

• 理论研究 •

大鼠宏观体征采集探讨证候的方法学评述^{*}

刘 蕾 郭淑贞 陈建新 仇 琪 李 春 王 伟[#]

(北京中医药大学 北京 100029)

摘要:从三个方面探讨大鼠宏观体征采集的内容和方法。首先是从外观表征入手,通过研究者直接观察获得模型动物的四诊信息,如形体、活动、皮毛色泽、眼睛、尾部、爪甲、唇、二便等;其次通过借助仪器获得某方面的数值或图像等变化来反映动物宏观体征,如测定体温、心电图、电生理等;最后从方法学角度来评价大鼠宏观体征,具体分为定量方法和半定量方法。通过对宏观体征的观察采集,探索出一套利用动物模型自身的宏观体征来评定其证候属性的思路和方法。

关键词:宏观体征;四诊信息;大鼠

中图分类号:R2-03

Methodology of studying syndromes based on macroscopic physical signs collected from rats^{*}

LIU Lei GUO Shu-zhen CHEN Jian-xin QIU Qi LI Chun WANG Wei[#]

(Beijing University of Chinese Medicine Beijing 100029)

Abstract: The content and methods of macroscopic physical signs collected from rats were discussed from three aspects including the information obtained by TCM four diagnostic methods based on the characterization of the appearance such as body activities skin and fur eyes tail paw nail lips urine and stool the changes of value and images obtained by using some instruments such as body temperature electrocardiogram and electrophysiology reflecting the macroscopic physical signs the evaluation of the macroscopic physical signs based on methodology including methods of quantification and semi-quantification. The train of thought and methods were found out to review the macroscopic physical signs of animal model through the observation and collection of these signs.

Key words: macroscopic physical signs information obtained by TCM four diagnostic methods rats

动物模型被广泛用于中医证候生物学基础的研究,但如何使中医临床上的四诊信息准确地体现在动物模型上是当前中医证候动物模型发展的瓶颈。因此,必须探索出一套利用动物模型自身的宏观体征来评定其证候属性的思路和方法。本文以证候研究中最常用的大鼠为例,探讨其在各证候模型中的宏观体征的采集内容及方法。

1 宏观体征采集内容及方法

1.1 外观表征的采集

大鼠外观表征的观察包括以下几个方面:形体、

活动、皮毛色泽、眼睛、尾部、爪甲、唇、二便等。这些外观体征是研究者能通过直接观察得到的关于动物状态的信息,所运用的观察方法也与临床上的望诊相似。在以往动物实验中发现,大鼠与人类相似,也具有四诊和证候的变化。

1.1.1 形体

形体观察包括观察形体虚实、精神状态、寒热等。从形体能够观察到动物最基本的生命状态。形体与五脏相应。一般说来,五脏强壮的,形体也强健;五脏虚弱的,外形也衰弱。正常大鼠一般精神状

刘 蕾,女,博士,在北京中医药大学博士后流动站工作

[#]通讯作者:王 伟,男,教授,博士生导师

^{*} 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2003CB517105)

态良好, 形体正常, 而在各证候模型中, 动物形体亦出现相应的改变。如“阳虚”模型的大鼠会出现身体羸瘦、肢冷等表现^[1]; “脾虚”模型的大鼠出现身体消瘦表现^[2]; “阴虚内热”模型的大鼠往往形体瘦小^[3]。

1.1.2 活动

对动物活动方面的观察内容主要包括活动度、运动步态等。正常大鼠活动灵巧, 反应敏捷, 抓取时抵抗适中。而“虚寒证”动物模型则出现安静少动、行动迟缓、畏寒、蜷缩、扎堆等乏力的表现; “阳虚”模型的大鼠肢体蜷缩、少动; “阴虚内热”模型的大鼠常出现惊恐不安, 在笼内乱跳乱窜, 表现为高度的惊恐兴奋。一些特殊的证候模型, 其活动上也会出现特征性的变化。如在中风后遗症“气虚血瘀”大鼠模型中会出现一侧上肢内收, 无力, 攀爬鼠笼时身体向一侧倾斜, 下肢外展, 内收困难, 走路或跳跃时呈跛行状态, 提起鼠尾时大鼠不能正常卷起身体, 只能不停抖动身体^[4]。

1.1.3 皮毛

观察动物皮毛包括皮毛颜色、毛皮形态及光泽度的变化。皮毛为一身之表, 是机体抗御外邪的屏障, 其变化可反映出动物的营养状况和气血的盛衰, 以及肺气的强弱。因此皮毛是大鼠宏观体征观察中非常重要的研究内容。正常时大鼠皮毛光泽, 毛态柔顺, “脾气虚”出现背毛蓬松无光泽、掉毛^[5]; 而当“阳虚”时即出现毛松、耸毛; “阴虚”时出现毛色枯黄易掉, “阴虚内热”时则皮毛干枯无光泽; “气虚血瘀”时出现毛发黯淡无光。

1.1.4 眼睛

精神活动, 往往流露于目光, 故前人有“神藏于心, 外候在目”之说, 眼为肝之外窍, 但五脏六腑之精气皆上注于目, 故目的变化, 不仅与肝有关, 也与五脏六腑密切相关。望眼除在望神中有重要意义外, 还可测知五脏的变化。对眼睛的观察包括: 目形、眼神及眼色。正常大鼠目形正常、两眼有神, 而“心气虚”证时表现为眼眶变小^[6], “脾虚证”时表现为眼眯^[3], “气血双虚”证时出现闭目^[7], “虚寒证及寒凝血瘀”时目光无神, “肝阳上亢”时出现结合膜充血即目赤^[8]。

1.1.5 尾部

尾部特征为动物特有表征, 不同证候下其尾部颜色表现不同。正常尾部颜色为粉红, 在气虚血瘀证大鼠模型中观察到尾部自尖至根出现不同程度皮下青紫或痕斑的现象。“脾气虚”尾部白,

“气血双虚”鼠尾苍白, “气阴两虚”尾色暗, “络气虚滞”尾部淡红^[9], “寒凝血瘀”尾部紫暗^[10]。

1.1.6 爪甲、唇、舌

与临床体征相似, 大鼠的唇、舌、爪甲都能够反映全身气血运行的情况, 因此当血运不畅时, 唇、舌、爪甲就会有所体现。如“寒凝血瘀”时唇周发黑、爪甲紫暗, 气虚血瘀时口唇颜色发黯。

1.1.7 二便

大小便是重要的观察指标, 可通过大小便的形状、次数来判定动物脏腑的功能。正常大鼠排尿正常, 大便色黄不干。肝阴虚、肾阴虚证出现大便秘; 脾气虚证大便稀溏不成形、肛周污秽甚至脱肛; 虚寒证大便干; 寒凝血瘀大便湿烂。虚寒证出现小便清长, 寒凝血瘀表现为小便色清, 糖尿病气阴两虚证出现小便量多的表现。

1.1.8 呼吸

肺主气, 司呼吸, 故呼吸异常往往与肺有关, 常见于各种肺经病。此外, 发热、疼痛、气血瘀滞或气血不足, 以及其他脏腑功能失调等, 也可影响气机, 导致呼吸功能的变化。因此, 临床上不论何种疾病都要对呼吸进行检查。在证候模型的宏观体征采集中, 对呼吸的观察也是必不可少的。正常大鼠呼吸平稳, 而“肺气虚”的动物呼吸急促, 咳嗽频作, “寒凝血瘀”的动物呼吸微弱, “慢性心衰气虚血瘀”的大鼠呼吸困难。

1.2 借助仪器得到的宏观体征信息

很多主观体征在动物身上无法直接表达, 此时就需借助仪器通过一些量化的指标来描述动物的一些主观体征。仪器是人感觉器官的延伸, 仪器检测具有客观、准确的特点, 且其结果多以数字化表示, 因此利用仪器进行的表征观测可称之为定量研究。包括了动物体重、摄食量的称量, 电生理检测, 动物行为学检测等。动物表征研究应当尽可能采用适当的仪器检测以增加其准确性和客观性。具体内容如下。

1.2.1 体重、饲料消耗量

动物称重, 通过体质量的变化反映动物的形体状况。其借助的工具为电子天平, 并通过得到的数值计算各组动物的体重增加指数及饲料消耗指数。如“脾虚证”模型在造模过程中会出现体重减少。心气虚证时体重增加指数及饲料消耗指数下降。

1.2.2 体温

利用体温计测量动物体温, 对于大鼠多采用的是肛温, 也有研究者测量腋温。肛温测定的具体方

法是将体温计插入动物肛门 2 cm 测定肛温,精确度 0.1℃。体温计插入肛门后连续 10 s 温度无上升即读取并记录数值。测定腋温的方法是用电子体温计测右侧腹股沟温度。肾阴虚的模型出现肛温升高、经过 6 周超负荷游泳运动的阴虚内热的大鼠肛温有增高趋势、寒凝血瘀动物模型出现体温下降。

1.2.3 腹围

测定大鼠腹围,并结合体重测定腹围指数,即:腹围指数=大鼠腹围长度/大鼠体重,脾气虚证时腹围指数降低、虚寒证腹围指数也降低。

1.2.4 心电图

通过心电图记录心率及心律,体现脉象的至数与节律,从而达到切诊的目的。具体方法为:将动物浅麻醉后,背位固定于鼠板,连接心电图机,以 50 mm/s 纸速描记心电图,然后测定 10 个 R-R 间期,以其平均值除以 60 算出心率,心气虚大鼠模型构建中心电图的测定有很重要的诊断意义^[9]。

1.2.5 自发活动

用小动物活动测定仪测定并记录,测定之前先使动物适应环境 3 min 后,记录 5 min 自发活动次数。从而体现动物活动及精神状态。

1.2.6 行为学测试

人体出现头晕、记忆力减退、健忘以及神疲乏力等非特异性的症状时,参照人体相关症状可以对大鼠进行行为学检测,包括水迷宫、避暗、旷场分析等,反映动物记忆、判断、定向等能力改变,以及懒动、不活跃等表现。

1.2.7 电生理检测

电生理能够把动物的心电、呼吸频率、肢端体温等信息转换为数字信息,为客观评定心悸、气短等主观症状提供借鉴。

1.3 宏观体征方法学研究

1.3.1 半定量方法

半定量的方法是在直接观察宏观体征的基础上,尝试用量化的指标替代部分主观表述,使之更具有可操作性。

(1) 精神状态评分。气的充足与否直接决定了机体的精神状态,因此对机体精神状态的观察是证候动物模型观察的重要部分,如神疲、乏力可反映“气虚”。在气虚证动物模型中大鼠精神状态的评定主要依据主动活动和被动逃避攻击两方面评价。正常:活动迅速,眼光有神,为 0 分;轻度异常:精神倦怠、懒动,自发活动减少,为 1 分;明显异常:逃避、攻击行为明显减少,为 2 分。

(2) 动物易激惹程度分级、评分。廖氏^[9]等在评价自发性高血压大鼠肝阳上亢模型时运用了动物易激惹程度分级及评分。Ⅰ级(1分):捉持颈部时尖叫、惊跳;Ⅱ级(2分):捉持颈部时激怒欲咬人;Ⅲ级(3分):提尾部时即尖叫、惊跳,甚至欲咬人或同笼大鼠频繁打斗,频咬铁笼;上述情况不明显者为 0 级(0分)。

(3) 舌象评分。舌象是中医证候学的重要组成部分,也是中医临床研究的重要特色之一,舌象观察为证候动物表征研究的重要指征。例如针对血瘀证出现的青紫舌,主要从舌色和舌底静脉长度的两个方面拟定舌象血瘀特征的量化评分标准。正常:舌底色微青、舌静脉主干长度不超过 3/4 为 0 分;轻度紫暗:舌底色紫暗或舌静脉主干长度超过 3/4 为 1 分;明显紫暗:舌底色紫暗且舌静脉主干长度超过 3/4 为 2 分。

1.3.2 量化方法

(1) 数码拍照,图像转化为量化研究。图像描述随着数码相机的普及,对于视觉表现突出、实验操作中不易定量研究的表征,可以通过数码照相将其记录、保存下来,如大鼠舌象、爪甲等。在既往研究中,对动物模型舌象观察以主观描述为主,数码照相的应用将为舌象的客观评价提供最直观的依据。在此基础上还可以探索对舌象的量化研究。在临床证候规范化采集研究过程中,前人通过对舌象的数码照片进行图像分析,尝试对人体舌象进行量化研究,取得了一定成果,例如 Lab 定量分析等。这在证候动物模拟中开展舌象量化研究提供了思路,将动物宏观表征进行定量分析是目前动物表征研究的热点之一。如心气虚血瘀证研究用数码相机拍照舌、爪甲、耳,并用 photoshop 软件转化为量化的 RGB 值,比较 R、G、B 的比值变化。寒凝血瘀证表征模型的建立中用数码相机拍摄舌下络脉和耳廓,并观察和分析模型大鼠证候表征舌像的变化,对舌质、舌下络脉、耳廓血管的外观、色泽的变化进行分析。

(2) 显微拍照,图像转化为量化研究。爪和尾显微拍照后计算机图像处理。详细计量观察小鼠的气血阴阳、寒热虚实的表现。上海中医药大学方肇勤教授的研究团队在探讨动物证候变化规律时多用显微拍照的方法获取动物表征的量化指标,用 SQF-EA 体视显微镜对爪、尾、舌进行显微拍摄,采用 Photoshop 7.0 图像软件,选取爪、尾、舌特定区域定量提取色度 R、G、B 进而求出反映红色程度的 r 值($r=R/(R+G+B)$),并将腋温、爪 r 值(反映红色

程度)、尾 r 值作为常规阳气盛衰的量化指标,如在糖尿病大鼠模型构建过程中观察发现动物成模后爪、尾色偏红,随着病程进展,出现逐渐变淡的趋势。

(3) 偶氮蓝染色。任氏等^[11]在血瘀证大鼠表征研究中以偶氮蓝在动物耳廓、舌体体表表征呈现出的蓝色瘀斑及与耳廓和血浆中偶氮蓝含量的相关性来反映血瘀程度的变化,使之成为更符合人体四诊信息所表达证候模型的更直观的评价依据。

4 讨论

与西医学一样,中医学的发展之路也凝聚着动物模型的功绩,当代中医动物实验的核心是中医证候动物模型,而动物模型的证候判定标准却一直是众多研究者争论的焦点和解决的难点。从临床上看,不同致病因素所导致的同种疾病,可能会出现不同的中医证候;同种致病因素所致疾病,在不同的阶段,也可表现出不同的证候属性。由此进行推论;与临床患者一样,西医学所建立的疾病动物模型也应该具有相应的中医证候属性,而且在疾病的进展过程中,中医证候属性是有变化的,根据动物所表现出的宏观表征,以及与临床上有关联的客观检测指标,可以对疾病动物模型的中医证候进行辨析。目前对动物模型的证候判定往往采用的是临床上应用于患者的判定方法及标准,而动物模型与临床之间存在着很大的差异,因此单纯的应用临床上的证候判定方法存在着局限性,而解决这个难题的关键在于应用动物模型自身的宏观表现与临床证候判定方法相结合,综合评价模型动物的证候特点。模型动物的四诊信息采集在动物模型证候属性判定中发挥着重要的作用,而动物的四诊信息中又以宏观体征最易获得,且直观、可操作,其中对于模型动物自身的四诊信息的采集又以宏观体征的采集为关键。因此,对动物模型的宏观体征采集及方法的探讨对于证候模型的证候属性判定具有重要意义。

在宏观体征的采集方法上,一方面通过直接望诊来获得,另一方面,借助仪器及方法学的技术,获得半定量或定量信息以体现宏观体征的特点。研究证明,将临床定性的四诊内容,尽可能地代以定量或半定量的同等意义的观察和测试指标,采用相应的物理、化学的手段,可以辨析动物模型的证候属性。

利用动物模型自身的宏观体征来评定其证候属性的思路和方法是当前探讨构建病证结合动物模型的核心环节,而病证结合动物模型是开展中医证候实验研究的一个必要条件,也是阐明、创新中医理论的一个重要工具,是传统中医向现代中医学发展的桥梁。因此,突破证候模型四诊信息采集这个瓶颈对中医药现代化研究有极其重大的理论意义。

参考文献:

- [1] 刘旭光,宋开源,余曙光,等. “阴虚”、“阳虚”模型大鼠体温昼夜节律参数差异的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(1): 71-73.
- [2] 章学林,顾宏刚,沈平,等. 部分肠切除大鼠“脾气虚”证模型的建立及以方测证研究[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(3): 52-54.
- [3] 汪泳涛,张伟荣,宋红普,等. 长期超负荷游泳运动建立阴虚内热证动物模型的研究[J]. 中医学杂志, 2003, 21(7): 1115.
- [4] 芦永康,彭康,朱传武,等. 补阳还五汤对中风后遗症“气虚血瘀”大鼠模型能量代谢的影响[J]. 中医学杂志, 2007, 25(11): 2280-2283.
- [5] 程志清,唐烨霞,吴玉芙,等. WKY 大鼠心气虚证模型的建立与评价[J]. 中医药信息, 2004, 21(1): 45-49.
- [6] 王振涛,王硕仁,赵明镜,等. 心梗后左心衰大鼠心气虚证动物模型的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(4): 68-70.
- [7] 苗明三,顾丽亚,方晓艳,等. 大鼠气血双虚动物模型的复制[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 60-62.
- [8] 廖圣宝,戴敏,刘光伟. 二肾一夹高血压大鼠模型中医证候属性的探讨及药物作用观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(21): 34-37.
- [9] 梁俊清,孙士然,吴以岭,等. 络气虚滞型血管内皮功能障碍病证结合动物模型的建立及通络方药干预研究[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 32(1): 52-57.
- [10] 郑小伟. 寒凝血瘀证动物模型的量化研究[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(2): 43-45.
- [11] 任映,宋崇顺,尹军祥,等. 大分子葡萄糖酐血瘀证动物模型表征的偶氮蓝变化特征[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(12): 824-827.

(收稿日期: 2009-02-18)