

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.11.013

基于饮食劳倦伤脾理论的五种脾气虚证造模方法的比较

乔波¹, 刘婧¹, 李丹丹², 李小雅¹, 刘娅薇³, 谭周进¹✉

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. 湖南中医药大学科技处; 3. 湖南中医药大学医学院

[摘要] **目的** 比较五种常见的脾气虚证造模方法, 以建立符合中医临床的脾气虚证动物模型。**方法** 60只雄性昆明小鼠随机分为正常组、饮食失节组、跑步组、站立组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组, 每组10只。饮食失节组单日常禁食不禁水, 双日自由饮食饮水; 跑步组以16 m/min的速度每天跑步20 min; 站立组在自制水环境小平台箱内站立每天4 h; 跑步+饮食失节组以16 m/min的速度每天跑步20 min, 同时单日常禁食不禁水, 双日自由饮食饮水; 站立+饮食失节组在自制水环境小平台箱内站立每天4 h, 联合单日常禁食不禁水, 双日自由饮食饮水。各组持续造模14天。观察各组小鼠一般情况, 隔日记录小鼠的摄食量、饮水量, 计算粪便含水率; 旷场实验观察小鼠5 min运动距离、平均速度; 计算胃残留率、小肠推进率, 测定肠道消化酶活性、血清中乳酸脱氢酶(LDH)含量, 评价脾气虚模型。测定血清中sIgA含量、血常规、脏器指数, 评价免疫功能。**结果** 与正常组相比, 饮食失节组、跑步+饮食失节组小鼠暴躁易怒, 被毛无光泽, 粪便颗粒较小、无光泽、硬而干, 粪便含水率呈下降趋势, 每日摄食量、饮水量呈增长趋势; 跑步组小鼠反应灵敏, 被毛无光泽, 粪便软硬适中, 粪便含水率、饮水量呈增长趋势, 每日摄食量呈下降趋势; 站立组小鼠反应迟钝、眯眼、弓背, 被毛蓬枯槁无光泽, 粪便呈条形软便, 粪便含水率呈增长趋势, 每日摄食量、饮水量呈下降趋势; 站立+饮食失节组小鼠暴躁易怒, 被毛无光泽, 粪便软硬适中, 粪便含水率、每日摄食量、饮水量整体表现出增长趋势。与正常组比较, 饮食失节组、跑步组小鼠5 min运动距离、平均速度, 跑步组脾脏指数显著升高($P<0.05$)。站立组小鼠5 min运动距离、平均速度显著低于其他造模组, 胃残留率显著低于饮食失节组, 小肠推进率显著高于正常组、饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组, 小肠黏膜蛋白酶及蔗糖酶活性显著低于正常组、站立+饮食失节组, 肝脏指数显著高于跑步组($P<0.05$)。站立组、站立+饮食失节组小鼠血清中LDH含量显著低于饮食失节组($P<0.05$)。站立+饮食失节组肝脏指数显著高于其余各组, 血小板数显著低于正常组($P<0.05$)。饮食失节组肝脏指数显著高于正常组、跑步组、跑步+饮食失节组, 血红蛋白数显著低于站立组($P<0.05$)。跑步+饮食失节组红细胞数显著低于站立组、站立+饮食失节组, 血红蛋白数显著低于正常组、站立组、站立+饮食失节组($P<0.05$)。**结论** 利用水环境小平台建立的小鼠模型更符合脾气虚证诊断标准。

[关键词] 脾气虚证; 动物模型; 饮食失节; 劳倦过度; 水环境小平台

中医脾的主要生理功能在于运化水谷, 主升清和统摄血液。脾气既是化生气血的物质基础, 也是推动脾生理功能的基础动力。脾气虚证的发生多由

饮食不节, 或劳倦过度, 或忧思日久, 或禀赋不足, 或年老体衰, 调养失慎等所致^[1]。脾气虚证患者临床主要表现为倦怠乏力、大便溏稀、面黄食少、神疲懒言、食后腹胀、舌淡苔白、脉虚弱等。随着社会的发展, 过度劳倦、饮食不规律等问题较多, 致脾气虚证相关疾病多发。因此, 建立符合现

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(CX20220777)

✉ 通讯作者: tanzhjin@sohu.com

代临床的脾气虚证模型, 对于开展脾生理功能、脾气虚发生机制研究, 以及探索脾气虚证治疗方法具有重要意义。目前, 关于脾气虚动物模型的制备方法繁多, 但是缺少模型间的对比及脾气虚的病因探讨。基于此, 本研究从脾气虚证病因角度出发, 利用饮食失节、跑步、水环境小平台站立、饮食失节结合跑步以及饮食失节结合水环境小平台站立方法建立脾气虚证模型, 并从宏观、消化、免疫角度进行评价, 比较模型损伤程度及适用性, 为探究脾气虚证的本质、推动基础研究提供依据。本实验通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查, 伦理编号: 202205090007。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 4 周龄雄性昆明小鼠 60 只, 体质量 (20 ± 2) g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物质量合格证号: 430727221101085685。实验动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 室温 $23 \sim 25^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50\% \sim 70\%$, 每日 7:00 至 17:00 光照, 17:00 至次日 7:00 无光照。

1.2 主要试剂和仪器

分泌性免疫球蛋白 A (sigA, 批号: SU-B20419), 科诺迪生物有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH, 批号: A020-2-2), 南京建成生物工程研究所; 柠檬酸 (批号: 20180116)、柠檬酸钠 (批号: 20180116)、羧甲基纤维素钠 (批号: XK13-201-00311), 天津市恒兴化学试剂制造有限公司; 磷酸二氢钠 (批号: 20180410)、磷酸二氢钾 (批号: 20180223)、葡萄糖 (批号: 20181113)、蔗糖 (批号: F20110111), 国药集团化学试剂有限公司; 可溶性淀粉 (批号: XK13-201-00146), 天津市大茂化学试剂厂; 氢氧化钠 (批号: XK13-011-00027), 西陇科学股份有限公司; 福林酚 (批号: 13093194), 合肥博美生物科技有限责任公司; 3, 5-二硝基水杨酸 (批号: 20171128), 上海润成生物科技有限公司。

EDTA-K2 抗凝管 (山东省成武县华博医疗器械有限公司); CA-500 型血液自动分析仪 (Sysmex 公司); 5810R 型台式大容量通用冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Open field 型敞箱 (成都泰盟公司); 自制水环境小平台站立箱 ($112\text{ cm} \times 62\text{ cm} \times 41\text{ cm}$), 箱内设置 10 个平台, 平台直径 3 cm, 高 10 cm, 平台周边注水, 水面距平台面约 1 cm, 水温 $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$; 722 型可见分光光度计 (上海舜宇恒

平科学仪器有限公司); TH212 型智能数字测温仪 (北京中交建仪科技发展有限公司); YS-C100 型跑步机 (武义宇晟运动器械有限公司); SSW-420 型水浴锅 (上海博讯实业有限公司); SPARK 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); SQ510C 型高压灭菌锅 (YAMATO 公司); 101-IES 型干燥箱 (上海汗诺仪器有限公司); KSYY-OP-V4.0 小鼠旷场实时检测分析系统 [博睿唯思 (香港) 科技有限公司]。

1.3 分组及造模方法

60 只小鼠适应性喂养 3 天后, 采用随机数字表法分为正常组、饮食失节组、跑步组、站立组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组, 每组 10 只。饮食失节组小鼠单日常禁食不禁水, 双日常自由饮食饮水^[2]; 跑步组以 16 m/min 的速度每天跑步 20 min^[3]; 站立组在自制水环境小平台箱内站立每天 4 h^[4]; 跑步+饮食失节组以 16 m/min 的速度, 每天跑步 20 min, 结合单日常禁食不禁水, 双日常自由饮食饮水^[5]; 站立+饮食失节组在自制小平台箱内站立每天 4 h, 结合单日常禁食不禁水, 双日常自由饮食饮水; 正常组小鼠不干预, 自由饮食饮水。各组持续造模 14 天。

1.4 脾气虚证模型评价

根据脾气虚证的临床表现, 结合文献 [6-7] 拟定, 脾气虚证小鼠模型辨证要点包括四肢不收、大便稀溏、进食量减少、精神萎靡、食后腹胀、饮水量减少、毛色不荣等。评价指标包括一般情况、摄食量、饮水量、粪便含水率、旷场实验结果、脏器指数、血常规、血清中 LDH 和 sigA 含量、胃残留率、小肠推进率及肠道消化酶活性。

1.4.1 一般情况 在实验第 7 和 14 天上午 8:30 观察小鼠一般体征, 包括精神状态、活动情况、毛发、粪便等, 并记录小鼠肛温、体质量等。

1.4.2 摄食量、饮水量测定 在实验第 2、6、10 和 14 天分别记录小鼠的摄食量、饮水量。每日上午 8:30 投放等体积的新食, 24 h 后称取剩余食物。每日平均摄食量 = (投放饲料量 - 24 h 后剩余饲料量) / 鼠数。同时记录小鼠饮水量, 每日上午 8:30 投放等体积的饮用水, 24 h 后量取剩余饮用水体积。每日平均饮水量 = (投放饮水量 - 24 h 后剩余饮水量) / 鼠数。

1.4.3 粪便含水率测定 实验第 2、6、10 和 14 天上午 8:30 收集小鼠粪便并计算粪便含水率, 每组同一笼盒内 5 只小鼠的样本为一份, 称记样本湿重, 110°C 加热烘干称记干重, 计算粪便含水率^[8]。粪便含水率 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 $\times 100\%$ 。

1.4.4 旷场实验观察小鼠 5 min 内运动距离、平均速度 造模第 14 天末将小鼠置于检测房间, 适应 30 min。采用随机数字表法每组取 5 只小鼠, 在 KSY-OP-V4.0 小鼠旷场实时检测分析系统中进行检测, 观察 5 min 内小鼠的运动距离、平均速度。每只小鼠实验结束后, 清理粪便和尿液, 用 75% 乙醇擦拭检测箱, 等待乙醇挥发, 重复 5 次上述操作, 取平均值。

1.4.5 胃残留率、小肠推进率测定 造模结束后第 2 天, 各组用于旷场实验的 5 只小鼠, 以半固体营养糊 0.4 ml+墨汁 0.2 ml 依次灌胃, 20 min 后无菌条件下摘眼球取血并以颈椎脱臼法处死, 结扎幽门、贲门和回盲部, 剪取全胃和小肠, 称量胃及内容物的全重。将胃剪开, 洗净内容物, 并用吸水纸吸干, 称其胃净重。同时将小肠全部展开分别测量小肠总长度和幽门至墨汁前沿的长度。胃残留率(%)=(胃全重-胃净重)/半固体糊质量×100%; 小肠推进率(%)=(幽门至墨汁前沿的长度/小肠总长度)×100%。

1.4.6 血清中 LDH 及 sigA 含量检测 1.4.5 中小鼠摘眼球取血, 于 4℃、3000 r/min 离心 15 min (离心半径 5 cm), 取上层血清, 将血液分为两份, 一份血清标本用于 LDH 含量检测, 另一份血清标本用于 sigA 含量检测, 按照试剂盒说明书进行, 以标准品浓度为横坐标, 对应的 OD 值为纵坐标, 绘制出标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度值。

1.4.7 小肠黏膜消化酶活性检测 造模结束后第 2 日, 将各组剩余的 5 只小鼠无菌条件下摘眼球取血, 以颈椎脱臼法处死后, 收集小肠黏膜样本。用玻片刮取小肠黏膜称重后加入 5 ml 生理盐水, 4℃、3000 r/min 离心 10 min (离心半径 5 cm), 取上清液即为粗酶液, 4℃保存备用。采用 DNS 比色法测定粗酶液中的纤维素酶、淀粉酶和蔗糖酶活性, 蛋白酶活性用福林酚法测定。

1.4.8 血常规指标检测 将 1.4.7 中取得的全血标本, 注入抗凝管, 于 2 h 内送至湖南中医药大学第一附属医院检验科检测血常规。

1.4.9 脏器指数 造模结束后第 2 天, 将用于血常规测定的 5 只小鼠以颈椎脱臼法处死, 采集肝脏、胸腺和脾脏, 去除周围脂肪及多余组织后称重, 计算脏器指数, 脏器指数=(内脏器官质量/体质量)×100%。

1.5 统计学方法

利用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料符合正态分布以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐则采用重复测量资料的方差分析或单因素方差分析对多组差异进行比较, 组间两两比较选用 LSD 法, 方差不齐则多组间比较采用 Welch 近似 *F* 检验, 两两比较采用 Dunnett's *T* 法。数据不符合正态分布则以中位数和四分位间距 [$M(Q_1, Q_3)$] 表示, 采用非参数检验中 Kruskal Wallis 检验并进行 Bonferroni 校正, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠宏观体征情况比较

造模结束后, 正常组小鼠反应灵敏, 被毛光泽, 粪便呈麦粒状、软硬适中; 与正常组相比, 饮食失节组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组小鼠暴躁易怒, 被毛无光泽, 粪便颗粒较小、无光泽、硬而干; 跑步组小鼠反应灵敏, 被毛无光泽, 粪便软硬适中; 站立组小鼠反应迟钝、眯眼、弓背, 被毛蓬枯槁无光泽, 粪便呈条形软便, 用镊子夹取易变形。

图 1、图 2 示, 与正常组相比, 站立组小鼠的每日摄食量、饮水量随造模时间的增加整体表现出下降趋势, 跑步组每日摄食量整体呈下降趋势, 每日饮水量呈上升趋势, 饮食失节组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组每日摄食量、饮水量整体表现出上升趋势 (摄食量比较: F 值=548.059, $P < 0.001$, 饮水量比较: F 值=548.059, $P < 0.001$)。图 3 示, 对比粪便含水率可发现, 与正常组比较, 站立组、跑步组、站立+饮食失节组小鼠粪便含水率随造模时间的增加整体表现出增长趋势, 跑步+饮食失节组、饮食失节组粪便含水率整体表现出下降趋势 (F 值=226.007, $P < 0.001$)。

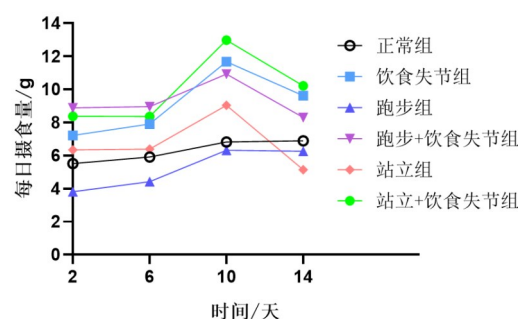


图 1 各组小鼠摄食量比较

Figure 1 Comparison of food intake in each group

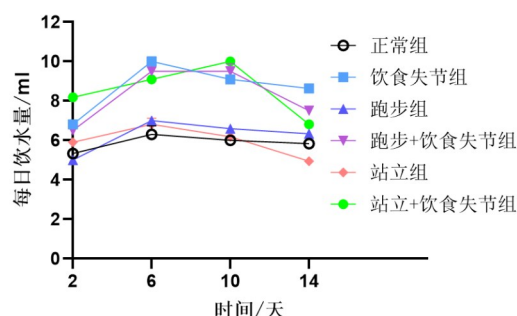


图2 各组小鼠饮水量比较

Figure 2 Comparison of water intake in each group

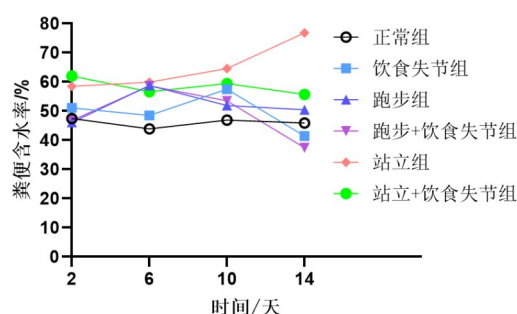


图3 各组小鼠粪便含水率比较

Figure 3 Comparison of moisture content of feces in each group

表1示,造模第7天,饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组、站立组、站立+饮食失节组小鼠的体质量显著低于正常组 ($P<0.05$),跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组小鼠体质量显著低于饮食失节组、跑步组、站立组 ($P<0.05$);造模

第14天,饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组、站立组、站立+饮食失节组小鼠的体质量显著低于正常组 ($P<0.05$),站立+饮食失节组小鼠体质量显著低于饮食失节组、跑步组、站立组 ($P<0.05$)。各组小鼠肛温各时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组小鼠旷场实验结果及血清LDH含量比较

正常组小鼠活动区域以检测箱的四角和周边区域为主,而中心区域则很少经过;饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组小鼠进入检测箱后,表现活跃,频繁经过中心区域;站立组小鼠反应迟钝,活动区域以检测箱的四角和周边区域为主,甚至没有形成闭合运动轨迹(见附图1,请扫描本文二维码获取)。表2示,饮食失节组、跑步组小鼠5 min内运动距离、平均速度显著大于正常组 ($P<0.05$),站立组小鼠5 min内运动距离、平均速度显著低于饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组、站立+饮食失节组 ($P<0.05$),站立组、站立+饮食失节组小鼠血清中LDH含量显著低于饮食失节组 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠胃残留率、小肠推进率及消化酶活性比较

表3示,站立组胃残留率显著低于饮食失节组,小肠推进率显著高于正常组、饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组 ($P<0.05$)。表4示,站立组小肠黏膜蛋白酶及蔗糖酶活性显著低于正常组、站立+饮食失节组 ($P<0.05$),各组间淀粉酶及纤维素酶活性差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表1 各组小鼠第7天、第14天体质量、肛温比较

Table 1 Comparison of body weight and rectal temperature of mice in each group on the 7th and 14th day [$\bar{x}\pm s/M(Q_1, Q_3)$]

组别	时间	鼠数	体质量/g	肛温/℃
正常组	第7天	10	32.30±1.70	37.25±0.36
	第14天	10	36.93±1.94	37.15 (36.85, 37.48)
饮食失节组	第7天	10	29.59±2.33 ^{a)}	37.42±0.21
	第14天	10	32.10±2.13 ^{a)}	37.35 (37.20, 37.50)
跑步组	第7天	10	29.74±3.06 ^{a)}	37.30±0.30
	第14天	10	31.93±3.28 ^{a)}	36.95 (36.83, 37.30)
跑步+饮食失节组	第7天	10	26.04±2.32 ^{a) b) c)}	37.45±0.33
	第14天	10	30.38±2.17 ^{a)}	37.35 (37.20, 37.68)
站立组	第7天	10	30.12±1.03 ^{a) d)}	37.28±0.27
	第14天	10	31.87±1.09 ^{a)}	36.95 (36.83, 37.18)
站立+饮食失节组	第7天	10	26.80±1.56 ^{a) b) c) e)}	37.22±0.29
	第14天	10	29.37±1.51 ^{a) b) c) e)}	37.55 (37.35, 37.68)

注: a) 与正常组同时间比较, $P<0.05$; b) 与饮食失节组同时间比较, $P<0.05$; c) 与跑步组同时间比较, $P<0.05$; d) 与跑步+饮食失节组同时间比较, $P<0.05$; e) 与站立组同时间比较, $P<0.05$ 。

表2 各组小鼠旷场实验结果及血清 LDH 含量比较

Table 2 Comparison of open field test results and serum LDH content in each group [x̄±s/M (Q ₁ , Q ₃)]				
组别	鼠数	旷场实验		LDH/U·L ⁻¹
		5 min 运动距离/cm	平均速度/cm·s ⁻¹	
正常组	5	1547.73±382.35	5.73±1.42	892 (869, 930)
饮食失节组	5	2257.83±300.42 ^{a)}	8.36±1.11 ^{a)}	1313 (1301, 1343)
跑步组	5	2233.30±432.26 ^{a)}	8.27±1.60 ^{a)}	911 (901, 1121)
跑步+饮食失节组	5	1953.85±713.31	7.24±2.64	996 (873, 1262)
站立组	5	1298.00±371.60 ^{b) c) d)}	4.81±1.38 ^{b) c) d)}	837 (827, 851) ^{b)}
站立+饮食失节组	5	2105.97±90.81 ^{c) e)}	7.80±0.34 ^{e)}	676 (649, 757) ^{b)}

注：LDH，乳酸脱氢酶。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与饮食失节组比较， $P<0.05$ ；c) 与跑步组比较， $P<0.05$ ；d) 与跑步+饮食失节组比较， $P<0.05$ ；e) 与站立组比较， $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠胃残留率、小肠推进率比较
Table 3 Comparison of gastric residual rate and small intestinal propulsion rate in each group [%，x̄±s/M (Q₁, Q₃)]

组别	鼠数	胃残留率	小肠推进率
正常组	5	65.00(61.75, 72.50)	40.67±7.70
饮食失节组	5	71.50(70.25, 78.75)	36.88±5.81
跑步组	5	65.00(62.50, 70.00)	41.36±9.57
跑步+饮食失节组	5	80.00(62.50, 80.00)	31.53±8.01
站立组	5	45.00(32.50, 50.00) ^{a)}	53.97±6.88 ^{a) b) c) d)}
站立+饮食失节组	5	80.00(57.50, 80.00)	42.70±11.52

注：a) 与饮食失节组比较， $P<0.05$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与跑步组比较， $P<0.05$ ；d) 与跑步+饮食失节组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组小鼠脏器指数、血清 sigA 含量比较

表5示，跑步组脾脏指数显著高于正常组 ($P<0.05$)，站立+饮食失节组肝脏指数显著高于正常组、饮食失节组、跑步组、跑步+饮食失节组、站立组 ($P<0.05$)，站立组肝脏指数显著高于跑步组 ($P<0.05$)，饮食失节组肝脏指数显著高于正常组、跑步组、跑步+饮食失节组 ($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠血常规指标比较

表6示，跑步+饮食失节组红细胞数显著低于站立组、站立+饮食失节组，血红蛋白数显著低于正常组、站立组、站立+饮食失节组 ($P<0.05$)；

表4 各组小鼠肠道消化酶活性比较

Table 4 Comparison of intestinal digestive enzyme activity in each group [U/g，x̄±s/M (Q ₁ , Q ₃)]					
组别	鼠数	蔗糖酶	蛋白酶	淀粉酶	纤维素酶
正常组	5	19.13±1.86	3.94 (3.21, 3.63)	1.17 (0.53, 1.12)	3.28 (1.17, 3.28)
饮食失节组	5	17.53±1.69	1.02 (0.82, 1.06)	0.98 (0.97, 1.01)	0.94 (0.88, 1.00)
跑步组	5	16.29±0.62	0.48 (0.43, 0.81)	0.92 (0.90, 0.95)	2.96 (1.80, 3.82)
跑步+饮食失节组	5	17.83±0.27	0.59 (0.58, 0.60)	0.89 (0.88, 0.94)	1.05 (0.85, 1.26)
站立组	5	13.94±1.93 ^{a) b)}	0.17 (0.16, 0.17) ^{a) b)}	0.40 (0.37, 0.42)	0.88 (0.82, 1.29)
站立+饮食失节组	5	18.68±3.91	3.01 (3.34, 3.10)	0.67 (0.62, 0.73)	1.28 (1.20, 2.12)

注：a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与站立+饮食失节组比较， $P<0.05$ 。

表5 各组小鼠脏器指数及血清 sigA 含量比较

Table 5 Comparison of organ index and serum sigA content in each group [x̄±s/M (Q ₁ , Q ₃)]					
组别	鼠数	脾脏指数/mg·g ⁻¹	胸腺指数/mg·g ⁻¹	肝脏指数/mg·g ⁻¹	sigA/μg·ml ⁻¹
正常组	5	0.22 (0.21, 0.23)	0.41 (0.19, 0.41)	5.16±0.41	74.94±10.58
饮食失节组	5	0.24 (0.19, 0.25)	0.41 (0.38, 0.50)	6.17±0.47 ^{a)}	73.78±7.24
跑步组	5	0.47 (0.41, 0.49) ^{a)}	0.19 (0.15, 0.42)	4.86±0.73 ^{b)}	72.04±12.26
跑步+饮食失节组	5	0.33 (0.31, 0.65)	0.31 (0.28, 0.37)	5.39±0.68 ^{b)}	74.94±6.44
站立组	5	0.30 (0.25, 0.31)	0.30 (0.28, 0.31)	5.75±0.32 ^{c)}	72.77±3.15
站立+饮食失节组	5	0.33 (0.32, 0.34)	0.34 (0.28, 0.36)	6.98±0.29 ^{a) b) c) d) e)}	81.03±0.64

注：sigA，分泌性免疫球蛋白A。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与饮食失节组比较， $P<0.05$ ；c) 与跑步组比较， $P<0.05$ ；d) 与跑步+饮食失节比较， $P<0.05$ ；e) 与站立组比较， $P<0.05$ 。

表6 各组小鼠血常规指标比较

Table 6 Comparison of blood routine indexes of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	白细胞数/ $\times 10^9 \cdot L$	红细胞数/ $\times 10^{12} \cdot L$	血红蛋白/ $g \cdot L$	血小板/ $\times 10^9 \cdot L$
正常组	5	4.38 $\pm$ 1.26	9.14 $\pm$ 0.60	147.60 $\pm$ 9.52	680.00 $\pm$ 72.24
饮食失节组	5	3.84 $\pm$ 0.91	8.25 $\pm$ 0.95	131.20 $\pm$ 10.91	566.60 $\pm$ 102.98
跑步组	5	4.78 $\pm$ 1.82	8.78 $\pm$ 1.26	135.00 $\pm$ 23.02	632.80 $\pm$ 105.73
跑步+饮食失节组	5	4.25 $\pm$ 0.61	7.39 $\pm$ 2.45	126.00 $\pm$ 16.65 ^{a)}	373.80 $\pm$ 87.56 ^{a) b) c)}
站立组	5	4.59 $\pm$ 1.33	9.54 $\pm$ 0.41 ^{d)}	150.80 $\pm$ 5.42 ^{b) d)}	612.60 $\pm$ 131.04 ^{d)}
站立+饮食失节组	5	5.14 $\pm$ 1.31	9.26 $\pm$ 0.32 ^{d)}	149.20 $\pm$ 4.35 ^{d)}	484.20 $\pm$ 102.30 ^{a)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与饮食失节组比较, $P < 0.05$; c) 与跑步组比较, $P < 0.05$; d) 与跑步+饮食失节组比较, $P < 0.05$ 。

饮食失节组血红蛋白数显著低于站立组 ($P < 0.05$); 跑步+饮食失节组血小板数显著低于正常组、饮食失节组、跑步组、站立组 ($P < 0.05$), 站立+饮食失节组血小板数显著低于正常组 ($P < 0.05$)。各组间白细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

《脾胃论》曰:“内伤脾胃,百病由生。”各种致病因素导致脾胃内伤不能化生气血,在内不能维持机体活动,在外不足以抵抗各种病邪的侵袭,故发生各种疾病。因此,构建可重复且稳定的脾气虚证动物模型,对于脾气虚证相关疾病的研究具有重要意义。本研究根据中医脾气虚证病因学说,参考目前已有的脾气虚证造模方法,运用单因素劳倦过度(水环境小平台站立、跑步)、饮食失节(隔天断食)以及复合因素建立脾气虚证小鼠模型。其中水环境小平台既可以满足其“劳倦伤脾”的因素,又可以满足“外湿侵袭”的因素;脾虚又易生湿,湿邪又易困脾。结果显示,水环境小平台站立干预后,小鼠出现消瘦、反应迟钝、眯眼、弓背,被毛枯槁无光泽,摄食量、饮水量的下降,粪便质地较软、含水量升高,活动的速度和距离减少,并且血清中LDH含量减少,小肠黏膜消化酶活性降低等,符合脾气虚证的临床诊断特征。

“神疲乏力”是评价脾气虚模型的重要宏观表征。现代医学中疲劳包括中枢神经系统损伤和运动系统功能下降^[9]。本研究通过行为学检测和血清中LDH的含量测定,对“神疲乏力”进行客观化评价。旷场实验主要用于检测啮齿类动物在新环境中的自发活动和探索行为,能客观反映中枢神经系统的兴奋程度^[10]。刘旭东等^[11]利用旷场实验对脾气虚证模型大鼠的神疲乏力进行客观化评价,发现脾气虚证大鼠运动的距离、平均速度明显降低。在碱性条件下,LDH可以促进乳酸转化为丙酮酸,从而有助于加速乳酸的清除和代谢,延缓疲劳^[12]。

多项研究^[13-14]结果表明,脾气虚证小鼠血清中LDH含量降低。本研究结果显示,饮食失节组与跑步组小鼠5 min运动距离、平均速度显著大于正常组,反映其中枢神经系统较为兴奋。

饮食物的消化与吸收主要依赖于胃肠运动以及消化酶的水解作用。本研究发现,站立组小肠推进率显著高于正常组,说明了站立因素可促进小肠蠕动,排便次数可能增多,出现腹泻。研究^[15]发现,脾虚证小鼠小肠黏膜淀粉酶、脂肪酶和胰蛋白酶活性下降。另有研究^[16]利用劳倦伤脾建立脾虚证小鼠模型,发现小肠胰蛋白酶、胃蛋白酶、胰脂肪酶、糜蛋白酶和 α -葡萄糖苷酶活性显著下降。本实验结果显示,站立组小肠黏膜蛋白酶及蔗糖酶活性显著低于正常组、站立+饮食失节组,说明站立组小鼠消化功能不良,可能会有“食后腹胀”的情况。

脾气虚使得机体营养吸收不足,能量代谢低下,可能会导致机体营养供给不足而出现贫血症状,则反映为红细胞或血红蛋白含量及红细胞压积的降低^[17-18]。脏器指数是衡量机体免疫功能的初步指标,脾脏及胸腺指数高低取决于其中淋巴细胞增殖的程度,可估计免疫功能强弱变化^[19]。本研究结果显示,跑步组脾脏指数显著高于正常组,提示跑步可以增强机体免疫力。跑步+饮食失节组红细胞数、血红蛋白数、血小板数显著低于正常组,提示跑步+饮食失节组的免疫功能降低。通过模型评价发现跑步+饮食失节组小鼠出现的症状不符合脾气虚模型特征,但免疫功能显著降低,考虑其原因为跑步过程中机械损伤小鼠爪子,导致小鼠爪子出现炎症性损伤,进而出现了血常规检测结果的异常。站立组小鼠符合脾气虚证模型评定,但血常规指标没有出现显著变化,提示脾气虚证可能不伴有免疫功能的低下。

综上,通过横向比较及纵向分析的方式,水环

境小平台建立疲劳致脾气虚证小鼠模型宏观和微观指标上都切合了脾虚证,为建立疲劳致脾虚证较为理想的实验模型。同时,脾气虚和脾阳虚两者在程度上存在递进关系。气虚是阳虚的初期阶段,阳虚则是在气虚证的基础上进一步加重,产生虚寒表现。在本研究中发现各组小鼠肛温在造模前后及各组间无显著变化,提示以上造模方法小鼠没有出现虚寒表现,未达到脾阳虚程度。这为脾气虚证的治疗、病理特点提供了更合理的动物模型。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,今后我们还可以结合以方测证,强化微观指标多样化,构建完整的证候模型评价体系。

参考文献

- [1]朱文锋. 中医诊断学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:340.
- [2]黄柄山,毛翼楷,范隆昌,等. 饮食失节所致的脾虚动物模型及中药治疗观察[J]. 中西医结合杂志, 1983, 3(5):295-296.
- [3]BEDFORD TG, TIPTON CM, WILSON NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 47(6):1278-1283.
- [4]杨茜,李峰,马捷,等. 水环境小平台建立脾虚证大鼠模型及其评价[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(5):452-457.
- [5]谢仰洲,陈琦涛,谢宗岑,等. 用过劳和饮食失节法塑造大白鼠脾气虚证模型的研究:生化免疫病理和超微结构观察[J]. 中医杂志, 1987(5):57-60.
- [6]张声生,胡玲,李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017)[J]. 中医杂志, 2017, 58(17):1525-1530.
- [7]郑小伟. 中医实验动物模型方法学[M]. 上海:上海中医药大学出版社, 1999: 63-111.
- [8]邵好青,何云山,肖嫩群,等. 泄泻食滞胃肠证小鼠模型的建立及保和丸的疗效[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1):10-15.
- [9]GRILL B, COLE M. Approach to fatigue and energy conservation[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2021, 32(3): 493-507.
- [10]刘文俊,高宇婷,窦智,等. 探讨旷场实验评价脾气虚和脾阳虚大鼠“神疲”的可能性及初步机制[J]. 中国当代医药, 2017, 24(21):4-6, 10.
- [11]刘旭东,刘文俊,孙大宇,等. 脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观化评价[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3):699-701.
- [12]LEE S, CHOI Y, JEONG E, et al. Physiological significance of elevated levels of lactate by exercise training in the brain and body[J]. J Biosci Bioeng, 2023, 135(3): 167-175.
- [13]WANG N, HUANG X, LI T, et al. Application of RRLC-QTOF-MS-based metabolomics and UPE for investigating Spleen-Qi deficiency syndrome with Panax ginseng treatment[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 256:112822.
- [14]王妮,张娜,李铁,等. 人参干预脾气虚体质的非靶向代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(2): 398-404.
- [15]李焰,王华,周孝琼,等. 银杏叶复方对实验性脾虚证模型小鼠消化酶活性和抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(21):52-55.
- [16]许仕杰. “五性”归脾经常用中药对脾虚动物模型的干预作用比较研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2016.
- [17]闫志强,翟少钦,张邑帆,等. 女黄扶正发酵物对脾虚大鼠肠道结构及免疫的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(1):120-125.
- [18]GOMOLLÓN F, GISBERT JP. Anemia and digestive diseases: an update for the clinician [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(37):4615-4616.
- [19]ZHONG Y, ZHANG X, HU X, et al. Effects of repeated lipopolysaccharide treatment on growth performance, immune organ index, and blood parameters of sprague-dawley rats[J]. J Vet Res, 2018, 62(3):341-346.

Comparative Study on Five Modeling Methods of Spleen Qi Deficiency Syndrome Based on the Theory that “Diet and Fatigue Damage the Spleen”

QIAO Bo¹, LIU Jing¹, LI Dandan², LIU Xiaoya¹, LIU Yawei³, TAN Zhoujin¹

1. College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. Office of Science & Technology, Hunan University of Chinese Medicine; 3. College of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To compare the five modeling methods of spleen qi deficiency syndrome, and to establish animal models consistent with clinical spleen qi deficiency in traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** Sixty male Kunming mice were randomly divided into normal group, diet disorder group, running group, standing group, running with diet disorder group, and standing with diet disorder group, ten mice in each group. The diet disorder group was fasted but with water for one day, and free to eat and drink for the next day. The running group ran at a

speed of 16 m/min for 20 minutes every day. The standing group stood in the self-made small water environment platform box for 4 hours every day. The running with diet disorder group and the standing with diet disorder group each received the corresponding combined two interventions. All groups continued modeling for 14 days. The general condition of the mice was observed; food intake and water intake were recorded every other day, and the moisture content of feces was calculated. Open-field experiment was used to evaluate the five minute walking distance and average speed of mice. The gastric residual rate and small intestinal propulsion rate were calculated. The intestinal digestive enzyme activity and serum lactate dehydrogenase (LDH) content were detected. The serum sigA content, blood routine indicators, organ index and immune function were measured. **Results** Compared to the normal group, the mice in the normal group were responsive, with shiny coats, wheat-like feces, moderate softness and hardness, and an increasing trend of food intake. Compared to the normal group, the mice in the diet disorder and the running+diet disorder groups were irritable, with a lustrous coat, dull, hard and dry feces in small pieces, having decreased moisture content of feces and increased amount of food and water intake; the mice in the running group were responsive, with lusterless coats, moderately soft and hard feces, having increased fecal moisture content and food intake and decreased water intake; the mice in the standing group were unresponsive, squinting, arching their backs, with lusterless coats, soft stools in the shape of strips, easily deformed when picked up with forceps, increased moisture content of feces, and decreased food and water intake; the mice in the standing+diet disorder group were irritable, with lusterless coat and moderate fecal hardness, as well as increased fecal moisture content, daily food and water intake. The five minute distance and average speed of mice in the diet disorder group and the running group, as well as the spleen index in the running group were significantly higher than those in the normal group ($P<0.05$). The standing group had significantly decreased five minute distance and average speed than the diet disorder group, the running group, the running+diet disorder group, and the standing+diet disorder group, lowered gastric residual rate than the diet disorder group, increased small intestine propulsion rate than the normal, diet disorder, running, running+diet disorder groups, lowered small intestine mucosal protease and sucrase activity than the normal and stand+diet disorder group, as well as increased liver index than the running group ($P<0.05$). And the serum LDH content of mice in the standing group and the standing+diet disorder group was significantly lower than that in the diet disorder group ($P<0.05$). The standing+diet disorder group had higher liver index than the other groups, and lower platelet count than the normal group ($P<0.05$). The diet disorder group had higher liver index than the normal, running, and running+diet disorder groups, and lower hemoglobin count than the standing group ($P<0.05$). The running+diet disorder group had decreased red blood cells than the standing and standing+diet disorder groups, and decreased hemoglobin count than the normal, standing, and standing+diet disorder groups ($P<0.05$). **Conclusion** The model established by using the small platform of the water environment is more consistent with the diagnostic criteria of spleen *qi* deficiency syndrome.

Keywords spleen *qi* deficiency syndrome; animal model; diet disorder; excessive fatigue; small water environment platform

(收稿日期: 2022-10-03; 修回日期: 2023-03-15)

[编辑: 王利芬]