

## 寒凝血瘀证动物模型研究现状

宋晓丹<sup>1</sup>, 成秀梅<sup>1,2\*</sup>, 周湘<sup>1</sup>, 白素芬<sup>1,3</sup>, 李新华<sup>1</sup>

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室, 石家庄 050091;  
3. 华北理工大学, 河北唐山 063210)

**[摘要]** 寒凝血瘀证是临床常见中医证型,寒凝血瘀证动物模型是探索中医寒凝血瘀证候实质的基础,是后续开展中医临床研究的前提。该文对近年寒凝血瘀证动物模型的建立方法、理论支撑及评价方法进行归纳总结,并对不同模型的优缺点进行分析。目前,寒凝血瘀证动物模型制备思路主要有病因造模、病因病理复合造模和病证结合造模3种。病因模型的制备主要采用冷暴露方法,根据寒冷的施加方法不同分为全身冷冻法、冰水浴法和局部冻伤法等;病因病理复合模型以寒冷刺激结合肾上腺素注射为主;常见的寒凝血瘀证病证结合模型有寒凝血瘀证冠状动脉粥样硬化性心脏病模型、寒凝血瘀证原发性痛经模型、寒凝血瘀证子宫内膜异位症模型、寒凝血瘀证动脉硬化闭塞症模型等。三大模型各具优势又各有不足,其中病证结合模型与临床实际的吻合度更高,可靠性和实用性更强,但此类模型的疾病种类较集中且病证结合方式存在争议。寒凝血瘀证模型的评价指标主要包括寒凝血瘀证表征评价,以及与血流状态有关的理化指标,如血液流变学、凝血功能、微循环等指标,也有学者从血管舒缩功能、内分泌、能量代谢等方面进行探索,现阶段的模型评价方法客观性和特异性均有待完善。寒凝血瘀证动物模型的研究应以临床实际为基础,以临床需求为导向,只有建立与临床病证特点高度吻合的动物模型才能更好地揭示寒凝血瘀证本质,推动中医药的现代化发展。

**[关键词]** 寒凝血瘀证; 证候模型; 病证结合动物模型; 模型评价

**[中图分类号]** R242;R856.2;R965.1; **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0267-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221593

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220321.1444.016.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-22 11:39

### Animal Model of Cold Congeal and Blood Stasis Syndrome: A Review

SONG Xiaodan<sup>1</sup>, CHENG Xiumei<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Xiang<sup>1</sup>, BAI Sufen<sup>1,3</sup>, LI Xinhua<sup>1</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;  
2. Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-kidney Patterns, Shijiazhuang 050091, China;  
3. North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China)

**[Abstract]** The cold congeal and blood stasis syndrome is a common clinical traditional Chinese medicine (TCM) syndrome. The animal model of cold ongeal and blood stasis syndrome is the basis for exploring the essence of TCM cold congeal and blood stasis syndrome, and the premise of follow-up TCM clinical research. This paper summarized the preparation method, theoretical support, and evaluation method of animal models of cold congeal and blood stasis syndrome in recent years and analysed the strengthens and weaknesses of different models. At present, the common animal models of cold congeal and blood stasis syndrome mainly include etiological model, etiological and pathological composite model and disease-syndrome combination model. The etiological model was mainly prepared by cold exposure, which could be divided into

**[收稿日期]** 2021-09-05

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82174426);河北省自然科学基金面上项目(H2021423020);河北省在读研究生创新能力培养资助项目(CXZZBS2022098);河北省教育厅重点项目(ZD2018035);河北中医学院科研能力提升重点项目(KTZ2019003)

**[第一作者]** 宋晓丹,在读博士,从事月经病寒证生物学基础及中药干预研究, Tel: 0311-89926290, E-mail: 1018450965@qq.com

**[通信作者]** \*成秀梅,博士生导师,从事月经病寒证生物学基础及中药干预研究, Tel: 0311-89926290, E-mail: xiumeicheng123@126.com

whole-body freezing, ice bath and local frostbite. The etiological and pathological composite model was mainly prepared by cold stimulation combined with epinephrine injection. The common disease-syndrome combination models included the coronary heart disease model of cold congeal and blood stasis syndrome, primary dysmenorrhea model of cold congeal and blood stasis syndrome, endometriosis model of cold congeal and blood stasis syndrome, and arteriosclerosis obliterans model of cold congeal and blood stasis syndrome. The three models have both advantages and disadvantages. Specifically, the disease-syndrome combination model had the highest consistency with clinical practice and was more reliable and practical. However, the disease types of this model were specific, and the combination method of disease and syndrome was controversial. The evaluation indicators of the animal models of cold congeal and blood stasis syndrome focused on the characterization of the syndrome and the physico-chemical indicators related to blood flow, such as blood rheology, coagulation function and microcirculation. In addition, some scholars explored the evaluation indicators from the aspects of vasomotor function, endocrine and energy metabolism. The objectivity and specificity of the current model evaluation methods needed to be further improved. The research of animal model of cold congeal and blood stasis syndrome should be based on clinical practice and oriented by clinical demand. Only by establishing animal models that are highly consistent with the characteristics of clinical disease and syndrome can we better reveal the essence of cold congeal and blood stasis syndrome and promote the modernization of TCM.

**[Keywords]** cold congeal and blood stasis syndrome; syndrome model; disease-syndrome combination animal model; model evaluation

寒凝血瘀证是血瘀证常见的辨证分型,临床常表现为畏寒冷痛,得温痛减,肢冷色青,妇女月经后期、痛经、经色紫暗夹块,以及苍白,脉沉迟且涩<sup>[1]</sup>。寒凝血瘀证的形成与环境、饮食、生活习惯等因素密切相关,久居寒地、喜食寒凉、冒雨涉水等均易引发寒凝血瘀证相关疾病。寒凝血瘀证的“血瘀”状态多由“寒凝”导致,寒为阴邪,性凝滞主收引,留于机体易伤阳气,挛缩脉道,阻滞经络,凝结气血,导致血行迟滞发为血瘀。目前常用的寒凝血瘀证动物模型有中医病因模型、中西医结合病因病理复合模型和病证结合模型3种。寒凝血瘀证动物模型的构建,有助于深入探索寒凝血瘀证的致病机制,推动相关中医药研发与疗效判定的发展,为相关疾病的治疗提供可靠依据。本文即对近年寒凝血瘀证动物模型的建立方法、理论支撑及评价方法进行总结分析,旨在为今后的研究提供思路。

## 1 中医病因模型

**1.1 全身冷冻法** 《黄帝内经·素问·八正神明论》云“天寒日阴,则人血凝泣而卫气沉。”《黄帝内经·素问·离合真邪论》曰“天寒地冻,则经水凝泣。”均阐明若天寒地冻,寒邪侵袭机体,则血气涩滞不畅。全身冷冻法即将机体全部暴露于寒冷空气中以模拟人在寒冷环境中的状态。赵珊珊等<sup>[2]</sup>将SD大鼠置于-20℃的冰柜中持续受冻1h,待大鼠出现寒凝血瘀症状时将大鼠脱离冷环境,每日1次,持续

14d。结果表明,模型组大鼠血液流变学指标升高,内皮素(ET)升高,一氧化氮(NO)、肾上腺素(ADR)及促甲状腺素(TSH)含量降低。其从体征、微循环障碍、血管舒缩功能和内皮功能受损及内分泌功能紊乱等方面佐证寒凝血瘀证模型成功。雷春红等<sup>[3]</sup>采用将大鼠置于(-10±2)℃冰柜,并在冰柜中放置含氮氧混合气体的气袋缓慢放气的方法以模拟寒冷地区低温,每日冷冻1次,每次1h,持续5d。发现大鼠冷冻后不仅具有寒凝血瘀证症状,还出现胃黏膜微循环血流量减少及病理损伤等表现,且损伤可能同胃黏膜ET-1和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的增加有关。全身冷冻法倾向于模拟北方严寒环境对人体的影响,其单次最佳造模时期应在兴奋减弱期,此时机体经历了兴奋增强期,已失代偿能力,容易导致瘀血现象<sup>[4]</sup>。全身冷冻法总造模时间也应重点把握,造模天数太短,不仅不能导致血瘀证,还可见内分泌系统的应激反应,使反映寒热性的内分泌指标含量升高,而造模时日过长,则可使血液流变学等指标趋于正常<sup>[5]</sup>。

**1.2 局部冻伤法** 本法通过局部冷冻刺激交感神经兴奋,引起血管反射性收缩、微血管舒缩功能障碍、局部血流减少、血管壁损伤等病理变化,导致局部或全身血液出现“浓、黏、凝、聚”特征<sup>[6]</sup>。刘华朋等<sup>[7]</sup>将冰袋固定在家兔后背处连续21d,每日1h建立寒凝血瘀证模型。模型家兔出现精神萎靡、反应

迟钝、被毛无光、大便稀溏等体征；微循环、血液流变学和凝血象等检测显示肉眼微血管管径变细、弯曲，管祥增多，血流减缓，全血黏度升高，纤维蛋白原含量增加，表明寒凝血瘀证造模成功。朱成慧等<sup>[8]</sup>采用将冰袋固定在家兔大椎穴与至阳穴之间连续10 d，每日1 h的方法造模。以家兔出现寒凝血瘀证体征，结合前期实验中血液黏度、纤维蛋白原含量升高判定模型制备成功。上述研究均选择了家兔背部进行干预，中医阴阳学说认为腹为阴而背为阳，背部督脉又为阳脉之海，统领一身之阳，督脉阳气受损，推动温煦功能减弱，则易导致血为寒凝，运行迟滞。在高寒地区或寒冷的冬天局部冻伤是造成血瘀的常见因素之一，但局部冻伤法以局部症状表现为主，其全身反应主要是血液流变异常，而临床上因局部冻伤导致重要脏器发病并不多见，故应考虑该模型与临床实际发病的贴合度<sup>[6,9]</sup>。

**1.3 冰水浴法** 冰水浴法在突出“寒”的同时强调了“水”“湿”。吴鞠通认为“湿水同类”，《黄帝内经·素问·调经论》云：“寒湿之中人也，皮肤不收，肌肉坚紧，营血泣，卫气去。”寒、湿二邪均属外感六淫范畴，同属阴邪，二者相和，重浊凝滞，相兼致病最易损人阳气，使气血营卫涩滞不畅。王迪等<sup>[10-11]</sup>将SD大鼠置于0~1℃冰水中浸泡，每次20 min，每天1次，持续21 d制备寒凝血瘀证模型。模型大鼠寒凝血瘀证征明显，动情周期紊乱，血清生殖激素水平降低，血液流变学指标异常升高，耳廓和子宫表面微循环血流量明显减少，卵巢ET-1、内皮素受体A(ET-AR)含量增加，血清和卵巢NO含量降低。表明寒凝血瘀证大鼠的生殖系统和微循环发生障碍。董娟妮等<sup>[12-13]</sup>利用此法造模，以模型大鼠出现寒凝血瘀表征，全血黏度和血浆黏度升高作为模型制备成功的依据。通过检测大鼠血浆、五脏及脑组织中能量代谢指标含量，发现寒凝血瘀证大鼠能量代谢发生障碍。冰水浴法虽为单因素造模方法，却结合了“寒”“湿”两类阴邪，尤其模拟了女性妇科病寒凝血瘀证的发生机制，女性的身体构造和生理特点使其更容易遭受阴邪袭扰，冒雨涉水尤其经期接触冷水常会导致生殖系统功能发生紊乱<sup>[14]</sup>。冰水浴法同全身冷冻法均需掌握刺激时间，造模时间过短，可见血液流变学指标的改善，而时间过长则会使动物出现适应性反应，各项指标趋于正常<sup>[15]</sup>。

寒凝血瘀证的病因模型基于“寒邪客于经络之中，则血泣，血泣则不通”“寒独留，则血凝泣，凝则脉不通”“血受寒则凝结成块”，血得温则行，得寒则

凝，利用寒邪或寒邪兼夹其他阴邪诱导动物产生寒凝血瘀证表征，并用临床上与证候相关理化指标进行验证。模型结合了中医基础理论及临床相关生理生化指标，方法简单，可操作性强。但同时存在一些问题，如刺激因素的干预时间、温度、冰水浴水位深浅、动物出水后是否给与擦拭及烘干等均无统一标准，导致模型重复性差。在造模方法上中医病因多是证候的诱发因素，二者之间的因果关系不甚明确，一种证候可能由多种病因独立或相兼引起，一种病因又可能会导致多种证候<sup>[16]</sup>，如寒邪易伤阳气，阳气虚损则温煦功能减退，故此法造模也可能出现阳虚症状，因此病因模型可靠性有待进一步验证。

## 2 病因病理复合模型

目前寒凝血瘀证病因病理复合造模方法多采用肾上腺素联合冰水浴法。肾上腺素是血小板聚集的强诱导剂，大剂量肾上腺素注射可使血小板聚集，并导致血管收缩、外周阻力增加等异常表现，同时施以冰水刺激仿照寒邪入侵，二者共同作用导致机体出现寒凝血瘀证表现，引发机体血液流变学、微循环等方面的病理变化，造成寒凝血瘀证模型<sup>[17-18]</sup>。李凤金等<sup>[19]</sup>将SD大鼠置于0~1℃冰水中，待大鼠全身僵直后取出，每日1次，连续14 d，第15天始隔日大鼠皮下注射0.8 g·kg<sup>-1</sup>盐酸肾上腺素2次，给药间隔4 h，2次给药间将大鼠置于冰水中，共造模4周。造模结束后，大鼠出现弓背立毛、毛发枯槁、进食减少等体征，且出现全血黏度、血浆黏度升高，血清NO含量降低，ET-1含量升高等表现。周世卿等<sup>[20]</sup>采用皮下注射盐酸肾上腺素联合冰水游泳的方法复制了寒凝血瘀证裸小鼠模型，模型小鼠身体形态、精神状况、皮肤色泽及二便等均与寒凝血瘀证表现相符，尾出血时间、凝血时间缩短又与血瘀证血液“凝”“聚”的特点相符，由此判定模型制备成功。ZHANG等<sup>[21]</sup>通过本法造模，模型组大鼠血液流变学、凝血功能和血小板聚集率等指标均显示异常，随后利用基因芯片技术对大鼠基因表达进行鉴定，实时荧光定量聚合酶链式反应对基因芯片技术的检测结果进行验证，发现寒凝血瘀证大鼠外周血有多种基因表达差异。

肾上腺素联合冰水浴造模方法虽然结合了西医病理造模，但其造模原理同样与中医基础理论相关，《黄帝内经·灵枢》中有“怒则气上逆，胸中蓄积，血气逆留……血脉不行”的阐述，气为血之帅，气畅则血行，机体在暴怒时易造成气机不畅，导致血液停滞，注射肾上腺素模拟了机体暴怒时分泌大量

肾上腺素,导致血瘀证病理损伤<sup>[17,22]</sup>。在寒邪病因基础上叠加情志导致的西医病理学变化,既能使动物出现寒凝血瘀表征,又提高了模型动物血液流变学、凝血功能、微循环等指标与临床病理变化相符的机率,模型制备方法可靠性、稳定性、重复性均较强,此法常作为急性血瘀证模型的制备方法<sup>[23-26]</sup>。然而,虽然病因病理复合模型导致的结局指标与证型临床表现吻合度更高,但其难以体现寒凝血瘀证实质和动态发展过程。且暴怒导致的气机不畅、血液瘀滞与寒凝血瘀证的“血瘀”关联度并不大,用肾上腺素模拟机体的“暴怒”状态也常被用作气滞血瘀动物模型的制备<sup>[27]</sup>,因此不排除肾上腺素注射也会导致其他临床证候表现。

### 3 病证结合模型

证候是疾病过程中某一阶段与机体有本质联系的反应状态,二者具有不可割裂性。病证结合动物模型能更好地反映证候动态性、阶段性属性,也更具有实用性<sup>[28]</sup>。寒凝血瘀证病证结合动物模型,即是在中医理论和现代医学理论的指导下,选择临床上与寒凝血瘀证有结合点的疾病,利用现有技术手段在合适的动物身上复制疾病及证候,使其产生相应疾病病理变化及证候表征<sup>[29]</sup>。因寒邪侵袭部位不同,寒凝血瘀证可在多种疾病中出现,如冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)、原发性痛经、子宫内膜异位症等。

**3.1 寒凝血瘀证冠心病模型** 本病属于中医“胸痹”“真心痛”范畴,“寒气卒然客于五脏六腑,则卒发心痛胸痹。”胸痹病位在心,心主血脉,寒凝血脉、心脉瘀阻则易诱发胸痹<sup>[30]</sup>。王朋等<sup>[31]</sup>以大剂量注射垂体后叶素能造成急性心肌缺血、诱发急性心绞痛且致病具有寒邪致病特点为依据,采用SD大鼠静脉注射垂体后叶素制备寒凝血瘀证冠心病心绞痛模型。通过观察大鼠症状体征、心电图、心肌微循环及血浆血栓素 $B_2$ ( $TXB_2$ )、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ )等指标的变化,认为模型被成功建立。这种造模思路是在疾病基础上探寻中医“证”类型,先建立疾病模型,在此基础上不施加其他干预因素,在造模过程中或成模后观察疾病发展过程中证候的动态演变过程<sup>[32]</sup>。孙安会<sup>[33]</sup>为模拟寒凝导致的冠心病血瘀证,给与SD大鼠冰水应激21 d,于第15天起连续7 d腹腔注射异丙肾上腺素,第21天皮下注射盐酸肾上腺素2次,给药中间给与大鼠冰水浸泡。模型大鼠出现颤栗,爪甲、肢端紫暗,精神倦怠等症状,结合心电图、血液流变学及凝

血象等异常表现,提示寒凝血瘀证冠心病大鼠模型制备成功。

**3.2 寒凝血瘀证原发性痛经模型** 本病在症状上可归属于中医“经行腹痛”范畴。“妇人经来腹痛,由风冷客于胞络冲任。”寒客胞络、冲任致经血瘀阻,“不通则痛”可发为痛经。研究显示,与妇女生理特点有关,寒凝血瘀证在原发性痛经证型中分布最多<sup>[34]</sup>。吴珊等<sup>[35]</sup>通过补佳乐灌胃联合腹腔注射缩宫素复制病理疼痛模型,结合冰水浴制备了寒凝血瘀证原发性痛经模型。模型大鼠除出现扭体次数增多的痛经表现,还表现出寒颤、背弓毛竖、大便稀、小便清等寒凝血瘀证表征特点,且全血黏度和血浆黏度升高,血清6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 、子宫前列腺素 $E_2$ (PGE $_2$ )含量均明显降低,血清 $TXB_2$ 、子宫前列腺素 $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$ )及钙离子( $Ca^{2+}$ )含量明显升高。王丹丹等<sup>[36]</sup>采用苯甲酸雌二醇联合缩宫素的方法制备病理疼痛模型,结合将大鼠置于冰块上的寒冷刺激法制备了寒凝血瘀证原发性痛经模型。大鼠出现寒凝血瘀证表征及扭体反应判定造模成功。

**3.3 寒凝血瘀证子宫内膜异位症模型** 中医中并无子宫内膜异位症的记载,但据其病因、病理及临床表现可归于中医“痛经”“癥瘕”“不孕”及“月经不调”等范畴,瘀血阻滞胞宫、冲任是其根本病机<sup>[37]</sup>。寒凝血瘀证是子宫内膜异位症最常见的证型之一,常因妇女冲任、胞宫受寒,气血不畅,离经之血瘀积于内而成<sup>[38-39]</sup>。倪喆鑫等<sup>[40]</sup>先以冰水浸泡小鼠的方法建立寒凝血瘀证小鼠模型,在此基础上通过移植供体小鼠子宫内膜碎片至受体小鼠并皮下注射雌激素溶液的方式,建立了寒凝血瘀型子宫内膜异位症复合模型。以小鼠耳廓血流减缓,爪甲颜色青紫,腹腔内出现明显内异病灶,作为模型构建成功依据。且模型组肠道菌群存在失调表现,腹腔内脂多糖浓度增加。丛慧芳等<sup>[41]</sup>在采用冰水浸泡加皮下注射肾上腺素的方法复制证候模型的基础上,结合自体子宫移植法加冰水浸泡制备了寒凝血瘀证子宫内膜异位症模型。以动物证候表现、血液流变学、凝血功能、移植生长情况及病理形态判定该病证结合模型建立成功。

**3.4 寒凝血瘀证动脉硬化闭塞症模型** 动脉硬化闭塞症是一种中老年人多发的周围血管难治性疾病,是全身动脉粥样硬化在肢体的表现,因动脉内膜发生粥样硬化改变形成斑块造成血管管腔狭窄甚至闭塞,使肢体发生不同程度的缺血症状,属于中医“脱疽”“脉痹”范畴<sup>[42-44]</sup>。寒冷刺激是导致动脉

硬化闭塞症发生的明确危险因素,寒邪袭人,易使血管痉挛、津血凝结、阳气损伤,加之中老年人动脉弹力减弱、内膜增厚,粥样硬化斑块逐渐形成,致使脉管狭窄或闭塞,且阳气渐虚,温煦推动功能不足,更致肢体血行不畅,引发此病<sup>[45]</sup>。樊凯芳等<sup>[46-47]</sup>认为心主血脉,心阳不振、寒凝血瘀是动脉硬化闭塞症的根本病机。其在高脂饲养的基础上,以冰水浸泡及饥饿法制备寒凝血瘀证候模型,采用定位电流刺激法复制股动脉粥样硬化病理模型。造模后家兔蜷缩少动,毛色发黄少泽,饮食量少,部分出现大便稀溏、肢端色紫暗的症状,且体内心钠素含量降低。

**3.5 其他** 除上述较常见的寒凝血瘀证疾病模型外,韩诚等<sup>[48]</sup>采用双侧颈总动脉永久结扎结合腹腔注射D-半乳糖的方法建立大鼠老年痴呆疾病模型,在此基础上,将大鼠放入冷冻冰箱制备寒凝血瘀证动物模型,根据症状、Morris水迷宫测试、血液流变学指标证实寒凝血瘀证老年痴呆大鼠模型制备成功。张睿等<sup>[49]</sup>采取臭氧染毒结合冰水浴的方法建立了寒凝血瘀证衰老大鼠心脏病变模型,模型大鼠出现中医寒证特征及凝血功能改变,且心肌细胞形态、心脏胶原纤维沉积量及心脏转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )表达量等均发生改变。无论是寒凝血瘀证老年痴呆模型还是衰老大鼠心脏病变模型,均与年老体弱,气衰无力行血,血液瘀阻,引发疾病有关,寒凝致血瘀均并非导致疾病发生的主导因素。

寒凝血瘀证病证结合动物模型以寒凝血瘀证形成的中医病因学说作为证候基础,或在中医病因基础上叠加西医病理因素制备证候模型,利用现代医学技术手段使动物出现疾病相关病理变化制备疾病模型,通过观察动物病、证宏观表征及微观指标,判定模型制备情况。病证结合动物模型糅合了现代医学的“病”和中医学的“证”,既反映了西医疾病特征又体现了中医证候特征,是具体与抽象、宏观与微观的整合,在探讨疾病生理病理变化和中医证候特征的关系上具有明显的优势,更贴近临床实际,现今寒凝血瘀证造模多采用这种方式<sup>[28,50]</sup>。然寒凝血瘀证病证结合动物模型中“病”的研究种类较为集中,近年多为原发性痛经及子宫内膜异位症模型,除上述疾病外,寒凝血瘀证还可见于子宫腺肌症、盆腔炎等妇科病,以及疼痛为主证的腰椎间盘突出、肩周炎、糖尿病周围神经病变等痹证,但此类疾病的寒凝血瘀证动物模型研究较少。寒凝血瘀证动物模型制备总结见表1。

#### 4 讨论

近年常用的寒凝血瘀证动物模型主要有3种:一是利用寒邪挛缩凝结血脉,损伤阳气的特点造模;二是通过注射肾上腺素使动物产生血瘀病理状态结合寒邪刺激造模;三是利用现代医学和中医学理论制备病证结合模型。三大模型各具优势又各有不足。病因模型符合中医病因学认识,操作简单,理论上可控性较强,但单纯病因多是中医病证产生的诱发因素,以施加寒邪为主的造模方法不足以模拟临床证候形成过程,且各造模参数无统一量化标准,导致造模终止时机不易判断,模型重复性差。肾上腺素复合冰水浴造模方法较稳定,动物症状体征和理化指标与临床贴切度更高,但同样忽略了证候形成的过程,且具有证候属性界定模糊的问题。病证结合模型体现了病、证之间的不可割裂性,更吻合于临床实际,也是现今证候模型研究的趋势。但依然存在一些问题,除疾病模型种类不全面外,较具有争议的是病证结合的方式。目前病证结合动物模型主要有5种模式<sup>[16,51]</sup>:①在证候模型基础上建立疾病模型;②在疾病模型基础上建立证候模型;③同时在动物身上复制病和证;④西医疾病模型探寻中医“证”类型;⑤中医证候模型探寻西医“病”类型。笔者认为,病证结合模型不是简单的病和证的结合,应放到二者发生的具体环境中分析。证候和疾病都是致病因素作用于人体的表现,是对患者的临床特征不同角度的归纳<sup>[52]</sup>。由于个体遗传体质不同,相同的致病因素也可能损伤不同的脏腑组织,发为不同疾病,在疾病的不同阶段发为相同证候,故个体体质因素、疾病的演化规律、传变趋势及病、证出现前机体的内环境在模型的制备中也应综合被考虑。此外,现有寒凝血瘀模型制备多以冷暴露为主,模型制备方法相对较少,在实际生活中,过食生冷也是寒凝血瘀证发生因素之一,而动物模型制备时常忽略这一因素。

“有诸内必形诸外”,生物表征符合中医以外测内的辨证方式,是证候模型造模的核心及主要评价方面<sup>[53]</sup>。研究常以实验动物出现精神萎靡、畏寒蜷缩喜扎堆、毛发不荣、大便湿烂、舌爪紫暗等寒邪致病特征作为寒凝血瘀证生物表征评判依据。有学者为便于判定证候程度制定了寒凝血瘀证小鼠症状、体量化评分表及开发了中医实验动物证候表征采集分析系统<sup>[54-55]</sup>。在证候模型辅助判断方法方面,研究常以动物出现类血瘀的病理生理指标作为寒凝血瘀证动物模型评价依据,如发生血液流变

表1 寒凝血瘀证动物模型制备

Table 1 Preparation of animal model of cold coagulation and blood stasis syndrome

模型类型	模型动物	制备方法	评价标准	优缺点	参考文献
病因模型	雄性SD大鼠	全身冷冻法	①体征;②血液流变学;③NO、ET含量;④TSH、ADR含量	优点:贴合中医学理论,方法简单,易于操作;	[2]
	雄性Wistar大鼠	全身冷冻法	①一般症状体征;②胃黏膜病理变化;③胃黏膜血液流变学和血流量;④胃黏膜ET-1、HIF-1 $\alpha$ 表达	不足:重复性差,可靠性有待进一步验证	[3]
	家兔	局部冻伤法	①症状体征;②眼、耳微循环;③血液流变学;④纤维蛋白原		[7]
	家兔	局部冻伤法	①体征;②血液黏度、纤维蛋白原含量		[8]
	雌性SD大鼠	冰水浴法	①症状体征;②动情周期;③血清生殖激素;④血液流变学;⑤耳廓、子宫微循环;⑥ET-1、ET-AR、NO表达		[10-11]
	SD大鼠	冰水浴法	①症状体征;②血液流变学;③血浆、心、肝、脾、肺、肾、脑中能量代谢指标		[12-13]
病因病理复合模型	SD大鼠	皮下注射肾上腺素联合冰水浴法	①症状体征;②血液流变学;③NO、ET-1含量;④血管性血友病因子(vWF)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量;⑤血管病理学变化(玻璃管法)	优点:可靠性、稳定性、重复性均较强;不足:与临床证候形成过程存在差距,分型判断不够明确	[19]
	雌性BALB/c裸小鼠	皮下注射肾上腺素联合冰水浴法	①症状体征;②尾出血时间、凝血时间		[20]
	雄性Wistar大鼠	皮下注射肾上腺素联合冰水浴法	①血液流变学;②凝血功能;③血小板聚集率		[21]
寒凝血瘀证冠心病模型	雄性SD大鼠	大剂量静脉注射垂体后叶素复制疾病模型,在此基础上观察证候演变过程	①症状体征;②心电图;③心肌微静脉管径和红细胞流速;④TXB <sub>2</sub> 、6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> 含量	优点:能较好地反映证候属性,贴近中医临床,实用性强;不足:疾病模型较集中,病、证结合方式存在争议	[31]
	雄性SD大鼠	异丙肾上腺素反复连续腹腔注射复制疾病模型,冰水浸泡+盐酸肾上腺素皮下注射复制证候模型	①症状;②血液流变学;③凝血象;④心电图		[33]
寒凝血瘀证原发性痛经模型	雌性SD大鼠	补佳乐+缩宫素复制疾病模型,冰水浴复制证候模型	①症状体征;②血液流变学;③TXB <sub>2</sub> 、6-keto-PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> 、PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> 、PGE <sub>2</sub> 含量;④Ca <sup>2+</sup> 表达		[35]
	雌性Wistar大鼠	苯甲酸雌二醇+缩宫素复制疾病模型,冰块局部冷刺激复制证候模型	症状体征		[36]
寒凝血瘀证子宫内膜异位症模型	雌性C57BL/6小鼠	冰水浴复制证候模型,供体子宫内膜移植+雌二醇注射复制疾病模型	①体征;②耳廓血流;③内异病灶		[40]
	雌性SD大鼠	冰水浴+皮下注射肾上腺素复制证候模型,在此基础上,自体子宫内膜移植+冰水浴复制疾病模型	①症状体征;②血液流变学;③凝血功能;④病灶外观和病理观察		[41]
寒凝血瘀证动脉硬化闭塞症模型	雄性日本大耳白兔	冰水浸泡制备证候模型,定位电流刺激+高脂饲养及饥饿法制备疾病模型	①症状体征;②心钠素含量		[47]
寒凝血瘀证老年痴呆模型	雄性SD大鼠	双侧颈总动脉永久结扎+腹腔注射D-半乳糖复制疾病模型,低温冷冻复制证候模型	①症状体征;②行为学测试;③血液流变学		[48]
寒凝血瘀证衰老大鼠心脏病变模型	雄性SD大鼠	臭氧染毒复制衰老模型,冰水浴复制证候模型	①症状体征;②凝血四项;③心肌细胞形态;④心肌胶原纤维沉积量;⑤心脏TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 表达量		[49]

学、凝血功能、微循环等方面异常。健康的内皮能够调节血管张力,维持血液正常运行,当血管内皮细胞受应激、物理化学等因素影响时,其结构完整性被破坏,造成内皮维持血管稳态的功能发生改变<sup>[56]</sup>。“寒主收引凝滞”,侵袭机体易致脉道挛缩,血液凝滞,故寒凝血瘀证血管异常也常用血管内皮细胞分泌的血管舒缩因子、细胞黏附因子等物质来体现。系统生物学的发展使组学技术也越发被应用

到挖掘疾病或证型的潜在生物标志物上,有研究表明寒凝血瘀证大鼠血清、粪便代谢物中均存在与寒凝血瘀相关的潜在代谢生物标志物<sup>[57-60]</sup>。另外,也有研究从内分泌、能量代谢、基因表达等方面对模型进行了探索<sup>[2,12-13,21]</sup>。总体来讲,现有的评价方法客观性、特异性均稍弱。生物表征的采集往往主观性较强,有些表征如精神萎靡、蜷缩喜扎堆、毛发不荣等也非寒凝血瘀证独有;理化指标主要针对“血

瘀”展开,关于“寒凝”因素的探寻,主要集中在机体功能“抑制”方面,指标特异性不足。中医证候动物模型的评价方法应建立在临床评价方法系统有效的基础上,建议全面搜集并通过大数据挖掘细化寒凝血瘀证患者的典型证候表现,全面整合数据,完善证候模型评判依据。其次,动物和人的生理基础有异,单纯套用临床评判标准科学性不强,模型评价应建立在实验动物生理特征的基础上,观察在其基本特点上所建模型差异是否具有临床意义。如某些实验动物的舌体在过激情绪下,如紧张、愤怒时即刻能从粉红色转变为瘀紫色,而麻醉后用工具牵拉出舌体亦不符合临床舌诊自然放松的要求,故寻求动物自然状态下与临床贴切的指标及合适的观测手段极其重要。如寒凝血瘀证的临床主证中“肢冷色青”,是否可以通过体表微循环或红外热成像技术观测以量化肢端“冷”的程度,其“痛”的表现是否可以通过测量痛阈的方法进行探索。最后,在症状体征、理化指标评判的基础上可综合利用代谢组学、蛋白组学等组学技术从多系统、多方面阐释寒凝血瘀证的生物学机制,并通过临床和实验相互验证的方法不断充实评价证据。

#### [参考文献]

[1] 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语——证候部分[M]. 北京:中国标准出版社,1997:12.

[2] 赵珊珊,郝艳玲,袁凤刚,等. 四种活血化瘀类中药注射液寒热药性的比较[J]. 中成药,2016,38(5):973-978.

[3] 雷春红,高文艳,刘杨,等. 寒凝血瘀型大鼠胃黏膜内皮素-1与缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 改变及对微循环血流量影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(5):63-65.

[4] 郑小伟. 寒凝血瘀证动物模型的量化研究[J]. 浙江中医学院学报,1999(2):43-45.

[5] 赵珊珊,郝艳玲,袁凤刚,等. 寒凝血瘀证动物模型的建立和优化筛选[J]. 中国中医基础医学杂志,2016,22(8):1048-1049,1079.

[6] 张珊珊,倪瑾,吴昱莉,等. 寒凝血瘀证动物模型的研制[J]. 南京中医学院学报,1992(1):21-23.

[7] 刘华朋,朱成慧,李丹丹,等. 寒凝血瘀型家兔模型的实验观察[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(9):1985-1987,后插3-后插4.

[8] 朱成慧,孟向文,刘华朋,等. 拔罐疗法干预寒凝血瘀证家兔模型细胞因子的实验研究[J]. 针灸临床杂志,2017,33(2):58-60.

[9] 谷万里,张俏,史载祥. 寒凝血瘀证动物模型的研究述评[J]. 中国中医药信息杂志,2007,14(6):89-91.

[10] 王迪,成秀梅,李新华,等. 加减温经汤对妇科寒凝血

瘀证大鼠Rho/ROCK信号通路相关因子表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2020,27(8):51-56.

[11] WANG D, CHENG X, FANG H, et al. Effects of modified Wenjing decoction on microcirculation in reproductive organs in rats with symptom patterns of cold coagulation and blood stasis [J]. J Tradit Chin Med,2020,40(2):212-223.

[12] 董娟妮,马翠翠,贾璞,等. 红花-甘草配伍对寒凝血瘀大鼠组织中能量代谢的影响[J]. 药物分析杂志,2017,37(8):1389-1397.

[13] 董娟妮,毛俊俊,龙丽辉,等. 红花-甘草配伍对寒凝血瘀模型大鼠血浆及脑组织中腺苷酸及能荷的影响[J]. 中国医院药学杂志,2019,39(24):2507-2511.

[14] 成秀梅,杜惠兰,李丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(8):604-605.

[15] 谢波,邓海山,喻斌,等. 寒凝血瘀证大鼠模型的优化筛选研究[J]. 南京中医药大学学报,2013,29(3):262-265.

[16] 李晓娟,白晓晖,陈家旭,等. 中医动物模型研制方法及展望[J]. 中华中医药杂志,2014,29(7):2263-2266.

[17] 胡泉,田金洲,宋崇顺,等. 脑梗塞寒凝血瘀证动物模型研制方法及评价指标[J]. 中华中医药杂志,2006,21(11):675-678.

[18] 纪文岩,刘英慧,高晓昕. 肾上腺素合冷刺激致血瘀模型大鼠血栓形成标志物变化的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(9):758-759.

[19] 李凤金,牛雯颖,刘欣欣,等. 基于Nrf2/ARE信号通路探讨少腹逐瘀汤对寒凝血瘀证大鼠血管内皮损伤的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(1):31-37.

[20] 周世卿,张婷婷,李甜甜,等. 寒凝血瘀证裸小鼠模型的建立及评价[J]. 辽宁中医杂志,2019,46(2):415-417.

[21] ZHANG X, ZHANG C, SAI J, et al. Xueshuan Xinmaining Tablet treats blood stasis through regulating the expression of F13a1, Car1, and Tbx2r [J]. Evid Based Complement Alternat Med,2015,2015:704390.

[22] 宋程程,王志斌,苏斌,等. 常用大鼠血瘀证模型的研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(2):94-98.

[23] 杨延泽,邓毅,杨秀娟,等. 当归不同配伍对急性血瘀大鼠血液流变学、凝血功能及心、肺病理影响[J]. 中药药理与临床,2018,34(6):125-129.

[24] 罗亚敏,任小巧,宋慧荣,等. 藏药如意珍宝丸对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2018,24(6):757-759.

[25] HUANG S, XU F, WANG Y Y, et al. Improvement and application of acute blood stasis rat model aligned with the 3Rs (reduction, refinement and replacement) of humane animal experimentation [J]. Chin J Integr Med,2020,26(4):292-298.

- [26] RAN N, PANG Z, GUAN X, et al. Therapeutic effect and mechanism study of *Rhodiola wallichiana* var. *cholaensis* injection to acute blood stasis using metabolomics based on UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1514845.
- [27] 刘楠, 姜云耀, 李莹, 等. 气滞血瘀证动物模型研究现状[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(1): 217-226.
- [28] 赵慧辉, 王伟. 病证结合证候模型研究基本思路[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(12): 762-764.
- [29] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考[J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(10): 1459-1462.
- [30] 肖香群, 王宗殿. 寒凝心脉型胸痹证治初探[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(4): 14-15.
- [31] 王朋, 杨明会, 李绍旦, 等. 冠心病心绞痛寒凝血瘀证动物模型的建立[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(3): 309-311.
- [32] 刘涛, 王伟. 证候动物模型研究的思索[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 21(9): 550-551.
- [33] 孙安会. 冠心病血瘀证病因病势对心肌细胞能量代谢及病证网络模型的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [34] 王艳英, 马堃. 2000例痛经患者问卷调查及临床特点分析[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(20): 3920-3924.
- [35] 吴珊, 汪蒙蒙, 彭代银, 等. 桃红四物颗粒对寒凝血瘀痛经大鼠的治疗作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14): 111-116.
- [36] 王丹丹, 王东梅, 马青, 等. 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠 Th17、Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(2): 308-310.
- [37] 李晓丹, 邵瑞萌, 高俊华, 等. 易修珍扶正化瘀治疗子宫内位异位性疾病[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4032-4034.
- [38] 武梅, 程雯, 张丹英, 等. 子宫内位异位症中医证型研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(1): 253-255.
- [39] 梁莉, 武权生, 张小花, 等. 少腹逐瘀汤治疗寒凝血瘀型子宫内位异位症痛经研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(2): 437-440.
- [40] 倪喆鑫, 毕艳丽, 孙帅, 等. 寒凝血瘀状态对子宫内位异位症小鼠肠道菌群结构的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(10): 1214-1218.
- [41] 丛慧芳, 谷栩萌, 张天婵, 等. 寒凝血瘀型子宫内位异位症大鼠模型的制备[J]. *中医药学报*, 2018, 46(1): 74-79.
- [42] 熊卫红, 赵晖, 梁媛, 等. 老年动脉硬化闭塞症常见中医证候影响因素研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2012, 18(5): 531-533.
- [43] 李亿, 李国信, 梁茂新. 动脉硬化闭塞症中医辨证存在问题与对策[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(6): 2244-2247.
- [44] 侯俊杰, 李大勇, 李世征, 等. 加味阳和汤治疗寒凝血瘀证下肢动脉硬化闭塞症的临床疗效及对血清 ET-1、NO 水平变化的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9): 2093-2097.
- [45] 吕勃川, 赵钢. “三因制宜”在下肢动脉硬化闭塞症防治中的应用[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(4): 1284-1286.
- [46] 樊凯芳, 王欢, 李晓亮. 当归四逆汤对动脉硬化闭塞症寒凝血瘀型家兔血管平滑肌细胞 ERK1、c-myc mRNA 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(1): 424-427.
- [47] 樊凯芳, 王丽婷, 刘其, 等. 当归四逆汤对 ASO 寒凝血瘀型家兔血清 ANP 含量的影响[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(9): 2153-2155.
- [48] 韩诚, 郭蕾, 陈燕清, 等. 老年期痴呆寒凝血瘀证模型大鼠 NO 及 SOD 含量变化的关系[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6): 1957-1960.
- [49] 张睿, 冯玄烨, 王湘, 等. 杞红方对寒凝血瘀衰老大鼠心脏保护作用的实验研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(9): 743-749.
- [50] 郭春荣. 病证结合动物模型的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(14): 2806-2809.
- [51] 高振, 刘莹莹, 朱玉龙. 中医证候模型: 从定位基础到模拟临床[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3): 1045-1050.
- [52] 郭淑贞, 王伟. 中医证候形成的“三因”理论[J]. *中医杂志*, 2020, 61(17): 1493-1497.
- [53] 段练, 刘咏梅, 王阶. 血瘀证中医证候模型的研究与展望[J]. *中医杂志*, 2017, 58(4): 346-350, 353.
- [54] 周华妙, 郭勇. 寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评价[J]. *中国中医药科技*, 2010, 17(1): 1-2, 7.
- [55] 杜正彩, 郝二伟, 邓家刚, 等. 寒凝血瘀证模型大鼠中医表征指标量化研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(7): 566-569.
- [56] XU S, ILYAS I, LITTLE P J, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(3): 924-967.
- [57] 袁顺, 王宁, 孟丹丹, 等. 系统生物学在中医证候模型评价方法中的应用与研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(10): 1252-1257.
- [58] 任珍, 彭孟凡, 苗明三. 中医药动物模型评价方法的现状与思考[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(4): 219-222.
- [59] 吴金霞. 基于代谢组学的当归四逆汤“温经通脉”作用机制的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [60] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 寒凝血瘀证大鼠的肠道菌群变化与粪便代谢特征分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 79-85.

[责任编辑 王鑫]