

# 寒湿痹证小鼠模型的制备及寒淫 湿淫致痹机制初探\*

周文涛<sup>1</sup> 马薇娜<sup>2</sup> 豆江移<sup>3</sup> 杨可人<sup>3</sup> 王松<sup>4</sup>  
甫拉提·热西提<sup>4</sup> 古丽巴哈尔·艾尼丁<sup>4</sup> 周晓涛<sup>4</sup>\*

(1.新疆医科大学第五附属医院中医科,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学研究生2021级,新疆 乌鲁木齐 830011;  
3.新疆医科大学中医学院,新疆 乌鲁木齐 830011;4.新疆医科大学基础医学院免疫教研室,新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要:**目的 构建中医寒湿痹证小鼠模型,探索“寒淫”“湿淫”致痹的可能机制。方法 成功构建胶原诱导型关节炎(Col-lagen induced arthritis, CIA)小鼠模型后,在不同温度、湿度下制备中医寒湿痹证动物模型,通过观察各组模型小鼠的舌苔、体质量、足踝肿胀程度、组织病理变化,ELISA检测血清中TNF- $\alpha$ 的表达情况,探讨“寒淫”“湿淫”致病的免疫机制。结果 造模成功后,予寒湿两邪干预25 d后,与正常对照组相比,模型组、降温低湿组、降温高湿组、低温低湿组及低温高湿组寒湿痹证小鼠舌苔颜色黑紫;足踝关节明显肿大,组织切片可见淋巴细胞浸润明显;外周血中TNF- $\alpha$ 均明显上升( $P<0.05$ )。结论 CIA小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 增高是中医六淫中“寒淫”“湿淫”造成踝关节痹证的主要原因之一;温度在7~10℃,湿度在80%~100%的条件可用于制备中医寒湿痹证小鼠动物模型。

**关键词:**寒湿痹证;小鼠模型;寒淫;湿淫;致病机制

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2022.12.053

文章编号:1672-2779(2022)-12-0141-04

## Construction of the Mouse Model of Cold-dampness Arthromyodynia and Research on the Mechanism of Arthromyodynia Induced by Cold and Dampness

ZHOU Wentao<sup>1</sup>, MA Weina<sup>2</sup>, DOU Jiangyi<sup>3</sup>, YANG Keren<sup>3</sup>, WANG Song<sup>4</sup>, Fulati Rexiti<sup>4</sup>, Gulibahar Anydin<sup>4</sup>, ZHOU Xiaotao<sup>4</sup>\*

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830011, China

2. Grade 2021 Graduate, Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830011, China;

3. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830011, China;

4. Department of immunology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Xinjiang, Urumqi 830011, China)

**Abstract: Objective** To establish the mouse model of cold-dampness arthromyodynia and research on the mechanism of arthromyodynia induced by cold and dampness. **Methods** After the successful construction of CIA mouse model, the animal model of cold-dampness arthromyodynia in traditional Chinese medicine was established on the condition with different temperature and humidity. By observing the tongue coating, body weight, ankle swelling and histomathological changes, the level of TNF- $\alpha$  in serum, we explored the immune regulation mechanism of the arthromyodynia induced by cold and dampness. **Results** After CIA mouse model had been established for 14 days, we gave the stimulation to the CIA mouse model on different condition with cold and dampness. Compared with the normal control group, the model group stimulated with cold and dampness had black and purple tongue, obvious swollen ankle joint, its joint tissue was showed obvious lymphocytes infiltration, TNF- $\alpha$  in serum was significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Cold and dampness can cause the arthralgia in the ankle joint of the mouse model of cold-dampness arthromyodynia by increasing the level of TNF- $\alpha$  in serum. Temperature at 7~10℃ and humidity at 80%~100% should be used as a modeling condition of the mouse model of cold-dampness arthromyodynia in traditional Chinese medicine.

**Keywords:** cold-dampness arthromyodynia; mouse model; cold; dampness; pathogenic mechanism

“六淫”是中医病因的重要组成部分<sup>[1]</sup>。《素问·痹论》“风寒湿三气杂至,合而为痹也。其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹”,可见风寒湿邪与痹证的发病的重要关系。在临床工作中,早期陈之才<sup>[2]</sup>通过对200例类风湿性关节炎患者诱发病因调查,发现47%

的RA患者发病多因受寒冷及潮湿;此后钱富艳等<sup>[3]</sup>对1444例类风湿性关节炎患者进行中医证候的回顾性分析,结果显示RA中医的常见证候类型为风寒湿痹型;近年,许飞等<sup>[4]</sup>对云南省4028例类风湿性关节炎患者中医证候回顾分析及郭志凡等<sup>[5]</sup>对新疆地区448名RA患者中医证型分布规律研究,均证实RA患者中医证候总体分布以风寒湿痹证为主。不难看出,风寒湿邪在的发病中起重要作用。但在风寒湿三邪中重在寒湿,正如清·陈念祖

\* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[No. 2018D01C299]

※通信作者:xiaotaozhou9@sina.com

表1 不同温度及湿度下各组小鼠关节肿胀程度比较

(x̄±s, mm)

组别	鼠数	各组小鼠关节肿胀程度 (造模成功时)	造模成功后各组小鼠关节肿胀程度				
			第5天	第10天	第15天	第20天	第25天
正常对照组	8	2.86±0.16	2.87±0.15	2.87±0.16	2.87±0.15	2.88±0.14	2.86±0.15
模型组	8	3.49±0.62*	3.52±0.62*	3.28±0.32*	3.42±0.46 <sup>#</sup>	3.5±0.38 <sup>#</sup>	3.41±0.23 <sup>#</sup>
降温低湿组	8	3.87±0.46 <sup>#</sup>	3.92±0.46 <sup>#</sup>	3.80±0.49 <sup>#</sup>	3.65±0.22 <sup>#</sup>	3.63±0.23 <sup>#*</sup>	3.85±0.15 <sup>#▲</sup>
降温高湿组	8	3.74±0.58 <sup>#</sup>	3.94±0.67 <sup>#</sup>	3.85±0.58 <sup>#</sup>	3.92±0.36 <sup>#</sup>	3.94±0.32 <sup>#*</sup>	3.92±0.33 <sup>#▲</sup>
低温低湿组	8	3.72±0.37 <sup>#</sup>	3.92±0.56 <sup>#</sup>	3.72±0.33 <sup>#*</sup>	3.93±0.31 <sup>#*</sup>	3.91±0.26 <sup>#*</sup>	3.86±0.24 <sup>#▲</sup>
低温高湿组	8	3.82±0.55 <sup>#</sup>	4.02±0.66 <sup>#</sup>	4.07±0.62 <sup>#*</sup>	4.19±0.61 <sup>#*</sup>	4.28±0.62 <sup>#▲</sup>	4.15±0.59 <sup>#▲</sup>

注:造模后各组与正常对照组比较,\*P&lt;0.01, #P&lt;0.05;各温湿度调控组与模型组比较,▲P&lt;0.01, \*P&lt;0.05。

《时方妙用·痹》说:“深究其源,自当以寒与湿为主。盖风为阳邪,寒与湿为阴邪,阴主闭,闭则郁滞而为痛,是痹不外寒与湿。而寒与湿亦必假风以为帅,寒曰风寒,湿曰风湿,此三气杂合之谈也”,这也是寒湿痹阻证作为痹证临床常见证型的原因之一。作为经典指标的血清中肿瘤坏死(TNF-α)的水平已被证明是判定关节炎严重程度的经典的指标之一<sup>[6]</sup>。胶原诱导性关节炎(Collagen induced arthritis, CIA)动物模型是Trentham等<sup>[7]</sup>于1977年首次建立的,随着研究的不断深入和实验的大量重复,该模型已被公认为是研究人类类风湿关节炎的经典模型。笔者在CIA动物模型的基础上,尝试从寒邪湿邪的角度构建病证结合的中医寒湿痹证动物模型,通过检测血清中TNF-α表达水平研究风、寒、湿等六淫之邪致痹中的微观致病机制,为后期进一步开发中医药的辨证施治提供动物模型及数据支持。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级健康雌性BALB/C小鼠48只,8周龄,购于新疆医科大学实验动物中心,体质量(20.00±0.94)g,正常饲养。

**1.2 主要试剂及仪器** 完全弗氏佐剂(Fredund's Complete Adjuvant, FCA)(美国Sigma公司);小鼠TNF-α的ELISA定量检测试剂盒(美国ADL公司);注射器(1 mL), TL-16G型高速离心机(上海实验仪器厂生产),酶标仪(Labsystems Dragon wellscanMK3型),游标卡尺(上海精密仪器厂生产)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 实验分组** 将48只雌性BALB/C小鼠随机分为正常对照组、模型组、降温低湿组、降温高湿组、低温低湿组及低温高湿组。其中夏季按实验室正常对照组及模型组所在温度湿度分别为:温度:20~25℃,湿度:45%~55%;降温低湿组:温度:12~18℃,湿度是60%~75%;降温高湿组:温度:12~18℃,湿度:80%~100%;低温低湿组:温度:7~10℃,湿度:60%~75%;低温高湿组:温度:7~10℃,湿度:

80%~100%。

**1.3.2 寒湿痹证小鼠模型动物模型构建** 配制IFA。完全佐剂(CFA):石蜡=1:2,模型组造模前将牛II胶原与IFA等体积混合、乳化。将混悬乳剂于小鼠左后足跖肉垫皮内注射0.1 mL致敏,背部0.05 mL致敏,7 d后于鼠尾根部以相同乳剂加强注射1次。正常对照组在相同部位注射0.1 mL灭菌石蜡<sup>[7]</sup>。将14 d后成功造模的小鼠随机分组后,将寒湿痹证小鼠模型按预先分组不同程度寒湿外邪作用范围,分别放置于动物证候造模箱中,通过温湿度调控控制箱内致病诱因,达到寒湿淫邪病证结合动物模型的构建。

**1.4 观察指标** 给予25 d寒湿淫邪影响后,各组小鼠心内取血,2000 r/min离心10 min分离得血清,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清中TNF-α的含量;取小鼠的左足踝关节滑膜组织用10%甲醛溶液固定,镜下观察滑膜组织病理切片(HE染色),观察小鼠舌苔、体质量及踝关节肿胀的变化程度。

**1.5 统计学方法** 所有数据采用均数±标准差(x̄±s)表示,利用SPSS 23.0软件进行数据处理,对计量资料进行单因素方差分析,采用LSD法进行两两比较,检验水准α=0.05, P<0.05为差异有统计学意义, P<0.01为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 寒湿淫邪对关节肿胀及体质量的影响** 与正常对照组比较,造模第14天,各组小鼠踝关节均明显肿胀(P<0.01),提示造模成功。在CIA模型的基础上增加寒淫及湿淫(即温度及湿度)干预后第25天,与模型组对比,各温湿度调控组小鼠关节肿胀更明显;其中,低温高湿组小鼠左足踝关节肿胀最明显(P<0.01),说明中医六淫之“寒淫”“湿淫”可导致CIA小鼠踝关节形成痹证。见表1。

在模型组的基础上予寒淫及湿淫(即温度及湿度)干预后,随着温度的降低和湿度的增加,前期模型组和各温湿度调控组小鼠进食量较前有增多,体质量渐增加,随着时间推移,各组之间体质量变化不明显,模型组与

表2 不同温度及湿度下各组小鼠体重变化的比较

( $\bar{x} \pm s, g$ )

组别	鼠数	各组小鼠体重 (造模成功时)	造模成功后各组小鼠体重				
			第5天	第10天	第15天	第20天	第25天
正常对照组	8	22.13±0.88	22.31±0.31	22.19±1.83	22.02±0.79	21.86±0.81	22.31±0.67
模型组	8	20.01±0.87*	20.81±0.69*	20.61±0.88	21.02±0.85	21.23±0.94	22.11±1.07
降温低湿组	8	20.15±0.91*	20.34±0.79*	20.49±0.77 <sup>▲</sup>	20.65±0.69 <sup>▲</sup>	20.79±0.68 <sup>▲</sup>	21.05±0.78 <sup>▲</sup>
降温高湿组	8	20.11±1.68*	20.47±1.39*	20.58±1.18 <sup>▲</sup>	21.22±1.23 <sup>▲</sup>	21.63±1.26 <sup>▲</sup>	21.93±1.31 <sup>▲</sup>
低温低湿组	8	20.12±0.87*	20.87±1.38*	20.82±1.24 <sup>▲</sup>	21.29±1.51 <sup>▲</sup>	21.47±1.61 <sup>▲</sup>	21.71±1.35 <sup>▲</sup>
低温高湿组	8	20.32±1.49*	20.81±1.78*	20.43±1.64 <sup>▲</sup>	21.81±1.55 <sup>▲</sup>	21.38±1.53 <sup>▲</sup>	21.32±1.45 <sup>▲</sup>

注:造模成功后各组与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ;各温湿调控组与模型组比较,<sup>▲</sup> $P > 0.05$ 。

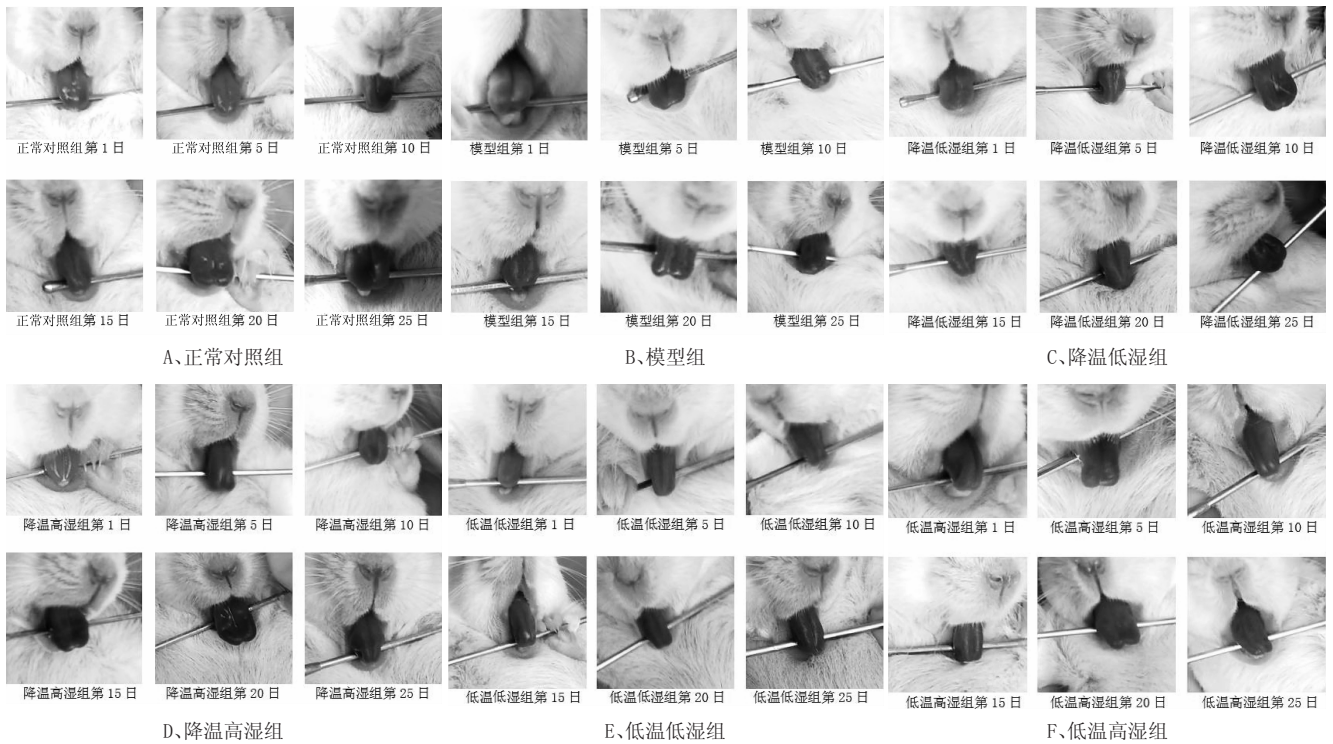
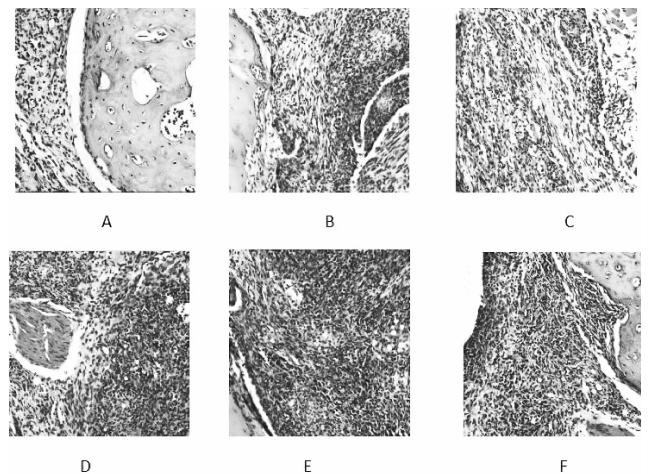


图1 各组小鼠舌苔变化情况

各温湿度组的体质量变化之间无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表2。

2.2 寒湿淫邪对舌苔的影响 造模成功后,在CIA模型的基础上增加寒淫及湿淫(即温度及湿度)连续干预25 d,期间每隔5 d拍摄舌苔图片,与模型组相比,温湿度调控下的各组在舌象颜色方面紫暗更明显。见图1。

2.3 寒湿淫邪对足踝组织病理的影响 通过HE染色过,组织切片在镜下可见,正常对照组小鼠关节组织无明显的淋巴细胞浸润及毛细血管的增生;模型组可见到淋巴细胞浸润,同时滑膜细胞增殖,毛细血管的增生,软骨组织破坏严重;而随着温度的降低及湿度的加大,软骨组织破坏逐渐加重,淋巴细胞浸润明显。见图2。



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 降温低湿组;  
D: 降温高湿组; E: 低温低湿组; F: 低温高湿组

图2 各组小鼠足踝关节组织病理变化(HE染色,10×10)

2.4 各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 的含量变化 与正常对照

组相比,模型组及降温低湿组、降温高湿组、低温低湿组及低温高湿组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  均明显上升 ( $P < 0.05$ );组间比较采用多组间方差,模型组与温湿度调控各组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组小鼠血清中 TNF- $\alpha$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

组别	鼠数	TNF- $\alpha$
正常对照组	8	126.21 $\pm$ 22.50
模型组	8	182.09 $\pm$ 35.20 <sup>a</sup>
降温低湿组	8	148.80 $\pm$ 26.20 <sup>a</sup>
降温高湿组	8	184.20 $\pm$ 23.87 <sup>a</sup>
低温低湿组	8	158.35 $\pm$ 44.03 <sup>a</sup>
低温高湿组	8	176.49 $\pm$ 47.10 <sup>a</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

《素问·痹论》中“风寒湿三气杂至,合而为痹”,从病因病机角度对痹证发病进行了阐述。《金匱翼》曰“历节肿痛,皆是湿病”。在痹证致病因素中,湿邪首当其冲。湿遏卫阳,筋脉失其温养,或郁而化热,湿阻气血,筋脉失其濡养而挛急,从而引起内寒、内热、内风等致病。湿聚日久可生痰,痰凝痹阻气血而生疲。肖东伟<sup>[8]</sup>从痹证的病机特点中论述了湿邪是贯穿痹证始终的致病主要病因。因此在痹证的发病中,风、寒、热、湿、痰、瘀均可致病因素,但湿邪却为贯穿病程始终的主要因素,而风、寒、热、痰、瘀等则多出现在疾病的不同阶段。

《素问·痹论》曰“寒气胜者为痛痹”,最早提出了寒邪至痹论点。在痹证致病中,不可忽视寒邪。且寒为阴邪,其性凝滞而收引,易伤阳气,使气血凝滞,不通则痛。《素问·举痛论》有云“寒气入经而稽迟,泣而不行,客于脉外则血少,客于脉中则气不通,故卒然而痛”。由于寒湿阻络证多有关节冷痛肿胀,疼痛剧烈,畏惧风寒,晨僵明显,遇寒加重,得温而减等表现,有明显的寒邪致病特点,故寒邪为致病的重要因素。较早的国外研究中,Aikman<sup>[9]</sup>通过对关节疼痛、僵硬等症状与气温变化、湿度、气压、风速及降雨量的关系等多方面对骨性关节炎或者类风湿性关节炎患者进行了研究,发现不同时间段的疼痛和僵硬度和气象变化有关,其中温度、湿度与发病症状的关系尤为紧密,降温及增湿都能使关节的疼痛加剧,并增加关节的僵硬程度。在综合性外因对疾病的影响的研究中,国内研究<sup>[10]</sup>对南北方不同纬度的温湿度对关节疾病发病的,在结果上都不尽相同。因此通过寒淫、湿淫作为外界刺激因素,制备中医 CIA 小鼠动物证候模型可重复性好,中医分型较为明确。

通过本实验可以看出,RA 是以寒邪为基础,当温度降低不变时,湿度越高,小鼠的舌象越暗紫,同时组织

切片中出现大量淋巴细胞浸润现象,提示湿邪是造成痹证形成中比较重要的因素。血清中 TNF- $\alpha$  的水平作为判定关节炎的严重程度的经典的指标之一。依据实验结果,观察到与正常对照组相比,模型组、降温高湿组及低温高湿组的小鼠血清中 TNF- $\alpha$  均明显上升 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,各不同寒湿条件处理组间比较无统计学意义。这也从另一个角度说明 CIA 模型组很经典,若无条件增加寒湿调节条件,CIA 模型可替代为中医证候中的寒湿痹证模型。通过本次动物实验的病理组织切片及动物患足数据显示,低温高湿组,即 7~10 °C/80%~100%的温湿度为寒湿痹证小鼠模型制备的较为理想条件的构建条件。虽然此次构建,增加外邪后各组间血清 TNF- $\alpha$  检测无明显统计学意义,但也不排除与小鼠本身在阴暗潮湿之地生存的动物特性有关。在使用中医证候箱制备中医证型动物模型时,由于小鼠体积小,质量轻,给予风力时有风向影响,小鼠会自发性团聚在一起,使风邪的影响因素并不均匀,且风力过大,小鼠持力不够,对多种混杂因素的六淫之邪致病的动物模型构建仍需考虑。另外,此次实验的样本量偏少,后期可以通过实验进一步确证。

通过构建中医痹证小鼠模型,笔者发现中医六淫中“寒淫”“湿淫”可明显提高 CIA 小鼠关节肿胀程度,加重足踝关节组织病理损伤,增加血清中 TNF- $\alpha$  的表达,这应是中医六淫中“寒淫”“湿淫”致 CIA 小鼠踝关节形成痹证的机制之一。同时,7~10 °C/80%~100%的湿度及湿度条件可作为寒湿痹证小鼠模型制备的选择条件。

### 参考文献

- [1] 沈阳,杨学,王丽娜,等.中医“六淫”的动物模型研究进展[J].现代中西医结合杂志,2019,28(28):3189-3192.
- [2] 陈之才.200例类风湿性关节炎诱发因素调查[J].上海中医药杂志,1981,15(7):29-30.
- [3] 钱富艳,杨瑞宇,李兆福,等.类风湿关节炎1444例回顾性分析[J].云南中医中药杂志,2013,34(4):16-19,89.
- [4] 许飞,唐超炫,周文强,等.4028例类风湿关节炎患者中医证候回顾分析[J].云南中医学院学报,2019,42(1):38-41.
- [5] 郭志礼,邢陆强,张山东,等.448例新疆地区类风湿关节炎患者中医证型分布规律研究[J].北京中医药,2021,40(6):619-624.
- [6] 郭晓强.肿瘤坏死因子抑制剂开发史:转化医学的成功范式[J].自然杂志,2020,42(2):142-150.
- [7] TRENTHAM D E, TOWNES A S, KANG A H. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med, 1977, 146(3): 857-868.
- [8] 肖东伟.浅议“内湿致痹”[J].航空航天医学杂志,2017,28(2):234.
- [9] AIKMAN H. The association between arthritis and the weather [J]. Int J Biometeorol, 1997, 40(4): 192-199.
- [10] 吴伟红.湿度和温度对类风湿关节炎患者CRP、ESR的影响[J].光明中医,2013,28(3):490-491.

(本文责编:秦琳 本文校对:胡永东 收稿日期:2021-12-14)