

马小娟,马文礼,王丽新. 不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 64-74.
Ma XJ, Ma WL, Wang LX. Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 64-74.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.01.008

不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型的影响

马小娟^{1,2},马文礼^{1,2},王丽新^{1,2*}

(1. 宁夏医科大学 医学院,银川 750004;2. 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室,银川 750004)

【摘要】 目的 通过研究不同造模周期对羟基脲致肾阳虚动物模型相关指标的影响,得出最佳造模时长,并对模型稳定性进行评价,为温补肾阳治疗肾阳虚证提供稳定的动物模型。**方法** 用 30 mg/mL 羟基脲混悬液灌胃,300 mg/kg 体重,每日 1 次,在灌胃的第 7、14、21、28 天分别对动物模型一般情况、肾阳虚相关生化指标、脏腑形态学等方面进行研究,得出最佳造模周期。**结果** 羟基脲致肾阳虚大鼠在羟基脲灌胃第 7 天,能量代谢:大鼠体温、肾 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性显著性降低、血清中 cAMP、cAMP/cGMP 比值均呈显著性降低($P < 0.05$),大鼠四肢末端及尾部温度、肾 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶与总 ATP 酶活力、cGMP 均无显著性差异($P > 0.05$);神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统均无显著性差异。在羟基脲灌胃第 14 天,能量代谢:血清中 cGMP 显著性上升($P < 0.05$),总 ATP 酶活力显著性下降($P < 0.05$),大鼠四肢末端及尾部温度变化、肾 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活力均无显著性差异($P > 0.05$);神经内分泌系统:血清 T、T4 均显著降低($P < 0.05$),尿 17-OH-CS、血清 T3 均无显著性差异($P > 0.05$);泌尿生殖系统:肾、睾丸均出现结构性病理变化,肾指数显著性下降($P < 0.05$);免疫功能:胸腺出现结构性病理变化,脾指数尚未出现显著降低($P > 0.05$)。在羟基脲灌胃第 21 天,能量代谢:大鼠四肢末端及尾部温度、肾 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活力均显著降低($P < 0.05$);神经内分泌系统:尿 17-OH-CS、血清 T3 含量均呈显著降低($P < 0.05$);在羟基脲灌胃第 28 天,免疫功能:脾指数显著降低($P < 0.05$),胸腺病理变化显著且不可逆,泌尿生殖系统:肾、睾丸的病理变化显著且不可逆。能量代谢、神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统各指标在第 28 天仍呈现下降趋势,与 21 d 相比,能量代谢、神经内分泌系统、泌尿生殖系统各指标均无显著性差异($P > 0.05$)。**结论** 羟基脲致肾阳虚大鼠模型各个检测指标出现显著性差异的时间段不尽相同,能量代谢、神经内分泌系统、免疫功能、泌尿生殖系统等多方面表现出显著性差异,最佳成模时间为 28 d。

【关键词】 羟基脲;肾阳虚;动物模型;造模周期

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 01-0064-11

Effect of different modeling periods on hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model

MA Xiaojuan^{1,2}, MA Wenli^{1,2}, WANG Lixin^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China. 2. Ningxia Minority Medicine Modernization Ministry of Education Key Laboratory, Yinchuan 750004)
Corresponding author: WANG Lixin. E-mail: wxy2008.oye@163.com

【Abstract】 Objective By studying the effects of different modeling cycles on related indicators in a hydroxyurea-induced kidney-yang deficiency animal model, the optimal modeling time was obtained. The stability of the model was evaluated. We provide method for creating a stable animal model of warming and tonifying kidney-yang to treat yang-deficiency syndrome. **Methods** Rats were gavaged with 30 mg/mL hydroxyurea suspension (300 mg/kg body weight)

[基金项目] 宁夏教育厅宁夏医科大学中医学一流学科项目(NXYLXK2017A06),宁夏自然科学基金资助项目(2018AAC03082)。
Funded by Ningxia Education Department Ningxia Medical University First-Class Discipline Project of Traditional Chinese Medicine (NXYLXK2017A06), Ningxia Natural Science Fund Project (2018AAC03082)。
[作者简介] 马小娟(1994—),女,在读研究生,研究方向:中医药治疗皮肤病。Email: mxj18795182325@163.com
[通信作者] 王丽新(1981—),女,博士,副教授,研究方向:中医外科学。Email: wxy2008.oye@163.com

once daily for 28 days. On the 7th, 14th, 21st, and 28th days of gavage, the general condition, biochemical indexes related to kidney-yang deficiency, and the morphology of the internal organs were examined to determine the optimal modeling cycle. **Results** On the 7th day of hydroxyurea gavage, the energy metabolism of rats with kidney-yang deficiency induced by hydroxyurea was assessed, and their body temperature, activity of kidney $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, serum content of cAMP, and cAMP/cGMP ratio were significantly decreased ($P < 0.05$). There were no significant changes in the rats' neuroendocrine systems, immune functions, or urogenital systems. On the 14th day of hydroxyurea administration, serum cGMP increased significantly ($P < 0.05$) and total ATPase activity decreased significantly ($P < 0.05$). There were no significant changes in the temperature of the extremities or tails of the rats or kidney $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activity ($P > 0.05$). Levels of the neuroendocrine system indicators serum T and T4 were significantly decreased ($P < 0.05$). In the urogenital system, there were structural pathological changes to the kidney and testis, and the kidney index decreased significantly ($P > 0.05$). On the 21st day of hydroxyurea gavage, the temperature of the extremities and tails of rats and the kidney activity of $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were significantly decreased ($P < 0.05$). The neuroendocrine system indicators urine 17-OH-CS and serum T3 levels were significantly decreased ($P < 0.05$). On the 28th day of hydroxyurea gavage, the immune function indicator, the spleen index, decreased significantly ($P < 0.05$), and thymus pathological changes were significant and irreversible. In the urogenital system, pathological changes to the kidney and testis were significant and irreversible. Energy metabolism, neuroendocrine system, immune function, and urogenital system indexes still showed decreasing trends on day 28, but there were no significant differences in energy metabolism, neuroendocrine system, or urogenital system indicators compared with on day 21 ($P > 0.05$). **Conclusions** We found significant differences among the modeling time periods for each energy metabolism, neuroendocrine, immune, and urogenital function index, and other aspects, of a hydroxyurea-induced rat model of kidney-yang deficiency. The best modeling time was 28 days.

[Keywords] hydroxyurea; kidney-yang deficiency; animal model; modeling cycle

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

肾阳虚证是中医多种疾病的常见证型之一,而阳虚证动物模型是中医证型研究的必需条件,既往对肾阳虚动物模型的研究较为充分,但是羟基脲灌胃造模提及的较少。羟基脲为抗肿瘤药,但可造成一定的肾损伤和睾丸萎缩,使患者的免疫机能受到抑制,从而出现一系列的虚损症状,是通过对核苷酸代谢的抑制、DNA 合成的抑制,使蛋白质代谢发生相应的改变。关于羟基脲造模使用的灌胃剂量、造模时间各文献有所不同,同时对模型的客观评价标准、模型稳定性的论述较少,缺乏统一的量化标准,为进一步的研究带来了不确定性和一定程度的困惑。为了解决这一问题,建立更加稳定的肾阳虚动物模型,本研究旨在对不同造模周期羟基脲所致肾阳虚动物模型的一般情况、相关生化、脏腑形态学等方面的变化,来确定最佳的造模周期;通过观察模型成功后自然恢复期以上指标的变化,来判断模型的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康的雄性 SD 大鼠 64 只,8 周龄,SPF 级动物,因本实验对所选用动物体重需进行严格把控,

故参考文献^[1-9],本实验所确定的实验动物体重范围为体重 180 ~ 220 g,购买于宁夏医科大学实验动物中心【SCXK(宁)2020-0001】实验条件:温度(22 ~ 24℃)、湿度(45% ~ 50%),昼夜各半更替照明,大鼠饮水及摄食自由,饲养于宁夏医科大学动物实验室【SYXK(宁)2020-0001】。实验研究相关的内容与实验动物均已通过宁夏医科大学动物伦理委员会审查(IACUC-NYLAC-2021-187)。

1.1.2 主要试剂与仪器

羟基脲(批号:H37021289),购自山东齐鲁光华制药厂;ATP 含量试剂盒(酶法)(JL-T0633)、 $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶试剂盒货号(JL-T0659)、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶试剂盒货号(JL-T0639)、17-OH-CS(JL11045)、大鼠三碘甲状腺原氨酸、大鼠甲状腺素、大鼠环磷酸腺苷、大鼠睾酮、大鼠环磷酸鸟苷(上海江莱生物科技有限公司)(批号分别为:20220703、20220704、20220711、20220743、2022070319)。

XB220A 电子分析天平(瑞士,Precisa 公司),BP310P 型称量天平(德国,Sartorius 公司) Synergy H1 酶标仪(美国,BioTek 公司),JY98-IIIN 细胞破碎仪(中国,SCIENTZ 公司),Eclipse Ci-L 电子显微镜(日本,Nikon 公司),Centrifuge5417R 型低温高速离心机(德国,Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

选用 SPF 级 8 周龄的雄性 SD 大鼠 64 只, 体重 180 ~ 220 g, 适应性饲养 4 d 后^[10], 无不良反应后即进入实验。随机分两组: 空白对照组 (简称空白组) 32 只, 肾阳虚组 32 只 (简称模型组), 两组各分四个亚组, 分别为第 7、14、21、28 天, 每组各 8 只。

1.2.2 建立肾阳虚模型

参考文献^[11]用 30 mg/mL 羟基脲混悬液灌胃, 300 mg/kg 体重, 每日 1 次, 建立肾阳虚动物模型, 空白组予以同等剂量生理盐水灌胃。

1.2.3 样本的制备

(1) 血清样本: 在第 7、14、21、28 天分别从空白组与肾阳虚组各随机抽取 8 只大鼠, 以 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 心尖取血, 血液 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清。

(2) 尿液样本: 从空白组与肾阳虚组各随机抽取 8 只大鼠并标记, 在第 7、14、21、28 天于代谢笼中禁食不禁水, 收集并记录 24 h 尿量, 各取 1 mL 于无菌管内置于 -80℃ 冰箱冻存。

(3) 组织样本: 大鼠取血后置于冰面, 取胸腺、脾、及右侧肾、睾丸及背部脱毛区域无蓝斑皮肤用生理盐水冲洗, 脾、肾在吸水纸处理后经电子天平精密称定、记录, 分别置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 将睾丸置于睾丸专用固定液固定。将左侧肾、睾丸分装入冻存管, 保存于液氮中, -80℃ 冰箱贮存待检。

1.2.4 观察指标及测定方法

(1) 行为指标: 肾阳虚模型一般情况: 每天观察大鼠体重、四肢温度、毛发色泽、精神、尿量、活动状况分阶段对比, 根据肾阳虚模型的行为指标, 判断造模成功的最佳阶段。

(2) 体温变化: 每 7 d 用红外成像测温仪监测大鼠体温变化并记录。

(3) 血清检测: 血清 cAMP、cGMP、cAMP/cGMP; T₃、T₄、T 的表达。按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 用多功能酶标仪检测血清中以上指标的吸光度, 根据标准曲线方程计算血清中各指标的浓度。

(4) 尿 17-OHCS 同 1.2.4 中血清检测方法。

(5) 肾中 ATP 酶含量及活性检测: 称取约 0.1 g 肾组织加入研钵中, 加入 1 mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 取上清液。严格按照生化试剂盒说明书用酶标仪分别测定大鼠肾中 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶和总 ATP 酶活

性, 用微板法测定。

(6) 睾丸、胸腺、肾病理形态学观察: 将固定的组织脱水、包埋、切片 (厚度为 5 μm)、HE 染色后封片, 置于光学显微镜下观察。

(7) 脾指数与肾指数的测定: 按照公式^[12]计算各组大鼠脾与肾指数。脾指数 = 脾重量 (mg)/大鼠体重 (g); 肾指数 = 肾重量 (mg)/大鼠体重 (g)。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 软件, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐性选择 LSD, 方差不齐则使用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; 组间比较进行均数 t 检验; 对于偏态分布者采用中位数 (25%, 75%) 表示采用。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

与空白组相比, 模型组大鼠第 7 天爪温略有降低, 未见其他明显异常表现; 造模第 14 天大鼠毛色光泽欠佳, 出现竖毛, 畏寒喜暖, 四肢温低, 活动减弱, 精神萎靡, 毛色无光泽; 造模第 21 天大鼠出现怕冷、弓背蜷缩喜扎堆, 活动减弱, 精神萎靡, 耳朵颜色变淡; 造模第 28 天大鼠毛发枯槁现象严重, 出现掉毛, 活动迟缓, 四肢、尾巴及耳朵颜色变白, 舌淡胖, 大便稀等症状, 符合肾阳虚模型的表现^[13]。空白组未出现上述表现 (图 1)。

2.2 大鼠红外成像测温, 体温与肢体末端温度比较

2.2.1 体温变化比较

与空白组相比, 模型各组大鼠体温显著下降 ($P < 0.01$) (表 1)。

模型组各亚组组内比较, 除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天相比体温变化无显著性差异 ($P > 0.05$) 外, 其他两两相比较均有显著性差异 ($P < 0.01$), 但整体体温呈下降趋势 (图 2)。

2.2.2 四肢与尾巴温度比较

与空白组相比, 模型组大鼠在第 7 天时只有右上肢和尾巴的体温差异有显著性 ($P < 0.05$), 第 14 天时右上肢温度与空白组相比显著降低 ($P < 0.05$)。随造模时间的延长, 大鼠四肢末端温度呈显著性下降趋势, 在第 21、28 天时, 模型组大鼠四肢及尾巴温度显著下降, 与空白组相比, 差异具有显著性意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组大鼠肾中 ATP 酶活力比较

与同阶段的空白组相比, 模型组大鼠肾总 ATP

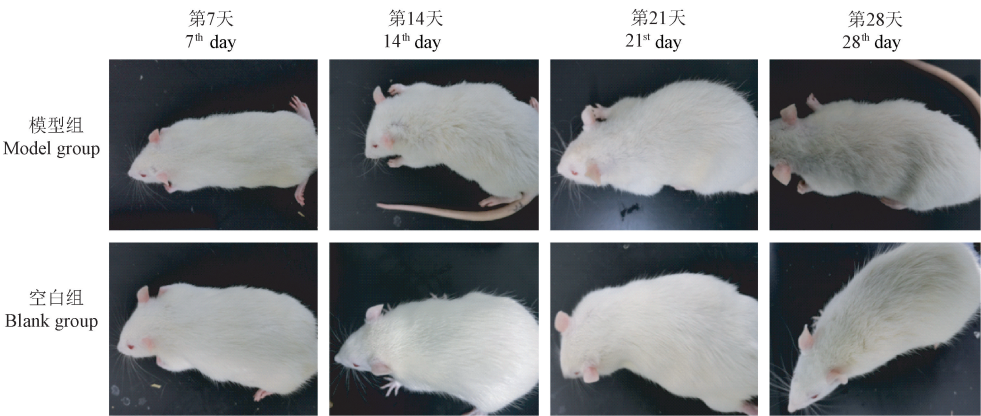


图 1 各组大鼠皮毛的变化

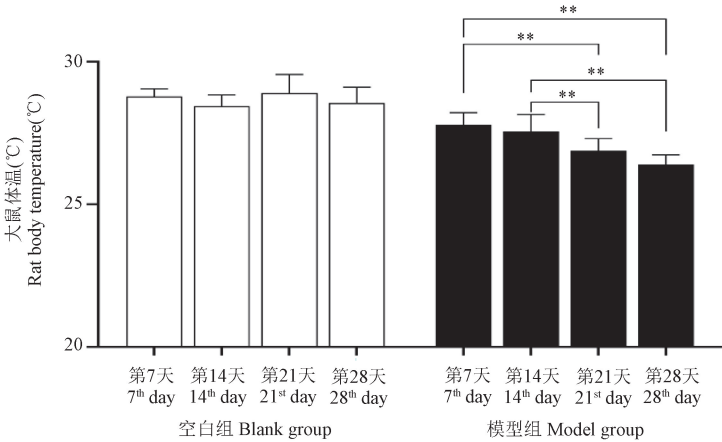
Figure 1 Changes in fur of rats in each group

表 1 各组大鼠体温变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Temperature changes of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	第 7 天(℃) 7 th day(℃)	第 14 天(℃) 14 th day(℃)	第 21 天(℃) 21 st day(℃)	第 28 天(℃) 28 th day(℃)	<i>F</i>	<i>P</i>
空白组 Blank group	28.78 ± 0.27	28.38 ± 0.51	29.10 ± 0.80	28.55 ± 0.56	1.526	0.246
模型组 Model group	27.79 ± 0.43 **	27.55 ± 0.60 **	26.88 ± 0.43 **	26.40 ± 0.34 **	9.525	0.001
<i>t</i>	4.334	2.344	5.515	7.352	—	—

注:与空白组的各亚组大鼠比较, ***P* < 0.01。(下图/表同)
Note. Compared with subgroup rats of blank group, ***P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)



注:各亚组大鼠组内相互比较, ***P* < 0.01。

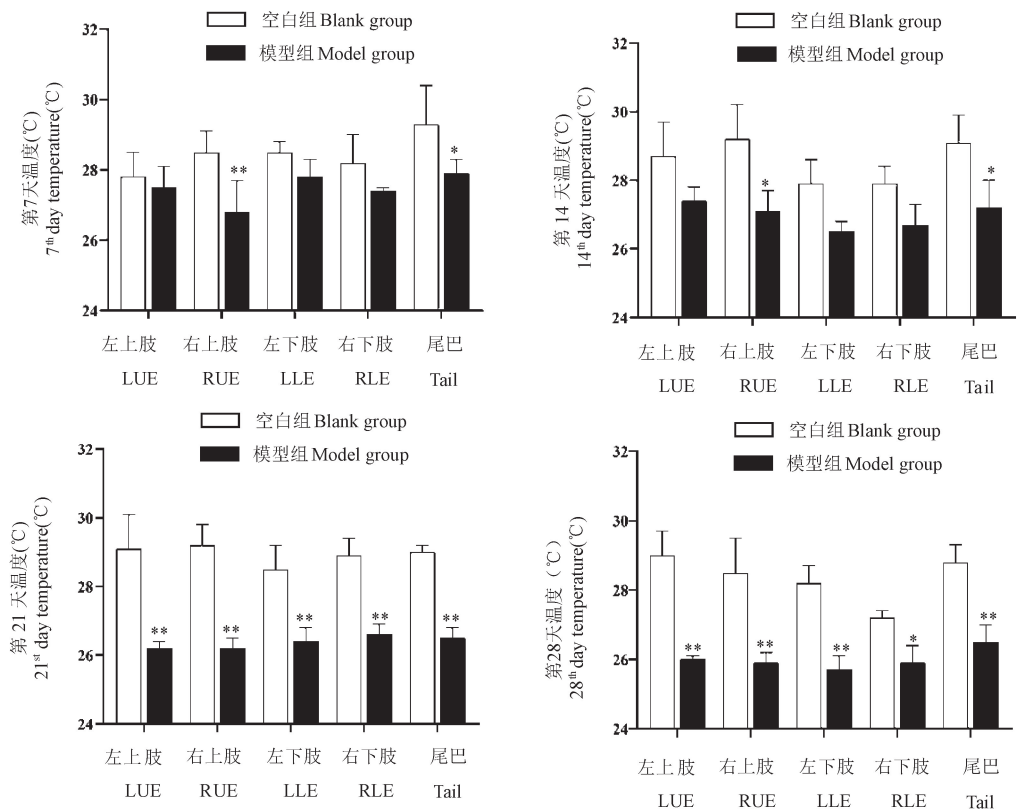
图 2 各组大鼠体温变化

Note. Compared within each subgroup of rats, ***P* < 0.01.

Figure 2 Temperature changes of rats in each group

酶活力呈稳步下降趋势,在第 14 天开始具有显著性差异(*P* < 0.05);Na⁺-K⁺-ATP 酶活力呈稳步下降趋势,在第 7 天开始具有显著性差异(*P* < 0.05);Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力呈稳步下降趋势,在第 21 天开始有显著性差异(*P* < 0.01)。以上结果提示,影响肾能量代谢的 3 种主要酶活力在肾阳虚模型中均显著性下降,但出现的时间并不完全相同:Na⁺-K⁺-

ATP 酶出现显著下降的时间最早(7 d),其次为 ATP 酶(14 d),再次为 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶(21 d),提示肾阳虚动物模型各类 ATP 酶的敏感性不同。
模型组各亚组组间比较,发现除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天总 ATP 酶下降量无显著性差异(*P* > 0.05)外,第 7 天与第 21、28 天、第 14 天与第 21、28 天总 ATP 酶均有显著性差异(*P* < 0.05),



注:与空白组的各亚组大鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图3 各组大鼠四肢及尾巴温度变化

Note. Compared with subgroup rats of blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 3 Temperature changes of limbs and tail of rats in each group

提示总 ATP 酶活力在肾阳虚造模第 14 ~ 21 天下降最快($P < 0.05$)。Na⁺-K⁺-ATP 酶在造模的各个周期均呈显著性下降($P < 0.05$),提示该酶敏感性最强。第 7 天与第 21、28 天,第 14 天与第 21、28 天 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力下降均有显著性差异($P < 0.05$),提示 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活力在肾阳虚造模第 14 ~ 21 天下降最快($P < 0.05$)(表 2)。

2.4 各组大鼠血清中 T、T₃ 和 T₄ 含量比较

普遍认为,肾阳虚雄性动物中睾酮(T)含量降低,三碘甲状腺原氨酸(T₃)、四碘甲状腺原氨酸(T₄)含量的降低可作为肾阳虚的客观指标,用来检测肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-靶腺轴的功能^[14]。与空白组相比,模型各组大鼠血清中 T、T₄ 从第 14 天开始显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),T₃ 从第 21 天开始显著下降($P < 0.01$),提示 T、T₄ 较 T₃ 更早出现下降趋势;但在模型第 7 天开始,以上指标含量已出现稳步下降趋势。

模型组各组组间两两比较,发现大鼠血清 T、T₃ 除在第 21 天与第 28 天相比无显著性差异外($P >$

0.05),在第 7、14、21、28 天的 4 个不同时间段都呈显著下降趋势($P < 0.05$),结合模型组在第 7 天时 T、T₃ 含量与空白组相比无显著性差异的情况,提示 T、T₃ 在第 14、21 天这 2 个时间段内显著下降,第 28 天仍在稳步下降,但下降趋势减缓。T₄ 除第 14 天与第 21 天之间下降无显著性差异外,其余时间段呈显著下降趋势($P < 0.05$),提示 T₄ 在不同时间段内下降程度不完全一致(表 3)。

2.5 各组大鼠血清中 cAMP, cGMP and cAMP/cGMP 含量比较

作为评价肾阳虚模型的特异性标准^[15-16] 环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)参与机体的能量代谢。

与空白组相比,模型各组大鼠血清中 cAMP 第 7 天开始呈显著降低($P < 0.01$),随时间呈稳步下降趋势;cGMP 从第 21 天开始呈显著升高($P < 0.05$),cAMP/cGMP 比值从第 7 天开始呈显著下降($P < 0.05$),提示 cAMP 最早出现下降,敏感性较强。

表 2 各组大鼠肾中 ATP 酶活性的比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g}, n=8$)

Table 2 Comparison of ATPase activity in kidney of rats in each group($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/g}, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	ATP	Na ⁺ -K ⁺ -ATP	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP
空白组 Blank group	7 th day	15.22 ± 2.95	36.90 ± 2.08	34.70 ± 1.76
	14 th day	15.49 ± 1.36	37.82 ± 1.01	34.97 ± 2.42
	21 st day	15.13 ± 2.89	36.77 ± 4.00	34.70 ± 3.88
	28 th day	16.02 ± 0.81	36.16 ± 3.07	34.15 ± 2.27
模型组 Model group	7 th day	12.90 ± 1.04	32.83 ± 0.37 *	33.23 ± 3.55
	14 th day	11.81 ± 0.39 *	27.96 ± 1.94 **	27.48 ± 4.94
	21 st day	9.21 ± 1.36 *	23.48 ± 1.94 **	21.29 ± 1.53 **
	28 th day	7.33 ± 1.86 **	18.74 ± 2.92 **	19.80 ± 2.55 **
F, P 值 F, P value	—	11.568, 0.003	26.949, 0.000	15.123, 0.001
P ₇₋₁₄ 值 P ₇₋₁₄ value	—	0.328	0.018	0.066
P ₇₋₂₁ 值 P ₇₋₂₁ value	—	0.008	0.000	0.001
P ₇₋₂₈ 值 P ₇₋₂₈ value	—	0.001	0.000	0.000
P ₁₄₋₂₁ 值 P ₁₄₋₂₁ value	—	0.038	0.026	0.021
P ₁₄₋₂₈ 值 P ₁₄₋₂₈ value	—	0.003	0.001	0.004
P ₂₁₋₂₈ 值 P ₂₁₋₂₈ value	—	0.111	0.020	0.329

表 3 各组大鼠在不同阶段血清 T、T₃ 和 T₄ 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of serum testosterone T, T₃ and T₄ levels in rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	T (pg/mL)	T ₃ (ng/mL)	T ₄ (ng/mL)
空白组 Blank group	7 th day	1435.82 ± 102.83	2.23 ± 0.29	78.95 ± 3.82
	14 th day	1426.68 ± 150.90	2.12 ± 0.46	77.74 ± 5.77
	21 st day	1447.00 ± 44.69	2.14 ± 0.28	78.51 ± 4.14
	28 th day	1452.79 ± 176.97	2.18 ± 0.27	77.72 ± 3.36
模型组 Model group	7 th day	1342.60 ± 64.33	2.32 ± 0.25	75.43 ± 5.29
	14 th day	1219.50 ± 18.88 **	1.91 ± 0.17	63.32 ± 4.13 *
	21 st day	1118.40 ± 40.20 **	1.55 ± 0.21 **	65.43 ± 5.19 **
	28 th day	1070.61 ± 59.27 **	1.45 ± 0.07 *	56.99 ± 2.22 **
F, P 值 F, P value	—	18.089, 0.001	13.385, 0.002	22.811, 0.000
P ₇₋₁₄ 值 P ₇₋₁₄ value	—	0.015	0.029	0.010
P ₇₋₂₁ 值 P ₇₋₂₁ value	—	0.001	0.001	0.001
P ₇₋₂₈ 值 P ₇₋₂₈ value	—	0.000	0.000	0.000
P ₁₄₋₂₁ 值 P ₁₄₋₂₁ value	—	0.036	0.043	0.059
P ₁₄₋₂₈ 值 P ₁₄₋₂₈ value	—	0.006	0.016	0.002
P ₂₁₋₂₈ 值 P ₂₁₋₂₈ value	—	0.267	0.538	0.046

模型各亚组组间两两比较,发现 cAMP 除第 7 天与第 14 天、第 21 天与第 28 天外,其余时间段之间均存在显著差异($P < 0.05$),结合 cAMP 在第 7 天即与空白组有显著差异,提示 cAMP 从造模第 7 天开始呈稳步下降趋势,差异具有显著性($P < 0.05$)。cGMP 在第 14、21、28 天各个时间段均呈显著上升趋势($P < 0.05$),并随着造模时间延长稳步上升。cAMP/cGMP 比值在各个时间段稳步下降,除第 21 天与第 28 天差异无显著性外($P > 0.05$),其余不同时间段间均具有显著性差异($P < 0.05$),提示 cAMP/cGMP 比值在第 21 ~ 28 天期间下降幅度变小,这种情况是否会延续一段时间直至出现病

理性平稳状态尚需进一步研究(表 4)。

2.6 脾与肾指数

作为重要的外周免疫器官,脾在调节机体免疫功能中起着重要作用。已有文献报道肾虚动物可发生脾的萎缩,影响动物免疫功能^[17]。肾作为肾虚证主要的靶器官,其重量及脏器指数能客观反映模型的成模情况。与空白组相比,模型组肾指数在不同时间段呈稳定下降趋势,第 14、21、28 天指数显著下降($P < 0.05$)。

与空白组相比,模型组脾指数在第 7 天、第 14 天呈稳步下降,在第 28 天脾指数显著降低($P < 0.01$)(表 5),提示脾损伤出现的时间较晚,肾虚

表 4 各组大鼠血清 cAMP、cGMP 和 cAMP/cGMP 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of serum cAMP, cGMP and cAMP/cGMP ineach group of rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	亚组 Name of the subgroups	cAMP(nmol/L)	cGMP(nmol/L)	cAMP/cGMP(nmol/L)
空白组 Blank group	7 th day	2. 23 ± 0. 18	0. 11 ± 0. 04	21. 17 ± 6. 39
	14 th day	2. 07 ± 0. 56	0. 16 ± 0. 07	13. 46 ± 4. 22
	21 st day	1. 99 ± 0. 29	0. 13 ± 0. 03	15. 47 ± 6. 39
	28 th day	1. 99 ± 0. 12	0. 16 ± 0. 01	12. 98 ± 2. 33
模型组 Model group	7 th day	1. 44 ± 0. 12 ^{**}	0. 11 ± 0. 01	13. 04 ± 2. 23 ^{**}
	14 th day	1. 15 ± 0. 05 ^{**}	0. 15 ± 0. 005	7. 80 ± 0. 56 ^{**}
	21 st day	0. 96 ± 0. 05 ^{**}	0. 18 ± 0. 003 [*]	5. 30 ± 0. 06 ^{**}
	28 th day	0. 82 ± 0. 08 ^{**}	0. 20 ± 0. 02 [*]	4. 15 ± 0. 99 ^{**}
<i>F, P</i> 值 <i>F, P</i> value	—	33. 725951, 0. 000	31. 507, 0. 000	29. 894, 0. 000
<i>P</i> _{7~14} 值 <i>P</i> _{7~14} value	—	0. 124	0. 008	0. 001
<i>P</i> _{7~21} 值 <i>P</i> _{7~21} value	—	0. 040	0. 001	0. 000
<i>P</i> _{7~28} 值 <i>P</i> _{7~28} value	—	0. 012	0. 000	0. 000
<i>P</i> _{14~21} 值 <i>P</i> _{14~21} value	—	0. 041	0. 014	0. 040
<i>P</i> _{14~28} 值 <i>P</i> _{14~28} value	—	0. 024	0. 000	0. 007
<i>P</i> _{21~28} 值 <i>P</i> _{21~28} value	—	0. 232	0. 036	0. 293

动物模型可影响脾的形态、功能和机体的免疫功能。

2.7 各组大鼠 24 h 尿量与 17-OH-CS 含量

17-OH-CS 反映下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能。与空白组相比,模型组尿量与 17-OH-CS 含量呈下降趋势,在第 7、14 天无显著性差异($P > 0. 05$),第 21、28 天尿量与 17-OH-CS 含量显著降低($P < 0. 05$),提示模型大鼠存在下丘脑-垂体-肾上腺轴功

能低下(见表 6)。

2.8 各组大鼠肾、睾丸、胸腺的病理结构观察

2.8.1 各组大鼠睾丸组织 HE 染色后病理变化

空白组睾丸组织中生精小管数量丰富、分布均匀,管壁上皮可见数量丰富的生精细胞、支持细胞,细胞形态正常,管腔内可见精子,上皮外均匀、界膜完整,管腔饱满;均匀排列的间质细胞,未见异常改变。

表 5 各组大鼠脾与肾指数($\bar{x} \pm s, n=32$)

Table 5 Comparison of spleen and kidney index in rats of group($\bar{x} \pm s, n=32$)

分组 Groups	第 7 天 7 th day		第 14 天 14 th day		第 21 天 21 st day		第 28 天 28 th day	
	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)	肾指数(%) Kidney index (%)	脾指数(%) Spleen index (%)
空白组 Blank group	4. 86 ± 0. 49	2. 7 ± 0. 04	4. 72 ± 0. 13	2. 3 ± 0. 00	4. 61 ± 0. 16	2. 60 ± 0. 04	4. 75 ± 0. 07	2. 70 ± 0. 01
模型组 Model group	4. 46 ± 0. 20	2. 5 ± 0. 06	4. 27 ± 0. 22 [*]	1. 8 ± 0. 04	3. 98 ± 0. 05 ^{**}	2. 20 ± 0. 03	3. 91 ± 0. 05 ^{**}	1. 80 ± 0. 00 ^{**}

表 6 各组大鼠 24 h 尿量及 17-OH-CS 含量比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Comparison of 24 h urine volume and 17-OH-CS content in urine in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组 Groups	第 7 天 7 th day		第 14 天 14 th day		第 21 天 21 st day		第 28 天 28 th day	
	24h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)	24 h 尿量 (mL)	尿 17-羟皮 质类固醇 (ng/mL)
	24h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)	24 h urinary volume (mL)	17-OH-CS (ng/mL)
空白组 Blank group	33. 4 ± 6. 30	18. 64 ± 2. 84	38. 61 ± 2. 60	18. 63 ± 1. 36	36. 0 ± 10. 6	18. 07 ± 4. 27	40. 0 ± 8. 87	18. 47 ± 3. 37
模型组 Model group	30. 6 ± 15. 61	16. 99 ± 3. 26	28. 6 ± 13. 83	16. 18 ± 7. 34	21. 4 ± 9. 07 [*]	12. 44 ± 1. 80 [*]	21. 2 ± 4. 55 [*]	9. 41 ± 1. 60 ^{**}

与空白组相比较,模型第 7 天组大鼠睾丸组织被膜结构完整,可见生精小管,分界清晰,形状规则;未见明显异常;模型第 14 天组大鼠生精小管上皮细胞数量轻微减少,生精细胞坏死、脱落,胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头);其他未见明显差异;模型第 21 天组大鼠见少量生精上皮萎缩、生精细胞坏死脱落,各级生精细胞、支持细胞数量轻度减少,胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头),细胞排列紊乱(黑色箭头),偶见大小不等的空泡(黄色箭头)。在第 28 天,模型组大鼠睾丸内大量生精上皮萎缩,较多生精细胞坏死脱落;生精细胞、支持细胞数量重度减少,细胞排列紊乱(黑色箭头),胞核固缩深染,管腔内可见坏死的细胞碎片(红色箭头)及大小不等的空泡(黄色箭头)(图 4)。

2.8.2 各组大鼠肾 HE 染色后观察病理变化

空白组肾组织结构形态正常,皮髓质分界清晰;皮质中肾小球均匀分布,肾小球中细胞数量及

基质均匀,肾小管上皮细胞圆润、饱满,以及整齐排列的刷状缘,髓质未见明显异常。

与空白组相比,模型第 7 天组大鼠肾组织未见异常;肾小管、集合管轻度扩张见于第 14 天组大鼠,伴体积增生,形状不规则;局部肾小管排列不规则、上皮细胞坏死,胞核固缩深染、溶解消失(红色箭头),未见其他明显差异。第 21 天组大鼠肾小管上皮细胞坏死增多,溶解消失明显,血管周围少量淋巴细胞浸润(红色箭头)。第 28 天组大鼠见肾小管囊状扩张;腔内可见嗜酸性絮状物(黄色箭头),血管周围可见大量淋巴细胞浸润(红色箭头)(图 4)。

2.8.3 各组大鼠胸腺组织 HE 染色后观察病理变化

空白组胸腺组织皮髓质分界明显,皮质着色较深,含有数量丰富的小淋巴细胞,排列紧密,形态正常,髓质淋巴细胞大,排列相对疏松,故髓质着色较浅,组织未见明显异常。

与空白组相比较,模型第 7 天组大鼠胸腺组织

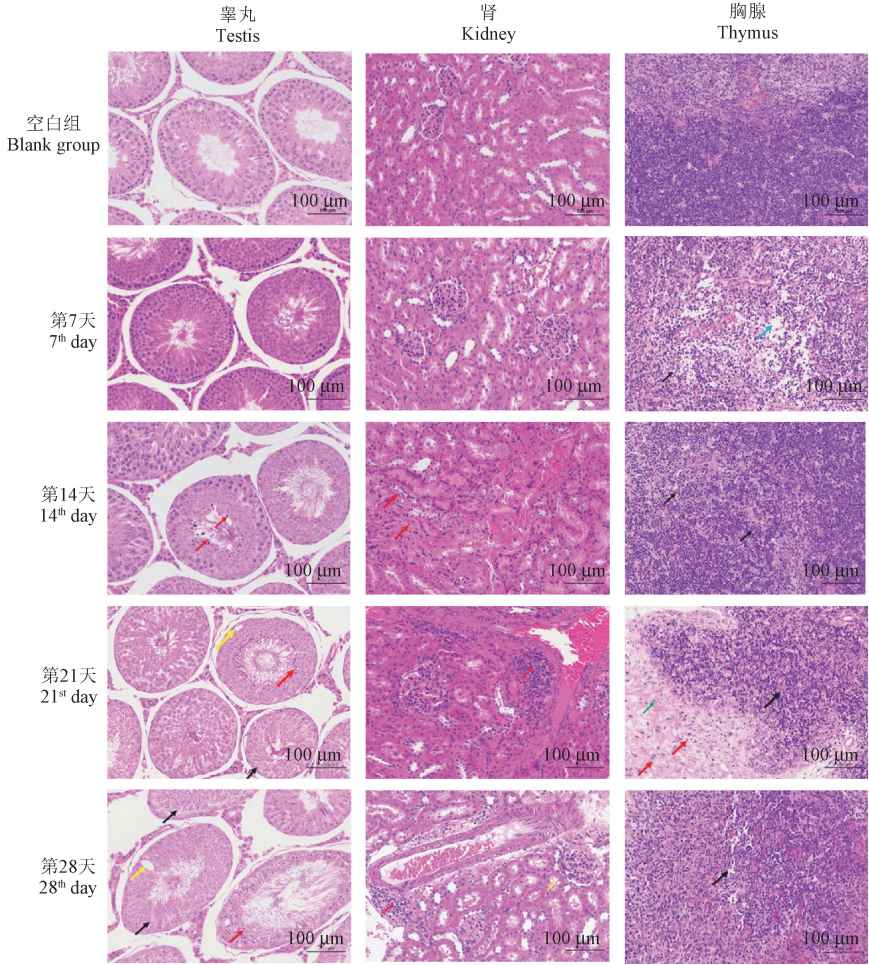


图 4 各组大鼠睾丸、肾、胸腺的组织 HE 染色(×100)

Figure 4 Pathological structure of testis kidney and thymus in rats of each group(×100)

皮、髓质分界不清晰,淋巴细胞数量轻度减少(黑色箭头),髓质局部细胞排列疏松(蓝色箭头);模型第 14 天组大鼠髓质内小淋巴细胞数量重度增多,分布不均匀(黑色箭头),髓质着色加深;未见其他明显差异。模型第 21 天组大鼠胸腺被膜可见结缔组织轻度增生(绿色箭头),伴有中性粒细胞、巨噬细胞点状浸润(红色箭头),皮质轻度变薄,淋巴细胞数量中度减少(黑色箭头);模型第 28 天组大鼠胸腺组织中度萎缩,体积变小;皮质变薄,皮、髓质分界不清,淋巴细胞数量重度减少(黑色箭头)(图 4)。

3 结论

羟基脲致肾阳虚大鼠模型各检测指标出现显著性差异的时间段不尽相同,具体如下:(1)体温出现显著性差异的时间较早(第 7 天),四肢末端温度出现显著性差异时间较晚(第 21 天);(2)肾能量相关酶类中,各类 ATP 酶的敏感性不同,按照时间先后顺序依次出现显著性差异($P < 0.05$)的酶分别是: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶(第 7 天) $>$ 总 ATP 酶(第 14 天) $>$ $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶(第 21 天);(3)肾阳虚大鼠模型血清 T(第 14 天)、 T_4 (第 14 天)较 T_3 (第 21 天)更早出现显著性下降趋势,血清 T、 T_4 的敏感性强于 T_3 ;反映机体能量代谢的客观指标中,血清中 cAMP(第 7 天)较 cGMP(第 21 天)更早出现显著性差异,cAMP 的敏感性强于 cGMP;(4)肾指数(第 14 天)较脾指数(第 28 天)更早出现显著性差异,为中医肾与脾的先、后天关系提供了一定的理论依据;(5)睾丸、肾、胸腺组织在第 14 天开始出现结构性病理变化,第 28 天病理变化显著且不可逆,提示第 28 天模型成熟且稳定。

羟基脲致肾阳虚大鼠模型在多方面表现出显著性差异:(1)能量代谢方面:肾相关 ATP 酶活性显著性下降,同时反映全身能量代谢的体温、四肢末端温度,以及客观指标 cAMP 和 cGMP 均呈显著性差异;(2)神经内分泌系统方面:17-OH-CS(反映下丘脑-垂体-肾上腺轴功能)、 T_3 和 T_4 (反映下丘脑-垂体-甲状腺轴功能)、T(反映下丘脑-垂体-性腺轴功能)为代表的神经内分泌系统出现紊乱;(3)免疫功能方面:脾指数显著下降、胸腺病理性结构异常;(4)泌尿生殖系统:肾、睾丸病理性结构异常。

羟基脲致肾阳虚大鼠模型能较全面地反映中医肾阳虚证的临床表现,随着造模时间的延长,相关检测指标呈稳步上升或下降趋势,在 28 d 达到峰

值或趋于平稳,因此认为羟基脲致肾阳虚大鼠最佳成模时间为 28 d。

4 讨论

肾阳虚证是中医临床上重要的证候之一,很多疾病都可出现肾阳虚证,在中医基础研究中建立稳定的、能够全面反映中医肾阳虚证临床特点的动物模型,是十分重要的任务。既往学者对肾阳虚的造模方法进行了多方面的探索,有中医传统病因造模、药物造模、手术造模等。传统病因造模包括恐伤肾造模、房劳造模、年老动物自然造模,药物造模包括肌注糖皮质激素造模(通过抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能)、灌胃腺嘌呤造模(通过抑制下丘脑-垂体-性腺轴的功能)、灌胃抗甲状腺药物造模(通过抑制下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能)以及羟基脲、卡那霉素、雷公藤多甙及利血平等的症状性造模;手术造模包括切除卵巢或睾丸的去势造模、甲状腺切除造模、肾上腺切除造模、肾切除加阿霉素造模^[18]。但是传统病因造模周期长,标准无法客观量化,同时涉及动物伦理方面的问题,研究中不易操作;肌注给药、手术方法造模对动物有一定的损害,操作过程中也容易引起动物的意外死亡。因此,在本实验中,最终选择用羟基脲灌胃进行肾阳虚动物造模。

羟基脲是能抑制 DNA 的合成和核酸代谢的核苷酸还原酶抑制剂,使机体能量代谢及脂类合成效率下降,会造成 HPTOA 轴(HPT 轴+HPO 轴+HPA 轴)的功能异常,通过产生细胞毒性作用的自由基,使造模大鼠出现毛发枯槁、消瘦和精神萎靡等状况^[19-20],符合中医肾阳虚模型。既往也有文献用羟基脲灌胃建立肾阳虚动物模型,但用药剂量和建模周期各不一样,另外模型的稳定性、对建模过程中动物的死亡率等问题未见阐释,评价标准不统一,对本研究造成了一定的困扰。为了建立稳定的、能全面反映肾阳虚证的动物模型,本研究拟对羟基脲致肾阳虚动物模型的建模周期进行深入研究。本项目前期预实验结果显示,羟基脲 210 mg/kg 灌胃大鼠造模时间过长,在后期模型动物甚至有自然恢复的迹象,因此本次研究将羟基脲的剂量确定为 300 mg/kg 灌胃。

现代医学研究发现肾阳虚的发生主要与下丘脑-垂体-靶腺轴功能的紊乱有关,主要包括下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)、下丘脑-垂体-性腺轴

(HPG)和下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)三种^[21],而肾虚动物模型常用的微观指标有:17-OH-CS(反映下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能)、T₃和T₄(反映下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能)、T(反映下丘脑-垂体-性腺轴的功能)、cAMP和cGMP(反映能量代谢的功能)等^[22],本研究为了全面反映羟基脲对肾虚大鼠模型的影响,对以上客观指标进行分别进行了检测,本实验结果显示,羟基脲对HPA、HPT、HPG这3条与内分泌系统相关的靶腺轴均有显著的干预作用,提示羟基脲对机体内分泌系统的影响是多方面的。本实验在模型第7、14、21、28天4个不同阶段,观察动物模型各项指标和主要脏器病理变化,发现在不同阶段肾虚相关指标的敏感性不同,同时羟基脲致肾虚模型在免疫系统、神经内分泌系统、泌尿生殖系统等多方面存在显著差异,提示该模型能够比较全面地反映出中医肾虚证的临床特点。当造模周期达到28d时,以上各项指标都出现了显著性差异,且趋于稳定,因此认为28d是羟基脲致肾虚动物最佳成模周期。

参 考 文 献(References)

- [1] 房磊臣,刘婧,韦祎,等.益智提取物对肾虚多尿模型大鼠的补肾缩尿影响[J].中华中医药学刊,2016,34(10):2346-2347.
Fang LC, Liu Q, Wei Y, et al. The effects of *Alpinia oxyphylla* extracts on the reducing urination and nourishing kidney in rats with kidney-Yang deficiency [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2016, 34(10): 2346-2347.
- [2] 朱叶,谢毅强,尹德辉.益智仁-乌药醚提取物对肾虚多尿模型大鼠血环磷酸腺苷和醛固酮水平的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(22):5498-5499.
Zhu Y, Xie YQ, Yin DH. Effect of the ether extract of the Yizhiren-Wuyao on Camp, ALD levels in polyuria model of Yang-deficiency rats [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(22): 5498-5499.
- [3] 陈红淑,杨元宵,戴世杰,等.肾气丸对肾虚证大鼠肾间质纤维化的作用研究[J].中华中医药杂志,2017,32(6):2700-2702.
Chen HS, Yang YX, Dai SJ, et al. Effects of Shenqi Pill on renal interstitial fibrosis in rat model with syndrome of kidney Yang deficiency [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(6): 2700-2702.
- [4] 卢文丽,方肇勤.阳虚证动物模型的造模方法与评析[J].上海中医药大学学报,2004,18(4):44-48.
Lu WL, Fang ZQ. Appraisal of the modeling methods of Yang-deficiency syndrome in animals [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2004, 18(4): 44-48.
- [5] 方萍,苏洁,陈炜,等.无比山药丸对腺嘌呤致肾虚模型大鼠肾脏病变的影响[J].中药药理与临床,2021,37(3):11-16.
Fang P, Su J, Chen W, et al. Effect of wubishanyao pills on renal lesion of shenyangxu model rats induced by adenine [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 11-16.
- [6] 马晓宇,姜梦如,穆祥,等.温肾益精散对肾虚模型大鼠生长性能的影响[J].中国兽医科学,2018,48(9):1187-1195.
Ma XY, Jiang MR, Mu X, et al. Effect of Wenshen Yijing San on growth performance of kidney-Yang deficiency model rats [J]. Chin Vet Sci, 2018, 48(9): 1187-1195.
- [7] 林海雄,王晓彤,江明洁,等.不同构建方法对肾虚大鼠模型的影响[J].辽宁中医杂志,2016,43(4):855-857,898.
Lin HX, Wang XT, Jiang MJ, et al. Effects of different establishing methods of kidney Yang deficiency rats model [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2016, 43(4): 855-857, 898.
- [8] 张巍岚,谭从娥.右归丸对肾虚证大鼠肾脏线粒体功能的影响[J].中国中医药信息杂志,2021,28(8):73-76.
Zhang WL, Tan CE. Effects of Yougui pills on the function of kidney mitochondria in rats with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(8): 73-76.
- [9] 许云姣,吴文笛,蔡悦青,等.基于补土伏火法的四逆汤及其拆方对肾虚证模型大鼠肝脏组织Na⁺-K⁺-ATP酶及Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶表达影响的研究[J].时珍国医国药,2020,31(11):2620-2622.
Xu YJ, Wu WD, Cai YQ, et al. Effects of Sini Decoction and its disassembled recipe based on tonifying soil and suppressing fire on the expression of Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in liver of kidney-Yang deficiency model rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(11): 2620-2622.
- [10] 郑龙飞,韩玲,郝宇,等.金匱肾气丸加味膏、汤方干预肾虚模型大鼠的药效学对比研究[J].北京中医药大学学报,2018,41(7):567-571.
Zheng LF, Han L, Hao Y, et al. Comparison in pharmacodynamics between modified paste and decoction of Jinhui Shenqi Pill in rat model of kidney Yang deficiency [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2018, 41(7): 567-571.
- [11] 张子怡,陈宝军,张庆,等.肾虚证动物模型的造模方法与评价指标[J].福建中医药,2014,45(2):61-63.
Zhang ZY, Chen BJ, Zhang Q, et al. Modeling method and evaluation index of animal model with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2014, 45(2): 61-63.
- [12] Jiang J, Xiao S, Yan S, et al. Glycyrrhizae Radix et rhizoma processed by sulfur fumigation damaged the chemical profile accompanied by immunosuppression and liver injury [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5439853.
- [13] Zeng Y, Li T, Zhang X, et al. Effects of Haima Duobian pill in a rat model of kidney Yang deficiency syndrome [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6696234.
- [14] 闵友江,姚海华,张辉,等.基于正交试验设计研究不同穴

- 位及刺激量对肾阳虚大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(4): 236-240.
- Min YJ, Yao HH, Zhang H, et al. Influence of different acupoints and intensity of stimulus on HPT axis in rats with syndrome of kidney-Yang deficiency: a study based on orthogonal experimental design [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2015, 38(4): 236-240.
- [15] 陈津岩, 李志强, 赵慧, 等. 强肌健力饮对肾阳虚证大鼠环核苷酸水平的调节作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(11): 1761-1762.
- Chen JY, Li ZQ, Zhao H, et al. Regulation of qiangji Jianli Yin on cyclic nucleotide levels of rats with kidney-Yang deficiency syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2008, 35(11): 1761-1762.
- [16] Hu H, Chen T, Liu W, et al. Differentiation of Yin, Yang and stasis syndromes in severe aplastic *Anemia* patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and their correlation with iron metabolism, cAMP/cGMP, 17-OH-CS and thyroxine [J]. J Blood Med, 2021, 12: 975-989.
- [17] 徐何方, 杨颂, 李莎莎, 等. 菟丝子醇提取物对肾阳虚证模型大鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2163-2165.
- Xu HF, Yang S, Li SS, et al. Effect of alcohol extract of *Cuscuta chinensis* on immune function of kidney-Yang deficiency model rats [J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(10): 2163-2165.
- [18] 李威, 王顺谱, 杨风云. 肾阳虚证动物模型建立方法及评定标准研究进展 [J]. 江西中医药, 2021, 52(8): 74-76.
- Li W, Wang SP, Yang FY. Research progress on establishment method and evaluation standard of animal model of kidney Yang deficiency syndrome [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2021, 52(8): 74-76.
- [19] Saban N, Bujak M. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64(2): 213-221.
- [20] Przybyszewski WM, Kasperczyk J. Radical mechanism of hydroxyurea side toxicity [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2006, 60: 516-526.
- [21] 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 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1317-1324.
- Tang WW, Zhang HY, Li Q, et al. Modeling methods and model evaluation of animal models for kidney Yang deficiency syndrome [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [22] Zhao L, Zhao A, Chen T, et al. Global and targeted metabolomics evidence of the protective effect of Chinese patent medicine Jinkui Shenqi pill on adrenal insufficiency after acute glucocorticoid withdrawal in rats [J]. J Proteome Res, 2016, 15(7): 2327-2336.

[收稿日期] 2022-10-24