

血虚证动物模型的标准化研究初探

杨岚¹, 祝彼得², 彭成³

(1. 成都中医药大学解剖组胚教研室, 成都 610072; 2. 成都中医药大学; 3. 成都中医药大学科技处)

摘要:目的: 建立标准化的血虚证动物模型。方法: 采用慢性失血法、溶血法和骨髓抑制法制造三种血虚证模型, 观察一般情况和与血发生有关的实验室指标, 并用四物汤反证造模效果。结果: 三种动物模型均符合血虚证表现, 同时出现外周血、骨髓有核细胞数目和细胞周期的改变, 四物汤对 3 种动物模型均有一定疗效。结论: 建立了 3 种符合标准化的血虚证模型。

关键词: 血虚证; 动物模型; 实验研究

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2006) 01-0160-05

Study on Standard Animal Models with Blood Deficiency Sign

YANG Lan, ZHU Bi-de, PENG Cheng

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072)

Abstract: Objective To establish standard animal models with blood deficiency sign. **Method** Three kinds of blood deficiency animal models were established by chronic blood loss, hemolysis and arrest of bone marrow respectively. The changes of body sign and laboratory indices were observed. Then the curative effect of Siwu Tang (Decoction of Four Ingredients) was examined as an evidence. **Result** Blood deficiency signs occurred in all three kinds of animal models and they had changes in periferal blood, bone marrow nucleated cells and cell cycle. Besides, Siwu Tang revealed good curative effect of these changes. **Conclusion** Three kinds of standard animal modles with blood deficiency sign were established.

Key words: blood deficiency sign; animal modle; study

血虚证是中医的基础病证, 主要表现为营血亏损^[1]。要阐明血虚证的本质和病理生理, 以及中药治疗血虚证的机理, 动物实验研究是不可缺少的途径。而要进行实验研究, 首先必须有一个标准化

的血虚证动物模型, 这是中医药现代化研究的重要环节。许多科研工作者在这方面做了探索和努力^[2~8], 然而至今尚无统一的造模规范程序和公认指标。实验动物选择不同、实验方法不统一, 甚

收稿日期: 2005-08-25 基金项目: 四川省科技厅课题, 成都中医药大学科技发展基金课题
作者简介: 杨岚 (1972~), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 血细胞的发生及调控, 血虚证动物模型的标准化研究。

保护和管理。

3.3 根据蝴蝶资源普查结果, 重新调整我国重点保护的一、二类蝴蝶名录。

3.4 由于蝴蝶的生存具有很强的地域性, 要因地制宜, 科学对待, 不宜盲目发展。建议着手制定具有指导意义的全国性的蝴蝶产业发展规划。

3.5 筛选几个基础较好且专业对口的科研单位或大学, 立即着手开展相关内容的课题研究和人才培养工作, 并给予经费支持。

3.6 尽早建立一个覆盖全国的权威性研发机构, 以便组织联络各方资源, 包括单位和个人, 作为我国蝴蝶产业的核心支撑力量, 具体研究解决蝴蝶产业

发展中的实际问题。

3.7 鼓励自主创新, 注意知识产权保护, 以便形成具有自主知识产权的技术和产品, 努力培养我国蝴蝶产业的核心竞争力, 为我国蝴蝶产业走向世界创造条件。

4 参考文献

- [1] 中华人民共和国濒危物种进出口管理办公室. 中国野生动植物进出口管理文件汇编[C]. 东北林业大学出版社, 2004.
- [2] 西双版纳国家级自然保护区管理局, 等. 中国蝴蝶养殖[M]. 云南科技出版社, 2002.
- [3] 陈树椿. 中国珍稀昆虫图鉴[M]. 中国林业出版社, 1999.
- [4] 张松奎, 赵爱玲. 蝴蝶世界[M]. 江苏科技出版社, 1996.

至缺乏客观指标,严重影响对血虚证本质的探讨和对治疗血虚证药物的药效评价。本实验进行的血虚小鼠模型的标准化实验研究,目的在于建立操作简便,敏感精确,重复性好,经济实用的标准化的血虚证动物模型。四物汤是中医传统的补血基本方,本实验用四物汤作为反证来评价血虚证造模成功与否,同时探讨四物汤的补血机理。

1 实验材料

1.1 实验动物

6~8 周龄 BALB/C 小鼠,体重 18~22 g,雄性,由成都中医药大学实验动物研究中心提供,合格证号:川实动管质 97(7)号。检疫后备用。

1.2 实验用品

1.2.1 造模药物

(1) 乙酰苯肼 (APH),分析纯,每瓶 25 g,由北京福星化工厂生产,生产批号:971015,用生理盐水配制成 2% 乙酰苯肼溶液。

(2) 环磷酰胺 (CTX) 注射用粉末,每支 200 mg,由上海华联制药有限公司生产,生产批号:990502,用注射用蒸馏水配制成 0.3% 环磷酰胺溶液。

1.2.2 治疗药物 四物汤(当归 10 g、川芎 8 g、白芍 12 g、熟地 12 g),药材购自成都市同仁堂药店,经过生药学鉴定。按照《中华人民共和国药典》附录中方法制成四物汤水煎液,每毫升含原生药 0.6 g。

2 实验方法

2.1 实验分组及造模

将 120 只小鼠随机分为 10 组,其中空白对照组 30 只;失血性血虚证模型对照组 10 只;失血性血虚证药物治疗组 10 只;失血性血虚证自然恢复组 10 只;溶血性血虚证模型对照组 10 只;溶血性血虚证药物治疗组 10 只;溶血性血虚证自然恢复组 10 只;骨髓抑制性血虚证模型对照组 10 只;骨髓抑制性血虚证药物治疗组 10 只;骨髓抑制性血虚证自然恢复组 10 只。每 5 只一笼饲养。

实验前,所有小鼠均第 1 次尾尖采血 50 μ l,进行血液学常规检查,测定红细胞 (RBC) 数、血红蛋白 (Hb) 量、白细胞 (WBC) 和网织红细胞数。采血后,分别造模:

(1) 空白对照组正常饲养。

(2) 失血性血虚证模型以 75% 酒精擦拭鼠尾

(或用温水浸泡鼠尾),使之充血后剪去 0.25~0.3 cm,放血 0.5 ml,间日一次,共 4 次。

(3) 溶血性血虚证模型于实验第 1、4、7 天进行皮下注射 3% 乙酰苯肼 (APH) 溶液,第一次剂量为 10 ml/kg,第 2、3 次剂量为 5 ml/kg。

(4) 骨髓抑制性血虚证模型于实验第 1 日起,连续 5 日腹腔注射 0.4% 环磷酰胺 (CTX) 溶液,剂量为 6 ml/kg·d。

实验第 10 日,所有小鼠第 2 次尾尖采血进行血液常规检查。采血后,处死 3 组对照组,空白对照组半数小鼠处死。自处死小鼠中取外周血,取出股骨,用 2 ml 红细胞稀释液冲出全部骨髓细胞,振荡 20 min,测定骨髓有核细胞数,取肝脏、脾脏称重。

实验第 11~20 日,3 组治疗组每日口服四物汤煎液,剂量为 6 ml/kg·d,共计 10 日。对照组口服等量生理盐水。

实验第 20 日,剩余所有小鼠第 3 次尾尖采血作血液常规检查。采血后全部处死,取骨髓细胞测定骨髓有核细胞数,取肝脏、脾脏称重。

2.2 统计方法

所有实验数据运用 SPSS 11.0 软件处理。

3 实验结果

3.1 外观状态

(1) 空白对照组小鼠神气矫健,行动敏捷,眼睛明亮,呈鲜粉红色,鼻唇洁净潮润呈淡粉红色,尾圆色粉红,背腰平直,披毛光泽而密。

(2) 3 种血虚小鼠基本体征与血虚证的描述一致。均表现精神萎靡,神疲乏力,行动迟缓,团缩弓腰,口唇、眼睑、耳廓苍白,毛蓬竖少光泽;失血性血虚证、溶血性血虚证药物治疗组动物经四物汤治疗后,外观状态迅速恢复接近空白对照组,骨髓抑制性血虚证小鼠一般情况较失血性血虚组和溶血性血虚组差,经治疗后有一定好转但不能完全恢复正常。

3.2 体重、肝脏和脾脏湿重观察

(1) 失血性血虚证动物模型肝脏湿重明显降低,脾脏湿重升高;与自然恢复组比较四物汤治疗组对肝脏萎缩和脾脏肿大明显的疗效。

(2) 溶血性血虚证模型动物肝脏、脾脏湿重明显增高;与自然恢复组比较四物汤治疗组对肝脏脾脏恢复有明显的疗效。

(3) 骨髓抑制性血虚证模型动物肝脏湿重、脾

脏湿重明显降低；自然恢复组比较四物汤治疗组对肝脏和脾脏萎缩有明显的疗效。

以上指标差异有显著性。结果见表 1。

表 1 血虚证模型动物治疗前后体重及肝脾湿重比较 (n=10, x±s)

组别	体重 (g)	肝 (g)	脾 (g)
空白对照组	37.30±1.24	2.171±0.144	0.329±0.015
失血性血虚模型组	23.26±1.44 [*]	1.874±0.125 ^{**}	0.379±0.013 [*]
失血性血虚药物治疗组	36.84±2.94 Δ	3.189±0.129 Δ ^{**}	0.343±0.015 Δ
失血性血虚自然恢复组	30.51±1.50 ^{**}	3.605±0.193 ^{**}	0.297±0.012 ^{**}
溶血性血虚模型组	22.74±1.18 ^{**}	2.655±0.207 ^{**}	0.464±0.012 ^{**}
溶血性血虚药物治疗组	35.05±4.49 Δ	2.973±0.379 Δ ^{**}	0.335±0.020 Δ
溶血性血虚自然恢复组	31.32±1.72 [*]	3.401±0.296 ^{**}	0.428±0.015 ^{**}
骨髓抑制性血虚模型组	22.08±1.58 [*]	1.846±0.155 ^{**}	0.239±0.010 ^{**}
骨髓抑制性血虚药物治疗组	35.85±1.95 [*] Δ	3.733±0.154 Δ ^{**}	0.281±0.011 Δ
骨髓抑制性血虚自然恢复组	30.51±2.90 ^{**}	3.095±0.165 ^{**}	0.209±0.021 [*]

注：与空白对照组比较：^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01；与自然恢复组比较： Δ P<0.01 (以下相同)

3.3 外周血细胞学检测

(1) 失血性血虚证模型动物红细胞数、血红蛋白数和白细胞数均明显降低，网织红细胞数均明显增高。四物汤治疗组红细胞、血红蛋白和白细胞迅速恢复正常，血虚证自然对照组缓慢恢复。四物汤治疗组网织红细胞计数比自然恢复组明显升高，两组均高于空白对照组。

(2) 溶血性血虚证模型动物红细胞数和血红蛋白数均明显降低，白细胞升高，网织红细胞数明显增高；四物汤治疗组红细胞、血红蛋白和白细胞迅速恢复正常，血虚证自然恢复组缓慢恢复，四物汤

治疗组网织红细胞计数比自然恢复组明显升高，两组均高于空白对照组。

(3) 骨髓抑制性血虚证模型动物红细胞数和血红蛋白数明显降低，白细胞降低尤为明显，网织红细胞数降低；与自然恢复组比较四物汤治疗组对升高红细胞、血红蛋白、白细胞和网织红细胞作用明显，与失血性血虚证和溶血性血虚证两组比较，骨髓抑制性血虚模型网织红细胞数降低，自然恢复组和四物汤治疗组红细胞、血红蛋白均低于空白对照组，白细胞不能恢复。

以上各项指标差异有显著性。结果见表 2。

表 2 血虚证模型动物红细胞、血红蛋白、白细胞和网织红细胞变化 (n=10, x±s)

组别	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	WBC ($\times 10^9/L$)	Rct (%)
空白对照组	7.41±0.18	141.8±10.3	14.53±0.87	2.43±0.20
失血性血虚模型组	5.28±0.29 ^{**}	111.3±11.0 [*]	9.44±1.01 ^{**}	4.14±0.13 ^{**}
失血性血虚药物治疗组	7.32±0.13 Δ	140.0±10.7 Δ	13.91±1.17 Δ	5.36±0.32 Δ ^{**}
失血性血虚自然恢复组	6.21±0.28 ^{**}	126.0±6.5 ^{**}	10.54±0.97 ^{**}	3.97±0.24 [*]
溶血性血虚模型组	5.14±0.29 ^{**}	118.9±13.7 ^{**}	22.31±2.29 ^{**}	4.23±0.16 ^{**}
溶血性血虚药物治疗组	7.33±0.12 Δ	134.0±12.3 Δ	17.46±1.53 Δ	5.06±0.13 Δ ^{**}
溶血性血虚自然恢复组	6.24±0.26 ^{**}	122.0±8.3 ^{**}	19.96±1.26 ^{**}	2.89±0.11 ^{**}
骨髓抑制性血虚模型组	5.02±0.24 ^{**}	116.1±14.9 ^{**}	7.22±1.64 ^{**}	1.73±0.13 ^{**}
骨髓抑制性血虚药物治疗组	6.44±0.26 Δ [*]	119.9±12.3 Δ ^{**}	9.03±1.26 Δ ^{**}	2.25±0.21 Δ
骨髓抑制性血虚自然恢复组	6.05±0.24 ^{**}	107.3±8.7 ^{**}	7.05±0.82 ^{**}	1.97±0.12 ^{**}

3.4 骨髓有核细胞测定

骨髓有核细胞数是直接反应骨髓造血功能状态的。3种血虚模型骨髓有核细胞数均降低。

(1) 失血性血虚证动物模型四物汤治疗组小鼠骨髓有核细胞数升高高于空白对照组，与自然恢复

组有显著性差异。

(2) 溶血性血虚证动物模型四物汤治疗组小鼠骨髓有核细胞数升高高于空白对照组，与自然恢复组有显著性差异。

(3) 骨髓抑制性血虚证模型小鼠骨髓有核细胞

数极显著降低，与自然恢复组比较，四物汤治疗组骨髓有核细胞数升高有显著差异，但两组均不能恢复正常。

结果详见表 3。

3.5 骨髓细胞增殖周期的变化

(1) 溶血性血虚可促进骨髓造血干细胞由 G₁ 期向 G₂/S 期转化，即可以促进骨髓造血干细胞造血，与自然恢复组比较，四物汤治疗组能促进更多的造血干细胞由 G₁ 期向 G₂/S 期转化，两组 G₂/S

表 3 血虚证模型动物治疗前后骨髓有核细胞比较 (n = 10, x ± s)

组别	BMC (×10 ⁵ /L)
空白对照组	10.08 ± 1.27
失血性血虚模型组	8.98 ± 0.62**
失血性血虚药物治疗组	11.56 ± 1.02Δ**
失血性血虚自然恢复组	9.68 ± 0.88
溶血性血虚模型组	8.16 ± 0.24**
溶血性血虚药物治疗组	11.54 ± 1.09Δ**
溶血性血虚自然恢复组	9.44 ± 0.53
骨髓抑制性血虚模型组	6.32 ± 0.45**
骨髓抑制性血虚药物治疗组	7.86 ± 0.49Δ**
骨髓抑制性血虚自然恢复组	6.44 ± 0.29**

期细胞均高于空白对照组。

(2) 骨髓抑制性血虚则抑制骨髓造血干细胞由 G₁ 期向 G₂/S 期转化，使骨髓造血干细胞增殖分化能力减弱，四物汤治疗组能改善这种抑制作用。

(3) 失血性血虚可促进骨髓造血干细胞由 G₁ 期向 G₂/S 期转化，即可以促进骨髓造血干细胞造血，四物汤治疗组促进这种转化的能力更强，能使更多的造血干细胞由 G₁ 期向 G₂/S 期转化。两组 G₂/S 期细胞均高于空白对照组。

以上各项指标差异有显著性 (表 4)。

表 4 血虚证模型动物治疗前增殖周期比较 (n = 10, x ± s)

组别	G ₁ (%)	S+G ₂ (%)
空白对照组	89.33 ± 1.11	10.66 ± 0.82
失血性血虚模型组	82.41 ± 1.91	17.56 ± 1.80**
失血性血虚药物治疗组	80.31 ± 1.49	19.63 ± 1.64Δ**
失血性血虚自然恢复组	84.66 ± 1.98	16.32 ± 1.05**
溶血性血虚模型组	80.70 ± 1.81	19.30 ± 1.12**
溶血性血虚药物治疗组	81.36 ± 1.44	18.64 ± 1.64Δ**
溶血性血虚自然恢复组	85.51 ± 1.72	14.48 ± 0.87**
骨髓抑制性血虚模型组	89.62 ± 3.11	10.39 ± 0.28
骨髓抑制性血虚药物治疗组	87.88 ± 1.93	13.11 ± 1.01**
骨髓抑制性血虚自然恢复组	89.41 ± 1.85	10.58 ± 1.77

4 讨论

4.1 中医对血虚证的认识

血是循行于脉中的富有营养的红色的液态物质，是构成人体和维持人体生命活动的基本物质之一^[9]。血虚证是指血液不足或血液的濡养功能减退的一种病理状态。血液亏损，脏腑百脉失养，表现为全身虚弱的症候^[1]。

祖国医学所指的血虚内涵丰富，从病因、临床特点与现代医学的贫血有密切的关系。现代医学中贫血^[10]包括低增生性 (再生障碍性贫血、骨髓病性贫血、肾衰贫血、慢性病贫血、内分泌缺乏等)、红细胞大量破坏或丢失 (溶血性贫血和失血性贫血)、成熟异常 (缺铁性贫血、巨幼细胞性贫血、骨髓增生异常、地中海贫血和铁幼粒贫血等)。经研究发现^[8,11]，血虚证的症状在贫血患者中有较高的出现率，贫血的中医证型分布以血虚证为主。因此可以借鉴现代医学对贫血的研究方法来帮助认识血虚证的本质。

4.2 血虚证与实验结果的关系

根据血细胞的发生原理^[9]，本次实验选择了与血液营血功能密切相关的实验指标^[12]来研究血虚的病理生理变化。外周血中选择了红细胞、血红蛋白、白细胞反映血虚时血细胞在数量和功能上的变化，为了研究血虚对骨髓造血功能和血发生的影响，反应骨髓细胞增殖状态，选择了外周血网织红细胞 (Rct) 计数、骨髓有核细胞计数，骨髓细胞中 G₂/S 细胞比例，同时选择了和造血功能密切相关的肝脏和脾脏作为实验指标。

4.2.1 共性 血虚时动物口唇、眼睑、耳廓淡白，竖毛，被毛枯槁，精神萎靡，倦困少动，3 种血虚小鼠体重、RBC、Hb、骨髓有核细胞数均显著降低。

4.2.2 个性

(1) 失血性血虚模型组和溶血性血虚模型组脾脏湿重、网织红细胞数、G₂/S 期细胞比例升高，两组自然恢复组和四物汤治疗组以上指标均升高，与空白对照组无差异或高于空白对照组，且四物汤治疗组比自然恢复组升高快且具有显著差异。

(2) 骨髓抑制性血虚组与溶血性血虚组和失血性血虚组有完全不一致的个性特点：所有实验指标下降快，降幅高于其余两组；四物汤治疗组和自然恢复组较其余两组恢复慢；四物汤治疗效果差。肝

脏脾脏均萎缩,红细胞、血红蛋白、白细胞、网织红细胞、BMC 和 G_2/S 期细胞数均低于空白对照组,经四物汤治疗和自然恢复均不能恢复至正常。

4.3 血虚小鼠的标准化动物模型和标准化指标

目前五脏证候实验指标研究趋向采用综合指标,即筛选非特异性指标,进行特异性组合,逐步建立能反映证候本质,又可区别于他证的定性定量的综合实验诊断标准,辅助中医四诊,达到提高中医辨证论治水平。对血虚证的研究亦是如此。建立一个标准化的血虚证模型,确定血虚证的标准化指标对中医药现代化研究是非常重要的。

遵循人类疾病动物模型的设计原理,在《医学实验动物学》指导下,依据中医传统理论中血虚证的病因及症状,本实验分别复制和探讨了 3 种常见的血虚证动物模型,力求建立符合原则的人类疾病模型。

实验结果证实,本次实验造模的方法符合中医基础理论,模型症状符合中医辨证要求,模型经重复实验证实是稳定、可重复的,同时应用相对应的药物反证治疗,因此本实验的造模方法是符合标准化动物模型要求的。在此基础上,总结出本实验提供的三种动物模型及其检测指标可以作为标准化血虚小鼠模型的造模方法和标准化检测指标。

4.4 四物汤的作用机制

四物汤是传统中医治疗血虚证的基本方。据《太平惠民和剂局方》记载,由当归(10 g)、川芎(6 g)、白芍(10 g)和熟地黄(15 g)四味药组成。“四物汤,物,类也,四者相类而仍各具一性,各建一功,并行不悖,芎归入少阳主升,芍药入厥阴主降,芎蔚郁者达之,当归者虚者补之,芍药实者泄之,地黄急者缓之。”本方组成共四味药物,故名四物汤^[13]。本实验提示:四物汤能促进血虚小鼠骨髓有核细胞由 G_1 期向 G_2/S 转化,促进血

虚小鼠的 Hb、RBC、网织红细胞、骨髓有核细胞数上升。说明四物汤对血虚小鼠造血系统有促进造血的作用,这与传统中医认为四物汤是治疗血虚证的基本方之一相符,同时也为四物汤治疗血虚证提供了有价值的实验室科学依据。但四物汤对于血发生的影响是直接作用于造血干细胞增殖分化时的某一阶段来促进机体造血功能,还是促进造血因子的分泌增加,改善造血微环境,是需要进一步研究的课题。

5 参考文献

- [1]李得新. 气血论[M]. 辽宁科学技术出版社, 1990: 174~175.
- [2]贲长恩. 血虚动物模型的进一步探讨[J]. 中医杂志, 1981, (6): 69~72.
- [3]贲长恩. 血虚动物模型的创建及实验研究[J]. 北京实验动物科学与管理, 1994, 11 (3): 5~10.
- [4]夏洪生, 张永锋, 刘立昌, 等. 归蓉补血片对血虚证动物模型作用的实验研究[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27 (3): 334~336.
- [5]樊彦, 王钦茂, 宿秀兰. 当归养血口服液补血作用实验研究[J]. 基层中药杂志, 1998, 12 (2): 49~50.
- [6]孙汉英, 舒砚君, 刘文励, 等. 川芎嗪改善免疫诱导再生障碍性贫血小鼠骨髓微环境作用的研究[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19 (4): 178~180.
- [7]王来慈, 张志华, 钱金钰, 等. 三才注射液对小鼠红系细胞的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18 (3): 165~167.
- [8]秦林, 刘更生, 宋月芹. 试论四物汤血虚证与贫血症的关系[J]. 中国中医基础杂志, 2004, 10 (2): 48~52.
- [9]成令忠主编. 组织学(第4版)[M]. 人民卫生出版社, 1994: 115~117.
- [10]谢鸣. 中医方剂的现代研究[M]. 学苑出版社, 1997: 274~275.
- [11]王建青. 血虚证与贫血的关系研究[J]. 中国中医药信息杂志, 1997, 4 (12): 24~25.
- [12]武淑兰. 现代血液病诊疗手册[M]. 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1998: 372~373.
- [13]许济群. 方剂学(第5版)[M]. 上海科技出版社, 1985: 89~90.