

· 实验研究 ·

基于动物热活性检测系统分析动物热活性影响因素

赵海平^{1,2} 赵艳玲¹ 王伽伯¹ 鄢丹¹ 金城¹ 张萍¹ 王永炎³ 肖小河^{*}

(1. 中国人民解放军第三〇二医院全军中药研究所,北京市西四环中路 100号 100039;

2. 江西中医学院; 3. 中国中医科学院)

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2007CB512607, 2006CB504703); 国家杰出青年科学基金(30625042)

* 通讯作者: pharmacy302@126.com, (010) 66933323

[摘要] 目的 基于动物热活性监测系统进行动物热活性影响因素分析,以期对中药寒热药性评价进行方法学探索。方法 采用动物热活性监测系统,考察品种、性别及适应时间对 ICR BALB/c及 KM种小鼠在不同温区停留时间比例(RTR)的影响。结果 ICR BALB/c种小鼠可耐受最低温度为 15℃,最高为 40℃;与适应前比较,15℃温区内 ICR BALB/c KM种小鼠分别在 6 8 4h,30℃温区内分别在 6 6 4h,40℃温区内分别在 4 6 8h, RTR值均开始减少($P < 0.05$);雌、雄性 KM小鼠在 15~40℃温区的 RTR值差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在动物热活性监测系统中,3个品种小鼠的可耐受温度范围大致为 15~40℃,累计适应 4~8h后对温区间温差能形成相对稳定的记忆,且雌、雄性 KM小鼠对同一温度的感知基本一致。

[关键词] 动物热活性监测系统;品种;适应时间;性别;停留时间比例

Study on Influencing Factor of Animal Thermal Activity Based on the Animal Thermal Activity Determination System

ZHAO Haiping^{1,2,3}, ZHAO Yanling¹, WANG Jiabo¹, YAN Dan¹, JIN Cheng¹, ZHANG Ping¹, WANG Yongyan⁴, XIAO Xiaohe¹

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Hospital of the PLA, Beijing 100039; 2. Jiangxi University of Chinese Medicine; 3. Chengdu University of Chinese Medicine; 4. China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To study the influencing factor of animal thermal activity based on the animal thermal activity determination system, to explore the methodology of evaluation of cold/hot nature of Chinese medicine. **Methods** By using the cold/hot plate differentiating instrument, the influence of different breeds, sex and adaptation time on the remaining time ratio (RTR) of ICR, BALB/c and KM mice at different temperature areas was studied. **Results** The tolerable temperature of ICR, BALB/c mice was between 15℃ and 40℃. Compared with before adaptation, the RTR of ICR, BALB/c and KM mice began to be depressed ($P < 0.05$) in 6, 8, and 4h in 15℃ temperature area, in 6, 6, and 4h in 30℃ temperature area, and in 4, 6, and 8h in 40℃ temperature area. The RTR of female and male KM mice in 15℃ to 40℃ temperature area were not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** In this detective system, the tolerable temperature of ICR, BALB/c, and KM healthy mice would be 15~40℃, a relative stable memory could be obtained after 4~8h adaptation, and the perception of male and female KM mice to the same temperature might be almost the same.

Key Words animal thermal activity determination system; breed; adaptation time; sex; remaining time ratio (RTR)

中药的寒热温凉四气,即药物的四性,反映了药物对人体阴阳盛衰、寒热变化的作用倾向。而“药物甘苦之味可略,唯冷热须明”,寒热药性又是中药的首要药性。但如何借鉴现代技术手段直观和客观地表征寒热药性的差异性,长期以来一直是研究的难点和热点,至今尚未有成熟的经验可循^[1-3]。本课题组从热力学角度审视和研究中药药性及药性理论,以动物热活性监测系统对寒热药性差异进行了较为系统的评价研究。然而,受寒热药性理论体系自身复杂性、动物行为随机性以及实验条件不稳定性等诸多因素影响,建立标准化的应用规范,成为该方法得

以广泛推广应用的首要关键问题。为此,本研究主要从方法学的角度,考察品种、性别、温度及适应时间等因素对动物热活性的影响,并分析归纳前期药性差异表征结果的规律性,为寒热药性理论研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康 KM ICR BALB/c种小鼠,体重 18~20g,购于中国药品生物制品鉴定所实验动物中心,许可证号: SCXK(京)2005-0004。预养 1周,预养期间测定小鼠肛温,淘汰肛温异常者。基础饲料为实验鼠全

价颗粒饲料,由军事医学科学院实验动物研究中心提供,自由进食及饮水,动物房温度(20±2)℃,湿度60%~80%。人工光照约12h的明暗周期。取预养1周健康ICR种雄性小鼠42只,以随机数字表法分为7组,每组6只。

1.2 动物热活性监测系统

动物热活性监测系统由解放军第三〇二医院中药研究所自主设计并由北京中交仪器公司协助开发(专利号:ZL200820000444.2),包括冷/热温区控制系统、数据采集及分析系统,可同时监测6个通道。工作原理:将动物置于已形成稳定温度梯度的6个独立通道内,由视频系统记录动物的热活性变化(如:停留时间、活动频率、运动距离等),并由软件将其转变为平面坐标系数据点,从而识别动物在各温区的停留时间比例(Remaining time ratio, RTR)。RTR为动物在某个温区出现频数占总监测频数的百分比,即 $RTR = \frac{\text{温区出现频数}}{\text{总监测频数}} \times 100\%$ 。数据分析软件采用Visual Basic 6.0语言编制。数据采集速度为12.5帧/s^[4]。

1.3 不同温度梯度小鼠可耐受温度考察

将动物热活性监测系统以5℃温差依次设定为7个不同的温度梯度,即:① 10-15-20;② 15-20-25;③ 20-25-30;④ 25-30-35;⑤ 30-35-40;⑥ 35-40-45;⑦ 40-45-50(℃)。依温度梯度顺序,每个温度梯度考察1组动物,然后将背部统一标记颜色后的小鼠按组别依次放入通道中,每通道1只,远程监测动物在温度控制板上1h内的热活性变化。同样取健康BALB/c种小鼠依此方法进行实验。

1.4 适应时间对3种小鼠热活性的影响

设置温度梯度为15℃、30℃、40℃,预养后分别取体重与肛温基本一致的雄性ICR/BALB/c KM种小鼠各6只,依前法将统一标记颜色的小鼠多次放于通道内使之熟悉冷热板的温度差异,每天每次2h,连续4天。并分别于第1次适应前以及适应累积2h、4h、6h、8h内,测定小鼠在不同温区的RTR值。

1.5 性别对KM种小鼠在3个温区的热活性影响

设置温度梯度为15℃、30℃、40℃,预养后分别取体重与肛温基本一致的KM种小鼠12只,分为雌、雄2组,每组6只,按前法依次测定各组小鼠在不同温区的RTR值。

1.6 统计学方法

采用SAS 8.2统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 一般情况

实验期间,小鼠一般情况良好,毛色、饮食、大小便及行为活动等均未见异常。小鼠对于不适宜的冷或热温区趋向次数较少,停留时间短,尤其在高温区停留期间出现舔足底现象时,瞬即折返回适宜温区。

2.2 ICR/BALB/c种小鼠在不同温度梯度下的各温区RTR值

表1示,在温度梯度①上,与10℃温区相比,小鼠在15℃、20℃温区总RTR显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在温度梯度⑥上,与35℃、40℃温区相比,在45℃温区总RTR显著减少($P < 0.05$)。在温度梯度⑦上,与40℃温区相比,在45℃、50℃温区总RTR显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且小鼠多次出现舔足底现象。而在其他各温度梯度上,ICR或BALB/c种小鼠在各温区的总RTR未见明显差异($P > 0.05$)。提示,ICR/BALB/c种小鼠在动物热活性监测系统上的可耐受最低温度为15℃,可耐受最高温度为40℃,适宜温度梯度的3个温区设定值参考范围大致为15~40℃。

表1 2种小鼠在温度梯度①、⑥、⑦各温区RTR比较(% , $\bar{x} \pm s$)

温度梯度	鼠数	温区(℃)	ICR	BALB/c
①	6	10	14.90±5.84	12.71±5.10
		15	38.45±11.42	33.37±2.07
		20	46.65±5.58	53.91±3.04*
⑥	6	35	47.42±8.10▲	42.01±0.07▲
		40	36.11±1.70▲	40.63±1.95▲
		45	16.45±6.38	17.35±1.87
⑦	6	40	54.68±8.66	53.55±4.97
		45	32.67±8.84#	33.05±9.72#
		50	12.64±0.18##	13.40±4.76##

注:与本温度梯度10℃温区比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本温度梯度45℃温区比较,▲ $P < 0.05$,与本温度梯度40℃温区比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

2.3 3种小鼠经不同时间适应后在不同温区RTR值比较

表2、表3、表4示,在15℃、30℃、40℃温度梯度上,与0h比较,3种小鼠在15℃温区的适应时间分别在6、8、4h时,RTR值均开始显著减少($P < 0.05$),且ICR KM种小鼠与此后适应时间段内的RTR值未见明显差异;3种小鼠在30℃温区的适应时间分别在6、6、4h时,RTR值均开始显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且与此后适应时间段内的RTR值未见明显差异;在40℃温区的适应时间分别在4、6、8h

时,RTR值均开始显著减少($P < 0.05$),且 ICR BALB/c种小鼠与此后适应时间段内的 RTR值未见明显差异.由此说明,各品种小鼠对于热活性监测系统的温差环境均需要适应过程.

表 2 ICR种小鼠在各温区的 RTR值比较(% , $\bar{x} \pm s$)				
适应时间 (h)	鼠数	15℃	30℃	40℃
0	6	31.4±1.05	34.6±10.6	33.95±9.55
2	6	27.57±8.12	38.95±8.99	33.48±17.11
4	6	29.97±3.17	47.78±5.84	22.24±9.01 [†]
6	6	19.78±8.23 [‡]	55.57±3.49 [§]	24.65±11.72 [‡]
8	6	13.96±3.13 [‡]	64.15±10.4 [*]	21.89±7.27 [‡]

注:与 0h比较,* $P < 0.05$;* * $P < 0.01$

表 3 BALB/c种小鼠在各温区的 RTR比较(% , $\bar{x} \pm s$)				
适应时间 (h)	鼠数	15℃	30℃	40℃
0	6	30.67±9.18	27.77±4.64	41.57±13.82
2	6	23.28±3.35	37.86±10.60	38.86±13.95
4	6	24.78±10.34	44.73±1.05	30.49±9.28
6	6	24.26±0.41	52.54±6.77	23.20±7.17
8	6	17.06±3.97	59.86±2.54 [*]	23.08±6.51 [†]

注:与 0h比较,* $P < 0.05$;* * $P < 0.01$

表 4 KM种小鼠在各温区的 RTR比较(% , $\bar{x} \pm s$)				
适应时间 (h)	鼠数	15℃	30℃	40℃
0	6	36.92±4.76	36.72±4.38	26.36±0.38
2	6	32.52±1.08	49.22±1.60	18.26±2.67
4	6	19.72±7.87	58.32±2.71 [†]	21.96±5.16
6	6	19.32±7.97	57.2±0.10 [†]	23.47±8.07
8	6	16.26±9.16 [‡]	65.56±0.74 [*]	18.19±9.90 [‡]

注:与 0h比较,* $P < 0.05$;* * $P < 0.01$

2.4 KM种雌、雄小鼠在不同温区 RTR值的比较
表 5示,与雌性 KM种小鼠比较,雄性 KM种小鼠在 15℃、30℃、40℃温区的 RTR未见明显差异($P > 0.05$).提示一定温度范围内,KM种雌、雄性小鼠对于同一温度未能体现敏感性差异.

表 5 KM种雌、雄小鼠在各温区的 RTR比较(% , $\bar{x} \pm s$)			
温区(℃)	性别	鼠数	RTR
15	雄性	6	16.53±5.64
15	雌性	6	22.60±6.78
30	雄性	6	76.96±14.01
30	雌性	6	71.73±15.29
40	雄性	6	23.17±8.37
40	雌性	6	22.33±8.51

3 讨论

研究表明,动物都会避开过低和过高的温度而选择最适合的温度环境,在合适的温度梯度下,能够

运动的动物倾向于生活在一个狭窄的最适温度区域内,此区域同时是生命活动的最适宜温度区域^[5],动物的这种趋向性被称之为温度趋向性(temperature tropism),并认为其受机体内在状态和外界干预变化的影响.而寒热药性是机体在药物作用下对热变化的一种生理或病理感受,均伴有物质、能量和信息的转移或传递,能使机体呈现寒、热的差异^[6],进而表现为对寒热环境趋避(选择)的意愿及行为.

在动物热活性检测系统中,ICR BALB/c及 KM种正常小鼠在 10℃、45℃温区的 RTR值明显减少($P < 0.05$);3个品种的小鼠在 15℃、30℃、40℃温区,经 4~8h的适应后 RTR值相对趋于稳定;KM种雌、雄性小鼠对 15℃、30℃、40℃温区未见敏感性差异($P > 0.05$).而基于此的实验研究也证实,在品种、性别、适应时间等相对统一的实验条件下,大黄与附子组(来源、功效不同),红参与西洋参组(品种、功效相近),(胆)黄连、(生)黄连与(姜)黄连组(炮制方法不同),黄连、吴茱萸、左金丸与反左金丸组(配伍、剂量不同)等各组别中不同方药对同一正常或寒热体质模型动物的温度趋向性,除个别药物外,总体上能分别表现出程度不同或相反的干预作用^[7-10].此作用与其传统中医药理论“寒”、“热”赋性及“寒者热之,热者寒之”治则基本相符.

综上,通过动物品种、性别及适应时间的考察,以及上述方药对正常或寒热体质模型动物热活性影响的回顾分析,不仅说明该方法能在一定程度上客观而又直观地表征某些方药的寒热药性差异,更能凸显对实验方法进行规范化、标准化研究的重要性.然而该方法也绝非能够解决所有与寒热药性有关的问题,只有进一步细化实验条件、增强实践应用、积累实验数据以及改进监测仪器,才能更好地为阐释中药寒热药性差异,进而为建立其评价方法和指标体系提供有益的研究思路与技术支撑.

参考文献

[1] 肖小河,王永炎.从热力学角度审视和研究中医药 / 王米渠.国际生物信息与中医药论丛 [M].新加坡:新加坡医药卫生出版社,2004:74-80.
[2] 肖小河,金城,王永炎,等.中药药性的生物热力学表达及其应用 [J].美中医学,2006,3(1):1-6.
[3] 高学敏.中药学 [M].北京:中国中医药出版社,2002:16-20.
[4] Aguiar P, Mendonca L, Galhardo V, et al. OpenControl: a free opensource software for video tracking and automated control of behavioral mazes [J]. J Neurosci Methods, 2007, 166(1): 66-72. (下转第 775页)

表 1 各组食蟹猴给药前后血浆组胺含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	给药前 (ng/ml)	给药后 (ng/ml)	给药前后差值 (ng/ml)	升高程度 (%)
生理盐水组	2	0.54± 0.16	0.48± 0.17	- 0.06± 0.00	- 10.75± 3.52
0.25% 广州组	3	0.53± 0.18	0.91± 0.54	0.39± 0.37	64.27± 51.25
0.25% 南京组	3	0.58± 0.14	0.67± 0.15	0.09± 0.11	16.84± 22.70
0.30% 南京组	3	0.51± 0.39	0.70± 0.19	0.19± 0.15	36.47± 26.90

2.4 类过敏反应综合判定结果

结合各组食蟹猴给药后的反应症状及血浆组胺含量变化情况,综合判定各组受试液的致敏性,结果显示,各组鱼腥草注射液静脉滴注后,均未诱发食蟹猴出现典型的类过敏反应。

3 讨论

食蟹猴为灵长目猴科猕猴属,与人类的遗传物质有 75.0%~ 98.5% 的同源性,可更大程度上客观地评价受试药物用于人类时是否出现致敏性。类过敏反应的主要介导物质是组胺,有文献表明^[7]临床症状与组胺浓度有关:组胺浓度小于或等于 1ng/ml 无症状,组胺浓度 1~ 2ng/ml 仅有皮肤反应;组胺浓度大于 3ng/ml 出现全身反应;组胺浓度大于 100ng/ml 出现严重全身反应,主要表现心血管及呼吸系统症状。本实验中仅 0.25% 广州组有 1 只猴出现面部轻微潮红,药后组胺升高至 1.49ng/ml,但未超过 1 倍,与人类基本一致。本次实验结果显示,2 个企业分别使用 0.25% 或 0.30% 浓度 2 种国产吐温 80 配制的鱼腥草注射液静脉滴注,均未诱发食蟹猴出现典型的类过敏反应。值得注意的是,该实验的用药剂量为人临床用量的 10 倍,有少数动物出现轻微皮肤反应,考虑临床上老年患者及易敏人群的存在,在使用含吐温 80 类药物时,仍需提高警惕。

综上所述,若严格控制吐温 80 质量,并将浓度限定在 0.25% 或 0.30% 以下,可以在保证药物增溶

效果的同时避免过敏及类过敏反应的发生。动物的类过敏反应存在种属差异,Beagle 犬对吐温 80 最为敏感,用于评价吐温 80 的安全性较为准确。食蟹猴与人类亲缘相近,可提供与人类接近的安全性研究数据,但价格昂贵,实验费用高,并不适合药厂用于药品出厂前安全性检测的常规类过敏反应的评价。通过对不同种属动物的系统致敏性研究,可为临床安全用药提高参考。

参考文献

[1] 刘燕梅,蒲旭峰,雷蕾,等.鱼腥草注射液静脉给药不良反应实验研究Ⅱ.豚鼠过敏反应研究[J].中药药理与临床,2008,24(2): 61- 63.
[2] 张美玉,李贻奎,张嘉,等.鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究[J].中国现代应用药学杂志,2009,26(8): 610- 614.
[3] 张美玉,李连达,李贻奎,等.鱼腥草注射液对食蟹猴类过敏实验研究[J].中药药理与临床,2009,25(6): 55- 57.
[4] 孙伟伟,李贻奎,张金艳,等.吐温 80 及其配制的鱼腥草注射液致豚鼠过敏反应的实验研究[J].中药新药与临床药理,2011,22(1): 47- 51.
[5] 孙伟伟,李贻奎,张金艳,等.聚山梨酯 80 及其配制的鱼腥草注射液致 Beagle 犬类过敏反应实验研究[J].中国中西医结合杂志,2011,31(1): 90- 93.
[6] 国家药典委员会.中药成方制剂国家标准(第 17 册)[M].北京:人民卫生出版社,1998.: 170.
[7] 田玉科,围手术期过敏反应及类过敏样反应[J].医学新知杂志,2005,12(2): 7- 9.
(收稿日期: 2010- 06- 02;修回日期: 2011- 02- 12)
[编辑: 行 之]

(上接第 772 页)

[5] 汪立志,李晓晨,孙涛,等.中国林蛙蝌蚪和大蟾蜍蝌蚪的最适温度、逃避温度及致死温度[J].动物学杂志,2005,40(2): 23- 27.
[6] 徐惠旻,肖小河,刘塔斯,等.中药四性的生物热动力学研究Ⅰ:生晒参和红参药性的微量热学比较[J].中国中药杂志,2002,27(5): 393- 369.
[7] 赵海平,赵艳玲,肖小河,等.基于冷热板示差法的中药大黄和附子寒热药性差异的表征[J].中国科学 C 辑: 2009,39(8): 803- 808.
[8] Zhou CP, Wang JB, Xiao XH, et al. Investigation on

the differences between COLD and HOT nature of Cop-tis Chinensis Franch and its processed material based on animal's temperature tropism [J]. Science in China (Series C), 2009, 39(7): 669- 676.
[9] 任永申,王伽伯,肖小河,等.小鼠限食/低温游泳模型评价黄连、吴茱萸及其复方寒热药性[J].药学学报,2008,44(11): 1221- 1227.
[10] 张学儒,赵艳玲,王伽伯,等.基于小鼠温度趋向行外学表征的红参和西洋参寒热药性差异研究[J].中华医学. 2009, 89(29): 1994- 1998.
(收稿日期: 2009- 12- 30;修回日期: 2010- 07- 11)
[编辑: 行 之]