

· 实验研究 ·

兔动脉粥样硬化模型的证候归属研究

张军平¹ 张光银² 李 明² 李良军² 彭 立² 许颖智² 周亚男² 杨 萃²

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市南开区鞍山西道314号, 300193; 2. 天津中医药大学)

[摘 要] **目的** 观察兔动脉粥样硬化模型的证候学表现, 探讨其中医证候学归属规律。**方法** 24只雄性日本大耳白家兔随机分为空白组(8只)和实验组(16只), 空白组给予普通饲料, 实验组在高脂饮食的基础上加以免疫损伤和经股动脉球囊损伤术, 共饲养10周。用血管形态学观察以及血脂检测评价模型, 并定期观察家兔的耳、舌、眼睛以及整体状态等证候学变化及生化指标。**结果** 实验组家兔早期活动量逐渐减少, 气候变化时出现鼻腔分泌物增多、呼吸有喘鸣、耳廓红热等感冒症状, 中期家兔眼睛周围可见脂肪斑或者形成脂肪带, 耳廓冰凉, 精神萎靡呆钝, 血脂明显高于空白组, 至第10周左右, 实验组家兔舌质暗红或有瘀斑, 耳廓青紫冰凉, 耳缘采血困难, 取材时可见血管内有栓子形成。与空白组比较, 实验组氧化低密度脂蛋白和丙二醛明显增高, 超氧化物歧化酶活性降低。**结论** 兔动脉粥样硬化模型证候学是变化的, 其初期表现为气虚、中期为气虚痰凝、后期为气虚血瘀之证, 其规律与临床动脉粥样硬化的发病相似。

[关键词] 动脉粥样硬化; 证候; 模型; 气虚痰瘀; 气虚血瘀; 家兔

Study on TCM Syndrome Attribution Rules of Rabbit Atherosclerosis

ZHANG Junping¹, ZHANG Guangyin², LI Ming², LI Liangjun², PENG Li², XU Yingzhi², ZHOU Yanan², YANG Cui²

(1. The First Affiliated Hospital, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193; 2. Tianjin University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To observe the syndrome manifestations of rabbit atherosclerosis models and explore the syndrome attribution rules of the models. **Methods** The 24 male Japanese rabbits were randomized into a control group (n=8) and a experimental group (n=16). The control group was given normal feed, and the experimental group was treated with high-fat diet and immune injury and surgical injury through the femoral artery balloon. They were fed totally for 10 weeks. Vascular morphological changes and blood lipid determine were used to evaluate the models. The ear, tongue, eye, and the overall state of rabbits were regularly observed to see the changes of TCM syndromes. **Results** The rabbits of the experimental group gradually reduced the amount of activity in early stage. When the climate changed, their nasal secretion was increased, and they had wheezing breathing, fever and other common cold symptoms like red auricle. In the medium stage, the fatty plaque or belt around the eyes, cold auricle, and listlessness could be seen, and the blood fat was significantly higher than that of the control group. To the tenth week, the dark tongue with blood spots and purple cold auricle appeared in the rabbits of the experimental group. It was difficult to draw blood from the ear, and the emboli could be seen in the vessels of auricles. Compared with the control group, the oxidized low density lipoprotein and malondialdehyde of the experimental group were significantly increased, and the activity of superoxide dismutase decreased. **Conclusion** The syndromes of rabbit atherosclerosis models are in the changing state, in early stage they can be manifested as Qi deficiency, in middle stage the manifestation can be Qi deficiency with phlegm retention, and in late stage there will be Qi deficiency with blood stasis. The rule is similar to that of the pathogenesis of atherosclerosis in clinic.

Key Words Atherosclerosis; Syndrome; Model; Qi deficiency with phlegm retention; Qi deficiency with blood stasis; Rabbit

动脉粥样硬化(AS)作为缺血性心、脑血管疾病的病理基础, 严重威胁人类的健康。近年开展的“病证结合模型”的研究为AS证候学的研究积累了丰富的经验, 而将已建立的西医学病理模型进行中医学的证候归属研究, 无疑在病证结合的证候模型研究中具有重要意义^[1-2]。本研究在建立兔AS模型的基础上, 进一步观察兔AS模型的证候学变化, 以探讨此模型的

中医证候学归属规律。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

普通级雄性日本大耳白家兔24只, 体重(2.0±0.2)kg, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 适应性喂养1周后, 按抽签法随机分成空白组(8只)和实验组(16只)。空白组给予普通饲料; 实验组以高胆固醇饲料饲养, 注射牛血清白蛋白及行球囊损伤术, 两组家兔均不限制饮水, 分笼饲养, 自由采食, 共喂养10周。本

实验符合《天津中医药大学实验动物管理保护条例》。

1.2 主要试剂与仪器

胆固醇(分析纯,天津市英博生化试剂有限公司生产,批号070703);胎牛血清白蛋白(Albumin Bovine fraction V,上海生物工程有限公司生产,批号9048-46-8);血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)等测试盒均购自南京建成生物技术有限公司。4F导管(规格:215mm×1.2mm)购自上海上医康鸽医用器材有限责任公司,球囊由天津市医疗器械有限公司定制。奥林巴斯BX40型生物显微镜;200-型半自动生化分析仪(Humaly公司生产)。

1.3 动物模型制备

实验组家兔经普通饲料适应性喂养1周后予高脂饲料(配方:1%胆固醇+5%猪油+5%蛋黄+89%普通饲料)100g/d(早),普通饲料50g/d(晚)直至10周取材。于第2周以胎牛血清白蛋白250mg/(ml·kg),经耳缘静脉注射;第4周行经股动脉球囊扩张术,术前12h禁食不禁水,用3%戊巴比妥钠[30mg/(ml·kg)]麻醉后将动物固定于手术台。左侧腹股沟周边区域备皮,沿股动脉走向切开皮肤,分离股动脉。结扎动脉远心端,用手术丝线轻轻提起动脉近心端以阻断近端血流。在动脉壁上约呈45°角“V”形剪开一小口,逆行插入肝素生理盐水(1:5稀释)浸泡过的球囊导管(内置钢丝引导)至胸主动脉。送入约20cm,抽出导丝,连接于20ml注射器,注入约10ml空气,以球囊充盈为度,缓慢回拉球囊至髂总动脉附近(约10cm处),重新插入导管,再牵拉1次,以确保内膜损伤,退出导管,结扎近心端。

1.4 模型评价

1.4.1 主动脉大体观察 所有动物在第10周末麻醉后处死,取出主动脉纵切后肉眼观察。

1.4.2 血脂水平检测 分别于实验0、3、6、10周采血,采血前禁食12h,经耳缘静脉抽取空腹血3ml,测定TG(酶比色法)、TC(酶比色法)。

1.5 证候学研究

1.5.1 证候学观察 所有动物定期观察耳、舌、眼、饮食情况、精神状况、活动量、粪便以及死亡率,于10周末进行眼、舌的图像采集。

1.5.2 生化指标评价 研究表明,痰为机体的代谢产物,其与氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)等密切相关,同时MDA、SOD也是心气虚的评价指标^[3-4]。本研究采用Thermo Multiskan MK3酶标仪检测(ELISA法)检测上述指标。

1.6 统计学方法

采用SPSS 11.5统计软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 动物模型制备情况

2.1.1 主动脉观察 在第10周末取材中发现空白组的主动脉柔韧均匀,颜色粉红,纵切后肉眼可见内膜光滑鲜亮。而实验组的主动脉粗细不均,血管明显增粗、变脆,外壁黄白相间、凹凸不平,纵切后肉眼可见管壁明显增厚、黄白色条纹或大小不等的黄白色脂质斑块向血管表面隆起。

2.1.2 两组家兔各时间点血脂水平变化比较 表1示,实验组TC、LDL随时间均呈上升趋势,且与同期空白组比较,在第3、10周时差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而空白组血脂前后无显著变化。在第10周时,TC和LDL均较空白组升高22倍左右。

表1 各组家兔不同时间点血脂水平变化比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	兔数	TC	TG	LDL
空白组	0周	6	1.04±0.13	1.14±0.39	0.53±0.17
	3周	6	1.43±0.40	0.69±0.07	0.39±0.13
	6周	6	1.31±0.17	0.96±0.34	0.35±0.16
	10周	6	1.35±0.34	0.77±0.20	0.67±0.21
实验组	0周	10	1.08±0.40	1.19±0.54	0.51±0.12
	3周	10	10.38±4.99*	1.25±0.57*	3.50±1.74**
	6周	10	10.99±3.89**	0.95±0.47	2.39±1.17**
	10周	10	24.04±4.73*	1.42±0.51*	11.73±3.09**

注:与空白组同时间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 证候学研究

2.2.1 证候学观察 空白组动物精神状态良好,毛色呈雪白色,干净有光泽,目睛光亮有神,扑抓时反应灵敏,挣扎有力,饲喂时见有不断抓挠食盒。表2示,实验组动物从3周开始出现精神欠佳、活动量减少、懒于理毛,但饮食尚可,气候变化时鼻孔分泌物增多,耳廓红热,出现死亡;5周左右饲喂时较少有反应,喜卧少动,饮食有所减少,毛色变暗;7周左右发现目睛混浊,周围可见脂肪沉积斑或者圆形脂肪带,耳廓冰凉,粪便量

表2 各组家兔在造模过程中的证候学观察

组别	入组兔数	死亡兔数	耳			眼		活动		粪便		扑捉反应	眼	舌
			3周	7周	10周	7周	3周	10周	7周	7周	10周			
空白组	8	2	温热	温热	红润	明亮	多动	多动	粒大松软	反抗	明亮	淡红		
实验组	16	6	红热	冰凉	青紫	脂肪沉积	量少	多寐	粒小黏连	呆钝	暗滞	暗红		

少,粒小粘连,反应迟钝,气候变化时死亡数增多;至10周时精神差,对外界刺激反应迟钝,多寐,舌质紫暗或

有瘀斑,耳廓青紫,耳缘采血困难。

2.2.2 生化指标检测结果

表3示,与空白组比较,实验组第3、10周时 O_x-LDL 和 MDA 明显增高,SOD 活性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),第6周时 O_x-LDL 和 MDA 明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表3 各组家兔不同时间点血清 SOD、MDA、O_x-LDL 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	兔数	O _x -LDL(μ g/dl)	SOD(U/ml)	MDA(nmol/mg)
空白组	0周	6	67.97 $\pm$ 18.02	290.27 $\pm$ 25.65	3.46 $\pm$ 0.86
	3周	6	54.85 $\pm$ 15.66	289.16 $\pm$ 50.76	2.71 $\pm$ 0.38
	6周	6	53.39 $\pm$ 19.26	283.05 $\pm$ 26.21	4.09 $\pm$ 1.45
	10周	6	55.39 $\pm$ 18.72	264.74 $\pm$ 27.51	4.23 $\pm$ 1.44
实验组	0周	10	73.19 $\pm$ 17.28	290.19 $\pm$ 30.98	3.60 $\pm$ 0.99
	3周	10	311.89 $\pm$ 54.88**	227.55 $\pm$ 46.49*	5.30 $\pm$ 2.15**
	6周	10	556.39 $\pm$ 74.07**	255.37 $\pm$ 27.75	7.08 $\pm$ 1.37*
	10周	10	406.22 $\pm$ 129.25*	194.97 $\pm$ 48.28*	10.05 $\pm$ 3.90**

注:与空白组同时时间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

病证结合的动物模型是中医学研究疾病机理的重要载体,也是药理研究的最佳平台和药效评价的最佳模式^[5],故建立理想的病证结合动物模型是中医实验学的主要内容之一^[6]。本研究通过高脂饮食、免疫损伤和球囊拉伤建立兔 AS 模型,通过对实验动物宏观证候学诊断,结合并吸收证候实质的现代研究成果^[7-8],以探讨兔 AS 模型的证候学特征,为病证结合的中医实验学研究提供新的思路。

研究发现,实验组家兔早期(即3周左右时)活动量开始逐渐减少,精神欠佳,目光呆滞,活动少,饲喂时较少有反应,喜卧少动,饮食有所减少,毛色变暗,呈现气虚之象。中期(7周左右)表现为气虚痰凝之候,家兔眼睛周围可见脂肪斑或者形成脂肪带,耳廓冰凉,精神萎靡呆钝,血脂明显高于空白组,至第10周左右,实验组家兔舌质暗红或有瘀斑,耳廓青紫冰凉,耳缘采血困难,取血时可见血管内有栓子形成,此为血瘀之证候。另外,根据证候的生物学基础研究结果显示,实验组 O_x-LDL 和 MDA 明显增高,SOD 活性降低,这表明随着造模时间的延长,血液流变异常逐渐加重,血液瘀滞明显^[7],这与蔡静等^[3]的报道一致。可见 AS 病变过程中存在“气虚痰瘀”,“痰瘀互结”,“气虚血瘀”的病理状态。与“气虚痰瘀”比较,血瘀证的发生往往在痰证之后,是属于 AS 的较晚阶段,也印证了中医“久病皆瘀”、“瘀多夹痰”的理论,这与临床 AS 的发病实际情况具有相似性。

以往研究往往以病因学模拟造模,而后以生物学指标判定,这在很大程度上忽略了中医证候诊断对模型的评判价值。本研究基于稳定的 AS 疾病模型探讨实验动物证候学的变化,研究发现,动物的证候是由气虚、气虚痰凝逐渐转向气虚血瘀的动态过程。随着病证结合模型的探索和中医证候模型拟临床研究概念的提出,中医证候模型的研究将会更符合中医学的诊断评价标准^[9-10]。

参考文献

[1]傅晓晴.现代医学疾病动物模型中医“证”的诊断研究思路[J].中华中医药杂志,2008,23(10):868-871.
[2]罗小泉,陈晓明,万睿,等.中医证候动物模型研制困惑与思考[J].陕西中医,2007,28(12):1657-1659.
[3]蔡静,侯丽.痰浊与现代物质基础的关系[J].辽宁中医药杂志,2007,34(6):742-743.
[4]李绍芝.心气虚细胞模型的研制[J].中国中医基础医学杂志,1998,11(4):53-55.
[5]张军平,耿晓娟,朱娅萍,等.试论病证结合、方证对应在临证处方遣药中的指导作用[J].天津中医药大学学报,2008,27(3):213-216.
[6]秦俊莲,宋建平.病证结合模型与中医实验研究[J].中医杂志,2003,44(8):636.
[7]刘保延,王永炎.证候、证、症的概念及其关系的研究[J].中医杂志,2007,48(4):293-297.
[8]刘卫红,张琪,颜贤忠,等.高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀演变的代谢组学研究[J].中医杂志,2008,49(8):738-741.
[9]刘建勋,李欣志,任建勋.中医证候模型拟临床研究概念的形成及应用[J].中国中药杂志,2008,33(14):1772-1776.
[10]陈隽妍,毛威,倪桂宝,等.动脉粥样硬化痰瘀互结证大鼠模型的建立[J].现代中西医结合杂志,2007,16(26):3789-3793.

(收稿日期:2009-02-12;修回日期:2010-05-04)

[编辑:行之]

欢迎邮购《动物本草》

《动物本草》是由杨仓良主任医师主编的我国第一部动物药本草专著,出版后受到全国著名医药学家、动物药专家姜凤梧、谢海洲、谢宗万、邓明鲁等的一致好评(见《新中医》2002年2期,2004年9期,2006年10期的书评)。专家认为本书有:“体例设计新颖,品种收录齐全,辨析药物名实,突出临床应用,提炼古籍精华,广集今贤经验,提示不良反应,防止中毒损害”的特点,是一部有较高学术价值的好书。

《动物本草》是作者继《毒药本草》(曾3次获奖重印4次)、《毒剧中药古今用》(曾2次获奖重印3次)等书后的又一力作。《动物本草》128元,《毒药本草》88元,《现代中医内科临床疗效评价与进展》45元,《华佗神秘方》10元。凡邮寄一套者可获赠《名医与名方》等相关资料。汇款请寄:银川市金凤区满城南街20号宁夏秦杨疑难病研究院赵伟收,邮政编码:750011,电话:13014278765(需要相关内容介绍者可通过手机发短信索取即可免费赠阅)。