

急性冠脉综合征瘀毒互结证大鼠模型的建立及评价

尤越^{1,2}, 辛高杰^{1,2}, 刘子馨^{1,2}, 李玲美^{1,2}, 孟红旭^{1,2}, 史跃^{1,2},
马彦雷^{1,2}, 王紫艳^{1,2}, 刘建勋^{1,2}, 李磊^{1,2*}, 付建华^{1,2*}

(1. 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 100091;
2. 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091)

[摘要] 目的:通过比较采用腹腔注射脂多糖(LPS)、结扎冠状动脉及两者不同组合方式建立急性冠脉综合征瘀毒互结证大鼠模型的可行性。方法:将225只SD雄性大鼠,随机分为假手术组、单纯结扎冠脉组、先注射LPS(5 mg·kg)组(结扎冠脉前24 h注射LPS)、后注射LPS(5 mg·kg)组(结扎冠脉后10 min注射LPS)。各组分别于造模后3、24、72 h进行各项指标的检测,对模型的建立进行综合评价。观察各组大鼠的一般状态与中医证候宏观评价指标舌象、脉象,采用心电图、超声心动图评价心功能,伊文思蓝/2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定心肌缺血、梗死面积,生化法或酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌钙蛋白T(cTnT)含量及白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6的变化,血细胞分析仪测定白细胞数,检测凝血四项、血小板聚集率、血液流变学等凝血评价指标,苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织。结果:造模3 h后,与假手术组比较,单纯结扎冠脉组大鼠舌面R、G、B值显著下降($P<0.01$),舌下络脉色泽显著变紫($P<0.01$),脉搏幅度显著降低($P<0.01$),心功能下降,血清CK、LDH、cTnT、IL-1 β 、IL-6含量明显上升($P<0.05$),心肌梗死面积显著增大($P<0.01$),白细胞总数明显增加,差异具有明显统计学意义($P<0.05$);与单纯结扎组比较,先注射LPS组、后注射LPS组舌下络脉增长,舌面R值均下降,cTnT含量显著增加($P<0.01$),后注射LPS组舌面B值下降,心输出量(CO)明显降低($P<0.05$),IL-1 β 含量上升,LVAWs显著变薄($P<0.01$)。造模24 h后,与假手术组比较,单纯结扎组舌面R、G、B值显著下降,舌下络脉加长、色泽紫暗($P<0.01$),脉搏幅度显著降低($P<0.01$),心功能下降,心肌梗死面积增大($P<0.01$),全血黏度增高,血小板聚集率变大,FIB增高,PT、TT显著缩短($P<0.01$),白细胞总数显著增加,差异具有明显统计学意义($P<0.01$),血清CK、LDH、cTnT、IL-6含量上升,差异具有明显统计学意义($P<0.05$);与单纯结扎组比较,先注射LPS组、后注射LPS组脉搏幅度下降,舌面R、G、B值显著降低($P<0.01$),舌下络脉加深加长($P<0.05$),左室射血分数(EF)及左室缩短率(FS)分值下降($P<0.05$),cTnT含量均上升($P<0.01$),后注射LPS组LVPWs变薄,LDH含量上升,血小板聚集率增高($P<0.05$),心肌梗死面积明显增大,TT显著缩短($P<0.01$),白细胞总数增加,IL-1 β 水平上升,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。造模72 h后,与假手术组比较,单纯结扎组脉搏幅度明显降低,舌面R、G、B值下降,舌下络脉加粗增长($P<0.01$),心功能下降,cTnT含量增加,FIB含量上升,血液黏稠度增高($P<0.01$),血小板聚集率增高,IL-6、IL-1 β 水平上升,差异具有明显统计学意义($P<0.05$);与单纯结扎组比较,先注射LPS组、后注射LPS组舌下络脉颜色更紫,cTnT含量均上升($P<0.01$);后注射LPS组脉搏幅度降低,舌面R、G、B值下降,心肌梗死面积增大,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),EF、FS分值降低,差异具有明显统计学意义($P<0.05$)。结论:大鼠冠脉结扎10 min后注射LPS在24 h时,与其他造模方法及不同造模时间点制备的模型比较,更符合急性冠脉综合征瘀毒互结证的临床发病特征。

[关键词] 动物模型; 急性冠脉综合征; 瘀毒互结证; 病证结合

[中图分类号] R2-0;R33;R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)19-0049-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221841

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220715.1654.003.html>

[网络出版日期] 2022-07-18 13:45

[收稿日期] 2022-05-07

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A00912);国家自然科学基金项目(82174219);北京市中医药科技发展基金项目(JJ-2020-78);国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202007)

[第一作者] 尤越,在读硕士,从事心血管中药药理研究,E-mail:youyue90996@163.com

[通信作者] *李磊,博士,副研究员,从事心血管中药药理研究,E-mail:lilei0502@126.com;

*付建华,博士,研究员,从事心血管中药药理、中药新药研发研究,E-mail:jianhuaffcn@263.net

Establishment and Evaluation of Rat Model of Acute Coronary Syndrome with Combined Blood Stasis and Poison

YOU Yue^{1,2}, XIN Gaojie^{1,2}, LIU Zixin^{1,2}, LI Lingmei^{1,2}, MENG Hongxu^{1,2}, SHI Yue^{1,2}, MA Yanlei^{1,2},
WANG Ziyang^{1,2}, LIU Jianxun^{1,2}, LI Lei^{1,2*}, FU Jianhua^{1,2*}

- (1. *Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Science of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;*
2. *National Clinical Research Center For Chinese Medicine Cardiology, Beijing 100091, China*)

[Abstract] **Objective:** To compare the feasibility of establishing the rat model of acute coronary syndrome with combined blood stasis and poison by lipopolysaccharide (LPS) injection, ligation of coronary artery and different combinations of the two methods. **Method:** A total of 225 male SD rats were randomly divided into sham operation group, simple coronary artery ligation group, first injected LPS group [LPS (5 mg·kg) injection 24 h before coronary artery ligation] and follow injected LPS group [LPS (5 mg·kg) injection 10 min after coronary artery ligation]. The indexes of each group were detected at 3, 24, 72 h after modeling, and the model was comprehensively evaluated. The general state and macroscopic evaluation indexes of traditional Chinese medicine (TCM) syndrome (tongue and pulse) of rats in each group were observed. ECG and echocardiography were used to evaluate cardiac function, and the myocardial ischemia and infarction areas were measured by Evans blue/2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The content of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and troponin T (cTnT) in serum as well as interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 changes were determined by biochemical method or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematology analyzer was adopted to determine the white blood cell (WBC) count, and the four coagulation indexes, platelet aggregation rate, hemorheology and other coagulation evaluation indexes were also detected. The myocardial tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** After 3 h of modeling, compared with the conditions in sham operation group, the R, G and B values of tongue of rats ($P<0.01$), pulse amplitude ($P<0.01$), and cardiac function in simple coronary artery ligation group were decreased, and the color of hypoglossal veins became purple ($P<0.01$). The content of CK, LDH, cTnT, IL-1 β and IL-6 in serum ($P<0.05$), myocardial infarction area ($P<0.01$), and total number of WBCs ($P<0.05$) were increased. Compared with simple coronary artery ligation group, first injected LPS group and follow injected LPS group had increased hypoglossal veins, decreased R value of tongue and elevated cTnT content ($P<0.01$), while follow injected LPS group had reduced B value of tongue, decreased cardiac output (CO) ($P<0.05$), increased IL-1 β content, and thinned left ventricular anterior walls at end-systole (LVAWs) ($P<0.01$). After 24 h of modeling, compared with sham operation group, simple coronary artery ligation group presented significantly decreased R, G and B values of tongue, lengthened purplish dark hypoglossal veins ($P<0.01$), reduced pulse amplitude ($P<0.01$) and cardiac function, enlarged myocardial infarction area ($P<0.01$), increased whole blood viscosity, platelet aggregation rate, fibrinogen (FIB), shortened prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) ($P<0.01$), and elevated total number of WBCs ($P<0.01$) and content of CK, LDH, cTnT and IL-6 in serum ($P<0.05$). Compared with the conditions in simple coronary artery ligation group, the pulse amplitude, R, G and B values of tongue ($P<0.01$), and ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) scores ($P<0.05$) dropped, and hypoglossal veins were deepened and lengthened ($P<0.05$), and cTnT content was increased ($P<0.01$) in first injected LPS group and follow injected LPS group. However, follow injected LPS group had thinned LVPWs, increased LDH content, platelet aggregation rate ($P<0.05$),

myocardial infarction area, and total number of WBC, level of IL-1 β ($P < 0.05$), and shortened TT ($P < 0.01$). Additionally, 72 h after modeling, compared with sham operation group, simple coronary artery ligation group showed significantly reduced pulse amplitude, lowered R, G and B values of tongue, thickened and lengthened hypoglossal veins ($P < 0.01$), decreased cardiac function, and increased content of cTnT, FIB, whole blood viscosity ($P < 0.01$), platelet aggregation rate, level of IL-6 and IL-1 β ($P < 0.05$). Compared with the conditions in simple coronary artery ligation group, the hypoglossal veins of the first injected LPS group and the follow injected LPS group were more purple, and the content of cTnT was boosted ($P < 0.01$), whereas follow injected LPS group had decreased pulse amplitude, R, G and B values of tongue, EF and FS scores ($P < 0.05$), and enlarged myocardial infarction area ($P < 0.01$). **Conclusion:** Compared with the other modeling methods and models at different modeling time, the established model by LPS injection 10 min after coronary artery ligation for 24 h was more consistent with the clinical characteristics of acute coronary syndrome with combined blood stasis and poison.

[Keywords] animal model; acute coronary syndrome; combined blood stasis and poison; disease-syndrome combination

急性冠状动脉综合征(ACS)是一组由急性心肌梗死引起的临床综合征^[1]。ACS是冠心病的主要死亡原因之一,其发病率和死亡率在我国逐年增加,严重危害着人民的健康^[2-3]。中医学中无ACS的病名,根据其临床表现,将ACS归于“胸痹”“真心痛”等范畴,《黄帝内经·灵枢·厥论》中“真心痛,手足青至节,心痛甚,旦发夕死,夕发旦死”的描述与ACS的症状类似^[4]。该病病位在血络,久病入络,久病成瘀,瘀阻血脉,不通则痛,则发病为“真心痛”,血瘀证为其重要的病理因素。但ACS具有发病急骤、病情难控、预后不良的特点,与一般的血瘀证相异。结合现代医学冠心病的“炎症”学说,陈可冀院士等认为“因瘀致毒,瘀毒互结”是ACS的关键病因病机^[5]。瘀血蕴积日久生毒,毒邪加重瘀血内阻,二者形成恶性循环,致冠心病由稳定期慢性心肌缺血发展为急性冠脉综合征^[6]。ACS瘀毒互结证的临床表征可以概括为心悸,胸痛剧烈,疼痛持续时间长,舌质紫暗或舌绛紫有瘀斑,舌下脉络紫红或紫暗,脉涩等,发病急骤,病情重;实验室检查结果伴随血小板聚集率、纤维蛋白原、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6含量等升高。临床上使用“解毒活血法”治疗ACS瘀毒互结证常获佳效^[7-8]。

目前尚无研究ACS瘀毒互结证动物模型报道,本课题组前期建立了稳定的心肌缺血再灌注、冠心病气虚血瘀证大鼠模型,本实验在前期工作基础之上,主要聚焦于使用脂多糖(LPS)作为复合因素制备ACS瘀毒互结证大鼠模型^[9-11]。依据中医对ACS瘀毒互结证的病因病机认识,本实验采用单纯结扎冠状动脉、结扎冠脉前24 h注射LPS、结扎冠脉

后10 min注射LPS3种方式造模,并选用3个造模时长,观察疾病模型的动态演变过程,筛选出符合临床表现的ACS瘀毒互结证大鼠模型,为探索ACS中医证候病理生理机制、中药防治ACS研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠225只,体质量(250 \pm 20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级实验动物中心,室温20~25 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~70%。本实验经中国中医科学院实验动物伦理委员会审批,实验动物伦理批号2022XLC045。

1.2 试剂 细菌LPS(美国Sigma公司,批号L2880),将LPS用生理盐水配置成0.5 g \cdot L⁻¹溶液;血小板聚集诱导剂二磷酸腺苷(ADP,法国HYPHEN BioMed公司,批号F2000702);活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)测定试剂盒(上海长岛生物科技有限公司,批号分别为210905500、210501701、210802800、210800700);大鼠IL-1 β 、IL-6酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为JL208884、JL20896);肌酸激酶(CK)、肌酸激酶MB同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒[富士胶片和光纯耀(上海)化学有限公司,批号分别为901587、210203、103424];肌钙蛋白T(cTnT)测定试剂盒(北京万胜达运科技有限公司,批号202205);苏木素染液、伊红染液(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为C201207、

C200401)。

1.3 仪器 LBY-N6C型血液流变测定仪(北京普利生仪器有限公司);PL-12型血小板聚集仪(江苏英诺华医疗技术有限公司);CS5000型动物体质量秤(上海奥豪斯仪器有限公司);ALC-V8型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物技术有限公司);CE-01型小动物心电图机(北京软隆生物技术有限公司);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);尼康D90数码单反相机(日本尼康公司);MPIAS-500型多媒体彩色病理图文分析系统(北京正恒博诚科技发展有限公司);SYNERGY4型酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 大鼠适应性喂养3 d后,采用随机数字表分为4组,分别为假手术组、单纯结扎冠状动脉组、先注射LPS组(结扎冠状动脉前24 h注射LPS)、后注射LPS组(结扎冠状动脉后10 min注射LPS),假手术组每组15只,其余组每组20只。根据团队前期研究基础及文献研究,采用结扎冠状动脉左前降支复合腹腔注射LPS的方法制备ACS瘀毒互结证模型^[9-12]。冠状动脉结扎手术:使用0.3%戊巴比妥钠溶液,按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量进行腹腔麻醉后常规备皮,将其仰卧位固定至鼠板。利用小二麻醉咽喉镜观察大鼠声门,插入简易气管导管,连接小动物呼吸机进行辅助呼吸,并按说明连接心电图机,随后沿左侧第3~4肋间开胸,钝性分离肌肉并剪开肋骨,然后轻柔挑开心包膜使心脏充分暴露,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,随后闭合胸腔,以心电图QRS波幅加大,ST段抬高,T波高耸或倒置作为缺血是否成功的判断标准。观察大鼠的呼吸和心跳,待其呼吸、心跳平稳后,回笼正常饮食饮水喂养。假手术组仅进行开胸手术不结扎冠脉,先注射LPS组于术前24 h腹腔注射LPS $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,后注射LPS组于术后10 min腹腔注射LPS $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。分别于术后3、24、72 h取材、处死。

2.2 指标检测

2.2.1 一般状态观察 在安静环境下观察各组大鼠的毛发、体质量、精神状况。

2.2.2 脉搏幅度检测 造模结束后利用2%异氟烷

维持大鼠麻醉状态,利用MouseOx小动物无创脉搏血氧仪对大鼠脉搏幅度进行检测,待出现脉搏曲线并稳定后,记录连续30个有效数据,取平均值进行分析。

2.2.3 舌象测定 本实验在固定数码像机参数,固定光源的情况下将Casmatch标准比色卡与舌面、舌底置于同一平面进行拍摄。运用Adobe Photoshop CS6分析出舌面固定3点(舌根及舌面左右两点)的色彩R(红)、G(绿)、B(蓝)值,并观察舌下脉络进行评定。舌背面舌下脉络显色长短分级计分标准^[13]如下:舌下脉络色泽红润,显色约1/3舌体长计0分;舌下脉络色泽紫暗,显色大于1/3小于1/2舌体长计1分;舌下脉络色泽紫暗,显色约1/2舌体长计2分;舌下脉络色泽紫黑,血管明显增粗,显色约2/3舌体长计3分。

2.2.4 采集心电图检测心功能 造模3、24、72 h后,使用小动物心电图机采集各组大鼠的心电图。

2.2.5 超声心动图评价心功能 大鼠麻醉后,胸部左侧胸前区进行广泛备皮处理,取仰卧位固定。当大鼠心律趋于持续性、稳定性时开始检测,以高频探头进行定位,在左室长轴及胸骨旁短轴各切面应用M模式超声心动图观察心脏运动,选用左室长轴切面计算左室舒张末期前壁厚度(LVAWd)、左室收缩末期前壁厚度(LVAWs)、左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)、左室收缩末期后壁厚度(LVPWs)、每搏输出量(SV)、心输出量(CO)、左室射血分数(EF)及左室缩短率(FS)。

2.2.6 血液流变仪检测血液、血浆黏稠度 大鼠腹主动脉穿刺取血3 mL,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(150 s^{-1})、中(60 s^{-1})、低(5 s^{-1})切变率下的全血黏度和血浆黏度(100 s^{-1})。

2.2.7 血小板聚集仪测定血小板聚集率 大鼠腹主动脉穿刺取血2 mL,加入3.8%枸橼酸钠抗凝管按1:9抗凝,采用血小板聚集仪器测定,指标包括最高聚集率(MAR)和平均聚集率(AAR)。

2.2.8 血细胞分析仪测定白细胞总数 腹主动脉采血后,采用血细胞分析仪测定各组SD大鼠血液标本白细胞计数。

2.2.9 生化分析法或ELISA检测血清CK-MB、LDH、CK、cTnT含量 大鼠腹主动脉取血,室温静置1 h后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径6 cm,下同),取上清,采用生化分析法检测CK、CK-MB和LDH活性,使用ELISA试剂盒检测cTnT

含量。

2.2.10 血凝仪检测凝血四项 腹主动脉取血后,加入3.8%枸橼酸钠抗凝管,4℃预冷,3 000 r·min⁻¹离心10 min,分离血浆,-80℃冻存待检测。测定凝血四项APTT、PT、FIB及TT。

2.2.11 ELISA检测大鼠血清IL-1β、IL-6含量 常规制备血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,检测IL-1β、IL-6含量。

2.2.12 伊文思蓝/2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定心肌缺血、梗死面积 实验结束后,由腹主动脉缓慢打进2%伊文思蓝染液1 mL(假手术组先进行冠脉结扎,再进行此步操作),稳定10 s后立即取出心脏,生理盐水冲洗,结扎线以下横切5片(2~3 mm),在TTC中避光染色15 min左右,采用MPIAS-500多媒体彩色病理图文分析系统,以固定像距拍照。使用Image-pro Plus 6.0图像处理软件测量每片心肌总面积、蓝染面积及白色梗死区域面积,心肌总面积减去蓝染面积得到缺血区域面积,分别计算心肌缺血梗死范围比例(心肌缺血范围比=缺血面积/心肌总面积×100%,心肌梗死范围比=梗死面积/心肌总面积×100%)。

2.2.13 苏木素-伊红(HE)染色观察心肌组织病理形态 实验结束时,取心肌组织,10%甲醛固定、乙

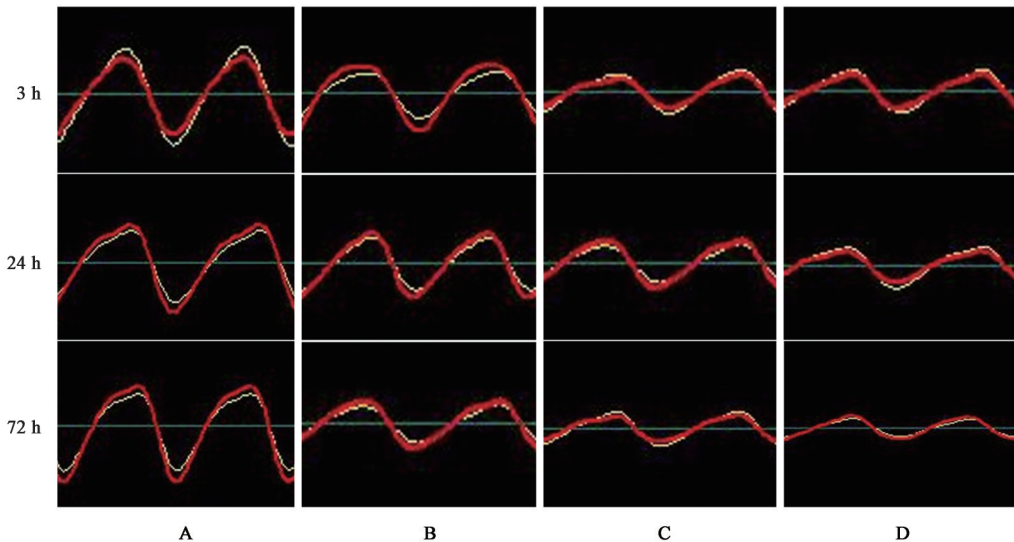
醇脱水、石蜡包埋、切片、HE染色,置于光学显微镜下观察心肌组织病理形态学变化情况。

2.2.14 统计学方法 运用SPSS 22.0数据分析软件对实验结果进行统计分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据符合正态分布方差齐用最小显著性差异法(LSD)检验,反之用Tamhane's T₂检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态变化 造模3 h后,与假手术组比较,3个模型组大鼠活动度明显降低,均精神萎靡或尚未苏醒,喜欢蜷缩聚拢在一起;造模24、72 h后,与假手术组比较,3个模型组大鼠活动度降低,体质量下降,精神萎靡,反应相对迟钝,毛色发黄、暗淡无泽,肢体未见瘀点瘀斑。

3.2 各组大鼠脉搏幅度比较 造模3、24、72 h后,与假手术组比较,3个模型组的脉搏幅度均显著降低($P < 0.01$);造模3 h后,与单纯结扎组比较,先注射LPS组、后注射LPS组的脉搏幅度均有降低趋势,但差异无统计学意义;造模24、72 h后,先注射LPS组、后注射LPS组脉搏幅度与A组比较均显著降低($P < 0.01$);造模72 h后,后注射LPS组脉搏幅度比先注射LPS组显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见图1、表1。



注:A.假手术组;B.单纯结扎冠状动脉组;C.先注射LPS组;D.后注射LPS组(图2-图4同)

图1 大鼠脉搏幅度图

Fig. 1 Pulse amplitude of rats

3.3 各组大鼠舌象分析比较 造模3、24、72 h时,与假手术组比较,3个模型组的舌象R、G、B值均显著降低($P < 0.01$)。在3 h时,先注射LPS组R值、后注射LPS组的R、B值明显低于单纯结扎组($P <$

0.05 , $P < 0.01$);在24 h时,后注射LPS组与先注射LPS组的R、G、B值显著低于单纯结扎组($P < 0.01$),且后注射LPS组的G、B值也显著低于先注射LPS组($P < 0.01$);在72 h时,后注射LPS组的R、G、B值

表1 大鼠脉搏幅度差异 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Difference of pulse amplitude in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | 24 h | 72 h |
|---------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 假手术组 | 39.93±10.60 | 36.93±6.94 | 36.32±11.55 |
| 单纯结扎组 | 19.75±7.97 ²⁾ | 19.84±1.85 ²⁾ | 15.94±3.34 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 15.61±2.03 ²⁾ | 15.89±2.66 ^{2,4)} | 14.15±2.26 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 15.40±2.60 ²⁾ | 14.80±1.57 ^{2,4)} | 11.69±1.14 ^{2,4,6)} |

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与单纯结扎组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与先注射LPS组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表2-表11同)

显著低于另外两个模型组($P<0.01$)。见表2。

假手术组大鼠在造模3、24、72 h时舌下络脉色泽红润,显色长度小于1/3舌体长。单纯结扎组大鼠舌下络脉色泽紫暗,显色长于舌体1/3;先注射LPS组与后注射LPS组大鼠舌下络脉较单纯结扎组色泽更紫,显色长度增加($P<0.05, P<0.01$),后注射LPS组大鼠舌下络脉与先注射LPS组比较差异无统计学意义。3个模型组大鼠舌下络脉均随造模时间的延长而血管增粗加长,色泽加重。见图2、表3。

3.4 各组大鼠心电图比较 造模3 h后,与假手术组比较,3个模型组心电图均出现ST段抬高,后注射LPS组ST段抬高最明显;造模24 h后,3个模型组的心电图均呈现异常Q波、冠状T波,后注射LPS组的病理性Q波均深于先注射LPS组与单纯结扎组;造模72 h后,3个模型组的病理性Q波均变浅。

3.5 各组大鼠超声心动图比较 造模3 h后,与假手术组比较,后注射LPS组EF、FS、CO、LVAWs、

表2 大鼠舌象R、G、B值比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Comparison of analysis of R, G and B value of tongue image ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | | |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | R | G | B |
| 假手术组 | 136.70±11.67 | 96.10±12.72 | 108.23±11.98 |
| 单纯结扎组 | 105.20±4.02 ²⁾ | 74.10±4.79 ²⁾ | 84.87±4.13 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 95.80±3.45 ^{2,4)} | 69.83±7.48 ²⁾ | 79.07±9.32 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 87.93±7.87 ^{2,4,5)} | 70.03±9.52 ²⁾ | 75.67±8.39 ^{2,3)} |
| 组别 | 24 h | | |
| | R | G | B |
| 假手术组 | 140.10±5.26 | 92.43±9.34 | 111.33±7.83 |
| 单纯结扎组 | 103.23±8.95 ²⁾ | 65.67±3.44 ²⁾ | 81.17±7.95 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 91.60±5.95 ^{2,4)} | 58.03±5.64 ^{2,4)} | 70.60±6.26 ^{2,4)} |
| 后注射LPS组 | 89.30±4.68 ^{2,4)} | 49.97±5.80 ^{2,4,6)} | 62.23±5.77 ^{2,4,6)} |
| 组别 | 72 h | | |
| | R | G | B |
| 假手术组 | 137.20±6.58 | 85.77±12.86 | 104.07±10.15 |
| 单纯结扎组 | 98.53±1.81 ²⁾ | 57.63±6.37 ²⁾ | 71.20±5.52 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 96.73±3.47 ²⁾ | 63.40±8.61 ²⁾ | 76.87±7.94 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 85.63±3.98 ^{2,4,6)} | 51.43±7.35 ^{2,4,6)} | 61.77±7.03 ^{2,4,6)} |

LVAWd均显著降低($P<0.01$),先注射LPS组EF、FS、LVAWs显著降低($P<0.01$),单纯结扎组仅EF、FS显著降低($P<0.01$);后注射LPS组CO、LVAWs值较单纯结扎组差异均有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。造模24 h后,与假手术组比较,3个模型组EF、FS、LVAWs、LVPWs、LVPWd均显著降低

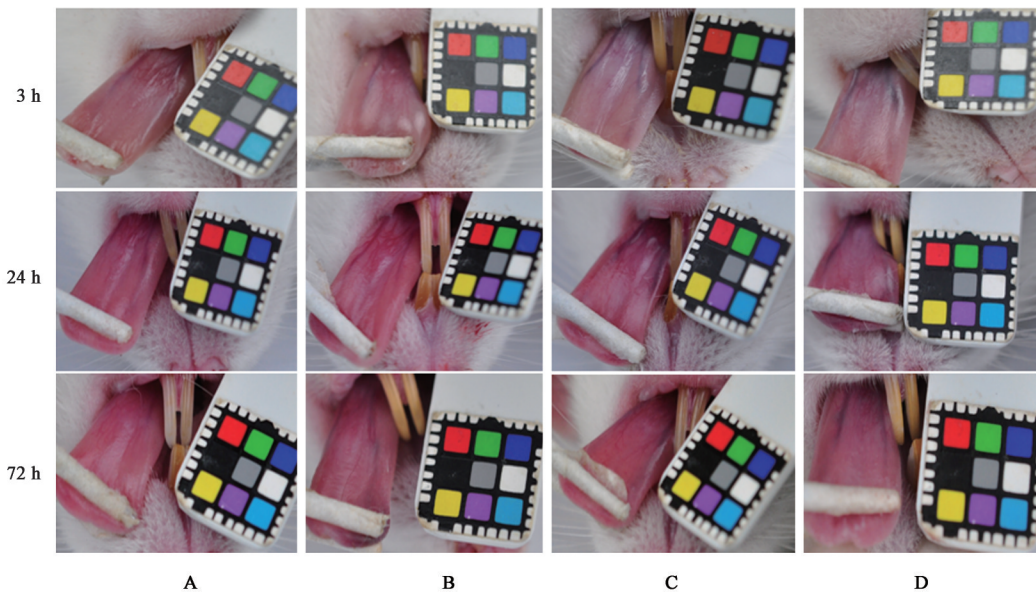


图2 大鼠舌下络脉
Fig. 2 Sublingual veins of rats

表3 大鼠舌下络脉评分比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Comparison of sublingual collaterals score in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | 24 h | 72 h |
|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| 单纯结扎组 | 0.78±0.44 ²⁾ | 1.09±0.83 ²⁾ | 1.30±0.67 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 1.89±0.60 ^{2,4)} | 1.80±0.42 ^{2,3)} | 2.20±0.63 ^{2,4)} |

表4 大鼠超声心动图比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of echocardiography in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | | | | | | | |
|---------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | SV/ μ L | EF/% | FS/% | CO/ μ L | LVAWs/mm | LVAWd/mm | LVPWs/mm | LVPWd/mm |
| 假手术组 | 125.80±38.54 | 78.85±3.85 | 48.21±3.67 | 91.61±46.75 | 3.25±0.37 | 2.10±0.35 | 3.16±0.46 | 2.34±0.37 |
| 单纯结扎组 | 115.93±27.96 | 60.55±10.42 ²⁾ | 33.51±7.78 ²⁾ | 67.80±27.53 | 3.05±0.69 | 2.38±0.49 | 2.90±0.49 | 2.20±0.32 |
| 先注射LPS组 | 112.40±27.72 | 57.32±10.58 ²⁾ | 31.13±7.10 ²⁾ | 70.68±40.85 | 2.31±0.79 ²⁾ | 1.86±0.49 ³⁾ | 3.17±0.44 ³⁾ | 2.41±0.36 |
| 后注射LPS组 | 103.44±31.75 | 54.60±10.63 ²⁾ | 29.25±6.78 ²⁾ | 40.35±19.11 ^{2,3)} | 2.36±0.44 ^{2,4)} | 1.86±0.38 ²⁾ | 2.75±0.67 | 2.21±0.42 |
| 组别 | 24 h | | | | | | | |
| | SV/ μ L | EF/% | FS/% | CO/ μ L | LVAWs/mm | LVAWd/mm | LVPWs/mm | LVPWd/mm |
| 假手术组 | 89.77±22.97 | 82.41±5.99 | 51.86±5.93 | 67.90±41.87 | 3.50±0.32 | 2.41±0.33 | 3.68±0.61 | 2.95±0.65 |
| 单纯结扎组 | 96.04±26.56 | 57.53±8.52 ²⁾ | 31.06±5.85 ²⁾ | 74.56±16.44 | 3.01±0.46 ²⁾ | 2.45±0.39 | 3.00±0.35 ²⁾ | 2.29±0.28 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 97.47±30.00 | 49.16±10.32 ^{2,3)} | 25.73±6.56 ^{2,3)} | 55.45±36.81 | 2.46±0.66 ^{2,3)} | 2.08±0.50 ³⁾ | 2.83±0.35 ²⁾ | 2.26±0.41 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 94.08±25.17 | 44.70±9.10 ^{2,4)} | 22.91±5.52 ^{2,4)} | 75.58±26.66 | 2.40±0.44 ^{2,4)} | 2.03±0.36 ^{1,3)} | 2.66±0.43 ^{2,3)} | 2.14±0.40 ²⁾ |
| 组别 | 72 h | | | | | | | |
| | SV/ μ L | EF/% | FS/% | CO/ μ L | LVAWs/mm | LVAWd/mm | LVPWs/mm | LVPWd/mm |
| 假手术组 | 144.14±26.45 | 79.80±6.79 | 49.67±7.07 | 65.35±17.21 | 3.34±0.31 | 2.17±0.34 | 3.15±0.48 | 2.13±0.43 |
| 单纯结扎组 | 106.68±33.15 ¹⁾ | 55.05±11.08 ²⁾ | 29.60±7.48 ²⁾ | 46.52±17.19 ¹⁾ | 2.65±0.72 ¹⁾ | 2.06±0.63 | 2.50±0.53 ²⁾ | 2.25±0.90 |
| 先注射LPS组 | 101.83±36.11 ²⁾ | 51.75±8.03 ²⁾ | 27.20±5.09 ²⁾ | 47.90±18.06 ¹⁾ | 3.15±0.82 | 2.58±0.74 | 2.35±0.69 ²⁾ | 1.86±0.59 |
| 后注射LPS组 | 95.11±21.67 ²⁾ | 47.81±8.49 ^{2,3)} | 24.80±5.34 ^{2,3)} | 40.05±16.51 ²⁾ | 2.44±0.70 ^{2,5)} | 1.91±0.56 ⁶⁾ | 2.63±0.61 ¹⁾ | 2.36±0.71 ⁵⁾ |

3.6 各组大鼠心肌损伤生物标志物比较 造模3 h后,与假手术组比较,后注射LPS组血清CK-MB、LDH、CK、cTnT含量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);单纯结扎组血清LDH、CK、cTnT含量明显升高($P<0.05, P<0.01$);先注射LPS组血清CK-MB、CK、cTnT含量明显升高($P<0.05, P<0.01$)。造模24 h后,与假手术组比较,3个模型组CK-MB、LDH、CK、cTnT含量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);与单纯结扎组比较,先注射LPS组血清cTnT含量显著升高($P<0.01$),后注射LPS组LDH、cTnT含量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与先注射LPS组比较,后注射LPS组血清LDH、cTnT含量明显上升($P<0.05$)。造模72 h后,与假手术组比较,3个模型组血清cTnT含量显著升高($P<0.01$)。见表5。

3.7 各组大鼠血液组流变学指标比较 与假手术组比较,造模3 h后,3个模型组低、中、高切变率的

($P<0.01$),后注射LPS组LVAWd降低,差异有显著统计学意义($P<0.05$)。造模72 h后,3个模型组SV、EF、FS、CO、LVPWs较假手术组均明显降低($P<0.05, P<0.01$),单纯结扎组、后注射LPS组LVAWs与假手术组比较明显降低($P<0.05, P<0.01$);后注射LPS组EF、FS较单纯结扎组明显降低,差异有显著统计学意义($P<0.05$)。见表4。

全血黏度及血浆黏度均无统计学差异;造模24、72 h后,3个模型组在低、中、高切变率下全血黏度均明显升高($P<0.05, P<0.01$);造模72 h后,后注射LPS组血浆黏度也显著增高($P<0.01$)。与单纯结扎组比较,造模72 h后,后注射LPS组在中、高切变率下全血黏度明显升高($P<0.05$)。与先注射LPS组比较,造模72 h后,后注射LPS组在低、中、高切变率下全血黏度均显著升高($P<0.01$)。见表6。

3.8 各组大鼠血小板聚集率比较 造模3 h后,与假手术组比较,3个模型组血小板最高聚集率、平均聚集率均有升高趋势,其中先注射LPS组血小板平均聚集率明显升高($P<0.05$)。造模24、72 h后,与假手术组比较,各组血小板最高聚集率、平均聚集率均明显升高($P<0.05, P<0.01$);与单纯结扎组比较,后注射LPS组在造模24 h后血小板最高聚集率、平均聚集率明显升高($P<0.05$),先注射LPS组在

表5 大鼠血清中CK-MB、LDH、CK、cTnT水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 CK-MB, LDH, CK and cTnT levels in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

U · L⁻¹

| 组别 | 3 h | | | | 24 h | |
|---------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| | CK | LDH | CK-MB | cTnT | CK | LDH |
| 假手术组 | 1 623.80±637.10 | 1 536.50±548.13 | 1 382.90±349.61 | 717.80±29.61 | 973.10±316.76 | 1 142.70±390.64 |
| 单纯结扎组 | 3 682.40±1 372.45 ²⁾ | 2 288.00±775.49 ¹⁾ | 1 594.20±255.35 | 804.60±61.15 ²⁾ | 1 377.50±325.40 ¹⁾ | 1 925.60±500.34 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 3 761.20±1 037.89 ²⁾ | 1 862.40±568.12 | 1 807.50±344.66 ¹⁾ | 898.51±47.51 ^{2,4)} | 1 261.90±270.46 ¹⁾ | 2 009.40±342.23 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 4 863.10±1 520.48 ²⁾ | 2 157.50±558.60 ¹⁾ | 1 869.70±314.95 ^{2,3)} | 936.13±37.45 ^{2,4)} | 1 714.88±542.41 ^{2,5)} | 2 633.25±636.99 ^{2,3,5)} |

| 组别 | 24 h | | 72 h | | | |
|---------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| | CK-MB | cTnT | CK | LDH | CK-MB | cTnT |
| 假手术组 | 1 057.22±295.84 | 778.72±43.59 | 1 268.70±394.86 | 1 657.22±313.71 | 1 765.00±474.43 | 840.55±34.28 |
| 单纯结扎组 | 1 626.20±337.42 ²⁾ | 926.36±30.38 ²⁾ | 1 340.80±406.92 | 1 756.30±488.65 | 1 644.20±378.67 | 916.09±21.21 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 1 573.40±330.26 ²⁾ | 973.95±27.11 ^{2,4)} | 1 138.80±260.92 | 1 774.00±691.83 | 1 484.20±350.71 | 995.96±30.68 ^{2,4)} |
| 后注射LPS组 | 1 969.25±477.00 ²⁾ | 1 008.86±27.36 ^{2,4,5)} | 1 114.10±148.82 | 1 352.88±274.54 | 1 422.70±238.90 | 1 013.02±34.53 ^{2,4)} |

表6 大鼠血液流变学指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 6 Comparison of hemorheological indexes in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

mPa · s

| 组别 | 3 h | | | | 24 h | |
|---------|----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 低切/5 s ⁻¹ | 中切/60 s ⁻¹ | 高切/150 s ⁻¹ | 血浆/100 s ⁻¹ | 低切/5 s ⁻¹ | 中切/60 s ⁻¹ |
| 假手术组 | 9.24±1.68 | 4.61±0.49 | 4.06±0.37 | 1.26±0.10 | 9.32±0.63 | 4.63±0.27 |
| 单纯结扎组 | 9.79±1.01 | 4.72±0.34 | 4.12±0.28 | 1.25±0.03 | 11.76±1.73 ²⁾ | 5.42±0.44 ²⁾ |
| 先注射LPS组 | 9.84±1.97 | 4.74±0.71 | 4.14±0.58 | 1.29±0.10 | 10.77±0.83 ²⁾ | 5.19±0.25 ²⁾ |
| 后注射LPS组 | 9.70±2.07 | 4.66±0.71 | 4.07±0.57 | 1.27±0.06 | 12.07±0.40 ^{2,6)} | 5.59±0.34 ^{2,5)} |

| 组别 | 24 h | | 72 h | | | |
|---------|---------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | 高切/150 s ⁻¹ | 血浆/100 s ⁻¹ | 低切/5 s ⁻¹ | 中切/60 s ⁻¹ | 高切/150 s ⁻¹ | 血浆/100 s ⁻¹ |
| 假手术组 | 4.07±0.23 | 1.30±0.07 | 8.61±1.10 | 4.44±0.43 | 3.94±0.36 | 1.25±0.02 |
| 单纯结扎组 | 4.68±0.33 ²⁾ | 1.33±0.03 | 11.17±0.63 ²⁾ | 5.24±0.23 ²⁾ | 4.55±0.19 ²⁾ | 1.33±0.14 |
| 先注射LPS组 | 4.14±0.58 ²⁾ | 1.29±0.10 | 10.73±0.66 ²⁾ | 5.06±0.27 ²⁾ | 4.39±0.24 ¹⁾ | 1.30±0.07 |
| 后注射LPS组 | 4.84±0.34 ^{2,5)} | 1.36±0.05 | 11.67±0.49 ^{2,6)} | 5.56±0.25 ^{2,3,6)} | 4.84±0.24 ^{2,3,6)} | 1.36±0.06 ²⁾ |

造模72后平均聚集率明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表7。

表7 大鼠血小板聚集率变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 7 Changes of platelet aggregation rate in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

%

| 组别 | 3 h | | 24 h | | 72 h | |
|---------|--------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | MAR | AAR | MAR | AAR | MAR | AAR |
| 假手术组 | 66.11±11.17 | 50.46±5.80 | 62.33±15.71 | 51.53±15.04 | 70.36±9.96 | 52.78±10.02 |
| 单纯结扎组 | 71.10±8.71 | 57.28±11.13 | 78.38±7.58 ²⁾ | 64.83±12.61 ¹⁾ | 79.61±9.47 ¹⁾ | 62.85±10.91 ¹⁾ |
| 先注射LPS组 | 77.82±8.50 ¹⁾ | 59.69±14.19 | 81.49±8.69 ²⁾ | 72.20±14.54 ²⁾ | 84.27±6.55 ²⁾ | 73.18±13.68 ^{2,3)} |
| 后注射LPS组 | 71.69±7.83 | 55.91±11.01 | 85.73±5.95 ^{2,3)} | 78.31±8.80 ^{2,3)} | 81.96±7.07 ²⁾ | 66.23±15.04 ¹⁾ |

3.9 各组大鼠凝血指标比较 造模3 h后,与假手术组比较,先注射LPS组、后注射LPS组PT水平明显降低($P<0.05, P<0.01$),且3个模型组中后注射LPS组PT水平最低。造模24 h后,与假手术组比

较,3个模型组PT、TT水平均明显降低($P<0.05, P<0.01$),APTT水平仅后注射LPS组明显降低($P<0.05$)。3个模型组的FIB水平在造模24、72 h后,与假手术组比较显著增高($P<0.01$)。见表8。

表8 大鼠凝血四项指标比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Comparison of four indexes of coagulation in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | | | | 24 h | |
|---------|----------------------------|------------|-----------------------|------------|--------------------------|----------------------------|
| | PT/s | APTT/s | FIB/g·L ⁻¹ | TT/s | PT/s | APTT/s |
| 假手术组 | 14.27±0.77 | 21.10±0.78 | 2.00±0.16 | 29.39±0.87 | 13.61±0.73 | 31.13±6.49 |
| 单纯结扎组 | 13.77±0.96 | 20.76±0.99 | 2.01±0.12 | 29.12±1.58 | 12.73±0.61 ²⁾ | 27.99±5.06 |
| 先注射LPS组 | 13.55±0.58 ¹⁾ | 21.98±1.67 | 2.10±0.20 | 29.17±0.97 | 13.00±0.41 ¹⁾ | 32.03±7.32 |
| 后注射LPS组 | 13.09±0.61 ^{2,5)} | 20.62±0.92 | 2.03±0.06 | 29.07±0.57 | 12.62±0.62 ²⁾ | 24.99±5.89 ^{1,5)} |

| 组别 | 24 h | | 72 h | | | |
|---------|---------------------------|----------------------------|------------|------------|-------------------------|------------|
| | FIB/g·L ⁻¹ | TT/s | PT/s | APTT/s | FIB/g·L ⁻¹ | TT/s |
| 假手术组 | 3.08±0.25 | 26.48±0.61 | 14.78±0.55 | 33.95±3.56 | 2.16±0.25 | 28.53±3.47 |
| 单纯结扎组 | 3.42±0.12 ²⁾ | 25.40±0.48 ²⁾ | 14.43±0.86 | 33.56±3.15 | 2.58±0.12 ²⁾ | 26.56±0.97 |
| 先注射LPS组 | 3.45±0.19 ²⁾ | 24.98±1.20 ²⁾ | 15.01±1.05 | 34.31±1.71 | 2.53±0.28 ²⁾ | 26.35±0.98 |
| 后注射LPS组 | 3.57±0.17 ^{2,5)} | 24.76±0.50 ^{2,4)} | 14.36±0.57 | 36.24±4.32 | 2.55±0.25 ²⁾ | 27.18±1.10 |

3.10 各组大鼠白细胞计数变化 造模3 h后,3个模型组白细胞总数显著升高,24 h后持续升高,与假手术组比较均明显升高($P<0.05, P<0.01$),模型组中后注射LPS组的白细胞总数最高。造模72 h后,模型组白细胞总数较24 h降低,后注射LPS组与假手术组比较显著升高($P<0.01$)。见表9。

3.11 各组大鼠血清IL-1 β 、IL-6含量比较 造模3 h后,与假手术组比较,3个模型组血清IL-1 β 、IL-6含量均明显升高($P<0.05, P<0.01$);且后注射LPS组血清IL-1 β 含量显著高于单纯结扎组($P<0.01$)。造模24 h后,与假手术组比较,后注射LPS组血清IL-1 β 、IL-6含量增高明显($P<0.05, P<0.01$),先注射LPS组仅血清IL-1 β 含量明显升高($P<0.05$),单纯

表9 大鼠白细胞计数变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 9 Changes of white blood cell count in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | 24 h | 72 h |
|---------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 假手术组 | 6.75±0.70 | 7.22±1.35 | 6.42±1.36 |
| 单纯结扎组 | 8.67±1.88 ¹⁾ | 13.40±2.54 ^{2,5)} | 10.17±5.24 |
| 先注射LPS组 | 8.37±1.50 ¹⁾ | 10.47±1.81 ²⁾ | 9.27±3.48 |
| 后注射LPS组 | 9.87±1.18 ²⁾ | 13.50±2.58 ^{2,5)} | 13.12±3.96 ²⁾ |

结扎组仅血清IL-6含量明显升高($P<0.05$)。造模72 h后,与假手术组比较,单纯结扎组、后注射LPS组血清IL-1 β 、IL-6含量明显升高($P<0.05, P<0.01$);先注射LPS组仅IL-6含量增高明显($P<0.05$)。见表10。

表10 大鼠血清IL-1 β 、IL-6含量变化 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 10 Changes of serum IL-1 β and IL-6 in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 3 h | | 24 h | | 72 h | |
|---------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | IL-1 β | IL-6 | IL-1 β | IL-6 | IL-1 β | IL-6 |
| 假手术组 | 10.62±0.54 | 55.70±12.44 | 11.02±0.89 | 33.06±6.29 | 10.77±0.61 | 35.47±5.92 |
| 单纯结扎组 | 11.35±0.93 ¹⁾ | 75.64±14.52 ¹⁾ | 11.69±1.13 | 40.67±4.98 ¹⁾ | 12.20±1.76 ¹⁾ | 43.50±6.13 ¹⁾ |
| 先注射LPS组 | 13.13±2.89 ¹⁾ | 76.26±16.97 ¹⁾ | 13.69±3.21 ¹⁾ | 31.39±2.89 | 11.61±1.11 | 62.83±25.46 ¹⁾ |
| 后注射LPS组 | 12.91±1.12 ^{2,4)} | 75.33±12.86 ¹⁾ | 13.46±2.13 ^{2,3)} | 39.66±3.41 ¹⁾ | 12.93±1.30 ^{1,5)} | 51.35±11.00 ¹⁾ |

3.12 心肌缺血、梗死范围比较 心肌TTC-伊文思蓝染色结果显示各组缺血面积与心肌总面积比值稳定在30%左右,说明造模方法较稳定。在造模72 h后发现各模型组大鼠冠状动脉侧支循环已建立,注射伊文思蓝会导致心肌大面积蓝染,因此72 h未做伊文思蓝染色处理。假手术组心肌未见明显白色染色区,表明不存在心肌梗死发生。造模3、

24 h后,可见心肌组织有白色染色区,后注射LPS组与单纯结扎组、先注射LPS组梗死面积比较均明显增高,差异有明显统计学意义($P<0.05, P<0.01$);造模72 h后,后注射LPS组梗死面积比较单纯结扎组、先注射LPS组有增高趋势,但差异无统计学意义。见表11、图3。

3.13 各组大鼠心肌HE染色结果 造模3 h后,各

表 11 大鼠心肌缺血、梗死面积百分比 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 11 Percentage of myocardial ischemia and infarct size in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

%

| 组别 | 3 h | | 24 h | | 72 h | |
|-----------|------------|--------------------------|------------|------------------------------|---------|------------------------------|
| | 心肌缺血面积比 | 心肌梗死面积比 | 心肌缺血面积比 | 心肌梗死面积比 | 心肌缺血面积比 | 心肌梗死面积比 |
| 假手术组 | 35.48±5.65 | 0.00±0.00 | 29.05±4.09 | 0.00±0.00 | - | 0.00±0.00 |
| 单纯结扎组 | 32.48±7.55 | 9.00±6.38 ²⁾ | 27.97±4.69 | 13.72±5.87 ²⁾ | - | 16.25±7.91 ²⁾ |
| 先注射 LPS 组 | 32.71±6.42 | 10.90±5.32 ²⁾ | 29.00±6.78 | 17.42±5.87 ²⁾ | - | 16.14±5.15 ²⁾ |
| 后注射 LPS 组 | 33.48±6.43 | 18.15±7.64 ²⁾ | 30.58±5.48 | 23.57±8.64 ^{2,4,6)} | - | 20.97±7.01 ^{2,4,5)} |

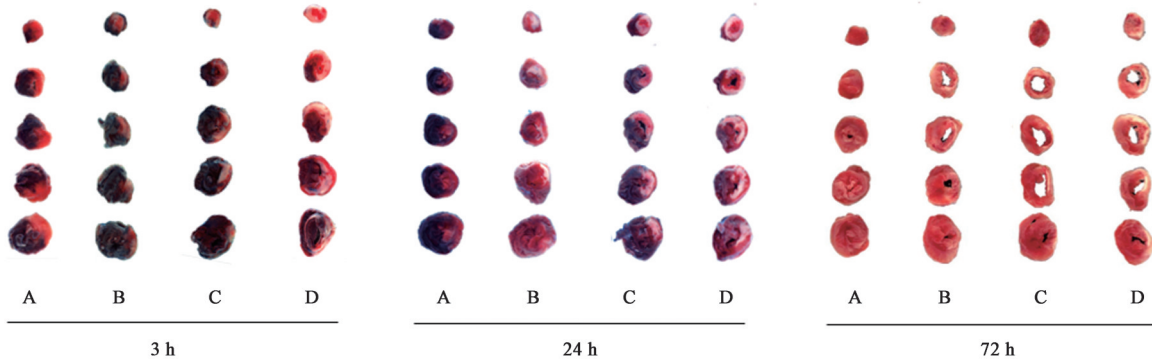


图 3 大鼠心肌缺血、梗死面积

Fig. 3 Area of myocardial ischemia and infarct size in rats

组心肌纤维间隙略增宽,有极少量炎细胞浸润,组间差别不大。造模 24 h 后,假手术组病变情况大致同 3 h 组;单纯结扎组心肌纤维排列紊乱,间隙见炎细胞浸润;先注射 LPS 组与后注射 LPS 组心肌炎症累计范围较单纯结扎组扩大。造模 72 h 后,假手术

组心肌纤维排列整齐紧凑,血管可见扩张出血;单纯结扎组出现局灶心肌纤维坏死,纤维组织、小血管增生,淋巴细胞和中性粒细胞浸润,先注射 LPS 组心肌梗死面积较单纯结扎组扩大,后注射 LPS 组病变较先注射 LPS 组稍重。见图 4。

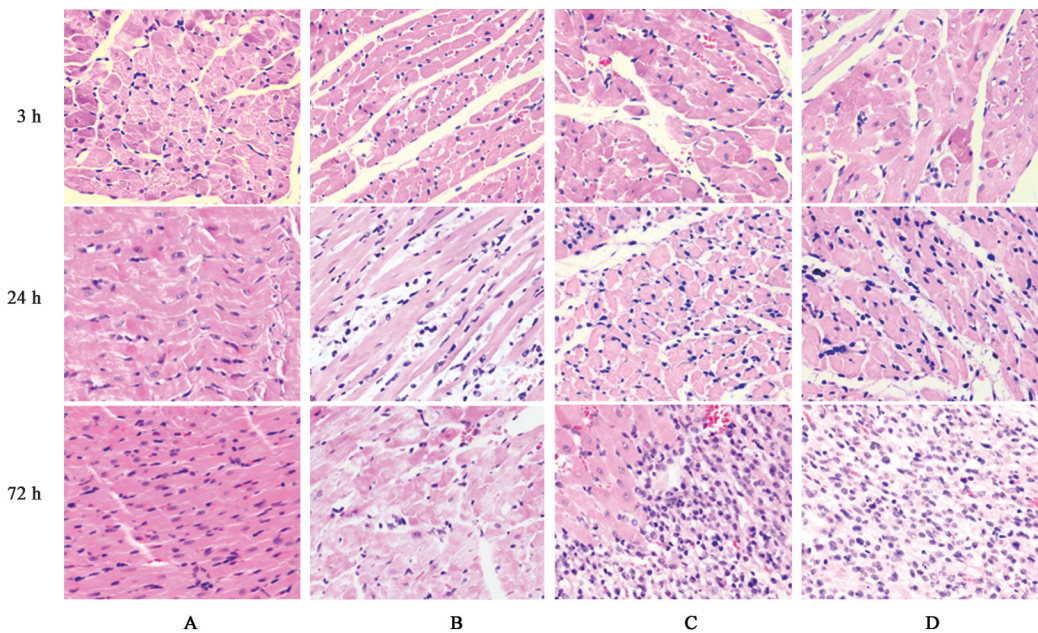


图 4 大鼠心肌组织病理变化 (HE, ×400)

Fig. 4 Pathological changes of myocardium in rats (HE, ×400)

4 讨论

辨证论治、四诊合参是中医临床诊疗的重要模

式,也是证候本质研究的关键手段。在探寻证候实质、深化机制研究的过程中,动物模型是重要

的工具和载体^[14]。单纯中医证候模型多从病因入手,但稳定性较弱;西医常规动物模型虽明确针对病理损害特征,稳定性好,方法成熟,但其缺乏中医辨证思想,难以呈现中医特定证候特征^[15-16]。病证结合动物模型复合“病”与“证”特征信息在同一动物身上的模拟,相较于单纯“病”或单纯“证”模型更具说服力^[17]。本研究采用先后施加病因与证因的方式,将导致ACS与瘀毒互结证的因素先后叠加于实验大鼠身上并加以对比,结果表明,先病后证的造模方式更贴近于临床实际发病表征。

现代医学认为瘀毒互结证的“瘀”为瘀滞内结之血,涉及血液流变性改变、血小板聚集率增高等;“毒”为脏腑功能失调,气血运行失常而在体内产生的生理病理产物蕴结之内毒,在冠心病发病过程中机体出现炎性介质增加、自由基和代谢物质堆积、血管活性物质过度释放、氧化应激异常等,一定程度上符合“内生毒邪”的致病特点^[6]。在ACS瘀毒互结证的整个发病环节中,内毒起到了至关重要的作用,其既是瘀血日久不化所导致的产物,又是损络耗阴、壅遏气机、加重血脉凝滞,引起急性心血管事件的关键诱因。LPS具有致炎作用和热原活性,属于中医的热邪、毒邪。临床研究发现感染、LPS及其产生的炎症反应等在脑中风、冠心病以及静脉血栓等疾病的发病过程中均起着重要作用,动物实验中也常使用LPS诱导血栓、热毒证及脓毒症心肌病等模型^[12,18-19]。瘀毒互结证是在“瘀血内阻”基础上,出现“毒”邪致病的症状,表现为“热毒蕴结”的病机特点^[6]。因此,本研究使用冠脉结扎模拟“血脉瘀阻”,使用LPS模拟“内生毒邪”制备ACS瘀毒互结证动物模型具有理论依据和临床相关性。

本课题组前期提出了中医证候模型“拟临床研究”的思路与方法,即使用临床实验方法研究中医证候模型动物的疾病规律及其演化过程^[20]。本研究基于“拟临床研究”的思路,将参照临床研究得出的瘀毒互结证中医证候特征以实验室客观指标的形式表现,构建人与模型大鼠的四诊转换模式,客观、系统性评价模型的证候体系^[21]。本研究将心电图变化、超声心动图检测的心功能相关指标、心肌梗死面积百分比作为胸痛、心悸主症的表征;将凝血四项、血小板聚集率、血液流变学变化作为“血瘀”的评价指标,将血清炎症因子IL-1 β 、IL-6水平及血液白细胞总数作为“内毒”的评价指标,并结合cTnT、CK、LDH、CK-MB水平、心肌组织病理变化与舌象、脉象、毛发、精神状态分析进行综合评价。

结果表明,造模24 h后,单纯冠脉结扎方式建立的模型在舌面色彩RGB值、舌下络脉、脉搏幅度、心脏功能、心肌坏死与损伤、血瘀指标与血清炎症因子水平方面均有明显的影响,使舌面RGB值降低,舌下络脉扩张变紫,心脏射血能力减弱,部分心肌梗死,脉搏幅度降低,血清炎症因子含量升高,白细胞总数增多,血瘀情况部分加重。造模24 h后,通过冠脉结扎后注射LPS方式建立的模型对上述指标均产生更严重的影响,体现了“因瘀致毒,因毒致变”的病机关系。舌诊对于急性冠脉综合征瘀毒互结证的诊断具有重要的意义,临床上常通过望舌络来判断“瘀毒”的深浅程度;冠脉结扎后注射LPS组大鼠舌面RGB值大幅降低,舌下络脉扩张非常明显且颜色紫暗,较好的诠释了“舌青紫,舌下络脉怒张、色紫暗”的临床舌象特征。脉诊对于辨证有特殊的意义,是评价病证结合动物模型成功与否的关键性指标^[22];在“瘀毒互结”证的发展过程中,毒深则瘀愈重,“瘀”与“毒”互为因果,临床上ACS瘀毒互结证患者的脉象呈现出脉涩,及脉率迟缓、往来艰涩等血瘀特征;冠脉结扎后注射LPS组大鼠的脉搏幅度显著性降低,且低于其他模型组,脉搏幅度减弱也属于涩脉的特征,表明“瘀毒”程度最深,瘀阻血脉严重,血运不充盈、不流利,符合“脉涩”的临床表征^[7,23]。冠脉结扎前注射LPS方式制备的模型虽然舌象、脉象特征与冠脉结扎后注射LPS组模型近似,但其他指标检测呈现出得结果不如冠脉结扎后注射LPS组严重。急性冠脉综合征瘀毒互结证具有发病急骤、病情严重的特点,因此,造模方式对各项指标的影响程度也是筛选优效模型的一个考虑因素。本研究选用的3种造模方式中,先结扎冠脉后注射LPS的方法可以较好的呈现ACS瘀毒互结证的病理与病因特征,成功建立动物模型。

在疾病不同阶段会出现不同的证候表现,“证”并非游离于“病”之外,两者实质上相互依存,共同发展变化^[24-25]。基于此,本研究设定3个造模时间点,动态观察3个模型在不同时间窗下呈现出的证候特征来评价证型,从而确立更加可靠的模型。结果表明,造模3 h后,血清IL-1 β 、IL-6水平显著升高,CK、CK-MB水平达到峰值,但心肌病理损伤轻微,血液流变学、血小板聚集率、凝血四项这些提示血瘀表现的指标无显著性变化,未呈现出“瘀血内阻”的特征;造模72 h后,虽舌、脉特征与瘀毒互结证的临床表现吻合度高、cTnT含量依旧升高,但炎症因子水平降低,CK、CK-MB、LDH水平已恢复正常,不

完全符合“毒”邪的酷烈性特征;造模24 h后,血瘀指标与炎症指标均明显改变,CK、CK-MB、LDH、cTnT水平仍处于较高水平,心肌损伤严重,同时符合急性冠脉综合征瘀毒互结证在“瘀”和“毒”两方面的证候特征及疾病病理特点。

综上,从多方面的模型评价考虑,冠脉结扎后注射LPS、造模24 h的方式是建立急性冠脉综合征瘀毒互结证大鼠模型的首选方法。后期实验将根据方证相应理论,结合有效方药对本实验建立的模型进行反向验证,通过用药后症状、体征及相应实验室指标的改善来证明本模型的证候属性,进一步评价模型的有效性、稳定性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 方子寒,谢盈或,张军平. 急性冠状动脉综合征中医诊治概述[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1852-1855.
- [2] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等. 《中国心血管病报告2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 6-17.
- [3] YILDIRIM A, LUBBERS H T, YILDIRIM A. Acute coronary syndrome [J]. Swiss Dent J, 2017, 127(1): 38-39.
- [4] 李鑫辉,李雅婧,杜建芳,等. 从“热瘀互结、毒损心营”论治急性冠脉综合征经验[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 103-105.
- [5] 徐浩,史大卓,殷惠军,等. “瘀毒致变”与急性心血管事件:假说的提出与临床意义[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(10): 934-938.
- [6] 刘龙涛,陈可冀,付长庚,等. 从“因瘀致毒”谈冠心病的病因病机[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(11): 1378-1380.
- [7] 李晓雅,王松子,孙卓,等. 以“因瘀致毒,瘀毒互结致变”理论诊治冠心病经验[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(10): 1248-1250.
- [8] 陈浩,高铸焯,徐浩,等. 活血解毒中药配伍干预介入后不稳定型心绞痛的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(10): 3.
- [9] 赵雨薇,付建华,李磊,等. 双参宁心胶囊通过调控线粒体ATP敏感性钾通道减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 104-110.
- [10] 黄烁,刘建勋,李磊,等. 4种冠心病气虚血瘀证大鼠模型建立方法的比较[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4216-4225.
- [11] 黄烁,任建勋,王少辰,等. 冠心病气虚血瘀证大鼠模型的建立[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1699-1705.
- [12] 梁爱华,刘婷,李春英,等. 一种热毒诱导的血栓形成动物模型的建立[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(18): 2124-2128.
- [13] 林筱洁,万浩宇,李志威,等. 丹红注射液对缺血性中风大鼠舌象的干预研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(5): 5.
- [14] 秦俊莲,宋建平. 病证结合模型与中医实验研究. 中医杂志, 2003, 44(8): 636.
- [15] 王靖怡,高嘉良,王阶. 病证结合动物模型研究概述[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(7): 2160-2165.
- [16] 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.
- [17] 陈燕清,杨晶晶,曹卓青,等. 病证结合动物模型的思考[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 628-629, 705.
- [18] 黎同明,邓敏贞. 脉络宁注射液对脂多糖与角叉菜胶诱导热毒血瘀证模型大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013.
- [19] 王惠. microRNA-21-3p通过靶基因SORBS2调控LPS诱导的脓毒症心肌病[D]. 南京:南京医科大学, 2016.
- [20] 刘建勋,李欣志,任建勋. 中医证候模型拟临床研究概念的形成及应用[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1772-1776.
- [21] 陈可冀,史大卓,徐浩,等. 冠心病稳定期因毒致病的辨证诊断量化标准[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(3): 313-314.
- [22] 王滨,牛欣,文仁都,等. 中医脉诊研究思路与脉诊动物模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(1): 22-24.
- [23] 刘甜甜,段锦龙,张良登,等. 经方整合论治急性冠脉综合征[J]. 环球中医药, 2019, 12(11): 4.
- [24] 钟森杰,李静,李琳,等. 病证结合动物模型研究思路述评[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 4.
- [25] 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.

[责任编辑 孙丛丛]