



阿霉素诱发肾性水肿病症大鼠模型的建立

王洪玉¹, 陈平平¹, 董婉茹¹, 高鑫¹, 苑艺蕾¹, 刘树民¹, 汪娜²

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 齐齐哈尔医学院, 齐齐哈尔 161000)

【摘要】 目的 考察复制大鼠的肾性水肿(肾阴虚、肾阳虚水肿)病症结合模型的可行性。方法 采用灌胃甲状腺素片及尾静脉注射阿霉素的方法制造大鼠肾阴虚水肿模型, 肌注氢化可的松和尾静脉注射阿霉素方法制造大鼠肾阳虚水肿模型。通过观察模型大鼠体征变化, 24 h 尿蛋白含量、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺(T₄)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、雌二醇(E₂)及睾酮(T)等指标含量, 判断模型是否成功。结果 阴虚水肿组动物出现多动、脱毛、大便干结、体重降低和体温升高等临床表现, 与空白组比较 T₃、T₄、cAMP、E₂、24h 尿蛋白含量明显升高, cGMP、T 含量降低, cAMP/cGMP 比值显著升高, 且各项指标均差异具有显著性($P < 0.05$)。阳虚水肿组动物则出现活动减少、大便溏泻、体重和体温下降等体征变化, 与空白组相比, T₃、T₄、cAMP、E₂ 含量显著降低, cGMP、T、24h 尿蛋白含量明显升高, cAMP/cGMP 比值降低, 且各项指标均差异具有显著性($P < 0.05$)。结论 分别由甲状腺素片联合阿霉素、氢化可的松注射液联合阿霉素诱导的动物病症结合模型, 符合中医证型诊断下肾阴虚、阳虚水肿病症, 造模方法可行。

【关键词】 肾阴虚; 肾阳虚; 水肿; 模型; 动物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 12-0005-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.002

Establishment of rat models of adriamycin-induced renal edema based on disease combined with TCM syndrome type

WANG Hong-yu¹, CHEN Ping-ping¹, DONG Wan-ru¹, GAO Xin¹, YUAN Yi-lei¹, LIU Shu-min¹, WANG Na²

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Qiqihar Medical University, Qiqihar 161000)

【Abstract】 Objective To study the feasibility of rat models of renal edema based on disease combined with traditional Chinese medicine syndrome yin-deficiency and yang-deficiency types. **Methods** Gastric gavage of thyroxine and tail vein injection of Adriamycin were performed to induce a rat model of kidney Yin deficiency edema, and intramuscular injection of hydrocortisone and tail vein injection of Adriamycin were used to establish a rat model of kidney Yang deficiency edema. The 24 h urine protein content, triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), estradiol (E₂) and testosterone (T) and other indicators were assayed to determine whether the rat models were successfully established. **Result** The rats of Yin deficiency edema group had clinical presentation such as hyperactivity, hair loss, dry stool, weight loss and temperature rise. Compared with the blank group, T₃, T₄, cAMP, E₂, and 24 h urinary protein levels were significantly increased, cGMP and T content decreased, and cAMP/cGMP ratio was significantly increased, showing significant differences ($P < 0.05$ for all). The Yang deficiency edema animals displayed reduced activity, diarrhea, decreased body weight and body temperature, and other signs of disease. Compared with the blank group, T₃, T₄, cAMP, and E₂ contents were

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划“973 计划”(2013CB531804); 黑龙江省高等学校科技创新团队—研究方向中药药性理论研究。

[作者简介] 王洪玉(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药性理论研究。E-mail: 1477548148@qq.com。

[通讯作者] 刘树民, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药药性理论研究。E-mail: keji-liu@163.com。

significantly decreased, cGMP, T, and 24 h urinary protein levels were significantly increased, and cAMP/cGMP ratio decreased, showing significant differences ($P < 0.05$ for all). **Conclusions** The rat model of renal edema disease combined with TCM syndrome yin-deficiency was successfully induced by thyroxine in combination with Adriamycin, and the rat model of renal edema based on disease combined with TCM syndrome yang-deficiency is successfully established by administration of hydrocortisone plus Adriamycin. These two rat models demonstrate similar clinical manifestations of human renal edema based on disease combined with TCM syndrome yin-deficiency and yang-deficiency, respectively, therefore, may serve as useful tools for further research on this disease.

【Key words】 Kidney yin deficiency; Kidney yang deficiency; Renal edema; Rat models; Traditional Chinese medicine

随着中医药事业的迅猛发展,建立中医证候下的动物模型成为中医药研究领域中之重的难点问题。客观的说,将复杂的中医辨证理论转化为临床上显而易见的指标数据是中医药发展的瓶颈所在。所以在中医理论支撑下,建立能够真实反映病症特征、且具有较好稳定性和重复性的动物模型以满足中医药研究的需求,是中医证候动物模型研究的重要任务^[1]。

中医的辨证论治理论将肾虚水肿划分为肾阳虚水肿和肾阴虚水肿两类,肾阳虚水肿是指先天禀赋不足,后天失养,或老年体衰,或久病失养以致肾阳虚衰,膀胱气化失司,水液停留体内,是肾病晚期比较常见症状;肾阴虚水肿多由禀赋不足,肾阴素亏,或久病伤阴,波及肾阴所致,水湿潴留,湿浊内生,也是肾病晚期比较常见症状。往往实验室所复制的动物模型未能真实客观地反映中医证候特征,且稳定性差,故本实验选择灌胃甲状腺素片及尾静脉注射阿霉素的方法制造大鼠肾阴虚水肿模型,肌注氯化可的松注射液联合尾静脉注射阿霉素的方法复制大鼠肾阳虚水肿模型,实验过程重复 3 次,以期获得稳定、可复制的肾阴虚、肾阳虚水肿症候特征的动物模型,并建立 SOP,为中医肾虚症本质下水肿病的研究提供科学、可靠的造模方法。现将实验结果报道如下。

1 材料

1.1 动物及分组

取 SD 种雄性大鼠 40 只,SPF 级,体重(200 ± 20)g,由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供,生产许可证号:【SCXK(黑)2013-004】,实验动物使用许可证号:【SYXK(黑)2013-012】,室温为(22 ± 1)℃,相对湿度为(65 ± 5)%,实验动物自由摄食饮水。将大鼠随机分成 4 组:空白组、水肿组、肾阴虚水肿组、肾阳虚水肿组,每组 10 只。

1.2 器材及试剂

全自动尿液分析仪:Clinitec Advantus™(德国);酶标仪:M200 PRO(奥地利);AL204 电子分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);MC-246 电子体温计(欧姆龙大连有限公司)。甲状腺素片(上海长城药业有限公司,40 mg/片,生产批号:20140501);氯化可的松(河南润弘制药股份有限公司,10 mg/2 mL,生产批号:1407081);注射用盐酸多柔比星(浙江海正药业股份有限公司,10 mg/瓶,生产批号:15008511);大鼠三碘甲状腺原氨酸(T₃)、大鼠甲状腺(T₄)、大鼠环磷酸腺苷(cAMP)、大鼠环磷酸鸟苷(cGMP)、大鼠雌二醇(E₂)及大鼠睾酮(T)酶联免疫试剂盒(生产批号:20151210),以上酶联免疫试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。甲状腺素片混悬溶液的制备:将甲状腺素片置于研钵中研磨成粉末,然后用生理盐水溶解,配成 15 mg/mL 甲状腺素片混悬溶液,使用前混匀。阿霉素溶液的制备:阿霉素以 0.9% 氯化钠溶液溶解稀释成 1 mg/mL 注射液。

2 方法

2.1 阿霉素水肿模型^[2-5]

造模前大鼠于代谢笼内适应性喂养 3 d,首次尾静脉注射阿霉素按照 4 mg/kg 大鼠体重量,第 2 次于 7 d 后以同样的方法按照 3.5 mg/kg 体重注射,注射 5 d 后检测 24 h 尿蛋白阳性为模型成功的标志。空白组注射等量的生理盐水。

2.2 大鼠肾阴虚水肿模型建立^[2-6]

给药前大鼠于代谢笼内适应性喂养 3 d,每日 9:00 按照 15 mg/100 g 体重灌胃给予甲状腺素混悬溶液,自由饮水,饮食,连续 21 d。首次尾静脉注射于第 1 d 下午 14:00 按照 4 mg/kg 体重注射阿霉素溶液,第 2 次于 7 d 后以同样的方法按照 3.5 mg/kg

体重注射,注射 5 d 后检测 24 h 尿蛋白阳性为模型成功的标志。

2.3 大鼠肾阳虚水肿模型建立^[2-5,8]

给药前大鼠于代谢笼内适应性喂养 3 d,每日 9:00 按照 2.5 mg/100 g 体重臀部肌肉注射氢化可的松,自由饮水,饮食,连续 15 d。尾静脉注射阿霉素同阴虚水肿组相同。

2.4 统计学方法

本实验采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

3 结果

3.1 一般行为学变化

阴虚水肿组大鼠在造模过程中,逐渐出现消瘦、多动、易怕惊人,体重增长减慢,背部皮毛枯槁、脱毛,饮水量增加,肛温升高,大便干结等症状,比较符合中医肾阴虚症状。而阳虚水肿组大鼠在造模期间,体重增长缓慢,肛温下降,活动减少,反应迟钝,蜷缩弓背,畏寒怕冷,体毛枯疏并失去光泽,大便稀溏,小便清长,符合肾阳虚症状。

3.2 各组大鼠体重变化

实验数据中可以看出,实验第 2 周起两模型组大鼠的体重明显下降,阴虚水肿组较空白组体重明显下降,具有统计学意义 $P < 0.01$;阳虚水肿组较空白组体重显著降低,具有统计学意义 $P < 0.01$;水肿组较空白组无显著性变化。实验结果见表 1。

3.3 各组大鼠体温变化

实验第 2 周时,各组大鼠体温出现差异。阴虚水肿组较空白组比较,大鼠体温明显升高,具有统计学意义 $P < 0.01$,阳虚水肿组较空白组体温下降,具有统计学意义 $P < 0.05$,水肿组较空白组无显著性差异。实验结果见表 2。

3.4 大鼠血浆 cAMP、cGMP 比较^[7]

血浆环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)是一对相互拮抗而又相互制约的物质,它们对细胞功

能处于稳定状态具有双向控制调节作用,与祖国医学的阴阳学说具有相似之处,多数研究结论认为 cAMP 含量升高,说明机体处于一种阴虚状态,反之则为阳虚。阴虚水肿组较空白组 cAMP 含量上升,cAMP/cGMP 比值显著升高,具有统计学意义 $P < 0.05$;阳虚水肿组较空白组 cAMP 含量降低,cGMP 含量上升,cAMP/cGMP 比值显著降低,具有统计学意义 $P < 0.01$;与空白组比较,水肿组无显著性变化。实验结果(表 3)。

3.5 大鼠血清 T3、T4 比较^[9]

甲状腺激素的基本功能是诱导新生蛋白质包括特殊酶系的合成,调节蛋白质、碳水化合物和脂肪,以及水、盐和维生素的代谢。甲状腺激素过量使用会诱导下丘脑—垂体—肾上腺轴、甲状腺轴、性腺轴不同程度的功能紊乱,使动物出现躁动、出汗多及怕热等症状。与空白组相比,阴虚水肿组 T3、T4 含量显著性升高,具有统计学意义 $P < 0.01$,阳虚水肿组较空白组 T3、T4 含量降低,差异无显著性;水肿组较空白组 T3、T4 含量升高,差异无显著性。实验结果(表 4)。

3.6 大鼠血清 E2、T 比较

实验结果中可以看出,阴虚水肿组较空白组 E2 含量升高,E2/T 比值上升,具有统计学意义 $P < 0.05$,阳虚水肿组较空白组 E2 含量降低,E2/T 比值显著性下降,具有统计学意义 $P < 0.01$;水肿组较空白组无显著性变化。实验结果(表 5)。

3.7 各组大鼠 24 h 尿蛋白含量变化

空白组大鼠 24 h 尿蛋白定量前后无显著性变化,各水肿组在造模后均出现尿蛋白含量增加,且所示数值达到了中医肾病水肿诊断标准^[10]。造模第 2 周时,水肿组、阴虚水肿组较空白组尿蛋白含量升高,具有统计学意义 $P < 0.05$,阳虚水肿组较空白组尿蛋白含量升高,具有统计学意义 $P < 0.01$;造模第 3 周,水肿组、阴虚水肿组、阳虚水肿组较空白组尿蛋白含量显著上升,具有统计学意义 $P < 0.01$ 。实验结果(表 6)。

表 1 3 组大鼠体重比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Comparison of body weight of rats in the three groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	0 d	7 d	14 d	21 d
水肿组 Edema group	241.1 ± 9.480	245.6 ± 6.149	276.3 ± 3.683	279.9 ± 3.639
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	233.6 ± 8.017	237.6 ± 4.624	244.4 ± 12.39 ^{▲▲}	251.2 ± 12.21 ^{▲▲}
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	238.7 ± 8.603	241.2 ± 8.176	234.5 ± 4.503 ^{▲▲}	240.6 ± 7.471 ^{▲▲}
空白组 Control group	238.4 ± 10.22	241.9 ± 7.519	272.3 ± 5.012	276.1 ± 6.173

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

Note. Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠体温比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 2 Comparison of the body temperature in the rats of three groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	0 d	7 d	14 d	21 d
水肿组 Edema group	36.93 ± 0.20	37.06 ± 0.23	37.20 ± 0.26	37.15 ± 0.38
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	37.14 ± 0.42	37.38 ± 0.68	38.08 ± 0.34 ^{▲▲}	38.04 ± 0.36 ^{▲▲}
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	36.96 ± 0.24	37.04 ± 0.35	36.74 ± 0.27 [▲]	36.69 ± 0.28 [▲]
空白组 Control group	36.88 ± 0.23	36.99 ± 0.29	37.11 ± 0.30	37.05 ± 0.41

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ Note: Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 表 3 各组大鼠 cAMP、cGMP 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 3 Comparison of cAMP and cGMP contents in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	环磷酸腺苷 cAMP	环磷酸鸟苷 cGMP	cAMP/cGMP
水肿组 Edema group	6.98 ± 1.73	16.80 ± 3.33	0.43 ± 0.17
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	10.31 ± 3.25 [▲]	14.56 ± 2.06	0.72 ± 0.27 [▲]
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	5.41 ± 1.58 [▲]	18.67 ± 2.43 ^{▲▲}	0.29 ± 0.10 ^{▲▲}
空白组 Control group	7.43 ± 2.49	15.10 ± 2.95	0.49 ± 0.16

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ Note: Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 表 4 各组大鼠 T3、T4 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 4 Comparison of T3 and T4 content in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	T3	T4
水肿组 Edema group	47.99 ± 19.21	174.07 ± 45.50
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	54.08 ± 5.62 ^{▲▲}	184.08 ± 17.98 ^{▲▲}
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	34.44 ± 8.18	133.23 ± 49.18
空白组 Control group	35.64 ± 14.90	148.99 ± 25.70

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ Note: Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 表 5 各组大鼠 E2、T 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 5 Comparison of E2 and T content in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	E2	T	E2/T
水肿组 Edema group	12.13 ± 9.79	143.45 ± 46.29	0.09 ± 0.07
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	21.11 ± 13.09 [▲]	124.20 ± 31.37	0.17 ± 0.10 [▲]
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	4.88 ± 3.23 ^{▲▲}	180.31 ± 30.23 [▲]	0.03 ± 0.02 ^{▲▲}
空白组 Control group	11.34 ± 6.30	140.90 ± 42.13	0.08 ± 0.04

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.05$ Note: Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 表 6 各组大鼠 24 h 尿蛋白含量动态变化($\bar{x} \pm s, \text{mg}/24 \text{ h}$)Tab. 6 Comparison of 24 h urine protein excretion in the rats ($\bar{x} \pm s, \text{mg}/24 \text{ h}$)

组别 Groups	0 d	7 d	14 d	21 d
水肿组 Edema group	1.62 ± 1.18	3.69 ± 3.33	11.34 ± 8.40 [▲]	18.63 ± 10.05 ^{▲▲}
阴虚水肿组 Kidney Yin deficiency edema	2.07 ± 1.20	5.22 ± 4.93	17.46 ± 16.20 [▲]	24.03 ± 18.25 ^{▲▲}
阳虚水肿组 Kidney Yang deficiency edema	3.78 ± 2.11	5.31 ± 5.28	13.68 ± 8.29 ^{▲▲}	22.68 ± 15.15 ^{▲▲}
空白组 Control group	2.61 ± 2.34	2.70 ± 1.70	3.69 ± 2.98	4.14 ± 3.53

注:与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ Note: Compared with the control group,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

4 讨论

近年来随着中医药事业的迅猛发展,在中医药科研中模拟中医临床症候的动物病理模型的建立越来越重要,无论是基础研究还是应用研究,动物模型已经成为研究的一种重要手段^[11]。本实验模型建立中,选用通过调节下丘脑-垂体-肾上腺轴、甲

状腺素轴的经典给药方式建立大鼠的肾阴虚、肾阳虚模型,在大鼠肾虚的体质下尾静脉注射阿霉素诱导大鼠肾源性水肿,从而完成中医病症结合模型。实验过程中可以观察到,阴虚水肿组大鼠在造模后逐渐出现消瘦、多动、易怕惊,体重增长减慢,背部皮毛枯槁、脱毛,饮水量增加,肛温升高,大便干结等症状,表明大鼠体内新陈代谢速率加快、组织

器官功能增强,并且通过生化指标的分析,大鼠血清中的 T3、T4、E2 含量升高,cAMP/cGMP 比值显著升高,表明下丘脑—垂体—肾上腺轴、甲状腺轴机能亢进,大鼠机体的能量代谢水平升高,符合肾阴虚证的表征。此外,与空白组比较阴虚水肿组尿蛋白含量显著性增加,所示数值达到了中医肾病水肿诊断标准,表明肾源性水肿诱导成功。以上所述说明肾阴虚水肿模型复制成功。

通过观察,阳虚水肿组大鼠造模后出现体重增长缓慢,肛温下降,活动减少,反应迟钝,蜷缩弓背,畏寒怕冷,体毛枯疏并失去光泽,大便稀溏,小便清长等表现^[12],与肾阳虚证症状类似;从生化指标的角度分析可得出,阳虚水肿组大鼠 T3、T4 和 E2 含量均下降,cAMP/cGMP 比值明显降低,与肾阳虚证的表征相一致。此外,阳虚水肿组尿蛋白含量增加,表明机体处于水肿状态,肾源性水肿诱导成功。综上所述,无论是从基础代谢水平还是到生化指标的含量变化,都印证了肾阴虚水肿、肾阳虚水肿模型复制成功,所以采用甲状腺素片联合阿霉素制造大鼠肾阴虚水肿模型、氢化可的松联合阿霉素制造大鼠肾阳虚水肿模型方法是稳定、可行的。

参考文献:

- [1] 林志健,张冰,刘小青,等. 中医证候动物模型评价研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2217-2221.
- [2] 杨维娜,于琳华,郭尚温,成少利,等. 改良阿霉素肾病大鼠模型的建立[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2009, 30(4): 445-448, 452.
- [3] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats; sequence of pathologic events [J]. Lab invest, 1982, 46(1): 16-23.
- [4] de Mik SML, Hoogduijn MJ, de Bruin RW, et al. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis; the role of animal models [J]. BMC Nephrology, 2013, 14(1): 74.
- [5] Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, et al. Acatlasemic mice are mildly susceptible to adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and glomerulosclerosis [J]. BMC Nephrology, 2012, 13(1): 14.
- [6] 付晓伶,方肇勤. 阴虚证动物模型的造模方法及评析[J]. 上海中医药大学学报, 2004, 18(2): 51-54.
- [7] 梁汝圣,徐宗佩. 大鼠肾阴阳虚模型建立方法[J]. 吉林中医药, 2008, 28(9): 685-687.
- [8] 苟小军,韩宝侠,王朝廷,等. 肾阳虚证造模方法考察[J]. 吉林中医药, 2009, 29(9): 814-815.
- [9] 卢文丽,方肇勤,潘志强,等. 小鼠气、血、阴、阳、虚等八种模型四诊的比较和评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6): 433-438.
- [10] 周仲瑛,孙伟正,徐京育,等. 中医内科学 2 版. [M]. 北京:中国中医药出版社,2008:355-359.
- [11] 吴启端,熊带水,梁文能. 肾阳虚动物模型的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(6): 54-56.
- [12] 肖静,何立群,高建东,等. 腺嘌呤与氢化可的松大鼠肾阳虚模型造模方法比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 77-80.

[修回日期]2016-07-13