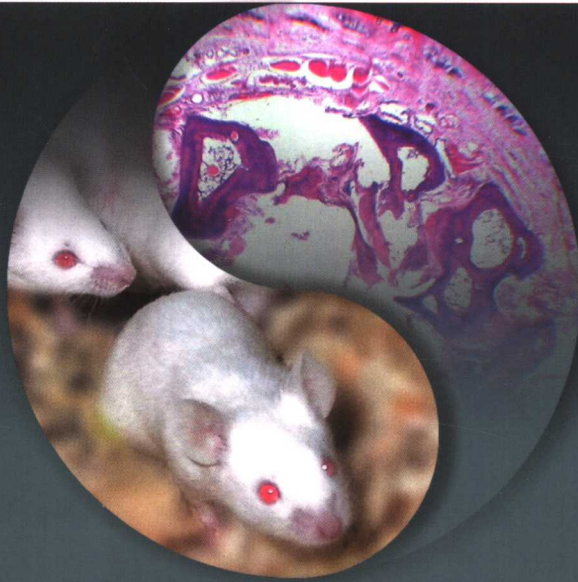


主编◎方肇勤

辨证论治实验方法学

——实验小鼠诊法与辨证



BIANZHENG LUNZHI SHIYAN
FANGFAXUE

SHIYAN XIAOSHU
ZHENFA YU BIANZHENG

上海科学技术出版社

辩证论治实验方法学

——实验小鼠诊法与辨证

主 编	方肇勤		
编 委	潘志强	陈 晓	
编写人员	卢文丽	侯 俐	廖明娟
	付晓伶	陈德溯	汤伟昌
	管冬元	吴中华	许家佗
	阚卫兵	许 敏	李海燕

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

辨证论治实验方法学：实验小鼠诊法与辨证/方肇勤
主编. —上海：上海科学技术出版社，2006.10
ISBN 7 - 5323 - 8554 - X

I.辨... II.方... III.实验动物 - 鼠科 - 应用 -
辨证论治 - 实验方法 IV.R241 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 075674 号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行

上海科学技术出版社
(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销

常熟市兴达印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 17.5 插页 2

字数 360 000

2006 年 10 月第 1 版

2006 年 10 月第 1 次印刷

定价：38.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题，
请向工厂联系调换

内 容 提 要

本书是关于实验小鼠诊法和辨证方法学的学术专著,介绍了该领域研究背景、小鼠诊法和辨证论治的研究与发展,包括小鼠常见的证候表现及其与人类的比较,小鼠爪、尾、舌等组织学特征,小鼠诊法检测技术、方法和标准的探索与建立,荷瘤小鼠辨证方法的探索与建立,小鼠常见虚证模型的比较与评价,不同品系小鼠虚证的比较,荷瘤小鼠分期论治,荷瘤小鼠辨证论治等;建立了小鼠诊法检测和辨证标准,包括小鼠诊法工作站与操作标准、小鼠诊法采集项目标准、小鼠诊法和辨证记录用纸、小鼠常见证候辨证标准。同时介绍了小鼠常用行为学检测方法,常见中医证候小鼠模型的制作方法 with 评价,常见大鼠、小鼠疾病模型的制作方法 with 评价等。

本书内容丰富,图文并茂,深入浅出,新颖实用。既可作为高等中医院校各中医药相关专业教材,又可供各类从事中医中药专业和涉及中医药研究的教师、研究人员和医务人员参考。

前 言

辨证论治是中医学的特色与优势所在,证候和辨证论治突出的疗效是客观存在的。那么,证候形成的机制是什么?证候与疾病,证候与机体系统、组织、细胞、分子之间的复杂关系是什么?辨证论治的机制是什么?如何提高辨证论治的疗效?要回答这样的问题,有待开展大量的动物实验研究。

然而,以往由于缺少小鼠等实验动物四诊的方法、技术和理论,有关辨证论治的动物实验研究,往往采用治疗反证、创伤性实验检测来评估动物证候模型成功与否,治疗取效与否。这与中医讲究望闻问切四诊的辨证论治不符,而且由于采用创伤性检测,大多要求处死动物,使得动态跟踪和观察动物在疾病发生与发展过程中证候的演变、对治疗的反应等发生困难;实验室检测,成本高、周期长,不利于研究的高效、批量要求;尤其是,证候是体内多系统、组织、细胞、分子等不同层次生物学复杂变化的外在综合反映,实验室若干指标的检测或治疗反证,难以替代四诊和辨证。另一方面,以往的研究也一再观察到,小鼠等实验动物是存在证候和证候演变的,生理状态下有体质的差异,病理状态下有同病异证和异病同证,而不加辨证的治疗,疗效往往受到限制。

因而,我们提出实验小鼠非创伤性四诊和基于四诊的辨证论治假说,并开展了长期的探索性研究,涉及实验小鼠诊法的理论探讨,小鼠四诊方法的探索和建立,包括小鼠诊法采集和标准化方法、小鼠部分诊法信息量化,建立了包括小鼠诊法采集项目标准、小鼠诊法工作站和操作标准,以及小鼠常见证候辨证标准等3个标准;还开展了小鼠辨证论治的尝试和机制探索。期间涉及大量的常见虚证动物模型的复制、比较、疗效的比较,常用不同品系小鼠及其气虚、血虚模型的复制、比较等。在小鼠诊法和辨证的标准化、客观化方面取得了突破,取得了阶段性成果。

在多次全国范围的学术交流中,我们介绍了所取得的进展,学术界同行和研究生均给予了充分的肯定,一致表现出浓厚的兴趣,希望有更多的了解,一些中医药医疗和研究机构也希望采用这样的技术。这就使我们萌发了撰写一部实验小鼠诊法和辨证论治方法学专著的想法,详细介绍我们研究的背景、思路、假说和探索的历程,以及所建立的方法与技术。于是,经过整理编撰便有了这本书的诞生。希望本书的出版,对中医基础理论有关辨证论治基础研究、证候机制研究、辨证论治方法的优化和发展,以及中医诊断、中药学和方剂学研究有所帮助。

方肇勤

2006年7月

目 录

第一章 绪论	1
一、实验小鼠证候及辨证研究背景与现状.....	2
二、常用实验动物存在证候.....	4
三、实验小鼠诊法的理论依据.....	6
四、小鼠诊法的探索和建立.....	10
五、小鼠辨证论治的尝试与发展.....	11
六、小鼠诊法和辨证已取得的成绩和面临的问题.....	12
七、结语.....	15
第二章 小鼠诊法和辨证论治的研究与发展	18
一、小鼠常见的四诊表现及其与人类的比较.....	18
(一) 小鼠若干证候与人类比较.....	18
(二) 小鼠的得神与失神.....	19
(三) 小鼠舌、爪、尾反映红色程度的比较.....	20
(四) 小鼠同病异证的表现.....	21
(五) 正常小鼠的体质差异.....	21
(六) 结论.....	22
二、小鼠爪、尾、舌等组织学特征.....	22
三、小鼠证候检测技术、方法和标准的探索与建立.....	24
(一) 小鼠证候信息采集的进展和存在的问题.....	24
(二) 小鼠诊断的方法、标准和工作站的研究与构建.....	26
四、荷瘤小鼠辨证方法的探索与建立.....	40
(一) 荷瘤小鼠分期辨证方法的探索与建立.....	41
(二) 荷瘤小鼠辨证方法的探索与建立.....	46
五、小鼠常见虚证模型的评价.....	53
(一) 小鼠气虚、血虚、阴虚、阳虚等8种模型的评价.....	53

(二) 小鼠气虚、血虚、阴虚、阳虚等 4 种虚证模型及治疗反馈的评价	61
(三) 甲状腺、肾上腺、性腺切除虚证小鼠的证候特征	69
六、不同品系小鼠气虚、血虚证的比较	76
七、荷瘤小鼠分期论治的尝试与发展	85
(一) 分期标准探索建立和疗效观察(第 1 批实验)	86
(二) 重复分期论治疗效观察(第 2 批实验)	89
(三) 发展和完善分期标准和疗效观察(第 3 批实验)	91
(四) 重复新分期标准及论治的疗效观察(第 4 批实验)	94
(五) 第 2 批实验有关分期论治机制的研究	98
(六) 第 4 批实验有关分期论治机制的研究	101
八、荷瘤小鼠辨证论治的尝试与发展	104
(一) 辨证标准探索建立和疗效观察(第 1 批实验)	104
(二) 重复辨证论治疗效观察(第 2 批实验)	106
(三) 发展和完善辨证标准和疗效观察(第 3 批实验)	107
(四) 重复新辨证标准及论治的疗效观察(第 4 批实验)	110
(五) 第 2 批实验有关辨证论治机制的研究	118
(六) 第 4 批实验有关辨证论治机制的研究	122
第三章 小鼠证候检测和辨证标准	132
一、小鼠四诊工作站与操作标准	132
(一) 小鼠四诊检测工作站各单元及操作方法	132
(二) 小鼠四诊检测操作流程和原则	139
二、小鼠四诊采集项目标准	140
(一) 类似于问诊采集的内容	140
(二) 闻诊采集的内容	140
(三) 望诊采集的内容	141
(四) 切诊采集的内容	142
(五) 注意事项	142
三、小鼠四诊和辨证记录用纸	143
四、小鼠常见证候辨证标准	146
(一) 四诊信息的标准采集	146
(二) 建立四诊信息的正常参考值	147
(三) 症状归类预处理	148
(四) 常见的寒热、虚实、气血、阴阳、病邪、五脏证候辨证标准	149
(五) 讨论	151

第四章 小鼠常用行为学检测方法	154
一、间歇观察.....	154
二、开野实验.....	155
三、大鼠洞板实验.....	157
四、小鼠联合开野实验.....	158
五、倾斜板实验.....	158
六、烟囱实验.....	159
七、握力实验.....	160
八、小鼠期待焦虑实验.....	160
九、悬尾实验.....	161
十、强迫游泳实验.....	161
十一、抖笼实验.....	162
十二、夹尾试验.....	163
十三、小鼠热板法.....	164
十四、甩尾试验.....	164
第五章 常见中医证候小鼠模型的制作方法	167
一、气虚证.....	168
(一) 急性风寒刺激的卫气虚证模型.....	168
(二) 控食、负重游泳、普萘洛尔的心气虚证模型(一).....	168
(三) 控食、负重游泳、普萘洛尔的心气虚证模型(二).....	169
(四) 控食、强迫跑步、普萘洛尔的心气虚证模型.....	170
(五) 剥夺睡眠、垂体后叶素的心气虚证模型.....	170
(六) 香烟烟熏的肺气虚证模型.....	171
(七) SO ₂ 吸入刺激的肺气虚证模型.....	172
(八) 环磷酰胺的脾气虚、脾阳虚模型.....	172
(九) 限制饮食的气虚证、脾气虚证模型.....	172
(十) 偏食苦味的脾气虚证模型.....	173
(十一) 大黄苦寒泻下脾气虚、脾阳虚模型.....	174
(十二) 番泻叶苦寒泻下的脾气虚、脾阳虚模型.....	174
(十三) 芒硝脾气虚、脾阳虚模型.....	174
(十四) 耗气破气的脾气虚、脾阳虚模型.....	175
(十五) 饮食失节的脾气虚、脾阳虚模型.....	175
二、血虚证.....	175

(一) 乙酰苯肼血虚证模型	175
(二) 环磷酰胺的血虚证模型	176
(三) 放血导致的血虚证模型	177
(四) $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射的血虚证模型	177
(五) X 射线照射结合免疫介导血虚证模型	178
(六) 乙酰苯肼加环磷酰胺血虚证模型	179
(七) 乙酰苯肼加 ^{60}Co 照射血虚证模型	179
(八) 放血、劳倦、控制饮食综合法血虚证模型	179
三、气血两虚证	180
(一) 限制蛋白质和热量摄入气血两虚证模型	180
(二) 限制营养气血两虚证模型	181
四、阴虚证	181
(一) 甲状腺激素阴虚证模型	181
(二) 甲状腺素联合利血平阴虚证模型	182
(三) 温燥利水中药阴虚证模型	182
(四) 甲状腺素、利血平结合 SO_2 肺阴虚模型	183
(五) 肾上腺皮质激素肾阴虚模型	183
五、阳虚证	184
(一) 脑垂体后叶素等复合因素心阳虚证模型	184
(二) 烟熏法加寒冷刺激肺阳虚模型	185
(三) 苦寒泻下脾阳虚模型	185
(四) 利血平脾阳虚证模型	185
(五) 饮食失节脾阳虚模型	186
(六) 羟基脲肾阳虚模型	186
(七) 腺嘌呤肾阳虚模型	187
(八) 硫脲类药物肾阳虚模型	187
(九) 房室不节肾阳虚模型	188
(十) 恐伤肾所致肾阳虚模型	189
(十一) 自然衰老肾阳虚模型	189
(十二) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(一):皮质酮模型	189
(十三) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(二):醋酸氢化可的松模型	190
(十四) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(三):醋酸氢化可的松模型	190
(十五) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(四):醋酸氢化可的松模型	191
(十六) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(五):醋酸氢化可的松模型	191
(十七) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(六):醋酸氢化泼尼松模型	191

(十八) 肾上腺皮质激素肾阳虚模型(七):醋酸泼尼松龙模型	191
六、阴阳两虚证	192
(一) 自发性阴阳两虚证模型	192
(二) 氢化可的松结合甲状腺素等肺阴阳两虚证模型	192
七、风寒证	192
八、寒实证	193
(一) 寒冷刺激寒实证模型	193
(二) 冰水灌胃寒实证模型	194
(三) 冰水炭末寒积便秘模型	194
九、实热证(热毒证)	194
(一) 仙台病毒滴注肺热证模型	194
(二) 松节油皮下注射结合中药灌胃实热证模型	195
(三) 辣椒白酒灌胃胃溃疡实热证模型	195
(四) 干姜灌胃实热证模型	196
(五) 复合因素阳明腑实证(实热证)模型	196
(六) 鹿角菜胶局部注射里热证模型	197
(七) 啤酒酵母/干酵母皮下注射里热证模型	197
(八) 2,4-二硝基酚注射里热证模型	197
(九) 大肠杆菌内毒素里热证模型	198
(十) 自身粪便里实热证模型	199
十、血瘀证	199
(一) 寒冷刺激的寒凝血瘀证模型	199
(二) 局部肾上腺素滴注血瘀证模型	200
(三) 放射损伤骨髓血瘀证模型	200
(四) 免疫法血瘀证模型	200
(五) 诱导衰老血瘀证模型	201
(六) 异丙肾上腺素心肌梗死血瘀证模型	201
(七) 脑内血肿血瘀证模型	202
(八) 高脂饲料血瘀证模型	202
(九) 肿瘤接种血瘀证模型	202
(十) 冷水负重游泳血瘀证模型	202
第六章 常见大鼠、小鼠疾病模型的制作方法 with 评价	209
一、胃溃疡	209
(一) 幽门结扎模型	209

(二) 水浸应激性胃溃疡模型	210
(三) 乙酸烧灼性胃溃疡模型	210
(四) 利血平性胃溃疡模型	210
(五) HP 与胃炎、十二指肠溃疡模型	211
二、萎缩性胃炎	212
(一) 水杨酸钠乙醇灌胃结合过劳模型	212
(二) 氯化钠灌胃模型	213
(三) 主动免疫和胆汁及热水灌胃模型	213
(四) 胃黏膜损伤结合 HP 菌液模型	214
三、胃痛	215
(一) 苯并芘小鼠胃癌模型	215
(二) BNX 小鼠原位移植胃癌模型	216
四、肝炎	217
(一) HBV 转基因小鼠	217
(二) 自身免疫性肝炎小鼠	218
五、肝硬化	219
四氯化碳结合食用白酒的肝硬化模型	219
六、肝癌	220
(一) 二乙基亚硝胺肝癌模型	220
(二) 3'-甲基-4-二甲基氨基偶氮苯肝癌模型	220
(三) 肝癌组织块移植模型	221
(四) Walker-256 瘤株混悬液移植大鼠肝癌模型	222
(五) Walker-256 瘤株块移植大鼠肝癌模型	222
(六) 肝癌大鼠原位肝移植模型	223
七、支气管哮喘	223
八、肺癌	224
(一) 4NQO 肺癌模型	224
(二) 苯并芘诱导肺癌模型	225
九、心力衰竭离体模型	225
十、高血压病	226
(一) 应激刺激大鼠高血压病模型	226
(二) 双侧肾动脉钳夹高血压病模型	227
(三) 双侧肾动脉结扎高血压病模型	228
(四) 综合方法制作不同证型的高血压病模型	228
十一、脑出血	229

(一) 自体动脉血注入脑尾壳核脑出血模型	229
(二) 肾血管性高血压大鼠脑内尾状核注射肝素胶原酶Ⅶ脑出血模型	230
(三) 自体血注入大鼠尾状核及胶原酶Ⅶ注入大鼠尾状核脑出血模型	231
(四) IV型胶原酶大鼠脑出血模型	232
十二、脑梗死	233
(一) 腔隙性脑梗死动物模型	233
(二) 颈内动脉注入真丝线段建立大鼠局灶性脑梗死模型	234
十三、肾小球肾炎	235
十四、逆行性慢性肾盂肾炎	236
十五、急性肾功能衰竭	237
(一) 缺血/再灌注小鼠急性肾功能衰竭模型	237
(二) 庆大霉素肾毒性急性肾功能衰竭模型	238
十六、慢性肾功能衰竭	239
十七、白血病	240
十八、白细胞减少	241
十九、糖尿病	242
(一) 四氧嘧啶致小鼠1型糖尿病模型	242
(二) 高脂诱发大鼠2型糖尿病模型	243
附录	247
一、实验小鼠与大鼠常用品种与品系	247
二、实验小鼠与大鼠一般生理指标	251
三、小鼠与大鼠的抓取和固定	252
四、小鼠与大鼠的分组与编号	253
五、随机数字表	259
六、实验小鼠与大鼠常用给药	261
七、小鼠与大鼠常用采血方法	263
八、实验小鼠与大鼠麻醉方法	264
九、小鼠与大鼠常用处死方法	264
十、动物实验常用参考书目	265

第一章

绪 论

长期以来,以辨证论治为特色的中医药在我国承担着大量的医疗保健任务,在国际上的影响越来越大。目前国内大多疑难杂证患者,比如肿瘤、心脑血管疾病、代谢综合征等,往往会主动寻求中医辨证治疗,既看西医,又看中医。甚至一些西医尚未明确的疾病,如2003年发生在中国的“非典”,在当时病原尚不明确的情况下,采用辨证论治也取得了优异的疗效。

为什么在西医高度发达的今天,中医药仍有这么大的市场需求呢?关键在疗效,在辨证论治。这充分表明了我们祖先千百年实践积累所形成的辨证论治理论与方法,蕴涵着丰富的科学内涵,其复杂的作用原理,涉及到目前人类尚未认识的许多复杂的生命现象和生命调控机制,这样的机制需要不断地探索、挖掘和解释,由此增进人类对生命及其调控机制的认识,丰富有关医学理论和诊、疗方法,以及推动中医药学的自身发展。因此,长期以来辨证论治一直是中医研究的热点,倾注了广大中医研究人员的大量心血,而且取得了长足的发展^[1,2]。

为了满足研究的需要,国内学术界借鉴西医动物模型的理论与方法,发展出包括自然衰老在内的证候动物模型,集中在常见的气、血、阴、阳虚证和实热、血瘀等实证。在很大程度上弥补了辨证论治研究动物模型的空白,促进了辨证论治基础研究与发展^[3-8]。

医学基础实验研究与发展,主要借助于小鼠等实验动物。我们的文献调查表明,以肿瘤研究为例,国际上采用最多的是小鼠,公开发表的学术论文约为大鼠的两倍。小鼠、大鼠、兔、猴有关论文的比例,约为26:14:2:1。因此,把小鼠作为主要实验动物,开展有关辨证论治的基础研究,既可以得到大量的国际学术研究的支撑,又可以产生广泛的学术影响。

一、实验小鼠证候及辨证研究背景与现状

1. 研究取得的进展

(1) 实践上的突破:早在 20 世纪 60 年代,我国的一些中西医结合学者,创造性地建立了肾虚证候动物模型,开创了中医证候动物模型的先河,以后不同证候动物模型研究在全国蓬勃开展,推动了学科的发展。一些中医常见基本证候大多已建立了多种证候模型,涉及小鼠、大鼠、兔子等常用实验动物,累计达数百种。研究采用的方法和手段多,涉及的疾病范围广,积累了丰富的翔实的研究资料,实现了中医证候研究从临床向实验室的过渡、人向动物的过渡。

(2) 理论上的突破:以上研究,一再发现和验证了证候模型动物的四诊表现和实验室检测数据与人类有相似的地方,可以用以模拟人类证候,用作证候研究。例如 1982 年全国中西医结合虚证和老年病专业委员会所制定的诊断标准,脾虚证临床表现具有食欲减退、脘腹胀满、大便溏泻或失调、乏力、四肢酸软,以及面色淡白无华等;对应的,脾虚证动物模型大多表现不同程度的饮食量少、体重下降、精神倦怠、少动、拱背、扎堆、眯眼、大便湿软、毛色枯黄等,类似于脾虚证患者的临床表现,也符合该证的诊断标准,有很高的一致性。

(3) 推进学术的作用:据文献检索,一些证候模型的引用频次高,学术界认同度高,表明这些模型的建立适应了中医证候和辨证论治基础研究的需求,为中医临床辨证论治疗效的提高和中医基础理论的研究提供了方法学支撑。

(4) 研究积累丰富,使得一些证候的重复性得到验证:例如我们依据 39 篇有关脾虚动物模型研究文献,统计出实验动物外观表现证候出现频率高低依次为:体重减轻、消瘦、便溏、毛色枯暗无光、食量减少、体温低(个别升高)、畏寒、精神不振、乏力、活动减少、拱背、腹胀,以及竖毛、眯眼、肛周污染、蜷缩、喜扎堆、耳色灰白、尾色灰白、四肢不收、行动迟缓、大便干、尾细、拉尾排便率上升、脱肛、舌淡苔少、悬尾反应下降、饮水量下降、足蹠鼻尖灰白。肺气虚出现咳嗽、气喘、气急、蜷伏少动、反应迟钝、毛失光泽、部分口鼻有分泌物、饮食大便基本正常、体重减轻等。

(5) 初步揭示出部分证候的内在生物机制:常见虚证的实验室指标主要集中在神经内分泌免疫网络的改变,不同脏腑气虚、阳虚、阴虚实验动物下丘脑的 TRH、CRH、GnRH,垂体的 TSH、ACTH、GH,以及甲状腺、性腺、肾上腺等激素水平会发生不同程度的降低和紊乱,免疫系统以及 β -内啡肽、蛋白激酶 A 和单胺类递质等也有变化。采用辨证论治往往可以给予纠正或部分纠正,而方证不符的治疗往往无效。证明了实验动物证的客观存在,及其内在相应的物质基础,以及辨证论治的疗效和大体的作用范围。

(6) 对于大鼠、小鼠等实验动物的证候已有一定的认识:研究中观察到大量的症状和体征,包括:蜷缩,扎堆,畏寒喜暖,活动减少,行动呆滞,拱背,发抖,精神萎靡,消瘦;反

应迟钝,步态不稳,倦怠,蒙眬欲睡,嗜卧;皮毛蓬松、竖立、无光泽、枯黄、稀少;食欲不振,饮水量改变;眼裂变窄、眼眯、闭目,眼中无神,唇周发黑,耳色淡、暗红,爪色紫暗,尾色紫暗;便溏或偏湿,湿烂,个别有黏液便,腹泻,肛门红肿充血、污秽,脱垂,小便色淡;呼吸微弱,体温下降,心跳减慢;或心跳、呼吸加快;舌色淡、微红、淡红、红、绛、暗红;体长、尾长、尾根直径改变;尾发凉;激惹程度、旋转时间改变;血压、肛温、呼吸频率、心电图、痛阈、耳郭微循环、汗点、消化道排空时间检测,等等。

(7) 部分诊法检测的辅助设备开始尝试性使用:例如已采用 XXG-B 型心血管功能测试仪、SC-513E 型心电图机、WX-753 型微循环显微镜配闭路电视、WIS-II 型血流流速仪、半导体体温计或 7071 型半导体点温计、WMZ-03 温度指示计、RM-6004 型多导生理记录仪、HX-III 型清醒小动物血压测量器、WQ-9 型痛阈测量仪、小鼠抖笼仪、自制旋转平台(转速 45r/min,旋转 2min)等。最近已有开展数码摄像结合计算机图像处理技术的应用等^[8]。

有关大鼠、小鼠体质的差异也有初步的研究报道^[9,10]。

然而,在取得以上成就的同时,也暴露出一些问题^[1,2]。

2. 研究存在的问题

(1) 中医辨证论治讲究望闻问切四诊,但迄今尚缺少实验动物比较完整、系统的基于望闻问切四诊的诊法、技术和理论。这既不符合中医的理论与实践,又忽视了中医辨证的优势。

(2) 以往实验动物证候的判断,往往采用创伤性实验室检测,诸如生化、免疫、酶学、生理等生物效应检测。由于创伤性检测,大多要求处死动物,终止实验,难以动态跟踪和观察动物在疾病发生与发展过程中证候的演变,以及开展辨证论治疗效的动态评估。

(3) 辨证主要依据的是证候,而不是生物效应的实验室检测。后者由于受到实验动物诊法发展滞后的限制,远未能够建立起证候与生物效应一一对应的联系,往往存在非线性和非对应的关系;已有的探索表明,证候是众多生物效应的综合反映,也由于受到以往生物效应检测手段和方法的限制,尚缺少系统、完整、实用的生物效应指标。因此,迄今实验室指标检测尚不能替代基于四诊的诊法。

(4) 如前所述,以往的实验研究业已涉及到一些实验动物的外在表现,但零星散落、不成系统,难以操作,缺少标准化、客观化的采集与分析方法。一些报道的方法还十分复杂,操作困难,检测耗时长,难普及和不实用。

(5) 不同证候模型实验动物的四诊表现缺乏深入细致的比较与刻画;大量观察指标的辨证意义也没有经过严格的比较和筛选。因此,一些证的动物模型的准确性、可靠性便难以准确评价,给中医药证候模型的进一步发展和深化带来困难。

总之,以上存在的问题,成为辨证论治深入研究和发展的瓶颈。

因此,当前的首要的任务是建立小鼠常见证的辨证思路、理论和方法,以及在此之上所建立的系列技术和标准。

二、常用实验动物存在证候

实验小鼠是否存在证候? 正常小鼠是否存在体质差异? 疾病小鼠是否会出现证候, 出现同病异证、异病同证? 疾病小鼠会不会发生证候的演变? 辨证论治基础研究是否只有证候造模这唯一途径? 采用类似于望闻问切四诊的诊法是否可以获得足够的辨证信息, 用于辨证?

仔细观察可以看到, 与人类存在证候一样, 常用实验动物小鼠也存在证候。

1. 人类疾病的证候分布及其演变 早在二千多年前的《黄帝内经》业已记述和强调了自然界生物和人体的体质差异, 至东汉末年, 《伤寒杂病论》确立了以理法方药为特征的辨证论治治疗原则和方法, 以后历代有所丰富。

以肿瘤为例, 成书于清代的《医宗必读》把类似于肿瘤的“积聚”治疗归纳为: “初者, 病邪初起, 正气尚强, 邪气尚浅, 则任受攻; 中者, 受病渐久, 邪气较深, 正气较弱, 任受且攻且补; 末者病魔经久, 邪气侵袭, 正气消残, 则任受补。”指出同为积聚, 不同阶段的证候特征不同, 治疗应作相应的调整。我们对 2 000 多例原发性肝癌患者中医证候临床流行病学调查发现^[11-14]:

(1) 肝癌证候有其独特的特征: 肝癌患者的证候十分复杂, 常见有肝血瘀阻、脾气虚、肝郁气滞、脾虚湿阻、肝胃不和、脾胃湿热、肝阴虚、肾阴虚等。这些证型大多相兼, 而肝脾同病是其主要特征, 治疗须肝脾同治。肝癌病机复杂还表现在邪实和正虚相兼出现。实证主要是气滞、血瘀、湿浊、水停、热毒、湿热、痰凝等; 正虚主要是气、血、阴、阳虚损, 涉及脏腑主要是脾、肝, 晚期涉及肾。

(2) 肝癌证候常相兼出现: 肝癌患者无证可辨者少, 单证者占 5.58%, 2 个证组合者占 14.81%, 3 个证组合者占 23.06%, 4 个证组合者占 24.37%, 5 个证组合者占 18.11%, 6 个证组合者占 8.93%; 平均每个患者出现 3.75 个证型, 其中肝癌 I 期患者平均 2.03 证次, II 期平均 3.47 证次, III 期平均 4.99 证次。随着病程的发展, 证的相兼愈加显著, 病机愈加复杂。

(3) 肝癌证候会发生演变: 肝癌 I 期以肝郁气滞、脾气虚为主; II 期以肝血瘀阻、肝郁气滞、脾气虚、脾胃湿热等为主; III 期以肝血瘀阻、脾虚湿阻、脾气虚、脾胃湿热、肾阴虚等为主。从早期到晚期, 正气越来越弱, 邪气越来越强, 病情越来越重。

以上特征在实验小鼠中是否也会出现呢?

2. 小鼠、大鼠存在着个体差异、证候及其演变 我们在以往长期的动物实验研究中每每观察到这样的现象, 不论是自然衰老大鼠, 还是去势大鼠; 不论是化学诱发肝癌大鼠, 还是接种肝癌形成实体瘤的小鼠, 其病理表现以及接受相同的治疗干预后, 个体之间存在明显的差异, 与人类存在的差异一致。因此在衰老、病态, 甚至是一些证的动物模型也需要辨证论治, 与人类类似。

(1) 正常小鼠存在体质的差异:以小鼠爪色和体重为例。通过对大样本正常小鼠爪的观察,可以发现,正常小鼠的爪舒展自如,大小适中,肉垫饱满,爪色红润,有光泽,无污物附着,纹理清晰,质地细腻,无瘀斑瘀点。但是其爪的红色深浅不同,少数偏淡和偏红,甚至出现偏瘦,颜色偏淡、偏暗等,类似于人类的面色少华、消瘦、舌淡、脉细等体质虚弱或虚证。其中爪的红色程度的变化呈正态分布,即大多小鼠集中在正常的中间范围,偏淡和偏红数量少,分布在两侧。类似的,小鼠的体重也可以见到这样的正态分布,大多集中在中间,少数偏轻,或偏重。综合爪色和体重,体重轻、爪色红,提示有阴虚;体重重、爪色淡,提示有气虚、阳虚。因此,小鼠体质存在偏寒、偏热、偏虚、偏实、偏阴、偏阳的不同,部分属于亚健康状态。

(2) 大鼠存在明显的个体差异,对二乙基亚硝胺(DEN)诱导肝癌和对药物的反应不同,类似于人类的证的变化^[15~20]:国内中医药实验往往采用 Wistar 或 SD 大鼠。这些大鼠个体差异较大,对造模药物和剂量的耐受性不同、反应不同。我们曾多次采用 DEN 诱导 Wistar 大鼠肝癌模型。不同批次的大鼠对 DEN 的耐受性不同,有的成瘤早,有的带瘤生存时间短。造成肝癌模型后,对中药复方的治疗反应也不同。例如采用中药全方和该方的清热、活血两个拆方对 DEN 肝癌大鼠的肝癌均有一定的治疗作用。在前、后的不同批次的实验中,虽然清热治法对大鼠肝脏癌症病理均有一致的改善,但是第一批大鼠的生存率并未提高,不如其他两个中药组;第二批大鼠体质强,体重增长快,清热组生存率显著提高。显然,对于体质强壮的大鼠,中药清热解毒复方的综合疗效比较好;而对于那些体质虚弱的大鼠,综合抑癌扶正行气活血治法的复方,或中药活血小复方的综合疗效会比较好。同样的中药治则,针对同样的模型动物,结果部分不同,提示辨证论治的必要性。

(3) 小鼠被接种肿瘤后,表现出明显的个体差异,对用药反应不同,类似于人类证的变化^[21~28]:我们采用 H22 肿瘤细胞,接种到近交系 C57 小鼠腋下,形成实体瘤。分别采用中药抑癌扶正行气活血方和西药 5-氟尿嘧啶(5-Fu)治疗,比较中、西药对荷瘤小鼠生存率及其抑瘤作用的影响。结果发现:①小鼠接种瘤株后,雄性、雌性小鼠肿瘤的生长速度有较为明显的差异,雄性肿瘤生长快,雌性慢。②模型组的雄性小鼠的生存率明显低于雌性小鼠($P < 0.05$)。与临床不同性别人群肝癌发生率不同、患病后的预后不同类似。③按时序检验统计发现模型组、西药组、中药组全部小鼠的生存率之间无显著性差别。但是,发现通常认为个体差异小的近交系 C57 小鼠,接种肿瘤后生存时间离散度大,表明接种后出现了明显的个体差异,而经中药、西药治疗后死亡有集中趋势。提示荷瘤 C57 小鼠同样存在有明显的个体差异,不加辨证的治疗,具有缩小这种差异的作用,即在减少过早死亡的同时,药物可能因副作用反而缩短了部分荷瘤小鼠原本可能再长一些的寿命。④同样剂量的抗癌药和不同中、西医治法,雌、雄小鼠的反应不同。中药组的雄性小鼠的平均生存日数有低于雌性小鼠的趋势,但西药组的雄性小鼠的平均生存日数有高于雌性小鼠的趋势。提示