

邱华明,李子祥,唐杰,等. 贵州小型猪2型糖尿病气阴两虚证模型建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1399-1407.

QIU H M, LI Z X, TANG J, et al. Establishment and evaluation of a Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes in Guizhou miniature pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1399-1407.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.004

贵州小型猪2型糖尿病气阴两虚证模型建立及评价

邱华明,李子祥,唐杰,吴延军,赵海,吴曙光*

(贵州中医药大学,贵阳 550025)

【摘要】 目的 本研究旨在探讨贵州小型猪2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)气阴两虚证模型的构建方法及评价体系和相关指标。方法 选取6月龄贵州小型猪26只,其中正常组6只采用基础饲料喂养10个月,T2DM气阴两虚证模型组20只采用高糖高脂饲料饲喂10个月、青皮附子水煎剂喂养3个月,构建了贵州小型猪T2DM气阴两虚证模型。以小便情况、大便情况、行动、精神、对周围环境反应及皮毛鼻盘色泽5方面量表评价中医证型,血清CD4⁺、CD8⁺及两者比值,cAMP、cGMP及两者比值、舌象红色值(R)、绿色值(G)和蓝色值(B)评估气阴两虚证。采用空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)、糖耐量实验(glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)、甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)等指标变化,苏木素-伊红(HE)染色观察胰腺组织形态学变化来评价T2DM。结果 模型组小型猪的体征可概括为体型偏胖、神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神、食少多饮、皮毛无光泽、皮毛灰暗;二便、行动及精神、对周围环境反应、皮毛鼻盘色泽等评分偏低($P < 0.05$);舌象呈舌红无苔或少苔;与正常组相比,模型组小型猪实验室指标出现了FBG、HbA1c、HOMA-IR、TC、LDL-C、cAMP、cGMP、舌象R、G、B值显著降低,PT、APTT、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺值显著下降,TG升高($P > 0.05$),HDL-C升高($P > 0.05$),cGMP升高($P > 0.05$);病理染色显示胰腺组织破坏。结论 采用高糖高脂饲料配合破气伤阴中药饲喂的方法可成功建立T2DM气阴两虚小型猪模型。该模型在中医证候上呈现神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌红少津、少苔、脉虚无力的主症和小便色黄透明无味、大便干结、反应迟钝、蜷缩、皮毛无光泽、灰暗、鼻盘淡白无华等兼症,也呈现糖脂代谢异常和胰岛素抵抗的临床表现。

【关键词】 贵州小型猪;2型糖尿病;气阴两虚证;空腹血糖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)11-1399-09

Establishment and evaluation of a Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes in Guizhou miniature pigs

QIU Huaming, LI Zixiang, TANG Jie, WU Yanjun, ZHAO Hai, WU Shuguang*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Corresponding author: WU Shuguang. E-mail: 243099502@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the construction method, evaluation system, and related indicators of the Qi Yin deficiency syndrome model of type 2 diabetes (T2DM) in Guizhou miniature pigs. **Methods** Twenty-six 6-month-old Guizhou miniature pigs were divided into 2 groups: pigs fed a basic diet for 10 months (normal group, $n = 6$), and pigs

【基金项目】国家自然科学基金(82160957),贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2021]一般148),贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2024]一般360)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(82160957), Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project(Supported by Qiankehe[2021]General 148), Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project(Qiankehe Fundamentals-ZK[2024]General 360)。

【作者简介】邱华明,在读硕士研究生,研究方向:中医基础。Email:137415316@qq.com

【通信作者】吴曙光,硕士,正高级实验师,硕士生导师,研究方向:中医基础理论与实验动物学。Email:243099502@qq.com

fed a high-sugar, high-fat diet for 10 months followed by Qingpi Fuzi decoction for 3 months (Qi Yin deficiency in T2DM model group, $n = 20$). Qi Yin deficiency in the T2DM model was created in Guizhou miniature pigs. Traditional Chinese medicine syndrome types were evaluated using five scales, including urination, defecation, movement and mental state, response to the surrounding environment, and color of the skin, hair, and nasal disc. Serum $CD4^+$ and $CD8^+$ and their ratios, cAMP and cGMP and their ratios, as well as tongue RGB color values were used to evaluate Qi Yin deficiency syndrome. Fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), glucose tolerance test (OGTT), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and other indicators were used to evaluate T2DM. **Results** Physically, the model group pigs were overweight and showed fatigue, with a tendency to lie down, lethargy, overeating and drinking, and dull fur. The defecation, movement and mental state, response to the surrounding environment, and color of the skin, fur, and nasal disc scores were relatively low ($P < 0.05$). The tongue appeared red with no or little coating. Pigs in the model group showed significantly lower of FBG, HbA1c, HOMA-IR, TC, LDL-C, cAMP, and cGMP, compared with the normal group. The RGB values of the tongue images were significantly reduced. The PT, APTT, $CD4^+$, and $CD4^+/CD8^+$ values were also significantly reduced, and TG, HDL-C, and cGMP were all elevated (all $P > 0.05$). Pathological staining showed destruction of pancreatic tissue. **Conclusions** The method of using a high-sugar and high-fat diet combined with traditional Chinese medicine for breaking Qi and damaging Yin can be used to establish a small pig model of T2DM with Qi Yin deficiency. The established model shows the main symptoms of fatigue, thirst, shortness of breath and lethargy, redness and dryness of the tongue, lack of coating on the tongue, and a weak pulse in traditional Chinese medicine syndromes, as well as concurrent symptoms including yellow and transparent urine, dry stools, slow response, curling up, dull fur, and a gray and dull nasal disc, as well as clinical manifestations of abnormal glucose and lipid metabolism and insulin resistance.

[Keywords] Guizhou miniature pig; type 2 diabetes mellitus; Qi Yin deficiency syndrome; fasting blood glucose

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

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一组由遗传和环境等多种因素引起的, 由胰岛素分泌和 (或) 作用缺陷所导致的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病, 常伴有糖、脂肪、蛋白质、水、电解质等代谢紊乱的临床综合征^[1]。其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 占 95% 以上。DM 在中医学中属于“消渴”范畴, 主要病机是阴虚内热。2022 年版《国家糖尿病基层中医防治管理指南》中指出 DM 中医主要证型分为热盛伤津证、肝郁脾虚证、痰浊中阻证、气阴两虚证、湿热蕴结证^[2]。其中气阴两虚证是 DM 前期及 DM 最常见和最主要的证型^[3-4]。

中医病证结合模型是一种将中医证候与现代医学疾病相结合, 综合病因、病理变化、临床表现等因素, 建立符合中医证候特点的动物模型^[5]。主要用于研究中医证候的病因、发病机制和治疗方法。2 型糖尿病的中医证候病证结合模型研究目前大多采用大鼠作为模型动物, 使用疾病造模因素与证候造模因素相叠加的方法来建立模型, 采用 T2DM 指标及证候指标来评判模型^[6]。上述造模方法和所采用的动物尚不能完全模拟符合中医基础理论的 T2DM 中医证候特点以及 T2DM 发生发展变化。贵

州小型猪是由贵州中医药大学甘世祥教授于 1982 年引种培育的实验小型猪, 具有体型小、繁殖力高、基因纯合等特点, 特别是在胰岛素分泌、糖耐量异常等生理过程与人类相似, 能更好地模拟 DM 发病过程^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 月龄清洁级贵州小型猪 26 只, 雄性 14 只, 雌性 12 只, 体重 (10.98 ± 2.42) kg, 由贵州中医药大学实验动物研究所提供【SCXK(黔)2021-0003】, 饲养于贵州中医药大学实验动物研究所清洁级实验室中【SYXK(黔)2021-0005】。饲养条件: 正常室温 $20 \sim 26$ °C, 湿度 50% ~ 70%; 12 h/12 h 昼夜节律, 动物可以自由进食饮水。本研究涉及的实验动物及实验操作均经过贵州中医药大学动物实验伦理学审批 (20220116)。

1.1.2 主要试剂与仪器

附子 (四川江油, 220101), 青皮 (江西新余, 20220201), 4% 多聚甲醛组织固定液 (biosharp,

22315976), CD4⁺、CD8⁺ 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX501095P), 环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP), 环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX501017P), GHb、INS 试剂盒(泉州市睿信生物科技有限公司, RX500940P), 10 mL 丙泊酚注射液(四川国瑞药业有限责任公司, H20040079)。

罗氏卓越型血糖仪(罗氏诊断有限公司, ACCU-CHEK Performa), HS11 型数码相机(富士公司, FinePix HS11), 台式高速冷冻离心机(大龙, D3024R), 酶标检测仪(BioTeK, Epoch), 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技, Chemray 420), 脱水(DIAPATH, Donatello), 包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-P5)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

将 26 只 6 月龄小型猪随机分为 T2DM 气阴两虚证模型组(以下简称模型组)20 只和正常组 6 只, 其中模型组雌性 10 只, 雄性 10 只, 正常组雌性 2 只, 雄性 4 只。模型组喂养高脂高糖饲料, 第 7 个月开始每天在高脂高糖饲料中加入青皮附子水煎剂直到实验结束, 正常组喂养基础饲料, 直到实验结束。以上实验小型猪每天喂食两次(早上 8 点、下午 4 点), 提供自由饮用水, 实验周期为 10 个月。

1.2.2 青皮附子水煎剂的制备

在制作过程中, 严格遵循青皮与附子 3:2 比例。首先, 向青皮附子中加入 8 倍质量的纯水, 并静置 30 min。随后, 进行第一次煮沸处理, 持续 1 h, 并用纱布过滤掉药渣。回收药渣, 并加入相当于药材质量 4 倍的纯水进行第 2 次熬制。同样持续 1 h 后, 再次用纱布过滤。将两次得到的药液合并, 并使用旋转蒸发仪将其浓缩至 0.5 g/mL 生药的浓度^[3]。

1.2.3 小型猪 T2MD 气阴两虚证中医证型评价及量表

根据《国家糖尿病基层中医防治管理指南》^[2]《中药新药临床研究指导原则》^[8]《中医糖尿病临床诊疗指南》^[9]三者中 T2DM 气阴两虚证的共同表现: 神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌淡红少津、少苔、脉虚无力等主症, 小便短少、大便干结等兼证, 制定了小便情况、大便情况、行动及精神、对环境反应情况、皮毛鼻盘色泽 5 个有关中医证候评定量表(具体如表 1 ~ 5), 采取相关体征指标作为模型中

医证候评价标准^[10-11], 其中评分越低越接近气阴两虚证的表现。

1.2.4 小型猪 T2MD 诊断标准

世界卫生组织对于人类糖尿病的诊断标准是空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) ≥ 7.0 mmol/L。根据国家实验动物专家委员会的相关规定, 小型猪的 MD 诊断标准: FBG ≥ 6.77 mmol/L 即为造模成功^[12]。

1.2.5 小型猪体重系数、饮水量、饮食量测定

每个月空腹状态下测量小型猪的体重、身长, 计算体重系数: 体重系数 = 体重/身长的平方。在第 10 个月每周记录小型猪的 24 h 饮水量、饮食量: 饮水量 = 单只猪的总加水量 - 24 h 后剩余水量; 饮食量 = (单只猪早上的总加饲料量 - 早上剩余量) + (单只猪下午的总加饲料量 - 下午剩余量)。测饮食量时, 采用小型猪自然条件下饮食, 直至小型猪吃饱后不再继续饮食时开始测量。为了确保对小型猪体征变化的判断标准一致, 排除个人主观判断和评判标准的误差, 一个人负责记录和评分, 另一个人负责审核评分结果。

1.2.6 小型猪舌象分析

于实验结束前最后一周采集小型猪舌象信息, 在小型猪麻醉状态下, 使用镊子拉动其舌头, 使其完全暴露。在数码相机的近距离拍摄模式下, 将小型猪的舌面与标准色卡进行比对拍照。使用 Photoshop2021 中的套圈工具选择舌尖至舌面中部的特定区域。通过“直方图”工具, 精确地计算出选定区域内的红色值(R)、绿色值(G)和蓝色值(B)。

1.2.7 FBG 测定、糖耐量测定、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c)测定、胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)

计算每个月在空腹 16 h 后用血糖仪及血糖试

表 1 小便情况评定表

Table 1 Evaluation of urinary conditions

评分/分 Score/ points	颜色 Colour	气味 Smell	质地 Texture
0	-	无味道 Unsavory	-
1	深黄 Deep yellow	轻度臭 Mild odor	透明 Transparent
2	介于二者间 Between the two	臭秽尚能忍受 Stinky and filthy, still tolerable	介于二者间 Between the two
3	淡黄 Pale yellow	臭秽难以忍受 Stinky and unbearable	浑浊 Turbidity

表 2 大便情况评定表

Table 2 Evaluation of bowel movements

评分/分 Score/point	颜色 Colour	性状 Character	质地 Texture
1	黑色 Black	球形 Spherical	硬 Hard
2	黄色 Yellow	成型 Molding	软硬适中 Moderate softness and hardness
3	淡黄 Pale yellow	水样便 Watery stool	软 Soft

表 3 行动及精神评定表

Table 3 Action and mental assessment form

评分/分 Score/point	状态 State	精神 Spirit
0	无反应 No response	-
1	神疲乏力、好卧 Feeling tired and weak, prone to lying down	精神萎靡、无神 Mental lethargy, lifelessness
2	自然站立 Natural standing	精神尚可,有神 Spiritually decent, with spirit
3	好动、爬栏、拱笼 Be active, climb fences, arch cages	精神亢奋、甚至烦躁 Mental excitement, even irritability

表 4 对环境反应情况评定表

Table 4 Evaluation of environmental response

评分/分 Score/point	平素观察 Regular observation	敲打笼子后观察 Observe after tapping the cage
0	无反应 No response	无反应 No response
1	反应迟钝、蜷缩、少动 Slow reaction, curling up, less movement	缓慢行动、无叫声 Slow movement, no sound
2	容易受到惊吓 Easy to be frightened	迅速行动、叫声较大 Act quickly, shout loudly
3	反应灵敏、尾巴自然摆动 Quick response, natural tail swing	剧烈对抗、躲闪及时 Intense confrontation, timely evasion

表 5 皮毛鼻盘色泽评定表

Table 5 Evaluation table for skin and hair nose disc color

评分/分 Score/point	皮毛色泽 Fur color	鼻盘颜色 Nasal disc color
0	明显掉毛或结块 Obvious shedding or clumping	淡白无华伴重度青紫 Pale white and unadorned with severe cyan purple
1	灰暗 Gray and dark	淡白无华伴轻度青紫 Pale white with no bloom and mild cyan purple
2	毛色不顺、无光泽 Uneven, dull fur color	淡白无华 Light white and unadorned
3	毛色光滑 Smooth fur color	淡红色 Light red

纸,尾尖取血,测 3 次,取平均数,计算 FBG。

糖耐量测定:小型猪空腹 12 ~ 16 h,然后给予 50%葡萄糖溶液,剂量为 1.2 mL/kg,通过耳缘静脉注射,注射时间不超过 3 min。实验后在第 3、10、30、60、90 和 120 min 记录和观测血糖水平的变化。

ELISA 法检测空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS) 和 HbA1c 的含量。

计算 HOMA-IR, 其计算公式为: $HOMA-IR = FBG \times FINS / 22.5$ 。

1.2.8 血脂四项及凝血检测

在实验结束前,所有实验中的小型猪在进行前腔静脉采血时必须保持 16 h 的空腹状态。采集血液后,以 3000 r/min 在 4 °C 下离心 10 min,以分离血清。运用全自动生化分析仪检测多个血液指标,如甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)。

1.2.9 血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 含量测定及 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 计算

小型猪前腔静脉采血,分离血清,-80 °C 保存备用。ELISA 实验检测血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 的含量,计算 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 比值。

1.2.10 胰腺组织苏木素-伊红(HE)染色观察

实验最后 1 周,动物禁食 16 h 后,麻醉并处死,胰腺组织取出并保存在 4% 多聚甲醛固定液中,HE 染色,光镜下观察胰腺组织形态学变化。

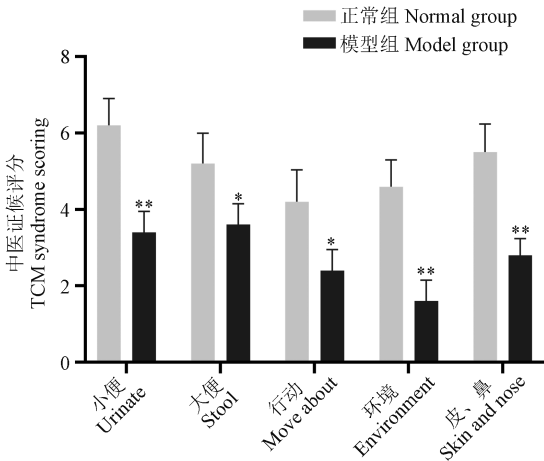
1.3 统计学分析

运用 SPSS 26.0 软件统计,数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据满足正态和方差齐则采用方差分析,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 小型猪一般状态的观察

结果显示在第 10 个月的每周观察中,与正常组相比,模型组小型猪在小便、大便情况、运动及精神、对周围环境反应、皮毛鼻盘色泽的中医辨证评分偏低,其中小便色黄透明无味,大便颜色偏黑、呈球形,神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神,自然情况反应迟钝、蜷缩、少动、敲打笼盒时无反应,皮毛无光泽、灰暗、明显掉毛,鼻盘淡白无华伴轻度青紫 (图 1)。



注:与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 小型猪中医证候评分观察

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

Figure 1 Observation on traditional Chinese medicine syndrome scoring of miniature pigs

2.2 小型猪体重系数、饮水量、饮食量测定

结果显示,与正常组相比,模型组体重系数显著增高($P < 0.05$),饮水量显著增加($P < 0.05$),饮食量显著降低($P < 0.01$)(图 2)。

2.3 小型猪舌象分析结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪 R、G、B 值均显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(图 3)。

2.4 小型猪 FBG 测定、糖耐量测定、HbA1C 测定、HOMA-IR 计算结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪 FBG 第 8 ~ 10 个月 FBG 稳定于 6.9 ~ 7.3 mmol/L 之间,差异具有显著性($P < 0.01$);第 10 个月糖耐量

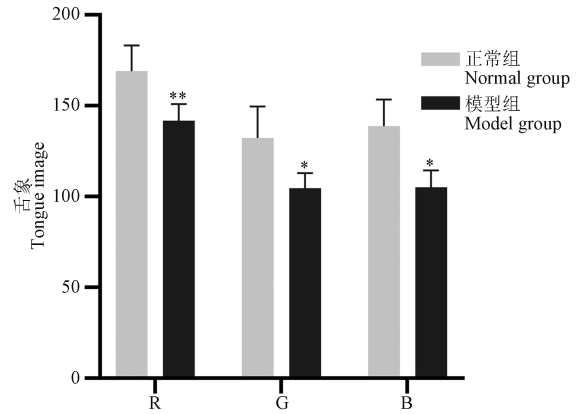


图 3 小型猪舌象分析结果

Figure 3 Analysis results of tongue images in miniature pigs

实验结果:从 60、90、120 min 血糖变化来看,模型组的小型猪葡萄糖的利用率明显降低($P < 0.01$);模型组小型猪的平均 HbA1C 含量是 7.78%,比正常组小型猪显著升高($P < 0.01$);模型组小型猪的 HOMA-IR 比正常组显著升高($P < 0.01$)(图 4)。

2.5 小型猪血脂及凝血功能指标测定结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪血清 TC、LDL-C 含量显著升高($P < 0.05$),TG 升高($P > 0.05$)、HDL-C 升高($P > 0.05$)。模型组的小型猪血浆 PT、APTT 显著减少($P < 0.01$)(图 5)。

2.6 小型猪血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP、cGMP 含量测定结果及 CD4⁺/CD8⁺、cAMP/cGMP 计算结果

结果显示,与正常组相比,模型组小型猪血清中 CD4⁺含量显著降低($P < 0.01$);CD8⁺含量降低($P > 0.05$);两者比值显著降低($P < 0.05$);血清 cAMP 显著升高($P < 0.01$);cGMP 及两者比值无显著性差异(图 6)。

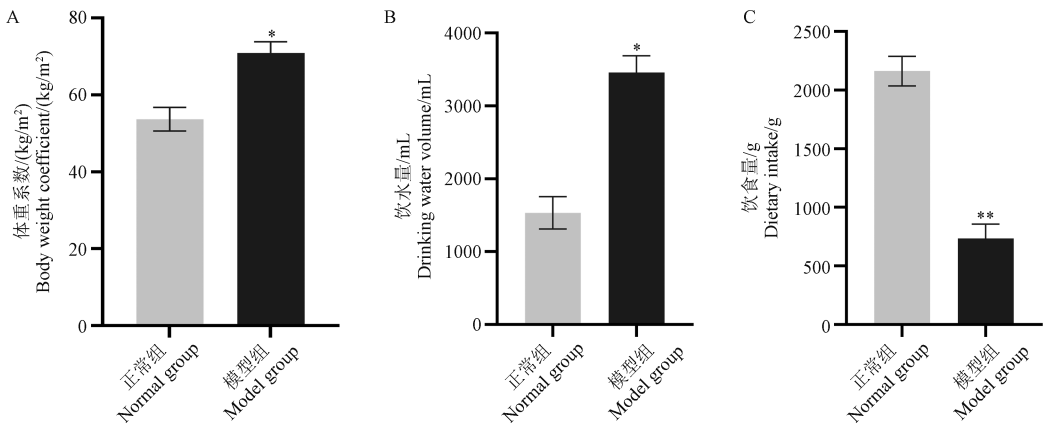


图 2 小型猪体重系数、饮水量和饮食量测定结果

Figure 2 Measurement results of body weight coefficient, water intake and dietary intake of miniature pigs

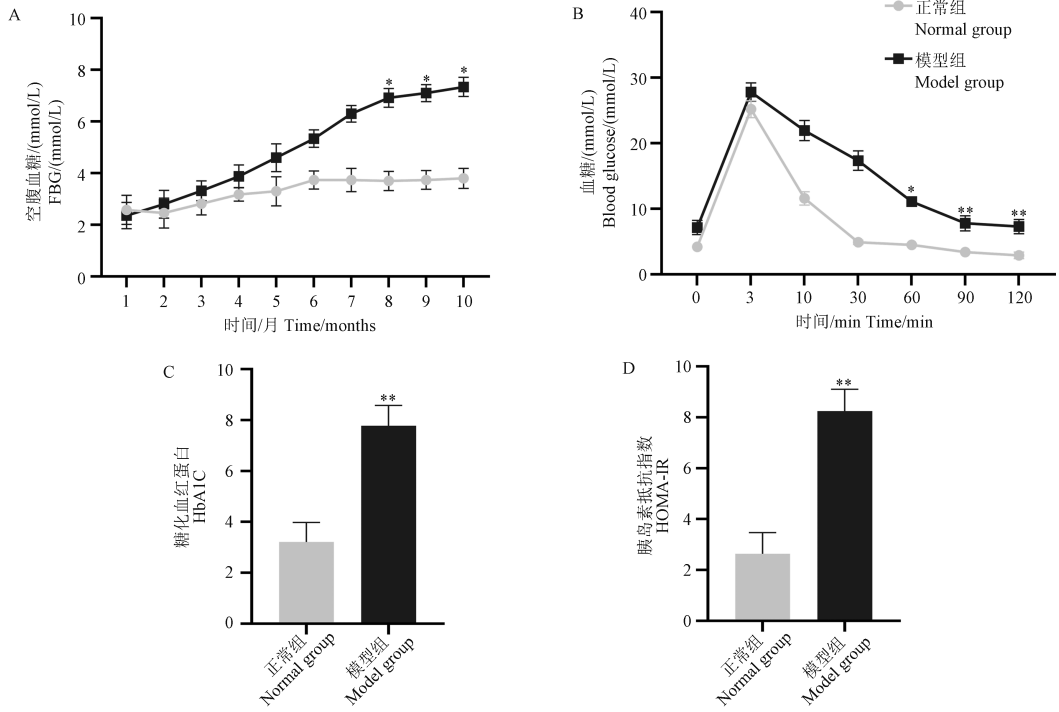


图 4 小型猪空腹血糖、糖耐量测定、糖化血红蛋白和胰岛素抵抗指数结果

Figure 4 FBG, glucose tolerance measurement, HbA1C and HOMA-IR of miniature pigs

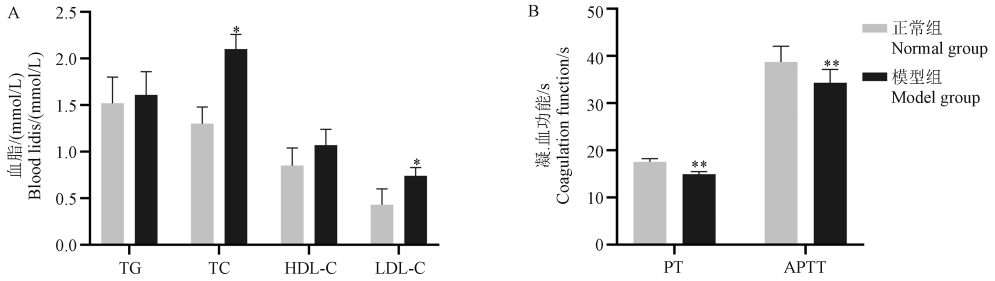


图 5 小型猪血脂及凝血功能指标测定结果

Figure 5 Measurement results of blood lipid and coagulation function indicators in miniature pigs

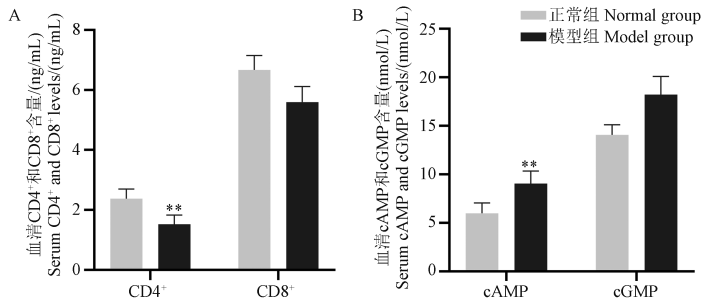


图 6 小型猪血清 CD4⁺、CD8⁺、cAMP 和 cGMP 含量测定结果

Figure 6 Determination results of serum CD4⁺, CD8⁺, cAMP and cGMP levels in miniature pigs

2.7 小型猪胰腺组织 HE 染色结果

结果显示(图 7),正常组小型猪的胰腺组织内胰岛数量丰富,细胞形态正常,胰岛细胞排列疏松。与正常组相比,模型组小型猪的胰腺组织内胰岛数量丰富,体积小,形状不规则,细胞结构不清晰,排

列疏松,少量胰岛细胞坏死,胞核固缩。

结合中医辨证量表、舌象、血液生化指标,模型组小型猪在造模过程中死亡 3 只,经过多次筛选,最终符合 T2DM 气阴两虚证的成模只有 3 只,成模率偏低。

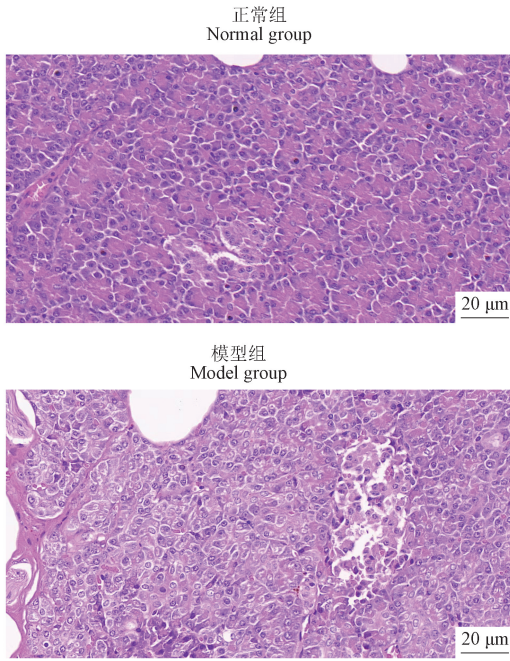


图 7 小型猪胰腺组织病理结果

Figure 7 Pathological results of pancreatic tissue in miniature pigs

3 讨论

DM 是一种由胰岛素分泌缺陷或生物作用受损引起的以高血糖为特征的代谢性疾病。在全球范围内,DM 患者数量逐年增加,根据 2015 ~ 2017 年的 DM 流行病学调查显示,我国 18 岁及以上人群 DM 患病率为 11.2 %^[13]。DM 不仅影响患者的生活质量和健康,还对社会造成负面影响,如增加医疗负担、影响社会经济发展等^[13]。世界卫生组织对于人类 DM 的诊断标准是 FBG \geq 7.0 mmol/L。根据国家实验动物专家委员会的相关规定,小型猪的 DM 诊断标准是:FBG \geq 6.77 mmol/L 即为造模成功^[12]。

DM,中医称之为“消渴病”,其基本病理特征在于阴液亏虚和燥热内盛。气阴两虚证在 DM 前期及 DM 中最为常见,DM 患者饮食多偏肥甘膩厚,易致饮食积滞,阻遏脾胃运化失司,脾气不升、胃气不降,化热伤阴耗气,反复循环,致气阴两虚。在 2022 年的《国家糖尿病基层中医防治管理指南》中,DM 的主要中医证型被分为 5 类:热盛伤津证、肝郁脾虚证、痰浊中阻证、气阴两虚证、湿热蕴结证。传统中医学认为久服附子会伤阴,久服青皮会耗气,可能会造成机体的气阴两虚。本研究则采用高脂高糖饲料结合青皮附子水煎剂来饲喂贵州小型猪,能够

建立 T2DM 气阴两虚证动物模型。

T2DM 是因胰岛素抵抗而产生糖脂代谢异常的综合征。本研究建立的 T2DM 模型小型猪 FBG、葡萄糖耐量实验、HbA1c、HOMA-IR 均比正常组明显增高,具有显著性差异。模型组小型猪体质量系数比正常组显著增高,而体型均偏肥且以腹部肥胖为主。模型组的小型猪多次测量 24 h 的饮水量均比正常组偏高,甚至是正常组小型猪饮水量的 2 ~ 3 倍,表明模型组小型猪处于多饮的状态。以上表观观察均表明贵州小型猪 T2DM 模型建立成功。

基于《国家糖尿病基层中医防治管理指南》^[12]、《中药新药临床研究指导原则》^[8]、《中医糖尿病临床诊疗指南》^[9]总结出 T2DM 气阴两虚证的共同表现为:神疲乏力、烦渴欲饮、气短懒言、舌淡红少津、少苔、脉虚无力等主症,小便短少、大便干结等兼证。根据上述表现制定了小便情况、大便情况、行动及精神、对环境反应情况、皮毛鼻盘色泽 5 个有关中医证候的评定量表。与正常组相比,模型组小型猪小便色黄、气味无腥臭、质地较为透明和小便短少的兼证不符合,可能是因为本研究中所造模的小型猪属于脾肾气虚,化源不足,气不摄津所致。与正常组相比,模型组小型猪大便呈球形或者羊屎疙瘩、质地偏硬和大便干结的兼证相符合,是阴虚致肠道津液不足所致。与正常组相比,精神及行动方面模型组小型猪呈现一派神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡、无神之证,与神疲乏力、气短懒言的主症相符合;气虚一般会导致机体神疲乏力、好卧、懒动、精神萎靡。除了以上 T2DM 气阴两虚证的共同表现外,本研究还观察到:与正常组相比,对周围环境的适应及反应情况,模型组小型猪表现为自然情况反应迟钝、蜷缩、少动、甚至无反应;在皮毛鼻盘色泽方面,模型组小型猪表现为皮毛无光泽、灰暗、明显掉毛,鼻盘淡白无华伴轻度青紫。这些可能是由于气虚时机体对周围环境的反应减弱,同时气虚时容易出现皮毛无光泽、灰暗等所致。饮水量方面模型组比正常组显著增高,提示模型组小型猪处于烦渴欲饮状态,是机体燥热伤阴、阴液亏虚引起的。从行为学指标观察来分析,T2DM 气阴两虚证有 6 个主症、2 个兼证。本研究还增加了对周围环境反应(包括自然状态下和敲打笼盒下的不同反应)和皮毛色泽与鼻盘的观察两方面。综合分析所得,本研究所造模型虽不能完全复制 T2DM 气阴两虚证的表现,但能够呈现神疲乏力、烦渴欲饮,气

短懒言,舌红少津、少苔,脉虚无力,小便短少、大便干结,反应迟钝,蜷缩,皮毛无光泽、灰暗,鼻盘淡白无华等 T2DM 气阴两虚证小型猪大部分症状。

舌象是中医诊断中的重要依据之一,通过观察舌头的形态、颜色、舌苔等特征,可以判断机体的健康状况和证候类型。本研究与正常组相比,模型组小型猪的舌象 R、G、B 值均显著降低,表示模型组的小型猪比正常组舌质偏淡,少苔,基本符合气阴两虚证舌象特征。本研究中小型猪舌苔偏少或者苔白可能是高脂高糖饲料喂养所致,相当于长期嗜好肥甘厚腻之品会滞碍脾胃运化,气血生化无源,易致脾气虚弱;再加之青皮附子破气伤阴也会造成气阴两虚的舌象。

气虚是一种元气不足导致的病理状态,主要表现为脏腑机能的衰退和抗病能力的低下,其中包括气的推动、防御、温煦、固摄等功能的减弱^[14]。在现代医学中,这与免疫力低下导致的“亚健康”状态相似。T 淋巴细胞中的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞作为两个关键的亚群,它们的数量和比例平衡对维持体内免疫功能的稳定至关重要^[15-16]。实验结果显示,与正常组相比,模型组小型猪的血清 CD4⁺ 水平和 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低。这表明模型组小型猪处于气虚状态,其免疫功能受到一定程度的抑制。

阴虚证是指体内阴液不足,无法滋润和制约阳气,导致阴阳失衡,出现一系列症状。相当于现代医学中体液免疫某些功能异常。cAMP 和 cGMP 在细胞内的平衡与互动,类似于中医理论中阴阳的相互制约和转化,共同维持着细胞的内稳态和功能平衡^[17-19]。国内邝安堃教授团队^[20]及夏宗勤等^[21]经过多年研究认为:凡中医辨证阳虚者,cAMP/cGMP 比值明显降低;而辨证为阴虚者则表现为 cAMP 含量升高,cAMP/cGMP 比值无明显降低。因此,测定血清 cAMP 和 cGMP 的含量及其比值可以作为判断阴虚、阳虚的客观指标。本研究结果显示与正常组相比,模型组的小型猪血清 cAMP 含量显著升高;cGMP 含量及两者比值无显著性差异,说明模型组小型猪处于阴虚状态。

本研究中模型组的小型猪血清 TC、LDL-C 比正常组含量明显偏高,符合 T2DM 的血脂异常特点,表明模型组小型猪在胰岛素抵抗状态下处于糖脂代谢紊乱状态。异常的血脂是机体肥甘厚腻之品在血液内累积而成。当机体处于气阴两虚之时,气虚不能推动、阴虚不能流动,机体内的气血循环受阻,

肥甘厚腻之品产生的浊物不能有效排除,化为脂膏。本研究中模型组小型猪血浆中 PT、APTT 比正常组时间明显减少,代表模型组小型猪处于高凝状态,可能与本模型气阴两虚证状态气不摄血而致血瘀有关。

本研究通过给贵州小型猪长期喂食高脂高糖饲料并结合青皮附子水煎剂,成功构建了 T2DM 气阴两虚证模型。本研究还从大体观察、行动和精神状态、二便情况、对周围环境的反应以及皮毛、鼻盘的颜色等方面对两组小型猪进行中医证候辨证。此外,还增加了舌象分析、检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞数量及比值、检测 cAMP 和 cGMP 的含量及其比值、血脂四项、凝血功能、FBG、糖耐量实验结果、HbA1c 以及 HOMA-IR 等指标来进行模型的评估。综合分析,通过上述各项指标,证明了本研究所构建的模型是成功的,为相关研究提供了有价值的参考。这一研究方法为未来研究 T2DM 气阴两虚证提供了新的思路 and 工具,有助于深入探讨该病症的发病机制和治疗方法。

参 考 文 献(References)

- [1] 许琳. 糖尿病的形成机理(病因)及其临床诊断标准 [J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(3): 1426-1429.
XU L. Formation mechanism (etiology) and clinical diagnostic criteria of diabetes mellitus [J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(3): 1426-1429.
- [2] 杨叔禹. 国家糖尿病基层中医防治管理指南(2022) [J]. 中医杂志, 2022, 63(24): 2397-2414.
YANG S Y. National guideline for management of diabetes prevention and treatment of traditional Chinese medicine at primary level(2022) [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(24): 2397-2414.
- [3] 曾梦莹, 何新苗, 苏比努尔, 等. 定量代谢组学研究气阴两虚糖尿病大鼠血清小分子代谢特征谱 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3313-3317.
ZENG M Y, HE X M, SU B N E, et al. Quantitative metabolomics study on serum small molecules metabolic profiling in diabetes mellitus rats with syndrome of both qi and Yin deficiency [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(8): 3313-3317.
- [4] 侯清涛, 李芸, 李舍予, 等. 全球糖尿病疾病负担现状 [J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(1): 92-96.
HOU Q T, LI Y, LI S Y, et al. The global burden of diabetes mellitus [J]. Chin J Diabetes, 2016, 24(1): 92-96.
- [5] 任志鑫, 王雨, 张冰, 等. 代谢性疾病病证结合动物模型的探讨与思考 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 897-908.
REN Z X, WANG Y, ZHANG B, et al. Animal models combining disease and syndromes related to metabolic diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 897-908.

- [6] 杨燕, 陈正涛, 肖华胜, 等. 糖尿病大血管病变小鼠模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1194-1205. YANG Y, CHEN Z T, XIAO H S, et al. Research progress on mouse models of diabetes macroangiopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1194-1205.
- [7] WU Y, MO J, LIANG J, et al. Multiomic study of the protective mechanism of *Pescicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Gross against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in Guizhou miniature pigs [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155499.
- [8] 郑筱蓓. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002. ZHENG X Y. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [9] 中华中医药学会发布. 中医糖尿病临床诊疗指南 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2020. Chinese Society of Traditional Chinese Medicine. Guide to clinical diagnosis and treatment of diabetes in traditional Chinese medicine [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press; 2020.
- [10] 张译心, 王鑫, 刘博, 等. 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229. ZHANG Y X, WANG X, LIU B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.
- [11] 相波. 巴马小型猪虚寒模型的建立、评价及视网膜血氧饱和度的特征研究 [D]. 成都: 成都中医药大学; 2018. XIANG B. Study on establishment, evaluation and retinal oxygen saturation in Bama mini pig and with deficiency-cold model [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM; 2018.
- [12] 田威龙, 綦文晶, 刘笑笑, 等. 小型猪 2 型糖尿病模型肠道微生物分析 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(6): 768-776. TIAN W L, QI W J, LIU X X, et al. Analysis of intestinal microflora in mini-pigs with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(6): 768-776.
- [13] 《中国老年 2 型糖尿病防治临床指南》编写组. 中国老年 2 型糖尿病防治临床指南 (2022 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2022, 30(1): 2-51. Compiling Group of Clinical Guidelines for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus in the Elderly in China. Clinical guidelines for prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly in China (2022 Edition) [J]. Chin J Diabetes, 2022, 30(1): 2-51.
- [14] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183. CHEN J C, LIU J X, LIN C R, et al. Study on establishment of an animal model of Qi deficiency syndrome base on theory of over exertion leading to Qi consumption in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [15] 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. LI Z Y, HAO L Y, SUN J H, et al. Comparison and evaluation of three animal models of qi deficiency syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(18): 1773-1778.
- [16] 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. GAN J K, FAN J Y, WANG D Z, et al. The establishment and evaluation of qi deficiency syndrome of mouse model induced by sleep deprivation [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(10): 1801-1806.
- [17] 李丽, 范晓旭, 华娟安, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 通路探讨白芍总苷对化学性肝损伤肝阴虚证大鼠的保护作用及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 341-351. LI L, FAN X X, HUA J A, et al. Total glucosides of paeony exert protective effects on chemical liver injury with pattern of liver yin deficiency in rats through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(3): 341-351.
- [18] 黄晓巍, 张思琪, 张译心, 等. 基于转录组学探讨气阴两虚型 2 型糖尿病病证结合大鼠模型证候表现与差异表达基因的关系 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2023, 49(3): 625-633. HUANG X W, ZHANG S Q, ZHANG Y X, et al. Relationship between syndrome manifestations and differentially expressed genes in rat model of type 2 diabetes mellitus with Qi and Yin deficiency explored through transcriptomics [J]. J Jilin Univ (Med Ed), 2023, 49(3): 625-633.
- [19] 谭丹, 曾丹, 唐利东, 等. 基于阴虚证、阳虚证及卵巢功能减退小鼠模型探讨杜仲雄花的补肾功效 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(12): 2875-2878. TAN D, ZENG D, TANG L D, et al. Medicinal effects of eucommia ulmoides male flowers on mouse models of yin and yang deficiency [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(12): 2875-2878.
- [20] 阴建国. CAMP 和 CGMP 的拮抗代谢调节与中医“阴阳”的关系 [J]. 陕西中医学院学报, 1987, 10(1): 51-54. YIN J G. Understanding the dual regulatory role of CAMP and CGMP in metabolism: Bridging traditional Chinese medicine with modern science [J]. J Shanxi Tradit Chin Med, 1987, 10(1): 51-54.
- [21] 夏宗勤, 朱玟, 胡雅儿, 等. 中医“虚证”理论的初步探讨 (阴虚和阳虚病人血浆环核苷酸含量变化的比较) [J]. 中医杂志, 1979, 11: 2-10. XIA Z Q, ZHU W, HU Y E, et al. Preliminary exploration of the theory of “deficiency syndrome” in traditional Chinese medicine (comparison of changes in plasma cyclic nucleotide content between patients with yin deficiency and yang deficiency) [J]. J Tradit Chin Med, 1979, 11: 2-10.