

小承气汤证兔动物模型的研制*

★ 陈颖¹ 张喜奎^{2**} (1. 福建农林大学医院 福州 350002; 2. 福建中医学院中医系 福州 350108)

摘要:目的:研制小承气汤证兔动物模型。方法:将60只日本大耳白兔随机分为正常对照组、病理模型组、模型治疗组和模型验证组。在次碳酸铋、禁水的基础上,用适当剂量的大肠杆菌内毒素攻毒,观察家兔的体温、腹围、呼吸、二便等一般状态、检测相关的实验室指标及重要脏器的病理形态学变化。结果:采用这种多因素联合造模方法,研制出家兔的病理模型,在症状、体征、实验室指标及病理改变上符合传统中医理论的小承气汤证。可以认为该造模方法是成功的。

关键词:小承气汤证;阳明腑实证;动物模型;病理形态

中图分类号:R-332 **文献标识码:**A

动物模型的复制是现代医学研究的基本方法。它对于探明疾病的病因、发病机制及药物的研究与开发均有重要的意义。因此建立各种中医病证动物模型,已成为实现中医客观化、规范化和科学化的主要环节^[1]。小承气汤首见于东汉张仲景的《伤寒论》,泻热通腑消痞,用于阳明腑实证的治疗。我们采用多因素联合造模的方法,初步研制了该证的动物模型,现将研制结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用健康日本大耳白兔60只,体重2.0~2.5 kg,雌雄兼用。由福建中医学院实验动

物中心代购。适应性饲养一周后进行实验。

1.2 实验药品 精制冻干大肠杆菌内毒素 E. coli O55:B5,美国 SIGMA 公司生产,批号:060915,上海西唐生物科技有限公司提供。实验前用生理盐水将内毒素配制成浓度为10 μg/ml 溶液,置于4℃冰箱内保存备用。次碳酸铋片,由河南天方药业股份有限公司生产,批号:060411650。实验前研成粉末,避光保存备用。小承气汤:大黄12 g、枳实9 g、厚朴6 g,由福建中医学院国医堂提供,剂量以上海科学技术出版社五版《方剂学》教材为依据,制成浓度为1 g生药/ml 的药液,置于4℃冰箱内保存备用。

4 讨论

本次实验采用超声波提取法处理样品只需1.5 h,比药典中方法^[3]省时,且操作简便。

实验结果显示柚皮苷含量变化,果中最高者为上天堂生产区毛橘红样品,最低为农中生产区样品;花中含量最高为天堂生产区毛橘红样品,最低的为大茶岭生产区样品。结果证实同一产地不同生产区毛橘红中柚皮苷含量有显著差异,提示生产区的小环境可显著影响毛橘红的质量;上天堂生产区毛橘红样品质量最优,提示应当对上天堂生产区的生态环境进行系统分析,找出适于培育优质毛橘红药材的影响因素。

另外,不同生产区对毛橘红果中柚皮苷含量影响较大,以上天堂采样品中最高,农中区采最低,花中柚皮苷含量不同生产区样品均较接近。但毛橘红果皮与花中柚皮苷含量总体差异不大,提示应考虑其花的开发利用。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 现代实用本草(中册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:103.
- [2] 黄兰珍, 梁照恒. 不同炮制方法对化橘红中柚皮苷含量的影响[J]. 中国新药与临床药理,2005,16(1):59-61.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2005年版一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:51.

(收稿日期:2009-03-04)

* 基金项目:福建省自然科学基金(2006J0111)

** 通讯作者:张喜奎(1963-),男,医学博士,教授。

1.3 实验分组 将 60 只日本大耳白兔随机分为正常对照组、病理模型组、模型治疗组和模型验证组, 每组 15 只, 雌雄兼用。实验前 24 h 称量体重, 并于早、中、晚各测一次肛温和腹围, 取平均值作为基础体温和基础腹围, 结果如表 1。

表 1 各组家兔基础体温、基础腹围的比较

组别	数量	基础体温/℃	基础腹围/cm
正常对照组	15	39.29 ± 0.20	33.33 ± 1.12
病理模型组	15	39.23 ± 0.18	33.08 ± 1.21
模型治疗组	15	39.25 ± 0.15	32.98 ± 1.20
模型验证组	15	39.26 ± 0.18	33.49 ± 1.36

经统计学处理(F 检验)后, 发现实验前各组动物的基础体温和基础腹围无显著差别, 即实验前各组动物条件齐同, 具有可比性。

1.4 造模方法 病理模型组、模型治疗组、模型验证组在实验前 48 h 给予次碳酸铋粉末 2.0 g/(kg·d) 分两次拌入饲料, 均连续喂养 2 d, 第 2 天禁水 24 h, 然后在自然状态下, 由耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素 2.0 μg/kg 一次。正常对照组正常进食饮水, 给予相应比例的生理盐水。

1.5 给药方法 模型治疗组于攻毒前 1 h 和攻毒后 2 h 灌胃以小承气汤 9 ml/(kg·次); 模型验证组则在造模的同时, 即给予次碳酸铋的同时分别给予小承气汤 9 ml/(kg·d), 直至实验结束; 正常对照组、病理模型组于攻毒前 1 h、攻毒后 2 h 按比例给予生理盐水。剂量均按成人临床每公斤体重常用量的 20 倍换算^[2]。

1.6 观察指标及方法 在整个实验过程中观测各组实验动物的神志、呼吸、饮食、二便、舌象、眼结膜和耳廓情况。在攻毒后 6 h 内每隔半小时测一次肛温。然后分别求出各组的发热高峰(ΔT)和 6 h 体温反应指数(TRI₆)^[3]。各组动物在攻毒后 6 h, 心脏采血。采血前测一次终末腹围, 求出其于基础腹围的差值。NO 浓度的测定采用硝酸还原酶法; WBC 计数测定采用显微镜计数法。采血后处死动物, 取肺、结肠等重要脏器组织, 常规制片, 光镜下观察。

所得数据均用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理, 结果均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 一般情况 正常对照组家兔反应敏捷, 神志、呼吸、饮食、二便正常, 舌象、眼结膜、耳血管等均未明显变化。病理模型组家兔在进食次碳酸铋饲料、禁水后出现躁动不安, 抓取时易尖叫, 纳差, 腹部胀满且硬, 大便量明显减少或不大便, 大便颗粒变小, 质硬, 压之难碎, 小便色黄。攻毒后, 家兔蜷缩,

懒动, 发抖, 反应迟钝, 呼吸, 心率加快, 腹部灼热胀满而硬, 眼结膜充血, 耳廓发红。模型治疗组和验证组家兔在攻毒后精神尚可, 体温略有升高, 腹部柔软不胀满, 大便正常或微软。

2.2 体温 各组家兔体温变化的比较见表 2。

表 2 各组家兔的 ΔT 和 TRI₆ 的比较

组别	数量	ΔT/℃	TRI ₆ /cm ²
正常对照组	15	0.16 ± 0.10	0.14 ± 0.37
病理模型组	15	1.38 ± 0.24**	4.80 ± 0.67**
模型治疗组	15	0.97 ± 0.25***▲	2.62 ± 1.25***▲
模型验证组	15	0.99 ± 0.19***▲	2.68 ± 1.04***▲

注: 各组与正常组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 与模型组比较, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01; 以下均同。

2.3 腹围 各组家兔腹围变化的比较见表 3。

表 3 各组家兔腹围的比较 cm

组别	数量	基础腹围	终末腹围	差值
正常对照组	15	33.33 ± 1.12	33.49 ± 1.01	0.19 ± 0.48
病理模型组	15	33.08 ± 1.21	35.25 ± 1.30 #	2.17 ± 0.22**
模型治疗组	15	32.98 ± 1.20	33.12 ± 1.27	0.14 ± 0.46▲
模型验证组	15	33.49 ± 1.36	33.61 ± 1.25	0.13 ± 0.33▲

注: 与基础腹围比较, # # P < 0.01;

2.4 实验室检测指标 各组家兔造模后血中 WBC 计数和 NO 含量的比较见表 4。

表 4 各组家兔血 WBC 计数和 NO 含量比较

组别	数量	WBC/×10 ⁹ ·L ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹
正常对照组	15	9.87 ± 1.03	108.97 ± 13.57
病理模型组	15	17.81 ± 3.22**	188.48 ± 25.35**
模型治疗组	15	12.52 ± 3.08***▲	125.34 ± 22.03***▲
模型验证组	15	13.59 ± 2.55***▲	119.83 ± 13.50***▲

2.5 病理结果

2.5.1 大体观察 各组家兔均未见皮下、肌肉有出血点。模型组部分家兔肺脏表面可见点状或片状出血点。大肠膨隆胀气, 肠管增粗, 内有颗粒状粪块。其余脏器未见明显病变。治疗组和验证组动物的肺部偶可见点状出血, 大肠内胀气不明显, 其余脏器未见明显病变。

2.5.2 镜下观察 (1) 肺脏: 正常对照组未见明显病理改变。模型组肺泡间隔扩张充血, 部分肺泡腔狭小, 肺泡壁及细支气管周围间质内炎细胞浸润, 及微小血栓形成。验证组和治疗组仅见部分肺泡间隔扩张充血及少量的炎细胞浸润。

(2) 结肠: 正常组仅见少量炎细胞浸润。模型组病变较重, 可见肠粘膜慢性炎症, 间质水肿, 毛细血管和小静脉瘀血, 伴糜烂。固有层内有大量炎细胞浸润。验证组和治疗组见肠粘膜慢性炎症, 轻度炎细胞浸润, 肠壁轻微水肿。

(3) 肝脏: 正常组未见明显病理改变。模型组见肝瘀血, 肝细胞浊肿, 血窦明显扩张。验证组和治疗组

疗组病变较轻,肝窦轻度充血,少量炎细胞浸润。

(4)肾脏:模型组可见肾间质轻度充血,肾实质无明显病理改变。正常组、治疗组和验证组肾间质、肾小球和肾小管等均无明显变化。

3 讨论

病邪深入阳明,化燥化热成实,与体内糟粕互结,阻于肠道,腑气不通,出现了痞、满、燥、实等证是阳明腑实证的病机。单纯的热邪亢盛或单纯的燥屎内结,都不能形成阳明腑实证。小承气汤证以津伤化燥、气机阻滞为重点,以腹大满不通、大便硬为主证,故药物剂量的控制是实验的关键所在,我们就此做了大量的研究。“土燥水竭证”^[4]动物模型的研制成功,及课题前期实验的顺利进行,为内毒素和次碳酸铋的使用剂量积累了丰富的经验。

3.1 造模动物的选择 实验动物的选择对造模的成功和模型研究成果的可靠程度有重要的影响。而实验动物的生物学特点是实验动物种属选择的重要依据。家兔的体温变化灵敏,发热比较稳定,测量体温容易,非常适合发热研究。且家兔的个体相对较大,实验中作静脉注射比较容易,因而取血、攻毒、给药较方便。适合于阳明腑实证动物造模的需要。

3.2 造模材料的选择 便秘模型的制作常见有限水法、药物法、自身粪便给药法等等,但一些造模因素对家兔不合适,如小鼠腹腔注射(或灌胃)其自身粪便混悬液的方法,复制出了小鼠实热性便秘模型^[5]。家兔本身具有食粪癖,此法不适用于家兔。次碳酸铋为收涩之品,能与肠粘膜表面的蛋白质形成沉淀,附着在肠粘膜上,减轻刺激,减少炎性渗出物,起收敛作用,服用较大剂量可致大便干燥。津亏不能滋润则大便干燥,水亏无以行舟则排便艰难。故限水是很强的实验性便秘因素,常用于制作便秘模型。因此,我们采用限水法加药物次碳酸铋法,使家兔大便干燥秘结,腑气不通,进而腹部膨胀而硬,形成燥屎内结之势。

随着温病研究的不断深入,内毒素已被广泛运用于温病卫气营血的各个阶段。研究发现,内毒素作攻毒材料,通过改变用药剂量或用药时间较易使

动物的病情、病变过程得到控制,而且实验人员也较安全^[6]。适用于邪热炽盛于内的动物造模。本次实验研究可见,家兔在攻毒后出现蜷缩,懒动,发抖,反应迟钝,呼吸,心率加快,眼结膜充血,耳廓发红及脏器组织损害等,符合热毒之征。

3.3 药物的反证 药物反证,又称以药测证,当建立稳定的动物模型后,再用该模型相对应的基本方药进行观察治疗,如果治疗能改善或消除模型的症状和某些检测指标,则佐证了此模型成立,否则,不成立^[1]。因此,我们同时设立模型验证组和模型治疗组,灌胃以小承气汤,泻热通腑消痞。结果验证组和治疗组家兔的症状、体征及各项指标均有很大的改善,证明小承气汤对该模型有很好的治疗作用,反证了小承气汤证动物模型成立。

上述几个方面可以看到,采用次碳酸铋、限水和大肠杆菌内毒素联合造模的方法,通过调整大肠杆菌内毒素和次碳酸铋的剂量,可以复制出家兔燥热、腑实、津伤的病理变化,符合阳明腑实证的临床表现和病理改变。药物的反证更进一步说明了模型的可靠性。因此可以认为这种造模是较成功的,具有可行性。本研究造模方法合理、简便易行、稳定性好、可靠性强,值得推广。

参考文献

- [1] 郑小伟. 试论中医动物模型的造型依据与研制方法[J]. 浙江中医学院学报, 2004, 11(28): 6-1.
- [2] 马超英主编. 实验中医基础[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000: 279-281.
- [3] Milton AS, Sabine Wendland. Effect on body temperature of prostaglandins of the A, E and F series on injection into the third ventricle of unanaesthetized cats and rabbits. J. Physiol. 1971, 218, pp. 325-336.
- [4] 张喜奎, 李森. 土燥水竭证动物模型研制[J]. 福建中医学院学报. 2004, 14(2): 35-40.
- [5] 鄢顺琴. 动物(小鼠)便秘模型的复制及其中药的治疗效果[J]. 中药通报, 1988, (8): 43.
- [6] 杨进, 陆平成. 家兔“热毒血瘀证”系列动物模型的试制[J]. 南京中医药大学学报 1995, 2(2): 70-72.

(收稿日期: 2009-01-09)

征稿启事

《江西中医药》所设的重点栏目有《明医心鉴》、《滕王阁医话》等。《明医心鉴》以介绍名老中医经验和中医临证心得为主, 重点刊载中医关于疑难病的诊疗经验, 要求观点、方法新, 经验独到。《滕王阁医话》主要反映中医教学、科研、临床的一得之见, 要求以小见大, 有感而文, 语言生动流畅, 可读性强, 富于知识性、趣味性。