 年(1 张光盘) 280 元; 2005-2013 年(1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘,收入了同期出版的全部《中医杂志》的内容,可对所有文章进行任意字检索,方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632; 网址: <http://www.jtcm.net.cn>