

小鼠腹腔水液体积检测方法建立及 肾阳虚模型小鼠水负荷的评价

李 静, 杨 勇, 容 蓉

(山东中医药大学, 济南 250355)

【摘要】 **目的** 建立小鼠腹腔水液体积的检测方法并评价肾阳虚模型小鼠的水负荷状况。**方法** 选取正常小鼠12只,根据“阿基米德原理”改进实验方法测量小鼠的腹腔水液体积,对其腹腔水液体积测量的稳定性进行评价;选取正常小鼠5只,利用小鼠腹腔水液检测方法对其进行线性关系考察;将SPF级昆明种雄性小鼠30只,随机分为正常组和肾阳虚模型组,肾阳虚模型组上午按0.08 mg/10 g腹腔注射苯甲酸雌二醇注射,正常组腹腔注射相同剂量的大豆油,下午两组均腹腔注射1 mL的生理盐水造成水负荷,连续15 d。**结果** 该测量方法的稳定性和线性关系考察均取得了良好的效果;与正常组相比,造模后体重显著性降低($P < 0.01$),肛温显著性降低($P < 0.01$),趾温差异无显著性($P > 0.05$);自主活动明显减少($P < 0.05$);游泳时间明显降低($P < 0.01$),综合评价说明肾阳虚造模成功;肾阳虚模型组的腹腔水液测量体积整体表现出下降的趋势,腹水指数显著高于正常组($P < 0.05$)。**结论** 该检测方法可以快速、准确的测量出小鼠腹腔水液测量体积和腹水指数的变化,可以较客观地评价中医证候的特点,为中医证候症状描述进一步提供实验数据支持。

【关键词】 证候模型;小鼠;腹腔水液体积检测方法;阿基米德原理

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0074-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.016

Establishment of a measurement method of peritoneal fluid volume and evaluation of the water load in mouse models of kidney-yang deficiency syndrome

LI Jing, YANG Yong, RONG Rong

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a measurement method of peritoneal fluid volume in mice and evaluation of the water load in mouse models of kidney-yang deficiency syndrome in Chinese medicine. **Methods** To improve the measurement method of peritoneal fluid volume in mice based on Archimedes' principle. Twelve normal mice were selected to evaluate the measurement stability of peritoneal fluid volume. Five normal mice were selected for study of the linear relationship of ascites detection method. Thirty SPF male Kunming mice were randomly divided into control group and kidney-yang deficiency model group. The mouse models of kidney-yang deficiency were generated by intraperitoneal injection of estradiol benzoate in a dose of 0.08 mg/10 g in the morning for consecutive 15 days. The mice of normal control group were injected the same dose of soybean oil. All mice of the both groups received intraperitoneal injection of 1 mL saline in the afternoon to make water load. **Results** Good effect of the measurement stability and linear relationship

【基金项目】国家自然科学基金项目(No. 81273626);山东省中医药科技项目(No. 2011-027);山东省高等学校科技计划项目(No. J10LF20)。

【作者简介】李静(1987-),女,硕士研究生,研究方向:经方的现代研究,电话:0531-89628505,Email: jingling1206@163.com。

【通讯作者】杨勇(1972-),男,副教授,研究方向:经方的现代研究,电话:0531-89628505,Email: yy7204@163.com。

study was achieved. Compared with the control group, the body weight of mice after modeling was significantly decreased, rectal temperature significantly declined ($P < 0.01$), spontaneous motor activity was significantly reduced ($P < 0.05$), and swimming time was significantly shorter ($P < 0.01$). All the signs indicated that the kidney-yang deficiency was successfully produced in the mice. The peritoneal fluid volume in mice of the kidney-yang deficiency model group showed a decreasing trend, and the ascites index was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The established detection method can quickly and accurately measure the mice peritoneal cavity fluid volume and changes of the ascites index. It can be used to objectively evaluate the characteristics of TCM syndrome and provide experimental data for the TCM symptom description.

【Key words】 Syndrome, Chinese medicine; Mouse, model; Mice; Peritoneal fluid volume; Detection method; Archimedes' principle

在正常情况下,为了使各个脏器及肠道保持润滑,机体的腹腔内常会有少量的液体^[1],传统中医认为,水液在体内主要是通过肺、脾、肾和三焦来共同完成吸收、转输和代谢,若脏腑功能紊乱,就会导致气血津液运行失常,引起体内水钠储留,形成腹水^[2]。本研究采用腹腔注射苯甲酸雌二醇注射建立肾阳虚模型^[3],并在同一时间给予相同剂量的生理盐水造成水负荷,连续 15 d,造成脏腑功能失调,使小鼠的水液代谢异常,腹水增多。查阅相关文献^[4]发现腹水的测量方法主要有称体重、抽腹水测量腹水量、测量腹围等,但以上方法干扰因素多,测量误差大,极大地影响了对中医证候模型整体的评价。因此,为了快速、准确、客观地测量小鼠的腹腔内的水液体积,我们基于“阿基米德原理”并改进实验方法,创建了小鼠腹腔水液体积的检测方法,并根据此方法评价肾阳虚模型小鼠的水负荷状况。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:SPF 级昆明种雄性小鼠,体重 18 g ~ 22 g,由山东鲁抗动物实验中心提供(许可证编号 SCXK(鲁)20080002)。

1.1.2 实验试剂与仪器:0.9% 氯化钠注射液(山东洁晶药业有限公司,批号 11071272);苯甲酸雌二醇(上海通用药业股份有限公司,批号 100801);蒸馏水;ZIL-2 型小鼠自主活动仪(北京医科院药研所);MC-142L 欧姆龙电子体温计(欧姆龙大连有限公司);DT-880B 手持式红外人体表面温度快速筛检仪(深圳市华盛昌机械实业有限公司);YP601N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);1000 mL 量杯,铁架台,天平砝码(上海实干实业有限公司);手术线;镊子。

1.1.3 实验条件:室温控制在 20℃ ~ 25℃,相对湿

度 55% ~ 70%,保持室内干燥、清洁,所有动物正常饮食饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 腹腔水液体积测量方法:(1)将量杯中装入 1 000 mL 的蒸馏水放在电子天平上读数归零,小鼠脱颈椎处死后仰卧取其胸骨剑突的位置(用细的记号笔标记)作为腹腔水液体积的测量点;(2)为了减少小鼠的浮力,用手术缝合线在小鼠的尾部负重 20 g 的天平砝码(最后测量结果应减去 20 g 砝码所产生的体积)。注意测量过程中切勿碰到量杯的壁及底部,否则影响测量结果的准确性。根据“阿基米德原理” $F_{浮} = G_{排} = \rho_{液} g V_{排}$,物体排开液体的重力与液体的密度和被物体排开液体的体积两个因素相关^[5],在该实验中所用的液体是 20℃ 的蒸馏水其密度为 1.0 g/cm³,因此物体排开液体的重力即为被物体排开液体的体积。(3)最后将小鼠缓慢的浸入量杯至测量点后固定在铁架台上,待读数稳定后读取数据即可。如图 1 所示。

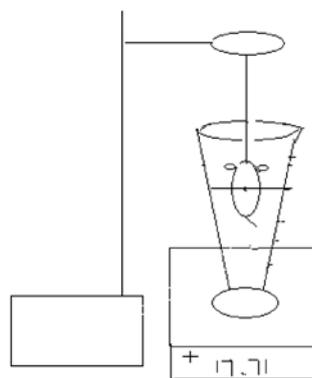


图 1 腹腔水液体积测量简易图

Fig. 1 Schematic diagram of the peritoneal fluid volume measurement

1.2.2 腹腔水液体积测量稳定性实验:选取 12 只

正常小鼠,称重,依据上述的方法测量。将小鼠从量杯取出后用滤纸将其身上的水分充分吸干再准确吸取 1 mL 的蒸馏水注入小鼠的腹腔内,重复上述操作读取数据,然后比较注射 1 mL 蒸馏水前后腹腔水液体积的差值,结果见表 1。

1.2.3 腹腔水液体积测量线性关系考察:选取 5 只正常小鼠,称重,脱颈椎处死后,分别准确吸取 0 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL、2.5 mL、3 mL 不同体积的蒸馏水注入小鼠的腹腔内,按照 5.1 的实验操作测量腹腔水液体积并计算腹水指数,考察其线性关系,结果见图 2。

1.2.4 肾阳虚模型小鼠腹腔水液体积的测量:将 SPF 级昆明种雄性小鼠 30 只,称重,随机分为正常组和肾阳虚模型组,肾阳虚模型组上午按 0.08 mg/10 g 腹腔注射苯甲酸雌二醇注射,每日的给药剂量按照造模第一天小鼠的体重计算,连续 15 d,造成肾阳虚小鼠模型^[6],正常组上午腹腔注射相应剂量的大豆油,下午两组均给予 1 mL 的生理盐水造成水负荷,每日观察小鼠的一般体征,在造模第 13 d 测量两组小鼠的肛温、趾温,第 14 天测量两组小鼠的自主活动和游泳时间,综合评价造模是否成功,造模成功后第 15 天,称重,摘眼球取血,将量杯中装入 1 000 mL 的蒸馏水放在电子天平上将读数归零,然后重复 5.1 的实验操作,比较正常组和肾阳虚模型组腹腔水液体积、腹水指数的差异。腹腔水液体积应等于电子天平所显示的读数,腹水指数 = 腹腔水液体积/体重 × 100%。

1.2.5 统计学方法:采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理,计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两独立样本均数比较的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔水液体积稳定性评价

实验结果表明该测量方法对于测量小鼠的腹腔水液体积具有良好的稳定性,见表 1。

表 1 12 只小鼠注射 1 mL 蒸馏水前后腹腔水液体积比较 ($\bar{x} \pm s$)

测量时间	动物只数(n)	腹腔水液体积 (mL)
Measurement time	Number of mice	Peritoneal fluid volume
注射前 Before injection	12	33.57 ± 1.73
注射后 After injection	12	34.58 ± 1.67
差值 Difference		1.01 ± 0.29

2.2 线性关系考察

按照 5.1 的实验方法测定腹腔水液体积,以向小鼠腹腔内注射蒸馏水的剂量为横坐标,分别以腹腔水液体积、腹水指数为纵坐标做回归分析,得回归方程分别为 $Y = 0.9529X - 0.0521$ ($R^2 = 0.9947$), $Y = 8.9416X + 106.62$ ($R^2 = 0.9269$),结果表明,注射蒸馏水的量在 0 ~ 3 mL 之间与腹腔水液体积、腹水指数之间呈良好的线性关系,见图 2、图 3。

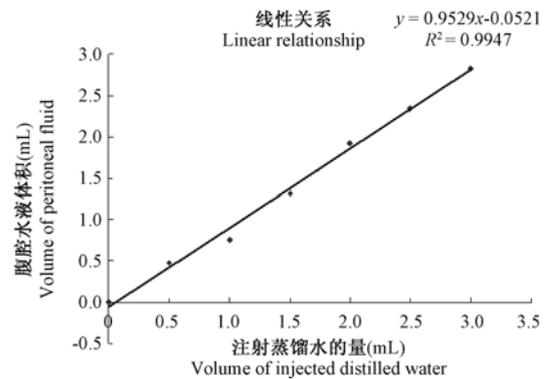


图 2 注射蒸馏水的量与腹腔水液体积线性关系考察

Fig. 2 Linear relationship of the injected distilled water and peritoneal fluid volume

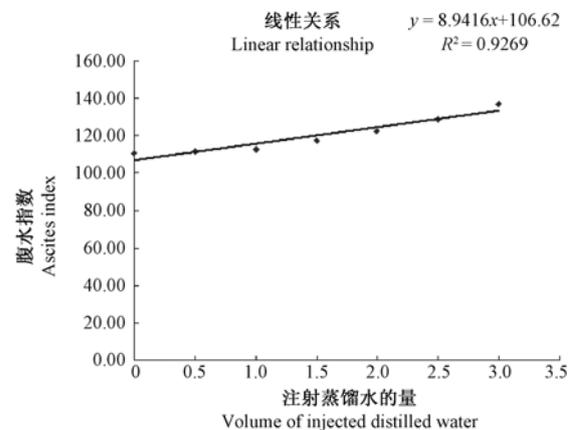


图 3 注射蒸馏水的量与腹水指数线性关系考察

Fig. 3 The linear relationship of injected distilled water and ascites index

表 2 两组小鼠造模前后体重的变化

Tab. 2 Comparison of the body weight of the model mice of the two groups before and after modeling

组别	只数(n)	造模前 1 d	造模后第 15 天
Groups	Number of mice	1 d before modeling	15 d after modeling
正常组 Normal	15	20.61 ± 2.02	33.03 ± 2.74
模型组 Model	13	20.97 ± 2.12	26.44 ± 2.73**

注:造模后与正常组比较,** $P < 0.01$ 。

Note: After modeling, compared with the normal group, ** $P < 0.01$.

表 3 两组小鼠肛温、趾温、自主活动、游泳时间的比较
Tab. 3 Comparison of two groups of the rectal temperature, toe temperature, locomotor activity and swimming time of mice in the two groups

组别 Groups	动物数 Number of mice(n)	肛温 /°C	趾温 /°C	自主活动/次/10 min Spontaneous locomotor activity	游泳时间/min Swimming time
正常组 Normal	15	37.11 ± 0.29	23.2 ± 0.5	335 ± 102	40.73 ± 19.89
肾阳虚模型组 Kidney yang-deficiency	13	36.57 ± 0.52 **	23.1 ± 0.5	254 ± 83 *	17.26 ± 12.62 **

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

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

表 4 两组小鼠腹腔水液体积、腹水指数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of peritoneal fluid volume and ascites indexes of the mice in the two groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	动物数(n) Number of mice	腹腔水液 测量体积 Peritoneal fluid volume	腹水指 数(%) Ascites index
正常组 Normal	15	20.39 ± 1.91	61.76 ± 3.57
肾阳虚模型组 Kidney yang-deficiency	13	17.22 ± 2.10	65.09 ± 3.77 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, * $P < 0.05$.

2.3 正常组与肾阳虚模型组小鼠一般体征的比较

正常组小鼠皮毛干爽、对外界反应灵敏,精神状态好,体重呈逐渐增长的趋势,肾阳虚模型组小鼠皮毛无光泽,出现竖毛现象,背腹部潮湿出汗,蜷缩,精神萎靡,对外界反应迟钝,体重降低等肾阳虚表现。经统计学分析,与正常组相比,造模后体重显著性降低($P < 0.01$),见表 2。

2.4 正常组与肾阳虚模型组小鼠肛温、趾温、自主活动、游泳时间的比较

与正常组相比,造模后肛温显著性降低($P < 0.01$),趾温差异无显著性($P > 0.05$);自主活动明显减少($P < 0.05$);游泳时间明显降低($P < 0.01$),综合评价体重、肛温、趾温、自主活动、游泳时间,说明肾阳虚造模成功,见表 3。

2.5 正常组与肾阳虚模型组腹腔水液体积、腹水指数比较

与正常组相比,肾阳虚模型组腹腔水液体积整体表现出下降的趋势,腹水指数模型组高于正常组,具有统计学意义($P < 0.05$),见表 4。

3 讨论

水肿是过多液体在组织间隙或体腔中积聚的一种病理过程,水肿液在体腔内蓄积过多时通常称为积液或积水,如胸腔积水(胸水),腹腔积水(腹水)、心包积水、脑室积水等,腹水属于中医学“鼓胀”范畴,是临床常见病证之一。产生腹水的病因

很多,比较常见的是肝性腹水、癌性腹水、结核性腹水等,是腹腔内液体的产生和吸收失去动态平衡的结果。中医认为,水为阴邪,水液停聚,运化失常,或为痰、或为饮,聚集在体内既是病理产物,又是常见的致病因素。腹水的产生可由脾失健运、运化失职、水湿停滞、肾失气化所致,长期腹水积聚可使脾肺肾的功能失调导致水湿内停^[7]。临床上对阳虚型腹水患者可通过望闻问切来辩证处方^[8],但基础研究却缺乏对实验动物腹水情况进行客观、精确的测量方法。本研究采用苯甲酸雌二醇注射液造成肾阳虚模型,模型小鼠出现竖毛、弓背蜷缩、背腹部出汗、消瘦、畏寒肢冷、精神萎靡、腰膝酸软等肾阳虚证状。与正常组相比,肾阳虚模型组的肛温显著性降低($P < 0.01$),说明畏寒肢冷造模成功;自主活动明显减少($P < 0.05$),说明精神萎靡造模成功;游泳时间明显降低($P < 0.01$),说明腰膝酸软造模成功。肾阳虚常会导致水泛,水液代谢失常,本实验对肾阳虚小鼠腹腔注射过量的生理盐水,连续 15 d,将会导致模型动物体内因肾阳虚衰,气化无权,水湿滞留,伴有不同程度腹腔积水的“水湿内停”的表现,这也同时符合了中医“肾阳不足,肺失通调,脾失健运,肾失开阖”在病机方面的演变规律^[9]。因此,我们通过检测肾阳虚模型小鼠腹腔水液测量体积和腹水指数的变化可以能较客观地评价中医证候的特点,为中医证候症状描述进一步提供实验数据支持。

阿基米德原理是浸在液体里的物体受到向上的浮力,浮力的大小等于物体排开液体所受的重力, $F_{浮} = G_{排} = \rho_{液} g V_{排}$,物体排开液体的重力是由液体的密度和被物体排开的液体的体积,浮力的大小与被测物体的密度、质量、体积、形状等无关,同时也与容器中液体的多少没有关系。在该实验中所用 20°C 蒸馏水的密度为 1.0 g/cm³,因此我们利用 $G_{排} = V_{排}$,物体排开液体的重力即为被物体排开液体的体积。本研究就是利用了“阿基米德原理”改

进实验方法对该方法进行了稳定性实验和线性关系考察均取得了良好的效果。小鼠胸骨剑突以下解剖部位主要包括胃、肠等腹腔脏器组织,因此为了能够准确的测量小鼠腹腔水液测量体积的变化,我们选择小鼠胸骨剑突部位作为测量点,该研究采用腹腔注射苯甲酸雌二醇注射液建立肾虚模型,并在相同的时间点腹腔注射 1 mL 的生理盐水造成水负荷,连续造模 15 d,造成小鼠脏腑功能失调,水液代谢异常,肾虚模型小鼠因动物消瘦、体质羸弱,其体重和腹腔水液测量体积在整体上表现出下降的趋势(这也能排除因动物皮下脂肪、肠道内容物等增多会造成腹腔水液测量体积的增高,而出现假阳性现象),但腹水指数却显著性升高,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.05$),该测量方法简单易行、容易操作,可以快速的测量出小鼠的腹水指数,为以腹水为指征的相关中医证候模型的评价提供借鉴和参考,为中医证候模型的客观化评价提供量化的数据支持。

济南益延科技发展有限公司李云峰老师对本实验提出的宝贵意见,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 孙文江,石君华. 真武汤治疗阳虚型肾病综合征水肿临床观察 [J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(6):46-47.
- [2] 姜群生. 经方治疗肾系水肿病的研究与分析 [D]. 北京,中国中医科学院, 2010.
- [3] 陈素红,吕圭源,范景,等. 海马不同提取物对雌二醇致肾虚小鼠的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(2):258-262.
- [4] 张萍,任永申,付强,等. 软肝消水巴布剂对 S180 腹水模型小鼠的治疗作用 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(4):259-262.
- [5] 宋维才,侯桂民. 阿基米德原理的内涵 [J]. 唐山师专学报, 2000, 22(2):50-51.
- [6] 李静,杨勇,尹翠翠,等. 肾虚小鼠模型呼吸代谢转换率、产热量的实验研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(2):148-151.
- [7] 李霞. 加味柴苓汤联合顺铂、白介素-2 腹腔内注射治疗肝癌腹水的临床研究 [D]. 南京,南京中医药大学.
- [8] 韩凯. 中西医结合治疗脾肾阳虚型腹水疗效观察 [J]. 中医学报, 2012, 27(10):1369-1370.
- [9] 王钰霞,陈魁敏,郝伟. 真武汤对阳虚小鼠作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(1):48-49.

[修回日期]2013-12-11

(上接第 73 页)

- [5] Blake JA, Richardson JE, Bult CJ, et al. MGD: the Mouse Genome Database [J]. Nucl Acids Res, 2003, 31(1):193-195.
- [6] Bult CJ, Blake JA, Richardson JE, et al. The Mouse Genome Database (MGD): integrating biology with the genome [J]. Nucl Acids Res, 2004, 32:D476-D481.
- [7] Raes G, Ghassabeh GH, Brys L, et al. The metastatic T-cell hybridoma antigen/P-selectin glycoprotein ligand 1 is required for hematogenous metastasis of lymphomas [J]. Int J Cancer, 2007, 121(12):2646-2652.
- [8] Goda MA, Tanaka T, Monden M, et al. Characterization of an apparently conserved epitope in E- and P-selectin identified by dual-specific monoclonal antibodies. Eur J Immunol, 1999, 29:1551-1560.
- [9] Vadas MA, Harlan J. The selection [M]. New York, Harward, 1997: 1.
- [10] Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer [J]. Cancer Microenviron, 2008, 1(1):69-83.
- [11] Roy Fleischmann R, Yocum D. Does safety make a difference in selecting the right TNF antagonist [J]. Arthritis Res Ther. 2004; 6(Suppl 2): S12-S18.
- [12] Egberts JH, Cloosters V, Noack A, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis [J]. Cancer Res, 2008, 68(5):1443-50
- [13] Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, et al. Tumor necrosis factor- α promotes malignant pleural effusion [J]. Cancer Res, 2007, 67(20):9825-34
- [14] Scott KA, Moore RJ, Arnott CH, et al. An anti-tumor necrosis factor- α antibody inhibits the development of experimental skin tumors [J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(5):445-451.
- [15] Lara T, Joachim S, Anke S, et al. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes [J]. J Leuk Biol. 2006, 79:1306-1313.

[修回日期]2013-12-11