

中医病证结合肝纤维化动物模型的研究概况

彭岳, 苗维纳, 赵铁建, 段雪琳

彭岳, 苗维纳, 成都中医药大学基础医学院生理学教研室 四川成都市 610075

彭岳, 赵铁建, 段雪琳, 广西中医药大学基础医学院生理学教研室 广西壮族自治区南宁市 530200

赵铁建, 教授, 主要从事中医药、民族药对肝纤维化逆转机制及应用的研究; 实验动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160553

广西科学研究与技术开发计划基金资助项目, No. 桂科攻13349005

广西研究生教育创新计划基金资助项目, No. JGY2014082

作者贡献分布: 本文由彭岳综述与论文写作; 赵铁建、苗维纳及段雪琳收集、整理文献并论文审校。

通讯作者: 赵铁建, 教授, 530200, 广西壮族自治区南宁市五合大道13号, 广西中医药大学基础医学院生理学教研室。

ztj-nanning@163.com

电话: 0771-2214279

收稿日期: 2014-07-03 修回日期: 2014-07-18

接受日期: 2014-08-17 在线出版日期: 2014-09-28

Animal model of hepatic fibrosis showing combination of disease and syndrome

Yue Peng, Wei-Na Miao, Tie-Jian Zhao, Xue-Lin Duan

Yue Peng, Wei-Na Miao, Department of Physiology, School of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Yue Peng, Tie-Jian Zhao, Xue-Lin Duan, Department of Physiology, School of Basic Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160553; Guangxi Scientific and Technological Development Projects, No. 13349005; Innovation Project of Guangxi Graduate Education, No. JGY2014082

Correspondence to: Tie-Jian Zhao, Professor, Department of Physiology, School of Basic Medicine, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, 13 Wuhe Avenue, Nanning 530200, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ztj-nanning@163.com

Received: 2014-07-03 Revised: 2014-07-18

Accepted: 2014-08-17 Published online: 2014-09-28

Abstract

Current animal models of liver fibrosis are often developed using a single factor, and they have no traditional Chinese medicine (TCM) characteristics such as Qi stagnation, Qi deficiency, liver depression, phlegm, dampness and blood stasis, although they can show the pathological changes of hepatic fibrosis.

In this paper, we initially give an overview of conventional animal models of hepatic fibrosis, and then discuss new animal models of hepatic fibrosis showing combination of disease and syndrome that are developed using multiple factors under the guidance of the etiology theory of TCM. These animal models have the double characteristics of the disease and syndrome and possess not only the basic characteristics in TCM but also the pathologic characteristics in Western medicine. They simulate the pathogenesis of clinical disease and syndrome more accurately, providing a new tool for studying liver fibrosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Traditional Chinese medicine; Combination of disease and syndrome; Hepatic fibrosis; Animal models

Peng Y, Miao WN, Zhao TJ, Duan XL. Animal model of hepatic fibrosis showing combination of disease and syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(27): 4053-4059 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4053.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i27.4053>

摘要

目前研究者制作的肝纤维化动物模型往往使用单一因素造模, 模型虽然具备肝纤维化病理变化, 却无气滞、气虚、肝郁、痰湿、血瘀等重要的中医证的特征。本文在总结了肝纤维化动物模型与病证结合动物模型研究概况后, 评述了几种在中医病因学理论的指导下, 运用复合多因素的造模方法建立的新型的病证结合疾病动物模型。这类肝纤维化模型动物同时具备疾病与证候双重特征, 既复制出了符合中医证的基本特点, 又与西医肝纤维化病理特征相一致。从而更准确地模拟了临床疾病与证候形成的病理机制及病变过程, 为中西医结合研究肝纤维化疾病提供了新的研究平台及途径。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

背景资料

病证结合模型是中医证候模型在西医疾病上的具体化, 又是西医疾病模型的中医证候化; 他能提供出比单纯的疾病模型或单纯的证候模型更多的信息, 更符合临床实践的具体要求, 能更准确地阐明并论证中医学的诊疗理论。

同行评议者

鲁玉辉, 副教授, 福建中医药大学中医学院

研究前沿

以往研究使用的动物模型往往是单一因素造模而成,模型具备了肝纤维化病理变化,而无中医的证候特征。目前有研究者将肝纤维化疾病与中医证候各因素进行有机地结合,可以复制出既与西医肝纤维化病理特征相一致,又能体现中医证候特点的病证结合动物模型,为中西医结合研究肝纤维化提供了新的研究平台。

关键词: 中医; 病证结合; 肝纤维化; 动物模型

核心提示: 以往肝纤维化动物模型往往采用单一因素进行造模。本文评述的几种病证结合模型具备疾病与证候双重特征,既符合中医证的基本特点,又与肝纤维化病理特征一致,为中西医结合研究肝纤维化提供了新的平台及途径。

彭岳, 苗维纳, 赵铁建, 段雪琳. 中医病证结合肝纤维化动物模型的研究概况. 世界华人消化杂志 2014; 22(27): 4053-4059
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4053.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i27.4053>

0 引言

病证结合是中医学诊疗理论的精髓部分^[1]。中医学强调辨证论治,同时也重视辨病论治;辨病论治与辨证论治相结合,才能诊断准确并取得满意的治疗效果^[2]。病证结合模型是中医证候模型在西医疾病上的具体化,又是西医疾病模型的中医证候化^[3];他能提供出比单纯的疾病模型或单纯的证候模型更多的信息,更符合临床实践的具体要求,能更准确地阐明并论证中医学的诊疗理论^[4]。具体到肝纤维化疾病研究,由于病证结合模型可以较贴切地模拟中医证候与西医病理的对应关系,因此对肝纤维化临床病变研究与证候本质研究具有较好参考价值^[5]。更广阔的开发意义是,可以为中医药防治肝纤维化(尤其是准确到某证候所在的肝病发展阶段或肝纤维化疾病目前所处的证阶段)提供客观的疗效判定,以及进一步的抗肝纤维化药理学机制探讨^[6]。以往研究使用的动物模型往往是单一因素造模而成,模型具备了肝纤维化病理变化,而无中医的证候特征。目前有研究者将肝纤维化疾病与中医证候各因素进行有机地结合,可以复制出既与西医肝纤维化病理特征相一致,又能体现中医证候特点的病证结合动物模型^[7],为中西医结合研究肝纤维化提供了新的研究平台。

1 肝纤维化动物模型与病证结合动物模型的研究

1.1 关于肝纤维化动物模型的思考 肝纤维化是指肝脏受到慢性炎症等损伤因素的持续刺激后,引起肝细胞发生脂肪变性、炎症浸润及坏死,肝脏中胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的增生与降解失去平衡,导致肝脏内纤维结缔组织在肝细胞坏死区发生异常沉积的病理过程^[8];是一种以肝组织弥漫性纤维化、

假小叶和再生结节形成病理学特征的慢性肝病。由肝纤维化发展到肝硬化是一个连续的病理变化过程,而肝纤维化是病变过程中的必经阶段^[9]。多数慢性肝病患者都有不同程度的肝纤维化,其中25%-40%的患者最终可发展成肝硬化甚至肝癌而死亡。研究者提出^[10],阻断并逆转肝纤维化病变,已成为慢性肝病治疗中的关键问题。因此寻找合适的、贴切的、能够反映肝纤维化到肝硬化各阶段发生发展变化的动物模型实属必要。建立合适的肝纤维化动物模型是研究肝纤维化发生机制、筛选护肝药物的前提^[11]。尽管肝纤维化造模方法很多,但不同物质诱导肝纤维化的机制不同,可以产生多种不同的病理和生化改变,有各自的优、缺点。理想的肝纤维化模型应具有如下特征^[12]:(1)与人类疾病相似,可复制人类肝纤维化病变的形态特征;(2)病变有一定发展过程,病理改变呈阶段性出现,即有明显分期;(3)造模方法简单易行,可重复;(4)病变形成率高,死亡率低;(5)所用方法对人类无害或危害较小,环境污染少。而以往制造肝纤维化动物模型的方法往往是单一因素造模,模型仅具备肝纤维化的病理特征,而缺乏中医应有的证候表现,使中医药治疗肝纤维化的基础研究和药物验证实验在一定程度上缺乏准确性可信度。

1.2 病证结合动物模型的研究 目前,实验动物模型对中医药研究的发展也做出了巨大贡献。中医无论是学术进步、临床发展和中药开发研制过程都离不开动物实验,动物模型在中医药科研中的重要作用已经被整个中医界承认^[13]。而动物实验成败的关键在于是否复制出与临床疾病、证候相一致的动物模型^[14]。中医独特的理论体系已经决定了中医动物模型的独特性。为了使动物模型更能体现中医学“证”的特色,近年来许多学者在单纯疾病动物模型的基础上,把西医的病和中医的证相结合,创建了“病证结合”的新动物模型^[15]。病证结合动物模型的概念是指,通过临床调查研究、选择出有密切联系的疾病和证候,即寻找两者在临床的结合点,分别或同时对两者的特征进行复制,用于观察研究的模型动物^[16]。其特点体现如下:(1)模型在“病”和“证”两方面均体现出良好的可靠性和稳定性;(2)将时间观念引入,使模型能较好地表达出中医“证”的动态性与阶段性特征,从而体现出中医对疾病发展规律的

认识; (3)疾病与证候结合, 宏观与微观结合, 使研究既能以中医学理论为指导, 又能用实验方法加以证实, 实用性和操作性均较强^[17]; (4)病证结合动物模型可以使很多“证”的不确定因素由于“病”的限制而变得更加清晰, 更符合临床实际, 更能准确地阐明中医证候的本质^[18]. 研制此类动物模型的基本思路是^[19], 以遵循中医理论为基础, 在制作出现代医学疾病模型的基础上, 恰当地施予中医病因病机, 可建立起具有中医特色的病证结合的中医实验动物模型. 该动物模型建立后, 能够成为探究疾病发生机制以及筛选有效治疗中药的关键途径和手段.

中西医结合研究指出, 一种西医疾病大多会被确定为中医的3-5证. 例如冠心病、心绞痛被规定了8证, 而将肝纤维化也确定为6证^[20]. 若按照这样的临床辨证标准, 病证结合模型的研制就应该为某病所辖的各证均建立起准确的动物模型^[21]. 病证结合是中西医结合的关键环节, 既重视辨证又强调辨病, 各取中西医之长处, 对临床及科研具有很大的指导意义^[22]. 目前在中医各类动物模型中, 病证结合动物模型数量最多, 研究开发力度最大, 涉及面最广, 是973重大理论专项研究和中药新药开发研究中经常使用的实验模型^[23]. 目前常用的病证结合模型有3种基本造模方法^[24]: (1)先建立西医疾病模型, 再施以中医病因造成中医相应的证候; (2)先施以中医病因造成中医相应的证候, 再进一步制造西医疾病模型. 这两种模型的特点为同属于疾病模型再加上中医的复合病因造模法; (3)在动物疾病与人类疾病具有相同的病理生理和解剖结构的理论基础上, 直接采用符合临床实际的西医疾病模型, 不再另外施加任何中医病因影响; 先对该模型进行疾病的诊断, 再直接动态观察该模型在疾病的发生、发展和转归过程中中医证候的演变情况; 即用具体疾病阐明中医和研究中医^[25].

2 常见中医肝纤维化病证结合的动物模型

2.1 中医对肝纤维化疾病证的分型 据肝纤维化临床研究文献报道, 肝纤维化的常见证型可归纳为肝郁脾虚、气滞血瘀、瘀血阻络、肝肾阴虚、脾肾阳虚和湿热中阻6型^[26]. 目前, 国内构建较为成功的病证结合肝纤维化动物模型主要有肝郁脾虚证、气虚血瘀证和血瘀证肝纤维化动

物模型3类^[27].

2.2 肝郁脾虚型肝纤维化模型的研究 正气不足是肝纤维化发生和发展的内因. 中医理论认为“正气内存, 邪不可干. 邪之所凑, 其气必虚”, “精气夺则虚”. 肝纤维化是各种慢性肝病发展的共同病理阶段^[28], 该病在中医观点属于“胁痛”、“痞积”、“积聚”、“臌胀”和“肝积”等证候的范畴^[29]. 慢性肝病的病程一般历时较长, 久病必耗伤人体正气, 人体免疫功能日渐低下, 正不胜邪而无法驱邪外出^[30]. 病邪由此长期内伏于肝, 此时若劳累过度, 脏腑气机失调更甚, 再遇忧思恼怒, 情志郁抑, 则肝气更损. 故正虚列为“正气虚弱、湿热邪毒、气血瘀阻”这3大肝纤维化致病病机之首. 本虚标实是肝纤维化发病的中医病机特点, 而正虚还是湿聚、血瘀、癥积形成的重要病因^[31]. 徐珊等^[32]、包剑锋等^[33]研究者建立肝郁脾虚肝纤维化模型的具体方法是: (1)将CCl₄与橄榄油配成40%浓度油剂, 按0.3 mL/100 g剂量给予皮下注射, 2次/wk; 肝纤维化病变约在造模6 wk后形成, 形成后仍每周2次持续给予微剂量(0.03 mL/100 g)CCl₄溶液注射刺激; (2)在造模第4周开始, 用止血钳夹住1-2只鼠的尾巴(攻击鼠), 3次/d, 每次刺激30 min, 诱其发狂与其他鼠撕打进而激怒全笼大鼠. 夹尾3 d后, 开始给予2次/d大黄灌胃, 水煎液浓度为2 g/mL, 剂量为1 mL/100 g; 同时将夹尾改为2次/d, 每次刺激15 min. 夹尾与灌胃同时参与造模时间共计2 wk; (3)造模结束, 治疗组加用逍遥丸治疗进行反证性论证.

该方法是一种在CCl₄肝纤维化造模的基础上联合夹尾激怒加大黄液水煎液灌胃法制作的一种复合多因素构建病证结合动物模型方法. 其特点为: (1)造模首先运用了CCl₄进行经典的肝毒性纤维化模型的制备; 而CCl₄造模的缺点是纤维化病变有自愈的倾向^[34], 故该实验在肝纤维化模型形成后(6 wk)定期给予大鼠微量CCl₄持续刺激(刺激时间间隔和持续刺激剂量的把握是技术关键; 维持量过大或间隔时间过短, 会导致纤维化程度加重, 甚至形成肝硬化; 反之自愈现象明显), 较好地维持了肝纤维化病变; (2)再运用中医机制“怒伤肝, 久则郁”对郁证进行复制, 使气机失调, 引致肝气郁结. 夹尾造成疼痛的刺激, 使大鼠恼怒非常, 出现相互撕咬, 精神紧张, 易激惹, 长时间对峙. 而随着刺激

相关报道

目前, 国内构建较为成功的肝纤维化病证结合动物模型主要有徐珊等的肝郁脾虚证、包剑锋等的气虚血瘀证和张斌等的血瘀证肝纤维化动物模型3类.

创新盘点

本文总结并评述了几种在中医理论的指导下,依据中医学病因,运用理化、中医病因等复合多因素的造模方法,建立起的新型的病证结合疾病动物模型。这些肝纤维化模型动物同时具备疾病与证候双重特征,为中西医结合研究肝纤维化疾病提供了新的研究平台及途径。

的一再进行,其撕咬的剧烈程度逐渐减弱,纳水和纳食也明显减少;精神多呈困倦状态,毛色发暗、枯黄,体质量逐渐下降。可见夹尾虽然是人为外因施予的肉体刺激,但亦严重影响精神情志活动的变化,可渐渐造成郁证的发生;(3)制作脾虚证的方法是高浓度生大黄水煎液大鼠灌胃法,其原理来自于中医理论的“吐下之余,定无完气”,泻下易导致脾气虚证的产生和发展^[35]。以上两种因素联合影响可较为准确地复制出肝郁脾虚证;(4)造模结束后,模型大鼠肝脏大体病理检查可见形态异常,颜色呈黄白,表面有明显颗粒,切面呈沙粒物;肝组织病理HE染色法可见肝细胞脂肪变性明显,汇管区和小叶内显著碎屑坏死,桥接坏死偶见;苦味酸-天狼红染色结果显示汇管区和小叶内有明显胶原纤维增生,并连接成纤维间隔,局部有假小叶形成。以上结果均符合肝纤维化的病理变化诊断标准。综上所述,通过给予致肝纤维化理化因素,再恰当加入中医病因干预的复合造模法,可以成功复制肝郁脾虚病证结合肝纤维化模型。为进一步验证疾病的宏观表现及中医病因干预因素的准确关系,实验中还应用了逍遥丸治疗进行反证性论证,结果为治疗组大鼠精神、食欲、活动及毛发等状况均明显改善。总结评价,该肝郁脾虚型肝纤维化病证结合动物模型,既具备了肝纤维化的病理特征,又符合中医肝郁脾虚证的证候表现。

2.3 气虚血瘀型肝纤维化模型的研究 徐珊等^[32]与包剑锋等^[33]研究者制作气虚血瘀肝纤维化模型的具体方法是:CCl₄致肝纤维化造模方法与上述相同;于造模第4周开始加予游泳疲劳运动实验,将大鼠置入一个盛满清水、四壁光滑的大容器中,迫使其连续游泳,直至其力竭沉下为止,2次/d,游泳共进行2 wk。造模结束观察模型大鼠肝脏的病理学变化及其中医证候表现,结果显示:(1)病理学改变与肝郁脾虚肝纤维化模型模型相似,大体观、切片染色观察均可见典型的肝纤维化病理改变;(2)模型大鼠出现气虚血瘀证候群:造模初始大鼠十分恐惧,竭力游泳;随着强迫游泳次数的增加,大鼠由于耗气而逐渐显现摄食减少、生长迟缓、消瘦、精神不振、行走不稳、爱蜷缩、游泳时间进行性缩短、毛发黯淡、大便稀溏等气虚证的证候。造模结束时,大鼠还进一步出现了眼球颜色变暗、舌下静脉曲张、舌质青紫瘀斑、尾部不同

程度瘀斑等血瘀证的证候。游泳疲劳法刺激耗气,是目前较成熟的气虚血瘀证造模方法。中医理论认为“气为血之帅,气行则血行,气止则血止”,“过劳则气耗”,“气虚气滞而血瘀”。气和血关系密切,气虚则推动和温煦血液功能减弱,血行不畅发生凝滞,引致血瘀^[36]。该实验以此为理论依据进行了气虚血瘀模型的复制。实验中采用强迫游泳法让大鼠游泳求生14 d,使其长时间处于高度应激状态,可迅速削弱其体力,因极度劳倦伤气引致气虚的发生,大鼠气虚血瘀证形成。实验中还加入了扶正化瘀胶囊治疗进行反证性论证,结果为治疗组大鼠的气虚证、血瘀证的证候得到明显改善。总之,此多因素联合造模方法成功地复制了气虚血瘀型肝纤维化大鼠病证结合动物模型。从模型大鼠的中医病因干预、一般情况、宏观证候、病理改变及药物反证等几方面的结果综合分析,该模型具备了现代医学肝纤维化的病理特征,同时又具有中医气虚证及血瘀证的特征,为中西医结合研究肝纤维化提供了新的研究模型。从本实验病证结合造模方法上看,遵循中医基础理论,遵循临床疾病发生发展的实际情况,准确地运用各种中医病机因素进行相互作用,相互影响,共同干预,是该模型成功构建的关键。

2.4 血瘀证肝纤维化模型的研究 中医认为,气滞血瘀贯穿肝纤维化发病的全过程,成为最重要的病因之一^[37]。《金匱要略》中提到“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”。肝主疏泄,调畅全身气机,与脾之运化功能关系很密切,故谓之肝疏则脾健。且肝主藏血,调理全身血运,若湿热入侵,阻滞肝经,引致肝气郁结,病久入络,气滞血瘀,造成肝血瘀阻。而脾主运化水湿,为生痰之源。肝胆湿热,久蕴造成湿浊困脾,脾失健运,水湿内停,痰浊丛生,湿郁化热,热灼津液,形成痰瘀。湿热、痰浊、瘀血交而结于肝络,最终形成痞块,谓之肝纤维化。病理学研究显示^[38],肝细胞及血窦内上皮细胞发生变性坏死,可引起肝组织的微循环障碍进而出现血瘀证;而且发生纤维化的肝组织分泌大量胶原蛋白形成条束,也参与了瘀血证的形成。另一方面,瘀血在肝纤维化病变中主要表现在肝脏微循环障碍及纤维结缔组织的增生,该现象证明了中医的肝郁脾虚,气滞血瘀是形成肝纤维化最常见的病机^[39]。据此为理论基础进行造模的肝纤维化病证结合模型

主要有如下几种。

2.4.1 传统血瘀证肝纤维化模型构建研究: 张斌等^[40]研究者采用联合多因素的造模方法构建血瘀证肝纤维化模型, 其具体方法为: (1)使用二甲基亚硝胺(dimethyl nitrosamine, DMN)制作大鼠肝纤维化模型, 每天1次以1 mg/100 g的剂量腹腔注射0.5%DMN, 每周内连续用药3 d, 共给予3 wk; (2)从第2周开始, 给造模大鼠尾静脉注射去甲肾上腺素(norepinephrine, NE), 1次/d, 用生理盐水配制成0.1 g/L浓度的注射液, 给药剂量为0.01 mg/100 g, 共给予3 wk; (3)造模开始的第1天及第10天, 分别给予大鼠尾静脉注射小牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 用生理盐水配制成50 g/L浓度的注射液, 给药剂量为0.025 mL/100 g。4 wk造模结束, 对模型大鼠进行肝脏病理学检查、中医血瘀证的证候观察及肠系膜微循环检测: (1)肝脏病理结果显示, 血瘀组大鼠的肝细胞变性坏死、纤维组织增生及假小叶形成的程度比单一因素DMN造模组和正常组明显更为严重, 肝窦内还可看到扩张瘀血变化; (2)中医证候观察发现该组大鼠有明显的血瘀表现: 眼球颜色变暗、舌下静脉曲张、舌体出现青紫色瘀斑, 尾部瘀斑; 此外还有易激惹、常抑郁等精神情志异常的改变; 其血瘀证体征分值显著高于单一因素DMN造模组和正常组; (3)多部位微循环显微镜肠系膜微循环检测结果, 血瘀证大鼠肠系膜血管出现明显的颜色暗红、管襻迂曲、动脉狭窄、静脉曲张、血流缓慢、红细胞聚集及血液流态呈粒流式等微循环障碍的变化。

该造模法的原理及特点在于: (1)用DMN取代肝脏毒性药物CCl₄来诱导大鼠肝纤维化, 主要是利用DMN更为全面的肝脏损伤特性^[41], 如肝毒性、免疫毒性和基因毒性等, 使肝脏的纤维化改变更稳定, 能较好地克服CCl₄造模时肝纤维化病变自愈的倾向; (2)气滞血瘀的原因之一为内感忧怒, 生理学研究发现情绪剧烈变化(如应激、暴怒)时机体会分泌大量的以肾上腺素为主的激素; 所以该实验中运用多次反复注射肾上腺素的方法引发血管内皮慢性损伤, 并诱导红细胞和血小板聚集, 以此模拟中医“气滞”, 引发模型大鼠的急性血瘀证候; (3)小牛血清白蛋白^[42]作为异种抗原, 多次注射可诱发III型变态反应, 形成沉积于血管内皮的免疫复合物, 联合肾上腺素损伤血管内皮细胞; 同时该免疫复合

物还通过诱导红细胞和血小板发生聚集, 进一步促进血瘀证的形成。研究者总结, 将NE与BSA联合应用, 可较快地使造模动物产生高黏、高聚、高浓、高凝的瘀血类病理变化; 这指导理论与血瘀证的中医病理机制较为符合, 证候表现也与血瘀证很相似。

2.4.2 改良法血瘀证肝纤维化模型构建的研究: 中医认为肝郁脾虚和湿邪困阻是肝纤维化发病的两大重要病因。由于湿邪困阻, 久郁生热, 致湿热毒邪在体内持续作用, 使部分患者转为慢性肝病。肝病急性期湿邪及热毒在体内残留难尽, 迁延反复, 可对肝细胞造成直接的损伤。医学研究证明^[43], 慢性肝炎的形成, 与湿热毒邪长期在体内困阻中焦, 进而交蒸于肝胆是分不开的。湿毒之邪困阻脾胃, 使肝失疏泄, 而致肝病犯脾, 久而脾失健运, 影响气血化生, 致肝失所养造成肝纤维化。另一方面由于饮食失节, 暗伤脾胃, 导致脾胃功能失调, 失其纳运, 导致湿浊内生, 湿困化热, 热蒸肝胆, 形成肝病。以此中医理论为依据, 彭岳等^[44]研究者参考并改良了张斌的造模方法, 使用“二甲基亚硝胺、小牛血清白蛋白和去甲肾上腺素联合注射, 外加乙醇灌胃及高脂低蛋白饲养法”, 多因素联合建立出更为完善和贴切的气滞血瘀模型。此法是一种制作病证结合血证肝纤维化动物模型的新方法。具体方法为: 在前述张斌造模法的基础上, 给予大鼠20%乙醇灌胃(用量0.1 mL/100 g, 2次/d)及高脂低蛋白饲养(低蛋白饲料配方, 混合以20%的猪油)。此造模法改良是为了进一步模仿中医痰湿和血瘀的病机, 使大鼠饮食失节而达到减少其生气之源、引发其气滞, 后致痰湿血瘀的目的。酒性湿且热, 常饮可致使湿热长期困阻中焦, 进而湿热毒邪可交蒸于肝胆。中医理论还认为“肥甘厚味易致膏粱之疾”, 滋腻碍胃而伤脾, 使后天气血生化乏源, 又可助生痰湿导致气滞瘀血的发生和加剧。实验结果显示, 采用此法造模周期可缩短1-2 wk, 而“病”和“证”的出现更为稳定和贴切, 脂肪肝的形成率较高(纤维化大鼠中约20%出现); 且造模大鼠易激惹、抑郁等情绪异常表现更为明显, 更好地模拟了临床上肝病患者肝郁的特征。

2.4.3 热毒血瘀证与血栓合并肝纤维化模型研究: 梁爱华等^[45]研究者以细菌内毒素(lipopolysaccharide, LPS)与角叉菜胶(carrageenin, Ca)两

应用要点
本文总结并评述的几种肝纤维化病证结合模型动物, 更准确地模拟了临床疾病与证候形成的病理机制及病变过程, 既符合中医证候的基本特点, 又与西医肝纤维化病理特征相一致, 可以为中西医结合研究肝纤维化疾病提供新的研究平台及途径。

名词解释
病证结合动物模型: 通过临床调查研究、选择出有密切联系的疾病和证候, 即寻找两者在临床的结合点, 分别或同时对两者的特征进行复制, 用于观察研究的模型动物。

因素联合造模法, 制备出一种血瘀证和血栓、肝损害联合表现的病证结合动物模型。造模结束后检测, 该模型表现出了明显的血流缓慢、全血黏度增高、血小板聚集率异常等血液流变学指标改变, 显示微循环障碍; 该模型上述明显的血瘀证指标改变结合造模采用的中医病因进行分析, 符合炎症诱导的热毒血瘀证特点; 而肝脏病理学观察还表明该血瘀证大鼠还出现了肝纤维化的表现如纤维组织增生, 纤维间隔加宽, 部分肝窦可见扩张瘀血等。总结并认为LPS/Ca联合造模可建立一种操作简便的、病变形成较为稳定的热毒血瘀证与血栓合并肝纤维化的病证结合动物模型。

3 结论

病证结合是中西医结合过程的重要环节, 要求做到既辨病又辨证。一个贴切的病证结合的中西医结合动物模型, 对临床病理研究与中医证候本质研究将具有较大参考价值。他能对中医药防治疾病的研究提供客观的疗效判定, 并可以进一步用于探讨其药理学作用^[46]。研究者可运用现有的单因素方法来制备疾病动物模型, 还可以恰当地叠加与中医病因、病机相关的因素, 联合进行复合病证结合动物模型的制备, 以使得基于动物实验的研究能够达到病证结合、方证相应^[47]。病证结合动物模型由于融合了现代医学病理学模型和中医证候模型两方面共同的特点及长处, 使模型动物可以同时具备西医疾病和中医证候双重特征。他们的优势在于可以使很多证的不确定因素由于病的限制而变得更加规范而清晰, 更贴近临床实际, 研究时更能准确地对中医证候的本质进行阐述^[48]。而另一方面, 基于病证结合动物模型的药效学研究可以更为全面准确地反映中药药效作用情况。研制出这类动物模型, 并将其运用于中药非临床有效性的评价, 可以有效地克服单纯用中医证模型或现代医学病理模型进行评价中药药效的不足^[49]。

具体到肝纤维化动物模型, 前研究者往往使用单一因素造模, 模型具备肝纤维化病理变化, 却无中医的气滞、气虚、肝郁、痰湿、血瘀等重要的证候特征^[50]。故本文总结并评述了几种在中医理论的指导下, 依据中医学病因, 运用理化、中医病因等复合多因素的造模方法, 建立起的新型的病证结合疾病动物模型。这些肝

纤维化模型动物同时具备疾病与证候双重特征, 更准确地模拟了临床疾病与证候形成的病理机制及病变过程, 既符合中医证候的基本特点, 又与西医肝纤维化病理特征相一致, 可以为中西医结合研究肝纤维化疾病提供新的研究平台及途径。

4 参考文献

- 1 黄烨, 殷惠军, 陈可冀. 病证结合的基础研究. 中国中西医结合杂志 2012; 32: 299-303
- 2 陈可冀. 病证结合治疗观与临床实践. 中国中西医结合杂志 2011; 31: 1016-1017
- 3 吴晏, 韩静, 郭淑贞. 2型糖尿病病证结合动物模型的研究. 中华中医药杂志 2011; 26: 1558-1560
- 4 何小娟, 李健, 陈旻. 基于病证结合的中药网络药理学研究与新药研发策略. 中国中医基础医学杂志 2011; 17: 1271-1273
- 5 郑旭锐, 张航, 李小苗, 高毅, 孙守才. 肝郁脾虚证肝纤维化大鼠模型研究. 陕西中医学院学报 2008; 31: 54-57
- 6 林志健, 张冰, 刘小清, 朱文静. 中医证候动物模型评价研究. 中国中医药杂志 2013; 28: 2217-2221
- 7 颜琳琳, 周利红, 李琦. 中医血瘀证动物模型研究概况. 中医杂志 2014; 55: 255-258
- 8 李满容. 中医活血化瘀法治疗肝纤维化、肝硬化临床思路探讨. 中国药物经济学 2013; 35: 298-303
- 9 Weber SN, Wasmuth HE. Liver fibrosis: from animal models to mapping of human risk variants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 635-646 [PMID: 20955966]
- 10 Jiao J, Sastre D, Fiel MI, Lee UE, Ghiassi-Nejad Z, Ginhoux F, Vivier E, Friedman SL, Merad M, Aloman C. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology* 2012; 55: 244-255 [PMID: 21898476]
- 11 Pinzani M. Foreword to liver fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 193-194 [PMID: 21497737]
- 12 王晓丽. 肝纤维化的动物模型制备研究. 山西职工医学院学报 2013; 23: 62-64
- 13 王郁金, 苏衍进. 对中医病证结合实验动物模型的思考. 云南中医中药杂志 2013; 34: 15-16
- 14 王婷婷, 贾乘, 陈宇. 大鼠气滞血瘀证模型的建立及影响因素分析. 中国中药杂志 2012; 37: 1629-1632
- 15 徐璿, 许朝霞, 王义闻, 燕海霞, 许文杰, 王亿勤. 基于病证结合的中医证候规范化研究进展. 中华中医药杂志 2014; 29: 14-16
- 16 刘志刚, 柴程芝, 黄煌, 余伯阳. 病证结合方证动物模型构建思路的探索. 中华中医药杂志 2012; 27: 2123-2125
- 17 赵辉, 王健. 试论多因素复合作病证结合动物模型思路. 安徽中医学院学报 2001; 20: 57-59
- 18 白云静, 申洪波, 孟庆刚, 王永炎. 基于复杂性科学的中医发展取向与方略. 中国中医药信息杂志 2005; 12: 2-5
- 19 徐浩. 病证结合临床研究的关键问题. 中国中西医结合杂志 2011; 31: 1020-1021
- 20 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2002
- 21 杜武勋, 朱明丹, 袁宏伟, 冯利民, 朱林平, 刘岩, 周营, 魏聪聪, 张少强. 病证结合, 方证相应的系统—系统的方证相应动态研究. 中国中西医结合杂志 2012; 32: 839-842
- 22 李建生, 余学庆. 病证结合模式下疗效评价指标体系

- 建立的思考. 中华中医药杂志 2011; 16: 1666-1670
- 23 殷惠军, 黄烨. 病证结合动物模型的研究进展. 中国中西医结合杂志 2013; 33: 8-10
- 24 吴同玉, 高碧珍, 林山, 李宇涛, 李旻, 俞洁, 林晴. 病证结合动物模型的模式探讨. 中国中医药信息杂志 2009; 16: 6-8
- 25 柴剑波, 李冀, 李胜志, 胡晓阳, 赵雪莹, 高彦宇. “方证相应”理论在“病证结合”研究中的应用. 世界中西医结合杂志 2011; 6: 711-713
- 26 郑其进, 李保桥. 肝纤维化中医药治疗临床探讨. 中医学报 2010; 25: 432-433
- 27 周玉平. 肝纤维化病证结合动物模型评析. 时珍国医国药 2011; 22: 1504-1505
- 28 胡军勇, 陈金亮. 肝纤维化的中医病机和治法探讨. 时珍国医国药 2008; 19: 1492-1493
- 29 张国梁. 中医药防治肝纤维化研究进展. 中医药临床杂志 2011; 23: 181-184
- 30 李生财. 论肝纤维化中医病机的演变规律. 新中医 2008; 40: 1-2
- 31 付艳霞. 甲虎芪金汤抗肝纤维化临床疗效初步观察. 中医学报 2009; 24: 55-56
- 32 徐珊, 包剑锋, 周敏, 张永生. 肝纤维化病证结合模型的研制. 中国中医药科技 2009; 16: 81
- 33 包剑锋, 黄劲松, 张永生, 徐珊. 肝纤维化病证结合模型的研究思路. 中华中医药学刊 2012; 30: 830-832
- 34 冯英巧, 杨元生, 崔淑兰, 陈垦, 王晖. 肝纤维化实验动物模型造模方法及应用研究进展. 广东药学院学报 2013; 29: 1-4
- 35 张绪富, 蔡红兵. 吕志平教授辨治慢性肝纤维化经验. 新中医 2005; 37: 30
- 36 彭勃. 从瘀论治肝纤维化体会. 江苏中医药 2007; 39: 4-5
- 37 刘成海, 刘平, 胡义扬, 徐列明, 刘成. 中医药抗肝纤维化临床与基础研究进展. 世界科学技术-中医药现代化 2007; 9: 112-119
- 38 Poynard T, Munteanu M, Deckmyn O, Ngo Y, Drane F, Castille JM, Housset C, Ratzu V, Imbert-Bismut F. Validation of liver fibrosis biomarker (FibroTest) for assessing liver fibrosis progression: proof of concept and first application in a large population. *J Hepatol* 2012; 57: 541-548 [PMID: 22612998]
- 39 谢体学, 史丰波, 谢艳华. 软肝缩脾胶囊联合阿德福韦酯治疗慢性乙型肝炎肝纤维化40例. 河南中医 2010; 30: 565-566
- 40 张斌, 王中华, 王江蓉, 王灵台, 陈建杰, 赵钢. 血瘀型肝纤维化大鼠模型的建立与评价. 中国中医基础医学杂志 2006; 12: 836-838
- 41 梁晋川, 谭正怀. 二甲基亚硝胺致肝纤维化动物模型研究进展. 山东医药 2013; 53: 80-83
- 42 武继彪, 随在云, 许复郁. 慢性血瘀证动物模型的建立及其血液流变学的变化. 中药药理与临床 2001; 17: 45-46
- 43 黄维良, 许爱婷. 肝纤维化中医病机及证治探讨. 河南中医 2012; 32: 45-46
- 44 彭岳, 吴光, 苏傲蕾, 赵铁建. 肝纤维化血瘀证研究及动物模型构建的思考. 辽宁中医杂志 2010; 37: 2261-2264
- 45 梁爱华, 丁晓霜, 李文, 薛宝云, 王金华, 杨洪军. 血瘀证与血栓形成病证结合动物模型的研究. 中国中药杂志 2005; 30: 1613-1616
- 46 黄碧燕. 关于病证结合动物模型研究现状的思考. 中国中医药信息杂志 2010; 17: 4-8
- 47 马捷, 李峰, 宋月晗, 刘晶, 刘晓萌, 吴凤芝. 病证结合理论的研究与思考. 河北中医 2013; 35: 112-114
- 48 吕爱萍. 病证结合动物模型研究: 从理论创新到技术挑战. 中国中西医结合杂志 2013; 33: 6-7
- 49 刘丽梅, 王瑞海, 陈琳, 刘治中. 病证结合方证相应证候动物模型研究中的应用. 中国中医基础医学杂志 2010; 16: 88-90
- 50 夏小芳, 徐珊. 肝纤维化大鼠病证结合模型肝脏病理学观察. 浙江中医杂志 2010; 45: 101-102

同行评价

本文综述了复合多因素造模方法建立的肝郁脾虚型、气虚血瘀型、血瘀证等新型的病证结合疾病动物模型, 认为其可以有效地克服单纯用中医证模型或现代医学病理模型进行中药药效评价的不足, 并且更加贴近中医临床实际, 研究时更能准确地对中医证候的本质进行阐述.

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

