

· 基础研究 ·

气虚血瘀证脑缺血再灌注病证结合大鼠模型的建立与评价

谭 辉¹ 尹婷婷² 王 键¹ 何 玲¹ 邓 勇¹ 李 净¹ 韩义皇³ 徐 伟¹

摘要 目的 研究建立大脑中动脉闭塞缺血再灌注(MCAO-R)气虚血瘀证病证结合大鼠模型的制备方法和评价标准。**方法** 雄性老龄 SD 大鼠 40 只,随机数字表法分成正常组、模型组、脑络欣通组、通心络组,每组 10 只。采用线栓法结合多因素老龄、饥饿、疲劳、高脂饮食、低氧等方法复合模拟制备气虚血瘀证 MCAO-R 模型,正常组和模型组予以 0.9% 氯化钠溶液灌胃,脑络欣通组和通心络组分别给予脑络欣通和通心络药液 1 mL/(100 g·d)灌胃;采用激光多普勒仪、Morris 水迷宫、TTC 染色法、ELISA 等方法检测各组大鼠神经功能缺损评分、气虚血瘀证评分、局部脑血流量(rCBF)、空间认知能力、脑梗死体积和凝血纤溶功能等指标变化。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、气虚血瘀证评分、脑梗死体积明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组神经功能缺损评分、气虚血瘀证评分、脑梗死体积显著降低($P < 0.01$)。与正常组比较,模型大鼠空间认知能力、rCBF 下降($P < 0.01$),与模型组比较,脑络欣通组和通心络组空间认知能力和 rCBF 升高($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶时间(TT)均明显缩短,纤维蛋白原(FBG)含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),与模型组比较,脑络欣通组 PT 延长($P < 0.01$),FBG 含量明显降低($P < 0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠纤维蛋白原降解产物(FDP)和 D-二聚体(D-D)水平升高($P < 0.01$),与模型组比较,脑络欣通组和通心络组大鼠 FDP 和 D-D 水平降低($P < 0.01$)。**结论** 通过线栓法结合多因素复合模拟制备的大鼠模型出现了脑缺血的病理表现,同时具备中医气虚血瘀证的生物学特征,说明 MCAO-R 气虚血瘀证模型是较为理想的脑缺血病证结合模型。

关键词 脑缺血;气虚血瘀证;病证结合;局部脑血流量;凝血;益气活血法

Establishment and Evaluation on Combination of Disease and Syndrome Rat Model of Cerebral Ischemia/Reperfusion with Qi Deficiency Blood Stasis Syndrome TAN Hui¹, YIN Ting-ting², WANG Jian¹, HE Ling¹, DENG Yong¹, LI Jing¹, HAN Yi-huang³, and XU Wei¹ 1 College of TCM, Anhui Chinese Medical University, Hefei (230038); 2 Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Anhui Chinese Medical University, Hefei (230000); 3 Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To study preparation methods and evaluation criteria for combination of disease and syndrome rat model [middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-R) rats with qi deficiency blood stasis syndrome (QDBSS)]. **Methods** Totally 40 male old rats were divided into the normal group, the model group, the Naoluo Xingdong (NLXT) group, and the Tongxinluo (TXL) group, 10 rats in each group. MCAO-R model was prepared by modified Longa EZ method. QDBSS was prepared by multiple factors complicated simulated ageing, hunger, fatigue, high fat diet, low oxygen, and so on. Rats in the normal group and the model group were administered with normal saline by gastrogavage.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 81603523);安徽省高校自然科学研究重点项目(No. KJ2016A404);安徽中医药大学自然科学研究基金项目(No. 2014zr001)

作者单位: 1. 安徽中医药大学中学院(合肥 230038); 2. 安徽中医药大学第二附属医院呼吸内科(合肥 230000); 3. 北京中医药大学研究生院(北京 100029)

通讯作者: 王 键, Tel: 0551-65169060, E-mail: 13695602939@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20171201.295

Those in the NLXT group and the TXL group were administered with NLXT and TXL by gastrogavage (1 mL/100 g per day) respectively. Neural function defect score (NFDS), score for QDBSS, renal cortical blood flow (rCBF), spatial cognitive function, volume of cerebral infarct, and the function of blood coagulation and fibrinolysis were detected by laser Doppler scanning, Morris water maze, TTC staining, and ELISA. Results Compared with the normal group, NFDS, score for QDBSS, and volume of cerebral infarct obviously increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, NFDS, score for QDBSS, and volume of cerebral infarct obviously decreased in the NLXT group and the TXL group ($P < 0.01$). Compared with the normal group, spatial cognitive function and rCBF obviously decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, spatial cognitive function and rCBF obviously increased in the NLXT group and the TXL group ($P < 0.05$). Compared with the normal group, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and thrombin time (TT) were obviously shortened, the content of FBG increased in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, PT was obviously prolonged, the content of FBG decreased in the NLXT group ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the contents of fibrin degradation products (FDP) and D-dimer (DD) obviously increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, FDP and DD levels obviously decreased in the NLXT group and the TXL group ($P < 0.01$). Conclusions Cerebral ischemia occurred in model rats established by multiple factors complicated modified Longa EZ method. They also manifested biological features of QDBSS, which showed that MCAO-R model rats with QDBSS was an ideal combination of disease and syndrome of cerebral ischemia.

KEYWORDS cerebral ischemia; qi deficiency blood stasis syndrome; combination of disease and syndrome; local cerebral blood flow; blood coagulation; supplementing qi activating blood circulation method

脑缺血动物模型的研究始于 1955 年 Hill NC 等^[1]建立的脑缺血狗模型,在其后近 30 年间基本是通过血栓形成的方法造成缺血^[2]。近年来,脑缺血模型选用的实验动物包括大鼠、小鼠、沙土鼠、犬、猫、兔、猴等^[3]。根据脑缺血部位不同主要分为全脑缺血和局灶性缺血模型。

“病证结合”是中医药研究的重点,也是中西医结合的切入点,用于实验的病证结合模型的研制引起关注。若单纯借用现代医学“病”的模型,就不能体现辨证论治特色,而单纯从中医学“证”角度模拟,则难以体现“同证异病”的多种病理特征。本课题组多年来致力于大脑中动脉闭塞缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion-reperfusion, MCAO-R)气虚血瘀大鼠模型的制作和应用研究,制定了符合生物学特征及中医学病机理论的操作规范。本研究介绍改良线栓法结合多因素复合模拟制作 MCAO-R 气虚血瘀证大鼠模型及其应用和评价。

材料与方法

1 动物 40 只雄性老龄 SD 大鼠,清洁级,月龄 > 18 个月,体重 280 ~ 340 g,由南京医科大学饲养中心提供,许可证号:SCXK(苏)2015-0004,独立送风隔离笼具系统(康为 IR60)饲养,动物饲养及手术环境温度控制在 20 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%。本实验

遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

2 药物 脑络欣通(黄芪 30 g 红花 10 g 三七 4 g 川芎 10 g 天麻 10 g 当归 10 g 蜈蚣 4 g)由安徽中医药大学门诊部提供,按上述所列用量比例将饮片用粉碎机制成药粉,煎药机煎煮,离心去滓,蒸发仪浓缩,冷冻干燥机(-45 °C, < 20 Pa)制冻干粉。通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号:110819)。

3 试剂及仪器 脂肪乳:由猪油 20 g、胆固醇 10 g、胆盐 2 g、吐温-80 20 mL、1,2-丙二醇 20 mL,加蒸馏水适量配制而成 100 mL。水合氯醛(分析纯)、胆固醇(分析纯)、胆盐(分析纯)、吐温-80(化学纯)、1,2-丙二醇(分析纯)、庆大霉素、葡萄糖注射液、阿托品、呋塞米等;纤维蛋白原降解产物(fibrin degradation products, FDP)试剂盒(批号:20140526)、D-D 试剂盒(批号:20140310)由南京建成生物工程研究所提供;凝血功能指标[凝血酶原时间(PT),凝血酶时间(TT),活化部分凝血活酶时间(APTT),纤维蛋白原(FBG)]试剂盒(批号:1011041)由四川迈克生物提供。

仪器:PeriFlux5000 激光多普勒仪(瑞典 Perimed 中国公司)、双极电凝器(CHR-Ⅲ型,北京东西仪科技有限公司)、常压低氧装置、动脉夹、开睑器、眼

科剪、游泳用塑料桶等。

4 线栓制法 将直径 0.20~0.25 mm 尼龙鱼线截成每根长为 50 mm,一端用蚊香火焰烧灼成圆钝(或头端蘸清漆,下垂自然晾干),镜下观察头端直径为(0.30±0.02)mm 者留用,并在距圆钝端 20 mm 处记号笔标记,然后在 25 mm 处打一结(以便于插线过程中调节方向和角度)。

5 动物模型制备

5.1 气虚血瘀证候复合因素模拟干预

5.1.1 饥饿因素模拟 大鼠平均每日饲料正常要求量为 186~374 g/kg,按照正常饮食量的 60% 提供饲料。动物称重,每日 8:00 给予全天量的 2/3,20:00 给予剩余 1/3 量。

5.1.2 疲劳因素模拟 实验大鼠每日 14:00 开始分批放入直径 60 cm、高 100 cm 水桶内[水深约 60 cm,水温保持为(37.0±0.5)℃],并以木棒拨打强迫其不断游泳,以消耗体力,每次 30 min。另外,动物饲养室保持全天 24 h 照明,以影响大鼠睡眠。

5.1.3 低氧因素模拟 将实验大鼠置于常压低氧装置(自制)内,外接氧气和氮气钢瓶。按 7.5 L/min 流量通入氮气稀释控制氧气浓度,用自动测氧仪调控氧气浓度至(10±0.5)%,二氧化碳传感器控制舱内二氧化碳维持在 0.03%。装置有一小孔与外界相通以确保舱内的常压状态,舱体由透明有机玻璃制成,可观察大鼠生命状态,每天进行 7 h^[5,6]。

5.1.4 肥甘厚味因素模拟 将特制的脂肪乳剂按 10 mL/kg 给实验大鼠灌胃。以上方法连续进行 10 天,然后进行气虚证评分,第 11 天起用线栓法制作 MCAO-R。

5.2 线栓法制作 MCAO-R 模型

5.2.1 激光多普勒仪动态检测局部脑血流量 运用激光多普勒仪,分别在造模过程中插线后 5 min、缺血再灌注 2 h 以及造模后 7 天、14 天监测大鼠局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)。选取手术侧梗死灶及其周边组织作为监测区域。将大鼠麻醉后俯卧,常规消毒沿颅骨正中偏右切开皮肤及皮下组织,钝性分离筋膜,暴露颅骨,定位头部右侧距矢状缝 2 mm,冠状缝前 1 mm 处,用生物胶将激光多普勒仪的探头座固定于此,安装连接探头,常规调试仪器和校零^[7]。

5.2.2 操作方法 参照 Longa EZ 等^[8]法并加以改良。麻醉大鼠;仰卧固定于消毒后木板,头部后方木板开一小孔,用以连接激光多普勒仪探头;钝性分离肌肉和筋膜,将开颅器放置于二腹肌和胸锁乳突肌之

间暴露视野;外科镊分离暴露颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,电凝颈外动脉分支(枕动脉和甲状腺上动脉),电凝颈内动脉分支翼腭动脉;把颈外动脉远心端结扎两处。动脉夹夹闭颈总动脉、颈内动脉。从颈外动脉两结扎处中间将其剪断,在颈外动脉近游离端斜剪一“V”形切口并快速插入栓线,此时在颈外动脉近游离端连同栓线一起结扎;调整角度和方向后继续将栓线插入颈内动脉约(18.0±0.5)mm;在切口下方,把颈内动脉与鱼线一起结扎。2 h 后拔出栓线少许(约 5 mm)造成缺血再灌注损伤。

手术过程中用激光多普勒仪监测缺血区局部脑血流量,再灌注之前局部脑血流量降低到开始水平的 70% 以上且同时满足以下条件方为“病证结合”模型制作成功:苏醒后(再灌注 2 h 后)神经功能缺损评分为 2~3 分,气虚证评分 10~20 分以及血瘀证评分 10~20 分^[9-12]。

6 气虚血瘀 MCAO-R 大鼠模型生物学特征评分标准 神经功能缺损评分(neural function defect score, NFDS):在大鼠术后苏醒后进行 NFDS,评分标准:(1)无神经功能缺损症状(0 分);(2)不能完全伸展对侧前爪(1 分);(3)行走时向对侧转圈(2 分);(4)站立或行走时向对侧倾倒(3 分);(5)不能自发行走,意识丧失(4 分);气虚证评分(Qi deficiency syndrome score, QDSS):根据大鼠气虚证辨证量表:(1)精神萎靡,四肢倦缩,活动性差(3 分);倦怠嗜睡,精神萎靡(5 分);对抗性行为减少或消失(7 分);(2)毛发干枯,失去光泽(3 分);毛发结穗打卷(5 分);毛发稀疏易落(7 分);(3)不思饮食,轻度大便稀溏(3 分);不思饮食,中度大便稀溏(5 分);不思饮食,重度大便稀溏或黄绿褐黏臭便(7 分);血瘀证评分(blood stasis syndrome score, BSSS):根据大鼠血瘀证辨证量表:(1)舌质黯淡(3 分);舌质绛紫(5 分);(2)眼球由鲜红色转为淡红(3 分);转为暗红(5 分);(3)尾部自尖至根部出现皮肤色泽暗淡(3 分);略显瘀紫(5 分);模型制作成功标准:(1)神经功能缺损评分 2~3 分;(2)气虚证评分 10~20 分;(3)血瘀证评分 10~20 分。

7 动物分组和给药 按随机数字表法分成正常组、模型组、脑络欣通组、通心络组,每组 10 只。模型组、脑络欣通组、通心络组大鼠按上述方法制作模型,符合成功标准者入选;脑络欣通配制浓度 80 mg/mL 溶液,通心络胶囊配制 30 mg/mL 溶液。依据课题组前期实验基础结合实验动物给药剂量标准,治疗组 and 对照组分别予上述药液按 1 mL/(100 g·d)灌胃(相

当于成人中等等效剂量的 7 倍)^[15],第 7 天常规取血、取脑。

8 检测指标及检测方法

8.1 TTC 染色测定脑梗死体积 取冰冻大脑,从其前脑在视交叉处由额极到枕极切成 2 mm 厚冠状脑片,连续切 5 片,置 1% TTC 溶液以锡箔纸盖严,37 ℃ 水浴锅中孵育 30 min。然后用 10% 甲醛缓冲液 4 ℃ 固定 24 h 后拍照,Image-ProPlus 6.0 软件分析计算脑梗死体积百分比。公式 $V = t(A_1 + A_2 + \cdots + A_n)$ 计算梗死体积和大脑体积(公式中 V:体积;t:脑片厚度;A:脑片总面积或梗死面积;n:脑片数)。梗死体积 = 梗死面积 × 厚度。相对梗死体积($V\%$) = 梗死体积/大脑体积 × 100%。

8.2 凝血 - 纤溶系统指标检测 ELISA 法检测血浆 FDP 和 D-D 含量,严格按试剂盒说明进行稀释、建立标准曲线、加样、温育、配液、洗涤、显色等步骤,在 450 nm 波长处测定各孔 OD 值;自动凝血仪检测 FBG、PT、APTT、TT,各指标检验操作严格按试剂盒说明书。

8.3 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM) 实验 参照参考文献[16] 象限和平台设置: Morris 实验用水池直径为 150 cm,高 45 cm,水深 32 cm (注入加墨汁自来水),在上缘等距离设置 4 个标记点作为大鼠的入水点,以这 4 个点在水面及水池底部位投影点将水池均分成 I、II、III、IV 4 个象限。大鼠躲避平台直径为 12 cm,高 30 cm,固定于第 II 象限,并隐藏于水面下 1.5 cm。定位航行实验 (place navigation test): 每只大鼠第一次实验前先将其置于平台上停留 10 s,每天将大鼠面向池壁从第 4 象限入水点放入水中 4 次,记录其从入水到寻找到隐藏在水面下平台的时间(即逃避潜伏期,escape latency, EL),如果在 120 s 内仍未找到平台,则人为引导其到平台,此时 EL 记为 120 s。空间探索实验 (spatial probe test): 撤去隐藏水面下的平台,以相同方法放大鼠入水,记录 120 s 内通过原平台所在位置次数(以下简称 Visits)。

9 统计学方法 数据统计分析和制图应用 SPSS 21.0、Graphpad 6.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,经正态性和方差齐性检验后,方差齐时用最小显著法(Least-significant Difference, LSD)进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 NFDS、QDSS 及 BSSS 比较(表 1)

与正常组比较,模型组 NFDS、QDSS 及 BSSS 明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组 NFDS、QDSS 及 BSSS 明显降低($P < 0.01$);脑络欣通组和通心络组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠 NFDS、QDSS 及 BSSS 比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NFDS	QDSS	BSSS
正常	8	0.00 ± 0.00	9.38 ± 1.19	7.13 ± 0.83
模型	8	2.75 ± 0.46 *	18.00 ± 0.76 *	18.88 ± 1.13 *
脑络欣通	8	1.50 ± 0.53 Δ	8.88 ± 1.25 Δ	10.63 ± 0.74 Δ
通心络	8	1.63 ± 0.52 Δ	8.88 ± 0.83 Δ	11.25 ± 1.28 Δ
F 值		53.124	152.120	188.379

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠脑梗死体积百分比比较(表 2) 与正常组比较,模型组大鼠脑梗死体积百分比明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组脑梗死体积百分比降低($P < 0.01$);脑络欣通组和通心络组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠脑梗死体积百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脑梗死体积百分比 (%)
正常	8	0.00 ± 0.00
模型	8	31.55 ± 2.25 *
脑络欣通	8	25.77 ± 2.12 Δ
通心络	8	26.96 ± 2.29 Δ
F 值		438.825

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较(表 3) 与正常组比较,模型组大鼠 EL 延长($P < 0.01$),Visits 减少($P < 0.05$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组 EL 显著缩短($P < 0.01$),脑络欣通组和通心络组 Visits 增加($P < 0.01$, $P < 0.05$);脑络欣通组和通心络组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

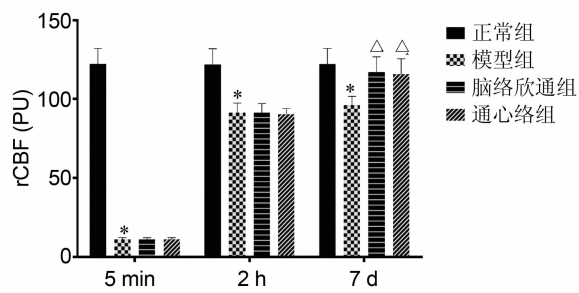
表 3 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EL (s)	Visits (次)
正常	8	60.90 ± 7.51	2.00 ± 1.07
模型	8	90.20 ± 8.36 **	0.50 ± 0.53 *
脑络欣通	8	74.33 ± 5.49 $\Delta\Delta$	2.13 ± 0.64 $\Delta\Delta$
通心络	8	69.40 ± 5.75 $\Delta\Delta$	1.88 ± 0.83 Δ
F 值		25.612	7.230

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 各组大鼠 rCBF 值比较(图 1) 与正常组比较,模型组大鼠在插线后 5 min、缺血再灌注 2h 和第 7 天 rCBF 明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,脑络欣通组和通心络组大鼠在插线后 5 min 和缺血再灌

注 2h rCBF 降低 ($P < 0.01$), 缺血再灌注第 7 天 rCBF 明显升高 ($P < 0.01$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

图 1 各组大鼠 rCBF 值比较

5 各组大鼠凝血及纤溶功能指标比较(表 4)
与正常组比较,模型组 PT、APTT 和 TT 均明显缩短,FBG、FDP 及 D-D 含量明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组 PT、APTT 均显著延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),FBG、FDP 及 D-D 含量明显降低 ($P < 0.01$);与脑络欣通组比较,通心络组 PT 延长 ($P < 0.01$)。

讨 论

脑组织能量储备极少,对缺血缺氧损害非常敏感
多项研究证实,脑缺血可导致不同程度神经功能障碍和空间学习记忆等认知功能降低^[17-19]。局灶性脑缺血发生后梗死部位脑组织会持续存在血液低灌注区,通过改善该区域的血液灌注量有利于改善恢复受损的神经功能^[20]和提高空间认知能力。

凝血纤溶系统中凝血指标 PT、APTT、TT、FBG、FDP、D-D 及局部脑血流量等指标等均是血液高凝状态、纤溶和血栓形成相关因素的标志,是脑缺血的病理生理改变的一个关键环节。

实验结果表明,在提高模型大鼠空间认知能力和改善受损神经功能作用上,恢复局部脑血流量是一个重要环节。同时可以看出,模型大鼠 PT、APTT 和 TT 较正常组均缩短、FBG、FDP 和 D-D 含量显著增加,说

明在脑缺血状态下凝血功能亢进,血液黏度增加,血栓形成的风险增大。实验结果显示,模型大鼠在激光多普勒仪检测下局部脑血流量低于正常组大鼠,神经功能缺损、脑梗死体积增大、空间认知功能降低,且凝血功能亢进,纤溶功能降低,这符合现代医学脑缺血的病理表现,说明脑缺血“病模型”复制成功;观察模型大鼠的中医证候,气虚证评分和血瘀证评分升高,有明显的气虚证和血瘀证表现,表明在同时结合中医多因素复合模拟干预下模型大鼠出现了气虚血瘀的“证模型”;同时,采用益气活血方药的干预,出现了以上相应指标的反应性改变,表明益气活血方药反证模型大鼠符合病证结合的表现;脑络欣通和通心络都能改善模型大鼠神经功能缺损,不同程度地恢复大鼠 rCBF,脑络欣通和通心络能改善空间认知能力,降低脑梗死体积,从而对脑缺血再灌注损伤起到保护作用;同时可以调节模型大鼠凝血和纤溶功能,PT、APTT 和 TT 较模型大鼠显著延长,FBG、FDP 和 D-D 水平较模型大鼠明显降低,说明脑络欣通可以起到改善和调整凝血纤溶功能的作用;同时能降低模型大鼠气虚证和血瘀证评分,说明通过益气活血方法干预可以改善模型大鼠气虚血瘀的证候表现。综上所述,通过现代医学相关宏观和微观指标的观察并结合益气活血方药反证的方法可证明线栓法结合中医多因素复合模拟的方法成功制备了脑缺血气虚血瘀证病证结合的动物模型。

该模型已先后应用于血液流变学、凝血纤溶功能、炎症反应、兴奋性氨基酸及中医药干预作用的研究。通过对一般体征、rCBF、脑水肿、炎症因子等结合宏观观察,发现该模型符合缺血性中风气虚血瘀证特点及现代医学脑缺血病理变化规律。同时,课题组一直致力于中药复方对模型作用机制的研究,已从凝血纤溶系统、自由基、兴奋性氨基酸、细胞凋亡、神经可塑性、神经-血管再生机制等多方面进行了系列研究,得到业内的肯定和广泛采用^[21-25]。通过对模型的系统研究,探讨病证结合的实质和特点,确立中医药的临床使用规范,中医药学实验研究与临床观察有机地结合,促使中医药的研究有所突破,更加客观化、

表 4 各组大鼠凝血及纤溶功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	FBG(g/L)	FDP(μg/mL)	D - D(mg/L)
正常	8	12.32 ± 0.68	22.61 ± 2.36	38.11 ± 7.11	2.34 ± 0.30	1.853 ± 0.074	0.423 ± 0.022
模型	8	8.59 ± 0.68**	17.93 ± 1.79**	31.21 ± 4.83*	2.73 ± 0.21**	4.300 ± 0.311**	0.617 ± 0.044**
脑络欣通	8	11.28 ± 0.81 ^{△△}	22.05 ± 4.93 [△]	36.56 ± 4.55	2.36 ± 0.15 ^{△△}	1.828 ± 0.070 ^{△△}	0.423 ± 0.028 ^{△△}
通心络	8	12.73 ± 0.76 ^{△△▲}	23.85 ± 2.64 ^{△△}	36.58 ± 4.30	2.20 ± 0.15 ^{△△}	1.770 ± 0.094 ^{△△}	0.414 ± 0.030 ^{△△}
F 值		51.753	5.270	2.592	9.418	427.007	74.919

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与脑络欣通组比较,[▲] $P < 0.01$

标准化及系统化。在模型复制过程中,要深入思考病证结合的切入点,确立相应的中医学理论依据。根据中医学“气为血之帅”的理论,结合“宗气”的生成原理,在中医学病因病机上进行多因素复合模拟,再加之低氧环境模拟不能吸入足够“自然界清气”,则宗气不能生成,故而最终导致气虚血瘀证候的出现。这符合中医学的气虚血瘀病因病机理论。

随着以基因芯片为代表的高效、精确的分子生物学检测技术的不断涌现,也给模型评价体系构建提供了新思路和新方法。通过研究证与基因多态性之间的内在联系,从基因多态性所带来的基因功能上的变化,最终把证候表现落实在相关基因表达谱上。这种将中医学宏观辨证与基因水平微观辨证相结合的结果都落实建立在证的基因表达谱上,将更有利于建立中医气虚血瘀证脑缺血动物模型的评价标准的准确性、可控制性和重复性。

参 考 文 献

- [1] Hill NC, Millikan CH, Wakim KG, et al. Studies in cerebrovascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot; preliminary report [J]. Proc Staff Meet, 1955, 30(26): 625-633.
- [2] Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, et al. An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats [J]. Stroke, 1982, 13(4): 505-508.
- [3] Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(8): 1412-1431.
- [4] 胡建鹏,程红,邵峦,等.中风病“气虚血瘀”病因病机探析[J].安徽中医学院学报,2006,25(2):1-4.
- [5] Nakajima W, Ishida A, Takada G. Anoxic and hypoxic immature rat model for measurement of monoamine using in vivo microdialysis [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 1999, 3(3): 252-257.
- [6] 胡定煜,李淳,戴荣继,等.常压低氧下 Wistar 大鼠脑组织中 HIF-1 α 表达与脑损伤 [J]. 化学通报, 2010, (11): 1030-1034.
- [7] Du Y, Shi L, Li J, et al. Angiogenesis and improved cerebral blood flow in the ischemic boundary area were detected after electroacupuncture treatment to rats with ischemic stroke [J]. Neurol Res, 2011, 33(1): 101-107.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 王世全,余良,郭宁,等.白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺

- 血再灌注的治疗作用 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(16): 3057-3059.
- [10] 米海霞,张通,缪培,等.早期运动训练对大鼠局灶性脑缺血后运动功能及磁共振弥散张量成像的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(1): 1-7.
- [11] 邓铁涛,李慧德主编.中医证候规范 [M]. 广州:广东科技出版社,1990:145-147.
- [12] 匡调元,王庆其主编.中医证候病理学 [M]. 上海:上海科学普及出版社,1995:89.
- [13] 王键,景珩.脑络欣通影响气虚血瘀证脑缺血-再灌注模型大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(5): 26-29.
- [14] 胡建鹏,李净,邵峦,等.益气活血方对气虚血瘀证脑缺血再灌注损伤大鼠 Fas、FasL 蛋白表达的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2004, 23(2): 35-37.
- [15] 王键,谭辉,胡建鹏,等.脑络欣通对大鼠中动脉闭塞缺血再灌注损伤模型大鼠空间认知功能和局部脑血流量的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(8): 687-690.
- [16] Du J, Ma M, Zhao Q, et al. Mitochondrial bioenergetic deficits in the hippocampi of rats with chronic ischemia-induced vascular dementia [J]. Neuroscience, 2013, 231: 345-352.
- [17] Sun HS, Feng ZP. Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(1): 24-32.
- [18] 刘妍君,雒扬,滕庆兰.缺血性脑血管病导致认知障碍的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17(24): 3092-3095.
- [19] 蔡青,黄淑芸,谭俊珍,等.丹参酮 B 钠盐对脑缺血再灌注损伤大鼠海马不同亚区 NMDAR1 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(8): 1073-1076.
- [20] 吴光勇,李亮,廖达光,等. Apelin-13 对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(9): 1335-1339.
- [21] 李净,李小亮,胡建鹏,等.脑络欣通对气虚血瘀证脑缺血再灌注损伤大鼠一氧化氮和神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药科技, 2007, 14(4): 247-248.
- [22] 胡建鹏,周会,王键,等.益气活血方和补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带 Notch-1 和 Jagged1 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 483-486.
- [23] 侯晞,梁枫,李爱剑,等.银杏叶提取物联合依达拉奉对气虚血瘀型脑缺血/再灌注大鼠血液学的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(8): 1049-1053.
- [24] 张允岭,张锦,扈新刚,等.制作缺血性中风气虚血瘀证大鼠模型的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(4): 343-346.
- [25] 邱乐,王新生,刘擎.益气活血法改善缺血性脑卒中急性期大鼠微循环障碍的机制 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(11): 2323-2325.

(收稿:2017-02-15 在线:2018-01-09)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶