

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.03.012

气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价

陈进成, 刘建勋*, 马博, 任钧国, 郭浩, 李磊

中国中医科学院西苑医院基础医学研究所/中药药理北京市重点实验室, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091

[摘要] 目的 评价睡眠剥夺方法建立气虚血瘀证大鼠模型的可行性并构建系统性评价体系。方法 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照组与模型组, 每组 12 只。模型组采用每天随机 14~16 h 睡眠剥夺方法进行干预, 连续 6 周; 正常对照组大鼠不进行干预。比较两组大鼠的力竭游泳时间及体重系数, 采用超声仪检测左心室射血分数 (LVEF)、有效心输出量 (CO)、心脏指数 (CI) 与每搏输出量 (SV), 采用旷场实验观察大鼠运动总路程、平均速度以及进入中央区域次数, 并检测凝血功能、舌象的色彩分析及脉搏幅度, 检测血浆/血清中促肾上腺皮质激素 (ACTH)、烟碱型胆碱受体 $\alpha 1$ (chrn $\alpha 1$)、三磷酸腺苷 (ATP) 与二磷酸腺苷 (ADP) 含量以及心脏、血管病理结果。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠运动总路程、平均速度下降, 进入中央区域次数增加, 力竭游泳时间缩短, 体重明显下降, 血浆 ACTH 水平降低, 血清 chrn $\alpha 1$ 水平升高, 心功能 LVEF、CO、SV、CI 均下降, 血浆活化部分凝血酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT) 降低, 纤维蛋白原 (FIB) 增加, 血清 ATP 含量降低, 而 ADP 含量增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组大鼠舌象表现为红、红/绿、红/蓝、洋红色至绿色范围与黄色至蓝色范围值显著降低, 脉搏幅度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。两组大鼠的心脏与血管组织病理未发生改变。结论 睡眠剥夺方法可以成功建立气虚血瘀证大鼠模型, 以主症、兼症、舌象、脉象为系统的评价体系对证候模型建立具有指导意义。

[关键词] 气虚血瘀证; 证候模型; 睡眠剥夺; 模型评价

证候模型是中医学基础研究中联系基础与临床的桥梁, 虽然证候模型的研究有多种思维的体现、多种方法的构建以及多种评价的模拟, 但目前仍没有一种公认的证候动物模型呈现出来^[1-2]。中国中医科学院西苑医院基础医学研究所研究团队提出了“拟临床研究”的原则^[3], 通过文献的系统挖掘、前瞻性研究、证候的特征性研究、模型干预条件的模拟以及拟临床评价体系的建立, 为中医证候以及病证结合模型的建立提供了系统性的思路与方法。气虚血瘀证是冠心病^[4-5]、呼吸系统疾病^[6-7]、慢性萎缩性胃炎^[8]及肾脏病^[9]等诸多临床疾病的基本病机。我们认为, 气虚不能充分推动血液运行以致“虚气留滞”, 血行无力而血液瘀滞则气血同病、气虚血瘀。有研究发现, 气虚血瘀证相关的基因、集群与免疫、内分泌、信号传导、造血细胞系以及炎症反应等^[10-11]生物学变化相关。本研究在

病因学说理论指导下, 采用睡眠剥夺干预手段, 系统观察动物表征, 以“四诊合参”证候临床诊断方法为指导, 将主症、兼症、舌象、脉象等系统检测以特定的指标反映, 建立气虚血瘀证候模型与系统的评价体系。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 220~240 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2016-0012。动物饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心, 温度 20~25℃, 相对湿度 40%~70%, 明/暗周期为 12 h/12 h, 大鼠自由饮水进食。本研究获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准 (2018XLC003-2)。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷 (鲁南贝特制药有限公司, 批号 H20040296); 大鼠三磷酸腺苷 (ATP) ELISA 试剂

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2015CB554405)

* 通讯作者: liujx0324@sina.com, (010) 62835601

盒 (批号 HTLW200094)、大鼠二磷酸腺苷 (ADP) ELISA 试剂盒 (批号 HTLW33121)、大鼠促肾上腺皮质激素 (ACTH) ELISA 试剂盒 (批号 HTLY30594)、大鼠烟碱型胆碱受体 $\alpha 1$ (chrn $\alpha 1$) ELISA 试剂盒 (批号 HTLY32938), 均为 AndyGene 公司产品; 凝血酶原时间 (PT, 批号: 1507012)、活化部分凝血酶时间 (APTT, 批号: 1506001)、凝血酶时间 (TT, 批号: 1508044)、纤维蛋白原 (FIB, 批号: 1509008) 测定试剂盒, 均购自上海太阳生物技术有限公司。

Vevo 2100 型高分辨率小动物超声仪 (加拿大 VisualSonics 公司, 探头 MS-250); MouseOx 型小动物无创脉搏血氧仪 (美国 Starr Life Science 公司); D90 型数码相机 (日本 Nikon 公司); TES-1330A 型数位式照度计 (台湾泰仕电子工业股份有限公司); VIP3000 型小动物麻醉机 (美国 Matrx 公司); IEC-CL31R 型离心机 (美国 Thermo 公司); COALAB1000 型凝血仪 (德国 LABiTec 公司); BX51 型光镜 (Olympus 公司)。

1.3 动物分组与处理方法

大鼠按照体重顺序编号, 采用随机数字表法分为正常对照组与模型组各 12 只。正常对照组不做干预, 自由饮水进食。模型组采用睡眠剥夺方法^[12]建立气虚血瘀证候模型, 干预强度为每日睡眠剥夺 14~16 h, 连续 6 周, 正常饮食饮水。

1.4 观察指标及方法

6 周后大鼠用 1% 戊巴比妥钠按 0.3 ml/100 g 剂量腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 4℃、3000 r/min 离心 10 min (离心半径: 161 mm)。分离血清和血浆于 EP 管中, -80℃ 保存备用。取完血后, 取心脏组织、腹主动脉, 置于 10% 甲醛中固定, 用于制成石蜡切片以供形态学研究。

1.4.1 大鼠一般状态 在安静的环境下, 观察大鼠的一般情况, 包括精神状态、活动情况、毛色以及体重变化等, 计算实验第 2、4、6 周时体重系数。

1.4.2 旷场实验 6 周后进行大鼠神经功能损伤的检测, 采用中国航天员训练中心和中国医学科学院药用植物研究所联合研制开发的空场计算机图像实时监测分析系统, 记录大鼠运动总路程、平均速度以及进入中央区域次数。

1.4.3 力竭游泳时间 分别在实验的第 2、4、6 周将大鼠尾部负重体重的 5%, 置于不锈钢水槽内 (50 cm × 40 cm × 70 cm), 水温控制在 22~24℃, 水深约 40 cm。当大鼠游泳至全身力竭 (鼻头浸入

水中 5 s 以上) 时记录时间, 及时捞出以免溺亡。

1.4.4 超声心动图检测 分别在实验的第 4 与第 6 周, 大鼠经异氟烷诱导麻醉 (3%~4%) 后用 2% 异氟烷维持麻醉, 稳定大鼠心率为 330~380 次/min, 在左室长轴及胸骨旁短轴各切面应用小动物超声仪进行心功能检测, 包括左心室射血分数 (LVEF)、有效心输出量 (CO)、心脏指数 (CI) 与每搏输出量 (SV)。

1.4.5 舌象的采集与分析 采用数码相机拍摄, 照度条件 (45° 侧光, 色温 5500K, 照度 1000~1500 lx), 拍摄条件 (光圈 F8, 快门 1/80 s, ISO400, WB PRE), 拍摄距离 10 cm。照片以 JPG 的格式输出后, 应用 DS01-A 舌面信息采集系统进行分析。

1.4.6 脉象的采集与分析 大鼠在维持麻醉状态下, 应用小动物无创脉搏血氧仪进行脉搏幅度的测定, 待数据曲线稳定后, 记录分析大鼠的脉搏幅度。

1.4.7 血浆/血清中 ACTH、chrn $\alpha 1$ 、ATP 与 ADP 含量测定 按照 ELISA 试剂盒说明书方法进行测定。

1.4.8 凝血功能检测 取大鼠血浆 (3.8% 枸橼酸钠抗凝), 按试剂盒说明书检测 APTT、PT、TT 与 FIB 的含量。

1.4.9 心脏与血管病理 将心脏、血管标本进行 HE 染色, 组织样本经梯度脱水、石蜡包埋、4 μ m 切片、脱蜡、酒精入水、苏木素染色、氨水返蓝、伊红染色、酒精脱水、二甲苯透明完成实验。光镜下观察心肌细胞排列、完整性以及血管壁厚度等。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析进行显著性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态结果比较

正常对照组大鼠精神状态良好, 活动自如, 饮食、体重正常, 毛发柔顺且有光泽; 模型组大鼠精神萎靡不振, 对外界刺激反应迟钝, 不喜动、嗜睡, 体虚无力明显, 型大而肉脱, 毛发枯槁。实验过程中, 两组大鼠均无死亡, 将旷场实验中未完成整体运动的大鼠淘汰, 最终正常对照组 10 只与模型组 8 只大鼠纳入统计学分析。表 1 示, 模型组大鼠在 2、4、6 周时体重系数均低于同时点正常对照组 ($P < 0.01$)。

表 1 两组大鼠不同时间体重系数比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	体重系数
正常对照组	2 周	10	41.11 $\pm$ 2.12
	4 周	10	56.19 $\pm$ 2.30
	6 周	10	79.87 $\pm$ 8.10
模型组	2 周	8	9.18 $\pm$ 5.89*
	4 周	8	23.47 $\pm$ 10.40*
	6 周	8	40.75 $\pm$ 8.36*

注: 与正常对照组同时间比较, * $P < 0.01$

2.2 大鼠旷场实验结果比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠运动总路程与平均速度明显下降, 进入中央区域的次数则明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 两组大鼠旷场实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	总路程 (cm)	平均速度 (cm/s)	进入中央区域次数 (次)
正常对照组	10	1175.83 $\pm$ 136.18	2.27 $\pm$ 0.14	3.30 $\pm$ 1.06
模型组	8	1011.33 $\pm$ 110.62*	1.80 $\pm$ 0.18*	8.12 $\pm$ 1.12**

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 大鼠不同时间力竭游泳时间比较

表 3 示, 模型组大鼠在 2 周时力竭游泳时间明显高于正常对照组, 而在 6 周时力竭游泳时间低于正常对照组 ($P < 0.05$), 两组在 4 周时力竭游泳时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 两组大鼠不同时间游泳力竭时间比较 (s, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	力竭游泳时间
正常对照组	2 周	10	344.25 $\pm$ 28.16
	4 周	10	333.50 $\pm$ 40.21
	6 周	10	339.73 $\pm$ 39.82
模型组	2 周	8	426.38 $\pm$ 40.11*
	4 周	8	311.25 $\pm$ 29.33
	6 周	8	283.46 $\pm$ 28.56*

注: 与正常对照组同时间比较, * $P < 0.05$

表 4 两组大鼠不同时间心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	LVEF (%)	CO (ml/min)	SV (μ l)	CI (ml/min $\cdot$ m ²)
正常对照组	4 周	10	77.07 $\pm$ 4.70	116.43 $\pm$ 12.31	319.39 $\pm$ 19.83	106.49 $\pm$ 13.92
	6 周	10	76.41 $\pm$ 4.66	109.32 $\pm$ 12.97	329.45 $\pm$ 13.42	109.32 $\pm$ 12.03
	4 周	8	69.75 $\pm$ 11.02	80.29 $\pm$ 9.81*	236.16 $\pm$ 19.42**	80.26 $\pm$ 9.78*
模型组	6 周	8	60.52 $\pm$ 5.87**	66.13 $\pm$ 14.0**	195.91 $\pm$ 30.71**	66.14 $\pm$ 14.02**

注: LVEF, 左心室射血分数; CO, 有效心输出量; SV, 每搏输出量; CI, 心脏指数; 与正常对照组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 5 两组大鼠血浆 ACTH 及血清 chn α 1、ATP、ADP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ACTH (ng/L)	chn α 1 (ng/L)	ATP (mmol/L)	ADP (mmol/L)
正常对照组	10	26.47 $\pm$ 0.62	358.72 $\pm$ 26.35	116.32 $\pm$ 3.66	581.48 $\pm$ 18.31
模型组	8	30.10 $\pm$ 3.03*	453.58 $\pm$ 92.80*	98.84 $\pm$ 6.26**	647.52 $\pm$ 22.44**

注: ACTH, 促肾上腺皮质激素; chn α 1, 烟碱型胆碱受体 α 1; ATP, 三磷酸腺苷; ADP, 二磷酸腺苷; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 大鼠心脏、血管组织 HE 染色病理结果

图 1 示, 正常对照组与模型组大鼠的心脏组织病理染色表现为心肌细胞排列整齐, 细胞完整, 胞浆丰富、红染; 横纹清晰, 核居中, 间质可见少量血管及结缔组织; 无明显水肿、变性和炎细胞浸润。血管表现为血管壁完整, 厚度较为一致, 弹力纤维明显可见, 未见断裂。

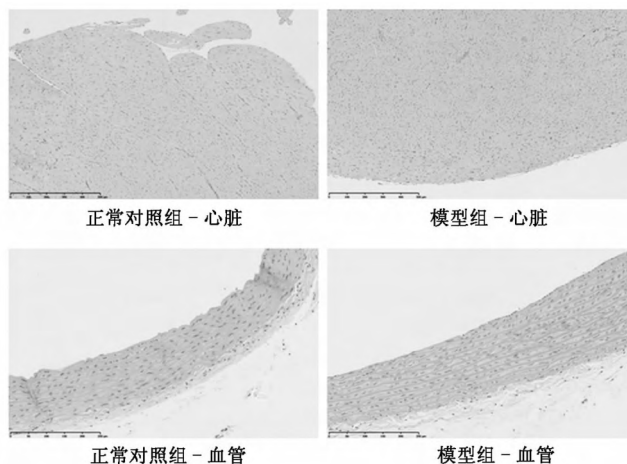


图 1 两组大鼠心脏、血管组织 HE 染色结果 (心脏 $\times 100$; 血管 $\times 200$)

2.5 大鼠不同时间心功能指标比较

表 4 示, 4 周时与正常对照组比较, 模型组大鼠 CO、SV、CI 水平下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 LVEF 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。8 周时模型组大鼠 LVEF、CO、SV、CI 水平均明显下降 ($P < 0.01$)。

2.6 大鼠血浆 ACTH 及血清 chn α 1、ATP、ADP 水平比较

表 5 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血浆 ACTH 和血清 chn α 1、ADP 水平明显升高, 而血清 ATP 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 6 两组大鼠凝血功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	APTT (s)	PT (s)	TT (s)	FIB (g/L)
正常对照组	10	20.09 ± 1.17	15.64 ± 1.81	45.13 ± 2.08	1.99 ± 0.11
模型组	8	16.92 ± 1.49*	12.04 ± 1.29*	46.18 ± 1.15	2.38 ± 0.43*

注: APTT, 活化部分凝血酶时间; PT, 凝血酶原时间; TT, 凝血酶时间; FIB, 纤维蛋白原; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

2.7 大鼠凝血功能指标比较

表 6 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠 APTT、PT 水平降低, FIB 水平增加 ($P < 0.05$), TT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.8 大鼠舌象、脉象分析结果比较

表 7 示, 在 LAB 色彩模式分析中, 模型组大鼠舌象 A 值与 B 值显著下降 ($P < 0.01$), 而 L 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表 8 示, 在 RGB 色彩模式分析中, 与正常对照组比较, 模型组大鼠舌象 R 值、R/G 与 R/B 均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), G 值和 B 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。正常组大鼠脉搏幅度为 (71.64 ± 10.56) mm, 模型组大鼠脉搏幅度为 (40.31 ± 15.97) mm, 模型组大鼠脉搏幅度明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。

表 7 两组大鼠舌面 LAB 色彩模式分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	L	A	B
正常对照组	10	12.70 ± 1.15	8.89 ± 1.40	4.46 ± 0.45
模型组	8	12.75 ± 1.18	7.18 ± 0.73*	3.78 ± 0.53*

注: L, 明度; A, 洋红色至绿色范围; B, 黄色至蓝色范围; 与正常对照组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

气虚血瘀证以气虚为本, 发生于先, 血瘀为标, 发生于后, 故气虚血瘀证模型的建立基础是气虚证。“劳则耗气”理论是本研究进行模型设计的理论依据, 由于疲劳导致气的损伤或来源不足, 是气虚证形成的主要因素。我们前期研究了“神劳”与“体劳”因素对证候模型的干预^[12], 结果表明, 长期的慢性睡眠剥夺为气虚证动物模型的主要干预因素, 这也是本研究采用的主要研究方法。

中医临床证候的诊断原则是四诊合参, 本研究结合“拟临床研究”的原则, 将气虚血瘀证的主症、兼症、舌象与脉象以实验室客观指标的形式表

现, 以构建该证候的系统性评价体系。气虚血瘀证是气虚证与血瘀证的复合证候群, 表现为同时出现气虚与血瘀的证候特征, 可以概括为: 面色淡白无华或晦滞青灰, 神疲乏力, 气短心悸, 食少纳呆, 或局部青紫、肿胀、刺痛不移而拒按, 或肢体瘫痪麻木, 或可触及肿块而质硬, 舌淡紫或有瘀点、瘀斑, 脉沉细涩等^[13]。本研究将神疲、乏力、心悸、气短的相关指标作为主症的表征。以旷场实验行为学变化与血浆中 ACTH 水平作为“神疲”的表征指标, 结果显示, 模型组大鼠旷场实验平均速度和总路程下降, 而进入中央区域次数增加, 伴随血浆 ACTH 水平降低, 这可能是“神疲”的中枢神经系统损伤的证据。以力竭游泳时间与血清中 $\text{chrn}\alpha 1$ 水平作为“乏力”指标, 结果显示, 模型组大鼠表现为力竭游泳时间缩短以及血清 $\text{chrn}\alpha 1$ 水平升高。以超声心动图检测心功能相关指标作为“心悸气短”的表征指标, 模型组大鼠表现为 LVEF、CO、SV 与 CI 水平显著下降, 提示心功能受损。

中医舌诊是四诊合参的重要组成部分, 亦是具有鲜明中医特色的临床辨证的重要手段之一。本研究将临床采用的 DS01-A 舌面脉信息采集体质辨识系统^[14]引入基础研究中, 气虚血瘀证大鼠的舌象在 RGB 色彩模式表现为 R 值、R/G、R/B 值显著降低, 在 LAB 色彩模式下 A、B 值亦显著降低, 较好地诠释了气虚血瘀证“舌淡而紫暗”的临床舌象特征。脉诊对于辨证有特殊的意义, 在基础研究中将脉诊仪应用于动物模型的观察成为关键性指标^[15]。由于虚证具有脉搏幅度弱小的特征, 本研究利用了小动物无创脉搏血氧仪作为脉诊的采集与分析工具, 结果显示模型组大鼠脉搏幅度显著降低, 与“脉沉细涩”表现一致。

气的功能包括促进能量代谢、抗炎、维持健康平衡, 气虚与能量代谢障碍有强相关性^[16]。本研

表 8 两组大鼠舌面 RGB 色彩模式分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	R	G	B	R/G	R/B
正常对照组	10	136.14 ± 7.19	70.45 ± 8.71	64.83 ± 7.05	1.94 ± 0.22	2.10 ± 0.21
模型组	8	125.08 ± 6.01*	73.36 ± 7.67	68.07 ± 7.50	1.72 ± 0.10**	1.86 ± 0.14**

注: R, 红; G, 绿; B, 蓝; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

究亦检测了血清中 ATP 与 ADP 水平, 结果显示, ATP 的含量显著降低而 ADP 的水平显著增加, 表明气虚血瘀证的能量代谢系统失衡, 产能下降, 首先符合了“本虚”的基本特征。同时模型组大鼠体重系数与正常对照组比较差异有统计学意义, 故可将体重系数的变化作为“食少纳呆”的表征指标。另外, 模型组大鼠反应迟钝, 身体瘦弱, 毛发枯槁无光泽, 虚证表现明显。证候是一种状态, 是一种综合性的功能态或反应态^[17]。本研究还观察了心脏与血管组织的病理变化, 结果表明, 模型组大鼠心脏和血管未发生病理性改变, 提示证候的研究重在功能改变, 而非单纯的器质性改变。

综上, 本研究采用睡眠剥夺法建立了气虚血瘀证大鼠模型, 以临床四诊合参为依据, 将证候的描述进行提炼, 系统建立了动物模型的评价体系, 且将舌象分析、脉象分析引入评价体系中。本研究团队也将应用分子生物学、系统生物学等各种科技手段, 从基础到临床等各方面对证候模型以及相应方药的作用机制进行深入探索。

参考文献

- [1] SHUOREN W, ZHETAO W, MINGJING Z, et al. The study on creating and enaluating animal model of disease and syndrome for deficiency of heart-qi in traditional Chinese medicine [J]. Acta Lab Amin Sci Sin, 2002, 10 (1): 33-38.
- [2] CHAI C, KOU J, ZHU D, et al. Mice exposed to chronic intermittent hypoxia simulate clinical features of deficiency of both qi and yin syndrome in traditional Chinese medicine [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011; 356252. doi: 10. 1093/ecam/nep226.
- [3] 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.
- [4] GAO Z, LI S, SHANG Q, et al. Complex networks approach for analyzing the correlation of traditional chinese medicine syndrome evolvement and cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 824850. doi: 10. 1155/2015/824850.
- [5] JIANG M, ZHANG C, CAO H, et al. The role of Chinese medicine in the treatment of chronic diseases in China [J]. Planta Med, 2011, 77(9): 873-881.
- [6] LI J, ZHANG F, LI J. The immunoregulatory effects of traditional Chinese medicine on treatment of asthma or asthmatic inflammation [J]. Am J Chin Med, 2015, 43(6): 1059-1081.
- [7] SU G, CHEN X, LIU Z, et al. Oral Astragalus (Huang qi) for preventing frequent episodes of acute respiratory tract infection in children [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 12: CD011958. doi: 10. 1002/14651858. CD011958.
- [8] ZHANG XX, CHEN WW, SHE B, et al. The efficacy and safety of Jian-Wei-Qu-Tong Pills for the treatment of chronic non-atrophic gastritis (spleen and stomach qi deficiency with damp-heat stasis syndrome): study protocol for a phase II, randomized controlled trial [J]. Trials, 2014, 15: 272. doi: 10. 1186/1745-6215-15-272.
- [9] TU X, LIU F, JORDAN JB, et al. 'Huang Qi Elixir' for proteinuria in patients with diabetic nephropathy: a study protocol for a randomized controlled pilot trial [J]. Trials, 2013, 14: 223. doi: 10. 1186/1745-6215-14-223.
- [10] 刘婧玮, 翟兴, 陈坤, 等. 利用文献挖掘技术从 MEDLINE 构建冠心病气虚血瘀证与气滞血瘀证的 NEI 分子网络初步研究 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(5): 760-762.
- [11] 陈婵, 郭淑贞, 王伟, 等. 气虚血瘀证(心肌缺血)大鼠模型单核细胞炎症因子表达的相关性探讨 [J]. 中医药学报, 2010, 38(4): 16-19.
- [12] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [13] 季绍良, 成肇智, 陈群, 等. 中医诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 130.
- [14] HAN S, YANG X, QI Q, et al. Potential screening and early diagnosis method for cancer: tongue diagnosis [J]. Int J Oncol, 2016, 48(6): 2257-2264.
- [15] 王滨, 牛欣, 文仁都, 等. 中医脉诊研究思路与脉诊动物模型的建立 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(1): 22-24.
- [16] SUN J, ZHANG L, HE Y, et al. To unveil the molecular mechanisms of qi and blood through systems biology-based investigation into Si-Jun-Zi-Tang and Si-Wu-Tang formulae [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34328. doi: 10. 1038/srep34328.
- [17] 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): 293-296, 298.

Establishment and Evaluation of Rat Model of *Qi* Deficiency and Blood Stasis Syndrome

CHEN Jincheng, LIU Jianxun, MA Bo, REN Junguo, GUO Hao, LI Lei

Institute of Basic Medicine, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences / Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Pharmacology, Beijing, 100091

ABSTRACT **Objective** To evaluate the feasibility of establishing a rat model of *qi* deficiency and blood stasis syndrome by sleep deprivation method and to construct a systematic evaluation system. **Methods** A total of 24 SD rats were randomly divided into a normal control group and a model group, with 12 rats in each group. The model group used the sleep deprivation method to intervene, and the intensity was randomized for 14 to 16 hours every day for 6 weeks; the normal control group rats did not intervene. Exhausted swimming time and body weight were compared between the 2 groups of rats. Left ventricular ejection fraction (LVEF), effective cardiac output (CO), cardiac index (CI), and stroke output (SV) were measured using an ultrasound system. Field experiments were used to observe the total distance of movement, average speed and the number of times of entering the central area. The blood coagulation function, tongue color analysis and pulse amplitude were tested, and the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and nicotinic choline receptor, recombinant cholinergic receptor nicotinic $\alpha 1$ (chrn $\alpha 1$), adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) content in plasma/serum, and cardiac and vascular pathological results were detected. **Results** Compared with the normal control group, the total distance of movement and average speed of the rats in the model group decreased, the number of times of entering the central area increased, the time of exhaustion swimming was shortened, the body weight was significantly reduced, the plasma ACTH level was reduced, the serum chrn $\alpha 1$ level was increased, and cardiac function LVEF, CO, SV, CI decreased, plasma activated partial thrombin time (APTT), prothrombin time (PT) decreased, fibrinogen (FIB) increased, serum ATP content decreased, and ADP content increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the model group, tongue manifestations showed significant reductions in red, red/green, red/blue, magenta to green range, and yellow to blue range values, and pulse amplitudes were reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathology of the heart and blood vessels of both groups of rats remained unchanged. **Conclusion** The sleep deprivation method can successfully establish a rat model of *qi* deficiency and blood stasis syndrome. The evaluation system based on the primary symptoms, companion symptoms, tongue, and pulse signs has a guiding significance for the establishment of syndrome models.

Keywords *qi* deficiency and blood stasis syndrome; syndrome model; sleep deprivation; evaluation system

(收稿日期: 2019-04-15; 修回日期: 2019-07-04)

[编辑: 柴倩云]

(上接第 200 页)

ZHOU Zhongying's Experience in Application of Flower Medicines

LI Liu, YE Fang, WU Mianhua

The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023

ABSTRACT Professor ZHOU Zhongying proposes that flower medicine has the characteristics of softness and permeability, which is a good assistant for prescription. These medicines can be used in many diseases of internal medicine, surgery, gynecology and pediatrics. In this paper, we collected and sorted out 20 flower herbal medicines frequently used by ZHOU Zhongying in clinical practice. According to the main efficacy, they were divided into 6 categories: regulating *qi* and relieving depression, soothing the liver and harmonizing the stomach, clearing away heat and dispersing pathogens, reducing *qi* and resolving phlegm, promoting blood circulation and cooling blood to stop bleeding. The clinical characteristics and compatibility experience of representative flower medicines were summarized.

Keywords flower medicines; experience of famous doctors; ZHOU Zhongying;

(收稿日期: 2019-07-03; 修回日期: 2019-09-19)

[编辑: 贾维娜]