

多因素复合建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型的探讨

王磊沙, 徐立, 宋文婷, 刘建勋, 王光蕊, 王敏, 李军梅, 李鸿海, 林成仁*
(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)

[摘要] **目的:**通过多因素复合建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型,研究多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型的建立方法。**方法:**将大鼠随机分为假手术组、多发性脑梗死模型组(脑梗组)和 3 个病证结合模型组——力竭游泳复合多发性脑梗死组(游泳+脑梗组),睡眠剥夺复合多发性脑梗死组(睡夺+脑梗组),力竭游泳加睡眠剥夺复合多发性脑梗死组(游泳+睡夺+脑梗组)。3 个病证结合模型组大鼠先分别采用相应因素(力竭游泳和睡眠剥夺)造模 10 d,然后行多发性脑梗死手术,术后继续采用相应因素造模 10 d;脑梗组大鼠只进行多发性脑梗死手术;术后第 11 天观察各组大鼠一般状态,采集中医证候指标(体重、抓力、脉搏、舌象等)和西医生化指标(血液流变学、凝血 4 项等)。**结果:**与假手术组比较,睡夺+脑梗组大鼠活动量减少、体重减轻、抓力下降,脉搏幅度减弱,舌面 R,G,B 值降低,全血黏度增加凝血酶原时间(PT)或活化部分凝血酶原时间(APTT)缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),且较其他组指标变化明显。**结论:**通过中医证候指标和西医生化指标综合分析,睡眠剥夺复合多发性脑梗死的方法优于其他 3 个造模方法,更适合建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型。

[关键词] 中风;多发性脑梗死;气虚血瘀;睡眠剥夺;力竭游泳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0105-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080105

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0906.012.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 9:06

Establishment of Rodent Model: Multiple Cerebral Infarction Combined with Qi-deficiency and Blood-stasis Syndrome in Rats

WANG Lei-sha, XU Li, SONG Wen-ting, LIU Jian-xun, WANG Guang-rui,
WANG Min, LI Jun-mei, LI Hong-hai, LIN Cheng-ren*

(Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a multifactor composite model with cerebral infarction with Qi-deficiency and blood-stasis syndrome in rats. **Method:** Rats were randomly divided into 5 groups, namely sham operation group, multiple cerebral infarction group, multiple cerebral infarction combined with exhaustive swimming group, multiple cerebral infarction combined with sleep deprivation group, multiple cerebral infarction combined with both exhaustive swimming and sleep deprivation group and sham group. Rats of the three syndromes combined model groups were provided with the corresponding factors (sleep deprivation and exhaustive swimming) for 10 days. Then, the rats received multiple cerebral infarction surgery. After the surgery, sleep deprivation and exhaustive swimming were continuously implemented for another 10 days. The rats of multiple cerebral infarction group only received multiple cerebral infarction surgery. At the 11th day after the surgery, general status, body weight, grasping strength of fore limb, pulse, tongue picture, hemorheology and four items of blood coagulation were observed and assayed. **Result:** Body weight, grasping strength of fore limb, pulse intensity, and RGB value

[收稿日期] 20161212(016)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2015CB554405);中国中医科学院科技创新团队建设项目(YS1303)

[第一作者] 王磊沙,在读硕士,从事脑血管药理学研究,Tel:010-62835610,E-mail:wangleisha2012@163.com

[通讯作者] *林成仁,研究员,从事心脑血管药理学研究及新药研发,Tel:010-62835611,E-mail:chengren1230@sina.com

of tongue surface were decreased, while the whole blood viscosity increased, and prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) shortened in multiple cerebral infarction combined with sleep deprivation groups compared with sham operation group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with more obvious changes in indexes than other groups. **Conclusion:** Through comprehensive analysis of traditional Chinese medicine syndromes (weight, grasping strength of fore limb, tongue, pulse) and western medicine biochemical indexes, the method of multiple cerebral infarction combined with sleep deprivation is superior to the other three modeling methods, and more suitable to establish a rat model with cerebral infarction with Qi-deficiency and blood-stasis syndrome.

[Key words] stroke; multiple cerebral infarction; Qi-deficiency and blood-stasis; sleep deprivation; exhaustive swimming

中风一直是威胁人类生命健康的重要疾病之一。西医称中风为脑卒中,按照其性质可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两大类,缺血性脑卒约占脑卒中病人总数的五分之四^[1],其中多发性脑梗死(MCI)最为常见^[2]。中医对中风辨证分型有 7 种,其中气虚血瘀证所占比例较高^[3]。建立一种规范化的疾病动物模型是认识人类疾病的发生发展规律,研究防治措施的有效手段。病证结合动物模型融合了现代医学病理学动物模型和中医证候动物模型两者共同的特点和因素,使模型动物同时具有西医疾病和中医证候的特征,是阐明中医基础理论、辨证论治关系、全面客观反映中药药效作用较为理想的载体^[4]。本文依据对多发性脑梗死气虚血瘀证病因、病机的认识,根据中医“劳则气耗”的理论,选取睡眠剥夺和力竭游泳两种疾病诱因,复合多发性脑梗死手术来建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型,并对所建模型进行了初步评价和分析,探讨建立该病证结合动物模型的最佳方法。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 47 只,体重(210 ± 10) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001。本研究获得西苑医院实验动物伦理委员会批准。

1.2 试剂 荧光微球(UVPMS-BY2,美国 Cospheric 公司,批号 100309-7),水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20131027),异氟烷(鲁南贝特制药有限公司,批号 H20020267);凝血酶原时间(PT),活化部分凝血酶原时间(APTT),凝血酶时间(TT),纤维蛋白原(FIB)试剂盒(上海长岛技术有限公司提供,批号分别为 1507012,1509026,1508044,1509008)。

1.3 仪器 MouseOx 型小动物无创脉搏血氧仪(美国 Starr Life Science Inc 公司),YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪(北京众实迪科技发展有限公司),

LBY-N6C 型全自动血液流变仪(北京普利生仪器有限公司),ICE-CL31R 型低温离心机(美国 Thermo 公司),COALAB1000 型血凝仪(德国 LABiTec 公司),ES-1100 型电子天平(长沙湘平科技发展有限公司),D90 型单反相机(日本 Nikon 公司),Adobe Photoshop CS5 软件,水环境小平台盒(自制)。

2 方法

2.1 动物分组 将大鼠随机分为 5 组,分别为假手术组(7 只),多发性脑梗死模型组(10 只)和 3 个病证结合模型组-力竭游泳复合多发性脑梗死组(10 只),睡眠剥夺复合多发性脑梗死组(10 只),力竭游泳加睡眠剥夺复合多发性脑梗死组(10 只)。

2.2 造模方法 假手术组大鼠和脑梗组大鼠正常饲养 10 d 后,分别进行假手术和多发性脑梗死手术,术后继续正常饲养 10 d;3 个病证结合模型组大鼠先分别采用相应因素(力竭游泳和睡眠剥夺)造模 10 d,然后行多发性脑梗死手术,术后继续采用相应因素造模 10 d。

2.2.1 睡眠剥夺方法 参考文献[5]中“水环境小平台法”并进行改进,将大鼠放入水深 3.5 cm 的水环境小平台盒里,每个盒里有 6 个小平台(直径 6 cm,高 4 cm),每盒放 5 只大鼠,用带有食槽的铁丝网盖住,大鼠不能逃脱但可以自由进食饮水,每天睡眠剥夺 16 h(每天 16 点至次日 8 点)后取出,回笼,正常饮食饮水。

2.2.2 负重力竭游泳方法 参考文献[6],在大鼠尾巴根部绑定重物,重物质量为大鼠体重的 5%,水深 50 cm,水温 23 ℃,使大鼠游泳至全身力竭(鼻头沉入水下 10 s 以上),及时捞出,用毛巾擦干大鼠身上的水,回笼,正常饮食饮水。

2.2.3 假手术及多发性脑梗死造模方法 参照文献[7],4% 水合氯醛腹腔注射(400 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠,颈部正中切口,分离颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。用动脉夹夹闭颈总动脉,颈外动脉的远心

端用线结扎,用注射器从颈外动脉向颈内动脉注入荧光微球 0.1 mL,微球经由颈内动脉分散至大脑各动脉。假手术组大鼠则从颈外动脉向颈内动脉注入生理盐水 0.1 mL。松开动脉夹,将颈外动脉近心端结扎,逐层缝合伤口,回笼正常饲养,术后 24 h 进行神经功能缺陷评分,淘汰死亡,0 分及 4 分大鼠,1~3 分为多发性脑梗死模型建造成功。

2.3 指标检测

2.3.1 一般状态观察 术后第 11 天,静态条件下观察各组大鼠的精神状态、被毛、饮食活动、体重变化、二便等一般状态。

2.3.2 神经功能缺陷评分 分别于术后 24 h 和术后第 11 天,采用 Zea Longa 评分标准^[8]进行评分,0 分为无神经功能缺失症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向外侧转圈即出现追尾现象;3 分为向对侧倾倒;4 分为意识丧失,不能自行行走。

2.3.3 抓力测定 术后第 11 天,大鼠平静状态下,右手抓取大鼠按放在抓力板上,左手向前推住抓力板,然后右手滑至大鼠尾部,左手轻轻松开抓力板,抓力板随右手拉鼠尾的力量向前滑行,待大鼠用力抓住抓力板时及时加力后拉,测取抓力,每只大鼠测量 3 次,取平均值。

2.3.4 脉搏幅度测定 术后第 11 天,2% 异氟烷进行持续气体麻醉,使用 MouseOx 小动物无创脉搏血氧仪对大鼠脉搏幅度进行检测,每次每只记录 10 个有效数据,取平均值。

2.3.5 舌面图像采集及色彩饱和度分析 术后第 11 天,参考文献^[9]方法,按照国际照明委员会 CIE 推荐的照明标准,选用 45/0 (照明/观察)的照明几何条件,相机用三脚架固定高度和角度,镜头与舌体保持恒距 15 cm,应用灰卡手动设定白平衡,相机拍摄条件参数设定如下:手动(M)档,自动对焦,光圈 F8,快门 1/80 s,ISO400。大鼠用 2% 异氟烷进行气体麻醉,用弯镊将其舌头夹出,拍照时比色卡与舌面始终保持在同一平面。最后使用 Adobe Photoshop CS5 软件处理图像,选取舌面同一区域固定 3 个点,分别读取像素区域的 R (红色),G (绿色)及 B (蓝色)分量值,取平均值。

2.3.6 脑表面荧光微球分布及脑切片梗死灶观察 术后 24 h,随机选取假手术组和造模组大鼠各 1 只,4% 水合氯醛腹腔注射麻醉,断头取脑,在紫外灯照射下,用相机拍摄大鼠大脑表面,观察荧光微球分布情况;同时将大脑沿冠状切成 5 片,进行 TTC 染色,观察脑片多发性脑梗死灶分布情况。

2.3.7 血液流变学检测 术后第 11 天,4% 水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,肝素抗凝,使用全自动血液流变仪检测血液的全血黏度和血浆黏度。

2.3.8 凝血 4 项检测 术后第 11 天,4% 水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,3.8% 枸橼酸钠抗凝,设置 1 600 × g 离心 10 min,取上清血浆,按照 PT,APTT,TT,FIB 试剂盒说明书使用血凝仪检测血液凝血 4 项指标。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性检验采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状态观察 假手术组大鼠精神状态和活动正常,毛发顺且有光泽,舌面呈粉嫩色,二便正常;脑梗组大鼠体型正常,活动量少,毛发枯黄欠光泽,舌面暗红,二便正常;游泳 + 脑梗组大鼠体形偏瘦,有疲倦表现,活动量少,毛发枯黄无光泽,舌面暗淡,大便松散;睡夺 + 脑梗组大鼠目光呆滞,倦卧蜷缩,自主活动明显减少,体型瘦小,毛发直立枯黄无光泽,舌面呈暗紫色,且散步瘀点,舌下脉络清晰粗大呈暗紫色,大便稀;游泳 + 睡夺 + 脑梗组大鼠一般状态与睡夺 + 脑梗组大鼠相近。

3.2 各组大鼠体重比较 与假手术组比较,脑梗组体重无显著性差异,3 个病证结合模型组体重均显著下降 ($P < 0.01$);与脑梗组比较,3 个病证结合模型组体重均显著下降 ($P < 0.01$);与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组、游泳 + 睡夺 + 脑梗组体重下降,但无统计学意义;与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组体重无明显差异。见表 1。

表 1 各组大鼠体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重/g
假手术	6	338.5 ± 10.7
脑梗	7	330.6 ± 10.9
游泳 + 脑梗	7	293.0 ± 14.0 ^{2,4)}
睡夺 + 脑梗	6	279.5 ± 26.7 ^{2,4)}
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	273.8 ± 19.8 ^{2,4)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与脑梗组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与游泳 + 脑梗组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与睡夺 + 脑梗组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$ (表 2~7 同)。

3.3 神经功能缺陷评分 与假手术组比较,各模型组术后 24 h 及术后 10 d 均存在神经功能缺陷 ($P < 0.01$),各模型组之间比较,各组大鼠神经功能缺陷评分无显著性差异。见表 2。

表 2 各组大鼠神经功能缺陷评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后 24 h	术后 10 d
假手术	6	0	0
脑梗	7	2.29 ± 0.76 ²⁾	1.43 ± 0.54 ²⁾
游泳 + 脑梗	7	2.14 ± 0.69 ²⁾	1.57 ± 0.54 ²⁾
睡夺 + 脑梗	6	2.17 ± 0.75 ²⁾	1.83 ± 0.41 ²⁾
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	2.33 ± 0.82 ²⁾	1.67 ± 0.52 ²⁾

3.4 各组大鼠抓力比较 与假手术组比较,各模型组抓力均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$);与脑梗组比较,游泳 + 脑梗组抓力下降,但无统计学意义,睡夺 + 脑梗组和游泳 + 睡夺 + 脑梗组抓力均显著下降($P < 0.01$);与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组和游泳 + 睡夺 + 脑梗组抓力均显著下降($P < 0.01$);与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组抓力升高,但无统计学意义。见表 3。

表 3 各组大鼠抓力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	抓力/g
假手术	6	1 786.03 ± 133.22
脑梗	7	1 599.60 ± 141.76 ¹⁾
游泳 + 脑梗	7	1 506.76 ± 155.61 ²⁾
睡夺 + 脑梗	6	979.55 ± 108.50 ^{2,4,6)}
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	1 074.20 ± 112.41 ^{2,4,6)}

表 5 各组大鼠舌面图像 R,G,B 值变化($\bar{x} \pm s$)

Table 5 R,G,B values of tongue surface in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	R	G	B
假手术	6	184.78 ± 4.73	90.44 ± 6.10	100.78 ± 5.43
脑梗	7	172.57 ± 2.72 ²⁾	79.76 ± 2.27 ²⁾	88.76 ± 2.88 ²⁾
游泳 + 脑梗	7	163.10 ± 4.50 ^{2,4)}	72.33 ± 4.97 ^{2,4)}	81.14 ± 5.05 ^{2,4)}
睡夺 + 脑梗	6	141.83 ± 8.84 ^{2,4,6)}	63.17 ± 3.27 ^{2,4,6)}	68.17 ± 9.00 ^{2,4,6)}
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	158.78 ± 7.30 ^{2,4,8)}	70.44 ± 5.93 ^{2,4,8)}	80.06 ± 7.74 ^{2,3,7)}

3.7 大鼠脑表面荧光微球分布及脑切片梗死灶观察 假手术组大鼠表面观正常,大鼠切片无梗死区域;模型组右侧大脑半球出现荧光微球散状分布,有局部坏死区,大鼠切片有面积不等的白色梗死区域。见图 1。

3.8 各组大鼠血液流变学比较 与假手术组比较,脑梗组在各切变率下的全血黏度有升高趋势,但无统计学意义;游泳 + 脑梗组在切变率 5 s⁻¹, 60 s⁻¹下的全血黏度明显升高($P < 0.05$);睡夺 + 脑梗组和游泳 + 睡夺 + 脑梗组在切变率 5 s⁻¹, 60 s⁻¹,

3.5 各组大鼠脉搏幅度比较 与假手术组比较,各模型组脉搏幅度均显著下降($P < 0.01$);与多发性脑梗死组比较,3 组病证结合模型组脉搏幅度均显著下降($P < 0.01$);与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组和游泳 + 睡夺 + 脑梗组脉搏幅度均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$);与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组脉搏幅度无明显差异。见表 4。

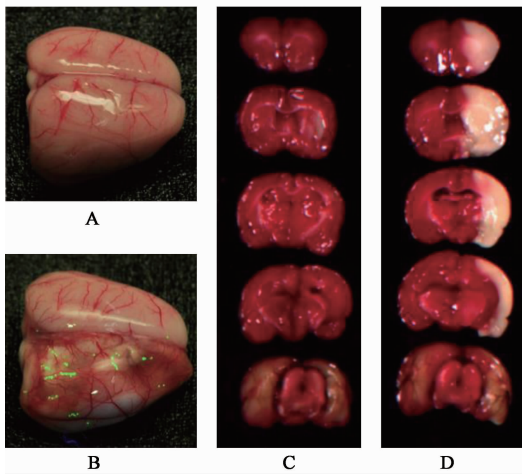
表 4 各组大鼠脉搏幅度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Rats pulse intensity in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脉搏幅度/ μm
假手术	6	252.34 ± 33.76
脑梗	7	143.87 ± 48.45 ²⁾
游泳 + 脑梗	7	71.66 ± 8.83 ^{2,4)}
睡夺 + 脑梗	6	49.79 ± 9.65 ^{2,4,6)}
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	54.71 ± 16.17 ^{2,4,5)}

3.6 各组大鼠舌面图像 R,G,B 值比较 与假手术组比较,各模型组舌面图像 R,G,B 值均显著下降($P < 0.01$);与多发性脑梗死组比较,3 组病证结合模型组舌面图像 R,G,B 均显著下降($P < 0.05, P < 0.01$);与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组舌面图像 R,G,B 值明显下降($P < 0.01$),游泳 + 睡夺 + 脑梗组舌面图像 R,G,B 值无显著性差异;与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组舌面图像 R,G,B 值显著上升($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

150 s⁻¹下的全血黏度均明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组在切变率 5 s⁻¹, 60 s⁻¹, 150 s⁻¹下的全血黏度明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),游泳 + 脑梗组血浆黏度明显降低($P < 0.05$)。与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组在切变率 5 s⁻¹, 60 s⁻¹, 150 s⁻¹下的全血黏度明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组在切变率 5 s⁻¹, 60 s⁻¹下的全血黏度均显著降低($P < 0.01$)。见表 6。



A. 假手术组脑表面荧光微球分布; B. 模型组脑表面荧光微球分布;
C. 假手术组脑切片梗死灶; D. 模型组脑切片梗死灶

图 1 大鼠脑表面荧光微球分布及脑切片梗死灶

Fig.1 Pictures of rat brain and infarction area distributed in rat brain slices

表 6 各组大鼠血液黏度变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Whole blood viscosity in each group ($\bar{x} \pm s$)

mPa·s

组别	n	全血黏度			血浆黏度/100 s ⁻¹
		低切/5 s ⁻¹	中切/60 s ⁻¹	高切/150 s ⁻¹	
假手术	6	15.74 ± 2.27	6.53 ± 0.47	4.84 ± 0.39	1.17 ± 0.04
脑梗	7	17.39 ± 4.06	7.25 ± 1.10	5.39 ± 0.77	1.20 ± 0.05
游泳 + 脑梗	7	18.53 ± 2.01 ¹⁾	7.24 ± 0.62 ¹⁾	5.26 ± 0.43	1.15 ± 0.02 ³⁾
睡夺 + 脑梗	6	25.63 ± 4.29 ^{2,4,6)}	9.28 ± 1.05 ^{2,4,6)}	7.74 ± 2.43 ^{1,3,5)}	1.17 ± 0.06
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	18.54 ± 1.44 ^{1,8)}	7.16 ± 0.38 ^{1,8)}	5.31 ± 0.22 ¹⁾	1.16 ± 0.07

表 7 各组大鼠凝血 4 项指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Four items of coagulation results in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/g·L ⁻¹
假手术	6	18.53 ± 1.88	24.18 ± 1.89	34.63 ± 1.34	2.09 ± 0.24
脑梗	7	17.11 ± 0.81	21.06 ± 1.48 ²⁾	34.43 ± 1.03	2.19 ± 0.23
游泳 + 脑梗	7	16.69 ± 1.09 ¹⁾	23.30 ± 2.90	34.21 ± 0.88	1.88 ± 0.16 ³⁾
睡夺 + 脑梗	6	15.12 ± 0.77 ^{2,4,5)}	23.92 ± 3.48	33.14 ± 0.96	1.98 ± 0.34
游泳 + 睡夺 + 脑梗	6	16.44 ± 0.76 ^{1,7)}	21.62 ± 0.99 ¹⁾	34.44 ± 0.78 ⁷⁾	1.86 ± 0.06 ³⁾

立气虚血瘀证候模型的时候应该先关注气虚。形成气虚的原因有 2 种,一是生成不足,主要是由于先天禀赋不足,或后天失养,或肺脾肾功能失调而导致;二是耗散太过,主要是由于劳倦内伤,久病不复等原因而导致。根据以上 2 个病因来建立气虚血瘀证候模型常用的方法有饥饿法^[11]、疲劳法^[12]、高脂饮食法^[13]、老龄鼠法^[14]等;其中疲劳法又分为躯体疲劳法和精神疲劳法。建立脑梗死疾病模型常用的方法有开颅闭塞法^[15]、栓塞法^[16]、线栓法^[17]等,其中采

3.9 各组大鼠凝血 4 项指标的比较 与假手术组比较,脑梗组 APTT 显著降低 ($P < 0.01$),游泳 + 脑梗组和睡夺 + 脑梗组 PT 明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),游泳 + 睡夺 + 脑梗组 PT, APTT 均明显降低 ($P < 0.05$)。与脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组 PT 显著降低 ($P < 0.01$),游泳 + 脑梗组和游泳 + 睡夺 + 脑梗组 FIB 均明显降低 ($P < 0.05$)。与游泳 + 脑梗组比较,睡夺 + 脑梗组 PT 明显降低 ($P < 0.05$)。与睡夺 + 脑梗组比较,游泳 + 睡夺 + 脑梗组 PT, TT 均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 7。

4 讨论

中医基础理论中将气血关系概括为气为血之帅,血为气之母。气能生血、气能行血、气能摄血。气的功能障碍,如气虚或气滞可引起血行不利,日久则可致血瘀。有研究表明,气虚血瘀证的特点为气虚为本发生于先,血瘀为标发生于后^[10]。所以在建

用栓塞法建立的多发性脑梗死大鼠模型,其病理特点与临床更为接近^[2]。本实验设计选取力竭游泳和睡眠剥夺 2 种造模方法,通过躯体疲劳和精神疲劳 2 种疾病诱因先使大鼠达到气虚血瘀的状态,然后复合西医病理模型造模方法-多发性脑梗死手术,使模型动物同时具有疾病与证候特征,且更符合疾病发病过程。

大鼠具备先天会游泳的能力,且在游泳过程中并无强烈反抗情绪,所以采用力竭游泳的方法是建

立身体疲劳的较好因素,并且游泳力竭时间经常被作为衡量大鼠疲劳程度的指标^[18]。睡眠是维持机体生理和心理正常活动的基本保证。长期睡眠不足会影响机体的行为和生理功能,增加全身系统性疾病,导致慢性疲劳综合征和认知功能衰退^[19]。睡眠剥夺常用水环境小平台法,该法使大鼠站立在圆形小平台上,平台高于水面,当大鼠进入异相睡眠阶段时,肌肉突然松弛而落入水中导致惊醒。目前关于睡眠剥夺模型的研究多集中于氧化应激和学习、记忆等领域,也有人采用此种方法来建立抑郁模型^[20-21],但大多数造模时间较短,致病因素只采用外因诱导方式,对于睡眠剥夺尤其是长时间睡眠剥夺与抑郁症的相互关系尚不明确。另外目前很多研究证明,短时间睡眠剥夺可以改善抑郁患者或抑郁动物的抑郁症^[22-23]。本研究对实验大鼠每天睡眠剥夺 16 h,共剥夺 20 d,造成长期慢性精神疲劳,又根据“久病则虚,大病则虚”的中医理论,在大鼠睡眠剥夺 10 d 后复合多发性脑梗死手术,从而达到病证结合的目的,这与该疾病临床发病机理和过程也比较接近。另外由于平台较小,大鼠长时间站立,也会造成肌肉疲劳,所以水环境小平台法是精神疲劳和身体疲劳 2 种方法的结合^[24]。

根据《中药新药临床研究指导原则》(试行),气虚血瘀型中风的主证主要为半身不遂,口舌歪斜,言语蹇涩或不语,感觉减退或消失;次证主要为面色㿗白,气短乏力,自汗出,舌质黯淡,舌苔白腻或有齿痕,脉沉细。本研究结合气虚血瘀型中风的中医证候诊断标准和实验动物本身特点,初步建立模型评价体系,包括主证(半身不遂):用神经功能缺损评分诊断大鼠半身不遂程度;兼证(气短乏力):用大鼠体重变化和抓力大小诊断大鼠是否瘦弱乏力;舌象(舌质黯淡):通过对舌面图像 R, G, B 值分析大鼠舌面色泽深浅;脉象(脉沉细):通过脉搏幅度诊断大鼠脉搏状态。同时结合大脑表观荧光微球堵塞血管情况、大脑切片梗死灶分布、血液流变学、凝血 4 项等多项指标,综合分析多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型建立的最佳造模方法。通过对各组之间多个指标综合比较分析,结果表明多发性脑梗死组和 3 个病证结合模型组均出现一定的气虚血瘀型中风症状,但是睡眠剥夺复合多发性脑梗死组较其他组症状表现更加明显,表现为蜷缩懒动,体重和抓力明显下降,脉搏幅度大幅减弱,舌面紫暗,这与临床上的主证和兼证相符;凝血 4 项和血液流变学的各项血瘀指标也说明该组模型较其他组更适于建立多

发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型。据文献报道,大鼠脑卒中后运动能促进血管再生和改善长期的神经功能预后,力竭游泳复合多发性脑梗死组及力竭游泳加睡眠剥夺复合多发性脑梗死组不如睡眠剥夺复合多发性脑梗死组指标变化明显可能与此有关^[25]。

综上所述,睡眠剥夺复合多发性脑梗死的方法优于其他 3 个造模方法,更适合建立多发性脑梗死气虚血瘀证大鼠模型。它融合了中医证候动物模型和西医病理动物模型 2 方面的特点,更加符合病证结合动物模型的特征及临床疾病发生发展的过程。但是由于中医疾病病因、病机的复杂性,接下来将通过增加阳性药物来进一步证明此模型的可靠性,还将通过神经递质检测、能量代谢研究等方法,来深入探讨气虚血瘀证多发性脑梗死大鼠模型发病过程中与气血相关的物质基础,以便为今后预防疾病的发生发展和改善疾病的预后治疗提供新的思路和新的靶点。

[参考文献]

- [1] 段云霞,陈小玉,张梓倩,等.缺血性脑卒中治疗药物研究进展[J].中央民族大学学报:自然科学版,2012,21(2):65-70.
- [2] 李冬梅,王戈.多发性脑梗塞动物模型的研究及分析[J].内蒙古中医药,2014,29(3):57-58.
- [3] 肖诗鹰,王永炎.论中风病可预防而不可预报[J].北京中医药大学学报,1995,18(6):2-5.
- [4] 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.
- [5] 杨茜,李峰,马捷,等.水环境小平台建立脾虚证大鼠模型及其评价[J].山东中医杂志,2016,35(5):452-457.
- [6] 苗明三,蒋美琼,张雪侠.参芪花粉片对大鼠运动性疲劳模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):177-179.
- [7] 徐立,林成仁,刘建勋,等.塞络通胶囊对多发梗死性痴呆大鼠认知功能障碍的干预作用[J].中国中药杂志,2012,37(19):29-43.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [9] 李磊,林成仁,任建勋,等.小型猪痰瘀互结证冠心病证候诊断研究[J].世界中医药,2013,8(10):1132-1136.
- [10] 王键,赵辉,李净,等.多因素复合制作气虚血瘀证脑缺血动物模型的实验研究[J].中国实验动物学报,2001,9(4):216-220.
- [11] 滕佳林,夏丽英,孙敬昌.黄芪配伍当归益气活血作

- 用的实验研究(三)一对气虚血瘀模型大鼠白细胞粘附性及粘附分子表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 4-5.
- [12] 黄烁, 任建勋, 王少辰, 等. 冠心病气虚血瘀症大鼠模型的建立[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1699-1705.
- [13] 庞树玲, 高金亮. 中年大鼠气虚血瘀证的模拟及其机制探讨[J]. 天津中医学院学报, 1997, 16(3): 28-30.
- [14] 赵瑛, 李蔚, 陆艳芹, 等. 天然慢性气虚血瘀模型的研究[J]. 中医药学报, 2005, 33(5): 28-30.
- [15] YANG D, Nakajo Y, Iihara K, et al. A logliptin, a dipeptidylpeptidase-4 inhibitor, for patients with diabetes mellitus type 2, induces tolerance to focal cerebral ischemia in non-diabetic, normal mice [J]. Brain Res, 2013, 1517(6): 104-113.
- [16] Durand A, Chauveau F, Cho T H, et al. Spontaneous reperfusion after in situ thromboembolic stroke in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50083.
- [17] ZUO X L, WU P, JI A M. Nylon filament coated with paraffin for intraluminal permanent middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Neurosci Lett, 2012, 508(1): 42-46.
- [18] 李晓勇, 靳文, 孙晓敏, 等. 构建复合因素致慢性疲劳大鼠模型及血生化动态变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(24): 4701-4704.
- [19] Orzel-Gryglewska J. Consequences of sleep deprivation [J]. Int J Occup Med Environ Health, 2010, 23(1): 95-114.
- [20] 李云, 周明眉, 苟小军, 等. 姜黄素对间歇性睡眠剥夺大鼠特定肠道菌的影响[J]. 中草药, 2016, 47(5): 794-798
- [21] 陈璐, 王震, 王雪敏. 连续 5 d 快速动眼睡眠剥夺诱发小鼠迟发性抑郁样行为[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(5): 660-664.
- [22] 冯飞, 许崇涛, 徐国建, 等. 快眼动睡眠剥夺对抑郁模型大鼠下丘脑 5-HT 和腺苷的影响[J]. 精神医学杂志, 2013, 26(5): 330-333.
- [23] 赵小赋, 王玉锋, 朱金富. 睡眠剥夺对抑郁模型大鼠海马 CREB 表达的影响[J]. 中国临床心理学杂志, 2012, 20(4): 461-464.
- [24] 孙福立, 李德明. 试用睡眠剥夺方法建立心虚证的动物模型[J]. 中国中西医结合杂志, 1987, 7(1): 35-37.
- [25] Gertz K, Priller J, Kronenberg G, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow [J]. Circ Res, 2006, 99(10): 1132-1140.

[责任编辑 周冰冰]