

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.14.012

泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的建立与验证

李小雅¹, 朱佳源², 吴仪¹, 刘娅薇³, 惠华英², 谭周进³✉

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市岳麓区学士路300号, 410208; 2. 湖南中医药大学药学院; 3. 湖南中医药大学医学院

[摘要] **目的** 探索建立泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的方法。**方法** 模型建立: 将20只雄性昆明小鼠随机分为空白组和模型组, 每组10只。模型组小鼠给予腺嘌呤混悬液50 mg/(kg·d)灌胃, 每日1次, 连续14日; 从第8日起给予番泻叶水煎液10 g/(kg·d)灌胃, 每日1次, 连续7日。空白组小鼠给予0.4 ml无菌水灌胃, 每日1次, 连续14日。观察两组小鼠一般行为学, 分别于造模第1、5、9、13日时测量小鼠体质量、肛温, 计算腹泻指数, 造模第14日结束时检测血清中环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)含量, 计算cAMP/cGMP值。模型验证: 将另外30只小鼠随机分为正常组、模型对照组和四神丸组, 每组10只。模型对照组和四神丸组按照上述方法造模, 造模成功后四神丸组小鼠给予四神丸水煎液5 g/(kg·d)灌胃, 每日2次, 连续7日; 正常组与模型对照组给予0.35 ml无菌水灌胃, 每日2次, 连续7日。比较各组小鼠一般行为学改变, 干预第1、3、7日时体质量、肛温、腹泻指数, 以及干预7日后血清中cAMP、cGMP含量及cAMP/cGMP值。**结果** 造模结果显示, 空白组小鼠精神状态及自主活动情况均正常, 粪便柔软成形, 干湿适中, 肛周洁净。模型组小鼠精神状态欠佳, 体凉尾冷, 爪甲颜色较浅, 毛发稀疏无光泽, 粪便稀软。与空白组同时时间比较, 模型组小鼠造模第9、13日时体质量降低, 造模第5、9、13日时小鼠肛温降低($P<0.01$)。模型组小鼠腹泻指数随着时间延长而逐渐升高, 呈时间依赖性; 模型组小鼠血清cAMP含量降低, cGMP含量升高, 且cAMP/cGMP值降低($P<0.01$)。模型验证结果显示, 四神丸组小鼠精神状态较模型组有所恢复, 活动灵活, 皮毛光泽度提高, 爪甲颜色恢复, 粪便稀溏现象减轻。与模型对照组同时时间比较, 在治疗第3、7日时, 四神丸组腹泻指数均显著降低($P<0.05$)。给药7日后小鼠血清cAMP、cGMP水平及cAMP/cGMP值差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 腺嘌呤联合番泻叶可成功建立泄泻肾阳亏虚证动物模型, 符合泄泻肾阳亏虚证的临床特点。

[关键词] 泄泻; 肾阳亏虚证; 动物模型; 腺嘌呤; 番泻叶; 四神丸

泄泻是一种常见病和多发病, 常伴随发生于糖尿病、溃疡性结肠炎、肠易激综合征等疾病的发生发展过程中, 所带来的疾病负担在全球范围内呈现逐年增长趋势^[1]。由于其病因、病机及临床表现不同, 所表现出的中医证型存在差异, 其中肾阳亏虚证为泄泻常见中医证型之一^[2]。探究泄泻肾阳亏虚证的发生机制对于寻求有效的诊断和治療措施具有十分重要的现实意义。目前, 西医“辨病”与中医“辨证”的病证结合诊疗模式逐渐在临床中应用^[3]。

既往研究^[4]发现, 泄泻动物模型的单因素西药造模仅复制疾病模型, 无法完全符合中医病因病机理论。而传统单因素中药造模虽能反映疾病本质, 但操作困难, 造模周期长。基于此, 本实验通过采用中西药联合的方法来模拟泄泻肾阳亏虚证病证模型。

以方测证作为中医证候模型研究的重要手段, 可通过方剂的功效、性质以及药效反应来反证其对应的疾病证候属性^[5]。四神丸是治疗泄泻肾阳亏虚证的经典名方, 由《普济本事方》中二神丸与五味子散组成, 包括补骨脂、肉豆蔻、吴茱萸、五味子、生姜、大枣六味药, 具有温肾散寒、涩肠止泻之功。本实验通过四神丸以方测证对泄泻肾阳亏

基金项目: 国家自然科学基金(81874460); 湖南省研究生科研创新项目(CX20210684)

✉ 通讯作者: tanzhjin@sohu.com

虚证小鼠的疗效及其药效机制进行验证,旨在为泄泻肾阳亏虚证的基础与临床研究提供实验依据。本实验经过湖南中医药大学动物伦理委员会批准(伦理编号:LLBH-202106120002)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性昆明小鼠 50 只,体质量 18~22 g,4 周龄,购于湖南斯莱克斯实验有限公司,实验动物质量合格证号:ZS-202106150014。小鼠饲养在湖南中医药大学实验动物中心,屏障环境下进行实验,室温 23~25℃,相对湿度 50%~70%,光照/黑暗循环 12 h,自由饮食及饮水。小鼠普通饲料由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供[编号:SYXK(湘)2020-0006]。

1.2 药物

腺嘌呤(长沙雅尔生物科技有限公司,批号:EZ2811A135),称取 20 mg 腺嘌呤溶于 4 ml 的无菌水中,配置成 5 mg/ml 腺嘌呤混悬液。番泻叶(安徽普仁中药饮片有限公司,批号:2005302),取番泻叶 28 g,加水浸泡 30 min 后煎煮,浓缩药液成含生药 1 g/ml 番泻叶水煎液,4℃保存备用。四神丸药物组成及剂量参照《方剂学》^[6]教材,组成:补骨脂(盐)12 g,肉豆蔻(煨)6 g,吴茱萸(制)3 g,五味子(醋制)6 g,大枣(去核)6 g,生姜 6 g,中药饮片均由湖南君吴中药饮片科贸有限公司提供,批号分别为 HY21012201、湘 20160111、2020082804、HY21020304、2103120082、170903。四神丸水煎液制备^[7]:将中药药材放于煎煮容器内,容器中加入没过药材的水浸泡 30 min 后将水倒掉,在容器中加入相对于药材量 5 倍水煮沸 30 min,滤出水煎液;将过滤后的药渣继续加入适量水煮沸 15 min,滤出水煎液;将两次水煎液混合后接着煎煮 15 min,浓缩药液制备成含生药 0.29 g/ml 的四神丸水煎液,4℃保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

ELISA 试剂盒:环磷酸腺苷(cAMP,批号:JM-02827M1)、环磷酸鸟苷(cGMP,批号:JM-02304M1),江苏晶美生物科技有限公司。

SQ510C 高压灭菌锅(YAMATO 公司);101-IES 干燥箱(上海汗诺有限公司);5810R 台式大容量通用冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);SSW-420 水浴锅(上海博讯实业有限公司);SPARK 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.4 动物分组及造模

将 20 只小鼠适应性喂养 3 日后按随机数字表法分为空白组和模型组,每组 10 只。参照文献[8-9]造模方法及预实验结果改进后,模型组小鼠给予腺嘌呤混悬液 50 mg/(kg·d)灌胃,每日 1 次,连续 14 日。从第 8 日起模型组给予番泻叶水煎液 10 g/(kg·d)灌胃,每日 1 次,连续 7 日。空白组小鼠给予 0.4 ml 无菌水灌胃,每日 1 次,连续 14 日。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 宏观体征 根据泄泻肾阳亏虚证的临床表现,结合《中医病证诊断疗效标准》^[10]、《中医虚证辨证参考标准》^[11]、《泄泻中医诊疗专家共识意见(2017)》^[12],拟定小鼠泄泻肾阳亏虚证模型宏观体征诊断标准:大便稀溏,或完谷不化,形寒肢冷,形体消瘦,神态萎靡。实验期间,观察小鼠一般行为学指标,包括精神状态、活动频率、毛发形态色泽、爪甲颜色、粪便形态颜色,肛周是否洁净等情况。在造模的第 1、5、9 和 13 日分别检测并记录小鼠的体质量、肛温及腹泻情况,并计算腹泻指数。腹泻指数=稀便率×平均稀便级。稀便率=稀便数/粪便总数×100%,稀便级为稀便污染的滤纸所形成的污迹直径定级(污染直径<1 cm 为 1 级;直径 1~1.9 cm 为 2 级;直径 2~3 cm 为 3 级;直径>3 cm 为 4 级)^[13]。

1.5.2 血清中 cAMP、cGMP 含量检测 造模第 14 日结束后,每组采用随机数字表法取其中 5 只小鼠在无菌条件下进行眼眶取血,于 4℃、3000 r/min 离心 15 min(离心半径 5 cm),取上层血清。按照 cAMP、cGMP ELISA 试剂盒说明书方法进行检测,并计算 cAMP/cGMP 值。

1.6 模型验证

将剩余 30 只小鼠适应性喂养 3 日后按随机数字表法分成正常组、模型对照组和四神丸组,每组 10 只。模型组和四神丸组小鼠根据以上造模方法造模 14 日后,四神丸组小鼠给予四神丸水煎液灌胃,依据《中药药理研究方法学》^[14]中换算方法,得出四神丸组小鼠的中药等效剂量为 5 g/(kg·d),每日灌胃 2 次,连续 7 日。正常组与模型对照组小鼠灌胃 0.35 ml 无菌水,每日 2 次,连续 7 日。四神丸干预期间观察各组小鼠宏观体征,在治疗的第 1、3 和 7 日分别检测并记录小鼠的体质量、肛温及腹泻指数,方法同上。治疗 7 日结束后,每组按随机数字表法取其中 5 只小鼠在无菌条件下进行眼眶取血,取血清进行 cAMP、cGMP 含量检测,计算

cAMP/cGMP 值, 方法同上。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理和统计分析, 计量资料均符合正态分布, 用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey HSD 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泄泻肾阳亏虚证模型建立指标结果

2.1.1 两组小鼠一般行为学指标比较 空白组小鼠精神状态及自主活动情况均正常, 反应灵敏, 毛发滑顺, 粪便柔软成形, 干湿适中, 呈黑褐色, 肛周洁净。模型组小鼠精神状态欠佳, 自主活动减少, 反应迟钝, 呈现拱背蜷缩样, 喜聚集扎堆, 体凉尾冷, 爪甲颜色较浅, 毛发稀疏无光泽, 垫料潮湿, 粪便稀软易粘垫料, 肛门周围有粪便附着等现象。

2.1.2 两组小鼠不同时间体质量、肛温、腹泻指数比较 表 1 示, 与本组造模第 1 日比较, 空白组和模型组小鼠造模第 5、9、13 日时体质量均增加, 空白组小鼠造模第 5、9、13 日时肛温亦升高, 模型组小鼠造模第 13 日时肛温降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与本组造模第 5 日比较, 空白组和模型组小鼠造模第 9、13 日时体质量增加, 造模第 13 日时肛温降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与本组造模第 9 日比较, 空白组小鼠造模第 13 日时体质量增加, 模型组小鼠造模第 13 日时肛温降低 ($P<0.01$)。与空白组同时间比较, 模型组小鼠造模第 9、13 日时体质量降低, 造模第 5、9、13 日时小鼠肛温降低 ($P<0.01$)。空白组小鼠未出现腹泻, 模型组小鼠腹泻指数随着时间延长而逐渐升高, 呈时间依赖性 ($P<0.01$)。

2.1.3 两组小鼠血清 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值比较 表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 cAMP 含量降低, cGMP 含量升高, 且 cAMP/cGMP 值降低 ($P<0.01$)。

表 2 两组小鼠造模第 14 日时血清 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	cAMP /pmol·ml ⁻¹	cGMP /pmol·ml ⁻¹	cAMP/cGMP
空白组	5	0.670 $\pm$ 0.011	0.395 $\pm$ 0.004	1.699 $\pm$ 0.034
模型组	5	0.630 $\pm$ 0.010 ^{a)}	0.405 $\pm$ 0.003 ^{a)}	1.556 $\pm$ 0.035 ^{a)}

注: cAMP, 环磷酸腺苷; cGMP, 环磷酸鸟苷。

a) 与空白组比较, $P<0.01$ 。

2.2 泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的验证结果

2.2.1 三组小鼠一般行为学指标比较 正常组小鼠精神状态、自主活动、毛发、粪便情况均正常。与正常组比较, 模型对照组小鼠精神不振, 嗜睡懒动, 反应迟钝, 呈现拱背蜷缩聚堆, 毛发稀疏无光泽, 爪甲颜色较浅, 粪便稀软, 垫料潮湿, 肛周污秽。四神丸组小鼠精神状态有所恢复, 活动灵活, 皮毛光泽度提高, 嗜睡懒动及聚集扎堆现象改善, 爪甲颜色恢复, 且接近正常组, 粪便稀溏现象减轻, 逐渐成形且软硬适中, 但与正常组小鼠还存在差距。

2.2.2 三组小鼠不同时间体质量、肛温、腹泻指数比较 表 3 示, 与正常组同时间比较, 模型对照组和四神丸组小鼠体质量、肛温在治疗第 1 日和第 3 日时均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 在治疗第 7 日时体质量、肛温差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与本组治疗第 1 日比较, 模型对照组和四神丸组治疗第 3 日时体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 治疗第 7 日时体质量升高 ($P<0.01$), 治疗第 3、7 日时肛温均明显升高, 腹泻指数明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与本组治疗第 3 日时比较, 模

表 1 两组小鼠不同时间体质量、肛温及腹泻指数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	鼠数	体质量/g	肛温/℃	腹泻指数
空白组	造模第 1 日	10	24.78 $\pm$ 0.80	34.93 $\pm$ 0.55	0
	造模第 5 日	10	31.63 $\pm$ 1.13 ^{a)}	36.85 $\pm$ 0.40 ^{a)}	0
	造模第 9 日	10	35.61 $\pm$ 1.75 ^{a) c)}	36.27 $\pm$ 0.97 ^{a)}	0
	造模第 13 日	10	39.39 $\pm$ 1.81 ^{a) c) e)}	36.07 $\pm$ 0.22 ^{a) d)}	0
模型组	造模第 1 日	10	25.57 $\pm$ 1.06	35.01 $\pm$ 0.68	0.08 $\pm$ 0.07
	造模第 5 日	10	30.82 $\pm$ 1.45 ^{a)}	35.85 $\pm$ 0.64 ^{f)}	0.42 $\pm$ 0.20 ^{a)}
	造模第 9 日	10	32.86 $\pm$ 2.03 ^{a) d) f)}	35.13 $\pm$ 0.63 ^{f)}	1.07 $\pm$ 0.10 ^{a) c)}
	造模第 13 日	10	33.45 $\pm$ 1.35 ^{a) c) e) f)}	33.94 $\pm$ 0.84 ^{b) c) e) f)}	2.18 $\pm$ 0.05 ^{a) c) e)}

注: a) 与本组造模第 1 日比较, $P<0.01$; b) 与本组造模第 1 日比较, $P<0.05$; c) 与本组造模第 5 日比较, $P<0.01$; d) 与本组造模第 5 日比较, $P<0.05$; e) 与本组造模第 9 日比较, $P<0.01$; f) 与空白组同时间比较, $P<0.01$ 。

表 3 三组小鼠干预不同时间体质量、肛温及腹泻指数比较 (x̄±s)

组别	时间	鼠数	体质量/g	肛温/℃	腹泻指数
正常组	治疗第 1 日	10	41.48±2.30	36.20±0.29	0
	治疗第 3 日	10	41.92±2.28	35.90±0.40	0
	治疗第 7 日	10	43.98±2.92	36.43±0.37	0
模型对照组	治疗第 1 日	10	36.03±2.48 ^{a)}	33.98±0.52 ^{a)}	2.07±0.14
	治疗第 3 日	10	38.69±1.85 ^{b)}	34.83±0.63 ^{a) c)}	1.71±0.28 ^{c)}
	治疗第 7 日	10	41.71±2.88 ^{d) e)}	36.02±0.77 ^{d) f)}	1.01±0.26 ^{d) e)}
四神丸组	治疗第 1 日	10	33.44±2.97 ^{b)}	33.92±0.62 ^{a)}	2.02±0.07
	治疗第 3 日	10	36.31±3.15 ^{a)}	34.96±1.07 ^{b) c)}	1.15±0.18 ^{d) g)}
	治疗第 7 日	10	42.00±2.68 ^{d) f)}	36.08±0.82 ^{d) e)}	0.23±0.01 ^{d) f) g)}

注：a) 与正常组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与本组治疗第 1 日比较， $P<0.05$ ；d) 与本组治疗第 1 日比较， $P<0.01$ ；e) 与本组治疗第 3 日比较， $P<0.05$ ；f) 与本组治疗第 3 日比较， $P<0.01$ ；g) 与模型对照组同时间比较， $P<0.05$ 。

型对照组和四神丸组治疗第 7 日时体质量、肛温均升高，腹泻指数均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型对照组同时间比较，治疗第 3、7 日时四神丸组腹泻指数均显著降低 ($P<0.05$)。

2.2.3 三组小鼠给药 7 日后血清中 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值比较 表 4 示，给药 7 日后各组小鼠血清 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 三组小鼠给药 7 日后血清 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 值比较 (x̄±s)

组别	鼠数	cAMP /pmol·ml ⁻¹	cGMP /pmol·ml ⁻¹	cAMP/cGMP
正常组	5	0.672±0.021	0.404±0.003	1.666±0.045
模型对照组	5	0.650±0.014	0.405±0.002	1.605±0.031
四神丸组	5	0.668±0.018	0.404±0.002	1.655±0.042

注：cAMP，环磷酸腺苷；cGMP，环磷酸鸟苷。

3 讨论

本实验通过采用腺嘌呤联合番泻叶灌胃的方式模拟泄泻肾阳亏虚证病证模型。其中腺嘌呤作为构建肾阳虚衰模型常见药物之一，在黄嘌呤氧化酶的作用下可转变为难溶解于水的代谢产物，不仅能够机械性损伤肾小球及肾小管功能而致肾功能衰竭，同时其毒性作用影响机体肾组织的能量代谢过程，使机体出现如畏寒、精神倦怠、喜静萎靡、体质量下降等病理性状态^[15]。番泻叶药性寒凉，是中药常用的苦寒泻下之品，过服易伤及脾阳，累及脾阳，使脾失健运，同时出现虚寒之象，形成“过服寒凉之品，伤及脾阳”的病理基础^[16]。刘佳星等^[17]发现腺嘌呤联合番泻叶灌胃会使腹泻型肠易激综合征大鼠出现精神倦怠、喜扎堆、尿量增多、大便溏、体质量下降、进食减少等特征。应用这种复合因素（中西药联合）可将中医病因病机作为前

提，与病理造模相结合，对于构建短时有效又符合中医病因的泄泻肾阳亏虚证模型具有重要意义。

中医证候模型一直以来是中医实验研究的特色，学者们强调建立中医证候模型可注重以动物行为学表征作为模型评价依据^[18]。实验过程中我们观察到造模阶段模型组小鼠出现精神不振、嗜睡懒动、反应迟钝、呈现拱背蜷缩聚堆、发稀疏无光泽、爪甲颜色较浅、粪便稀软、垫料潮湿、肛周污秽等泄泻肾阳亏虚证表现。随着造模时间的增加，模型组小鼠体质量与同时间空白组小鼠相比均有所下降，且在造模第 13 日时降低最为明显，提示腺嘌呤联合番泻叶造模过程中对小鼠体质量起到抑制作用，这符合泄泻肾阳亏虚证中“形体消瘦”的表现。在对造模阶段小鼠肛温的检测中，空白组小鼠肛温处于较为稳定的状态，而造模前后模型组小鼠肛温差异较大，呈现显著降低，这也体现泄泻肾阳亏虚证中“形寒肢冷”的病理性状态。同样，腹泻指数作为泄泻模型中较为常见的指标之一，可通过计算实验过程中小鼠的稀便率及稀便级客观地反映泄泻的程度。实验中空白组小鼠均无腹泻，模型组小鼠腹泻指数随着造模时间延长腹泻指数增加，并呈时间依赖性。cAMP、cGMP 作为细胞调控作用的重要调节物质，在细胞代谢及多种生理效应中发挥关键作用，阳虚时表现为 cAMP 含量降低，cGMP 含量升高，cAMP/cGMP 降低^[19]，故本实验将 cAMP、cGMP 含量作为肾阳虚证模型的评价指标之一。在本实验结果中模型组小鼠 cAMP、cAMP/cGMP 降低，cGMP 升高，说明腺嘌呤联合番泻叶造模可使小鼠能量代谢降低。

以方测证结果显示，四神丸治疗后小鼠精神状态有所恢复，反应灵敏，扎堆聚集现象改善，粪便成形，软硬适中，腹泻现象明显改善，腹泻指数显

著降低,且均接近正常水平,验证了泄泻肾阳亏虚证模型造模方法的成功。但在体质量、肛温和能量代谢方面虽有改善趋势,但差异无统计学意义,可能与本研究样本量少、干预时间短有关,需进一步验证。

综上所述,腺嘌呤联合番泻叶灌胃可成功构建泄泻肾阳亏虚证小鼠模型,但由于动物和人在一般行为学方面存在不同,难以完全遵循中医四诊信息,这也是现阶段证候模型研究中的难点。今后我们可加强微观指标的多样化,通过将微观指标与宏观表征协同判定,同时与以方测证等方法相融合,构建完整的证候模型研究体系,最大限度地发挥以方测证的科学价值。

参考文献

- [1]MAKKER J, CHILIMURI S, BELLA JN. Genetic epidemiology of irritable bowel syndrome [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(40): 11353.
- [2]李玉丽,吴仪,袁振仪,等.析述泄泻的“同病异治”[J].世界华人消化杂志,2020,28(21):1090-1095.
- [3]张建英,李小茜,何建成.诊病-辨证-识症三位一体诊疗模式的构建与意义[J].中医杂志,2017,58(28):1538-1542,1553.
- [4]朱佳杰,苏晓兰,刘珊,等.病证结合复制大鼠脾肾阳虚腹泻型肠易激综合征模型的探讨[J].上海中医药杂志,2016,50(9):15-17,35.
- [5]卢林竹,胡志希,李琳,等.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):570-573.
- [6]李冀.方剂学[M].北京:中国中医药出版社,2012:153.
- [7]李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:119.
- [8]肖静,何立群,高建东,等.腺嘌呤与氢化可的松大鼠肾阳虚模型造模方法比较[J].中国比较医学杂志,2008,18(3):77-80.
- [9]肖新云,邓艳玲,刘又嘉,等.番泻叶所致脾虚泄泻小鼠血常规的研究[J].湖北中医药大学学报,2016,18(6):49-51.
- [10]国家中医药管理局.中医病证诊断疗效标准[S].北京:国家中医药管理局,1994:9.
- [11]沈自尹.中医虚证辨证参考标准[J].中西医结合杂志,1983,3(2):117.
- [12]中华中医药学会脾胃分会.泄泻中医诊疗专家共识意见(2017)[J].中医杂志,2017,58(14):1256-1259.
- [13]陈奇,张伯礼.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2016:282-283.
- [14]陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:1103-1105.
- [15]郑平东,朱燕俐,丁名城,等.腺嘌呤诱发“肾阳虚”动物模型的研制[J].中国医药学报,1990,5(8):68-73.
- [16]李芹,张会永,吴天石,等.脾阳虚证动物模型造模方法与模型评价的研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(8):1721-1728.
- [17]刘佳星,王彦礼,杨伟鹏,等.四神丸对IBS-D大鼠肠道屏障影响的实验研究[J].中药药理与临床,2019,35(3):24-28.
- [18]任珍,彭孟凡,苗明三.中医药动物模型评价方法的现状与思考[J].中药药理与临床,2020,36(4):219-222.
- [19]杨梦琳.从HPA、HPT轴探讨金匱肾气丸与六味地黄丸补肾作用机制的差异[D].长沙:湖南中医药大学,2016.

Model Building and Validation of Diarrhea Mice with Kidney-yang Depletion Syndrome

LI Xiaoya¹, ZHU Jiayuan², WU Yi¹, LIU Yawei³, HUI Huaying², TAN Zhoujin³

1. College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. College of pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine; 3. College of medicine, Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the modeling method of diarrhea mice with kidney-yang depletion syndrome.

Methods Model building stage: Twenty male Kunming mice were randomly divided into the blank group and modeling group, with 10 mice in each group. Mice in the modeling group were given daily gavage of 50 mg/(kg·d) adenine suspension for 14 days. From the 8th day onwards, the modeling group was gavaged with 10 g/(kg·d) of Fanxieye (*Folium sennae*) decoction, once a day for 7 days. Mice in the blank group were given 0.4 ml sterile water daily by gavage for 14 days. The general behavior of the mice in both groups was observed, while the body weight and rectal temperature were measured, and the diarrhea index was calculated on the 1st, 5th, 9th, and 13th day of modeling. At the end of the 14th day of modeling, the serum content of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were tested, and the cAMP/cGMP value was calculated. Model validation stage: the remaining 30 mice were randomly assigned to the normal group, model control group and *Sishen Pill* (四神丸) group,

with 10 mice in each group. The model was built in the model control group and *Sishen Pill* group with the above mentioned method. After successful modeling, mice in the *Sishen Pill* group were gavaged with 5 g/(kg·d) of *Sishen Pill* decoction, twice a day for 7 days. Mice in the normal and model control groups were given 0.35 ml sterile water by gavage, twice a day for 7 days. Mice were tested for general behaviour, and body weight, rectal temperature, and diarrhea index were assessed on the 1st, 3th, and 7th day. The serum content of cAMP and cGMP and the cAMP/cGMP value were assessed after 7 days. **Results** During the model building stage, the mental state and autonomous activity of the mice in the blank group were normal, and the perianal region was clean with soft, formed and moderate watery stool. Mice in the modeling group were in poor mental state, with cool body and cold tail, light nails, sparse and dull hair, and soft feces. Compared to those in the normal group, the body weight of the mice in the modeling group decreased on the 9th and 13th days of modeling, and the rectal temperature of the mice decreased on the 5th, 9th, and 13th days ($P < 0.01$). As the modeling time increased, the diarrhea index in the modeling group increased in a time-dependent manner; in the modeling group, the serum cAMP content decreased, and the cGMP content increased, with decreased cAMP/cGMP value ($P < 0.01$). During the model validation stage, the mental state of the mice in the *Sishen Pill* group were improved compared to the model control group, and the movement of the mice was flexible, with improved gloss of the fur, the color of the nails and the loose feces. Compared to the model control group, the diarrhea index of the *Sishen Pill* group on the 3rd and 7th days of treatment significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in serum cAMP, cGMP and cAMP/cGMP values between groups after 7 days ($P > 0.05$). **Conclusion** Adenine combined with Fanxieye (*Folium sennae*) decoction can be successfully used to establish the animal model of diarrhea with kidney-yang depletion syndrome, in accordance with its clinical characteristics.

Keywords diarrhea; kidney-yang depletion syndrome; animal model; adenine; Fanxieye (*Folium sennae*); *Sishen Pill* (四神丸)

(收稿日期: 2021-10-28; 修回日期: 2022-02-23)

[编辑: 邓媛]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。