

络气郁滞证大鼠动物模型的建立和评价

吴相春^{1,2}, 来静³, 吴以岭^{1*}, 贾振华¹, 王洪涛¹, 张秋艳¹

(1. 河北中西医结合医药研究院, 河北石家庄 050035; 2. 河北以岭医院, 河北石家庄 050091; 3. 河北省石家庄市三院 050017)

摘要:目的 建立络气郁滞证大鼠动物模型并进行评价。方法 对大鼠慢性束缚 6周建立络气郁滞证模型, 观察模型大鼠的精神、饮食量、体质量、蔗糖水摄取量, 血清皮质酮(CORT)、血浆内皮素(ET)、血清 5-羟色胺(5-HT)、NO以及主动脉组织内皮细胞超微结构的变化。结果 络气郁滞证模型表现为精神萎靡, 反应迟钝, 摄食量减少, 体质量增长缓慢, 蔗糖水摄取量、摄食量及体重均明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 模型组大鼠血浆 ET升高、血清 CORT升高, 5-HT、NO降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 内皮细胞超微结构发生明显改变。结论 利用慢性束缚法 6周, 通过观测大鼠体质量、摄食量、蔗糖水摄取量、CORT、ET、NO、5-HT的变化, 初步建立络气郁滞证大鼠动物模型, 制作方法简单, 评价指标客观, 为脉络血管系统病的研究提供良好的实验基础。

关键词: 络气郁滞证; 动物模型

中图分类号: R2-03 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2010)03-0734-02

Establishment and Evaluation of Rat Animal Model with Collateral Qi Stasis

WU Xiangchun², LAI Jing³, WU Yiling^{1*}, JIA Zhenhua¹, WANG Hongtao¹, ZHANG Qiuyan¹

(1. Department of Collateral Theory Combination of TCM with Western Medicine Academy of Heibei Shijiazhuang 050035, China; 2. Hebei Yiling Hospital, Shijiazhuang 050091, China; 3. The Third Hospital of Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To establish and evaluate the rat animal model with collateral qi stasis. Methods To establish animal model with collateral qi stasis in 6 weeks by chronic constraint. To observe the changes of consciousness, appetite, body weight, the intake of cane sugar water and the levels of CORT, ET, NO, 5-HT. The ultrastructure change of aorta was observed by transmission electron microscope. Results The animal model rats showed depression, dull, no appetite, increasing slow of body weight, the cane sugar water intake was lowered significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the levels of CORT, HCY, ET were increased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and the levels of 5-HT, NO were lowered significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The ultrastructure of aorta changed obviously. Conclusion The animal model with collateral qi stasis is established with chronic constraint. The method has been succeed through observation the changes of body weight, cane sugar water intake, appetite, CORT, ET, NO, 5-HT and ultrastructure of aorta. The method is easy and the evaluated indexes are objective, which provide the good experiment foundation for the study of vessel-collateral and vascular system disorders.

Key words: Stasis of collateral qi; Animal model

络气郁滞、络气虚滞引起的络脉自稳状态功能异常与血管内皮功能障碍具有内在一致性, 均为“脉络—血管系统病”的始动因素并贯穿病变全过程, 成为运用络病理论研究血管病变的切入点^[1]。高同型半胱氨酸血症是内皮功能障碍的独立危险因素, 而应激是引起高同型半胱氨酸血症的主要原因。我们以慢性束缚法建立络气郁滞证大鼠动物模型, 进行络气郁滞证候的研究。

1 材料与仪器

1.1 动物及分组 健康雄性 Wistar 大鼠 20 只, 体质量 200~230 g 购于北京维通利华实验动物中心, 大鼠 5 只/笼, 饲养在河北以岭医药研究院药理实验室, 按体重随机分为两组, 即正常对照组和络气郁滞模型组。正常饲料饮食。

1.2 仪器 束缚盒: 参照朱清静等^[2]、唐已婷等^[3]方法选择合适的大鼠固定盒, 该筒呈管状, 长约 25 cm, 筒口外径 7 cm, 内径 5 cm, 筒内前端置一直径小于筒的内径, 并可以前后调节的圆嘴的塑料口, 其口为通气口, 后端为开关闸门。尾悬挂架由大鼠实验架改装而成。

2 方法

2.1 动物造模方法 络气郁滞模型组: 参照吴淑庆等^[4,5]的方法, 实验开始时即给予束缚法, 将大鼠放入束缚盒内, 调节前端活动部位到合适的位置, 使大鼠不产生强烈反抗的紧张程度。每天 6 h (9:00~15:00), 连续 6 周。

2.2 观察指标

2.2.1 行为学观察 ① 一般情况的监测: 称每日摄食量, 最后计算总摄食量; 每周记录体质量 1 次; 观察模型动物精神、活动情况等。② 尾悬挂: 参照唐已婷等^[3]的方法, 于实验末测定不动时间、挣扎次数。③ 1% 蔗糖水摄取量测定: 参照熊振芳等^[6]、金光亮等^[7]的方法, 在实验前先对所有的大鼠进行 1% 蔗糖水摄取训练, 即先用蔗糖水喂养 48 h 随后断水 24 h 再于晨 8~9 时的 1 h 内测量每只大鼠摄取蔗糖水的量, 以此作为每只大鼠蔗糖水摄取量的基线, 在实验末于晨 8~9 时测 1 h 内的蔗糖水摄取量。

2.2.2 内皮功能的检测 采用硝酸还原酶法检测血清 NO 含量, 试剂盒由南京建成生物试剂公司提供。放免法检测血浆 ET 含

收稿日期: 2009-06-17 修订日期: 2009-09-22

基金项目: 国家“973”重点基础研究发展计划 (No. 2005CB523301)

作者简介: 吴相春 (1973-) 男 (汉族), 河北故城人, 现任河北中西医结合医药研究院副主任医师, 在读博士研究生, 硕士学位, 主要从事络病理论基础及临床研究工作。

* 通讯作者简介: 吴以岭 (1949-) 男 (汉族), 河北故城人, 现任河北中西医结合医药研究院主任医师, 教授, 硕士学位, 主要从事络病理论基础及临床研究工作。

量,试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供。

2.2.3 神经递质的测定 放免法测定皮质酮(CORT),试剂盒由北京北方生物技术研究所提供;酶法测定五羟色胺(5-HT),试剂盒由 RAp iB iO Lab Califonia USA 提供。

2.2.4 循环酶法测定血清同型半胱氨酸(HCY)试剂盒由北京九强生物技术有限公司提供。

2.2.5 主动脉组织内皮细胞超微结构 实验结束后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉,颈总动脉取血后,仔细分离并截取一小段胸主动脉,迅速浸入电镜液中,修成 1 mm×1 mm×1 mm大小组织块,置 4%戊二醛固定液中 4℃保存(由河北医科大学基础医学院电镜室协助完成)。

2.3 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 统计软件包进行 检验分析。

3 结果

3.1 大鼠行为学结果

3.1.1 精神 初期络气郁滞模型组大鼠表现为打斗、撕咬、尖叫等情绪过激行为,随着造模时间的推移,上述过激行为逐渐减少,精神萎靡,胡须下垂,贴边,扎堆,反应迟钝,毛色失去光泽。

3.1.2 日摄食量和总摄食量的变化 分别选择第 10、30、40 天的日摄食量和总摄食量进行比较,络气郁滞组低于正常对照组,具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1

表 1 两组大鼠摄食量的比较($\bar{x} \pm s$) g

组别	第 10 天	第 30 天	第 40 天	总饮水量
正常	25.10±2.23	21.20±2.26	24.65±2.53	989.65±26.30
络气郁滞	22.07±2.49*	18.23±4.86	20.55±3.76*	825.67±82.34**

与正常组比较,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3.1.3 两组大鼠体重变化 两组大鼠体重在实验前未见有明显差异;在实验末,络气郁滞组(317.18±28.69)g 低于对照组(361.80±31.33)g 有显著性差异($P < 0.01$)。

3.1.4 1%蔗糖水摄取量的变化 实验前两组 1%蔗糖水摄取量无明显差异;实验末络气郁滞组较正常组显著降低,有显著性差异($P < 0.01$)。见表 2

表 2 实验前后两组蔗糖水摄取量的变化比较($\bar{x} \pm s$) g

组别	实验前蔗糖水	实验末蔗糖水
正常	15.22±4.14	21.00±1.47
络气郁滞	14.30±1.79	13.82±2.71**

与正常组比较,** $P < 0.01$ $n=10$

3.1.5 尾悬挂实验 络气郁滞组较对照组不动时间明显增加,挣扎次数明显减少,具有显著性差异($P < 0.01$)。见表 3

表 3 两组之间大鼠尾悬挂实验比较($\bar{x} \pm s$)

组别	不动时间 /s	挣扎次数
正常	99.30±23.57	78.00±19.22
络气郁滞	148.86±28.98**	48.00±18.78**

与正常组比较,** $P < 0.01$ $n=10$

3.2 血清 HCY 的变化 络气郁滞组血清 HCY 水平(12.72±1.33) $\mu\text{mol/L}$ 较正常组(10.18±1.68) $\mu\text{mol/L}$ 显著增高,具有统计学差异($P < 0.01$)。

3.3 大鼠血清 5-HT、CORT 的变化 络气郁滞组 5-HT 较正常组明显下降,CORT 明显增高,有显著性差异($P < 0.01$)。见表 4

表 4 两组之间 5-HT、CORT 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	5-HT	CORT
正常	346.27±67.72	25.01±1.83
络气郁滞	248.51±78.94**	29.08±2.09**

与正常组比较,** $P < 0.01$ $n=10$

3.4 大鼠内皮功能的变化 络气郁滞组较正常组 ET 增高,NO 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 5

表 5 两组间 ET、NO 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ET/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	142.91±8.72	45.22±12.42
络气郁滞	163.19±24.74*	25.68±10.92**

与正常组比较,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $n=10$

3.5 主动脉组织超微结构改变 正常对照组血管内皮细胞形态规则,连接紧密,基底膜完整,细胞核及细胞器存在,线粒体结构无异常。络气郁滞组,内皮细胞线粒体大部分嵴和部分膜融合或消失,粗面内质网扩张,脱颗粒明显,吞饮小泡数量明显减少。

4 讨论

大量研究资料表明,应激在心血管发病机制中起着重要作用。高同型半胱氨酸血症是内皮功能障碍的独立危险因素,而应激是引起高同型半胱氨酸血症的重要原因^[8],Allan 等用模拟心理应激的束缚应激持续 1 h 可显著升高大鼠血浆 HCY 水平,但游泳和冷刺激虽然都能导致 HPA 轴的激活,但不能升高大鼠血浆 HCY 的水平^[9]。有研究证实知识分子血浆同型半胱氨酸水平普遍增高^[10]。本研究采用慢性束缚应激方法建立络气郁滞证动物模型,结果显示,络气郁滞证大鼠日摄食量明显减少,体质量增长缓慢,尾悬挂实验不动时间延长,挣扎次数减少,蔗糖水摄取量减少;模型大鼠应激激素 CORT 水平升高,使 HPA 轴兴奋;模型大鼠 5-HT 降低;ET 增高,NO 明显下降,血清 HCY 增高,主动脉组织内皮细胞超微结构发生明显改变。表明慢性束缚可明显影响动物的摄食量、体质量及行为学的改变,损伤血管内皮功能,显示出络气郁滞证候因素可以造成血管内皮的损伤,是导致血管内皮功能障碍的重要危险因素,在血管病变发生发展过程中发挥重要作用。

本研究结合相关疾病(内皮功能障碍)和相关证(络气郁滞)的现代认识,初步建立了基本符合中医络病理论的络气郁滞证大鼠动物模型,以摄食量、体质量、蔗糖水摄取量、尾悬挂试验、CORT、5-HT、ET、NO 等作为评价指标,制作方法简单,评价指标客观,为络脉-血管系统病的研究提供实验基础。

参考文献:

- [1] 吴以岭.“络脉-血管系统病”新概念及其治疗探讨[J]. 疑难病杂志, 2005, 4(5): 285.
- [2] 朱清静, 罗欣拉, 熊振芳, 柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节作用[J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(13): 7.
- [3] 唐已婷, 陈家旭. 三种中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(3): 23.
- [4] 吴淑庆, 钱令嘉. 应激大鼠血浆同型半胱氨酸水平的变化及其对心功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3): 137.
- [5] 吴淑庆, 钱令嘉. 应激对同型半胱氨酸代谢的负性调节[J]. 生理学报, 2004, 56(4): 521.
- [6] 熊振芳, 朱清静, 柴胡疏肝散对慢性束缚应激性肝郁证大鼠的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(4): 220.
- [7] 金光亮, 南 睿, 郭露珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(2): 18.
- [8] 刘 卫, 钱令嘉. 同型半胱氨酸与抑郁[J]. 国际精神病学杂志, 2006, 33(1): 45.
- [9] Oliveira AC, Suchecki D, Cohen S, et al. Acute stressor selective effect on total plasma homocysteine concentration in rats[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2004, 77(2): 69.
- [10] 侯 玥, 程义勇, 王冬兰. 138 名知识分子血清同型半胱氨酸水平及其影响因素调查研究[J]. 营养学报, 2005, 27(6): 452.