

## 2 种慢性间歇性缺氧小鼠模型模拟气阴 两虚证临床指征的比较研究

王文萍,柴程芝,寇俊萍,余伯阳\*

(中国药科大学中药复方研究室,南京 211198)

**[摘要]** 目的:比较钠石灰和低压氧仪 2 种不同缺氧方式诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型的整体行为变化,为进一步构建气阴两虚证动物模型奠定基础。方法:分别采用氧分压从 21% 逐渐降至 6%,平均下降速度为 0.5%/min ~ 1%/min 的钠石灰缺氧法和氧分压在短时间内骤降后维持在 7% ~ 8% 的低压氧仪缺氧法,考察 2 种缺氧模式对小鼠体重,摄食量,自发活动以及心率、T 波等气阴两虚临床相关指标变化的影响。结果:钠石灰和低压氧仪 2 种不同的缺氧方式均能够导致小鼠体重下降;摄食量减少;行走格数减少,直立次数增加等自发活动改变;心率加快,T 波持续抬高等心电图变化,二者对各项指标的影响呈基本一致的趋势,其结果具有显著相关性。结论:钠石灰和低压氧仪 2 种缺氧方式诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型均能够模拟形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等气阴两虚证的主要临床特征。

**[关键词]** 慢性间歇性缺氧;气阴两虚证;动物模型;低压氧仪;钠石灰

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0171-06

## Comparison of Clinical Indications Simulating Deficiency of Both Qi and Yin Syndrome Induced by Two Types of Chronic Intermittent Hypoxia in Mice

WANG Wen-ping, CHAI Cheng-zhi, KOU Jun-ping, YU Bo-yang\*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish foundation for constructing a suitable animal model of deficiency of both Qi and Yin syndrome (DQYS) induced by two types of chronic intermittent hypoxia (soda lime and low-pressure

**[收稿日期]** 20110228(004)

**[基金项目]** “十一五”国家科技支撑计划(2008BAI51B03);中央高校科研专项基金(JKY2009006)

**[第一作者]** 王文萍,硕士研究生,主要从事中药复方作用机制研究

**[通讯作者]** \*余伯阳,教授,博士生导师,主要从事中西医结合药理学研究,Tel:025-83271321,E-mail:boyangyu59@163.com

- [15] Alvarez S, Zaobornyj T, Actis-Goretta L, et al. Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 957:271.
- [16] Balabhadrapathruni S, Thomas T J, Yurkow E J, et al. Effects of genistein and structurally related phytoestrogens on cell cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 human breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2000, 7(1):3.
- [17] Ho K P, Li L, Zhao L, et al. Genistein protects primary cortical neurons from iron-induced lipid peroxidation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 247(1/2):219.
- [18] Haenen G R, Paquay J B, Korthouwer R E, et al. Peroxynitrite scavenging by flavonoids [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236(3):591.
- [19] Wang N, Li D, Lu N H, et al. Peroxynitrite and hemoglobin-mediated nitrative/oxidative modification of human plasma protein: effects of some flavonoids [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(4):257.

[责任编辑 聂淑琴]

oxygen controller) by comparison the whole behavior in mice. **Method:** The two modes of oxygen scarcity, including oxygen pressure declining continuously from 21% to 7% -8% with the average speed of 0.5%/min-1% per minute in airtight wide-mouthed bottle and oxygen pressure falling abruptly within short period and then keeping in the level of 7% -8%, were adopted respectively to observe the time-course changes in body weight, food intake, locomotive activity and electrocardiogram respectively. The experiments were designed for mimicing clinical features of DQYS. **Result:** The mice exposed to two different modes of chronic intermittent hypoxia for certain duration showed body weight loss, food intake decline, locomotive activity change of ambulation decrease and rearing increase, heart rate increase and T wave elevation. There was significant correlation between the results of the two groups. **Conclusion:** Both types of chronic intermittent hypoxia can simulate the major clinical features of DQYS mainly characterized by tiredness, emaciation, anorexia, fidget, palpitation and rapid pulse, etc.

[**Key words**] chronic intermittent hypoxia; deficiency of both Qi and Yin syndrome; animal model; low-pressure oxygen controller; soda lime

气阴两虚证是临床常见证型,可见于多种急性热病后期与各种慢性内伤杂病之中<sup>[1]</sup>,以形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等表现为主要临床特征<sup>[2]</sup>。到目前为止,尚缺乏成熟的可供临床及药理学研究的理想的气阴两虚证动物模型<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现,钠石灰缺氧法诱导慢性间歇性缺氧小鼠表现为:体重下降,摄食量减少,自发活动改变,心率加快、T波持续性升高等心电图异常改变以及断尾出血时间缩短,不仅成功模拟了形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等气阴两虚证的主要临床表现,而且体现了气阴两虚证由虚到瘀的病机演变规律<sup>[4]</sup>。本研究在此基础上,进一步改进缺氧条件,采用氧分压可控的低压氧仪,比较两种不同缺氧方式对小鼠体重,摄食量,自发活动,心率、T波等指标的影响,通过考察各项指标随时间变化的趋势,进一步验证采用慢性间歇性缺氧手段构建气阴两虚证动物模型的可行性。

## 1 材料

**1.1 试剂** 钠石灰(上海陆都化学试剂厂,批号20090120)。

**1.2 动物** ICR小鼠,雄性,体重18~22g,SPF级,由扬州大学比较医学动物中心提供,动物合格证号SCXK(苏)2007-0001。

**1.3 仪器** XF-YC06型低压氧舱全自动控制仪(简称低压氧仪,南京新飞分析仪器制造有限公司);EGG-6511型心电图机(日本光电工业株式会社)。

## 2 方法

**2.1 氧分压检测** 利用XF-668型测氧仪测量钠石

灰瓶中氧分压在20min内的变化情况,根据低压氧仪的氧分压显示器记录低压氧仓中氧分压的变化情况。

**2.2 造模方法** 30只雄性ICR小鼠随机分为空白对照组(空白组)、钠石灰组(模型组-1)和低压氧仪组(模型组-2)。每组10只饲养于同一笼内,每笼小鼠每天给定量食物100g,自由饮水。空白组每天正常喂养,早晨灌服生理盐水 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ;钠石灰组和低压氧仪组每晚9点开始禁食,次晨8点分别放入200mL密闭广口瓶中(每瓶预先加入钠石灰15g)和低压氧仪缺氧箱中(氧分压调至7%~8%),持续缺氧20min;每天1次,连续42d。

### 2.3 观测指标

**2.3.1 体重** 分别于实验第1,7,14,21,28,35,42天早晨9时供给食物前,分别称体重并作记录;计算空白对照组与2种缺氧条件下各时间点体重曲线下的面积。

**2.3.2 进食量** 分别于实验第1,7,14,21,28,35,42天晚间9时禁食前称剩余食物量并作记录;计算空白对照组与2种缺氧条件下各时间点摄食量曲线下的面积。

**2.3.3 自发活动** 分别于实验第1,7,14,21,28,35,42日上午10时,采用开场实验箱考察各组的自发活动<sup>[5]</sup>。①运动力,即行走格数:观察2min内小鼠四肢所爬过的格子数;②直立次数:观察2min内后肢站立,前肢离地1cm以上的次数。开场实验箱为直径30cm圆形场地,高20cm。由2个同心圆分为外侧、中间及中心区域,试验在暗室、安静的环境中进行;计算空白对照组与2种缺氧条件下各时间

点行走格数与直立次数曲线下的面积。

**2.3.4 心电图** 分别于实验第1,7,14,21,28,35,42天上午10时,用4%水合氯醛 $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\text{ ip}$ 麻醉后30 min测心电图,记录心率及T波变化;计算空白对照组与2种缺氧条件下各时间点心率与T波曲线下的面积。

**2.3.5 各观测指标曲线下面积的计算**<sup>[6]</sup> 采用梯形法计算曲线下面积。

**2.4 统计分析** 实验结果均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计采用方差分析及t检验。以 $P<0.05$ 为统计显著性水平。两种不同缺氧方式结果的相关性采用SPSS 11.5软件 Bivariate 两变量相关性分析。

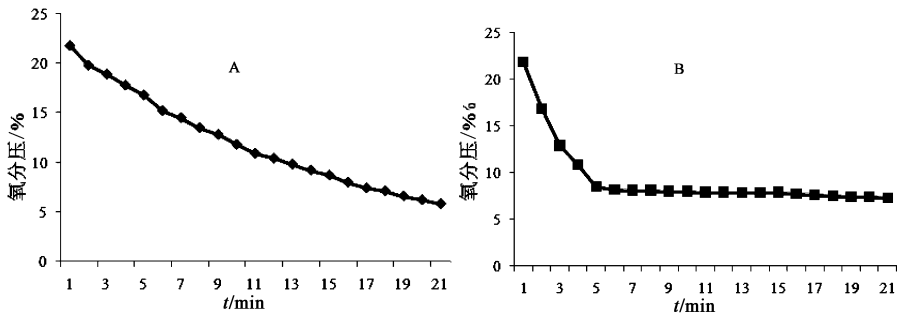
### 3 结果

**3.1 2种缺氧条件下氧分压变化** 利用测氧仪,每分钟测量1次钠石灰瓶中的氧分压,共21次。如图1所示,钠石灰瓶中的氧分压随缺氧时间的延长呈

逐渐下降趋势;低压氧仪缺氧箱中氧分压在5 min内由21%骤降至8%,并一直维持在7%~8%之间。

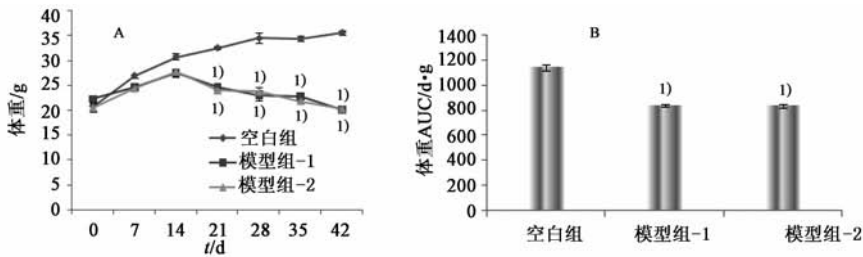
**3.2 各组间体重比较** 如图2A显示,空白对照组体重呈逐渐增长趋势,钠石灰组和低压氧仪组的体重在前14 d增长缓慢,从第3周开始呈逐渐下降趋势,与空白对照组比较,具有非常显著性差异( $P<0.01$ );二者体重变化总趋势基本一致,曲线下面积均明显低于空白对照组,组间无显著差异(图2B)。

**3.3 各组间摄食量比较** 空白对照组摄食量在前两周呈下降趋势,从第3周开始呈逐渐增加趋势,与体重增长趋势保持一致。钠石灰组和低压氧仪组的摄食量一直呈下降趋势,从第3周开始,与空白对照组比较有显著性差异( $P<0.01$ )。二者摄食量变化总趋势保持一致,曲线下面积均明显低于空白对照组,组间无显著差异(图3)。



A. 钠石灰瓶; B. 低压氧仪

图1 2种缺氧条件下氧分压变化

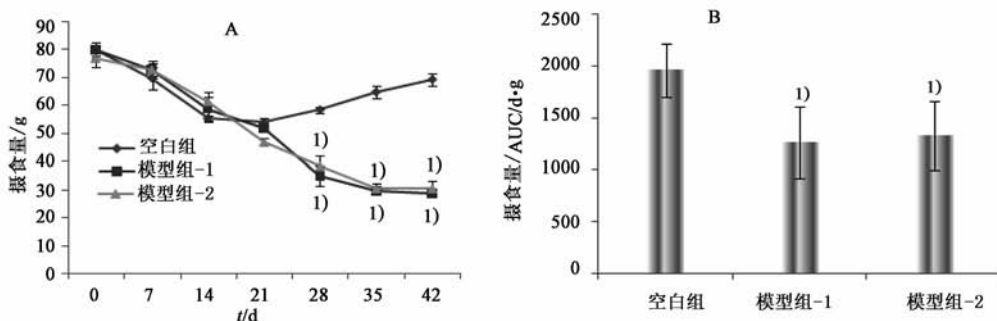


A. 小鼠体重的经时变化; B. 小鼠体重的总时程变化;与空白对照组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ (图3~5同)

图2 2种缺氧条件对小鼠体重的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

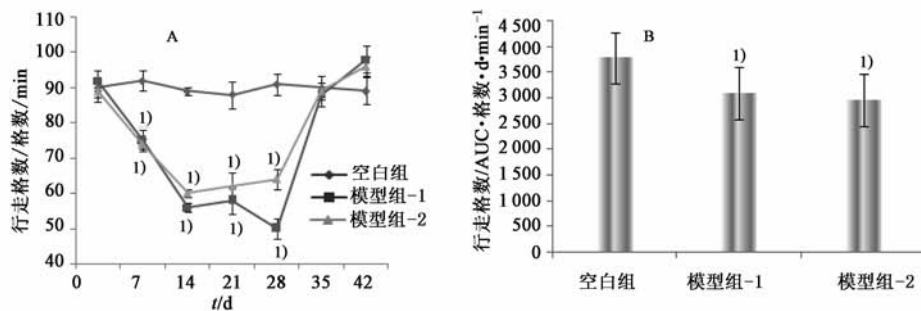
**3.4 各组间自发活动比较** 空白对照组一直保持在相对平稳的水平。钠石灰组和低压氧仪组的行走格数在第14~35天明显减少,与空白对照组相比较,具有非常显著性差异( $P<0.01$ )。二者行走格数变化总趋势保持一致,曲线下面积均明显低于空白对照组,组间无显著差异(图4B)。

各组在不同时间的直立次数。数据显示,空白对照组的直立次数一直保持在相对平稳的水平。钠石灰组和低压氧仪组的直立次数一直呈上升趋势,与空白对照组比较,具有非常显著性差异( $P<0.01$ )。二者直立格数变化总趋势保持一致,曲线下面积均明显高于空白对照组,组间无显著差异(图5B)。



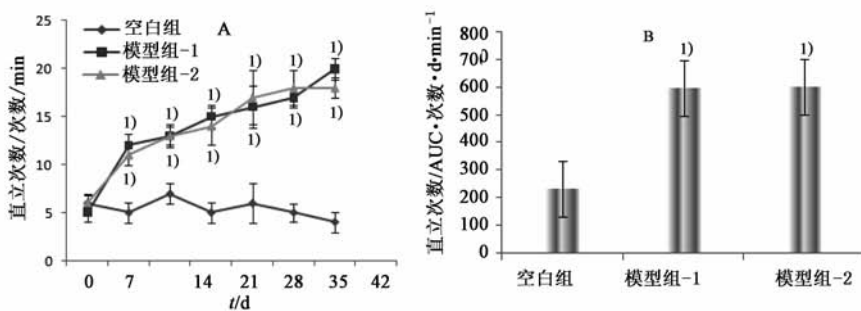
A. 2 种缺氧条件小鼠摄食量的经时变化; B. 2 种缺氧条件小鼠摄食量的总时程变化

图 3 2 种缺氧条件对小鼠摄食量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



A. 2 种缺氧条件小鼠行走格数的经时变化; B. 2 种缺氧条件小鼠行走格数的总时程变化

图 4 2 种缺氧条件对小鼠行走格数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )



A. 直立次数的经时变化; B. 直立次数的总时程变化

图 5 2 种缺氧条件对小鼠直立次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**3.5 心电图变化** 空白对照组的心率一直保持在平稳的水平。随着缺氧时间的延长,钠石灰组和低压氧仪组的心率在前 4 周均逐渐加快,从第 28 天开始又逐渐减慢,到第 6 w 时与空白对照组处于相同水平。二者心率的变化趋势一致,曲线下面积均明显高于空白对照组,组间无显著差异(图 6)。

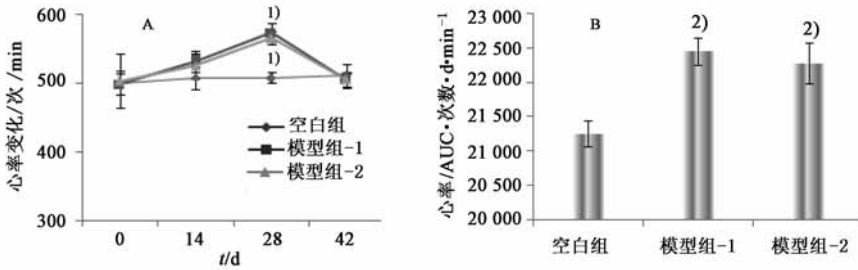
空白对照组的 T 波无明显变化,一直保持在平稳水平;与空白对照组比较,钠石灰组和低压氧仪组的 T 波呈逐渐抬高趋势,提示随着缺氧时间的延长,模型组小鼠逐渐呈现心肌缺血的表现<sup>[7]</sup>。二者 T 波变化

趋势一致,曲线下面积均明显高于空白对照组,组间无显著差异(图 7)。

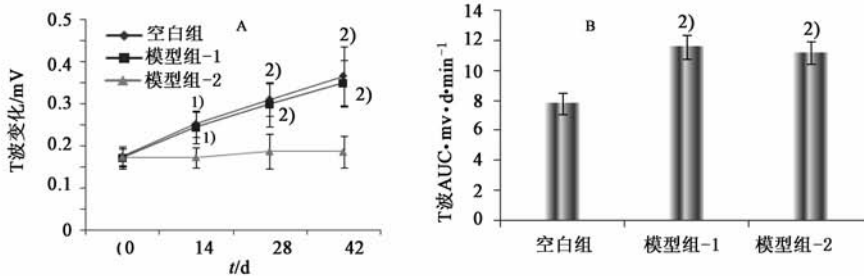
**3.6 两种缺氧方式的相关性分析** 如表 1 所示,两种缺氧方式的各实验结果间相关系数大部分达到 0.9 以上,呈显著相关性。

#### 4 讨论

证候是机体在疾病发展过程中的某一阶段的病理概括,辨证论治是中医认识疾病和治疗疾病的基本原则。中医学独特的理论体系决定了证候模型并不等同于西医的病理模型,除了内在的病理变化指



A. 2种缺氧条件小鼠心率的经时变化; B. 2种缺氧条件小鼠心率的总时程变化;与空白对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$  (图7同)  
图6 2种缺氧条件对心率的影响



A. 2种缺氧条件小鼠T波的经时变化; B. 2种缺氧条件小鼠T波的总时程变化  
图7 2种缺氧条件对小鼠心电图T波的影响

表1 2种缺氧方式的相关性分析

类别	Sig 值	Pearson 相关系数
体重	0.000	0.925 <sup>1)</sup>
摄食量	0.000	0.952 <sup>1)</sup>
心率	0.000	0.822 <sup>1)</sup>
T波	0.000	0.661 <sup>1)</sup>
自发活动行走格数	0.000	0.968 <sup>1)</sup>
自发活动直立次数	0.000	0.976 <sup>1)</sup>

注: Sig 值  $< 0.01$  相关性高度显著; <sup>1)</sup> $P < 0.01$  表示相关性非常显著。

标外,要尽可能体现“有诸内,必形诸外”这种司外揣内的中医思维模式。因此,生物体的表观特征能否反映不同的证候属性显得尤为重要,模型要尽可能反映中医诊疗特点,使动物的整体表现能够模拟患者的主要临床特征<sup>[8]</sup>。

本课题组提出“采用与证候密切相关现代医学疾病的关键病理环节选择造模手段”的建模假说<sup>[9]</sup>,并发现钠石灰缺氧致慢性间歇性缺氧模型小鼠的整体表现类似于气阴两虚证的主要临床指征<sup>[4]</sup>。钠石灰缺氧法属于低张性缺氧,又称乏氧性缺氧<sup>[10]</sup>,通过在密闭广口瓶中加入钠石灰,通过中和呼出的二氧化碳防止酸中毒造成缺氧条件,其氧分

压从21%逐渐降至6%,平均下降速度为0.5%/min~1%/min;为更好地控制缺氧条件和模拟缺氧类疾病的临床发病特点,加快实验进度,我们拟改用低压氧仪,通过调节缺氧箱中氮气的流量,使氧分压在短时间内由21%骤降至8%,并一直维持在7%~8%。本文比较观察了上述2种间歇性缺氧模型小鼠体重,摄食量,自发活动以及心电图等与气阴两虚证相关的临床指征变化。结果显示,各项指标在不同时程的变化趋势基本一致,均表现为体重在前14d增长缓慢,从第3周开始呈逐渐下降趋势;进食量一直呈下降趋势;行走格数在第14~35天明显减少,而直立次数则一直呈上升趋势,而且与空白对照组相比较,理毛、搔抓,大、小便次数也明显增多;心电图则表现为心率加快,T波呈逐渐抬高趋势。曲线下面积(AUC)也显示,2种不同缺氧方式对各项指标随时间变化趋势的影响基本一致,与空白对照组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ )。证实钠石灰缺氧法与低压氧仪缺氧法两种不同的缺氧条件,二者诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型均能模拟形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等气阴两虚证的主要临床特征<sup>[2]</sup>。除此之外,2种不同缺氧方式的相关性分析结果也显示,二者具有非常显著的相关性。

本研究结果还显示,在慢性间歇性缺氧的过程中,小鼠在前 4 周心率逐渐加快,到第 6 周时基本恢复到缺氧前状态,而心电图 T 波呈持续增高的趋势。较好地模拟了“机体在缺氧条件下容易出现心悸等不适感觉,在一段缺氧适应期之后通常能够逐渐耐受,但是心肌缺血的状态仍然持续存在,后期会出现心绞痛等心血管事件的发生”这一临床常见现象<sup>[11]</sup>,也从动物模型与临床发病特点的相似性进一步揭示了该模型模拟气阴两虚证临床指征的可靠性。

综上所述,钠石灰法和低压氧仪 2 种缺氧方式诱导的慢性间歇性缺氧小鼠模型均能模拟形体消瘦,食欲不振,体倦乏力,烦躁,心悸,脉细数等气阴两虚证的主要临床特征,进一步证实了采用慢性间歇性缺氧为手段构建气阴两虚证动物模型的可行性,也为进一步阐释气阴两虚证表现特征的内在病机变化及代表方剂的作用机制奠定了良好的基础。

#### [参考文献]

[1] 赵琼,严石林,陈为,等.论气阴两虚证发展源流[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(10):853,860.  
[2] 邓铁涛.中医证候诊断标准[M].广州:广东科学技术出版社,1990:12.  
[3] 章忱,盛学仕,吕嵘,等.动物心肌缺血中医证型规范化标准化研究(二)[J].上海中医药杂志,2003,37(3):42.

[4] Chai C Z, Kou J P, Zhu D N, et al. Mice exposed to chronic intermittent hypoxia simulate clinical features of deficiency of both Qi and Yin syndrome in traditional Chinese medicine[J]. eCAM, 2011 doi:10.1093/ecam/nep226.  
[5] Huang F, Xiong Y T, Xu L H, et al. Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from Fructus Schisandrae in mice and rats[J]. J Ethnopharmacol, 2007,110(3):471.  
[6] 陈世伟,张杰,刘翠娥,等.消渴胶囊对高血糖模型小鼠的降糖作用[J].现代预防医学,2006,33(2):143.  
[7] 关颖,李菁,朱伟杰,等.丝瓜络对小鼠心肌缺血性损伤的预防效应[J].中国病理生理杂志,2006,22(1):68.  
[8] 崔轶凡,王庆国.证候动物模型对中医药研究的意义及方法学探讨[J].中华中医药学刊,2009,27(12):2525.  
[9] 柴程芝,寇俊萍,朱丹妮,等.关于病证结合动物模型研究现状的思考[J].中国中药杂志,2009,34(20):2673.  
[10] 金惠铭.病理生理学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2000:79.  
[11] Zubieta-Castillo G, Zubieta-Calleja G R, Zubieta-Calleja L. 试论高原地区正常及患病个体的慢性缺氧[J].青海医学院学报,2005,26(1):27.

[责任编辑 聂淑琴]

## 欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究成果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,304 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发售,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com。