

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.18.013

实验研究

三种气虚证动物模型的比较与评价

李宗源^{1,2}, 郝莉雨², 孙建辉², 于泽玥², 陈红映³, 霍海如², 李洪梅², 黄璐琦⁴✉

1. 江苏大学药学院, 江苏省镇江市京口区学府路301号, 212013; 2. 中国中医科学院中药研究所; 3. 海南省琼海市中医院; 4. 中国中医科学院中药资源中心

[摘要] **目的** 比较环磷酰胺、限食+力竭游泳、限食+力竭游泳+环磷酰胺三种方法制备的气虚证实验动物模型, 确定最优造模方法。**方法** 将美国癌症研究所(ICR)小鼠按力竭游泳时间随机分为正常对照组、环磷酰胺组、限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组, 每组10只, 雌雄各半。造模时间共15天。环磷酰胺组小鼠于造模第1、2、3、10天腹腔注射环磷酰胺, 每次50 mg/kg, 共4次; 限食+力竭游泳组小鼠连续15天每天进行力竭游泳, 并限制进食量为150 g/(kg·d); 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠按上述方法进行力竭游泳、限制进食量、腹腔注射环磷酰胺。每日观察小鼠一般状态, 于造模第7、14天测定小鼠体质量, 造模15天后比较各组小鼠力竭游泳时间、脾指数、胸腺指数、肝糖原含量, 血浆尿素氮、血浆免疫球蛋白IgG和IgA含量, 以及外周血T淋巴细胞(CD3⁺)及其亚群(CD4⁺、CD8⁺)、B淋巴细胞(CD19⁺)含量。**结果** 与正常对照组比较, 环磷酰胺组小鼠体质量、力竭游泳时间、脏器指数、外周血CD19⁺含量、血浆免疫球蛋白IgG、IgA含量显著降低, 血浆尿素氮含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 限食+力竭游泳组小鼠体质量, 脏器指数, 外周血CD3⁺、CD4⁺、CD19⁺及肝糖原含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠体质量, 力竭游泳时间, 脏器指数, 外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺, 肝糖原, 血浆免疫球蛋白IgG、IgA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠体质量、胸腺指数、外周血CD4⁺、CD19⁺、肝糖原含量明显降低, 且限食+力竭游泳组IgG显著升高($P<0.05$)。与限食+力竭游泳组比较, 环磷酰胺组脾指数显著下降; 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠脾指数、CD19⁺、血浆中IgG含量明显降低($P<0.05$)。**结论** 三种模型均可从免疫、能量、代谢不同方面模拟气虚证的临床表现, 且力竭游泳+限食+环磷酰胺造模方法能更好地模拟气虚证“神疲乏力”的临床表现。

[关键词] 气虚证; 动物模型; 力竭游泳; 饮食控制; 环磷酰胺

证候是中医学特有的概念^[1]。气虚证是指元气不足, 脏腑机能衰退, 以气短乏力、神疲懒言、自汗、舌淡、脉虚等为常见症^[2], 是中医学基本证候之一。形成气虚证的原因包括禀赋不足、年老虚衰、久病失养、外感六淫、劳倦过度等。现代医学研究^[3]表明, 气虚与机体物质能量代谢、免疫炎症反应、氧化损伤、内分泌等方面密切相关。气虚

证的动物实验需要借助中医理论指导下建立的气虚证动物模型^[4]。目前多数学者采用疲劳法复制气虚证模型, 或加以限制饮食、泻下等, 但都有成模后维持时间不长的问题; 而使用化学药物制备气虚证模型, 虽操作便捷、模型稳定, 但脱离了中医理论中气虚证的病因病机, 无法完全复制中医理论中气虚证临床表现。本研究通过检测小鼠体质量、脏器指数、免疫球蛋白、血浆尿素氮、肝糖原等指标, 比较化学药物、疲劳+限食以及疲劳+限食+化学药物三种建立气虚证模型方法的差异, 以期寻找更佳的气虚证动物模型造模方法, 为气虚证动物模型的建立提供实验依据。本实验经中国中医科学院中药

基金项目: 国家自然科学基金(81891010); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A04605); 中国中医科学院科技创新工程创新团队项目(CI2021B015); 中国中医科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费(ZZ15-WT-04)

✉ 通讯作者: huangluqi01@126.com

研究所动物伦理委员会批准, 批准号 2020B174。

1 材料与方法

1.1 动物

无特定病原体 (SPF) 级美国癌症研究所 (Institute of Cancer Research, ICR) 小鼠, 40 只, 雌雄各半, 体重 18~22 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (京) 2016-0006。小鼠饲养于屏障环境, 保持饲养环境 22~27 °C, 相对湿度 40%~70%, 明暗交替 12 h。动物使用许可证号: SYXK (京) 2019-0003。

1.2 试剂与仪器

注射用环磷酰胺, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 19120225; 氯化钠注射液, 石家庄四药有限公司, 批号: 2008183203; 红细胞裂解液 (Lysing Buffer), BD Biosciences 公司, 批号: 0244344; PBS 缓冲液, 江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号: 20201204; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联抗小鼠的抗原 CD3e 的抗体 (批号: C0031091119353)、Per-CP-Cyanine5.5 偶联抗小鼠的抗原 CD4e 的抗体 (批号: C0042022020653)、别藻青蛋白 (APC)-Cy7 复合染料偶联抗小鼠的抗原 CD8a 的抗体 (批号: C0081033020203)、藻红蛋白 (PE) 偶联抗小鼠的抗原 CD19 的抗体 (批号: C0193121919503), Tonbo Biosciences 公司; 免疫球蛋白 G (IgG, 批号: 201102285)、免疫球蛋白 A (IgA, 批号: 201209606) ELISA 检测试剂盒, 武汉云克隆科技股份有限公司; 肌/肝糖元试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 批号: 20210608。

5922 冷冻离心机, 日本 KUBOTA 公司; Sartorius BSA323S-CW 电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; PL203 METTLER TOLEDO 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; BioTek Epoch 型酶标仪, BioTek 公司; AU-480 血生化自动分析仪, Beckman Coulter 公司; Accuri C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.3 分组及造模

ICR 小鼠适应性饲养 1 周后, 测定力竭游泳时间^[5], 按力竭游泳时间采用分层区组随机化方法进行分组: 雌性小鼠 20 只, 应用 Excel 2016 软件随机函数公式产生随机数字与小鼠一一对应, 按力竭游泳时间从短到长排序, 每 4 只为一区组, 区组内随机数字排序, 从小到大分别为正常对照组、环磷酰胺组、限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰

胺组, 雄性小鼠以相同方法分组, 然后雌雄各 5 只合并后每组 10 只。造模方法参考文献^[5], 并根据前期预实验进行改进, 除正常组及环磷酰胺组外, 力竭游泳+限食组、力竭游泳+限食+环磷酰胺组小鼠每天进行力竭游泳, 水温 (17±1) °C, 水深 25 cm, 连续 15 天; 并在此期间给予饲料 150 g/(kg·d), 自由饮水。环磷酰胺组、力竭游泳+限食+环磷酰胺组小鼠于造模第 1、2、3、10 天腹腔注射环磷酰胺 50 mg/(kg·d)。环磷酰胺组和正常组小鼠自由进食、饮水。造模时间共计 15 天。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般状态及体质量 每日观察各组小鼠精神状态、活动情况、二便形态及鼻、唇、耳、爪的皮毛色泽等外观及行为变化, 每周称重 1 次。

1.4.2 力竭游泳时间 于造模第 15 天测定小鼠力竭游泳时间。力竭标准为游泳最后下沉经 10 s 后仍不能返回水面^[5]。

1.4.3 血浆尿素氮含量 造模结束后 1 天, 所有小鼠于水深 25 cm、30 °C 水中游泳 30 min, 休息 10 min 后眼眶取血约 0.6 ml, 置肝素钠抗凝管中, 4 °C、2500 r/min 离心 5 min, 离心半径 16.7 cm, 吸取上清液得到血浆, 全生化自动分析仪测定血浆尿素氮含量。

1.4.4 外周抗凝全血淋巴细胞含量 造模结束后, 取肝素钠抗凝全血 100 μl 至流式管中, 按顺序依次加入 FITC 标记的 CD3e、Per-CP-Cyanine5.5 标记的 CD4e、APC-Cy7 标记的 CD8a、PE 标记的 CD19 抗体各 1 μg, 室温避光孵育 30 min, 加入 2 ml 红细胞裂解液, 混匀后室温避光孵育 10 min, 4 °C、1620 r/min 离心 5 min, 离心半径 16.7 cm, 弃上清液, 加 PBS 洗 2 遍, 弃上清液, 加入 200 μl PBS 缓冲液使细胞重悬, 于流式细胞仪进行分析小鼠外周抗凝全血 T 淋巴细胞 (CD3⁺) 不同亚群 (CD4⁺、CD8⁺) 及 B 淋巴细胞 (CD19⁺) 比例。

1.4.5 血浆免疫球蛋白含量 取 1.4.3 分离所得血浆, 采用 ELISA 法测定血浆中 IgG、IgA 含量。

1.4.6 肝糖原含量 取血后, 将小鼠脱颈处死, 摘取小鼠肝脏置液氮速冻, 转移至 -80 °C 冰箱保存。实验时称取肝脏 50 mg, 比色法试剂盒测定肝脏肝糖原含量。

1.4.7 脏器指数 处死小鼠后打开胸腔、腹腔, 取脾脏及胸腺, 称重, 计算脾、胸腺指数, 计算公式为: 脏器指数=脏器重量/小鼠重量×100%。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。满足正态分布、方差齐性的数据以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间多重比较采用单因素方差分析, 结合 LSD 法进行多重比较分析; 对不满足正态分布或方差齐性数据以中位数和四分位间距, 即 $M(Q_1, Q_3)$ 表示, 采用非参数检验中 Kruskal-Wallis 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态结果

正常对照组小鼠体质量稳定增长, 精神、活动、皮毛均正常; 与正常对照组比较, 环磷酰胺组、限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠体型瘦弱, 体质量减轻, 精神倦怠, 活动减少, 嗜睡; 环磷酰胺组及限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠还表现为皮毛稀疏且欠光泽, 拱背, 大便溏稀。环磷酰胺组及限食+力竭游泳组各有 1 只小鼠在力竭游泳时间测定时下沉 10 s 取出后死亡。

2.2 各组小鼠造模后不同体质量比较

由于不同性别间小鼠体质量存在较大差异, 因此将雌雄小鼠体质量分别统计。表 1 示, 造模第 7 天, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组雄性小鼠及限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组全部小鼠体质量均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠体质量明显降低 ($P<0.05$)。造模第 14 天, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组、限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组全部小鼠体质量均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳组雄性小鼠、限食+力竭游泳+环磷酰胺组全部小鼠体质量明显降低 ($P<0.05$); 限食+力竭游泳组与限食+力竭游泳+环磷酰胺组各时间点比较, 小鼠体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠力竭游泳时间比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组、限

食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠力竭游泳时间均明显缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 限食+力竭游泳组小鼠力竭游泳时间差异无统计学意义 ($P>0.05$); 除正常对照组外, 其余各组间小鼠力竭游泳时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠力竭游泳时间比较 (min, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	力竭游泳时间
正常对照组	10	11.63±3.11
环磷酰胺组	9	8.29±3.16 ^{a)}
限食+力竭游泳组	9	10.10±3.23
限食+力竭游泳+环磷酰胺组	10	7.71±1.39 ^{b)}

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

2.4 各组小鼠脏器指数比较

表 3 示, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组、限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠脾指数和胸腺指数均明显降低 ($P<0.01$); 与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠脾指数和胸腺指数明显降低, 限食+力竭游泳组胸腺指数明显降低 ($P<0.05$); 与限食+力竭游泳组比较, 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠脾指数明显降低 ($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠脏器指数比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾指数	胸腺指数
正常对照组	10	0.42±0.04	0.28±0.07
环磷酰胺组	9	0.22±0.03 ^{a)}	0.20±0.06 ^{a)}
限食+力竭游泳组	9	0.28±0.04 ^{a)}	0.12±0.04 ^{a) b)}
限食+力竭游泳+环磷酰胺组	10	0.18±0.09 ^{a) b) c)}	0.10±0.04 ^{a) b)}

注: a) 与正常对照组比较, $P<0.01$; b) 与环磷酰胺组比较, $P<0.05$; c) 与限食+力竭游泳组比较, $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠外周抗凝全血淋巴细胞含量比较

表 4 示, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组小鼠外周血 CD19⁺ 含量降低, 限食+力竭游泳组小鼠外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD19⁺ 含量明显降低, 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 含量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳组、

表 1 各组小鼠造模后不同时间体质量比较 (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	造模第 7 天		造模第 14 天	
	雌性 (5 只)	雄性 (5 只)	雌性 (5 只)	雄性 (5 只)
正常对照组	25.0±0.87	30.6±2.16	25.6±0.72	33.2±2.94
环磷酰胺组	23.2±1.89	27.4±0.93 ^{a)}	23.7±1.70 ^{a)}	29.0±1.51 ^{a)}
限食+力竭游泳组	19.0±1.78 ^{b) c)}	18.0±4.28 ^{b) c)}	22.1±0.86 ^{b)}	24.4±2.50 ^{b) c)}
限食+力竭游泳+环磷酰胺组	18.5±2.27 ^{b) c)}	16.2±0.52 ^{b) c)}	21.1±1.12 ^{b) c)}	22.7±0.49 ^{b) c)}

注: a) 与正常对照组比较, $P<0.05$; b) 与正常对照组比较, $P<0.01$; c) 与环磷酰胺组比较, $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠外周血外周抗凝全血淋巴细胞含量比较

(x±s)

组别	鼠数	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD19 ⁺ /%
正常对照组	10	40.76±14.27	36.70±11.90	8.79±3.08	4.39±1.32	18.13±6.06
环磷酰胺组	9	36.59±16.21	31.16±11.78	8.39±2.95	3.74±0.81	3.98±1.76 ^{b)}
限食+力竭游泳组	9	28.26±11.64 ^{a)}	22.24±8.13 ^{b) c)}	6.52±2.20	3.45±0.64	2.16±1.47 ^{b) c)}
限食+力竭游泳+环磷酰胺组	10	25.53±13.80 ^{a)}	18.23±8.95 ^{b) c)}	5.40±3.38 ^{a)}	3.91±1.57	0.68±0.37 ^{b) c) d)}

注: a) 与正常对照组比较, $P<0.05$; b) 与正常对照组比较, $P<0.01$; c) 与环磷酰胺组比较, $P<0.05$; d) 与限食+力竭游泳组比较, $P<0.05$ 。

限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠外周血 CD4⁺、CD19⁺含量明显降低 ($P<0.05$); 与限食+力竭游泳组比较, 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠外周血 CD19⁺含量明显降低 ($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠血浆尿素氮、免疫球蛋白及肝糖原含量比较

表 5 示, 与正常对照组比较, 环磷酰胺组小鼠血浆尿素氮含量明显升高, 环磷酰胺组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠血浆中 IgG、IgA 含量明显降低, 限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠肝脏中肝糖原含量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与环磷酰胺组比较, 限食+力竭游泳组、限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠肝糖原含量明显降低, 限食+力竭游泳组 IgG 含量明显升高 ($P<0.05$); 与限食+力竭游泳组比较, 限食+力竭游泳+环磷酰胺组小鼠血浆中 IgG 含量明显降低 ($P<0.05$)。

3 讨论

《素问·刺志论篇》云:“谷盛气盛, 谷虚气虚”;《素问·举痛论篇》曰:“劳则喘息汗出, 外内皆越, 故气耗矣”。本研究将“饥则损气”(限食)与“劳则气耗”(力竭游泳)相结合, 模拟气虚证表现, 结果显示, 与正常对照组比较, 力竭游泳+限食组小鼠呈现精神倦怠、活动减少、嗜睡、体重减轻的状态, 与气虚证辨证中“神疲”状态相符。肝糖原与机体疲劳程度相关, 肝脏中肝糖原的储备增多, 可以维持运动时血糖水平, 从而为机体提供更多的能量来达到抗疲劳的目的^[6]。免疫器官

(胸腺、脾)重量、免疫球蛋白及淋巴细胞含量变化在一定程度上反映了机体的免疫功能^[7]。本研究结果显示, 与正常对照组比较, 力竭游泳+限食组小鼠体质量、脾指数与胸腺指数、外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺亚群水平、B 淋巴细胞 (CD19⁺) 水平、肝糖原含量显著降低, 小鼠更易疲劳且免疫功能下降, 与气虚证“气短乏力”的临床表现^[8]相符。

现代研究^[9-10]表明, 气虚证与免疫细胞的新生、凋亡或比例失衡相关, 致使机体免疫能力紊乱。环磷酰胺是一种细胞毒性药物, 可造成动物免疫抑制^[11-12]。本实验采用腹腔注射环磷酰胺造成动物免疫失衡状态, 与正常对照组小鼠相比, 环磷酰胺组呈现精神倦怠、活动减少、嗜睡、皮毛稀疏欠光泽、大便溏稀、体质量减轻的状态, 且体质量、力竭游泳时间、脾指数与胸腺指数、外周血 B 淋巴细胞含量 (CD19⁺) 及血浆免疫球蛋白 IgG、IgA 水平显著降低, 血浆尿素氮水平升高。力竭游泳时间可以反映机体抗疲劳的能力以及抗应激能力^[13]。本实验结果提示环磷酰胺在小鼠上成功模拟了临床气虚证患者免疫机能的紊乱。

将限制饮食、疲劳与化学药物造成免疫损伤相结合结果显示, 与正常对照组相比, 力竭游泳+限食+环磷酰胺组小鼠呈现精神倦怠、活动减少、嗜睡、皮毛稀疏欠光泽、大便溏稀、体质量减轻的状态, 且力竭游泳时间、脾指数与胸腺指数、外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺和 CD8⁺亚群水平、B 淋巴细胞 (CD19⁺) 水平、血浆免疫球蛋白 IgG 和 IgA 水平、肝糖原含量显著降低, 血浆尿素氮含量升高。在剧烈运动中, 糖和脂肪分解代谢产生的能量不足以补

表 5 各组小鼠血浆尿素氮、免疫球蛋白及肝糖原含量比较

[M (Q₁, Q₃), x±s]

组别	鼠数	尿素氮/mmol·L ⁻¹	IgA/μg·ml ⁻¹	IgG/mg·ml ⁻¹	肝糖原/mg·g ⁻¹
正常对照组	10	7.25 (6.50, 7.70)	37.35 (21.56, 63.05)	33.69±14.45	0.30±0.07
环磷酰胺组	9	7.95 (7.45, 8.50) ^{a)}	10.77 (10.05, 19.74) ^{b)}	5.46±2.57 ^{b)}	0.34±0.13
限食+力竭游泳组	9	8.30 (6.80, 8.60)	53.23 (39.91, 56.26)	33.97±10.96 ^{c)}	0.15±0.01 ^{b) c)}
限食+力竭游泳+环磷酰胺组	10	7.75 (7.25, 10.65)	9.34 (6.18, 9.45) ^{b)}	3.99±1.21 ^{b) d)}	0.15±0.01 ^{b) c)}

注: a) 与正常对照组比较, $P<0.05$; b) 与正常对照组比较, $P<0.01$; c) 与环磷酰胺组比较, $P<0.05$; d) 与限食+力竭游泳组比较, $P<0.05$ 。

充机体消耗, 导致氨基酸^[14]和蛋白质分解增加, 尿素氮含量上升。因此, 限制饮食、疲劳与化学药物造成免疫损伤相结合的造模因素在能量代谢紊乱、免疫水平下降层面均与气虚证“气短乏力”表现相符。

证候的临床表现与实验室检测指标相对较为复杂, 评价方式角度多样, 证候的动物模型要从表现于外部的证和内在的候统一评价。气虚证模型为中医证候模型, 本课题组前期研究发现, 单纯疲劳或限制实验动物饮食虽可以模拟气虚证候, 但维持时间较短, 因此本实验在保留疲劳、饥饿的中医病机基础上, 结合现代医学常用环磷酰胺造成免疫抑制, 在小鼠上模拟中医气虚证的临床表现及实验室指征, 并通过实验证明, 三种模型均可部分模拟气虚证的临床表现。与单纯环磷酰胺造模、力竭游泳+限食造模方法相比, 力竭游泳+限食+环磷酰胺造模制备的气虚证模型在能量代谢紊乱、免疫水平下降层面均与气虚证“元气不足, 气短乏力、神疲”^[2]相符, 更适合作为小鼠气虚证模型, 为后期深入探究气虚证现代科学内涵提供了更符合中医临床证候特征的模型制备方法。

本实验中所选取的测定对象多为实验室指标, 对临床所关注的神态、舌象、脉象等具有中医特色的指标涉及较少, 后续实验研究中可对中医特色指标加以测定, 并制定一套的符合中医特色的证候模型评价方法。

参考文献

- [1]刘保延, 王永炎. 证候、证、症的概念及其关系的研究[J]. 中医杂志, 2007, 48(4):293-296, 298.
- [2]国家技术监督局. 中医临床诊疗术语:证候部分[S]. 北京:中国标准出版社, 1997:1.
- [3]蔡铭, 夏婧, 郑桃云, 等. 中医气虚证评价指标的研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4):1578-1581.
- [4]李崇, 王世坤, 司红彬. 气虚证动物模型建立方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2018, 39(9):92-95.
- [5]徐宇杰. 通过控制饲料量建立“气虚证”动物模型的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(8):1909-1911.
- [6]杨畅, 彭朦媛, 王文娟, 等. 部分人参miRNA对气虚疲劳模型大鼠免疫相关靶基因的影响[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(1):120-125.
- [7]程延, 赵朝伟, 李浩, 等. 玄黄药膏对急性软组织损伤大鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2021, 42(3):284-287.
- [8]梁忠, 黄波, 陈军. 中医之经气与氧代谢相关性研究[J]. 中国针灸, 2012, 32(2):183-186.
- [9]曾典, 袁明勇, 张仲林. 肺气虚证的免疫学研究进展[J]. 四川中医, 2014, 32(6):175-179.
- [10]曹福凯, 郭建辉, 梁栋, 等. 健脾益肺口服液对慢阻肺“肺脾气虚证”大鼠免疫功能的影响[J]. 中成药, 2014, 36(10):2184-2186.
- [11]VALLANT B, KADNAR R, GOESSLER W. Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection[J]. J Anal Spectrom, 2007, 22(3):322-325.
- [12]ZHOU R, HE D, XIE J, et al. The synergistic effects of polysaccharides and ginsenosides from American Ginseng (*Panax quinquefolius* L.) ameliorating cyclophosphamide-induced intestinal immune disorders and gut barrier dysfunctions based on microbiome-metabolomics analysis[J]. Front Immunol, 2021, 12: 665901. doi: 10.3389/fimmu. 2021. 665901.
- [13]高慧颖, 姜帆. 龙眼干制前后缓解小鼠疲劳作用的研究[J]. 中国农学通报, 2022, 38(11):106-110.
- [14]李静, 李亮, 杨萍, 等. 气虚证模型大鼠尿液代谢组学特征[J]. 中医杂志, 2021, 62(6):516-522.

Comparison and Evaluation of Three Animal Models of Qi Deficiency Syndrome

LI Zongyuan^{1,2}, HAO Liyu², SUN Jianhui², YU Zeyue², CHEN Hongying³, HUO Hairu², LI Hongmei², HUANG Luqi⁴

1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Qionghai Hospital of Traditional Chinese Medicine; 4. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences

ABSTRACT Objective To compare and evaluate three experimental animal models of *qi* deficiency syndrome prepared by cyclophosphamide, food restriction plus exhaustive swimming, and cyclophosphamide plus food restriction plus exhaustive swimming, and to determine the optimal modeling method. **Methods** The Institute of Cancer Research (ICR) mice were divided into normal control group, cyclophosphamide model group, food restriction plus exhaustive swimming model group, food restriction plus exhaustive swimming plus cyclophosphamide model group, with

10 mice in each group, half-female and half-male. The modelling time was 15 days. Cyclophosphamide was intraperitoneally injected into the mice on the 1st, 2nd, 3rd, and 10th days of modelling (50 mg/kg). The mice in the exhaustive swimming plus food restriction model group performed exhaustive swimming every day for 15 days, and the food intake was restricted into 150 g/(kg·d). The mice in the exhaustive swimming plus food restriction plus cyclophosphamide model group performed exhaustive swimming, restricted food intake, and intraperitoneal injection of cyclophosphamide as mentioned above. The general condition of the mice was observed every day, and the body weight was measured on the 7th and 14th day of modelling. The exhaustive swimming time, splenic index, thymus index, liver glycogen content, plasma urea nitrogen, plasma immunoglobulin IgG and IgA content, as well as peripheral blood T lymphocytes (CD3⁺) and their subsets (CD4⁺, CD8⁺), and B lymphocyte (CD19⁺) content were detected and compared between groups after 15-day modelling. **Results** The body weight, exhaustive swimming time, organ index, peripheral blood CD19⁺ content, plasma IgG and IgA content of mice in cyclophosphamide group significantly decreased, while plasma urea nitrogen content significantly increased compared to those of mice in the normal control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The body weight, organ index, peripheral blood CD3⁺, CD4⁺, CD19⁺ and liver glycogen of mice in the exhaustive swimming plus food restriction group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and also the body weight, exhaustive swimming time, organ index, peripheral blood CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, liver glycogen content, plasma immunoglobulin IgG and IgA content in exhaustive swimming plus food restriction plus cyclophosphamide group significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared to those in the normal control group. Compared to those in the cyclophosphamide group, the body weight, thymus index, peripheral blood CD4⁺, CD19⁺ content, and liver glycogen content in the exhaustive swimming plus food restriction group and the exhaustive swimming plus food restriction plus cyclophosphamide group were significantly reduced, while the IgG content in the exhaustive swimming plus food restriction group significantly increased ($P < 0.05$). Compared to those in the exhaustive swimming plus food restriction group, the splenic index in the cyclophosphamide group significantly decreased, while splenic index, CD19⁺ content, and plasma immunoglobulin IgG in the exhaustive swimming plus food restriction plus cyclophosphamide group were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** The three models could all simulate the clinical manifestations of *qi* deficiency syndrome from the aspects of immunity, energy and metabolism, and the exhaustive swimming plus food restriction plus cyclophosphamide modeling method is more in line with the mental fatigue symptom of *qi* deficiency syndrome.

Keywords *qi* deficiency syndrome; animal model; exhaustive swimming; food restriction; cyclophosphamide

(收稿日期: 2022-01-13; 修回日期: 2022-05-30)

[编辑: 王利芬]

广告

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001年合订本每本100元, 2002、2003年合订本每本105元, 2004年合订本115元, 2005年合订本125元, 2007—2010年合订本每本140元。2011(缺5、6期)—2013年每册9.80元, 2014(缺21期)—2017年(缺3、5、15、18期)每册15元, 2018年(缺5、7、9期)每册20元, 2020年(缺7、8、9期)每册20元, 2021年每册20元。2011—2013年合订本每年4本, 全年280元, 2014—2017年合订本每年4本(缺2017年上半年合订本), 全年400元, 2018—2021年合订本, 每年4本, 全年600元。《中医杂志》2006—2008年增刊每册40元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加3元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街16号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信(zyzzgzh)购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。