

实验研究

基于冷热板示差法的小鼠胃寒/胃热证病理模型
寒热属性研究杨宏博^{1,2} 赵艳玲² 李宝才¹ 王伽伯² 李瑞生² 贾雷^{2,3} 程丹红^{2,3} 肖小河²

中医药病理动物模型是指在中医病理研究中建立的具有人类病证表现的动物实验对象和相关材料,是中医“证”在实验研究中的载体,在中药实验药理的研究中起基础作用^[1]。现代研究认为,机体是统一的热力学整体,能量的转移和热变化均可使机体呈现寒、热的差异,外在则表现为对寒热环境趋向性(选择性)的行为学差别^[2]。因此,本课题组用冷热板示差法从动物宏观温度趋向行为学角度探讨中医不同寒热体质客观差异性,尝试建立以动物行为学为主多指标的胃寒/胃热证病理动物模型研究载体的综合评价方法。

1 实验仪器与材料

1.1 实验仪器

Cary50 Bio 紫外分光光度计(Varian Australia PTY LTD);动物温度趋向性行为学智能监测系统由解放军第三〇二医院中药研究所自主设计(专利号 ZL20082000444.2,北京中交仪器公司协助研发),其原理为:首先由温控系统在温度控制板(冷热板)上生成若干稳定温差的温度区域,然后将实验动物置于温度控制板上,观测动物在不同温度区域的停留时间、活动频率、运动距离等,从而评估动物对指定温度的趋向性行为特征。停留时间、活动频率等参数通过视频信号实时处理技术获得,即采用摄像头远程监测动物在各温区的动态活动情况,通过计算机人工智能技术对视频帧信号进行实时处理,判定动物在每一帧图像的平面投影坐标(X, Y),将各帧坐标数据连接起来即为动物的时间运动轨迹 $Y_t = f[X_t]$,经计算机统计该轨迹在各温度区间的时长和频度,即得到动物在不同温度区域的停留时间、活动频率等指标。本实验采用的仪器配备了 6 通道监测系统,即可同时监测 6 只动物的运动情况,从而提高实验数据的重复性和可比性。视频识别软件参考了文献[3]算法,数据分析软件采用 Visual Basic 6.0 语言编制。

1.2 实验药品

氢氧化钠(北京化学试剂公司,批号:060109);无水乙醇(北京化工厂,批号:080522);考马斯亮兰蛋白测定盒(批号:20090522)、ATP 酶试剂盒(批号:20090522)、总抗氧化能力(T-AOC,批号:20090522)测试盒和超氧化物歧化酶(SOD,批号:20090522)均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

清洁级 KM 种小鼠,雄性,体重 14~16g,购于军事医学科学院,许可证号:SCKX-(军)2007004。动物自由

摄食饮水,饲养室光照 12h,黑暗 12h,室温为 23~25℃。

2 实验方法

2.1 造模药物的制备

0.3mol/L 氢氧化钠溶液(4℃):取 0.6g 氢氧化钠固体溶于 0.5L 去离子水中,不间断搅拌至固体全部溶解后,静置放冷到室温,然后将其放入提前设定好的 4℃ 冰箱中备用。10%乙醇的辣椒溶液:取市售的新鲜小辣椒 100g,反复用清水冲洗,用 10 倍量的 70%乙醇提取 2 次,将 2 次提取液合并,减压浓缩,得油状物,将其溶于 10%乙醇 30ml 中。

2.2 动物分组

预养及造模期间,使小鼠感受不同温区的温度,每天 30min,学习记忆冷热板(温度控制板)不同温区的位置。造模前测定小鼠肛温,淘汰体温差异较大者,然后随机分为 3 组,每组 6 只,即空白组、冷氢氧化钠溶液灌胃模型组和 10%乙醇的辣椒溶液灌胃模型组。

2.3 模型的建立^[1]

冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证模型:小鼠自由饮食 3 天,同时按 20ml/kg 灌服 4℃ 冷水 3 次(每 6h 1 次),共灌胃 3 天。造模前小鼠禁食不禁水 24h,然后给小鼠灌胃 0.3mol/L 氢氧化钠溶液(4℃)10ml/kg,每天 1 次,造模 3 天,制成胃寒证模型。10%乙醇的辣椒溶液灌模拟胃热证模型:小鼠自由饮食 3 天,造模前小鼠禁食不禁水 24h,然后按 0.02ml/g 给小鼠灌胃 10%乙醇的辣椒汁,每天 1 次,造模 3 天,制成小鼠胃热证模型。空白组:给予相同体积生理盐水。

2.4 胃寒/胃热证模型小鼠温度趋向性考察

在室温(20±2)℃下,设置自动温控系统不同温区的底板温度(低温板)25℃,高温板(40℃),待冷热板的温度达到预设温度后,将各待测组的 6 只小鼠按编号顺序分别放入相应的冷热板中的各通道内,运行摄像跟踪软件(15 帧/s),监测其冷热板寒热温区趋向活动,并对活动轨迹进行全程记录。每天记录测定 1 次,重复测定 7 天。

2.5 其他相关指标考察

体重、饮食量、饮水量及耗氧量的测定:在进行小鼠温度趋向性考察的同时,每天早上同一时间称量并记录各组小鼠的体重、饮食量、饮水量及耗氧量,重复测定 7 天,结束记录。各脏器指数的测定:在完成最后一次小鼠温度趋向性测定后,断头处死小鼠,迅速取出肝脏、肾脏、脾脏和睾丸 4 种脏器,分别称其重量,记录,分别计算各脏器指数。肝组织各生化指标的测定:称取肝组织制备

10%肝组织匀浆,按各试剂盒说明书操作,分别测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATP 酶, T-AOC 和 SOD 各生化指标。

3 结果

3.1 胃寒/胃热证模型小鼠温度趋向性比较

与空白组比较,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠趋热性明显,随着时间的延续,小鼠在高温区的停留比例(RR)逐渐增强,在测定第 1、4 和 7 天有统计学差异($P < 0.05$),第 5、6 天亦有统计学差异($P < 0.01$),表现出典型的“寒”证特点;而 10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组小鼠趋寒性明显,且随着时间的延续,在高温区的停留比例逐渐降低,从第 4 天开始,表现出统计学差异($P < 0.05$),到第 7 天差异亦显著($P < 0.01$),与典型的“热”证特点相符合。另外,将以上实验重复进行 2 次,考察其重现性。冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒/10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型小鼠温度趋向性与空白组有显著的差异性,与第一次实验结果具有一致性,提示该方法重现性较好。

3.2 一般生理指标测定结果

在模型复制饲养过程中,与空白组比较,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠稀便现象严重,毛色枯白,精神萎靡,喜热聚集成团,四肢和尾部偏凉,饮水量及饮水量逐渐减少,表现出“胃寒畏饮”的特征,体重生长缓慢、停滞,且在造模第 6 天开始,部分小鼠腹部开始胀大(实验完成解剖发现,小鼠胃肠胀气严重),体重迅速减轻;10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组小鼠在模型复制后,排便干燥,颗粒小而坚硬,毛色不顺,分散且活跃,体重轻,易出汗,随造模时间的延续,上述现象

随之严重,饮食量及体重增加缓慢,饮水量明显提高,表现出“胃热欲饮”的特征。以 6min 内消耗氧气体积(ml)为指标的结果显示,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠耗氧量下降,从第 4 天有所回升,但仍明显低于空白组;10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组小鼠耗氧量随着时间的延续明显升高,第 6、7 天结果最为显著。

3.3 各脏器指数计算结果

表 1 示,各脏器指数的结果可以看出,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组与空白组比较,对小鼠的肝脏、脾脏和脑有较大影响,在脏器指数有统计学差异($P < 0.05$),对心脏、肾和睾丸基本无影响;10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组与空白组比较,对小鼠的脾脏和脑有较大的影响,且在脏器指数上有统计学差异($P < 0.01$)。另外,结果显示,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒/10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组对心脏和肾脏均无明显影响。

3.4 肝组织各生化指标的测定结果

表 2 示,与空白组比较,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶均显著降低($P < 0.05$),而 10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组显著提高($P < 0.05$)。与空白组比较,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠肝组织 T-AOC 显著降低($P < 0.05$),而 10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组显著提高($P < 0.01$)。与空白组比较,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型组小鼠的 SOD 显著降低($P < 0.05$),而 10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型组显著升高($P < 0.01$)。

表 1 3 组小鼠各脏器指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	心脏	脏腑	脾脏	肾脏	睾丸	大脑
空白组	0.0046±0.0007	0.0475±0.0102	0.0046±0.0013	0.0134±0.0033	0.0053±0.0015	0.0166±0.0028
CM 组	0.0045±0.0009	0.0544±0.0076*	0.0036±0.0008*	0.0131±0.0014	0.0061±0.0012*	0.0168±0.0017
HM 组	0.0046±0.0017	0.0500±0.0104	0.0031±0.0004**	0.0129±0.0025	0.0053±0.0011	0.0135±0.0024**

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (CM:冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型;HM:10%乙醇的辣椒溶液灌胃模拟胃热证病理模型,下表同)

表 2 3 组小鼠各生化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	T-AOC(U/mgprot)	SOD(U/mgprot)
空白组	4.66±0.80	3.78±0.77	3.83±0.60	0.2377±0.0322	98.66±13.42
CM 组	4.18±0.63*	3.15±0.40*	3.04±0.74*	0.1515±0.0430*	82.89±11.38*
HM 组	5.63±0.69*	5.97±0.94**	5.36±0.68**	0.4168±0.0528**	157.19±12.37**

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

4 讨论

现代研究认为,机体在病理条件下对热变化的一种生理或病理感受^[5],既可能是处于病理状态下机体可激发出的内生致热物质或相关物质作用于机体后产生的一系列生理或病理反应,这些反应均伴有能量转移和热变化。无论哪种形式的能量转移和热变化,均可使机体呈现寒、热的差异,从而表现为对寒热环境的趋向性(选择性的)行为学差别。近而也可使机体一些相关的生理和

生化指标受到影响而发生变化,在本研究中,主要从宏观动物温度趋向行为学角度,并同时辅以一般生理指标和与机体能量代谢相关的生化指标对冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒/10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证病理模型进行评价,并考察其相关性。从具体实验结果中我们可以看出,冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证病理模型小鼠在高温区的停留比例显著提高($P < 0.05$),10%乙醇的辣椒溶液灌模胃热证模型小鼠显著降低($P < 0.05$),提示

建立冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证和 10% 乙醇的辣椒溶液灌胃模拟胃热证可使机体之气偏盛偏衰, 寒热(阴阳)失衡, 与《素问·阴阳应象大论》中提到的“阳胜则身热……能冬不能夏, 阴胜则身寒……能夏不能冬”的论述相一致。在测定的一般生理指标及相关的生化指标结果与温度趋向行为学结果有一定的相关性。具体体现在与空白组比较, 冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证小鼠体重、饮食量、饮水量和耗氧量下降, 肝、脾和脑的脏器指数有显著变化($P < 0.05$), ATP 酶、T-AOC 和 SOD 显著下降($P < 0.05$); 10% 乙醇的辣椒溶液灌胃模拟胃热证小鼠体重、饮食量和耗氧量下降, 饮水量上升, 脾和睾丸的脏器指数有显著变化($P < 0.01$), ATP 酶、T-AOC 和 SOD 显著上升($P < 0.05$), 提示不同寒热证模型在体内会产生相应的内在反映, 并且与小鼠的温度趋向性也存在一定的相关性。

参考文献

[1] 唐扩军, 刘士敬. 中医证型动物模型研究的反思[J]. 中医学

信息, 2000, 17(1): 3-4.

[2] 肖小河, 金城, 赵艳玲, 等. 中药药性的生物热力学表达及其应用[J]. 中美医学, 2006, 3(1): 1-6.

[3] Aguiar P, Mendonca L, Galhardo V, et al. Open Control: a free opensource software for video tracking and automated control of behavioral mazes[J]. J Neurosci Methods, 2007, 166(1): 66-72.

[4] 李茹柳, 陈艳芬, 陈蔚文. 左金丸方证相应动物模型建立的回顾及其对方证研究的意义[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 236-238.

[5] Jain Campbell. Body temperature and its regulation[J]. Anaesth Intens Care, 2008, 9(6): 259-263.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2007CB5-12607); 国家自然科学基金项目(30772740)

1 昆明理工大学生命科学与技术学院(650224);

2 中国人民解放军第三〇二医院;

3 成都中医药大学

通讯作者: 肖小河, xiaoxiaohe302@126.com, (010)66933322

清热解毒方对脓毒症大鼠机体免疫状态的影响

喻文立¹ 崔乃强² 傅强² 刘洪斌³ 李东华³

在脓毒症的初始阶段, 脓毒症以大量分泌炎性介质为主要特征, 而随着脓毒症的进展, 机体可能经历了一个免疫抑制阶段, 由此引起的迅速出现且难以控制的继发性感染是引起脓毒症患者死亡重要原因之一^[1]。目前认为, Th1 和 Th2 细胞功能的改变能够反映机体的免疫功能状态, 而 Treg 作为免疫系统的重要调节细胞之一, 可能与脓毒症早期细胞免疫抑制有关^[2]。中药治疗在脓毒症的防治中展现了良好的疗效, 这与其免疫调理功能密切相关^[3]。本研究以大鼠腹腔感染致脓毒症模型为研究对象, 探讨了清热解毒方对机体免疫平衡状态的影响及作用机理, 为脓毒症的临床防治提供理论依据。

1 材料与方

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠(动物由军事医学科学院四所动物室提供, 动物号为 DD20013) 96 只, 雄性, 体重 200~220g, 在实验室使用标准颗粒饲料喂养 1 周。

1.2 药物

清热解毒方剂, 由大黄、黄芩、白头翁、败酱草组成, 药物剂量配比为 2:2:3:3, 由天津市中西医结合急腹症研究所药研室提供, 制备成含生药量 1g/ml 的浓度浓缩煎剂, 分装, 高压灭菌后置于 4℃ 冰箱存放备用。

1.3 仪器和试剂

FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickson 公司, 美国), CO₂ 培养箱(Thermo 公司, 美国)。红细胞溶血素(Becton Dickson 公司, 美国), 破膜剂(Becton Dickson 公司, 美国), 高尔基体转运抑制剂(BFA, Becton Dickson 公司, 美国), 佛波酯(PMA, Becton Dickson 公司, 美国), 离子霉素(Sigma 公司, 美国), 异硫氰酸荧光素(FITC)标记

小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), 藻红毒素(PE)标记小鼠抗大鼠干扰素-γ(IFN-γ)单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), PE 标记小鼠抗大鼠白细胞介素-4(IL-4)单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), PE 标记小鼠 IgG1κ 同型对照抗体(Becton Dickson 公司, 美国), FITC 标记小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(Biolegend 公司, 美国), FITC 标记小鼠抗大鼠 CD25 单克隆抗体(Biolegend 公司, 美国), 别藻蓝素(APC)标记小鼠抗大鼠叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)单克隆抗体(eBioscience 公司, 美国), APC 标记大鼠 IgG2a 同型对照抗体(eBioscience 公司, 美国), 固定/破膜剂(eBioscience 公司, 美国)。

1.4 脓毒症模型建立和分组

参照 Wichterman 等^[4]介绍的盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型: 大鼠麻醉后, 开腹分离暴露盲肠, 3-0 丝线结扎盲肠根部, 以 18G 穿刺针横穿肠壁, 挤出 0.1ml 肠内容物, 将盲肠放回腹腔, 术毕立即皮下注射 50ml/kg 林格液抗休克。96 只大鼠随机分为对照组、模型组、清热解毒方组, 每组 32 只。对照组动物只开腹、关腹与复苏, 但不进行盲肠结扎和穿孔。各组分别于造模后 12h、24h、48h、72h 随机取 8 只大鼠, 麻醉后解剖腹腔, 无菌留取腹主动脉血 1ml 待测。

1.5 检测指标

1.5.1 大鼠全血 Th1/Th2 比值测定 500μl 腹主动脉血以等倍 RPMI-1640 稀释, 加入刺激剂(PMA5ng, 离子霉素 0.5μg, BFA1μg)混合, 37℃、5% CO₂ 孵育 4 小时。取出混匀后, 将血样加入 3 只试管中(200μL/管), 分别加入 FITC 标记小鼠抗大鼠 CD4 抗体进行细胞外染色, 经