

Lewis 大鼠肾阳虚体质及其 HPA 轴功能失衡

寿旗扬¹, 张利棕¹, 蔡月琴¹, 方 鹏², 倪琳慧², 徐剑钦¹,
盛佳萍², 方明笋¹, 陈民利¹

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 2. 浙江中医药大学第二临床医学院; 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的 对 Lewis 大鼠肾阳虚体质及其 HPA 轴功能进行研究。方法 采用氢化可的松皮下注射法和切除肾上腺损伤 HPA 法建立大鼠肾阳虚模型, 同时 Lewis 大鼠与两种实验性肾阳虚模型进行比较, 并用一般体征、行为学、神经内分泌功能等检测和方法评估 Lewis 大鼠肾阳虚程度。结果 与正常 Wistar 大鼠比较, Lewis 大鼠体重明显重于同年龄的 Wistar 大鼠, 但体温、尿量和抓力明显低于 Wistar 大鼠 ($P < 0.01$), Lewis 大鼠的记忆能力有下降趋势, Lewis 大鼠肝脏指数、肾脏指数和肾上腺指数明显降低 ($P < 0.01$), 血清促肾上腺皮质激素 (ACTH)、促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、皮质醇 (Cort) 和尿 17-羟皮质类固醇 (17OHCS) 明显降低 ($P < 0.01$)。结论 因基因遗传而致 Lewis 大鼠肾上腺皮质功能减退, Lewis 大鼠具有先天性肾阳虚体质-临界性肾阳虚证或肾阳虚证前期。

【关键词】 Lewis 大鼠; 肾阳虚体质; HPA 轴功能失衡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 09-0008-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.002

Kidney yang deficiency constitution and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in Lewis rats

SHOU Qi-yang¹, ZHANG Li-zong¹, CAI Yue-qin¹, FANG Peng², NI Lin-hui², XU Jian-qin¹,
SHENG Jia-ping², FANG Ming-sun¹, CHEN Min-li¹

(1. Laboratory Animal Research Center, 2. the Second Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University. Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the kidney yang deficiency constitution and hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction in Lewis rats. **Method** Two kidney yang deficiency models were established by subcutaneous injection of hydrocortisone and by adrenalectomy to induce hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction in Lewis rats. Wistar rats were used as control and compared with the two types of Lewis rat models of kidney yang deficiency. The degree of kidney yang deficiency of the Lewis rats was evaluated by examination and detection of the general signs, behavior, and neuroendocrine function, and so on. **Result** Compared with the normal Wistar rats, the body weight of Lewis rats was significantly higher than that of Wistar rats at the same age. The body temperature, urine volume and grip strength were significantly lower than those of Wistar rats ($P < 0.01$ for all). The memory ability of the Lewis rats was slightly decreased. The liver, kidney and adrenal indexes were significantly decreased in the Lewis rats ($P < 0.01$). The

【基金项目】浙江省公益性技术应用研究计划(2015C37091);国家自然科学基金项目(81202972);浙江中医药大学校级科技创新团队(XTD201301);国家级大学生创新创业训练计划项目(201310344001)。

【作者简介】寿旗扬(1979-),男,副研究员,研究方向:比较医学,E-mail: sqy133@126.com。

【通讯作者】陈民利(1963-),女,教授,研究方向:比较医学,E-mail: cmli991@aliyun.com。

levels of serum ACTH, CRH, cGMP, Cort and urine 17OHCS were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** A very slight deficiency of adrenal cortex function of Lewis rats is caused by genetic inheritance, and Lewis rats have the constitution of congenital kidney yang deficiency (criticality or prophase of kidney yang deficiency).

【Key words】 Lewis rat; Wistar rat; Kidney yang deficiency, Hypothalamus-pituitary-adrenal dysfunction

肾阳是人体生命活动的原动力,为人体生命之根本^[1]。肾阳虚动物模型的建立可为肾阳虚的疾病研究及补肾助阳药药效的研究提供研究工具。常见的肾阳虚模型有肾上腺皮质功能抑制、甲状腺功能抑制、性腺功能受抑、恐伤肾,老年肾阳虚及房劳伤肾模型等^[2,3],其中外源性糖皮质激素所致的肾虚模型应用最为广泛。邝安堃教授首次建立了“氢化考的松肾阳虚”动物模型,是通过注射大剂量氢化可的松使垂体前叶促肾上腺皮质激素(ACTH)释放减少,动物出现一系列“耗竭”现象,其类似肾阳虚证的临床表现^[4,5]。

肾阳虚证与神经内分泌免疫网络密切相关,是多系统和器官功能的综合表现。大量实验研究证明,肾阳虚调控枢纽定位在下丘脑^[6,7],下丘脑-垂体-肾上腺轴/甲状腺轴/性腺轴的功能障碍和功能低下是肾阳虚证的基础^[8,9]。研究报道 Lewis 大鼠体内存在着下丘脑-垂体-肾上腺轴功能(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)的缺陷^[10,11],且易感实验性脑脊髓炎、类风湿关节炎等自身性免疫性疾病。在正常应激时,HPA 轴是免疫调节的负反馈环路,在 HPA 轴功能低下时,机体易患自身免疫性疾病;是因为皮质类固醇能抑制 Th1 细胞的产生,Th1 细胞则分泌 IL-2、TNF- γ 和 TNF- α ,这些细胞因子能刺激 B 淋巴细胞而产生大量的自身抗体;同时皮质类固醇还可诱导 TGF- β 生成^[12]。我们前期实验也证明了 Lewis 大鼠体内存在着下丘脑-垂体-肾上腺轴功能缺陷,Lewis 大鼠血清皮质醇水平显著低于正常 Wistar 大鼠血清皮质醇水平^[13]。我们根据以上结果推断,认为 Lewis 大鼠可能具有肾阳虚体质。

因此,本课题拟用氢化可的松皮下注射法和切除肾上腺损伤 HPA 轴法建立大鼠肾阳虚模型,同时取 Lewis 大鼠与前两种实验性肾阳虚模型进行比较,并用一般体征、行为学、神经内分泌功能等检测和方法评估 Lewis 大鼠肾阳虚程度,拟构建一种大鼠自发性肾阳虚体质模型,为补肾中药的开发和应用提供现代研究的依据和可靠的肾阳虚中医动物模型。

1 材料

1.1 试剂

氢化可的松注射液,100 mg/20 mL(5 mg/mL),5 支/盒,天津金耀药业有限公司,20130415。大鼠促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、皮质醇(CORT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP),尿 17-羟皮质类固醇(17-OHCS) ELISA 检测试剂盒,上海拜沃生物科技有限公司;戊巴比妥钠:规格:25 g/瓶,含量 > 99.0%,批号:WS20120112,德国进口分装。

1.2 动物

雄性 SPF 级 Lewis 大鼠,7~8 周龄,体重为(240~260)g,10 只;北京维通利华实验动物有限公司【生产许可证:SCXK(京)2012-0001】。雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,7~8 周龄,体重为(220~240)g,30 只,中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司【生产许可证:SCXK(沪)2012-0002】。大鼠肾上腺切除手术在浙江中医药大学动物实验研究中心 SPF 级屏障手术室中进行[SYXK(浙)2013-0184]。试验中所有实验动物饲养、使用和操作均按 3R 原则给予人道关怀。

1.3 仪器设备

AG204-电子分析天平,瑞士 Mettler; AF100 雪花状制冰机,美国 Scotsman; 725 型 -86℃ 低温冰箱,美国 Forma; Smart-MASS 小动物行为记录分析系统,西班牙 Panlab; MLS-3020 高压灭菌锅,日本三洋公司; DK-450B 型电热恒温水槽,上海森信实验仪器有限公司; BG-270 隔水式电热恒温箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂; SPX-150B 生化培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂; VarioScan Flash 波长多功能酶标仪,芬兰 Thermo Fisher 公司。

2 方法

2.1 氢化可的松法(Hydrocortisone, HYD)肾阳虚模型建立

取 20 只 7~8 周龄 Wistar 大鼠,预饲养 10 d 后,按体重均匀分为 Wistar 正常组(A 组)、Wistar-HYD 组(B 组),共 3 组,每组 10 只。Wistar-HYD 组

大鼠进行氢化可的松法肾阳虚模型建立,采用氢化可的松皮下注射 15 mg/kg 造模,每日 1 次,连续造模 3 周。

2.2 切除肾上腺损伤 HPA 轴法 (Bilateral adrenalectomy, BA) 肾阳虚模型建立

取 10 只 7~8 周龄 Wistar 大鼠,设立 Wistar-BA 组(C 组),预饲养 3 d 后,Wistar-BA 组大鼠进行双侧切除肾上腺损伤 HPA 轴法肾阳虚模型建立,大鼠腹腔注射 3.0% 戊巴比妥钠,麻醉剂量为 45 mg/kg,剃去腹部被毛消毒,在腹中线纵向切口,切除大鼠双侧肾上腺,术后以 0.5% 葡萄糖生理盐水代饮水,恢复 7 d 后,连续观察 3 周。

2.3 Lewis 大鼠肾阳虚体征与两种常用实验性模型的比较及药物反证

取 10 只 7~8 周龄 Lewis 大鼠,预饲养 10 d 后,设立 Lewis 组(D 组)。通过以下各种指标去评价 Lewis 大鼠肾阳虚体征及 HPA 轴功能失衡,连续观察 3 周。

2.4 大鼠一般体征的观察

对各组大鼠的体重、肛温、饮食量、饮水量、尿量进行观察。造模结束时观察大鼠自主活动情况。大鼠自主活动的测试:将大鼠放入自主活动仪中,在安静避光的环境中,安静 1 min 后,测 5 min 内大鼠自主活动次数。

2.5 大鼠行为学观察

2.5.1 开场实验:各组大鼠进行开场实验。圆形敞箱,高 40 cm,直径 80 cm,周壁、底面为黑色,并划定直径 40 cm 的中央区。每只动物测定 1 次,每次测定 5 min。将大鼠置于圆形敞箱底面的中心,用数码摄像机视频监控和记录大鼠轨迹,轨迹记录为水平运动大鼠的活动度,同时记录大鼠后肢直立次数记录为垂直运动次数了解大鼠对新鲜环境的好奇程度,并计数大便粒数。保证实验室内暗光、安静,两次实验之间将箱底打扫干净。实验完毕用小动物行为记录分析系统分析大鼠水平运动总距离、中央区运动距离、中央区滞留时间和中央区进入总次数。

2.5.2 Morris 水迷宫测试:开场实验结束后进行 Morris 水迷宫测试各组大鼠学习记忆能力。水迷宫水池高 50 cm,直径 120 cm,站台直径 10 cm,站台高出水面 2 cm,水温(22±0.5)°C,水池、日光灯、鼠笼等实验室各种物件的位置保持不变。在安静环境下,数码摄像机监测大鼠活动情况,利用小动物行为记录分析系统对其活动进行全程跟踪,并显示整

个活动轨迹。实验采用 1 d 训练 1 次。若动物 2 min 尚未找到站台,将动物拿到站台上并使它上面停留 20 s。训练 4 d 后进行水迷宫测试,记录 120 s 内找到站台所需的时间即逃避潜伏期。

2.6 血清 ACTH、CORT、CRH、cAMP、cGMP、17-OHCS 测定

各组大鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,心脏取血置离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,参照 ELISA 试剂盒说明书测定血清大鼠 CRH、CORT、ACTH、cAMP、cGMP,尿 17-OHCS。

2.7 统计学方法

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,所有数据以均数±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料应用 ANOVA 方差分析评价试验结果,两两比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 肾阳虚模型大鼠体重和体温的变化

由表 1 结果可见,各组实验前,与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组大鼠在试验前体重无明显差异,而 Wistar-BA 组在试验前进行了双侧肾上腺切除手术导致体重明显降低($P < 0.01$),Lewis 组大鼠由于动物品系差异 Lewis 大鼠体重明显高于同周龄的 Wistar 大鼠($P < 0.01$)。实验后,与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组大鼠每日皮下注射 15 mg/kg 氢化可的松后体重急剧降低($P < 0.01$),Wistar-BA 组大鼠与自身比较体重升高,但与正常组比明显降低($P < 0.01$),Lewis 组大鼠体重明显高于同周龄的正常 Wistar 大鼠($P < 0.01$)。一般观察上,Wistar-HYD 组和 Wistar-BA 组大鼠毛松、竖毛、毛发失去光泽,而 Lewis 组大鼠外形无异常。

与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组大鼠注射氢化可的松 3 周后,体温急剧降低($P < 0.01$),Lewis 组大鼠体温明显低于 Wistar 正常大鼠($P < 0.01$),而 Wistar-BA 组大鼠体温无明显变化($P > 0.05$),这与肾阳虚临床症状相悖,分析原因可能是由于肾上腺切除手术引起。

3.2 肾阳虚模型大鼠采食量、饮水量和尿量变化

由表 2 结果可见,与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组大鼠饮水量明显升高($P < 0.01$),尿量有升高的趋势($P > 0.05$);而 Wistar-BA 组大鼠饮水量和尿量明显升高($P < 0.01$);Lewis 组大鼠采食量和饮水量无明显变化($P > 0.05$),尿量略微明显升高($P < 0.05$)。

表 1 大鼠体重和体温变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.1 Changes of body weight and body temperature in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	第 0 周体重 Body weight, 0 wk (g)	第 2 周体重 Body weight, 2 wks (g)	第 3 周体重 Body weight, 3 wks(g)	第 3 周体温 Body temperature, 3 wks (°C)
Wistar 正常组 Normal Wistar rats	249.88 ± 11.03	300.13 ± 10.40	320.50 ± 10.57	38.10 ± 0.20
Wistar-HYD 组 HYD group Wistar rats	250.89 ± 11.22	223.00 ± 14.08 **	220.11 ± 14.08 **	36.26 ± 0.88 **
Wistar-BA 组 BA group Wistar rats	182.29 ± 18.90 **	235.14 ± 36.90 **	253.00 ± 41.04 **	37.33 ± 0.91
Lewis 组 Lewis rat group	299.78 ± 12.60 **	335.22 ± 18.63 **	357.22 ± 20.34 **	36.88 ± 0.81 **

注:与 Wistar 正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 大鼠采食量、饮水量和尿量变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.2 Changes of feed intake, water intake and urine volume in the rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	采食量 Feed intake(g/24 h)	饮水量 Water intake(mL/24 h)	尿量 Urine volume(mL/24 h)
Wistar 正常组 Normal Wistar rats	15.825 ± 3.535	20.650 ± 5.561	9.046 ± 2.909
Wistar-HYD 组 HYD Wistar rats	13.822 ± 4.279	34.044 ± 7.446 **	11.498 ± 3.335
Wistar-BA 组 BA Wistar rats	16.729 ± 4.547	46.44 ± 12.04 **	26.059 ± 9.782 **
Lewis 组 Lewis rat group	14.600 ± 3.959	19.722 ± 10.320	12.688 ± 3.762 *

注:与 Wistar 正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 肾虚模型大鼠抓力、自主活动、记忆能力等指标的变化

由表 3 结果可见,与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组、Wistar-BA 组和 Lewis 组大鼠抓力明显降低 ($P < 0.01$);Wistar-HYD 组大鼠的自主活动时间明显降低 ($P < 0.05$),而 Wistar-BA 组大鼠自主活动时间有升高趋势,Lewis 组大鼠仅在开场实验垂直运动次数中有降低的趋势。

与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组大鼠的开场中水平运动总距离、中央区运动距离、中央区滞留时间和中央区进入总次数均显著降低 ($P < 0.01$);Wistar-BA 组大鼠的开场中水平运动总距离

无明显变化 ($P > 0.05$),而中央区运动距离、中央区滞留时间和中央区进入总次数均有升高的趋势 ($P > 0.05$);Lewis 组大鼠的开场中水平运动总距离显著降低 ($P < 0.01$),而中央区运动距离、中央区滞留时间和中央区进入总次数均有降低趋势 ($P > 0.05$) (图 1)。

在水迷宫实验中,上平台时间为大鼠从入水到找到平台时间代表了大鼠记忆能力。与 Wistar 正常组比较,Wistar-HYD 组和 Lewis 组大鼠的上平台时间有延长的趋势 (说明大鼠记忆能力下降),Wistar-BA 组大鼠的上平台时间明显延长 ($P < 0.05$)。

表 3 大鼠抓力、自主活动、记忆能力等指标变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab.3 Changes of holding power, spontaneous activities and memory ability in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

项目 Items	Wistar 正常组 Normal Wistar rat group	Wistar-HYD 组 HYD Wistar rat group	Wistar-BA 组 BA Wistar rat group	Lewis 组 Lewis rat group
抓力/Holding power(g)	1681.5 ± 169.2	686.7 ± 128.7 **	979.0 ± 131.8 **	1107.6 ± 214.3 **
自主活动/Spontaneous activity(5 min)	98.11 ± 13.41	72.20 ± 24.72 *	110.25 ± 12.80	109.10 ± 24.25
垂直运动次数/ Number of vertical movement(n/5 min)	20.22 ± 7.68	13.00 ± 7.30	26.25 ± 6.27	14.50 ± 3.37
大便数/ Number of defecation(n/5 min)	1.22 ± 1.48	2.00 ± 1.76	1.00 ± 1.07	0.90 ± 1.29
水平运动总距离/ Total distance of horizontal movement(cm)	8569.7 ± 723.7	5643.8 ± 1090.7 **	8324.0 ± 790.4	7206.4 ± 1106.4 **
中央区运动距离/Central movement distance(cm)	1248.2 ± 328.4	637.0 ± 159.2 **	1413.5 ± 388.5	993.6 ± 431.4
中央区滞留时间/The central residence time(s)	34.0 ± 8.7	20.3 ± 8.6 **	46.3 ± 13.4 *	28.5 ± 11.9
中央区进入总次数/ Total number of entry into central region(n/5 min)	23.2 ± 6.5	12.6 ± 5.2 **	30.0 ± 6.5 *	18.3 ± 9.2
水迷宫逃避潜伏期/ Escape latency period(s)	27.44 ± 9.80	38.00 ± 30.86	60.25 ± 29.74 *	41.50 ± 18.13

注:与 Wistar 正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

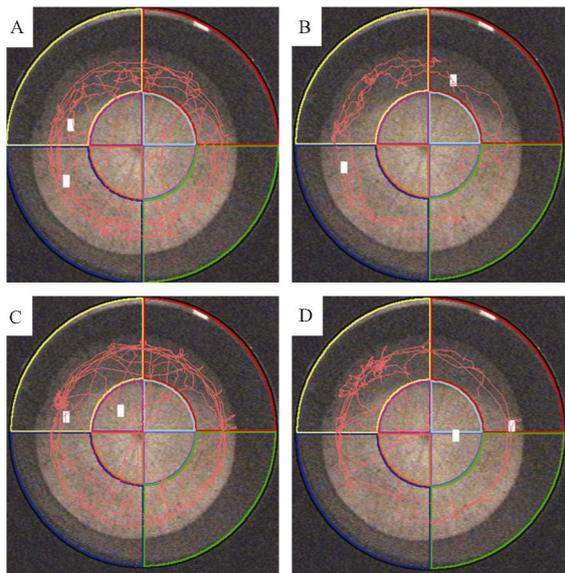


图 1 各组大鼠开场试验水平运动总距离、中央区运动距离等的变化(A:Wistar 正常组;B:Wistar-HYD 组;C:Wistar-BA 组;D:Lewis 组)

Fig.1 Changes of the total distance of horizontal movement and central movement distance in the rats tested by open field. (A: Normal Wistar rat group. B: HYD Wistar rat group. C: BA Wistar rat group. D: Lewis rat group)

3.4 肾阳虚模型大鼠脏器重量和脏器指数变化

由表 4 结果可见,与 Wistar 正常组比较, Wistar-HYD 组大鼠心脏指数、肝脏指数、脾脏指数、肾脏指数、肾上腺指数和肺脏指数明显升高 ($P < 0.01$); Wistar-BA 组大鼠肾脏指数和肺脏指数明显升高 ($P < 0.01, P < 0.05$); Lewis 组大鼠肝脏指数、肾脏指数和肾上腺指数明显降低 ($P < 0.01$)。

3.5 肾阳虚模型大鼠血清 ACTH、CRH、cAMP、cGMP、Cort 和尿液 17-羟皮质类固醇 (17OHCS) 变化

由表 5 结果可见,与 Wistar 正常组比较, Wistar-HYD 组大鼠血清 ACTH、cAMP、cGMP、Cort 和尿液 17OHCS 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); Wistar-BA 组大鼠血清 ACTH、Cort 和尿液 17OHCS 明显降低 ($P < 0.01$); Lewis 组大鼠血清 ACTH、CRH、cGMP、Cort 和尿液 17OHCS 明显降低 ($P < 0.01$),说明 Lewis 组大鼠未经干预处理自发性出现促肾上腺皮质释放激素 (CRH)-促肾上腺皮质激素 (ACTH)-皮质醇 (cortisol) 轴 (HPA 轴) 功能低下的情况。

表 4 肾阳虚模型大鼠脏器指数变化(g/kg 体重, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.4 Changes of visceral indexes in the rats (g/kg body weight, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	心脏指数 Cardiac index	肝脏指数 Liver index	脾脏指数 Spleen index	肾脏指数 Kidney index	肾上腺指数 Adrenal gland index	肺脏指数 Lung index
Wistar 正常组 Normal Wistar rats	3.199 ± 0.337	39.565 ± 2.459	2.131 ± 0.198	6.605 ± 0.374	0.148 ± 0.013	4.124 ± 0.358
Wistar-HYD 组 HYD Wistar rats	3.878 ± 0.410 **	43.438 ± 1.398 **	4.038 ± 1.489 **	7.698 ± 0.398 **	0.189 ± 0.024 **	5.649 ± 0.433 **
Wistar-BA 组 BA Wistar rats	3.700 ± 0.724	42.781 ± 6.742	2.565 ± 0.593	7.563 ± 1.026 *	/	5.631 ± 0.952 **
Lewis 组 Lewis rats	3.055 ± 0.208	32.440 ± 1.441 **	2.297 ± 0.201	7.056 ± 0.226 **	0.121 ± 0.015 **	3.937 ± 0.319

注:与 Wistar 正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 5 肾阳虚模型大鼠血清 ACTH、CRH、cAMP、cGMP、Cort 和尿 17OHCS 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Changes of serum ACTH, CRH, cAMP, cGMP, Cort and urine 17OHCS in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	促肾上腺皮 质激素 ACTH (pg/mL)	促肾上腺皮 质释放激 素 CRH (pg/mL)	17-羟皮质 类固醇 17OHCS ($\mu\text{mol/L}$)	环磷酸腺苷 cAMP (nmol/L)	环磷酸鸟苷 cGMP (nmol/L)	皮质醇 Cort (ng/mL)
Wistar 正常组 Normal Wistar rats	120.1 ± 14.7	112.7 ± 22.8	95.15 ± 6.69	49.15 ± 5.42	20.07 ± 1.61	538.43 ± 35.60
Wistar-HYD 组 HYD Wistar rats	97.8 ± 8.3 **	92.9 ± 14.9	86.68 ± 5.62 *	43.55 ± 2.77 *	18.04 ± 1.54 *	406.96 ± 27.58 **
Wistar-BA 组 BA Wistar rats	95.1 ± 8.4 **	91.2 ± 14.3 *	84.18 ± 5.70 **	41.92 ± 7.69	17.55 ± 2.77	396.26 ± 36.91 **
Lewis 组 Lewis rats	51.9 ± 6.7 **	70.6 ± 13.8 **	78.65 ± 5.93 **	44.12 ± 3.44 *	15.90 ± 1.34 **	451.73 ± 25.69 **

注:与 Wistar 正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the normal Wistar rat group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4 讨论

肾阳虚证是肾阳虚衰表现的证候。肾阳为诸阳之本,肾阳虚的中医辨证为“主症:腰膝酸痛,畏寒肢冷,性欲减退,舌质胖大,苔白,脉沉^[5]。常见于虚劳、哮喘、泄泻、水肿、阳痿等,建立有效的动物模型在肾阳虚证研究工作中不可缺少的一个重要环节^[14]。目前最常用的肾阳虚模型为氢化可的松肾阳虚模型。氢化可的松肾阳虚模型是用一定量外源性糖皮质激素使垂体前叶的 ACTH 释放受到抑制,进而使肾上腺皮质分泌类固醇激素减少,导致动物出现一系列的“耗竭”现象,腰膝酸软,性功能低下,畏寒肢冷,精神不振,气短而喘,消瘦、尿夜白浊等病理状态^[15,16]。模型动物的下丘脑视上核甲细胞数减少,乙细胞数增加,CRF mRNA 表达降低;肝细胞中线粒体破坏,肝细胞 RNA 含量降低,肝细胞中各种酶活性下降,肝糖元减少;免疫器官、免疫细胞损害而免疫低下等^[17,18]。

下丘脑损害和功能紊乱是肾阳虚证的主要病理基础,下丘脑-垂体-甲状腺、肾上腺、性腺不同环节和不同程度的变化,是肾阳虚证的主要病理环节。该模型的内源性糖皮质激素分泌受到抑制,但在皮下注射后大剂量外源性糖皮质激素可导致在注射后 1 h 左右体内外源性糖皮质激素水平急剧升高,有与肾阳虚患者下丘脑-垂体-肾上腺轴功能减退、血浆皮质醇减少的病理变化相左。因为外源性糖皮质激素干预可治疗某些自身免疫性疾病,因此,在建立某些肾阳虚病证结合模型(如肾阳虚型类风湿关节炎、哮喘)中存在一些问题,该模型存在一定局限性。

神经内分泌免疫网络的整合中枢在下丘脑。免疫系统不仅有神经内分泌激素受体,还能合成神经递质和内分泌激素,免疫系统产生的细胞因子能影响中枢神经系统,中枢神经系统又能合成细胞因子及其受体,对其发生反应。由此构成神经-内分泌-免疫调节网络^[19]。机体受到刺激后 HPA 轴活性增强,HPA 轴作为神经内分泌网络的枢纽不仅在机体内环境平衡中起重要作用,而且能调节机体衰老过程。应激反应的中枢效应主要发生在 HPA 轴,而下丘脑的室旁核是 HPA 轴活动的直接控制部位^[20]。Lewis 大鼠体内存在下丘脑-垂体-肾上腺轴功能缺陷,我们推断 Lewis 大鼠可能具有肾阳虚体质。

通过实验发现,与正常 Wistar 大鼠比较,Lewis 大鼠体重明显重于同周龄的 Wistar 大鼠,但体温、尿量和抓力明显低于 Wistar 大鼠($P < 0.01$),Lewis 大鼠的记忆能力有下降趋势,Lewis 大鼠肝脏指数、肾脏指数和肾上腺指数明显降低($P < 0.01$),血清 ACTH、CRH、cGMP、Cort 和尿液 17OHCS 明显降低($P < 0.01$);Lewis 大鼠因基因遗传而致肾上腺皮质功能有所减退。以上结果证明了 Lewis 大鼠具有先天性肾阳虚体质-临界性肾阳虚证或肾阳虚证前期,因 Lewis 大鼠基因遗传而致肾上腺皮质功能有所减退,有极轻度的肾阳虚症状,亦可称 Lewis 大鼠为隐性肾阳虚动物,在中医理论中属“未病”范畴。为我们下一步全面评估 Lewis 大鼠肾阳虚模型及病症结合模型打下了坚实基础。

参考文献:

- [1] 张文军,孙升云.从表观遗传学探讨中医“肾为先天之本、脾为后天之本”理论[J].广州中医药大学学报,2015,32(3):559-565.
- [2] 陈英华,欧阳轶强,孙琪,等.肾阳虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(10):746-750.
- [3] 孙蓉,杨倩.肾阳虚证动物模型研制进展与中药药效评价的思考[J].药物评价研究,2010,33(1):22-24.
- [4] 邝安堃,吴裕,丁霆,等.某些助阳药对大剂量皮质激素所致耗竭现象的影响[J].中华内科杂志,1963,11(2):113.
- [5] 彭成.“氢化考的松阳虚”动物模型的反思[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(2):55-57.
- [6] 蔡定芳,沈自尹,张玲娟,等.右归饮对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴功能抑制模型的影响[J].中国免疫学杂志,1994,10(7):236-239.
- [7] 蔡定芳,沈自尹,陈晓红,等.乌头碱对大鼠下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素含量的影响[J].中国中西医结合杂志,1996,16(9):544-546.
- [8] 欧阳轶强,邹移海,张薇,等.对大鼠他巴唑肾阳虚证动物模型下丘脑-垂体-靶腺轴几项指标的考察[J].中医药学刊,2006,24(9):1658-1661.
- [9] 沈自尹.肾的研究(续集)[M].上海:上海科学技术出版社,1990:313.
- [10] Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, et al. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(12): 4771-4775.
- [11] Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(7): 2374-2378.

(下转第 38 页)

- [3] Mathew R, Gewitz MH. Pulmonary hypertension in infancy and childhood [J]. *Heart Dis*, 2000, 2: 362 – 368.
- [4] Lam CF, Peterson TE, Croatt AJ, et al. Functional adaptation and remodeling of pulmonary artery in flow-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289 (6): H2334 – H2341.
- [5] Wei L, Zhao Q, Chen A, et al. Establishment of hemodynamic pulmonary hypertension after total resection of right lung in rats [J]. *Clinical Med J China*, 2007, 14(4): 482 – 484.
- [6] Zhao K, Wang H, Hou M, et al. Preventive effects of different number of mesenchymal stem cells transplantation on lung injury in rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2012, 22(1): 34 – 38.
- [7] Rungtatscher A, Hallström S, Linardi D, et al. S-nitroso human serum albumin attenuates pulmonary hypertension, improves right ventricular-arterial coupling, and reduces oxidative stress in a chronic right ventricle volume overload model [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2015, 34(3): 479 – 488.
- [8] Liu C, Yan Z, Fang C, et al. Establishment and comparison of two reliable hyperkinetic pulmonary hypertension models in rabbits [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 148(5): 2353 – 2359.
- [9] 张留保, 陈进贵, 刘平, 等. 不同动物颈总动脉结扎后存活率比较 [J]. *解剖科学进展*, 1997, 3(3): 277.
- [10] 张辉, 郑荣琴. 超声观察单侧颈总动脉结扎前后心血管指标变化的实验研究 [J]. *生物医学工程与临床*, 2012, 16(4): 322 – 326.

[修回日期] 2015-07-25

(上接第 13 页)

- [12] Newson MJ, Roberts EM, Pope GR, et al. The effects of apelin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis neuroendocrine function are mediated through corticotrophin-releasing factor- and vasopressin-dependent mechanisms [J]. *J Endocrinol*, 2009, 202(1): 123 – 129.
- [13] 傅惠英, 寿旗扬, 蔡月琴, 等. 盐酸奥芬米洛对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠下丘脑 – 垂体 – 肾上腺轴功能的影响 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2013, 30(2): 1 – 4.
- [14] 张琰, 邓树泳, 马娜, 等. 肾虚动物模型的现代研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(3): 838 – 841.
- [15] 施玉华, 马正立, 汪丽亚, 等. 中药复方对小鼠氢化考的松模型肝切片的组织学与组织化学研究 [J]. *中医杂志*, 1983, (5): 382 – 385.
- [16] 彭成. 补肾壮阳液的药理研究 [J]. *中药药理与临床*, 1994, (特): 17.
- [17] 施玉华. 动物模型在中医药理论形态学研究中的应用 [D]. 北京: 全国中医药动物模型研讨会论文集汇编. 1993: 48.
- [18] 沈自尹. 中医肾的古今论 [J]. *中医杂志* 1997, (5): 48.
- [19] 谢启文, 王高峰, 王淑芬, 等. 现代神经内分泌学. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 351 – 355.
- [20] Chrousos GP, Gold PW. The concept of stress and stress system disorder [J]. *JAMM*, 1992, 267: 1244 – 1252.

[修回日期] 2015-07-25

(上接第 17 页)

- in pristane nephropathy [J]. *J Autoimmun*, 2010, 35(4): 291 – 298.
- [17] Sano H, Takai O, Harata N, et al. Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments [J]. *Scand J Immunol*, 1989, 30(1): 51 – 63.
- [18] Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. *Nature*, 2000, 408: 740 – 745
- [19] Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(7): 381 – 386.
- [20] Shi Z, Cai Z, Sanchez A, et al. A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (6): 4517 – 4524.
- [21] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 709 – 716.
- [22] Means TK, Latz E, Hayashi F, et al. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9 [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 407 – 417.

[修回日期] 2015-07-25