

4 组造模复合因素致肺阳虚小鼠模型的比较研究

吕圭源¹, 陈素红^{2*}, 温慧萍², 刘建明¹, 苏洁¹, 胡慧明², 姜水莲²

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 温州医学院, 浙江 温州 325035)

[摘要] **目的:**根据“形寒饮冷则伤肺”“劳倦内伤而耗阳气”,对烟熏、冰水游泳、服用冰水、服用冰他巴唑溶液等造模因素进行组合,比较 4 组造模复合因素对肺阳虚证小鼠模型的影响。**方法:**ICR 小鼠,随机分为 4 个造模组,造模 10 d。观测小鼠一般体征、抓力、自主活动,测定肺组织和血清丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD),计算心、肝、脾、肺、肾等脏器指数。**结果:**4 个模型组小鼠均出现体重增长缓慢,自主活动减少,抓力降低,心、肺指数增加。其中 3 因素组合对体征以及肺组织和血清 MDA, SOD 的影响,优于 2 因素组合;复合造模因素中,增加冰泳(烟熏 + 冰泳、烟熏 + 冰泳 + 服用冰水、烟熏 + 冰泳 + 服用冰他巴唑)优于服用冰水(烟熏 + 服用冰水),抓力下降、心肺指数升高更明显;烟熏 + 冰泳 + 服用冰水可能是最佳造模复合因素。**结论:**采用烟熏、冰水游泳、服用冰水、服用冰他巴唑等 2 因素或 3 因素组合造模,小鼠均表现出不同程度的肺阳虚症状。其中 3 因素(烟熏 + 冰泳 + 服用冰水)造模更接近中医临床,这可能是形寒、劳倦与饮冷共同使然。

[关键词] 肺阳虚; 模型; 复合因素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0173-04

Research on Mice Lung-Yang Deficiency Models Induced by Four Different Multi-factors

LV Gui-yuan¹, CHEN Su-hong^{2*}, WEN Hui-ping², LIU Jian-ming¹, SU Jie¹, HU Hui-ming², JIANG Shui-lian²

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Wenzhou Medical College, Wenzhou 320535, China)

[Abstract] **Objective:** According to the traditional Chinese medicine (TCM) theory that lung injury was resulted from chilled body shape and cold drink and “Yang “Deficiency was caused by over-strain and internal injury”, we combined two or three of four Lung-Yang Deficiency factors to compare the effects of these different combinations in mice Lung-Yang Deficiency models. The four factors were termed as smoking in the special box, swimming in ice water, drinking ice water, and taking the methimazole ice solution. **Method:** Seventy ICR mice were randomly divided into four model groups and normal group. Each group with 14 animals was treated for 10 days. We observed the general physical signs (grip strength and self-activity), measured MDA and SOD activity of lung tissue and serum, and calculated the organ indexes. **Result:** The body weight growth decreased, the self-activity and grip strength reduction, and the heart and lung indexes increase were observed in all model groups. In addition, the effects of three-factor combination groups on physical signs as well as MDA and SOD of lung tissue and serum were better than which of the two-factor combination groups, resulting in that swimming in ice water was more effective than drinking ice water. These results showed that the combination of smoking, swimming in ice water, and drinking ice water was the best method to induce Lung-Yang Deficiency. **Conclusion:** Different combinations of four Lung-Yang Deficiency factors indicated different effects. Among these combinations, the

[收稿日期] 20110402(011)

[基金项目] 国家重点基础研究发展项目(973 计划), (2007CB512603)

[第一作者] 吕圭源, 教授、博士生导师, 研究方向为中药药理与新产品开发

[通讯作者] * 陈素红, 研究员、博士, Tel:0571-86613601, E-mail:chensuhong06@yahoo.com.cn

three-factor combination (smoking + swimming in ice water + drinking ice water) was consistent with TCM theory about Lung-Yang Deficiency, which may be induced by several factors such as chilled body shape, cold drinks and over-strain.

[Key words] Lung-Yang Deficiency; model; multi-factors

肺阳虚又称肺气虚冷,是由于肺阳不足,阴寒内生,肺失宣降,津液凝聚不布所致。其成因主要是外邪侵袭或饮食生冷,损伤肺阳,阳虚寒盛所致;此外,劳倦内伤,久病体衰亦可导致本病。在前期肺阳虚大鼠模型建立的基础上^[1],根据“形寒饮冷则伤肺”、“劳倦内伤而耗阳气”的中医理论,本实验尽可能模拟其临床病因病机,采用烟熏(伤肺)、冰泳(形寒、劳倦)、服用冰水(饮冷)等造模因素,进行 2 因素或 3 因素组合,比较这 4 组造模复合因素对肺阳虚证模型小鼠相关指标的影响,为建立合适的肺阳虚动物模型提供参考。

1 材料

1.1 药物 甲巯咪唑薄膜衣片(他巴唑),批号 5728801,购自浙江省中医院,配制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,冷藏;雄狮过滤嘴香烟(焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg),浙江中烟工业有限责任公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20090709)、考马斯亮蓝试剂盒(批号 20090707),南京建成生物工程研究所。

1.2 动物 ICR 小鼠 70 只,雌雄各半,25~30 g,浙江省实验动物中心,合格证号 SCXK(浙)2008-0033。

1.3 仪器 自制烟熏箱($0.6 \text{ m} \times 0.8 \text{ m} \times 1.0 \text{ m}$);LP123 电子天平,常熟市衡器厂;YLS-1A 多功能小鼠自主活动记录仪,山东省医学科学院设备供应维修站;YLS-13A 大小鼠抓力测定仪,山东省医学科学院设备供应维修站;IMS-40 全自动雪花制冰机,郑州南北仪器设备有限公司;Power wave 304 酶标仪,美国 Bio-Tek;Lxj-IIB 低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器厂制造;XHF-D 高速分散器(内切式匀浆机),宁波东芝生物科技股份有限公司。

2 方法

2.1 动物分组与造模 ICR 小鼠 70 只,随机分为 5 组:正常对照组(G1)和 4 个造模组。2 因素组合:烟熏+冰泳组(G2)、烟熏+服用冰水组(G3);3 因素组合:烟熏+冰泳+服用冰水组(G4)、烟熏+冰泳+服冰他巴唑组(G5),每组 14 只,连续造模

10 d,设立正常对照组(G1)。G2,G3,G4,G5 各模型组同时置自制烟熏箱内烟熏,香烟 20 支,时间 $20 \text{ min} \cdot \text{d}^{-1}$;之后,将 G2,G4,G5 置冰水中游泳时间为 2~3 min/d;G3,G4 分别自由饮用冰水,G5 饮用冰他巴唑溶液($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。以上处理,每日 1 次,连续 10 d。

2.2 指标检测 每日定时称量体重、进食量、饮水量,并观察其一般体征是否有肺阳虚症状(如咳声低弱、皮毛潮湿、乏力少动等)。测定以下指标:①于造模第 1 天与第 7 天测抓力:每次测 2 次,取平均值。②于造模第 3 天与第 8 天测自主活动:记录实验动物在 10 min 内活动次数。③于第 11 天,小鼠禁食 12 h,眼眶取血,离心取血清,测定血清 MDA,SOD。处死,取心、肝、脾、肺、肾,称重,计算脏器系数;取肺组织,测其 MDA,SOD。

2.3 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Excel 2003 版的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对体征的影响 4 个模型组小鼠出现不同程度的体征变化,如毛凌乱、皮潮湿、精神萎靡、蜷缩抱团、咳声低弱、乏力少动等,与肺阳虚之中医临床证候相吻合。与 2 因素组合比较,3 因素组合(烟熏+冰泳+服用冰水组、烟熏+冰泳+服冰他巴唑组)后期出现低怯的喘鸣声、呼吸急促、蜷缩抱团的症状较为明显。

3.2 对体重的影响 表 1 显示:前 4 d 各组间体重未见明显差异;造模第 5 日,与正常对照组相比,各复合因素造模组的小鼠体重增长明显缓慢($P < 0.05$ 或 0.01),后期体重差异益加明显。

3.3 对抓力的影响 表 2 显示:造模第 1 日,与 G1 比较,4 个模型组的小鼠抓力无明显差异,说明分组均匀。造模第 7 日,与 G1 比较,4 个模型组的小鼠抓力均有明显下降($P < 0.01$);与 G3 比较,G2,G4,G5 组的小鼠抓力有一定下降趋势。

3.4 对自主活动的影响 表 3 显示:与 G1 比较,造模第 8 日,4 个模型组的小鼠自主活动次数均有明显减少($P < 0.01$)。

表 1 4 种造模复合因素对肺阳虚小鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	体重/g										
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d
G1	29.0 ± 1.6	29.5 ± 1.8	29.5 ± 1.9	30.0 ± 2.2	30.6 ± 2.0	31.2 ± 2.1	31.7 ± 2.1	31.7 ± 2.7	31.6 ± 2.4	32.2 ± 2.9	32.4 ± 3.1
G2	28.0 ± 2.1	28.5 ± 2.1	28.4 ± 2.2	28.4 ± 2.1 ¹⁾	29.0 ± 2.4 ¹⁾	29.6 ± 2.2 ¹⁾	29.6 ± 1.9 ¹⁾	29.2 ± 2.3 ²⁾	28.5 ± 2.6 ²⁾	29.4 ± 2.6 ²⁾	29.6 ± 2.6 ¹⁾
G3	28.6 ± 1.7	28.5 ± 1.6	28.6 ± 1.6	28.9 ± 1.7	29.3 ± 1.9	29.5 ± 1.9 ¹⁾	29.9 ± 1.7 ¹⁾	29.8 ± 1.8 ¹⁾	29.4 ± 2.1 ¹⁾	29.9 ± 2.3 ¹⁾	30.0 ± 2.3 ¹⁾
G4	28.7 ± 2.0	28.8 ± 2.0	28.7 ± 2.1	29.0 ± 2.1	29.3 ± 2.3	29.6 ± 2.2 ¹⁾	29.9 ± 2.3 ¹⁾	29.7 ± 2.0 ¹⁾	29.2 ± 2.0 ²⁾	29.7 ± 2.1 ²⁾	29.4 ± 2.2 ³⁾
G5	28.6 ± 1.8	29.0 ± 1.8	28.9 ± 1.8	28.6 ± 2.1	28.9 ± 2.2 ¹⁾	29.2 ± 2.3 ¹⁾	29.5 ± 2.7 ¹⁾	29.2 ± 2.1 ²⁾	29.0 ± 2.2 ²⁾	29.9 ± 2.3 ¹⁾	29.6 ± 2.5 ²⁾

注:与正常对照组 G1 比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。各组的处理条件:烟熏 + 冰泳组(G2)、烟熏 + 服用冰水组(G3)、烟熏 + 冰泳 + 服用冰水组(G4)、烟熏 + 冰泳 + 服冰他巴唑组(G5)(表 2 ~ 5 同)。

表 2 4 种造模复合因素对肺阳虚小鼠抓力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	抓力/g	
	第 1 天(造模前)	第 7 天(造模后)
G1	250.31 ± 55.21	340.53 ± 72.92
G2	275.19 ± 61.92	242.88 ± 53.18 ²⁾
G3	222.50 ± 55.82	263.30 ± 54.76 ²⁾
G4	282.54 ± 58.49	249.50 ± 54.23 ²⁾
G5	243.53 ± 72.09	231.98 ± 69.41 ²⁾

表 3 4 种造模复合因素对肺阳虚小鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	自主活动/次	
	第 3 天	第 8 天
G1	183.4 ± 25.4	209.1 ± 27.0
G2	174.5 ± 21.8	167.4 ± 26.1 ²⁾
G3	179.6 ± 24.9	179.0 ± 27.4 ²⁾
G4	193.6 ± 34.0	163.1 ± 28.8 ²⁾
G5	198.4 ± 35.5	162.7 ± 35.5 ²⁾

表 4 4 种造模复合因素对肺阳虚小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	心指数/%	肝指数/%	脾指数/%	肺指数/%	肾指数/%
G1	0.431 ± 0.045	4.735 ± 0.462	0.355 ± 0.117	0.543 ± 0.091	1.366 ± 0.213
G2	0.472 ± 0.039 ¹⁾	4.964 ± 0.637	0.344 ± 0.089	0.651 ± 0.095 ²⁾	1.327 ± 0.135
G3	0.452 ± 0.061	4.909 ± 0.387	0.367 ± 0.061	0.611 ± 0.071 ¹⁾	1.359 ± 0.180
G4	0.481 ± 0.053 ²⁾	4.733 ± 0.495	0.367 ± 0.072	0.663 ± 0.073 ^{2,3)}	1.408 ± 0.265
G5	0.479 ± 0.051 ²⁾	4.963 ± 0.312	0.362 ± 0.085	0.700 ± 0.069 ^{2,4)}	1.482 ± 0.206

注:与 G3 比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.6 对肺组织和血清 MDA, SOD 的影响 表 5 显示:与 G1 组比较, G2 组的小鼠肺组织、血清 SOD 降低 ($P < 0.05$); G3 组仅肺组织 MDA 升高 ($P < 0.05$); G4, G5 组肺组织和血清 MDA 均升高, 且血清 SOD 降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。

4 讨论

肺阳虚为寒邪犯肺, 久则伤及肺阳所致。本实

说明烟熏、冰泳、服用冰水等造模因素, 不管是 2 因素或 3 因素组合, 均引起少气乏力, 结合结果 **3.1**(皮毛潮湿, 蜷缩抱团, 咳声低弱)、**3.2**(体重减少)、**3.3**(抓力下降), 与中医之“肺脏虚寒, 肢体沉重, 神疲乏力, 少气懒言”等肺阳虚证候相接近。与 G3 组比较, G2, G4, G5 组的小鼠自主活动有一定下降趋势。说明复合造模因素中增加冰泳(烟熏 + 冰泳、烟熏 + 冰泳 + 服用冰水、烟熏 + 冰泳 + 服冰他巴唑)优于服用冰水(烟熏 + 服用冰水), 冰泳是造模复合因素中的重要因素之一。

3.5 对脏器指数的影响 表 4 显示:与 G1 组比较, G2, G4, G5 组的心、肺指数均明显升高 ($P < 0.05 \sim 0.01$), G3 组仅肺指数升高 ($P < 0.05$); 对肝、肾、脾指数影响不大; 与 G3 组比较, G4 组的心、肺指数升高更明显 ($P < 0.05$), G5 组的肺指数升高更明显 ($P < 0.01$)。

验以中医的病因病机为依据, 采用不同造模因素组合, 以期筛选肺阳虚证的最佳造模复合因素。根据“外邪犯肺, 劳倦内伤”设立了烟熏 + 冰泳组; “外邪犯肺, 内饮生冷”设立了烟熏 + 服用冰水组; “外邪犯肺, 劳倦内伤, 内饮生冷”设立了烟熏 + 服用冰水 + 冰泳组, 并设立了中西医结合因素造模组(烟熏 + 冰泳 + 服冰他巴唑组)。观察指标尽可能选择接近肺

表 5 4 种造模复合因素对肺阳虚小鼠 MDA 及 SOD 的影响

组别	肺组织		血清	
	MDA/nmol·mg	SOD/U·mg	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/U·mL ⁻¹
G1	23.35 ± 10.36	181.70 ± 71.76	9.42 ± 2.06	79.71 ± 21.59
G2	27.88 ± 11.04	133.49 ± 39.58 ¹⁾	11.36 ± 3.52	59.46 ± 16.42 ¹⁾
G3	33.21 ± 13.04 ¹⁾	163.33 ± 38.54	12.49 ± 5.92	71.39 ± 12.84
G4	33.17 ± 13.68 ¹⁾	173.11 ± 41.25	12.80 ± 5.26 ¹⁾	69.13 ± 11.58 ¹⁾
G5	31.69 ± 9.73 ¹⁾	174.62 ± 45.92	13.10 ± 4.24 ²⁾	65.04 ± 11.85 ¹⁾

阳虚之中医临床特征：①体征、体重：皮毛凌乱、潮湿，精神萎靡，蜷缩抱团，咳声低弱；肺阳耗损，肺气虚弱，宣降无力，宗气不能输布，机体失养，日久可累及脾土，导致脾失健运，机体失养，全身消瘦，故考察小鼠体重。②肺阳虚弱，肺气亏虚，四肢百骸失其濡养，症见稍劳尤甚、体倦乏力、倦怠少动，故考察小鼠抓力、自主活动。③肺为娇脏，寒湿侵袭，必先伤肺。寒湿伤阳耗气，则致肺阳虚证，日久不愈，累及五脏。肺为主气之脏，心为主血之脏，气血互用。久病肺阳受损，不能助心行血，则心用不及，故考察了心、肺等指数。④肺的功能虚衰或失养，导致机体气血津液的失养而加速衰老，故测定肺组织和血清 SOD,MDA。

结果发现 4 个模型组小鼠均出现毛凌乱、皮潮湿，精神萎靡，蜷缩抱团，咳声低弱、乏力少动等，体重增长缓慢，抓力降低，自主活动减少，心、肺指数增加，肺组织和血清 SOD,MDA 呈不同程度的改变。究其原因可能是①烟熏 + 冰冰组与“外邪袭肺，耗伤太过”相关。②烟熏 + 服冰水组与“寒饮犯肺，寒伤脾胃，肺感于寒”相关。③烟熏 + 冰冰 + 服用冰水组与“外邪袭肺，体弱劳倦，寒束肌表，阴寒内生”相关。④烟熏 + 冰冰 + 服冰他巴唑组与“外邪袭肺，劳伤肺气，中焦虚寒致脾气虚损，脾虚而致肺气不足”相关。各模型的影响因素的主次较难辨别，但其中 3 因素组合对体征(咳声低弱、皮毛潮湿、乏力少动)以及肺组织和血清 MDA,SOD 的影响优于 2 因素组

合；复合造模因素中，增加冰冰(烟熏 + 冰冰、烟熏 + 冰冰 + 服用冰水、烟熏 + 冰冰 + 服冰他巴唑)优于服用冰水(烟熏 + 服用冰水)，其抓力下降、心肺指数升高更明显；烟熏 + 冰冰 + 服用冰水可能是最佳造模复合因素。该复合因素制备的肺阳虚动物模型表现出形体消瘦、体倦乏力、倦怠少动、心肺病变等肺阳虚症状。

建立中医证候动物模型时，需根据中医发病规律优选纯化造模因素，并尽可能采用复合因素造模。目前肺虚动物模型的复制方法不多，病因主要为外邪侵袭、劳倦内伤、形寒饮冷等^[2-4]。外邪侵袭是制作肺阳虚的首选因素，同时结合多因素造模，如结合形寒饮冷或劳倦内伤等因素，则更能符合中医临床，突现中医特色。

[参考文献]

[1] 温慧萍,陈素红,吕圭源,等.多因素复合造模法致肺阳虚大鼠模型的研究[J].浙江中医药大学学报,2010,34(2):163,168.
[2] 文小敏,王鹏,刘青,等.“肺阳虚”动物模型的探索[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(4):45.
[3] 卢文丽,方肇群.阳虚动物的诊断指标与评析[J].上海中医药杂志,2005,39(4):42.
[4] 张新芳.肺阳虚证研究进展[J].安徽中医学院学报,2006,25(6):58.

[责任编辑 聂淑琴]