

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.05.014

睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价

任建勋, 尹春园, 史雅红, 苗兰, 孟红旭, 李军梅, 李鸿海, 马京泉, 刘建勋*

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 对采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法建立心力衰竭大鼠气虚血瘀证模型进行评价。方法 70 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、睡眠剥夺组、心肌梗死组以及益气活血颗粒高、中、低剂量组, 每组 10 只。睡眠剥夺组给予无规律性睡眠剥夺 8 周, 模型组以及益气活血颗粒高、中、低剂量组大鼠给予睡眠剥夺 3 周后进行冠状动脉左前降支结扎, 手术后第 2 天继续睡眠剥夺 5 周建立心力衰竭气虚血瘀证模型, 心肌梗死组仅给予冠状动脉左前降支结扎, 空白对照组正常饲养。手术后第 2 天益气活血颗粒高、中、低剂量组分别给予益气活血颗粒 4.0、2.0、1.0 g/(kg·d) 灌胃, 其余各组给予生理盐水 1 ml/100 g 灌胃, 持续 5 周。比较各组大鼠体重、抓力、脉搏幅度、自主活动、舌象、心功能、心室重构指标、血液流变学指标以及腹主动脉血流速度。结果 与空白对照组比较, 模型组大鼠体重、抓力、脉搏幅度及自主活动总路程和平均速度明显下降, 心室重构指标升高, 心功能、室壁厚度指标和腹主动脉血流速度则明显下降, 不同切变率下的血液黏度和血浆黏度明显升高, 舌面 R (红)、G (绿)、B (蓝) 相对值均有明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 益气活血颗粒高剂量组可以增加大鼠体重、抓力、脉搏幅度、室壁厚度, 降低心室重构、血液流变学指标, 改善大鼠心功能和自主行为活动, 提高腹主动脉血流速度, 大鼠舌面 R、G 相对值明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法可以促使心力衰竭大鼠表现出明显的气虚血瘀证外在客观表现, 高剂量的益气活血颗粒的有效干预反证此模型的科学性和可靠性。

关键词 心力衰竭; 气虚血瘀证; 动物模型; 睡眠剥夺; 冠状动脉; 益气活血颗粒

心力衰竭是多种心脏疾病发展的严重阶段, 其发病率高、预后差, 五年存活率与恶性肿瘤相仿, 年病死率达 10% ~ 50%, 严重降低患者生活质量^[1]。目前研究证实, 中医临床辨证施治能够降低心力衰竭长期病死率, 提高生存质量^[2]。而气虚血瘀证作为心力衰竭的主要证候之一得到了重点关注和广泛的研究^[3]。在基础研究中多采用单纯冠状动脉结扎, 以及游泳力竭复合冠状动脉结扎方法建立的心力衰竭气虚血瘀证大鼠作为证候生物学分析和药物干预的研究对象, 这主要突出了心力衰竭过程的病理生理特点, 而气虚和血瘀证候要素的

外在客观化表现却难以反映其病机特点。本研究依据“劳则气耗”的理论在前期工作^[4]基础上, 采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法建立心力衰竭大鼠气虚血瘀证模型, 并应用益气活血方进行干预, 分别从“病”与“证”角度探讨此方法诱导心力衰竭大鼠气虚血瘀证模型的可靠性和科学性, 为今后进一步的研究奠定基础。本研究的设计、实施过程符合实验动物福利和伦理原则, 并经中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会批准 (2018XLC003-2)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 6 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2015CB554405); 国家自然科学基金 (81803770); 北京市自然科学基金 (7192183)

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

供, 实验动物许可证编号: SCXK (京) 2016-0002。大鼠在中国中医科学院西苑医院动物实验室喂养, 自由饮水, 温度 22 ~ 25℃, 相对湿度 50% ~ 70%, 明/暗周期为 12 h。

1.2 药物

益气活血颗粒药物组成: 黄芪 30 g、赤芍 6 g、川芎 6 g、当归尾 10 g、地龙 6 g、桃仁 6 g、红花 6 g 组成。中药颗粒剂由三九药业有限公司提供, 批号: 1511001Y, 中药复方提取物 1 g 相当于生药 7 g。

1.3 主要试剂与仪器

水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 30037517); 肝素钠注射液 (常州千红生化制药股份有限公司, 国药准字 H32022088)。

CS5000 型动物体重秤, 上海奥豪斯仪器有限公司; LBY-N6C 型血液流变测定仪, 北京普利生仪器有限公司; YLS-43A 型小鼠抓力测定仪, 北京众实迪科技发展有限公司; ALC-V8 型小动物呼吸机, 上海奥尔科特生物技术有限公司; Visual-Sonics Vevo 2100 型高分辨率小动物超声影像系统, 日本富士胶片有限公司; ICE-CL31R 型低温离心机, 美国 Thermo 公司; MouseOx 型小动物无创脉搏血氧仪, 美国 Starr Life Science 公司。

1.4 动物分组及模型建立

大鼠适应性喂养 1 周后, 按体重排序采用随机数字表分为空白对照组、模型组、睡眠剥夺组、心肌梗死组以及益气活血颗粒高、中、低剂量组, 每组 10 只。睡眠剥夺组给予无规律性睡眠剥夺^[5]: 每天随机睡眠剥夺 12 ~ 16 h, 每周随机睡眠剥夺 24 h 及恢复正常睡眠周期各 1 或 2 次。心肌梗死组给予冠状动脉左前降支结扎^[6]: 大鼠麻醉后开胸进行冠状动脉左前降支结扎。采用 3.5% 水合氯醛 (10 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 并将其仰卧位固定至鼠板。分离颈部正中皮肤、皮下组织, 在第 3、4 气管软骨间隙切口并插入简易气管导管, 连接小动物呼吸机进行辅助呼吸。随后沿左侧第 4 肋间开胸, 钝性分离肌肉及肋骨, 分开肋骨后小心挑开心包膜, 暴露心脏并按压胸腹挤出心脏, 在肺动脉圆锥和左心耳之间, 于冠状动脉左前降支根部穿线 (0 号缝合线) 以备结扎, 待大鼠稳定 5 min 后行冠状动脉左前降支结扎。模型组以及益气活血颗粒高、中、低剂量组大鼠给予睡眠剥夺 3 周后, 再进行冠状动脉左前降支结扎, 手术后第 2 天继续进行睡眠剥夺持续 5 周建立心力衰竭气虚血瘀证模

型, 观察大鼠的呼吸和心跳, 回笼正常饮食饮水喂养。空白对照组正常饲养, 不予处理。

1.5 给药方法

根据预实验结果, 益气活血颗粒高、中、低剂量组大鼠在冠状动脉左前降支结扎手术后第 2 天开始给予益气活血颗粒复方提取物灌胃, 剂量分别为 4.0、2.0、1.0 g/(kg · d), 每日 1 次。其余各组均给予 1 ml/100 g 生理盐水灌胃, 每日 1 次。各组大鼠连续灌胃 5 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般状况观察 包括大鼠的毛发、活动度、是否存在争斗、抓取时的应激情况以及大便质地情况等。

1.6.2 体重 分别在实验 0、3 和 8 周时, 采用动物体重秤测定。

1.6.3 抓力测定 大鼠平静状态下, 右手抓取大鼠按放在抓力板上, 左手向前推抓力板, 然后右手滑至大鼠尾部, 左手轻轻松开抓力板, 抓力板随右手拉鼠尾的力量向前滑行, 待大鼠用力抓住抓力板时及时加力后拉, 测取抓力。每只大鼠测量 3 次, 取平均值。

1.6.4 自主活动测定 采用旷场试验方法^[7]评价各组大鼠自主活动情况, 在安静、暗光条件下检测。实验前先将大鼠单独放入自发活动实验仪 (北京众实迪科技发展有限公司研制, 箱子长、宽、高均为 80 cm) 中适应 2 min 后, 操作者握住大鼠尾根部 1/3 处, 轻轻将大鼠放入旷场箱中格内, 开始同步录像计时。观察 10 min 内大鼠活动情况。取出大鼠后用毛巾蘸清水及低浓度酒精彻底擦拭箱底, 避免留有气味而干扰下 1 只大鼠的观察结果。测定指标包括大鼠活动总路程、运动速度, 大鼠不活动时间、活动时间。

1.6.5 舌象分析 实验结束后对大鼠进行舌象分析。采用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 依据参考文献^[8], 比色卡固定色块 (中间灰色色块) 固定三点及舌面固定三点 (舌根及舌面左右两点) 的色彩 R (红)、G (绿)、B (蓝) 初始值。用绝对中性灰的色彩 RGB (R = G = B = 128) ÷ 比色卡灰色色块的平均 RGB 值 × 舌面采集平均 RGB, 得到舌面 R、G、B 的相对值。X 相对 = 128/X 比色卡 × X 舌面 (X = R, G, B)。

1.6.6 脉搏幅度 利用小动物无创脉搏血氧仪对大鼠脉搏幅度进行检测, 探头的夹子轻轻夹住大鼠右侧后足, 探头红外感受器置于足掌侧避光检测,

待出现脉搏曲线并稳定后,记录数据。

1.6.7 超声心动图及腹主动脉血流速度 大鼠胸部左侧锁骨至肋骨下缘进行备皮处理,仰卧固定,通过高分辨率小动物超声影像系统,将探头定位在乳头肌水平长轴切面,频率设定为 17.5 MHz,进行 M 型超声检查。心脏结构和功能测定:选用左室短轴切面测量检测心率 (HR)、心功能指标 [包括射血分数 (EF)、短轴缩短率 (FS)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO)]、心室重构指标 [包括左室收缩末期容积 (LVEVs)、左室舒张末期容积 (LVEVd)、左室重量 (LVM)、左室舒张末期内径 (LVIDd)、左室收缩末期内径 (LVIDs)]、室壁厚度指标 [包括左室前壁收缩末期厚度 (LVAWs)、左室前壁舒张末期厚度 (LVAWd)、左室后壁收缩末期厚度 (LVPWs)、左室后壁舒张末期厚度 (LVPWs)],各项指标均连续测量 3 个周期,取平均值。腹主动脉血流速度测定^[8]:在腹主动脉超声 (M 型) 中,分别结合心电图和腹主动脉搏动超声波形,测量心脏收缩至腹主动脉近心端时间 (T1) 和远心端时间 (T2),并测量近心端和远心端之间腹主动脉长度 (L),计算腹主动脉血流速度 ($V = L / (T2 - T1)$)。

1.6.8 血液流变学 大鼠腹主动脉穿刺取血 3ml,加入肝素化抗凝试管中,采用血液流变测定仪测定,指标包括高(150S⁻¹)、中(60S⁻¹)、低(5S⁻¹)切变率下的全血黏度和血浆黏度。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计。计量资料符合正态分布以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较

本研究过程中由于大鼠不能耐受疲劳和心力衰竭而死亡,最终纳入统计的空白对照组 10 只,心

肌梗死组 7 只,其余各组 8 只。空白对照组大鼠活泼好动,皮毛洁白有光泽,抓捕时挣扎有力。心肌梗死组大鼠活动度下降,毛发色泽暗淡无光,未见鼠间争斗。其余各组大鼠在睡眠剥夺初始时大鼠处于应激状态,抓取时撕咬,对水敏感,存在鼠间争斗。随着睡眠剥夺时间延长各组大鼠处于衰竭状态,表现倦伏懒行,放开时无逃逸的行动,抓取时温顺,并存在皮毛脱落的情况,各组大鼠之间一般状态并无明显的差异。

2.2 各组大鼠不同时间体重比较

表 1 示,在 0 和 3 周时,各组大鼠体重差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 8 周时,与空白对照组比较,模型组大鼠体重明显下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,益气活血颗粒高、中剂量组,睡眠剥夺组和心肌梗死组大鼠体重明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与益气活血颗粒高剂量组比较,益气活血颗粒中、低剂量组大鼠体重降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠脉搏幅度和抓力比较

表 2 示,与空白对照组比较,模型组大鼠脉搏幅度和抓力明显下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,益气活血颗粒高剂量组、睡眠剥夺组和心肌梗死组大鼠抓力明显提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),益气活血颗粒高剂量组脉搏幅度也明显升高 ($P < 0.05$)。益气活血颗粒高剂量组大鼠抓力明显高于益气活血颗粒低剂量组 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠脉搏幅度和抓力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脉搏幅度 (μm)	抓力 (g)
空白对照组	10	52.00 ± 14.27	599.60 ± 81.32
模型组	8	21.43 ± 16.38*	416.50 ± 42.01*
睡眠剥夺组	8	21.29 ± 10.73	479.63 ± 59.51 [△]
心肌梗死组	7	29.14 ± 13.17	506.14 ± 78.93 [△]
益气活血颗粒高剂量组	8	36.37 ± 14.45 [△]	515.00 ± 74.70 ^{△△}
益气活血颗粒中剂量组	8	30.14 ± 18.98	468.38 ± 71.57
益气活血颗粒低剂量组	8	27.00 ± 15.44	424.13 ± 38.59 [▲]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与益气活血颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

表 1 各组大鼠在实验 0、3 和 8 周时体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	0 周	3 周	8 周
空白对照组	10	192.00 ± 5.85	268.70 ± 8.97	395.90 ± 13.29
模型组	8	196.13 ± 9.70	263.50 ± 10.23	317.00 ± 14.28*
睡眠剥夺组	8	191.63 ± 5.63	273.13 ± 17.63	339.13 ± 13.35 [△]
心肌梗死组	7	193.43 ± 6.85	267.29 ± 8.75	343.43 ± 13.30 ^{△△}
益气活血颗粒高剂量组	8	193.88 ± 6.92	268.38 ± 8.19	354.63 ± 12.22 ^{△△}
益气活血颗粒中剂量组	8	190.75 ± 7.29	267.25 ± 11.21	335.00 ± 18.42 ^{△▲}
益气活血颗粒低剂量组	8	192.13 ± 7.68	266.88 ± 10.41	320.25 ± 10.02 ^{▲▲}

注:与空白对照组同时时间比较,* $P < 0.01$;与模型组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与益气活血颗粒高剂量组同时时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠舌象分析结果比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠舌面 R、G、B 相对值均有明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 益气活血颗粒高剂量组大鼠舌面 R、G 相对值明显升高 ($P < 0.05$), 其余各组大鼠舌面 R、G、B 相对值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组大鼠自主活动指标比较

表 4 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠活动总路程和平均速度均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 心肌梗死组大鼠活动的总路程明显升高 ($P < 0.05$); 同时益气活血颗粒高剂量组大鼠活动总路程和平均速度也明显升高 ($P < 0.05$)。益气活血颗粒高剂量组大鼠总路程和平均速度明显高于益气活血颗粒低剂量组 ($P < 0.05$)。各组大鼠不动时间、活动时间差异均无统计学意义

($P > 0.05$)。

2.6 各组大鼠心率及心功能指标比较

表 5 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠 SV、EF、FS、CO 水平均降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 睡眠剥夺组、心肌梗死组和益气活血高剂量组大鼠 SV、EF、FS、CO 水平均升高, 益气活血中剂量组 EF、FS 水平亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与益气活血颗粒高剂量组比较, 益气活血颗粒中剂量组 SV、FS 水平降低, 益气活血颗粒低剂量组 SV、EF、FS 水平亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠 HR 比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.7 各组大鼠心室重构、室壁厚度指标及腹主动脉血流速度比较

表 6 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠 LVIDs、LVIDd、LVEVs、LVEVd 和 LVM 均明显增加,

表 3 各组大鼠舌面 RGB 相对值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	R	G	B
空白对照组	10	168.60 ± 9.09	94.90 ± 11.41	108.50 ± 7.37
模型组	8	152.63 ± 3.42**	79.13 ± 3.91**	100.02 ± 4.66*
睡眠剥夺组	8	152.75 ± 5.18	80.38 ± 5.60	102.75 ± 7.69
心肌梗死组	7	153.14 ± 6.52	82.29 ± 5.88	103.14 ± 8.15
益气活血颗粒高剂量组	8	159.63 ± 8.38 [△]	85.88 ± 5.36 [△]	102.13 ± 6.13
益气活血颗粒中剂量组	8	152.38 ± 4.98	81.13 ± 4.67	98.13 ± 9.20
益气活血颗粒低剂量组	8	152.88 ± 4.83	79.25 ± 6.88	101.13 ± 8.48

注: R, 红; G, 绿; B, 蓝; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 4 各组大鼠自主活动指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	总路程 (s)	平均速度 (cm/s)	不动时间 (s)	活动时间 (s)
空白对照组	10	3132 ± 812	5.33 ± 1.09	205.6 ± 109.2	415.6 ± 121.8
模型组	8	1905 ± 577**	3.54 ± 1.12*	173.6 ± 98.6	395.0 ± 135.5
睡眠剥夺组	8	2077 ± 676	3.66 ± 1.07	166.2 ± 84.3	405.5 ± 94.2
心肌梗死组	7	2689 ± 1108 [△]	4.52 ± 1.88	168.7 ± 84.4	430.1 ± 88.2
益气活血颗粒高剂量组	8	2501 ± 922 [△]	4.58 ± 1.43 [△]	142.0 ± 90.8	464.1 ± 96.9
益气活血颗粒中剂量组	8	2247 ± 653	3.74 ± 1.27	145.1 ± 94.3	455.6 ± 107.8
益气活血颗粒低剂量组	8	2045 ± 648 [▲]	3.49 ± 1.08 [▲]	143.6 ± 102.4	439.7 ± 135.2

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与益气活血颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

表 5 各组大鼠心率及心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HR (次/min)	SV (μl)	EF (%)	FS (%)	CO (ml/min)
空白对照组	10	427 ± 32	203.7 ± 47.67	85.38 ± 5.31	56.44 ± 6.30	87.66 ± 24.66
模型组	8	399 ± 48	111.8 ± 22.49*	23.85 ± 4.89*	11.59 ± 2.50*	44.04 ± 7.54*
睡眠剥夺组	8	385 ± 61	216.6 ± 43.45 ^{△△}	79.20 ± 7.18 ^{△△}	49.91 ± 7.68 ^{△△}	83.00 ± 20.4 ^{△△}
心肌梗死组	7	425 ± 63	141.7 ± 15.00 [△]	38.63 ± 12.39 [△]	19.86 ± 7.32 [△]	60.17 ± 5.91 ^{△△}
益气活血颗粒高剂量组	8	385 ± 43	214.3 ± 45.70 ^{△△}	68.30 ± 18.04 ^{△△}	41.27 ± 13.99 ^{△△}	76.85 ± 29.81 [△]
益气活血颗粒中剂量组	8	393 ± 47	154.6 ± 56.67 [▲]	48.52 ± 23.92 [△]	27.17 ± 15.64 ^{▲▲}	59.13 ± 20.74
益气活血颗粒低剂量组	8	397 ± 72	127.5 ± 31.26 ^{▲▲}	36.27 ± 23.82 [▲]	19.61 ± 15.24 [▲]	50.26 ± 15.20

注: HR, 心率; EF, 射血分数; FS, 短轴缩短率; SV, 每搏输出量; CO, 心输出量; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与益气活血颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$

而 LVAWs、LVPWs 和腹主动脉血流速度则明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 益气活血颗粒高、中剂量组 LVIDs、LVIDd、LVEVs、LVEVd 均明显下降, 益气活血颗粒高剂量组 LVAWs、LVPWs 和腹主动脉血流速度明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 睡眠剥夺组 LVIDs、LVIDd、LVEVs、LVEVd 和 LVM 均明显下降, LVAWs 和 LVPWs 则明显增加 ($P < 0.01$); 心肌梗死组各指标与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与益气活血颗粒高剂量组比较, 益气活血颗粒低剂量组大鼠 LVIDs 与 LVEVs 明显升高, 腹主动脉血流速度明显下降 ($P < 0.05$)。

2.8 各组大鼠血液流变学指标比较

表 7 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠低、中、高切变率下全血黏度及血浆黏度明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 睡眠剥夺组、心肌梗死组

及益气活血颗粒高、中剂量组在低、中、高切变率下全血黏度均明显下降, 益气活血颗粒低剂量组中、高切变率下全血黏度亦降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 睡眠剥夺组、心肌梗死组和益气活血颗粒中剂量组大鼠血浆黏度亦较模型组下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与益气活血颗粒高剂量组比较, 益气活血颗粒低剂量组大鼠低切、中切全血黏度和血浆黏度明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

心力衰竭是由于任何心脏结构或功能异常导致心室充盈和/或射血能力受损的一组临床综合征, 为临床各种心脏病发展的终末阶段。有研究^[4]显示, 气虚血瘀是心力衰竭始动因素和基本病机特点, 是在心力衰竭病理条件下由于心气和脉气亏虚导致血液运行无力, 淤积脉管之中而形成血瘀证的

表 6 各组大鼠心室重构、室壁厚度指标及腹主动脉血流速度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVM (mg)	LVIDs (mm)	LVIDd (mm)	LVEVs (μ l)	LVEVd (μ l)
空白对照组	10	973 $\pm$ 62.3	2.94 $\pm$ 0.52	6.75 $\pm$ 0.68	35.0 $\pm$ 15.65	238.8 $\pm$ 53.73
模型组	8	1254 $\pm$ 285.9*	8.14 $\pm$ 0.54**	9.21 $\pm$ 0.48**	360.4 $\pm$ 52.95**	472.1 $\pm$ 52.93**
睡眠剥夺组	8	874 $\pm$ 110.7 $\Delta\Delta$	3.60 $\pm$ 0.62 $\Delta\Delta$	7.19 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta$	57.1 $\pm$ 21.37 $\Delta\Delta$	273.7 $\pm$ 48.44 $\Delta\Delta$
心肌梗死组	7	1123 $\pm$ 318.4	6.83 $\pm$ 1.52	8.44 $\pm$ 1.23	255.9 $\pm$ 114.20	397.6 $\pm$ 121.50
益气活血颗粒高剂量组	8	1058 $\pm$ 226.5	4.65 $\pm$ 1.66 $\Delta\Delta$	7.78 $\pm$ 0.98 $\Delta\Delta$	116.1 $\pm$ 105.70 $\Delta\Delta$	330.4 $\pm$ 95.59 $\Delta\Delta$
益气活血颗粒中剂量组	8	1062 $\pm$ 134.7	5.95 $\pm$ 1.95 Δ	8.01 $\pm$ 1.15 Δ	199.4 $\pm$ 133.50 Δ	354.0 $\pm$ 108.90 Δ
益气活血颗粒低剂量组	8	1159 $\pm$ 251.6	7.38 $\pm$ 2.81 Δ	8.91 $\pm$ 2.01	334.7 $\pm$ 242.80 Δ	462.2 $\pm$ 221.40

组别	鼠数	LVAWs (mm)	LVAWd (mm)	LVPWs (mm)	LVPWd (mm)	腹主动脉血流速度 (mm/s)
空白对照组	10	3.71 $\pm$ 0.43	2.26 $\pm$ 0.40	3.95 $\pm$ 0.31	2.36 $\pm$ 0.32	7.75 $\pm$ 1.08
模型组	8	1.91 $\pm$ 0.84**	1.65 $\pm$ 0.65	2.68 $\pm$ 0.46**	2.26 $\pm$ 0.35	5.62 $\pm$ 0.95**
睡眠剥夺组	8	3.32 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta$	1.99 $\pm$ 0.31	3.43 $\pm$ 0.44 $\Delta\Delta$	2.05 $\pm$ 0.48	6.11 $\pm$ 1.02
心肌梗死组	7	1.87 $\pm$ 1.03	1.48 $\pm$ 0.78	3.19 $\pm$ 1.06	2.58 $\pm$ 0.82	5.70 $\pm$ 0.84
益气活血颗粒高剂量组	8	3.17 $\pm$ 1.01 Δ	2.05 $\pm$ 0.36	3.21 $\pm$ 0.37 Δ	2.15 $\pm$ 0.39	6.89 $\pm$ 0.81 Δ
益气活血颗粒中剂量组	8	2.59 $\pm$ 0.56	1.94 $\pm$ 0.32	2.82 $\pm$ 0.79	1.90 $\pm$ 0.41	6.27 $\pm$ 1.14
益气活血颗粒低剂量组	8	2.11 $\pm$ 1.06	1.48 $\pm$ 0.54	3.13 $\pm$ 0.94	2.50 $\pm$ 0.76	5.88 $\pm$ 0.76 Δ

注: LVM, 左室重量; LVIDs, 左室收缩末期内径; LVIDd, 左室舒张末期内径; LVEVs, 左室收缩末期容积; LVEVd, 左室舒张末期容积; LVAWs, 左室前壁收缩末期厚度; LVAWd, 左室前壁舒张末期厚度; LVPWs, 左室后壁收缩末期厚度; LVPWd, 左室后壁舒张末期厚度; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与益气活血颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$

表 7 各组大鼠血液流变学指标比较 (mPa·s, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	低切	全血黏度 中切	高切	血浆黏度
空白对照组	10	8.36 $\pm$ 1.00	4.93 $\pm$ 0.36	4.03 $\pm$ 0.26	1.19 $\pm$ 0.04
模型组	8	12.61 $\pm$ 0.99*	8.32 $\pm$ 2.14*	5.74 $\pm$ 0.90*	1.24 $\pm$ 0.03*
睡眠剥夺组	8	11.04 $\pm$ 1.04 Δ	5.70 $\pm$ 0.66 Δ	4.35 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta$	1.18 $\pm$ 0.04 Δ
心肌梗死组	7	10.15 $\pm$ 1.30 $\Delta\Delta$	5.42 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$	4.39 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	1.20 $\pm$ 0.02 Δ
益气活血颗粒高剂量组	8	9.56 $\pm$ 0.79 $\Delta\Delta$	5.13 $\pm$ 0.26 $\Delta\Delta$	4.18 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 0.02
益气活血颗粒中剂量组	8	10.11 $\pm$ 0.72 $\Delta\Delta$	5.23 $\pm$ 0.20 $\Delta\Delta$	4.22 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.18 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
益气活血颗粒低剂量组	8	11.20 $\pm$ 1.16 $\Delta\Delta$	5.46 $\pm$ 0.29 $\Delta\Delta\Delta$	4.38 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$	1.24 $\pm$ 0.02 Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与益气活血颗粒高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

病机变化。虽然采用益气活血治法能够明显改善心力衰竭患者的症状与预后^[1]，但是目前在病证结合研究思路指导下，对于心力衰竭气虚血瘀证动物模型的研究有重要意义。另有研究认为，心气虚与神经内分泌的紊乱密切相关^[12-13]，而长期睡眠失常不仅可导致机体内分泌昼夜节律的失调^[14-15]，而且易产生精神恍惚、神疲乏力、不欲饮食等临床类似气虚证的症状表现。因此，本研究采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎方法建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型。结果显示，模型组大鼠出现体重和脉搏幅度降低、抓力降低、自主活动下降等气虚证的客观表现，同时舌象表现、腹主动脉血流速度降低、血液流变学异常反映了气虚血瘀的病机变化，并且心功能、心室结构指标证实心力衰竭模型成功。与心肌梗死组和睡眠剥夺组相比，模型组大鼠体重、抓力、自主活动、心功能、心室重构、室壁厚度等指标均有不同程度加重，提示双因素复合干预作用下大鼠表现出心力衰竭气虚血瘀的病证结合模型更明显。

本研究进一步采用益气活血颗粒干预心力衰竭气虚血瘀病证结合模型大鼠进行验证。益气活血颗粒由补阳还五汤演化而来，具有益气、活血化瘀的功效。方中黄芪补益元气，气旺则血行，瘀去络通，为君药。当归尾活血通络而不伤血，为臣药。赤芍、川芎、桃仁、红花协同辅助祛瘀；地龙通经活络，力专善走，周行全身，以助药力，同为佐药。前期研究^[16]表明，益气活血颗粒通过调节血管内皮活性物质分泌、减少细胞黏附、抑制炎症等途径保护气虚血瘀证大鼠血管内皮的功能。本研究结果显示，益气活血颗粒各剂量不仅能够不同程度增加大鼠体重、抓力、脉搏幅度，提高腹主动脉血流速度，改善大鼠血液流变学和自主行为活动等与气虚血瘀相关的客观表现，而且在抑制心室重构、增加心输出量、改善心肌组织的病理变化等方面表现出对心力衰竭病理过程的干预作用。并且益气活血颗粒高剂量相比益气活血颗粒中、低剂量对本研究部分指标影响更有优效性。一方面，可以认为高剂量的益气活血颗粒对睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型具有较好干预作用，这对临床药物剂量的应用亦提供了重要的参考依据；另一方面，也从对证治疗的角度说明采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的科学性和可靠性。

综上，本研究通过现代医学相关宏观和微观指

标观察并结合益气活血方药反证的方法证实了睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法成功制备了心力衰竭气虚血瘀证病证结合的动物模型可行性和可靠性，为中医药基础和临床研究提供有价值的实验数据。下一步我们将对其过程中神经内分泌紊乱及潜在机制进行深入研究。

参考文献

- [1] CUI X, DONG W, ZHENG H, et al. Collaborative care intervention for patients with chronic heart failure: A systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(13): e14867.
- [2] 冯英, 蒋玗姝, 何倩雯, 等. 芪苈强心胶囊治疗舒张性心力衰竭的疗效及安全性的 Meta 分析 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(6): 992-998.
- [3] 赵志强, 王贤良, 张萍, 等. 基于前瞻性临床流行病学调查的射血分数正常心力衰竭中医证候特征分析 [J]. 中医杂志, 2019, 60(9): 773-778.
- [4] 薛冰洁, 黄吉生, 马博, 等. 益气通络颗粒促气虚血瘀证脑梗大鼠血管新生的作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 44(1): 112-118.
- [5] 史雅红, 任建勋, 刘建勋, 等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3341-3345.
- [6] ZHANG Y, DEDKOV EI, LEE B, et al. Thyroid hormone replacement therapy attenuates atrial remodeling and reduces atrial fibrillation inducibility in a rat myocardial infarction-heart failure model [J]. J Card Fail, 2014, 20(12): 1012-1019.
- [7] 吴红芳, 金齐颖, 曹金英, 等. BDNF 在慢性不可预见性温和刺激应激大鼠海马星形胶质细胞中的表达 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1379-1382.
- [8] 郝婷婷, 郭浩, 刘建勋, 等. 2 种分析方法对睡眠剥夺大鼠血瘀证评价的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1880-1885.
- [9] COLAZZO F, CASTIGLIONI L, SIRONI L, et al. Murine left atrium and left atrial appendage structure and function: echocardiographic and morphologic evaluation [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125541.
- [10] 颜蕾, 魏易洪, 周忠焱, 等. 慢性心力衰竭中医证型及其影响因素相关性分析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 97-100.
- [11] 刘晶, 徐浩. 益气活血法治疗射血分数保留心力衰竭气虚血瘀证临床疗效和安全性的 Meta 分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(11): 1476-1480.
- [12] 金红姝, 杨戈, 张钦传, 等. 心气虚证动物模型雌二醇睾酮变化的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(8): 622-623.
- [13] 许丽梅, 赖仁奎. 心气虚证与神经内分泌免疫调节关

系探析 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(1): 146-149.

[4] OLIVEIRA RF, DANIELE TMDC, FACANHA CFS, et al. Adiponectin levels and sleep deprivation in patients with endocrine metabolic disorders [J]. Rev Assoc Med Bras (1992), 2018, 64(12): 1122-1128.

[5] ALDABAL L, BAHAMMAM AS. Metabolic, endocrine,

and immune consequences of sleep deprivation. Open [J]. Respir Med J, 2011, 5: 31-43. doi: 10. 2174/1874306401105010031.

[6] 黄婷婷, 韩笑, 刘建勋, 等. 益气活血方对气虚血瘀证大鼠血管内皮功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 40-46.

Evaluation on Sleep Deprivation Combined with Left Anterior Descending Coronary Artery Ligation to Establish Rat Model of Heart Failure with *Qi* Deficiency and Blood Stasis Syndrome

REN Jianxun, YIN Chunyuan, SHI Yahong, MIAO Lan, MENG Hongxu, LI Junmei, LI Honghai, MA Jingquan, LIU Jianxun

Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091

ABSTRACT Objective To evaluate sleep deprivation combined with left anterior descending coronary artery ligation to establish rat model of heart failure with *qi* deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** A total of 70 SD rats were randomly divided into a blank control group, a model group, a sleep deprivation group, a myocardial infarction group, a *Yiqi Huoxue Granule* (益气活血颗粒) groups with high, medium and low dosage, with 10 rats in each group. The sleep deprivation group was given irregular sleep deprivation for 8 weeks. The rats in the model group and *Yiqi Huoxue Granule* group were given 3 weeks of sleep deprivation, and the left anterior descending coronary artery was ligated. The sleep deprivation continued on the 2nd day after surgery. A model of *qi* deficiency and blood stasis syndrome of heart failure was established at 5 weeks. Only the left anterior descending coronary artery was ligated in the myocardial infarction group, and the blank control group was fed normally. On the 2nd day after the operation, *Yiqi Huoxue Granules* were given gavage at 4.0, 2.0, and 1.0 g/(kg · d) in the high, medium, and low-dose groups, and the other groups were given saline 1 ml/100 g, for 5 weeks. The body weight, grasping force, pulse amplitude, autonomic activity, tongue image, cardiac function, ventricular remodeling index, hemorheology index and abdominal aortic blood flow velocity of the rats in each group were compared. **Results** Compared with the blank control group, the body weight, grasping force, pulse amplitude, and total distance and average speed of autonomous activities of the model group significantly decreased, and the index of ventricular remodeling increased, and the index of cardiac function, wall thickness, and abdominal aortic blood flow velocity significantly decreased. The blood viscosity and plasma viscosity increased significantly under different shear rates, and the relative values of R (red), G (green), and B (blue) on the tongue surface were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the *Yiqi Huoxue Granule* high-dose group can increase rat weight, grasping force, pulse amplitude, wall thickness, reduce ventricular remodeling, hemorheology indexes, improve rat heart function and autonomous behavior activities, and increase abdominal aorta blood flow velocity, and the relative values of R and G on the tongue surface of rats significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The combination of sleep deprivation and left anterior descending coronary artery ligation can induce heart failure rats to show obvious external and objective manifestations of *qi* deficiency and blood stasis syndrome. The effective intervention of high-dose *Yiqi Huoxue Granules* contradicts the scientificity and reliability of this model.

Keywords heart failure; *qi* deficiency and blood stasis syndrome; animal model; sleep deprivation; coronary artery; *Yiqi Huoxue Granule* (益气活血颗粒)

(收稿日期: 2019-04-06; 修回日期: 2019-06-16)

编辑: 邓 媛