

冠心病心脾阳虚证动物模型的建立及附子理中汤的反证效果

陈桦¹, 唐汉庆^{2*}, 李晓华², 朱晓莹²

(1. 惠州卫生职业技术学院, 广东 惠州 516025; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

[摘要] **目的:**探索冠心病心脾阳虚证动物模型的建立方法并观察附子理中汤的对模型的反证效果。**方法:**100 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、附子理中汤低剂量、中剂量、高剂量组 5 组, 每组 20 只。模型组采用肩胛骨间棕色脂肪组织 (BAT) 切除术, 术后以高脂饲料喂养、隔日寒冷环境刺激连续 21 d, 从第 22 天开始脑垂体后叶素 ($10 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 皮下注射, 每天 1 次, 连续 7 d。第 29 天开始, 低剂量、中剂量、高剂量组在模型组基础上, 以附子理中汤分别按 10, 20, 40 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 每天 1 次, 连续 7 d。观察大鼠心功能、磷酸肌酸激酶、胆碱酯酶、甘油三酯、总胆固醇、体重和体温等的变化。**结果:**模型组大鼠有类似于冠心病血脂升高、心肌缺血损伤、心功能不全以及脾阳虚证形寒肢冷、纳少、消瘦、便溏及腹泻表现。与正常组和中剂量、高剂量组比较差异显著 ($P < 0.05$) 或高度显著 ($P < 0.01$)。**结论:**通过复合方式建立病证结合的冠心病心脾阳虚证动物模型是可行的。附子理中汤高剂量能一定程度改善冠心病心脾阳虚证动物模型病理变化。

[关键词] 冠心病; 脾阳虚证; 动物模型; 附子理中汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0224-04

[doi] 10.11653/syfy2013230224

Establishment of the Animal Model of Coronary Heart Disease due to Heart and Spleen Yang Deficiency Syndrome and Effects of Fuzi Lizhong Decoction Interference

CHEN Hua¹, TANG Han-qing^{2*}, LI Xiao-hua², ZHU Xiao-ying²

(1. Huizhou Health Vocational Technical Institute, Huizhou 516025, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the method of establishing the animal model of coronary heart disease due to heart and spleen Yang deficiency syndrome and observe the effects of Fuzi Lizhong decoction interference. **Method:** Hundred Wistar rats were randomly divided into control group, model group, Fuzi Lizhong decoction low-dose group, middle-dose group and high-dose group 5 groups with 20 rats in each group. The model group was applied by incising brown adipose tissue (BAT) then with high fatty diet and cold stimulation every other day for 21 days. From the 22nd day, the model group was given subcutaneous injection with pituitrin, once a day for 7 days and from the 29th day, low-dose group, middle-dose group and high-dose group were ig respectively with Fuzi Lizhong decoction ($10, 20, 40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) based on model group. Once a day for 7 days. To observe the changes of the cardiac function, creatine kinase (CK), cholinesterase (CHE), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), rectal temperature and weight. **Result:** The model rats were familiar to the pathologic change of CHD hyperlipidemia, the myocardial ischemia damage and the cardiac insufficiency and low rectal temperature, weight lose, diarrhea of spleen Yang deficiency syndrome. There was significant difference or high significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), compared with the control group, middle-dose group and high-dose group. **Conclusion:** It may provide a valuable method for establishment of combined with disease and Zheng animal model by applying

[收稿日期] 20130326(004)

[第一作者] 陈桦, 讲师, 中西医结合内科学, E-mail: chenhuahua8099@126.com

[通讯作者] * 唐汉庆, 副教授, 博士, 中西医结合基础研究, E-mail: iloveyouverymuch0000@yahoo.com.cn

multiple methods during the establishment of the animal model of coronary heart disease due to heart and spleen Yang deficiency syndrome. high-dose Fuzi Lizhong decoction could improve the pathologic changes of model rats to some extent.

[**Key words**] coronary heart disease; spleen Yang deficiency syndrome; animal model; Fuzi Lizhong decoction

《素问·生气通天论》说:“阳气者,若天与日,失其所则折寿而不彰。”指出阳气在生命活动中的根本地位,张景岳在《类经·疾病类》也指出:“人而无阳,犹天之无日。”强调了人体阳气的重要性。冠心病和心阳虚证表现多类似,但单纯的冠心病心阳虚证临床上比较少见,更多的表现为冠心病心脾阳虚证或冠心病心肾阳虚证,冠心病心阳虚证动物模型已有了建立方法并得到了实践的检验,本实验工作借鉴上述研究的成果^[1],着重探讨多见的冠心病心脾阳虚证动物模型的建立,以附子理中汤为反证方药,为建立病与证结合、贴近中医科研特点的动物模型提供参考。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雌雄兼用,体质量 210 ~ 280 g,本院科学实验中心提供,动物合格证号 SCXK(桂)2010-0004。

1.2 药物 附子理中汤由炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草组成,实验所用单味药由本校药理教研室提供。经本院药理教研室鉴定:附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (franch.) Nannf. 的干燥根;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根;干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎;甘草为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根。

1.3 试剂 脑垂体后叶素(批号 990314,上海生物化学公司);水合氯醛(批号 20090025,北京化学试剂公司);磷酸肌酸激酶(CK,批号 20120436)、胆碱酯酶(CHE,批号 20120814)试剂盒(北京博奥公司);甘油三酯(TG,批号 20121503)、总胆固醇(TC,批号 20120236)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)。

1.4 仪器 AE160 型电子天平(瑞士 Mettler 公司),SF-3000 型血生化分析仪(Sysmex 公司,日本),PK121R 型高速低温离心机(ALC 公司),MDF-U72V 型超低温冰箱(日本三洋公司),MedLab-U 生物信号采集系统,BL-420E⁺ 型生物机能实验系统及温度传感器(成都泰盟公司),Vivid 7 型彩色多普勒

超声诊断仪(美国 GE 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 大鼠适应性喂养 1 周后,随机数字表法分为正常组、模型组、附子理中汤低剂量组,中剂量组和高剂量组 5 组,每组 20 只。①正常组:普通饲料,自由饮水摄食,常态环境喂养。②模型组:施行肩胛骨间棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)切除术,术后饲以高脂饲料(83% 基本饲料,15% 甘油三酯,2% 胆固醇),19 ℃ 环境喂养 21 d。第 22 天开始,皮下多点注射脑垂体后叶素(10 U·kg⁻¹),正常对照组给予等容量的生理盐水。每天 1 次,连续 7 d。③低剂量组:在模型组基础上,第 29 天开始,附子理中汤按 10 g·kg⁻¹ ig,每日 1 次,连续 ig 7 d。④中剂量组:附子理中汤按 20 g·kg⁻¹ ig,余同③。⑤高剂量组:附子理中汤按 40 g·kg⁻¹ ig,余同③。对照组和模型组给予等容积的生理盐水 ig。

大鼠给药剂量的计算依据,参考文献[2]中药复方药动学研究中给药剂量情况进行折算,按汤剂折成动物平均等效剂量 15 g·kg⁻¹。

2.2 附子理中汤制备 炮附子、党参、白术、干姜、炙甘草按照原方 3:5:4:3:2 的比例,诸药分开均先经蒸馏水浸泡 30 min,炮附子先煎 1 h,后纳入其余诸药,煎煮 2 次(40 min/次),期间将 2 次药液纱布过滤,合并,水浴加热浓缩至含生药量为 2 g·mL⁻¹ 浓度的药液,杀菌,贮存于 4 ℃ 冰箱内备用。

2.3 行为学观察 大鼠一般生活状况如活动度、摄食行为、毛发改变、体重变化等。

2.4 肛温、体重检测 大鼠分组后第 1 天早晨 8 点记录每组的原始肛温数据和体重数据。第 36 天早晨 8 点再次记录肛温数据和体重数据。肛温检测方法:大鼠适宜环境温度(28 ℃)下,禁食 12 h 后,乙醚麻醉,称重,仰卧固定;连接 BL-420E⁺ 生物机能实验系统,取少量甘油润滑温度传感器探头,置于肛门内 25 mm 测肛温。

2.5 心电图检查 10% 水合氯醛按 3 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,连接 MedLab-U 生物信号采集系统,记录标 II 导联心电图,参考文献[3]心肌缺血阳性标准,具备

以下之一为阳性:①ST 段水平向下或向上偏移 ≥ 0.1 mV。②T 波高耸,超过同导联 R 波的 1/2。③T 波高耸伴 ST 段移位。阴性判断标准,具备以下之一:①ST 段斜形偏移或水平偏移 < 0.1 mV。②T 波低平或双向倒置。彩色多普勒超声诊断仪(探头频率为 7.5 MHz)检测大鼠心功能,测左心室舒张早期血流 E 波峰值流速(E)和舒张末期血流 A 波峰值流速(A), $E/A > 1$ 为心舒张功能正常, $E/A \leq 1$ 为心舒张功能异常。

2.6 血生化检测 称重麻醉,颈动脉采血 2 mL 于无菌试管中,4 ℃ 离心($3\ 000\ r \cdot \min^{-1}$, 15 min)分离血清,按说明书检测磷酸肌酸激酶、胆碱酯酶、甘油三酯、总胆固醇。采血之后分别处死大鼠,摘取心脏,用预冷的生理盐水冲洗,滤纸吸干,天平称重,计算心脏指数,心脏指数 = 心脏质量(g)/体重(g)。

2.7 统计学处理 数据统计采用 SPSS 13.0 软件。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 t 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学观察 造模后,大鼠畏冷寒战、喜扎堆、

拱背少动、毛发枯槁,出现食欲不振、倦怠、消瘦、便溏等症状或体征。

3.2 大鼠心电图、心脏指数检测 与正常组比较,模型组心肌缺血阳性表现增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,中剂量组和高剂量组恢复阴性表现,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常组比较,模型组心脏指数显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,中剂量组和高剂量组心脏指数升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常组比较,模型组全部例数 $E/A \leq 1$,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量组 $E/A > 1$ 例数增多,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

3.3 大鼠肛温、体重变化 造模后,与正常组比较,模型组肛温及体重均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,中剂量组和高剂量组肛温及体重均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组造模前后相比,造模后肛温及体重均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 1 附子理中汤对冠心病心脾阳虚证动物模型大鼠心电图、心脏指数、E/A 的影响 ($n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	阳性/n(%)	阴性/n(%)	心脏指数	$E/A > 1$ /n(%)	$E/A \leq 1$ /n(%)
正常	-	0	20(100)	0.026 ± 0.001	20(100)	0
模型	-	17(85) ²⁾	3(15)	0.078 ± 0.010 ²⁾	0	20(100) ²⁾
附子理中汤	10	14(70)	6(30)	0.068 ± 0.005	6(30)	14(70)
	20	11(55)	9(45) ³⁾	0.041 ± 0.003 ³⁾	12(60) ³⁾	8(40)
	40	6(30)	14(70) ⁴⁾	0.032 ± 0.002 ⁴⁾	18(90) ⁴⁾	2(10)

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 2 附子理中汤对冠心病心脾阳虚证动物模型大鼠肛温、体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肛温/℃		体重/g	
		造模前	造模后	造模前	造模后
正常	-	31.05 ± 2.14	31.21 ± 2.11	258.24 ± 15.22	298.23 ± 11.23
模型	-	31.44 ± 2.25	27.04 ± 1.39 ¹⁾	249.86 ± 10.24	154.01 ± 5.32 ²⁾
附子理中汤	10	30.18 ± 2.06	28.24 ± 1.45	245.44 ± 11.54	172.58 ± 6.63
	20	29.82 ± 2.02	29.45 ± 2.01 ³⁾	242.21 ± 10.55	239.59 ± 8.33 ³⁾
	40	30.88 ± 2.12	32.36 ± 2.86 ³⁾	252.48 ± 11.85	249.43 ± 10.46 ⁴⁾

注:模型组造模前后相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 心肌酶学、血脂水平检测 与正常组比较,模型组 CK, TG 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$), CHE, TC 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量组 CK, TG 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),中、高剂量组 CHE, TC 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

动物模型研究是动物实验研究的重要组成部分,以复合因素、病证结合思维为基础造模法研制贴近中医科研特点的动物模型一直是努力方向。笔者在临床中观察到单纯的冠心病心脾阳虚证临床上比较少见,更多的表现为冠心病心脾阳虚证或冠心病心肾阳虚证,试图建立冠心病心脾阳虚证动物模型并

表3 附子理中汤对冠心病心脾阳虚证动物模型大鼠心肌酶学、血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	CHE/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	32.21 ± 3.66	46.02 ± 11.21	0.56 ± 0.06	0.09 ± 0.03
模型	-	156.23 ± 15.36 ²⁾	10.12 ± 3.66 ²⁾	0.87 ± 0.28 ²⁾	0.16 ± 0.02 ²⁾
附子理中汤	10	102.23 ± 14.22	15.20 ± 4.01	0.76 ± 0.18	0.26 ± 0.05
	20	89.01 ± 11.96 ³⁾	30.25 ± 5.21 ³⁾	0.72 ± 0.16 ³⁾	0.32 ± 0.05 ³⁾
	40	62.55 ± 8.26 ⁴⁾	42.46 ± 11.02 ⁴⁾	0.62 ± 0.12 ⁴⁾	0.38 ± 0.08 ⁴⁾

以附子理中汤进行反证。

在本实验工作中,参考冠心病心阳虚证的造模方法和冠心病动物模型的客观诊断依据:高脂血症;心肌酶学改变;心电图T波及S-T段改变^[1],采用皮下多点注射脑垂体后叶素,通过心电图、心肌酶学检查,观察到模型组在心肌缺血程度、心脏指数、E/A、血清CK、TG、TC水平和正常组相比,差异有统计学意义,似乎可以说明冠心病动物模型已和临床冠心病表现比较接近。

脾阳虚证概括为两大症状群即阳虚症状群如畏寒喜温、形寒肢冷等,以及脾虚症状群,表现是纳少、消瘦、乏力、脘腹胀痛、便溏及腹泻等。笔者在以往有关脾阳虚证研究中^[4-6],采用BAT切除术+高脂饲料喂养+隔日寒冷环境刺激的复合因素方法建立脾阳虚证动物模型,结合脾阳虚证两大症状群的评价^[7-8],通过大鼠行为学观察、体重、肛温的测定评价模型的建立,本实验中,我们观察到模型大鼠大便稀,肛门周围有污物,动物蜷伏懒动,喜扎堆,毛稀疏枯槁、无光泽,同时,模型组体重、肛温和正常组比较,差异有统计学意义,此外,由于CHE水平明显降低目前被认为是脾阳虚证的客观指标^[9],我们观察到和正常组比较,模型组CHE水平显著降低,上述的结果为脾阳虚定性和定位提供了参考依据。

本实验工作综合皮下多点注射脑垂体后叶素、BAT切除术、高脂饲料喂养、隔日寒冷环境刺激建立冠心病心脾阳虚证动物模型,在这个过程中,我们加强了脾阳虚证的“伤阳”设计,通过切除BAT,大幅度减少大鼠产热来源,寒冷环境刺激,衰其阳气,模拟“饮食不节”、“寒伤中阳”,试图使脾阳虚证造模的阳虚、脾虚环节坚实,观察到模型组在造模后体重、肛温均降低,和造模前比较,差异有统计学意义,说明中医理论对本实验工作的重要指导意义。

对于冠心病心脾阳虚证动物模型,笔者采用附子理中汤进行反证性治疗,附子具有回阳救逆作用,理中汤具有温阳健脾作用,两者合用对于心脾阳虚证是比较适合的,在本实验中我们注意到低剂量组在恢复正常心电图、心脏指数、E/A、血清CK、TG、TC、CHE水平、体重、肛温方面效果不明显,中剂量和高剂量组恢复效果较明显,和正常组比较有统计学意义,似乎说明附子理中汤疗效和剂量有关,也为冠心病心脾阳虚证动物模型的建立提供了反证的参考依据。

[参考文献]

- [1] 张明雪,曹洪欣. 冠心病心阳虚证动物模型的制作[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(4):71.
- [2] 黄娟萍,罗裕,江力,等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药学杂志,2012,47(21):1685.
- [3] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理学实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:897.
- [4] 唐汉庆,张文通,王勇,等. 脾阳虚证大鼠胃生长素改变的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(12):1136.
- [5] 唐汉庆,张文通,卢阿娜,等. 附子理中丸对脾阳虚证大鼠骨骼肌能荷影响的实验研究[J]. 中国药师,2010,13(12):1691.
- [6] 张文通,唐汉庆,卢阿娜,等. 附子理中丸对脾阳虚证大鼠骨骼肌肌球蛋白ATP酶活性的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(3):490.
- [7] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚证中阳虚症状群的实验评价[J]. 中华中医药杂志,2008,23(3):244.
- [8] 杨雪,杨文思,王勇,等. 脾阳虚消化不良症状群客观评价的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2008,14(4):271.
- [9] 陈家旭,杨维益. 中医脾虚证研究的进展[J]. 中国中医基础医学杂志,1995,1(3):59.

[责任编辑 聂淑琴]