

肾阳虚外感小鼠模型的建立及评价

尹翠翠¹, 杨勇^{1*}, 李静¹, 李荣荣¹, 容蓉¹, 孟红²

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

[摘要] 目的:建立肾阳虚外感复合病证小鼠模型。方法:腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液(0.008 mg·g⁻¹),复制小鼠肾阳虚模型。在此基础上,采用鼠肺病毒株 FM1 滴鼻建立肾阳虚小鼠外感模型,观察小鼠体征表现,死亡率及每天体重、游泳时间、肛温变化;测定小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),干扰素- γ (IFN- γ)含量;并观察肺组织病理变化;测肾、肺、脾、肾上腺及胸腺的脏器指数。结果:模型组小鼠游泳时间、肛温、趾温、自主活动均明显下降($P < 0.01$);肺组织出现外感病毒性肺炎的特征;与正常对照组比较,模型组小鼠各脏器指数均降低,其中胸腺具有显著性差异($P < 0.01$);IFN- γ 含量明显提高($P < 0.05$);TNF- α 含量有降低趋势。结论:采用雌二醇腹腔注射结合鼻腔滴注流感病毒 FM1,病证结合建立的肾阳虚外感病证小鼠模型,在一定程度上反映了中医肾阳虚外感的特点,为研究肾阳虚外感的发病机制及药物干预提供了较理想的实验模型。

[关键词] 流感病毒; 苯甲酸雌二醇; 肾阳虚外感模型; 评价

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0253-05

[doi] 10.11653/syfy2013100253

Establishment and Evaluation of Mice Model with Kidney Yang Deficiency Infected by Influenza Virus

YIN Cui-cui¹, YANG Yong^{1*}, LI Jing¹, LI Rong-rong¹, RONG Rong¹, MENG Hong²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Institute of Preclinical Medicine, Shandong Institute of Medical Science, Ji'nan 250062, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a mouse model with kidney Yang deficiency infected by influenza virus. **Method:** Kidney Yang deficiency mice were established by intraperitoneal injection of estradiol benzoate (0.008 mg·g⁻¹) as previously described. The physical signs in mice were observed, and the swimming time of mice, rectal temperature, toe temperature, autonomic mobility were examined. On the basis of above model, Mice were inoculated with mouse lung influenza virus (FM1) by the nasal cavity to establish the mice model with kidney Yang deficiency infected by influenza virus. Then physical signs, mortality, body weight and temperature changes were observed daily. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in mouse serum were measured, and the organ indexes of lung, spleen, kidney, adrenal and thymus were detected. Pathological changes of lung were observed. **Result:** The swimming time, rectal temperature, toe temperature, and autonomic activities of mice model were significantly decreased compared with normal group ($P < 0.01$); Viral pneumonia was detected in lung tissue. Compared with the normal control, the thymus index of model mice was remarkably reduced ($P < 0.01$). The level of IFN- γ was obviously increased ($P < 0.05$) and TNF- α level was decreased. **Conclusion:** To some extent, the symptoms of kidney-yang deficiency with influenza disease could embodied in this mouse model, which was successfully established by combining estradiol intraperitoneal injection with nasal cavity by influenza virus FM1 and this provided a more ideal experimental model for pathogenesis and drug

[收稿日期] 20120719(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273626);山东省中医药管理局项目(2011-027);山东省高等学校科技计划项目(J10LF20)

[第一作者] 尹翠翠, 硕士, 从事经方的现代研究, Tel:15098740590, E-mail:yincui1@126.com

[通讯作者] * 杨勇, 博士, 副教授, 从事经方的现代研究, Tel:0531-89628505, E-mail:yy7204@yahoo.com.cn

intervention.

[**Key words**] influenza virus; estradiol benzoate; kidney Yang deficiency model with influenza disease; evaluation

流感是一种多发的呼吸道疾病,其病毒种类繁多、结构简单、变异复杂,是人类至今尚不能完全控制、流行于全球的病毒性传染病^[1]。它的两个重要特征是流行性爆发和高死亡率^[2],流感还易引起细菌性肺炎、病毒性肺炎、脱水、慢性病恶化,以及鼻窦感染等并发症^[3],研究表明流感有极强传染性,人群普遍易感,其重症多是年老体弱、或免疫力低下患者,而这些病人多是属于中医的肾阳虚体征。肾阳主导一身之阳气,火衰其本则阳虚之证迭出,出现形寒肢冷、精神不振、腰膝酸冷、小便清长、夜尿频多、舌淡苔白润、脉沉细无力等肾的温煦、生殖、气化功能失调和免疫低下为主的临床表现。沈自尹^[4]提出了肾阳虚与现代医学的神经内分泌免疫系统有关,同时认为老年人生理改变和肾阳虚证甚为相似。由于肾阳虚体质患者在流感发病过程中与普通患者的感冒不同,病邪极易直中少阴,防治不得当病情将加重并变生它病,故“肾阳虚外感”患者是目前流感防治的重点和难点。针对以上问题,本课题进行了“肾阳虚外感”动物模型的建立并对该方法学进行评价。

1 材料

1.1 药品与试剂 苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业股份有限公司,批号 100801),注射用大豆油(浙江田雨山药用油有限公司,批号 110502),0.9%生理盐水(山东结晶药业有限公司,批号 11071272),流感病毒甲型(Flu A,北京地方株引自中国 CDC 病毒病研究所),Mouse γ 干扰素(IFN- γ)和 Mouse 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的 ELISA 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号为 ZKAFBZAA01,ZKZCBAA02)。

1.2 动物 昆明种小鼠,SPF 级,雄性,体重 18~22 g,山东鲁抗动物实验中心提供,许可证号 SCXK(鲁)20080002。

1.3 仪器 01193-YP601N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司),MC-142L 型欧姆龙电子体温计(欧姆龙大连有限公司),DT-880B 型手持式人体表面温度快速筛检仪(深圳市华盛昌机械实业有限公司),ZIL-2 型小鼠自主活动仪(北京医科院药研所),Multiskan MK3 型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

2 方法

2.1 小鼠肾阳虚外感模型的制备 小鼠 24 只,适应环境 2 d,随机分为正常对照组和模型组,每组 12 只。正常对照组按体重 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 腹腔注射 0.9%生理盐水;根据本课题组前期实验,模型组参考文献方法并改进造模剂量,按体重 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ ip $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 苯甲酸雌二醇稀释液,1 次/d,并自由饮水、饮食,连续 15 d,复制肾阳虚模型^[4]。然后将 Flue A 鼠肺适应株(FM1)用 9 日龄鸡胚传代,测定其血凝滴度为 1:80,通过滴鼻感染小鼠。参考预实验结果,肾阳虚模型组每只小鼠接种鼠肺病毒尿囊液 $50 \mu\text{L}$,对照组滴入等量生理盐水。小鼠自由饮食、饮水,接种后每天观察小鼠的精神状态和表现(称体重、量体温),并记录小鼠的发病和死亡情况,连续观察 7 d。建立肾阳虚外感模型。

2.2 模型的评价

2.2.1 肾阳虚模型的评价 观察肾阳虚小鼠一般体征。于造模第 13 天测定游泳时间,超过 1 h 的以 1 h 计;造模第 14 天测量肛温、趾温;造模第 15 天记录 10 min 内小鼠自主活动次数。

2.2.2 肾阳虚外感模型的评价 观察肾阳虚外感小鼠的一般体征,记录小鼠每天发病和死亡情况及每天的体重、肛温;于接种病毒后第 7 天眼眶取血处死小鼠, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 取血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。小鼠剖杀后取肾、脾、肺、胸腺、肾上腺分别在盛有生理盐水及 PBS 缓冲液的培养皿中洗涤 2 遍,用吸水纸擦干表面水分后称定各脏器的质量,组织浸入福尔马林溶液中。以备组织常规制片厚 $6 \mu\text{m}$,HE 染色,镜检观察脏器病理变化,测定脏器指数,并采用双抗体夹心技术测定小鼠血清及肺脏组织中 TNF- α ,IFN- γ 的含量。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,死亡率的比较采用 χ^2 , $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肾阳虚模型的表现

3.1.1 一般体征 正常对照组小鼠皮毛干爽光滑,精神状态良好,喜动而不喜卧。肾阳虚模型组小鼠皮毛汗湿竖立,精神萎靡,弓背萎缩,喜挤卧而不喜动,倦怠嗜睡,消瘦,对外界的反应较差等肾阳虚证。

3.1.2 肛温、趾温、自主活动、游泳时间 肾阳虚模型组小鼠的游泳时间、肛温、自主活动均较正常

对照组显著降低($P < 0.01$),说明造模成功。见表1。

表1 造模小鼠游泳时间、肛温、趾温、自主活动的变化($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	游泳时间/min	肛温/°C	趾温/°C	自主活动/次/10 min
正常对照	41.5 ± 18.0	36.40 ± 0.72	20.92 ± 0.58	232.9 ± 84.5
模型	16.5 ± 10.8 ²⁾	34.34 ± 0.60 ²⁾	19.16 ± 1.32 ²⁾	61.8 ± 43.3 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表2~4同)。

3.2 肾阳虚外感模型的表现

3.2.1 一般体征 肾阳虚外感小鼠除上述症状外症状初期为毛松、不活泼、厌食、呼吸短促、可听到肺部水泡声,有时可见到打喷嚏,到后期可呈现极度消瘦,呼吸极度困难,尾血管发紫、行动呆滞。

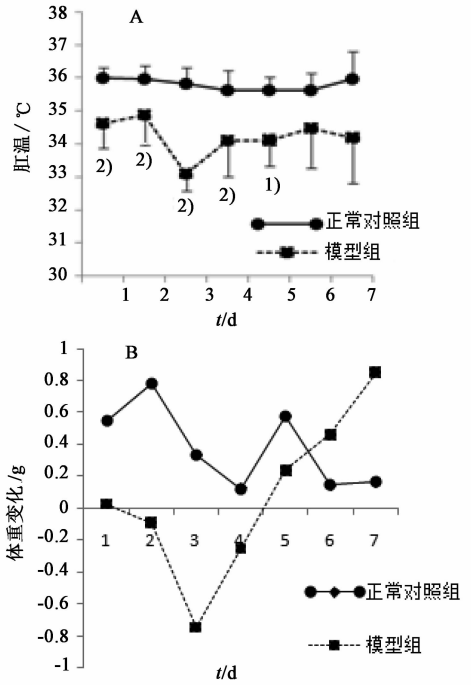
3.2.2 死亡率 接种病毒后,模型组小鼠先后有4只出现死亡,其死亡率33.33%。

3.2.3 肛温、体重变化趋势 与接种病毒前比较,模型组接种病毒后肛温前1~5 d呈显著降低($P < 0.01$);体重第2~4天呈下降趋势,第5~7天有回升,正常组小鼠肛温及体重变化较平稳。见图1。

3.2.4 脏器指数 与正常对照组比较模型组胸腺指数显著降低($P < 0.01$),其他各脏器指数有下降趋势,但无明显差异,见表2。

3.2.5 血清 TNF- α , IFN- γ 含量 与正常对照组比较,模型组小鼠血清 IFN- γ 含量明显升高($P < 0.05$),TNF- α 与正常对照组无显著性差异。见表3。

3.2.6 病理切片观察 与正常对照组比较,模型组小鼠支气管肺组织病理表现符合外感病毒性肺炎特



A. 肛温; B. 体重变化

与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图1 造模组小鼠各测量指标随时间的变化趋势($\bar{x} \pm s$)

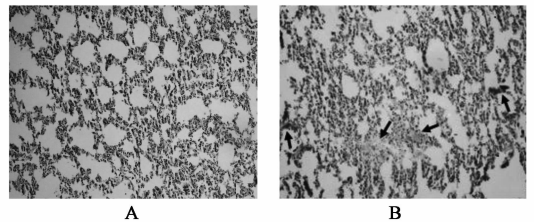
表2 造模小鼠脏器指数变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脾指数	肺指数	胸腺指数	肾指数	肾上腺指数
正常对照	12	0.353 ± 0.116	0.877 ± 0.319	0.227 ± 0.071	1.108 ± 0.080	0.037 ± 0.001
模型	8	0.287 ± 0.055	0.861 ± 0.253	0.079 ± 0.023 ²⁾	1.056 ± 0.140	0.024 ± 0.012

表3 造模小鼠血清中 TNF- α , IFN- γ 变化($\bar{x} \pm s$) ng·L⁻¹

组别	n	TNF- α	INF- γ
正常对照	12	22.13 ± 11.92	27.74 ± 21.58
模型	8	16.35 ± 8.27	49.35 ± 11.12 ¹⁾

征,出现明显的炎症,肺泡腔不同程度缩小,肺泡大小不一,出现个别极大肺泡;肺泡间隔不同程度地增宽,肺内毛细血管出现扩张、瘀血,可见大量淋巴细胞和单核细胞浸润。正常对照组肺组织肺间质未出现炎症表现,肺泡大小正常,无扩张及萎缩,肺泡间隔不增宽,各级支气管上皮较完整无渗出物,毛细血管无充血、出血现象,仅在小支气管周围有少量淋巴细胞。见图2。



A. 正常对照组; B. 模型组

图2 造模组小鼠肺组织病理变化(HE染色, ×200)

4 讨论

本课题建立了小鼠肾阳虚外感模型。在鼻腔滴注流感 FM1 病毒后,与正常对照组和自身滴注病毒前比较,模型对照组肛温在第1~4天出现显著性降

低,小鼠并出现死亡情况,死亡率与正常对照组比较也显著性增高;模型对照组在第 3 天体重增长变化也有明显降低趋势。7 d 后实验结束,肺组织镜下显示,模型对照组小鼠肺组织病理表现为外感病毒性肺炎特征,肺部瘀血,呈现暗红色,光镜下显示肺泡腔及间质出血、炎性细胞浸润等。

本实验模型小鼠出现皮毛汗湿竖立、精神萎靡、弓背萎缩、喜挤卧而不喜动、倦怠嗜睡、消瘦等症,从外表体征、精神状态等方面说明符合肾阳虚病证。腰膝酸软、游泳时间缩短畏寒肢冷是肾阳虚证的主症^[6],肖氏^[7]等从动物热活性角度考察中医肾阴/阳虚体质动物模型的科学性与可靠性实验中验证“阳虚则寒”的理论。本实验通过肛温、趾温、小鼠自主活动次数反映此症。综合以上指标表明采用腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液所致小鼠肾阳虚模型,可较好的符合中医肾阳虚病证体征。

小鼠在肾阳虚外感模型制备过程中,接种病毒后,脾、肺参与炎症反应,出现水肿、瘀血等症,脏器指数本应升高,可能由于注射苯甲酸雌二醇注射液,使模型组小鼠由于不能完全代谢多余稀释注射用油溶液,出现腹腔积水现象,致使模型组小鼠出现体重偏大于正常对照组,使小鼠脏器指数计算结果受到影响,出现模型组小鼠肺指数与正常对照组相似,而不是如文献报道小鼠感染流感病毒后,肺指数显著性升高^[8-10];模型组小鼠为肾阳虚体征,其免疫功能降低,脾、胸腺、肾上腺作为体内重要的免疫器官,其脏器指数降低趋势,其中胸腺指数明显降低。

病毒性肺炎的免疫炎症反应机制十分复杂,涉及到多种炎症细胞和炎症因子,小鼠流感病毒致命的后果主要取决于宿主的免疫病理损伤,而非病毒复制所致的直接细胞病理改变^[11],IFN 具有抗病毒、抗肿瘤及免疫调节作用,模型组小鼠在感染流感病毒后,IFN- γ 显著性升高,提示这与 FM1 感染动物诱导 NK 细胞等分泌 IFN- γ 有关。有关 TNF 的研究报导在之前与现代及国内外研究中颇有争议。近期有文献报道,利用 TNF- α 基因敲除小鼠建立的流感病毒感染的动物模型的病理结果表明,严重的肺部免疫功能缺陷是引起流感发病和死亡的主要因素之一,此研究结果表明 TNF- α 在流感病毒的清除中作用不明显,但在流感发病过程中的免疫调节具有双向性,即在疾病感染初期,促进炎症反应从而加重病情,在病毒清除后期对抗流感病毒炎症反应及免疫应答的调控中及组织重塑过程中起着重要的负调控作用^[12]。本课题建立的肾阳虚外感模型中,与正常

对照组比较,模型组小鼠肺组织出现明显的肺炎病理特征,肛温、体重在染毒 2~4 d 出现明显下降趋势,虽然之后肛温、体重有逐步上升的趋势,但总体而言,模型组的肺组织的病理损伤与正常组比较严重很多。有文献报道,染毒 7 d 后,宿主体内的流感病毒几乎检测不到,而继发的病理损伤是其死亡的主要因素,所以本课题在染毒 7 d 后检测模型组 TNF- α 比正常组偏低,可能与 TNF- α 发挥对肺组织炎症反应和免疫病理损伤的负调控有关,此方面机制还有待于继续研究。

本研究通过综合整体评价,建立了肾阳虚外感小鼠模型。本方法简单可靠,为完善肾阳虚外感实验诊断标准、研究肾阳虚外感的发病机制、为治疗该病证的中药复方新药药理药效研究提供了较好的动物模型。

[参考文献]

- [1] 李世宏,梁纪兰,杨锐乐,等. 中药抗流感病毒研究进展[J]. 中兽医医药杂志,2007,26(5):26.
- [2] 马力,黎敬波,盛丹,等. 3 种解表方对甲 1、甲 3 型流感小鼠白介素 2 和 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):108.
- [3] 张烜榕,王涛,申元英. 甲型流感病毒感染 BALB/c 小鼠模型的建立[J]. 大理学院学报,2007,6(10):25.
- [4] 沈自尹. 肾的研究(续集)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:313.
- [5] 陈素红,吕主源,范景,等. 海马不同提取物对雌二醇致肾阳虚小鼠的影响[J]. 中草药,2009,40(2):258.
- [6] 印会河,童瑶. 中医基础理论[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:104.
- [7] 任永申,赵艳玲,肖小河,等. 基于动物热活性检测的肾阴虚/肾阳虚模型寒热属性差异研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):94.
- [8] 陈忠斌,王升启,孙志贤,等. 流感泰得在小鼠模型中抗流感病毒活性研究[J]. 生物技术通讯,2000,11(2):81.
- [9] 刘培民,张鸿彩,包培蓉. 升降散抗流感病毒实验研究[J]. 山东中医药大学学报,2001,25(1):43.
- [10] 闫怀士,李京培. 艾灸抗小鼠流感病毒性肺炎的实验研究[J]. 上海针灸杂志,2006,25(7):43.
- [11] 唐光华,余如瑾,姜良铎. 栝楼甘草颗粒对流感病毒肺炎小鼠肺组织和血清 TNF- α , IL-6, MCP-1, INF- γ 及 IL-1 β 含量的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(12):950.
- [12] Damjanovic D, Divangahi M, Kugathasan K, et al. Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF-alpha during acute influenza infection [J]. Am J Pathol, 2011, 179(6):2963.

[责任编辑 李玉洁]

醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究

高兰, 颜晓静, 李征军, 杨艳菁, 张丽*, 丁安伟

(南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:**研究醋炙降低甘遂乙酸乙酯部位对小鼠胃肠道氧化损伤的作用机制。**方法:**将小鼠分为空白对照组、甘遂组(256,160,100 g·kg⁻¹)、醋甘遂组(256,160,100 g·kg⁻¹),灌胃给药 7 d 后,取小鼠胃、肠匀浆测定乳酸脱氢酶(LDH)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量。取胃、肠组织进行 HE 染色,光镜观察其组织形态学改变。**结果:**空白对照组小鼠体重无明显减轻,大便性状正常,甘遂和醋甘遂各剂量组出现体重明显减轻和大小便失禁,但与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组体重减轻较少,泻下作用有所缓和。与空白对照组比较,甘遂各剂量组胃肠 SOD 活力、GSH 含量明显降低,MDA 含量、LDH 活力明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组胃肠 SOD 活力、GSH 含量明显增高,MDA 含量、LDH 活力明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白对照组比较,甘遂各剂量组胃肠黏膜损伤显著加重($P < 0.05$, $P < 0.01$);与甘遂组比较,醋甘遂各剂量组胃肠黏膜损伤显著减轻($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**醋炙能明显降低甘遂乙酸乙酯部位对小鼠胃肠道的氧化损伤,为后续进一步探讨甘遂醋炙减毒机制提供了一定的依据。

[关键词] 甘遂; 醋炙甘遂; 胃肠损伤; 氧化损伤; 减毒

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0257-04

[doi] 10.11653/syjf2013100257

Gastrointestinal Toxicity Attenuation of Kansui Radix Stir-baked with Vinegar by Reducing Oxidative Injury in Mice

GAO Lan, YAN Xiao-jing, LI Zheng-jun, YANG Yan-jing, ZHANG Li*, DING An-wei

(Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the gastrointestinal toxicity of ethyl acetate extract of Kansui Radix (KS) and Kansui Radix stir-baked with vinegar (VKS). **Method:** ICR mice were dosed for 7 days with the ethyl acetate extract of KS (256, 160, 100 g·kg⁻¹) and VKS (256, 160, 100 g·kg⁻¹), and then were killed to collect the stomach and intestines. Afterwards, the gastrointestinal tissues were sliced and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) staining to observe the pathological changes. The activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) were measured from gastrointestinal homogenate. **Result:** After treated with KS and VKS, weight of ICR rats was reduced and diarrhea was occurred. However, in comparison with the KS treated groups, the VKS treated groups had less weight loss and lighter diarrhea, while the control group had no weight loss and bowel movement was normal. In comparison with the control group, KS groups had lower SOD activities and GSH content, but higher MDA content and LDH activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$); in comparison with KS groups, VKS groups had higher SOD activities and GSH content, but lower MDA content and LDH activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE staining of gastric and intestinal

[收稿日期] 20121020(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973940);国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-09-0163);江苏省“六大人才高峰”项目(2010年度);江苏高校优势学科建设工程项目(yxxk-2010)

[第一作者] 高兰,硕士研究生,从事中药炮制机制与质量标准研究,Tel: 13809036963,E-mail:gaolan1000@126.com

[通讯作者] *张丽,博士,教授,硕士生导师,从事中药炮制与质量控制研究,Tel:025-85811519,E-mail:zhangliguanxiong@163.com