

寒湿证动物模型的研究现状与评述*

孟 岩¹, 李威莹¹, 吴 威^{2**}, 王 凤¹, 姜晓西¹,
于嘉莹¹, 杨关林¹, 张会永^{3**}(1. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家重点实验室 沈阳 110847; 2. 珠海科技学院 珠海 519041;
3. 辽宁中医药大学附属医院 沈阳 110032)

摘 要:寒湿证泛指因寒湿邪犯肌表、络脉、筋骨,或阴寒凝滞于脏腑经络所引起,以寒湿合邪等相应征象为特征的一类证候。为了探究寒湿证发病本质,现代学者建立了一系列具有特色的寒湿证动物模型。本文将寒湿证的动物模型分为中医证候动物模型(寒饮蕴肺证、寒湿困脾证、阴黄证)和病证结合动物模型(类风湿关节炎、强直性脊柱炎、原发性痛经、新型冠状病毒肺炎)。中医证候模型的造模方法多根据中医的病因学以寒湿环境为基础或复合苦寒泻下、饮食不节、劳则耗气等因素进行造模,模型的稳定性和代表性相对西医的病理模型较薄弱,而病证结合动物模型更加符合临床实际。关于模型的评价多采用动物的宏观体征、微观指标、及反证方剂来验证模型是否成功。本文旨在对寒湿证动物模型的造模方法及模型评价方法做出分析与探讨。

关键词:寒湿证 动物模型 模型评价 中医证候 病证结合

doi: 10.11842/wst.20210729009 中图分类号: R2-03 文献标识码: A

寒湿证是常见的中医证候,主要包括阳虚和寒湿两大证候群。阳虚不足,失于温煦,则寒湿内生,寒湿多由阳虚加重或生活环境寒冷潮湿、过食生冷,损耗机体阳气所致。目前,寒湿证涉及的疾病范围较广,在呼吸系统、消化系统、循环系统、运动系统的疾病中均有体现,主要临床表现为畏寒肢冷、疼痛、腹胀痞满、喜温喜按、大便稀溏、神疲乏力、肢体倦怠、舌苔白腻、脉濡缓等^[1]。为了探究寒湿证的本质以及更好的治疗寒湿证所引起的疾病,复制与人类临床症状相似的寒湿证动物模型是必要条件。目前大多数学者对寒湿证动物模型造模后,都是以动物行为学特征的直观观察作为寒湿证证候模型的主要评判标准,比如动物表现出的神疲倦怠、蜷缩聚堆、毛色干枯、大便溏泻

等,虽不同程度地反映了寒湿证临床表现,也为寒湿证的临床治疗提供了实验依据,但存在寒湿证动物模型的造模方法复杂多样,实验施加因素种类繁多,造模时间长短不一,评价模型宏观表征及微观指标的方法各不相同,反证方剂种类较多、差异较大等问题。因此如何准确构建与人类临床疾病症状和病理变化相似的寒湿证动物模型,对深入研究寒湿证的本质及治疗方法具有重要的意义。本文通过中国知网、维普、万方以及CBM数据库,以“寒湿、动物”为检索词对建库以来的文献进行整理、分析。以(寒饮蕴肺证、寒湿困脾证、阴黄证)中医证候类型以及(类风湿关节炎、强直性脊柱炎、原发性痛经、新型冠状病毒肺炎)病证结合角度出发对寒湿证动物模型的造模方法及

收稿日期:2021-07-29

修回日期:2022-06-21

* 国家自然科学基金委员会青年基金项目(81603513):基于“脾病,脉道不利”探讨脾虚痰浊小鼠dyHDL对冠脉内皮S1PR1/PI3K/Akt的分子调控机制,负责人:张会永;广东省自然科学基金委员会面上项目(2021A1515011485):基于AR靶点的大独活香豆素类抗前列腺癌药效物质基础及其分子作用机制研究,负责人:吴威;沈阳市科学技术局中青年科技创新人才支持计划项目(RC190281):基于“脾虚生痰”探讨肠道菌群影响dyHDL及其亚类促动脉粥样硬化的作用及机制,负责人:张会永。

** 通讯作者:吴威,教授,主要研究方向:基于中医理论的传统中药和方剂药理学研究与中药及天然药物的活性化学成分研究;张会永,主任医师,教授,主要研究方向:中医古典方剂的文献整理研究与经典方剂的临床应用与实验研究。

模型评价进行综述。

1 中医证候动物模型

1.1 寒饮蕴肺证

寒饮蕴肺证是因外寒引动伏饮,或阴寒凝聚于肺系,肺失宣肃所致的一种病证^[1],在中医证候的肺系疾病中占比20.9%^[2]。2000年孙广仁^[3]采用“控气+生理盐水注射+寒冷环境”的方法,首次建立寒饮蕴肺证家兔模型。随着实验的开展,家兔出现呼吸困难、四肢发凉、尿量减少、气管插管分泌物增多、泪液增多等体征,并以小青龙汤以方测证得到缓解。吸烟可引起正常肺上皮细胞的过度自噬发生炎症反应,最终导致肺功能受损^[4]。沈承玲等人^[5]根据此理论在孙广仁基础上增加烟熏刺激进行造模,家兔体征、肺组织病理变化、微观指标均符合寒饮蕴肺证的临床表现。此造模方法虽符合中医病因理论,但其造模顺序是否会对实验结果造成误差尚且存疑。黄茜等人^[6]通过寒冷环境喂养及冷水浴与烟熏穿插的方法建立寒饮蕴肺证动物模型,并且认为先烟熏破坏肺组织再施加冷水浴,造模结果可能更佳。脂多糖可直接引起气道上皮损伤,导致气管慢性炎症发生^[7]。张才擎^[8]采用“脂多糖及改良烟熏”的方法建立寒饮蕴肺证大鼠模型,大鼠出现行动迟缓、拱背蜷缩、食少、扎堆恶寒、分泌物增多、哮鸣音等体征。刘燕等人^[9]根据“形寒饮冷伤肺”理论建立寒饮蕴肺证大鼠模型,大鼠出现形体消瘦、皮毛无泽、蜷缩、四肢不温、便不成形、呼吸急促、哮鸣音等体征。此造模方法相比于脂多糖及烟熏对肺组织损伤较小,操作简单,重复性好,是目前常用的造模方法。

综上,寒饮蕴肺证动物模型的建立主要是通过施加寒冷环境、脂多糖、烟熏、冷水浴等因素进行造模,造模后实验动物均出现呼吸困难,呼吸时间延长,呼吸道中有水样分泌物,尿量减少,毛发杂乱无泽,聚堆,体温下降等表现。并均通过观察分析动物的肺组织病理切片,发现肺组织支气管管壁均有炎细胞浸润,或伴有局部肺泡间隔断裂后融合成肺大泡,及黏膜上皮有损害。动脉血气分析是通过分析血液中氧气和二氧化碳含量用来判断呼吸功能是否异常,具有客观性,因此大部分学者用它来检测动物的呼吸状态。测量cAMP、cGMP的含量及比值可作为阴、阳虚的客观评判标准,因为寒饮蕴肺证有阳虚的表现,所

以cAMP/cGMP值会下降。具体详见表1。

1.2 寒湿困脾证

1.2.1 单因素造模

寒湿困脾证是由寒湿或阴寒内蕴,困阻脾阳所致^[11]。临床上寒湿证与脾阳虚证常相伴存在,因此有学者将脾阳虚动物造模归纳到寒湿困脾证中^[10]。王昕等人^[11]首次采用外感寒湿的方法,将大鼠放于寒湿环境中复制脾阳虚证动物模型,大鼠出现食少纳呆、消瘦、倦怠少动、肛温降低、肛周秽浊等体征。谢俏俏等人^[12]借鉴上述造模方法,缩短大鼠每日寒湿环境造模时间,连续21天。大鼠出现同样症状。

以上造模均属单因素造模,仅施加寒湿环境一种因素,操作简单,可重复性好,即使大鼠种类不同,也会出现进食、体征等方面的相似的变化,但这种方法的造模标准尚未统一,造模湿度、温度及时间缺乏客观性,若想继续深究,只有在微观指标上不断创新寻找突破口,这在未来的研究方向中并不提倡。

1.2.2 多因素造模

靳荃等人^[13]采用“劳则耗气”即冷水力竭游泳的方法复合寒湿因素进行造模。小鼠出现毛发粗糙、精神萎靡、大便稀等体征。但劳则耗气在短时间内便可得到恢复,实验结果稳定性差。因此宁晚玲等人^[14]采用“肩胛骨间棕色脂肪组织切除+高脂饲料+隔日寒冷刺激”的方法复制了稳定的脾阳虚寒湿证动物模型,模型大鼠出现扎堆、食欲减退、消瘦、毛发无泽、肛周秽浊等体征。该造模方法采用了手术因素,对模型动物损伤较大、死亡率高且不符合中医的病因学发病机理。孙大宇^[15]结合中医多种病因致病特点,采用“饮食不节+劳倦+苦寒泻下”的方法进行造模,造模后大鼠出现神疲乏力、消瘦、双前肢拉力下降、活动减少、粪便含水量增加、肛温降低等表现。王常松等人^[16]采用“寒湿环境+寒凉及高脂高糖饮食”的方法造模,大鼠出现弓背、反应迟钝、扎堆、毛发疏松、摄食减少、便溏等现象。

以上可知,多因素的寒湿困脾造模方法中,动物表征上均出现精神状态低迷、活动度下降、饮食减少、毛发粗糙等特征,微观指标中的均有对小肠上皮细胞、D-木糖和胃中相关酶的检测,且含量均有降低,这是因为小肠上皮细胞、D-木糖吸收率可以反映肠道的吸收功能,胃中的相关酶常做为反映“脾主运化”功能状况的重要指标。具体详见表2。

表1 寒饮蕴肺证造模方法

作者	实验动物	造模方法	宏观表征	微观指标	反证药物
孙广仁 ^[3]	青紫蓝种健康家兔, 雄性	气管、尿道、十二指肠插管处理+耳缘静脉生理盐水注射(每分钟0.5 mL·kg ⁻¹)+寒冷环境(温度10℃左右)	呼吸状态、痰液分泌量、尿量、体温、眼结膜分泌物	肺组织病理切片、颈动脉血气分析、肺组织 cAMP/cGMP测定	小青龙汤
沈承玲 ^[5]	纯种新西兰家兔, 雌雄不拘	在孙广仁造模基础上+烟熏(每天30 min)	呼吸状态、活动度、毛发色泽、体温、舌象、尿量、	动脉血气分析、肺组织病理观察、肺组织 TNFαmRNA 表达	小青龙加人参、黄芪
黄茜 ^[6]	Wistar 大鼠, 雄性	寒冷环境(10℃左右)+烟熏(每天2次, 每次30 min)+冷水游泳(温度11±2℃, 每次力竭)	反抗力度、咳嗽、活动度、体温、毛发光泽度、痰量	痰液测定	半夏
张才擎 ^[8]	Wistar 大鼠, 雄性	气管滴注脂多糖(第1、14天)+烟熏(第2-28天, 2次/天, 每次1 h)+冰箱冷冻(-20℃), 每天5 min, 连续8天	皮毛、呼吸状态、分泌物、体重、活动度	病理形态学改变、呼吸功能、IL-4、IL-8、TNF-α、IFN-γ 含量	小青龙汤加减
刘燕 ^[9]	SPF 级 Wistar 大鼠, 雄性	除第1、7天外, 饮冷(0℃冰水混合物, 12 h/天)+形寒(0℃恒温冰箱3 h/天, 待其恢复放置24±1℃中游泳至力竭)	皮毛、活动度、有无咳嗽、分泌物、体温、体重、呼吸频率、饮食情况、被毛	肺功能、肺组织形态学改变	小青龙汤

1.3 阴黄证

阴黄证由寒湿困脾, 血瘀气滞, 致使胆汁外溢等所致。临床以白睛、皮肤及小便发黄等为特征的征状^[1]。阴黄证的动物模型多采用“寒湿因素+α-萘基异硫氰酸酯(α-Naphthyl isothiocyanate, ANIT)或异硫氰酸苯酯(APIT)诱导肝损伤”的方法进行造模。佟欣等人^[17]采用“大黄煎剂+酒精+不同浓度的ANIT”灌胃的方法建立阴黄证大鼠模型, 大鼠出现倦卧、毛发脱落、水样便、饮食减少、肤色及巩膜黄染、尿黄等现象。经自然恢复后大鼠仍困倦嗜睡、大便溏、扎堆, 该模型具有稳定性。但该模型采用酒精灌胃, 难以判断是否为酒精损伤肝脾, 从而诱发黄疸。

曲长江^[18]等人采用“寒湿环境+大黄煎剂灌胃+APIT灌胃”的方法模拟中医阴黄黄疸理论复制动物模型, 大鼠出现眯眼、活动减少、扎堆、毛发松散无泽、饮水量减少、便不成形、肛周秽浊、肛温降低、体重下降、巩膜黄染、耳背皮肤色黄、小便色黄等现象。杨雪山等人^[19]采用同样的方法造模并用茵陈术附汤以方测证, 模型大鼠体征明显缓解, 说明该造模方法重复性高, 可靠性强。

张赤志等人^[20]以“大黄煎剂+ANIT”灌胃的方法制备阴黄证动物模型, 大鼠出现明显寒湿证的表现, 同时大鼠的肝功能及肝脏的病理改变与阴黄证的临床研究一致^[21]。该造模方法施加因素较少, 操作简单, 造模条件易控制。具体详见表3。

综上, 寒湿证的中医证候模型主要根据中医的病因学, 从外感寒湿或内伤损伤脾胃的角度进行造模,

而阴黄证和寒湿困脾证的造模方法相似, 是在寒湿困脾证的基础上增加了诱发肝损伤的药物, 从而导致小鼠出现巩膜发黄、皮肤黄、小便黄及寒湿证的表征。关于模型的检测指标均对实验动物的肝功能的一些微观指标进行检测如胆红素、胆汁酸、谷丙转氨酶、谷草转氨酶等, 且含量均有增高的表现。在西医疾病中也将阴黄证的造模方法称为急性肝损伤, 因此亦可归为病证结合的范畴。

2 病证结合动物模型

将现代医学疾病模型及中医证候模型同时复制到动物身上的病证结合类造模是目前模拟寒湿证候的常用方法, 该方法多采用寒湿环境复合致病因子进行造模, 比单纯的西医疾病模型或单纯的中医证候模型更加具有说服力。

2.1 类风湿关节炎

类风湿关节炎(Rheumatoid Arthritis, RA)属于中医的“痹症”范畴, 主要是由于遗传、环境等多种因素引起, 其中寒湿环境引起的类风湿关节炎占中医证型的19.82%^[22-23]。陈欢等人^[24]采用寒湿环境复合佐剂性关节炎的方法复制类风湿关节炎动物模型, 大鼠出现右足肿大、滑膜细胞增生活跃、毛细血管增生充血严重、大量炎性细胞浸润等体征, 经乌头汤治疗后上述症状明显改善。但此模型缺乏对造模大鼠行为学的描述, 其严谨性有待斟酌。有学者^[25-26]以胶原乳化剂结合寒湿环境的方法复制SD大鼠类风湿关节炎动物模型, 造模后大鼠出现行走不便、关节肿胀、四肢厥

表2 寒湿困脾证造模方法

作者	实验动物	造模方法	宏观表征	微观指标	反证药物
王昕 ^[11]	Wistar大鼠, 雄性	置于温度 $16\pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $95\pm 3\%$, 连续9天	进食量、饮水量、体温、粪便情况	胃酸、血清淀粉酶、血清胃泌素、D-木糖、胃壁及肢端循环血流量、形态学、小肠上皮细胞核酸及酶含量	四君子汤
谢俏俏 ^[12]	SPF级SD大鼠, 雌雄各半	每天中午置于温度 $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 湿度 $90\pm 20\%$ 的人工气候室内, 连续21天	进食量、饮水量、口唇颜色、体质量、舌象、毛发光泽度、活动度、精神状态、二便情况	脾脏系数、胸腺系数、血清四指标(IgG-S、IgG-R、Trypsin、PAR-2)	阿里红
靳荃 ^[13]	SPF级ICR小鼠, 雌性	上午在 $14\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 水温中力竭游泳, 下午置于(温度 $4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 湿度 $90\sim 95\%$)人工气候仓4h, 连续15天	粪便情况、体质量、皮毛色泽、精神状态、饮食量、活动度、反应灵敏度、关节变化	无	甘草附子汤
宁晚玲 ^[14]	Wistar大鼠, 雌雄不限	肩胛骨间棕色脂肪组织切除+高脂饲料+隔日寒冷刺激, 共造模30天	体温、活动度、毛发色泽、排便情况、饮食量、精神状态	胃肠组织病理、AQP4mRNA表达及蛋白含量、ANP含量	附子理中汤
孙大字 ^[15]	SD大鼠, 雄性	饱食1天, 禁食2天, 力竭游泳14天, 再灌服番泻叶水煎液1 mL/100 g, 2次/天, 连续14天	肛温、前肢抓力、排便情况、饮食量、活动度、精神状态、体质量	小肠组织 μ 受体表达及ATP、cAMP、PKA、含量变化UCP2、CREB、Sirt1蛋白表达	附子理中丸
王常松 ^[16]	Wistar大鼠, 雄性	将大鼠置于自制寒湿气候箱中, 上、下午各一次, 1.5 h/次+寒凉饮食+高脂饲料, 21天	精神状态、活动度、二便情况、饮食量、体质量、毛发	胃动素、胃泌素、尿D-木糖排泄率	胃苓汤

冷、嗜睡蜷缩、少动、皮毛无光泽、大便稀溏等体征。该造模方法简单, 模型成功率高, 耗费较少, 与临床类风湿性关节炎相似, 是常用的造模方法。

2.2 强直性脊柱炎

周腊梅等人^[27]运用蛋白聚糖加完全弗氏佐剂复合寒湿环境的方法制备肾虚型寒湿证强直性脊柱炎动物模型, 造模后小鼠出现蜷缩、精神萎靡、体重下降、缩毛等体征, 与中医肾虚型寒湿证较为吻合。陈月月等人^[28]去掉自来水冲笼这一步骤, 采用“蛋白聚糖+弗氏佐剂+寒湿因素”的方法复制动物模型, 小鼠出现同样症状。以上两种造模方法均采用生物冰置于笼内的方法模拟寒湿因素进行造模, 此研究未对小鼠的肛温进行测量, 施加的寒湿因素不稳定, 且脾虚与肾虚临床表现有交叉性, 其造模并未突出肾虚表现, 因此该模型具有局限性。

2.3 原发性痛经

原发性痛经发病率在年轻女性中占比 $40\sim 50\%$ ^[29], 寒湿凝滞是其发病的主要原因。孙小雪^[30]采用苯甲酸雌二醇复合寒湿刺激制备寒湿凝滞型原发性痛经大鼠模型的方式是目前最常用的造模方法。该研究以平滑肌痉挛导致子宫内膜缺血缺氧引起痛经为原理制备模型, 但造模结果未出现行经样改变, 因此该模型具有局限性。刘志刚等人^[31]采用病理手段使模型小鼠出现行经样改变, 并施加水浸束缚法造模, 实验结果显示: 小

鼠阴道涂片有红细胞出现, 子宫组织中炎细胞增多等现象。此造模方法符合女性在寒冷应激下出现痛经反应的原理, 与临床特征吻合度高, 但该模型制备过程复杂, 手术感染风险较大, 死亡率较高, 重复性较差。

2.4 新型冠状病毒肺炎

2019年新型冠状病毒肺炎疫情爆发成为全球研究的热点, 寒湿证占新冠肺炎患者中医证型的 22.71% ^[32], 因此有学者模仿寒湿因素进行造模, 探索其治疗方法。鲍岩岩等人^[33]采用寒湿刺激联合人冠状病毒229E(HCoV-229E)的方法造模, 小鼠出现扎堆、畏寒、活动度降低、四肢无力、反应迟钝、大便软、饮水量下降等体征, 经复方芩兰口服液治疗后得到缓解。赵荣华等人^[34]采用同样的方法造模, 并用体外培育的牛黄进行治疗, 小鼠症状同样得到缓解, 但小鼠的机体免疫、生理病理与人有所差异, 不能很好的诠释人的发病原理, 因此有学者^[35]采用与人更相似的恒河猴作为实验对象, 阐明了SARS-CoV-2感染的致病性, 加深了对新型冠状病毒病因学和病理学的认识, 促进了抗病毒药物及疫苗的研发。造模方法详见表4。

综上所述, 病症结合动物模型是在中医理论的指导下, 模型既具备中医证候的特点, 又具备西医疾病的病理改变, 在模型评价中也是以宏观表征和微观指标相结合, 避免了单纯中医证候模型的“一证”可能会出现“多病”的情况, 而现代医学疾病模型是西医理

表3 阴黄证造模方法

作者	实验动物	造模方法	宏观表征	微观指标	反证药物
佟欣 ^[17]	Wistar大鼠, 雄性	100%大黄煎剂1 mL/100 g+50%乙醇+α-异硫氰酸苯酯7.5(2.5) mg/100 g	体重量、体温、大便情况、进食量、活动度、毛发色泽	谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆汁酸、直接胆红素、总胆红素、环磷酸腺苷与环磷酸鸟苷比值、碱性磷酸酶、血清白介素2、Y-L-谷氨酰转肽酶	茵陈四逆汤
曲长江 ^[18]	Wistar大鼠, 雄雌各半	温度(8-12)℃,湿度>95%,每日上午予2 mL/100 g的100%大黄煎剂灌胃,第22天给予0.5%异硫氰酸苯(APIT)灌胃	大便情况、活动度、毛发状态、行为、体温、皮毛色泽	胆红素、胆汁酸、体液免疫功能、血清酶含量	茵陈术附汤
张赤志 ^[20]	Wistar大鼠, 雄雌各半	400%大黄煎剂,每只按50 mL/kg/天灌胃,连续15天,给予6 mL·kg ⁻¹ ANIT灌胃	行为、活动度、粪便状况、皮毛光泽度、进食量	血清白介素2受体、肝功、D-木糖吸收率、肝、胃、大小肠组织病理学改变	茵陈术附汤

论体系为基础,相比于中医的宏观表征更加注重微观指标,比如人体细胞、组织、器官等结构与功能方面的病理变化,从这些方面认识疾病本质,并以此为治疗依据,通俗的讲更像是有指向性的点对点治疗,却没有深度挖掘疾病背后证候所带来的影响。病症结合动物模型正是结合了二者各自的特点和优势,使模型动物兼具了疾病和证候的特征,同时在西医病理基础上加入中医辨证思想,也使证候这一宽泛理念有了具体体现,为促进中医辨证论治的客观化、科学化和现代化有重要意义。

3 模型评价方法

3.1 宏观表征

宏观表征主要包括观察模型动物的活动情况、精神状态、皮毛色泽、二便等,所使用的方法与临床的望诊相似。理想的寒湿证动物实验应当具备与临床症状吻合度高、操作简单、条件易控等特点,吻合度是指复制出的模型与临床症状相吻合,通过对寒湿证动物宏观表征与临床表现作对比来判断模型成功与否^[36],临床表现中的畏寒、喜温、肢体疼痛,在动物行为中表现为蜷缩扎堆、行走不便;神疲乏力、肢倦在动物体常表现眯眼、精神不振、少动、游泳耐力减少;肢冷可通过测量体表温度获得;大便稀溏、食少、舌脉可在动物体直接观察^[37-39]。可操作性是指动物模型施加因素越少,操作条件要求越低,可操作性越简单。易控性是指操作越简单,施加因素越少,越容易控制。具体评价详见表5。

3.2 微观指标

微观指标的出现丰富了直观的外在表象观测结

果,为传统的中医辨证提供了依据,克服了四诊辨证的主观性缺点^[41],但任何一个微观指标都不能完全诠释一个“证”的本质,只能从一个侧面说明部分问题。寒湿证在不同的疾病中测量的微观指标不同,例如寒饮蕴肺证主要测量的微观指标包括肺组织的病理形态学变化、动脉血气分析、炎症因子及环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, AMP)/环磷酸鸟苷(Cyclic guanosine monophosphate, GMP)。寒湿困脾证测量的微观指标有胃酸、胃动素、胃泌素、D-木糖、胃大小肠组织的形态学变化、炎症因子及能量代谢。阴黄证检测指标包含转氨酶、胆红素、血清酶含量、炎症因子、D-木糖吸收率、cAMP/cGMP^[42]。可以看出cAMP/cGMP、D-木糖、血清胃动素、胃泌素、炎症因子这些指标在任意病变脏腑均可见到,由此可见单纯的中医证型无法仅使用微观指标进行辨别,只有在疾病的基础上才能进行微观指标的判断。

3.3 反证方剂

反证方剂是验证寒湿证是否成立的必要条件。不同证型寒湿证动物模型的侧重点有所不同,故反证方剂亦不同。寒饮蕴肺证的反证方剂较单一,主要以小青龙汤为主。寒湿困脾证的反证方剂较多,主要有胃苓汤、阿里红、四君子汤、甘草附子汤、附子理中汤等。甘草附子汤具有温阳散寒,健脾除湿的功效,是临床治疗寒湿证的常用方剂。胃苓汤具有健脾和中、利水化湿的功效,四君子汤是补气的经典方,阿里红为多孔菌科层孔菌属真菌的子实体,具有祛风除湿、消肿止痛、利尿平喘的功效^[43],附子理中汤治疗脾肾阳虚。由此可见目前寒湿证的动物模型仍有不规范处或所复制的动物模型并非典型。

表4 病证结合寒湿证动物模型

疾病	作者	实验动物	造模方法	宏观表征	微观指标	反证药物
类风湿关节炎	陈欢 ^[24]	SPF级SD大鼠, 雄性	完全弗氏佐剂(0.1 mL)+寒湿环境(湿度2~8℃, 湿度70%~80%)每天6 h	无	足肿胀率变化、踝关节组织病理学检测、血清因子	乌头汤
	丁子铜 ^[26]	SPF级Wistar大鼠	牛Ⅱ型胶原乳化剂(100 μL/只)+寒湿环境(温度4℃, 湿度95%)每天刺激4~6 h	行为、活动度、粪便情况、皮肤色泽	抗体芯片扫描、血清变化	无
强直性脊柱炎	周腊梅 ^[27]	BALB/c小鼠, 雄性	蛋白聚糖+完全弗氏佐剂+自来水冲笼+冰袋250 g置于笼中每天5 h	精神状态、体质量、行为、饮水量	肿瘤坏死因子-α(TNF-α)	鹿角片、麻黄、桂枝、白芥子及复方
	陈月月 ^[28]	BALB/c小鼠	蛋白聚糖+弗氏佐剂+250 g生物冰放于笼内4.5 h	一般情况、精神状态、毛色、饮食、体质量	肿瘤坏死因子-α、基质金属蛋白酶-9、转化生长因子-β、RANKL	阳和汤
原发性痛经	孙小雪 ^[30]	Wistar大鼠, 雌性	苯甲酸雌二醇+寒冷刺激(下腹部浸入0±1℃冷水中, 每次20 min, 1次/天)	行为、大便状态、精神状态、饮食情况	血浆中TXB ₂ 、6-keto-PGF _{1α} 、子宫组织PGF _{2α} 、PGE ₂ 、AVP、一氧化氮、内皮素含量	艾灸
	刘志刚 ^[31]	清洁级未孕昆明小鼠, 雌性	子宫内膜行经样改变+(8±0.5℃)冷水浴浸泡1 h, 每日1次	无	子宫组织病理形态、血清、子宫组织PGF _{2α} 、TNF-α、OT、AVP水平	葛根汤
新型冠状病毒肺炎	鲍岩岩 ^[33]	SPF级BALB/c小鼠, 雄雌各半	寒湿气候箱(温度4±2℃, 湿度90%±3%)每天4 h, 连续7天+HCoV-229E滴鼻感染, 每日1次, 连续2天	行为、精神状态、活动度、摄食量、饮水量、体质量、皮毛光泽	肺指数及抑制率、肺组织病理学观察、炎症指标、血清胃动素、胃泌素	复方芩兰口服液
	赵荣华 ^[34]	SPF级BALB/c小鼠, 雄雌各半	同鲍岩岩	活动度、毛发状态、大便状态	肺指数及抑制率、肺组织病毒载量、血清含量、肺组织形态学; 外周血CD4+、CD8+ T及B淋巴细胞比例	牛黄

4 讨论

4.1 关于造模方法

目前寒湿证的中医证候动物模型多从“外感寒湿”与“内伤寒湿”两大角度进行造模,将动物放在“寒湿环境”中模拟“外感寒湿”,饲以“寒凉、高脂饮食”损伤脾胃引起“内伤寒湿”。而病证结合模型是在寒湿证的基础上施加病理因素来确定疾病类型。现如今寒湿证动物模型的复制取得了一定的成绩,但也存在一些缺点亟须我们去解决。在模型的建立过程中,不同的寒湿环境、动物品系、造模时间、药物剂量及给药方式可能会对模型的质量产生较大的影响,且这些影响因素的施加尚缺乏系统的标准。从造模方法看,有学者仅使用单因素进行造模,但在临床上寒湿证是由多种因素共同形成的,单一的寒湿环境并不符合发病机理,所以单因素造模并不适用于建立寒湿证动物模型。从不同的证型角度看,脾阳虚和寒湿证的造模极

其相似,模型所表现出的宏观症状模糊难以区分,在其造模的过程中使用的环境因素及造模时间基本一致,同样的造模方法却复制出了不同的动物模型,其中的孰是孰非不得而知,由此可见,脾阳虚和寒湿证的造模方法需要进一步区分。从实验条件标准看,实验所需的外在因素也应有明确的标准,例如有学者采用自来水冲笼同时将冰块放于笼中的方法来模拟寒湿环境,此造模方法缺乏严谨性,因为不同的地区自来水的温度会有所差异,而且冲笼用水的时间及水流的大小很难标准化,由此可见此造模方法存在较大弊端。从实验动物来看,寒湿证大多选择大鼠、小鼠、家兔等小型哺乳动物作为实验对象,种类较少,而且与人类物种不同无法全面反映模型的病理变化,有研究表明猪具有与人类生化指标相似的特点^[44],可以尝试将猪作为实验对象来更好模拟临床寒湿证的病因病机。

表5 寒湿证宏观表征评价

分类	造模方法	临床表现	中医病因	与临床吻合度	可操作性	易控性
寒饮蕴肺证	控气+生理盐水+寒湿环境 ^[3]	主证:咳逆喘息、胸部憋闷。次证:咳痰量多、色白清稀(或泡沫样)、畏寒肢凉、小便不利、舌淡苔白、脉弦紧 ^[1]	符合	高	复杂	差
	控气+生理盐水+寒湿环境+烟熏 ^[5]		符合	高	复杂	差
	寒湿环境+烟熏+冷水浴 ^[6]		符合	高	一般	一般
	脂多糖+烟熏+寒冷环境 ^[8]		不符	高	一般	一般
	饮冷+形寒 ^[9]		符合	高	简单	好
寒湿困脾	寒湿环境 ^[11-12]	主证:腹胀腹痛、大便稀溏。次证:四肢不温,口淡纳呆,舌淡苔白腻,脉濡缓 ^[1]	符合	中	简单	好
	寒湿环境+力竭游泳 ^[13]		符合	中	简单	好
	肩胛骨间棕色脂肪组织切除+高脂饲料+隔日寒冷刺激 ^[14]		不符	高	复杂	差
	寒湿环境+寒凉饮食+高脂饮食 ^[16]		符合	高	简单	好
阴黄证	大黄+酒精+α-异硫氰酸苯酯 ^[17]	主证:身黄,目黄,小便黄。次证:黄色晦暗如烟熏、肢体乏力、脘腹胀满、大便溏、口淡不渴、畏寒肢冷 ^[1]	不符	高	一般	一般
	寒湿环境+大黄+α-异硫氰酸苯酯 ^[18]		不符	高	一般	一般
	寒湿环境+ANI ^[20]		不符	高	简单	好
类风湿关节炎	完全弗氏佐剂+寒湿环境 ^[24]	主证:关节肿胀,冷痛。次证:屈伸不利,恶风畏寒,活动尤甚,僵硬,四肢不温,舌淡,苔白,脉细数 ^[1]	不符	-	简单	好
	牛Ⅱ型胶原乳化剂+寒湿环境 ^[26]		不符	高	简单	好
强直性脊柱炎	蛋白聚糖+完全弗氏佐剂+自来水冲笼+冰袋 ^[27]	主证:腰骶及背部疼痛,晨僵、遇寒加重,遇热减轻。次证:四肢关节冷痛,舌淡,苔白,脉弦滑 ^[1]	不符	低	复杂	差
	蛋白聚糖+弗氏佐剂+冰袋 ^[28]		不符	低	一般	一般
原发性痛经	雌激素+寒冷刺激 ^[30]	主证:经期规律性下腹痛,拒按。次证:畏寒肢冷,得温痛减,舌暗,苔白,脉沉缓 ^[1]	不符	高	简单	好
	子宫内膜行经样改变+冷水浴 ^[31]		不符	-	复杂	差
新型冠状病毒肺炎	寒湿环境+HCoV-229E ^[33-34]	主证:发热、干咳、乏力。次证:鼻塞流涕,胸闷,口渴,恶心呕吐,腹泻 ^[40]	不符	中	简单	好

注:符合主证≥2,次证≥2项视为吻合度高;符合主证≥2、次证<2项(均不包括0)视为吻合度中;主证≤1或次证≤1项视为吻合度低;未对动物宏观表征进行描述的标“-”。

4.2 关于模型评价

就评价标准而言,现有的动物实验大多通过动物行为学特征、生化指标及反证方剂来判断所复制的动物模型是否成功^[45]。应由三者相互结合来判断模型是否成功,但有部分文献仅对动物的行为学表征做出描述,当动物出现毛发无泽、蜷缩少动、大便不成形、体质量降低、饮食减少等体征时说明模型复制成功,未进一步进行微观指标的检测。这样存在的问题,单从外在条件来看,这些症状并不是寒湿证所独有。因此模型评价成功的标准并不严谨,主观性强,导致实验结果在评判过程中存在较大误差。从反证方剂来看寒湿证模型反证方剂种类较多、选择随意,所选的方药各互,难以相互评判,使证实结果的可靠性遭到质疑。评价寒湿证的微观指标主要包括病变脏腑的病理组织形态学改变、免疫功能、血液、消化功能等方面,而这些指标在其它疾病中也可见到,由此可见微观指标的特异性、敏感性不够明确,缺乏特异性的

金标准来衡量模型的成功性。

5 总结

综上所述,目前寒湿证造模方法各异、种类繁多,所以仍不免存在一些问题。西医病理模型简单易行,稳定性强,但未能反应寒湿证的中医病因,中医证候病因模型虽能反映出疾病的本质,但单纯的中医病因对于中医病证来说多为诱发因素,而非直接发病因素,所以往往不具备特异性,且单因素造模也并不符合临床实际。因此中医的病因模型与西医的病理模型相结合是最常用的造模方法也更加符合实际,但是仍有不足之处:同一证候存在多种因素的造模方法,比如寒湿证中医病因造模就可以通过形寒饮冷、苦寒泻下、饮食失节、劳则耗气等因素实现,若联合现在医学造模,则方法更多,而且在现有的研究中没有相应的规范来规定何种造模因素能造出典型的符合临床实际的相应模型;对于模型成功的评价多是以模型的

宏观指标及反证方剂进行评判,难免依赖于主观上的判断,很少在动物行为学特征的基础上用微观指标进行佐证,来判断寒湿证动物模型造模是否成功。

因此,在寒湿证造模上若能避免单因素造模,改为中医病因作为诱发因素,结合西医病理的造模手法,再加以结合临床,分析寒湿证证候出现的主次原因,并在造模过程中实时跟踪,总结改善所施加因素

的合理性及相互之间的时序性,筛选建立最佳的构建模型的造模因素;同时,在模型评价标准上,学者们可以借鉴中医临床上的“望、闻、问、切”,观察动物形态、行为,必要时观察舌脉、内脏切片等,再结合能反应寒湿证病理疾病的微观指标,来减少宏观评判的主观性,增加模型评价的客观性、真实性以及准确性。

参考文献

- 1 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- 2 Li X, Liu W, He W, et al. [Meta-analysis of single-group rate of the distribution of traditional Chinese medicine syndromes in 2 139 patients with coronavirus disease 2019]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2020, 32(6):664-670.
- 3 孙广仁, 陈德溯, 张庆祥, 等. 寒饮蕴肺证家兔病理模型初步研究. *山东中医药大学学报*, 2000(2):143-146.
- 4 Song B, Yan X, Li R, et al. Ghrelin ameliorates chronic obstructive pulmonary disease-associated inflammation and autophagy. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(2):356-365.
- 5 沈承玲, 孙塑伦, 高颖, 等. 寒饮蕴肺证家兔病理模型的建立及评价. *辽宁中医杂志*, 2004(12):982-984.
- 6 黄茜, 蔡陈浩, 冯贤慧, 等. 生半夏与制半夏对寒饮蕴肺型大鼠祛痰疗效比较. *吉林中医药*, 2019, 39(6):793-796.
- 7 汪珊珊, 汪电雷, 陶秀华, 等. 脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮MRP1功能分析. *中国实验动物学报*, 2014, 22(3):30-34, 5.
- 8 张才擎, 梁铁军, 张心月, 等. 温肺化饮方对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺保护作用的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(1):72-75.
- 9 刘燕, 张庆祥, 常兴, 等. 哮喘病寒饮蕴肺证证结合大鼠病理模型的建立与思考. *中华中医药学刊*, 2019, 37(3):586-588, 777.
- 10 吉琳, 申琪, 郭向东. 阳虚动物模型及检测指标的研究进展. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1):138-145.
- 11 王昕, 张永志, 孙跃余. 伤湿所致大白鼠脾阳虚症动物模型及其机理研究. *辽宁中医杂志*, 1995(4):187-188.
- 12 谢俏俏, 赵伟芹, 何文静, 等. 阿里红对寒湿证大鼠免疫功能的影响. *环球中医药*, 2019, 12(11):1630-1634.
- 13 靳荃, 青千裕, 郜宪明, 等. 甘草附子汤对小鼠疼痛模型及寒湿证疼痛模型止痛作用比较研究. *山西中医药大学学报*, 2020, 21(5):338-341.
- 14 宁晚玲, 唐汉庆, 刘燕平, 等. 附子理中汤对脾阳虚大鼠AQP4-ANP-pGC轴的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20):126-131.
- 15 孙大宇. 附子理中丸对脾阳虚大鼠海马、下丘脑和小肠cAMP-PKA通路的影响研究. 沈阳: 辽宁中医药大学博士研究生学位论文, 2018.
- 16 王常松, 吴同玉, 陈学习, 等. 寒湿困脾证动物模型的建立和评价. *上海中医药大学学报*, 2011, 25(5):75-78.
- 17 佟欣, 王喜军, 孙晖. 茵陈四逆汤对阴黄证模型大鼠的治疗作用研究. *世界科学技术-中医药现代化*, 2011, 13(1):87-92.
- 18 曲长江, 王文丽, 吴谔谔, 等. 中医黄疸动物模型的建立. *辽宁中医杂志*, 2005(10):106-108.
- 19 杨雪山, 曲长江. 茵陈术附汤对阴黄证黄疸动物模型 β -葡萄糖醛酸酶含量UDPGT活性的影响. *辽宁中医杂志*, 2007(5):688-689.
- 20 张赤志, 曾浩, 程良斌. 阴黄证动物模型的建立及其意义. *中国中医基础医学杂志*, 2000(7):43-46.
- 21 Pavlidis E T, Pavlidis T E. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17(1):17-21.
- 22 刘蔚翔, 巩勋, 姜泉, 等. 类风湿关节炎湿热与寒湿证候的病情特点分析. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2):1088-1091.
- 23 Schinnerling K, Rosas C, Soto L, et al. Humanized mouse models of rheumatoid arthritis for studies on immunopathogenesis and preclinical testing of cell-based therapies. *Front Immunol*, 2019, 10:203.
- 24 陈欢, 任香怡, 魏江平, 等. 寒湿环境对佐剂关节炎模型大鼠炎症反应的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(3):328-331.
- 25 Grötsch B, Bozec A, Schett G. In vivo models of rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol*, 2019, 1914:269-280.
- 26 丁子桐, 熊海霞, 高琴琴, 等. 胶原诱导性关节炎病/证模型大鼠血清细胞因子表达谱的初步研究. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4):28-33.
- 27 周腊梅, 汪悦. 蛋白聚糖及寒湿因素BALB/c小鼠造模分析. *中华中医药学会第十六届全国风湿病学术大会论文集*, 2012:4.
- 28 陈月月, 汪悦. 阳和汤加减调节强直性脊柱炎T细胞功能及骨代谢指标的探讨. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(10):23-28.
- 29 Dawood M Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. *Obstet Gynecol*, 2006, 108(2):428.
- 30 孙小雪. 不同时机艾灸对寒湿凝滞型痛经大鼠子宫组织微血管密度及血管活性物质含量的影响. 石家庄: 河北医科大学硕士研究生学位论文, 2017.
- 31 刘志刚, 张荣春, 刘红梅, 等. 葛根汤对寒湿凝滞型原发性痛经模型小鼠的治疗作用及其机理研究. *江苏中医药*, 2020, 52(9):82-85.
- 32 李建生, 李素云, 谢洋, 等. 河南省524例新型冠状病毒肺炎患者临床特征及中医证候分布. *中医杂志*, 2020, 61(16):1391-1396.
- 33 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 复方芩兰口服液对人冠状病毒肺炎病毒肺炎证的治疗作用. *中国中药杂志*, 2020, 45(7):1473-1480.

- 34 赵荣华, 孙静, 郭姗姗, 等. 体外培育牛黄对冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠病证结合模型的效用特点. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(2):66-73.
- 35 Deng W, Bao L, Liu J, *et al.* Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*, 2020, 369(6505):818-823.
- 36 钟森杰, 李静, 李琳, 等. 证候动物模型的构建思路与评价方法述评. 时珍国医国药, 2021, 32(3):712-714.
- 37 王丹丹, 王东梅, 马青, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠 Th17、Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响. 时珍国医国药, 2019, 30(2):308-310.
- 38 许颖智, 王晓玲, 庞树朝, 等. 气滞血瘀与气虚血瘀心肌梗死大鼠模型的生物学标记物表达差异. 中医杂志, 2018, 59(18):1606-1610.
- 39 慕德宏, 刘慧霞, 李东棋, 等. 克敏芪丹鼻喷剂对气虚血瘀证变应性鼻炎大鼠血清 IL-4、PAF 的影响. 中国免疫学杂志, 2020, 36(24):2981-2985.
- 40 国家卫生健康委员会, 国家中医药管理局. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)的通知, 2020.08.19.
- 41 李灿东, 杨朝阳, 廖凌虹, 等. 微观参数的中医辨证意义. 中华中医药杂志, 2011, 26(12):2916-2920.
- 42 吴清, 莫秀梅, 陈达灿, 等. 中医湿证动物模型的研究进展. 世界中医药, 2022, 17(8):1184-1191.
- 43 郭雄飞, 魏鸿雁, 马晓玲, 等. 阿里红的化学成分研究. 中药材, 2021, 44(1):99-102.
- 44 张会永, 庞琳琳, 张哲, 等. 小型猪中医动物模型进展及在中医药研究中的应用. 中华中医药学刊, 2014, 32(6):1266-1269.
- 45 唐维我, 张会永, 李芹, 等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4):1317-1324.

Research Status and Review of Animal Models of Cold-dampness Syndrome

Meng Yan¹, Li Weiyang¹, Wu Wei², Wang Feng¹, Jiang Xiaoxi¹, Yu Jiaying¹, Yang Guanlin¹, Zhang Huiyong³

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, National Key Laboratory of the Theory and Application

of TCM Zangxiang Theory and Application of Ministry of Education, Shenyang 110847, China; 2. Zhuhai

Institute of Science and Technology, Zhuhai 519041, China; 3. The Affiliated Hospital of Liaoning

University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

Abstract: Cold-dampness syndrome generally refers to a type of syndrome that is caused by cold-dampness evil invading the muscle surface, collaterals, muscles and bones, or yin-cold stagnation in the viscera and meridian, and it is characterized by cold-dampness combined with evil and other corresponding signs. In order to explore the nature of cold-dampness syndrome, modern scholars have established a series of characteristic animal models of cold-dampness syndrome. This article divided the animal models of cold-dampness syndrome into animal models of TCM syndromes (cold drink accumulating lung syndrome, cold-dampness trapping spleen syndrome, yin jaundice syndrome) and disease-syndrome animal models (rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, original Dysmenorrhea, new coronavirus pneumonia). The modeling methods of TCM syndrome models are mostly based on the etiology of TCM based on cold and humid environment or composite multiple factors. The stability and representativeness of the model are relatively weak compared with the pathological model of Western medicine, and the animal model is combined with disease and syndrome, which is more in line with clinical reality. Regarding the evaluation of the model, the animal's macroscopic signs, microscopic indicators, and disproving prescriptions are often used to verify the success of the model. The purpose of this article is to analyze and discuss the modeling methods and model evaluation methods of animal models of cold-dampness syndrome.

Keywords: Cold-damp syndrome, Animal model, Model evaluation, TCM syndrome, Combination of disease and syndrome

(责任编辑: 周阿剑、李青, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)