

高冉冉,申振,连梦慧,等.气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2023,33(10):91-99.
Gao RR, Shen Z, Lian MH, et al. Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 91-99.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.012

气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展

高冉冉¹,申 振²,连梦慧²,韩 聪^{3,4*},李 伟^{4*}

(1.山东中医药大学中医学院,济南 250014;2.山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;
3.山东中医药大学,济南 250014;4.山东中医药大学附属医院,济南 250014)

【摘要】 动物模型是中医药基础研究的重要手段,气虚湿瘀是肾纤维化的主要证候。随着慢性肾病患率及死亡率的逐年升高,气虚湿瘀型肾纤维化研究成为近年来的热点,亟须其病证结合动物模型的建立。本研究综述近年来相关造模方法,基于西医外科手术及化学因素建立肾纤维化病理模型,通过劳则气耗或饥则气损、内外湿相引加之客邪影响理论以及化学药物因素等从病因、病理角度建立气虚湿瘀病证结合模型,并从宏观表征、实验室指标、病理改变等角度制定气虚湿瘀型肾纤维化动物模型评价标准。将中医病证模型同现代科学相结合,构建相对完善的气虚湿瘀型肾纤维化动物模型造模方法及评价标准,为今后探究其发病机制及新的治疗思路提供模型支持,更有效地发挥中医药在肾纤维化中的治疗作用,推动中医药走向国际。

【关键词】 气虚湿瘀;肾纤维化;动物模型;模型评价方法;病证结合
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2023) 10-0091-09

Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome

GAO Ranran¹, SHEN Zhen², LIAN Menghui², HAN Cong^{3,4*}, LI Wei^{4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China.
2. First Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014. 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014. 4. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014)

【Abstract】 Animal models are important means for basic research in traditional Chinese medicine (TCM). Qi deficiency, dampness, and blood stasis are the main syndromes of renal fibrosis. With the increase in the morbidity and mortality of chronic kidney disease, study of renal fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome has become a hotspot in recent years. Additionally, establishment of combined disease and syndrome animal models is urgently needed. This article reviews the recent modeling method that established the renal fibrosis pathological model based on western medicine surgery and chemical factors, and established the model of qi deficiency, dampness and blood stasis disease from the aspect of etiology and pathology through the theory of exhaustion leading to qi loss or hunger leading to qi loss, internal and external dampness combination, exogenous pathogenic factors, and chemical drugs. Additionally, these studies established the evaluation standard of the renal fibrosis animal model of qi deficiency, dampness and blood stasis type from the aspects of macroscopic characterization, laboratory indexes, and pathological changes. The TCM disease and

【基金项目】国家自然科学基金(82174179);山东省自然科学基金(ZR2021LZY041);国家自然科学基金(82204886);山东省自然科学基金(ZR2022QH133);中国博士后科学基金(2021M702039);中国博士后科学基金(2023T160398)。

【作者简介】高冉冉(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:1377142543@qq.com

【通信作者】韩聪(1992—),男,主治医师,博士后,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:1585285585@qq.com

李伟(1962—),女,主任医师,博士,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:lweidw@163.com

* 共同通信作者

syndrome model has been combined with modern science to establish a relatively perfect qi deficiency and dampness stasis kidney fibrosis animal model with evaluation criteria. Exploring its pathogenesis and new treatments supports the therapeutic role of TCM in kidney fibrosis and promotes TCM internationally.

[Keywords] qi deficiency and dampness stasis; kidney fibrosis; animal model; model evaluation method; combination of disease and syndrome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动物模型最早可追溯到公元前 6 世纪,人类疾病发生发展复杂,借助动物模型间接研究可调控变量,有助于方便、有效地认识人类疾病的发生发展规律,促进医学发展与进步^[1]。传统医学因其独特性及病证复杂性,单纯西医病理模型不能充分反映其病因及临床实际,在现代实验研究中病证结合动物模型发挥着重要作用。近年来有关中医动物模型的研究不断发展,逐渐由单纯病理模型到病因模型再到病证结合模型,使动物模型同时具备疾病与证候的特征,更加贴近于中医理论特色。但是目前病证结合动物模型仍缺乏规范化的评价体系及可重复性,建立规范且具有复刻性的病证结合动物模型成为近年来研究的热点。

气虚湿瘀是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 的常见证候,肾纤维化是 CKD 的主要病理特征,胡洪贞等^[2]提出 CKD 以气虚为本,血瘀、湿浊为标,主要由劳倦、内外湿邪及外邪侵袭等所致。气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的建立有助于把握该证候疾病的本质及病理生理变化特点,利于 CKD 的研究及更好地指导临床用药诊疗。目前并无气虚湿瘀型肾纤维化动物模型造模的先例,本文从病理造模、病因造模及病证结合造模、模型评价角度出发,综述并探讨气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的造模方法及模型评价,以期气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的构建及复制提供参考。

1 气虚湿瘀

1.1 气虚血瘀

中医认为气为血之帅,气行则血行、气止则血止,气虚无力推动血液运行,血行不畅而致瘀;血为气之母,血瘀致脏腑失养,生化乏源,进一步导致气虚,气虚与血瘀二者互为因果,相互关联,临床多气虚血瘀并见。该证候动物模型的构建可从其病理及病因角度出发,单因素与多因素相结合。

1.1.1 病理造模

气虚血瘀多表现为免疫学、血液流变学及行为学上的改变如免疫功能下降、能量代谢紊乱、神疲

乏力、血液高凝状态、黏度增高、纤维蛋白原含量增高等。病理造模根据气虚血瘀特定的病理表现,运用相关实验技术对动物进行造模,使动物表现出该特定的病理改变。

林家茂等^[3]通过阿霉素腹腔注射联合丙基硫氧嘧啶混悬液灌胃,从血流动力学方面降低心肌收缩力,减少心排量制备心气虚兼血瘀证心衰模型,造模 6 周后,造模组出现饮食量减少、生长缓慢、精神萎靡、活动力下降、甲状腺激素 T₃、T₄ 降低等气虚表现以及毛色枯槁、爪甲紫绀、左室射血分数下降、心排量减少等血瘀表现,提示心气虚兼血瘀证的 SD 大鼠模型造模成功。罗泽飞等^[4]以环磷酸腺苷腹腔注射使血液呈高凝状态制备气虚血瘀大鼠模型,模型组大鼠全血黏度、血沉、血浆黏度、红细胞压积和内皮缩血管肽 (endothelin, ET)-1 均明显高于空白组,NO 含量低于空白组,提示造模成功。张玉昆等^[5]通过注射博来霉素生理盐水溶液 (5 mg/kg) 法过表达 TGF- β 1,制备气虚血瘀动物模型,造模结束后大鼠的中、低、高切变率的全血黏度、血小板聚积性相关指标 cGMP、血小板纤溶相关指标 PAI-1 以及血小板释放相关指标如 β -TG 和 PF4 水平均升高, cAMP、TT 缩短,并以方测证,运用行气活血方丹参饮后,大鼠气虚血瘀状态得到改善。此外,还有研究采用利血平肌肉注射,消耗小鼠体内儿茶酚胺导致脾虚,模型小鼠出现耳缘、脚趾等局部微循环血流量的降低,表现出气虚血瘀的临床及病理改变^[6-7]。

1.1.2 病因造模

病因造模指基于中医病因学说和发病理论将符合单一或多种病因理论的致病因素作用于实验动物^[8],符合“因-证理论”,符合中医机理,具有逻辑性。气虚血瘀依据中医“劳则气耗、饥则气损”的病因,多采用力竭游泳、疲劳跑步、睡眠剥夺法进行“气虚血瘀”模型构建。扈新刚等^[9]以大鼠沉入水中 10 s 不能自行浮出水面为力竭标准,制备大鼠气虚血瘀模型,对大鼠表征进行动态观察并检测相关血液流变学指标,发现经过长期的力竭游泳后均表

现出气虚相关表征,血液流变学指标符合气虚血瘀表现。郝婷婷等^[10]通过对大鼠每天睡眠剥夺 16 h 造成中枢性神经疲劳并联合长时间站立所致形体疲劳制备气虚血瘀型大鼠,大鼠出现舌象、足底图像 R、G、B 下降,足底变紫暗、舌呈淡紫,耳廓、足底体表激光多普勒血流灌注量降低等气虚血瘀表现。后陈进成等^[11]采用睡眠剥夺法成功复制气虚血瘀动物模型。甘加宽等^[12]曾用睡眠剥夺、力竭游泳、睡眠剥夺结合力竭游泳 3 种方法进行小鼠造模,对小鼠体重、抓力、舌象、脉搏、脾指数与胸腺指数、脾淋巴细胞亚群进行比较,结果显示三种造模方式均能引起小鼠乏力,睡眠剥夺与力竭游泳均能引起小鼠脉象变细,并最终得出睡眠剥夺组为三者间更优造模方法。李雅君等^[13]通过饥饿和力竭游泳的方法成功复制大鼠气虚血瘀模型,与王晚霞等^[14]的实验结果基本一致,表现为血液黏度低、纤维蛋白原等凝血因子显著不足的低流变性型血瘀证。彭桂原等^[15]采用小承气汤耗气破气加饥饱失常(足量给食-限量给食循环)进行气虚造模后,再用光化学反应法制备气虚血瘀证耳蜗 Corti 器毛细胞损伤的豚鼠动物模型,造模后豚鼠均出现不同程度的中医气虚证的典型症状表现,耳蜗病理切片提示耳蜗血管纹、Corti 器等结构出现不同程度的缺血性病变,体现血瘀表现,提示造模成功。

1.1.3 病证结合造模

病证结合造模即在充分考虑气虚血瘀证类疾病病因的前提下,人为地制造病理产物,使之既符合西医病理特点又符合中医证候特点,同时使用一些动物体表特征来模拟人类证候特征的生物表征,可更好地体现中医理论和评价中药疗效^[16]。

杨霓芝等^[17]在 Thy-1 抗体制备慢性肾炎模型的基础上采用游泳疲劳实验制备气虚血瘀病证结合模型,模型组大鼠出现气虚血瘀表征,机体细胞免疫功能紊乱,血液流变学异常。任建勋等^[18]依据“劳则气耗”理论,采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法建立心力衰竭气虚血瘀病证结合大鼠模型,模型组体重、抓力、脉搏幅度及自主活动总路程和平均速度较空白对照组均明显下降,主动脉血流速度下降,在多因素复合干预下气虚血瘀病证结合更为明显。王瑾茜等^[19]通过控食复合力竭游泳联合结扎左冠状动脉前降支造模,造模结束后分析大鼠舌面 RGB 值属“紫舌”,舌面微血管数量增加,符合冠心病气虚血瘀病证结合模型特点。戴

姣等^[20]依据“生物表征”及“因、脉、证、治”理论通过声、光、电、夹尾、冰水浴、束缚等消耗正气,“元气既虚,必不能达于血管;血管无气,必停留而瘀”,从而构建气虚血瘀大鼠模型,通过注射野百合碱诱导肺动脉高压,大鼠注射部分出现不同程度的紫肿、出血等血液循环瘀滞表现,同时血流动力学指标体现血瘀。

综上,气虚血瘀模型多表现为血流动力学及肢体行为学上的改变,可采用化学法如阿霉素、环磷酸胺、博来霉素等靶向病理造模,同时采用劳倦过度、饮食失节的方法进行病因造模,病证结合。

1.2 气虚湿盛

气主推动,气行津行,气虚气化无力、气机阻滞可致运化失司,水湿停聚。《景岳全书》云“盖水为至阴,故其本在肾;水化于气,故其标在肺;水唯畏土,故其制在脾”。肾者水脏,主津液。肾气虚,气化不利,水液输布失常,则湿浊内生。肾气虚,邪能客之,外湿客表,久则深入血络,导致气滞湿阻,气化失司,加重湿浊。湿浊内停化热,可见湿热,而浊毒日久损及肾阳,失于温煦,可致寒湿。故从湿热与寒湿两方面论述。

1.2.1 湿热证

肾者,胃之关也,关门不利,故聚水而从其类也。肾气亏虚,失于气化蒸腾,可见水湿停聚。徐灵胎云:“有湿则有热,虽未必尽然,但湿邪每易化热。”肾气亏虚,津液输布排泄障碍,水湿停聚,郁久化热。肾与脾先后天相互滋生、相互影响,薛生白云“太阴内伤,湿饮停聚,客邪再至,内外相引,故病湿热”。嗜食肥甘厚味、饮酒无度、年老久病或房劳过度损伤脾肾、聚湿生热,加之外界环境湿热氤氲,同气感召,另受客邪引动致湿热,故湿热模型构建可从“内湿+外湿+客邪+脾肾亏虚”角度出发,内外因结合。

(1) 病理造模

湿热证病理多表现为舌苔黄腻、小便黄赤、大便黏滞或溏泄、炎症因子升高等,杜恒^[21]通过在口服并定时尾静脉注射牛血清白蛋白(BSA)的基础上注射葡萄球菌肠毒素 B 制备大鼠肾炎湿热证模型,大鼠出现大便溏泄等湿热证表征同时伴有 IL-6 等炎症因子升高。齐文杰等^[22]、Cao 等^[23]通过用胆胰管推注 5% 牛磺胆酸钠、异硫氰酸 α-萘酯和四氯化碳进行病理造模,呈现湿热证候。此外,多研究发现在肥甘饮食+恒温恒湿的基础上加用水杨酸、大

肠杆菌、克林霉素磷酸酯、鼠伤寒沙门氏菌灌胃等生物、化学因子均可制备湿热模型^[24-27]。

(2) 病因造模

基于饮食不节、外感湿邪及脾胃不和酿湿生热病因,季旭明等^[28]通过高脂饮食+游泳内外相引制备湿热证小鼠模型,模型小鼠出现脂质代谢紊乱。王婷等^[29]通过高蛋白饲料+糖水+酒营造内湿,恒温恒湿气候箱制备外湿,分别用花生油脂模拟肥甘厚腻致脾气虚、番泻叶寒凉致脾阳虚,两种湿热模型均出现喜聚堆蜷卧、喜闭眼、嗜睡懒动、被毛无光泽、尾部肛周、腹部毛色黯黄、饮水减少、大便溏泄等湿热证的临床表现和体征,以及干扰素 γ (INF- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子的改变和肠道菌群结构的失调。周祎青等^[30]通过高蛋白饮食+人工气候箱+隔日灌服白酒+跑步制造“外湿+内湿+脾虚”的复合因素造模,模型组小鼠出现湿热证症状,机体发生炎性改变以及小肠组织黏膜层上皮细胞破坏,舌组织黏膜层角化增加、舌乳头排列不均匀等湿热证的病理表现。

(3) 病证结合造模

病证结合模型可反映疾病病理与湿热证候特征,熊宁宁等^[31]早在 1991 年就报道了采用给家兔注射血清白蛋白并加用大肠杆菌内毒素感染造成免疫复合物沉积模仿人类反复感染后导致的湿热型进行性肾炎,制备肾炎湿热病证结合模型。刘晓鹰等^[32]复刻肾炎湿热动物模型,通过在对 Wistar 大鼠口服并定时尾静脉注射牛血清白蛋白的基础上,分别施以葡萄菌肠毒素 B 或高糖高脂饮食联合恒温恒湿外环境影响构建湿热模型动物,造模中晚期动物出现血尿、蛋白尿、血清胆固醇、三酰甘油、血肌酐、尿素氮等升高,弥漫性肾小球系膜区增宽、系膜细胞、系膜基质增生、肾小管间质炎细胞浸润等类似于肾炎湿热证的生化及病理改变。

1.2.2 寒湿证

疾病日久,损及肾阳,肾阳不足,命门火衰,火不暖土,寒湿内生,另加之外受寒邪影响,内外寒湿互病。劳则耗气、饮食失节、苦寒药物、年老久病等损伤脾肾、寒湿内生,外界寒湿环境、寒湿邪气乘虚而入,内外因相互影响导致寒湿证候。故寒湿模型构建可基于“内伤+外感”,病因病理相结合。

寒湿证病理多表现为畏寒肢冷、肤色青暗、大便稀溏、体重下降、炎症因子升高、血清皮质醇下降等,病因多与饮食不节、苦寒泻下、年老久病气耗阳

损、外感寒湿侵袭等有关。戴冰等^[33]基于抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴原理通过给予 25 mg/kg 氢化可的松灌胃 10 d 后小鼠出现肢尾冷、体重下降、大便稀溏等寒湿表征。刘同林^[34]、吴君等^[35]选取老年大鼠与青年大鼠比较,发现老年大鼠具有体温下降、尿量增多、血清皮质醇下降等阳虚寒湿表现。靳荃等^[36]以冷水游泳力竭联合人工气候箱模拟外界寒湿环境制备小鼠寒湿证疼痛模型,造模后小鼠出现尾巴皮肤青暗、体重增长变慢等寒湿证病理特征。雷鸣等^[37]基于外湿病因以温度 4℃,湿度 60% 构建外湿环境进行寒湿痹阻模型造模,大鼠皮下胶原及肌组织出现肌纤维变性、坏死,纤维化伴淋巴细胞浸润提示造模成功。王常松等^[38]通过采取寒湿环境+寒凉饮食+高脂饲料的多因素造模,在外在表现及尿 D-木糖排泄率、血浆胃动素等微观指标上均符合寒湿证模型特征。

综上,气虚湿盛证候模型分为湿热与寒湿两个方面。湿热证主要根据中医“肥甘厚腻,酿湿生热”“湿热胶着,内外相引”理论再加以生活因素、生物化学因素等影响而建立,大致可概括为“内外湿热+脾肾亏虚+致病因子”的多因素病证结合造模。气虚阳损可见寒湿,寒湿证动物模型可通过糖皮质激素等抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴靶向病理联合中医寒湿“内生+外感”病因建立。

2 肾纤维化病理模型

肾纤维化发生发展机制复杂,涉及多细胞及多条细胞信号通路,其动物模型的制备方式多样。胡安康等^[39]通过大鼠肾大部分切除 (Platt 法) 和腺嘌呤 (Yokozawa 法) 灌胃法制备肾衰竭模型,两组大鼠肾均见局灶性间质纤维化,伴大量淋巴和单核细胞的浸润。麻志恒等^[40]成功复刻 5/6 肾切除慢性肾纤维化小鼠模型,可见肾小球明显肿大、增生,系膜细胞增殖变大变厚,局部粘连和硬化,基底膜增宽明显,肾小管管腔不完整,有蛋白管型,胶原纤维增生。李艺文等^[41]单侧输尿管结扎大鼠后,大鼠肾盂扩张、皮质变薄,上皮标志物 E-cadherin 表达下降,肌成纤维细胞标志 α -SMA 表达增加,EMT 形成,提示肾纤维化模型成功。Han 等^[42]用环孢素 (30 mg/kg) 灌胃配合低盐饮食建立环孢素肾毒性小鼠模型,造模后小鼠体重减轻,肾功能下降,肾小球基底膜增厚、肾小管扩张,空泡化或萎缩。高健^[43]通过单侧肾切除加阿霉素尾静脉注射制作大鼠肾小

球硬化模型,模型组可见肾小球局灶节段性肾小球硬化,肾小球毛细血管内皮细胞和足细胞肿胀、足突融合消失,加重病理进展,最终致肾纤维化。多项实验研究采用链脲佐菌素均成功制备糖尿病肾病肾纤维化模型,方便稳定且对组织器官的毒性小,相对安全,实验动物的死亡率小^[44-47]。

综上,肾纤维化造模方式多样,主要基于其病理变化可通过肾大部分切除、单侧输尿管结扎等外科手术方法及腺嘌呤、环孢素 A 灌胃,阿霉素尾静脉注射、链脲佐菌素腹腔注射等化学方法造成肾功能和结构的损害,最终导致肾纤维化。

3 “气虚湿瘀”肾纤维化模型造模方法

气虚无力推动运化水湿,水液输布代谢障碍可致水湿停滞,湿饮停聚,客邪再至内外相引,故病湿浊。湿浊阻滞气机加之热伤阴损络、寒凝络阻,使血瘀加重,湿瘀又可耗伤人体正气,故气虚湿瘀相互影响,互为因果。

目前并无气虚湿瘀型肾纤维化造模先例,基于以上气虚血瘀、湿热、寒湿证及肾纤维化造模方法,总结气虚湿瘀型肾纤维化模型可通过劳则气耗或饥则气损联合内外湿邪及多因素破坏肾结构及功能的原理制备,具体造模方法见表 1。

4 “气虚湿瘀”肾纤维化模型评价

4.1 宏观表征

动物模型所指宏观表征常涵盖习性、一般生活状态、生命体征、外观形态及舌象等多个方面^[48]。气虚运化失常可见饮食减少、体重下降以及消瘦等症状。气为“神之母”,气充则神明,气虚则神衰,故气虚可见精神倦怠、眼光无神、活动性差。脾气亏虚,脾失健运,肌肉毛发失于濡养可见皮毛色暗、无光;脾气亏虚转运不利、清浊不分可见大便稀溏。气虚无力推动血行,血液瘀滞,气虚血瘀常并见,血瘀多见舌质紫暗,舌面瘀斑瘀点,实验小鼠尾部可出现不同程度的瘀紫或青斑^[49]。湿热内蕴舌苔多黄腻,熏蒸水液常见小便黄赤,湿热壅阻大肠,大肠传导失常可见大便溏泄。湿热下注而为蛋白尿,久则耗血伤阴,终致肾气匮乏,肾阳耗损,肾虚无力主水、司开合,而见尿少等症。肾阳虚衰、失于温煦见畏寒肢冷、肤色青暗、大便稀溏、体重下降等症。同时根据《中医临床诊疗术语证候部分(修订版)》、

《中药新药临床研究指导原则》概括动物模型宏观表征主要为:(1)气虚:倦怠嗜睡,精神萎靡,四肢蜷缩,活动性差,对外界刺激反应迟钝;进食量逐渐减少,消瘦,大便稀薄;皮毛色暗、蓬松无光;(2)血瘀:舌面瘀点,舌质淡紫;尾部出现不同程度瘀紫或青斑。(关于舌象分析多采用 Adobe Photoshop CS5 软件进行,选取舌面 3 点,读取像素区域 R(红色)、G(绿色)及 B(蓝色)分量值进行比较);(3)湿热:小便黄赤、量少、泡沫尿;大便溏泄或黏滞;体温不变或升高;舌苔黄厚;(4)寒湿:畏寒肢冷、倦怠乏力、食少纳呆、小便清长,肢体水肿,大便溏泄,舌苔白腻。

4.2 实验室指标

所谓“正气存内,邪不可干”,有研究表明气虚证与机体免疫能力紊乱有关,临床上气虚患者多伴有免疫功能低下,CD4⁺、CD19⁺等免疫指标及血浆免疫球蛋白 IgG、IgA 下降^[50-52]。2021 年国际血瘀证诊断指南^[53]将血流动力学、血液流变学、血小板功能、凝血功能、纤溶功能列为血瘀证的主要诊断标准。血瘀证血液流变学特征主要包括浓、黏、凝、聚四个方面,体现在血液黏度增高、血小板黏附率增高、凝血时间缩短、纤维蛋白原含量增高等。Ran 等^[54]采用血液流变学指标评价血瘀证大鼠模型,血瘀证大鼠的全血黏度和血浆黏度较正常大鼠显著增加。

钟云良等^[55]综述见肾系疾病湿热证与感染之间存在一定的相关性,湿热证 C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)水平明显高。此外,慢性肾病湿热病理可表现蛋白尿、血尿、胆固醇血症、氮质潴留、血流变异常等^[56]。李威莹等^[57]得出脾胃湿热证模型评价多涉及血糖血脂、氧化应激、炎症细胞、水通道蛋白等指标。陈佳美等^[58]制定了湿热证动物的模型评价指征,通过评估氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等氧化指标,IgM、IgG、CD4⁺T、CD8⁺T 等免疫指标,CRP、TGF-α、IFN-γ、IL-6 等炎症指标,水通道蛋白(AQP2、AQP3、AQP4)等水液代谢相关指标进行评价。糖尿病肾病寒湿证可见血清 MCP-1、IL-6 等炎症因子升高^[59],在肾阳气虚寒湿证中血清皮质醇及三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)下降^[34]。此外,血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、尿 NAG 酶(NAG)、尿蛋白/肌酐比值升高,eGFR 下降是 CKD 的主要表现。

表 1 气虚湿瘀型肾纤维化模型构建方法

Table 1 Method for constructing kidney fibrosis model of qi deficiency and dampness stasis type

	气虚血瘀 Qi deficiency and blood stasis	气虚湿盛 Qi deficiency and dampness		肾纤维化(手术/化学) Renal fibrosis (surgery/chemistry)
		湿热 Damp and hot	寒湿 Cold-dampness	
病理造模 Pathological modeling	1. 阿霉素腹腔注射联合丙基硫氧嘧啶灌胃 1. Intraperitoneal injection of adriamycin combined with oral administration of propylthiouracil	1. 大肠杆菌 1. <i>Bacillus coli</i>	1. 糖皮质激素 1. Glucocorticoid	1. 5/6 肾切除 1. 5/6 Renal resection
	2. 环磷酰胺腹腔注射 2. Intraperitoneal injection of CTX	2. 水杨酸 2. Salicylic acid	/	2. 单侧输尿管结扎 2. Unilateral ureter obstruction
	3. 博来霉素气管注射 3. Intratracheal injection of bleomycin	3. 克林霉素磷酸酯 3. Clindamycin phosphate	/	3. 腺嘌呤灌胃 3. Oral administration of adenine
	4. 利血平肌肉注射 4. Intramuscular injection of reserpine	4. 鼠伤寒沙门氏菌 4. <i>Salmonella typhimurium</i>	/	4. 低盐饮食+环孢素灌胃 4. Low salt diet + oral administration of CsA
	/	5. 血清白蛋白+大肠杆菌 5. Serum albumin+ <i>Bacillus coli</i>	/	5. 单侧肾切除+阿霉素尾静脉注射 5. Unilateral ureter obstruction+tail vein injection of adriamycin
	/	6. 血清白蛋白+葡萄球菌肠毒素 6. Serum albumin + staphylococcal enterotoxin	/	6. 链脲佐菌素腹腔注射 6. Intraperitoneal injection of streptozotocin
病因造模 Etiological modeling	1. 力竭游泳 1. Exhaustive swimming	1. 高糖高脂+游泳 1. High-sugar and high-fat diet + swimming	1. 年老动物 1. Aged animal	/
	2. 睡眠剥夺 2. Sleep deprivation	2. 高蛋白饲料+糖水+酒+恒温恒湿+花生油 2. High protein feed + sugar water + constant temperature and humidity + peanut oil	2. 寒湿环境 2. Cold-damp environment	/
	3. 疲劳跑步 3. Tired running	3. 高蛋白饲料+糖水+酒+恒温恒湿+番泻叶 3. High protein feed+sugar water+alcohol + constant temperature and humidity + folium sennae	3. 冷水游泳力竭+寒湿环境 3. Cold water swimming exhaustion + cold-damp environment	/
	4. 饥饿+力竭游泳 4. Hunger + exhaustive swimming	4. 高蛋白饮食+恒温恒湿+隔日灌服白酒+跑步 4. High protein feed + constant temperature and humidity+alcohol+run	4. 寒湿环境+寒凉饮食+高脂饲料 4. Cold-damp environment+cold diet+high-fat diet	/
	5. 耗气破气+饥饱失常 5. Exhausting, dissipating qi +irregular diet	/	/	/

注:各因素选其一组合进行“气虚湿瘀肾纤维化造模”。
Note. Each factor selects one combination to construct kidney fibrosis model of “qi deficiency and dampness stasis type”.

4.3 病理表现

肾固有细胞凋亡,炎细胞浸润,肌成纤维细胞异常增殖,ECM 过度沉积最终形成肾纤维化,主要病理表现是肾小球的硬化、肾小管间质的纤维化以及肾内血管的硬化或堵塞等。李春庆等^[56]综述各医家研究,认为系膜细胞增生和基质增多、纤维素

样坏死及炎细胞浸润是肾小球疾病湿热证的特异性表现。寒湿证可表现为系膜细胞增生,小管上皮空泡样变,肾间质炎细胞浸润^[60]。局灶增生硬化、肾小球肥大在慢性原发性肾小球疾病气虚证中多见^[61]。血瘀证主要表现为胶原纤维增生、毛细血管襻内微血栓形成^[62]。

综上,气虚湿瘀肾纤维化的模型评价标准主要涉及宏观表征、实验室指标以及病理改变 3 个方面,宏观表征主要表现为气虚、血瘀与湿热、寒湿证的

症状与体征;化学指标与病理改变通过现代分析检测技术,明确疾病引起的微观改变,将评价指标量化,具体评价标准见表 2。

表 2 气虚湿瘀型肾纤维化模型评价标准

Table 2 Evaluation criteria of kidney fibrosis model of qi deficiency and dampness stasis syndrome		
指标类型 Indicator type		具体表现 Specific description
肾功能指标 Renal function	实验室指标 Laboratory indicators	血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、尿 NAG 酶(NAG)、尿蛋白/肌酐比值升高,eGFR 下降 Blood creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), urinary NAG enzyme (NAG), urinary protein / creatinine ratio were increased, and eGFR were decreased
	影像学 Medicalimageology	肾变小或弥漫性病变 Small or diffuse lesions of the kidney
		进食量逐渐减少、体重减轻 Food intake decreases gradually and body mass decreases
气虚(脾肾) Qi deficiency (spleen and kidney)	宏观表征 Macroscopic characterization	精神萎靡、倦怠嗜睡、四肢蜷缩、活动性差、对外界刺激反应迟钝 Mental depression, tiredness and lethargy, limbs curling up, poor mobility and slow response to external stimuli
		皮毛色暗、蓬松无光 Fur is dark and dull
		大便稀薄 Thin stool
	实验室指标 Laboratory indicators	免疫指标:CD4 ⁺ 、CD19 ⁺ 、血浆免疫球蛋白 Ig G、Ig A 下降 Immune index: CD4 ⁺ , CD19 ⁺ , plasma immunoglobulin IgG, IgA were decreased
	病理表现 Pathological	肾小球硬化、小管萎缩 Glomerular sclerosis and tubular atrophy 肾组织凋亡细胞增多 Apoptotic cells increased in renal tissue
血瘀 Blood stasis	宏观表征 Macroscopic characterization	舌面瘀点、舌下脉络紫暗、尾部出现不同程度瘀紫或青斑 Tongue surface is petechiae, the sublingual vein is dark purple, and the tail appears different degrees of purple or green spots
		肾血流指数升高 Renal blood flow index was increased
	实验室指标 Laboratory indicators	血流动力学改变:全血粘度切变率(WBV)、血浆粘度(PV)、红细胞压积(HCT)升高 Hemodynamic changes: whole blood viscosity shear rate (WBV), plasma viscosity (PV) and hematocrit (HCT) were increased
	病理表现 Pathological	胶原纤维增生 Collagen fiber proliferation
	宏观表征 Macroscopic characterization	小便黄赤、量少、泡沫尿 Yellow and red urine, little urine, foam urine 体温不变或升高 Body temperature unchanged or increased
湿热 Damp and hot		舌苔黄腻 Yellow and greasy of tongue
	实验室指标 Laboratory indicators	血糖血脂:血糖升高或不变,总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)升高 Blood glucose and lipid: Blood glucose was increased or unchanged, and total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein (LDL-C) were increased
		氧化指标:血清超氧化物歧化酶(SOD)降低、丙二醛(MDA)升高 Oxidation index: decrease of serum superoxide dismutase (SOD) and increase of malondialdehyde (MDA)
	病理表现 Pathological	炎性指标:血 C 反应蛋白(CRP)、白介素 6(1L-6)升高 Inflammatory index: blood C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (1L-6) were increased
		水液代谢:尿液水通道蛋白(AQP2 与 AQP4)升高 Water-fluid metabolism: AQP2 and AQP4 were increased 肾炎细胞浸润 Renal inflammatory cell infiltration

续表2

	指标类型 Indicator type	具体表现 Specific description
寒湿 Cold-dampness	宏观表征 Macroscopic characterization	畏寒肢冷、倦怠乏力、食少纳呆、小便清长、肢体水肿、大便溏泄 Chills and cold limbs, tired and weak, eating less, clear and long urine, body edema, loose stool
	实验室指标 Laboratory indicators	MCP-1、IL-6 升高,血清皮质醇、三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)下降 MCP and IL-6 were increased, serum cortisol, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were decreased
	病理表现 Pathological	系膜细胞增生,炎细胞浸润 Mesangial cell hyperplasia and infiltration of inflammatory cells

注:指标至少满足一半。
Note. At least half of the indicators are met.

5 总结与展望

“病证结合”动物模型以中医理论为基础,要求不仅符合西医各种疾病的病理特征,具备与临床疾病相似的演变和发展过程,而且要与中医临床病证特点相结合,是中医药基础研究的重要手段。

气虚湿瘀型病证结合肾纤维化的造模方法基于中医病因并结合西医病理制备,可通过肾大部分切除、单侧输尿管结扎等外科手术方法或腺嘌呤、环孢素 A 灌胃、阿霉素尾静脉注射、链脲佐菌素腹腔注射等化学方法建立西医肾纤维化模型,结合饥饿、力竭游泳、疲劳跑步、睡眠剥夺、高糖高脂饮食、外湿环境、灌服白酒、注射药物、选择年老体虚动物等单一或者复合手段建立气虚湿瘀模型,此模型同时满足病证特征,符合中医与现代医学理论,具有可行性。此外,模型评价从疾病与证候分而论之,将中医临床表现与西医微观指标结合,多维度、标准化、具体化。但是本证候模型无先例,造模中考虑条件众多,需下一步实验验证。制备稳定有效,成本低,操作简便的气虚湿瘀型肾纤维化模型,可为气虚湿瘀型肾纤维化的研究提供有效的模型支持,并进一步促进其基础及临床研究,更有效地发挥中医药在肾纤维化中的治疗作用。

参考文献:

[1] Robinson NB, Krieger K, Khan FM, et al. The Current state of animal models in research; a review [J]. Int J Surg, 2019, 72: 9-13.

[2] 胡洪贵, 齐振强, 李伟. 李伟中西医结合治疗慢性肾脏病经验撷菁 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 260-262.

[3] 林家茂, 郭伟星, 王营, 等. 慢性心力衰竭心气虚兼血瘀水肿证大鼠模型的建立与整合判定 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1457-1462.

[4] 罗泽飞, 苏旭春, 孔嘉欣, 等. 黄芪多糖对环磷酸腺苷导致大鼠气虚血瘀证的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016(1): 30-32.

[5] 张玉昆, 冯月男, 卞敬琦, 等. 丹参饮对气虚血瘀模型大鼠的血小板生物学 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 848-851,

858.

[6] 郑翔, 郭勇, 李妍. 乳腺癌气虚血瘀证小鼠模型的建立及益气活血法的干预研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(10): 849-855.

[7] 金莉, 刘鲁明. 小鼠脾虚血瘀动物模型的建立 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(6): 352.

[8] 钟森杰, 李琳, 胡思远, 等. 中医病因型证候模型建立的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2): 310-314.

[9] 扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血大鼠模型表征及血液流变学研究瘀 [J]. 天津中医药, 2007, 24(2): 138-141.

[10] 郝婷婷, 郭浩, 刘建勋, 等. 2 种分析方法对睡眠剥夺大鼠血瘀证评价的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1880-1885.

[11] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229-234.

[12] 甘加宽, 樊憬懿, 王冬芝, 等. 睡眠剥夺诱导小鼠气虚证模型的方法研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2016, 18(10): 1801-1806.

[13] 李雅君, 程嘉艺. 纳豆+甘麦大枣加味汤对气虚血瘀证大鼠血液流变学和凝血功能的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(1): 13-16.

[14] 王晚霞, 李荣亨. 气虚血瘀证患者血黏度与心功能相关性研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(1): 80-81.

[15] 彭桂原, 李松键, 杨黎, 等. 气虚血瘀型 Corti 器毛细胞损伤动物模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49): 7384-7390.

[16] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.

[17] 杨宽芝, 包崑, 王立新, 等. 通脉口服液对慢性肾炎气虚血瘀证大鼠模型的药效学研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(4): 332-336.

[18] 任建勋, 尹春园, 史雅红, 等. 睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 428-434.

[19] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘佩, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 602-609.

[20] 戴姣, 王雷, 龚桂姿, 等. 多因素整合诱导证属“气虚血瘀”型肺动脉高压大鼠模型的建立 [J]. 中医药导报, 2018, 24(17): 19-22.

[21] 杜恒. 大鼠肾炎湿热证血尿模型的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.

[22] 齐文杰, 张淑文, 王红, 等. 急性重症胰腺炎湿热证动物模型建立初探 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(2): 47

- 50.
- [23] Cao HX, Sun H, Jiang XG, et al. Comparative study on the protective effects of Yinchenhao Decoction against liver injury induced by alpha-naphthylisothiocyanate and carbon tetrachloride [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(3): 204-209.
- [24] 韦嵩, 劳绍贤, 黄志新, 等. 脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 AQP3、AQP4 基因的表达 [J]. 中国中医急症, 2008, 17(3): 357-358, 384.
- [25] 王瑞琼, 郭超, 王志旺, 等. 内外合邪诱导抗生素相关性大肠湿热证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(1): 5-10.
- [26] 吴仕九, 杨运高, 杨钦河, 等. 温病湿热证动物模型的研制及清热祛湿法机理的探讨 [J]. 中国中医药科技, 1999, 6(2): 65-67, 5.
- [27] 廖荣鑫, 刘小虹, 许仕杰. 脾胃湿热证大鼠模型血清蛋白质组学差异表达研究 [J]. 新中医, 2018, 50(7): 15-18.
- [28] 季旭明, 庄凌云, 崔有利, 等. 三仁汤对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1287-1289, .
- [29] 王婷, 郑锋玲, 骆欢欢. 岭南温病湿热证小鼠模型的建立及肠道菌群的研究分析 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6): 1361-1365.
- [30] 周韦青, 郑裕华, 陈颂, 等. 连翘对岭南湿热模型小鼠的作用及其肠道菌群变化的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 678-685.
- [31] 熊宁宁, 徐长照, 余江毅, 等. 家兔肾炎湿热证模型的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 1991, 18(4): 42-43.
- [32] 刘晓鹰, 王文广, 杜恒. 两种肾炎湿热证血尿模型的比较 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(2): 122-124.
- [33] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [34] 刘同林. 自然衰老 SD 大鼠肾阳虚模型的研究 [D]. 广东: 广州中医药大学, 2005.
- [35] 吴君, 韩芸, 梁伟玲, 等. 老龄大鼠尿量、离子浓度及皮质醇的变化 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(5): 515-516.
- [36] 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 [J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(5): 338-341.
- [37] 雷鸣, 周杰, 王美元, 等. 腰痹舒胶囊对寒湿痹阻腰痛模型大鼠血液流变学等相关指标的影响 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(11): 1936-1939.
- [38] 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 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(5): 75-78.
- [39] 胡安康, 朱孝荣, 袁红花. 慢性肾衰竭大鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 34-38.
- [40] 麻志恒, 倪健俐, 钟利平, 等. Smad3 基因敲除对 5/6 肾切除慢性肾脏纤维化小鼠模型的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(1): 189-194, I0006, I0007.
- [41] 李艺文, 唐志书, 张珍, 等. 异鼠李素抗 UUO 大鼠肾脏纤维化作用及机制 [J]. 中成药, 2021, 43(11): 3172-3177.
- [42] Han C, Jiang YH, Li W, et al. Astragalus membranaceus and Salvia miltiorrhiza ameliorates cyclosporin A-induced chronic nephrotoxicity through the “gut-kidney axis” [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113768.
- [43] 高健. JAK/STATs 信号转导通路在阿霉素肾纤维化大鼠模型中的研究及苦参碱对 STAT3 的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [44] 石光, 石岩, 孙晓波, 等. 糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7): 171-173.
- [45] 权晓娟, 梁春联, 孙明珠, 等. 吡非尼酮对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病大鼠肾纤维化的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(3): 215-218, 224.
- [46] 陈亚坤, 穆霖, 邢玲玲. 大黄酸对糖尿病大鼠肾脏纤维化的作用机制 [J]. 河北医药, 2022, 44(14): 2186-2188.
- [47] 逯凤肖. 二氢杨梅素对糖尿病小鼠降糖作用的研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [48] 扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血瘀证大鼠表征观察与分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(12): 807-810.
- [49] 姜晓西, 王凤, 张会永, 等. 气虚血瘀证动物模型研究现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(11): 68-74.
- [50] 宋燕娟, 陈丽, 梁凤霞, 等. 针刺治疗气虚证作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 133-136.
- [51] 李宗源, 郝莉雨, 孙建辉, 等. 三种气虚证动物模型的比较与评价 [J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1773-1778.
- [52] 陈潇. 健脾清化方干预 CKD3 期脾肾气虚湿热型患者微炎症状态及免疫功能的临床研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [53] 世界中医药学会联合会. 国际血瘀证诊断指南 (2021-12-16) [J]. 世界中医药, 2022, 17(1): 31-36.
- [54] Ran N, Pang Z, Guan X, et al. Therapeutic effect and mechanism study of *Rhodiola wallichiana* var. *cholaensis* injection to acute blood stasis using metabolomics based on UPLC-Q/TOF-MS [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1514845.
- [55] 钟云良, 谢桂权. 原发性肾综合征湿热证与炎症因子相关性的探讨 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5): 25-26.
- [56] 李春庆, 孙伟, 周栋. 慢性肾病学湿热证实验研究进展 [J]. 中医药导报, 2010, 16(11): 117-119.
- [57] 李威莹, 吴威, 孙凡雅, 等. 脾胃湿热证动物模型的构建与评价研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(11): 77-82.
- [58] 陈佳美, 朱青, 朴胜华, 等. 湿热证动物模型造模方法的文献挖掘研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1399-1404.
- [59] 龚蕾丽. 糖尿病肾病血清炎症因子与中医证型的相关性研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [60] 张萌萌, 张新雪, 郑鹏飞, 等. 阿霉素联合雌二醇诱导慢性肾脏病肾阳虚证大鼠模型的建立与评价及真武汤干预作用研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2021, 23(11): 3866-3877.
- [61] 崔赵丽. 气虚、阳虚体质与慢性原发性肾小球疾病中医证候及 TGF- β 相关性分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [62] 庞欣欣, 彭紫凝, 邢玉凤, 等. 基于病证结合探讨血瘀证糖尿病肾病大鼠肾损害与内质网应激的关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 74-81.

[收稿日期] 2022-12-28