

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.15.006

思路与方法

络风内动模型构建的思路与方法

李红梅, 王昱*

(北京中医药大学东直门医院/北京中医药大学心血管病研究所, 北京市东城区海运仓 5 号, 100700)

摘要 络风内动是针对急性心脑血管事件中西医结合防治策略进行创新性思考和探索之后提出的病机学说, 认为在络脉为病过程中出现动风征象即为络风内动。基于络风内动病机学说, 从动物、细胞和细胞内超微结构三个层面, 多视角、多维度阐释络风内动模型载体构建理念, 并结合相关研究的新近的实践研究结果, 全面整合研究思路, 为实现络风内动研究平台的科学化和标准化寻求新突破。

关键词 络风内动; 动物模型; 细胞模型; 超微分子模型

络风内动学说是针对目前动脉粥样硬化发病机制尚未完全阐明、治疗缺乏治本之策等现状, 结合动脉粥样硬化性心血管疾病发病急骤、临床表现变化多端等特点, 创新地提出的病机学说。我们认为, 在气血失常基础上发生的“络风内动”是动脉粥样硬化性心血管疾病发生发展的关键病机。既往研究已经证实络风内动病机学说的合理性, 且在该学说指导下初步建立的冠心病稳定期患者再发心血管事件的预警指标体系以及络风宁系列方剂研发均取得一定进展^[1-14]。然而由于缺乏客观化与标准化的研究模型, 限制了络风内动学说的进一步深化研究, 尤其是络风内动学说科学内涵的阐释和作用机制研究、新药研发等仍缺乏合理的模型做支撑。在此背景下, 本文围绕络风内动理论体系, 借助现代先进的技术手段, 通过宏观至微观分层次地深入阐述, 从动物(器官)水平、细胞水平和超微(分子)水平提出较为系统的络风内动模型载体构想, 为推动络风内动学说科学化和现代化研究提供基础。

1 络风内动物模型构建思路

络风内动学说是针对具有发病急骤、病情多变、病情迁延等临床特点的疾病如急性冠脉综合征而提出, 这些特点也是络病的临床特征。络风内动

本身体现出络脉形质的易变性, 络风内动常见证候因素包括风、火、寒、燥、湿、虚、瘀、郁、滞、毒、痰、水等, 其中络脉虚或络脉瘀是形成络风内动的基本维度。结合王永炎院士的络病理论, 对络风内动学说进行进一步发挥, 认为络风内动是病络理论的不同表达形式, 更体现络脉为病的多变性, 从络脉、病络到络病这种病理生理过程称之为“络脉为病”, 在络脉为病过程中出现动风征象称之为络风内动^[10-13]。气血在络脉中运行失常或不循常道皆可逆乱动风或络伤血溢, 络脉结构与功能异常导致气络与血络交互作用失衡亦可逆乱生风。我们通过对目前较为成熟的肝阳化风证脑出血大鼠模型和线栓法脑梗死大鼠模型^[17]进行深入思考后认为, 络风内动也类似缺血性中风与出血性中风, 亦可分为“缺血性”和“出血性”。出血性络风内动与王永炎院士提出的“络破”概念相一致, 即各种原因导致络壁损伤, 络脉中的血液溢出的病理状态^[18-21]。我们认为, 络风内动实证者, 多因血瘀、痰浊伏络日久, 郁毒化热, 热极生风, 导致动脉粥样硬化斑块内络脉破裂出血, 即“络破”这一病络状态。现代研究证实, 易损斑块破裂导致血栓形成阻塞冠状动脉是急性冠脉综合征的发病机制^[22], 设想这种由于斑块内微小血管破裂出血, 引起斑块易损并发血栓形成从而导致急性冠脉综合征的病理过程, 与“络破”及出血性络风内动具有内在的一致性。缺血性络风内动则与“络结”“络弛”更为接近, “络结”是络脉管壁因痰浊、

基金项目: 国家自然科学基金(81273913); 北京中医药大学重点学科开放课题(2013-ZDXKKF-27)

* 通讯作者: wx650515@163.com, (010) 84015563

瘀血、瘀脂等原因导致增厚、变硬、凹凸,影响络脉正常的气血流通而产生的一种病理状态。“络弛”则是络脉因某种原因导致络脉麻痹弛缓,血液滞留于局部而他处血少或无血,影响络脉渗灌、返注的一种病理状态。临床上破裂的微小粥样硬化性斑块直接或继发性造成远端血管阻塞即冠状动脉微栓塞过程^[23],集中反映了络结、络弛特点,因此,我们将动脉微栓塞造成的微循环障碍称为缺血性络风内动,而缺血性络风内动可以通过模拟微循环灌注障碍进行研究。

1.1 出血性络风内动模型

1.1.1 热毒生风型出血性络风内动模型 既往构建的斑块内出血动物模型是通过斑块内注射红细胞模拟出血环境完成的,并非由于斑块易损而自发破裂形成。建议在排除血管腔内出血的基础上,通过多因素联合干预,模拟自发斑块内出血,构建热盛血溢病证结合动物模型。将形成络风内动的各因素逐一叠加,从简单到复杂,从静态到动态,最后复合成为热毒生风型出血性络风内动模型。1) 风邪伏络(静态):“内风”伏藏体内,因不同诱因引触而动,此与易损斑块的形成与破裂过程相似。我们选择 ApoE 基因敲除(-/-)小鼠进行全程高脂饲养,于 12 周龄时进行右侧颈总动脉硅胶套管放置术,制作动脉粥样硬化斑块模型。2) 受外因诱发而动(动态):颈动脉套管手术 6 周后,予小鼠腹腔注射脂多糖,模拟中医“热毒”,持续 8 周;套管术后 11 周,小鼠腹腔注射 Compound 48/80 (0.5 mg/kg),促发斑块内出血;术后 12 周,对小鼠进行为期 2 周的限制性精神刺激,促使斑块破裂。由于增加斑块的易损性与改变斑块表面的应力/应变状态密切相关,因此,我们在高脂喂养的 ApoE -/- 小鼠颈动脉套置缩窄性硅胶管(改变表面应力),诱发动脉粥样硬化斑块形成,继而采用“应激+脂多糖+Compound 48/80”(增加斑块易损性和出血率)三种因素联合干预诱发斑块破裂,而其中应激与脂多糖的联合应用可导致血液纤维蛋白原浓度明显升高,机体炎症反应增强,斑块内炎症细胞、炎症细胞因子和组织因子表达增多,增加血液的凝固性和斑块的易损性,通过促发机体的高血流动力学反应、高凝状态和炎症反应,改变斑块的应力/应变状态,进一步增加斑块易损性,诱发血栓形成。

1.1.2 络虚风动型出血性络风内动模型 气不摄血导致的出血性络风内动模型的构建,可从广州中

医药大学罗颂平研究团队的经典先兆流产动物模型受到启发^[24-26]。先兆流产具有反复发作的特点,类似于“风”的特性,同时气血虚弱,胞脉受损,胎元不固,导致胎漏、胎动不安,是典型的络脉气血受损疾病。《景岳全书》言:“凡妊娠之数见堕胎者,必以气脉亏损而然。盖气虚而提摄不固,血虚则灌溉不周,所以多致小产。”提示气不摄血、络脉风动是先兆流产的基本病机之一。现代研究发现,子宫螺旋动脉重构不良,导致螺旋动脉血流减少,收缩期峰值流速及舒张期末流速下降,阻力指数上升,形成先兆流产的病理基础^[27]。子宫螺旋动脉相当于胞宫络脉,若气血亏乏,络脉空虚,失于濡养则形成络虚风动;甚则气不摄血,形成“络破”出血,因此,先兆流产动物模型是出血性络风内动(虚证)理想的研究载体。采用孕激素受体拮抗剂 RU-486 制作阴道出血先兆流产气不摄血病证结合动物模型,全面、动态地采集信息,依据宏观表征结合生物学指标,对络脉气血异常的动态演变进行系统辨证,有望构建出血性络风内动(虚证)模型。

1.2 缺血性络风内动模型

在造模方法上,目前常用机械性栓塞和化学性损伤栓塞两种,前者主要包括冠状动脉内注射微栓塞球法、自体微血栓法,后者主要指冠状动脉内注射月桂酸钠。但上述造模方法存在一定的局限性,如冠状动脉注射微栓塞球法所用的栓塞微球与实际冠状动脉斑块破裂后释放出的富含血小板、纤维蛋白、红细胞等成分的血栓栓子不同,且微球对局部组织释放的血管活性物质的反应同真正的微血栓也存在差别^[28],与临床病理生理不符,对药物治疗的研究应用价值较小;自体微血栓法为机械性堵塞,堵塞材料为自身血栓,成分与临床冠状动脉微血栓成分接近,但是无内皮损伤和微血管病变因素;月桂酸钠注射法通过化学药物造成微血管内皮损伤,引起微血管病变,诱发血小板黏附聚集、促进原位微血管栓塞形成,但难以模拟破裂斑块造成的弥漫性微栓塞过程。

结合缺血性络风内动的病机特点,我们认为,构建缺血性络风内动物模型必须具备以下 3 个条件:1) 络气亏虚(络弛);2) 瘀血阻络(络结);3) 有效形成微栓塞导致冠状动脉微循环障碍。要满足上述条件,需要把问题进行拆分,首先中医“络气”与西医血管内皮功能相吻合,络气“亏虚”与血管内皮功能障碍相类似,因此,应从

物理性损伤和化学性损伤两种途径进行模拟,采用肾上腺素^[29]联合月桂酸钠干预的方式造成冠状动脉微血管原位血栓形成;至于瘀血阻络环节,建议选用成熟的自体微栓塞法进行模拟,加重冠状动脉微循环障碍,同时肾上腺素也是经典的中医血瘀证造模所用试剂,加之手术操作过程开胸时间较长,且须撕破心包,从中医角度已损伤胸中大气,进而加重心络气虚。具体操作流程如下:大鼠剪尾取血后加入肾上腺素,体外自凝成血凝块,用玻璃器皿研磨成均匀颗粒备用;大鼠开胸,撕开心包,用小动脉夹钳夹升主动脉,将月桂酸钠与自体血栓粉末混合成均匀颗粒状悬液后注入主动脉,约 10s 后松开钳夹,压迫止血后关胸复苏。上述所有干预操作连贯,作用有放大效应,整个动物模型的制作有据可依,能切实反映缺血性络风内动的病机特点。

2 络风内动细胞模型构建思路

证候模型是中医证候生物学基础研究的重要技术平台,随着现代研究技术的快速发展,基于单细胞分析的细胞组学研究给中医病证结合模型的构建带来新的生机。模拟临床疾病建立起来的细胞模型可反映生命活动最小单位的活细胞水平,通过积极开展络风内动细胞模型研究,有望在现有中医证候模型研究领域取得新突破。

络风内动是包括急危重症在内的多种病证的关键病理环节,络脉为病伤气为先,气络既伤,则神机紊乱,功能失用,继而导致血络结构改变,形成“络结”“络弛”甚或“络破”的病理状态。目前认为,营气、络脉与血管内皮细胞在功能上密切相关,因此,络风内动细胞模型的建立也应以血管内皮细胞损伤为基础展开。早期的血管内皮细胞模型多从微观角度入手,采用模型动物的血管内皮细胞直接取材建模,或选用内毒素、高脂饮食、凝血酶、氧化低密度脂蛋白和血管紧张素等手段损伤动物或人的正常血管内皮细胞进行造模。这些方法虽可有效避免动物模型的诸多不足,但仍存在造模因素简单、不符合中医致病因素、不能反映中医学病理状态等问题。基于前期研究基础,我们拟通过两步叠加法构建络风内动细胞模型:1) 络脉损伤基础模型:选择人冠状动脉内皮细胞(HCAEC),采用缺氧(1~3h)再给氧损伤法培养并建立 4~6 代具有“气虚”本底的实验细胞系。2) 叠加病理培养环境,二次损伤 HCAEC:在络脉损伤基础模型上,用冠心病络风内动证患者 15%~20% 的血

清作用于体外培养的 HCAEC,通过检测细胞活性、细胞上清丙二醛含量、超氧化物歧化酶活力、细胞 DNA 损伤程度、内皮细胞血栓调节蛋白和血管性假血友病因子 mRNA 的表达,确定最优造模条件作为络风内动细胞模型构建标准。

3 络风内动细胞超微结构研究载体

络脉是气络和血络的统一体,既有结构又有功能,气血逆乱生风,扰动络脉出现动风征象即为络风内动。络风内动的生物学基础研究除借助细胞模型以外,尚需对胞内超微结构进行更深层次的探究。研究表明,线粒体与内质网在结构和功能上密切相关,线粒体表面的 4%~20% 与内质网的形成有直接的联系,线粒体外膜与内质网膜间存在特殊的物理(蛋白质)连接,被称为线粒体-内质网结构偶联,线粒体-内质网偶联可通过影响 Ca^{2+} 和磷脂代谢调控血液、血流,而血液又能为线粒体-内质网偶联提供所需的结构蛋白、功能蛋白,此过程类似中医气血的相互调节作用。基于以上分析,我们提出“气”与线粒体-内质网偶联中的 Ca^{2+} 调节和磷脂代谢高度相关,“血”与现代医学血液、血流相一致,因此,气血及络脉的深化研究应结合线粒体-内质网偶联这一崭新结构。对络风内动细胞超微结构的研究形成以下思路:建立体外心肌细胞培养平台及内皮细胞-血管平滑肌细胞、平滑肌细胞-血管外膜成纤维细胞、滋养细胞-蜕膜细胞共培养体系,模拟在体环境,通过“阳性”药及缺血缺氧刺激,围绕线粒体-内质网偶联,观察偶联结构的变化及其对 Ca^{2+} 和磷脂代谢的调节,以及相关信号通路的变化。同时观察低剪应力对内皮细胞与血小板间作用的影响,检测滋养细胞功能及绒毛间质血管体视学变化,结合相关蛋白阻断剂及药物干预,从不同层次和靶点深入揭示线粒体-内质网偶联失衡(气血逆乱)与络风内动证之间的相关性。

4 小结

中医病证结合模型的设想被提出以来,以其特有的优势在中医药学界得到了广泛的认可和推广,越来越多成功模型的涌现极大地推动了中医药的现代化发展。络风内动作为新兴的学说,更需要一套完善和系统的模型研究载体做支撑。

参考文献

- [1] 中华中医药学会介入心脏病学专家委员会. 胸痹心痛络风内动证诊断专家共识 [J]. 中医杂志, 2014, 55(17):1528-1530.

- [5] 赵怀兵. 络风宁 0 号方涂层球囊对小型猪冠状动脉的影响 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [6] 李红梅. 络风宁 0 号方对体外培养的人冠状动脉平滑肌细胞和内皮细胞生长的影响 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [7] 任晓霞. 紫杉醇水蛭素复合物对兔血管内皮细胞和平滑肌细胞生长的影响 [J]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [8] 李雪峰, 杨雪卿, 王显, 等. 络风宁 2 号对心力衰竭大鼠心功能的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(5): 510-512, 539.
- [9] 郑相颖. 基于络风内动病机学说的络风宁 3 号方治疗频发室性早搏的临床研究 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [10] 刘江波. 心房颤动射频消融术前后中医证候演变规律及络风宁 3 号方干预研究 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [11] 王子辰. 基于络风内动病机学说的络衡滴丸的安全性评价 [J]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [12] 王显, 赵怀兵, 胡大一. 紫杉醇水蛭素复合物对培养的兔血管平滑肌细胞和内皮细胞增殖与迁移的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2009, 1(2): 65-69.
- [13] 王显, 杨巨成. 急性冠脉综合征“络风内动”假说及实践 [J]. 中华中医药杂志, 2002, 17(9): 19-22.
- [14] 王显, 杨巨成. 急性冠脉综合征“络风内动”假说再认识 [J]. 中华中医药杂志, 2002, 17(10): 8-10.
- [15] 王显, 胡大一. 急性冠脉综合征“络风内动”假说临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 204-208.
- [16] WANG X, LIN ZX, JUN-BO GE, et al. Relationship between traditional Chinese medicine syndrome type and coronary arteriography of acute coronary syndrome [J]. CJIM, 2003, 9(2): 116-119.
- [17] 王显, 胡大一, 沙鸥. 中医络风内动证的病变特征和炎症标志物的检测 [J]. 心脏杂志, 2008, 20(10): 235-238.
- [18] 王显, 胡大一, 沙鸥. 中医络风内动证血管内超声的病变特征 [J]. 心脏杂志, 2009, 21(1): 88-91.
- [19] 王显, 胡大一, 沙鸥. 复方丹皮酚滴丸对 90 例不稳定型心绞痛患者血浆炎症标志物的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 10(5): 8-10.
- [20] 熊新贵, 梁清华, 陈疆, 等. 高血压性脑出血肝阳化风证大鼠模型的建立 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 11-14.
- [21] 常富业, 王永炎, 高颖, 等. 络脉概念诠释 [J]. 中医杂志, 2005, 46(8): 566-568.
- [22] 王永炎, 杨宝琴, 黄启福, 等. 络脉络病与病络 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(4): 1-2.
- [23] 李鲲, 王燕平. 王永炎从病络论治急性冠脉综合征的体会 [J]. 中医杂志, 2011, 52(20): 1726-1728.
- [24] 王永炎, 常富业, 杨宝琴, 等. 病络与络病对比研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(3): 1-6.
- [25] 曾秋棠, 毛晓波. 易损斑块的早期识别与干预 [J]. 临床心血管病杂志, 2009, 25(5): 321-322.
- [26] 孙伏清, 陈良龙. 冠状动脉微栓塞的研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2006, 40(2): 199-202.
- [27] 方家. 滋肾育胎丸对先兆流产止血安胎作用的机理研究 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [28] 方家, 赵颖, 罗颂平, 等. 滋肾育胎丸对 SD 大鼠先兆流产模型止血安胎机理研究 [J]. 北京: 中国中西医结合学会生殖医学分会首届学术年会论文集. 2014: 283-283.
- [29] 陈曰黄. 加减寿胎丸治疗肾脾虚弱型先兆流产、习惯性流产的临床观察 [J]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
- [30] 雷琳, 白皎, 任青, 等. 子宫螺旋动脉血流参数检测联合血清孕酮、 β -HCG 测定预测早期先兆流产结局的价值 [J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(28): 4383-4385.
- [31] DORGE H, NEUMANN T, BETHENDS M, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6): H2587-H2592.
- [32] 赵建宏, 林琳, 高继发. SD 大鼠血管内皮细胞损伤模型的制作方法 [J]. 微循环杂志, 2000, 10(2): 20-21.

Ideas and Methods of Construction the Model of Wind of Collateral Channels Agitation

LI HongMei, WANG Xian

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700)

ABSTRACT Wind of collateral channels agitation is a pathogenesis theory put forward by researchers creative thinking and exploring the control strategy combined Chinese and western medicine of acute cardiocerebrovascular events. The researchers think that, wind of collateral channels agitation is emergence of symptom with agitation in the process of diseases with collateral channels. Based on the pathogenesis theory that wind of collateral channels agitation and from three levels that animal, cell and intracellular ultrastructure, the author from multi-perspective and multidimensional view interprets construction ideas of the model and carrier about wind of collateral channels agitation. Combined with the recent results of the related practice research, the author roundly integrated research thought, in order to seek new breakthroughs to achieve scientific and standardized research platform about wind of collateral channels agitation.

Keywords wind of collateral channels agitation; animal model; cell model; ultramicro molecular model

(收稿日期: 2015-11-03; 修回日期: 2015-12-29)

[编辑: 崔京艳]