

动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型的研究

古丽加玛力·尼亚孜, 安冬青*, 李梅
(新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**建立动脉粥样硬化秽浊痰阻证发病特点相符合的病证结合动物模型,为后续的临床研究提供载体。**方法:**将 60 只载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为 4 组,即高脂饲料复合寒燥环境的模型组、高脂饲料组、寒燥环境组和正常对照组。过程中记录小鼠体重、情绪、大小便、毛发及舌象等生物表征,12 周时眼球取血,用酶比色法检测血清甘油三酯、总胆固醇,高密度脂蛋白,低密度脂蛋白;脱臼处死小鼠,分离主动脉瓣至髂肾动脉分支动脉组织,观察细胞形态学变化。用 SPSS 17.0 对量化后指标进行统计分析。**结果:**高脂饮食复合寒燥环境组小鼠表现为行动迟缓,抑郁状态,进食进水较少,体重增长不明显,舌质多见暗红或暗紫色;模型组小鼠主动脉中膜明显增生,平滑肌细胞排列紊乱并向内膜突起,大量粥样斑块形成,管腔明显狭窄,可见少量泡沫细胞,大量胆固醇结晶形成;高胆固醇饲料和寒燥环境对 ApoE 基因敲除小鼠的血脂升高的促进作用不显著。**结论:**高脂饲料喂养复合寒燥环境干预建立动脉粥样硬化秽浊痰阻证的方法是可行的,可成功建立与动脉粥样硬化秽浊痰阻证生物表征和部分生物学基础相似的病证结合模型。

[关键词] 动脉粥样硬化; 秽浊痰阻证; 动物模型

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0265-05

[doi] 10.11653/syfj2013130265

Study on Establishing Animal Model of Huizhuo Tanzu Type Atherosclerosis

Gulijiamali · Niyazi, AN Dong-qing*, LI Mei

(Xinjiang Medical University College of Traditional Chinese Medicine, Urunqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** Study the way to make Huizhuo Tanzu type atherosclerosis animal model. **Method:** Divide 60 ApoE gene knock out mouse into 4 groups: high fat diet and cold dry environment intervention animal model group, high fat diet control group, cold dry environment intervention control group and normal control group. 12 weeks after nurturing in different groups, the weight, emotion, defecation, tongue presentations were observed in all animals. Biochemical indicators and cell morphology were compared between groups after sacrificing all the animals. **Result:** Indicators of Huizhuo Tanzu type atherosclerosis in High fat diet and cold dry environment intervention animal model group animals are significantly higher than other groups ($P < 0.05$). Light microscopic observations revealed that all the animals developed atheromatous plaque. high fat diet and cold dry environment intervention alone has significantly different affect on the development of atheromatous plaque comparing to a combined intervention of both high fat diet and cold dry environment (ANOVA, $P < 0.05$). **Conclusion:** Animal underwent combined intervention of high fat diet and cold dry environment significant biological characteristics of Huizhuo Tanzu type atherosclerosis, indicating that animal models were successfully made.

[Key words] atherosclerosis; Huizhuo Tanzu type; animal models

[收稿日期] 20130308(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160428)

[第一作者] 古丽加玛力·尼亚孜, 硕士, 从事心血管病的中医药研究, E-mail: 123933410@qq.com

[通讯作者] *安冬青, 博士, 教授, 从事心血管疾病的中医药研究工作, Tel: 0991-4266251, E-mail: andongqing@sina.cn

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是以大动脉内膜的脂质沉积、内膜纤维化、平滑肌细胞和结缔组织增生引起内膜灶性纤维性增厚及粥样斑块形成,使动脉壁变硬,管腔狭窄甚至堵塞为主要特征的病理表现^[1]。动脉内壁这种复杂的变化是引起冠心病、脑卒中等疾病的重要病理基础^[2]。研究发现不同的环境暴露、遗传易感性和生活习惯等复杂因素导致的 AS 性疾病的临床表现有较大的差异性,因此其中医证型归类和治疗也截然不同。课题组在前期流行性病学调查和多年临床研究中发现,新疆地区动脉粥样硬化性疾病患者具有乏力自汗、头昏嗜睡、口中异味、脘腹胀满,恶心等特点。安冬青教授通过温习新疆名医处方以及对该地区 AS 性疾病临床表现和病因病机的研究,总结提出秽浊痰阻证理论,即新疆地区动脉粥样硬化性疾病证型属于秽浊痰阻证^[3]。

笔者将“秽浊痰阻证”不同于其他地区 AS 发病特点的原因主要从两个方面考虑。第一是特殊的气候环境,即新疆地区常年干燥、夏季炎热而冬季寒冷、温差较大的气候环境;寒燥入侵,气机闭塞,血运不畅,瘀血内生。第二是饮食习惯,少数民族聚集的新疆居民喜食牛羊肉奶制品等肥甘厚味,肥甘易伤脾胃,运化失常,脾虚湿盛,炼液成痰,壅滞脉络,痰瘀浊气内生^[4]。本研究模拟新疆地区居民的饮食习惯和寒燥气候环境为切入点,以 ApoE 基因敲除小鼠作为载体,探索性建立动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型。成功的动物模型为药物干预动脉粥样硬化性疾病提供科学依据,为寻找药物作用靶点等后期研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 ApoE 基因敲除小鼠 60 只,雄性,体重(18 ± 2)g,均购自北京大学医学部动物实验中心,动物质量合格许可证号 SCXK(京)2011-0012。

1.2 主要试剂与仪器 MIC400 人工气候箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),LEICA DM 2500 光学显微镜(德国),KDC-2046 低速冷冻离心机(科大创新有限公司),BS-120 生化仪(深圳迈瑞生物医疗有限公司),胆固醇(美国 AMRESCO 公司),猪胆盐(上海蓝季科技发展有限公司),丙硫氧嘧啶(德国 RIEMSER Arzneimittel AG 公司),血脂四项试剂盒(深圳迈瑞生物医疗有限公司)。

1.3 分组与造模 将 60 只 ApoE 基因敲除小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 4 组,即寒燥环境和高脂

饲料联合干预的模型组、高脂饲料组、寒燥环境组和空白对照组,每组 15 只。模型组每天定时放入气候箱 11 h 并予高脂饲料喂养;寒燥环境组予普通饲料喂养,并每天置入人工气候箱 11 h;高脂饲料组予高脂饲料,置于室温(20 ~ 24 °C、相对湿度 40% ~ 70%);正常对照组予普通饲料喂养,置于室温。各组小鼠均自由饮水,不限制活动。高脂饲料配方^[5]:基础饲料 72.5%;猪油 10%;蛋黄 5%;蔗糖 10%;胆固醇 2%;猪胆盐 0.2%;丙硫氧嘧啶 0.12%;21 金维他 0.1%。人工气候箱系统设定^[6-7]为(6 ± 2)°C,相对湿度控制在 25% ~ 32.8%。

1.4 指标检测与方法

1.4.1 生物表征 每周观察并记录实验小鼠体重、饮水量、进饲量、情绪变化、大便、舌象、被毛等生理指征。其中大便黏腻程度以等级资料形式记录。

1.4.2 血脂 于第 12 周,禁食水 8 h 后,将小鼠麻醉(注射用地西洋 + 氯胺酮 + 阿托品)后摘眼球取血 1 mL,且立即离心提取血清;用半自动生化分析仪采用酶比色法检测血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)等。实验对动物的处理方法按照中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》条例要求进行^[8]。

1.4.3 主动脉组织标本及量化 各组小鼠脱臼处死后眼科剪分离主动脉瓣至髂肾动脉分支动脉组织。将剥离干净的组织用生理盐水冲洗,浸泡 10% 福尔马林溶液固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋、染色以制备切片。光学显微镜观察切片标本中炎症细胞、平滑肌细胞及血管内膜的变化。将显微镜观察所得的主动脉标本图像计算主动脉内膜厚度(内膜厚度为管腔至内部弹性膜支架支柱中点垂直距离)并计算其与主动脉内径的比值,量化指标^[8]。

1.4.4 数据处理与统计分析 采用 SPSS 17.0 软件做统计分析。本实验设计为析因设计,等级资料采用秩和检验法,计量资料以平均值表示,经正态性、方差齐性检验;符合条件后,进行方差分析,当方差不齐时,采用秩和检验,进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

评价模型是否成功采用宏观表现与微观表现相结合的方式。既采集实验小鼠的体重、饮食量、精神状态等宏观表征,又观察主动脉细胞形态学、血脂等微观变化。

2.1 生物表征比较 各组小鼠在实验前均被毛光

泽,活动、饮食、体重均无差异。喂养第12周观察其生物标证时模型组行动迟缓,抑郁状态,进食进水较少,体重增长不明显,被毛稀疏,舌质多见暗红或暗紫色;高脂饲料组大便黏腻,进食水较少,可见薄白

舌苔;寒燥环境组观察到嗜睡怠倦,活动较迟缓,舌质暗红或暗紫;而空白对照组情绪易激动,频繁撕咬,进食水较多,体重增长显著。

表1 各组动物第12周生物表征比较

指标	模型组	高脂饲料组	寒燥环境组	空白对照组
舌质	暗紫,瘀斑	暗红或暗紫	暗紫或暗红,瘀斑	暗红
舌苔	苔薄腻	苔薄白	少苔,苔薄白	无苔
被毛	欠光泽,稀疏	有光泽	欠光泽,稀疏	有光泽
毛色	黑	棕黑	黑	棕黑
行为	少动,嗜睡	活泼,打架	蜷缩少动	活泼,打架撕咬
情绪	温顺	易怒	温顺	易怒,躁动
攻击性	轻度攻击性	中度攻击性	轻度攻击性	中度攻击性
大便	黏腻,颗粒状	黏腻,颗粒状	干结,颗粒状	干结,颗粒状
反应	迟缓	灵敏	迟缓	灵敏
进食水	少	可	少	多

2.2 各组小鼠大便黏腻度比较 因为载脂蛋白E基因敲除小鼠的大便信息按照其黏腻度来分级,并以等级资料形式记录,故进行多个样本两两比较的秩和检验。数据显示,模型组小鼠大便黏腻度 > 空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组与寒燥环境组比较模型组小鼠大便黏腻度 > 寒燥环境组,差异有统计学意义($P < 0.05$);但是模型组与高脂饲料组小鼠之间、高脂组与寒燥环境组小鼠之间、高胆固醇饲料组与空白对照组小鼠之间的大便黏腻度比较差异没有统计学意义。见表2,3。

表2 各组载脂蛋白E基因敲除小鼠大便黏腻度比较

黏腻度等级	分组				秩次范围	平均秩次
	模型(n)	寒燥环境(n)	高脂饲料(n)	空白对照(n)		
无	2	8	10	10	1~30	15.5
轻	8	7	3	5	31~55	43
中	5	0	2	0	56~60	58
重	0	0	0	0	-	0
合计	15	15	15	15	-	-

2.3 血脂结果 从表4可看出各组小鼠血清TG,TC,HDL,LDL均有升高,但是经过统计学比较得知高脂饲料喂养对小鼠血清胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白的差别有统计学意义,而寒燥环境的干预对各组血脂水平的差别无统计学意义。两种因素交叉作用于小鼠时,其血脂四项差异均无统计学意

表3 各组载脂蛋白E基因敲除小鼠大便黏腻度差异

组间	Wilcoxon W	Z	P
模型与高脂对照	65	-3.212	0.110
模型与空白对照	59	-3.661	0.000
模型与寒燥对照	88	-3.342	0.010
高脂对照与空白对照	90	-1.371	0.170
高脂对照与寒燥对照	100	-0.438	0.661
寒燥对照与空白对照	93	-0.970	0.213

义。见表5。

表4 4组小鼠模型间血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$) mmol·L⁻¹

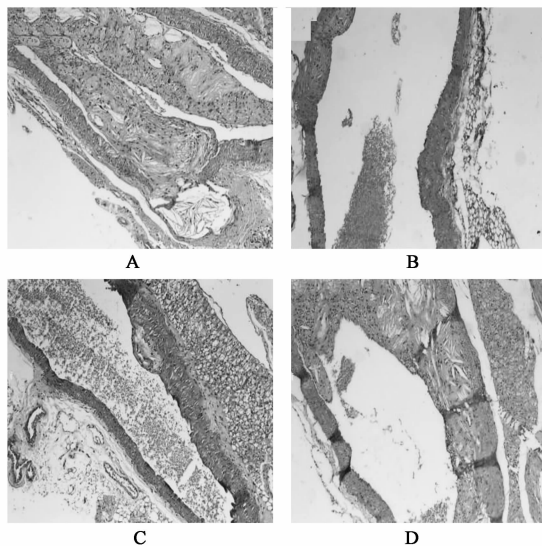
组别	TG	TC	HDL	LDL
模型	1.40 ± 0.12	33.13 ± 1.54	8.60 ± 1.12	30.00 ± 2.67
高脂饲料	0.94 ± 0.03	30.23 ± 0.91	8.56 ± 0.89	25.61 ± 3.98
寒燥	0.84 ± 0.21	9.68 ± 0.35	2.60 ± 0.17	4.63 ± 0.61
空白对照	2.03 ± 1.0	11.91 ± 2.01	2.93 ± 0.43	3.33 ± 0.02

表5 寒燥环境和高脂饲料对小鼠血脂水平的单独作用和交互作用

变异来源	TG	TC	HDL	LDL	P
A(气候箱环境)	0.108	0.848	0.749	0.105	
B(高脂饲料)	0.188	0	0	0	
A × B	0.121	0.056	0.078	0.087	

2.4 细胞形态学结果 从光镜可观察到模型组主动脉中膜明显增生,平滑肌细胞排列紊乱并向内膜突起,大量粥样斑块形成,管腔明显狭窄,可见少量

泡沫细胞,大量胆固醇结晶形成;寒燥组主动脉平滑肌排序紊乱,可见脂质斑块隆起,管腔轻度狭窄,泡沫细胞少见;高脂饲料组内膜隆起斑块,平滑肌细胞的异常增生,胆固醇结晶,血管腔面积狭窄;正常对照组主动脉中膜未见明显的平滑肌细胞增生,内膜轻度增生,管腔未见明显狭窄。见图 1。



A. 模型组; B. 空白对照组; C. 寒燥环境组; D. 高脂饲料组

图 1 4 组小鼠主动脉形态学改变 (HE 染色, ×200)

表 6 各组载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉内膜 / 管腔均数差别

载脂蛋白 E 基因	寒燥环境 (a ₁)	室温 (a ₂)	平均	a ₁ -a ₂
高脂饲料 (b ₁)	0.92	0.45	0.69	0.47
普通饲料 (b ₂)	0.25	0.13	0.19	0.12
平均	0.59	0.29	0.44	0.30
b ₁ -b ₂	0.67	0.32	0.50	-

表 7 干寒环境和高脂饲料对各组小鼠内膜 / 血管腔作用比较

变异来源	MS	F	P
A (寒燥环境)	0.532	15.538	0.001
B (高脂饲料)	1.513	44.182	0.000
A × B	0.187	5.455	0.030

从表 6~7 可以看出高脂饲料干预的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠的动脉血管内膜占官腔的比值大于喂予普通饲料的小鼠,经方差分析其差异有统计学意义 ($P < 0.05$);干燥寒冷环境下的小鼠内膜/官腔比值也大于室温环境的小鼠,经过检验差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而高胆固醇饲料和寒燥环境对小鼠内膜/官腔比值的交互作用也大于室温环境或

普通饲料喂养对小鼠内膜/官腔比值的影响,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。于是可以推导高胆固醇饲料和干燥寒冷环境均有促进内膜增生,增加内膜/血管腔比值,而两种因素联合干预时载脂蛋白 E 基因敲除小鼠内膜增厚更为明显。

3 讨论

动脉粥样硬化是环境,遗传性等众多因素交互作用引起的复杂性病理变化。近年来对动脉粥样硬化模型的研究颇多,模型的研究均基于粥样硬化脂质浸润、血管壁损伤等发病特征。但是对生存环境等外在因素对 AS 形成的影响尚未予足够重视。《素问》中提到“西方者,其民陵居而多风,水土刚强,其民不衣而褐荐,其民华食而脂肥,故邪不能伤其形体,其病生于内。北方者,天地所闭藏之域也,其地高陵居,风寒冰冽。其民乐野处而乳食,脏寒生满病”^[8]。新疆地处我国西北部,少数民族聚集,气候干燥寒冷,居民多食喜羊肉,奶制品等肥甘厚腻之品。多食肥甘易伤脾胃,运化失常,脾虚湿盛,燥伤津液,炼液成痰;痰邪凝结成块,壅滞脉络;寒邪入侵,气机闭塞,则血运不畅,瘀血内生,演变成以脾虚为本,痰瘀湿浊为标的秽浊痰阻证。故本研究以高脂饲料喂养和寒冷干燥刺激来模拟新疆居民特殊饮食习惯、气候环境,探索性建立秽浊痰阻证动物模型。

证候是由生理功能、病理变化和外界环境影响等众多因素交叉作用的结果,是中医理论和临床治疗的核心所在。其候表现为特定的症状及生命体征的有机结合。本研究模型组小鼠饮水量减少与多食肥甘膏脂易伤脾胃,三焦运化失司有关;该认识也能阐释为什么高脂饲料干预的小鼠体重反而比普通饲料喂养的小鼠体重增加的缓慢。水谷运化失常,久之,化为痰浊,浊气不降,清气不升,故表现出嗜睡懒动,反应迟缓,活动能力差等;大便手感质软黏是痰湿证典型表现;燥邪外侵,将痰湿凝结成块滞于血脉,故出现舌质暗红或暗紫色,苔腻。横向分析以上纳呆、懒惰少动、大便黏腻、精神不振、舌质暗红等生理学特征均可归属为秽浊痰阻证^[10],说明该模型能反应秽浊痰阻证辨证要点。

载脂蛋白 E 基因敲除小鼠是目前粥样硬化研究中应用最多的基因工程动物。据 Rosendfeld 等人的研究发现 ApoE 基因敲除小鼠动脉斑块的产生和发展呈时间依赖性,随着年龄的增长,粥样病变越明显,表现出典型的纤维斑块^[9]。从本研究组织形态学结果发现,不管高脂饲料喂养或寒燥环境的单独

刺激均对 AS 形成有正性促进作用,而两种干预因素叠加实施后便加快粥样硬化进展,形成脂质斑块。观察小鼠动脉病理切片发现模型组小鼠主动脉内膜平滑肌细胞排列紊乱、增生,血管腔内可见隆起或弥漫性增厚的脂质斑块导致管腔明显狭窄,脂质斑块内形成呈大量呈梭型的白色胆固醇结晶,内皮下出现少量泡沫样细胞,内弹力层和中弹力板发生变性、断裂和崩解。说明高脂饲料和寒燥环境联合施加于实验动物,更进一步促进粥样硬化斑块形成的进展。

《素问·生气通天论》中提到“高粱之变,足生大丁”,巧妙地说明了气血津液代谢异常,化为痰瘀秽浊,雍滞血络引起病变。从统计结果来看高脂饲料喂养对模型动物血脂的异常升高有客观的贡献。尽管寒燥环境和高脂饲料交互作用对血脂的差异无统计学意义,但是本研究将建立的是秽浊痰阻证和 AS 的相互结合模型,是一种复杂的病理、生理表现,故不得片面的否认多因素叠加作用的结果,有待今后深入研究。

动物实验研究是连接理论和临床治疗的桥梁。在动物身上建立疾病病理和所表现证候相结合的模式则是中医药动物实验研究的难点。动物不像人类可以提供完整的四诊信息,因此本实验过程中观察动物身上的各种行为学、外表形态等信息并结合中医学基础理论来衡量模型是否能成功建立。证候是个多因素联合作用而致的复杂临床表现,故制备其模型采用近似于疾病多样化致病因素的重叠干预是实验成败的关键。本研究模拟新疆地区特殊的饮食特点及气候环境来探索性制造该地区多见粥样硬化秽浊痰阻证模型。望为今后的药物干预治疗,分子生物学水平上寻找药物作用靶点奠定基础。

[参考文献]

- [1] 王建,李磊,刘建勋,等.痰瘀同治方对兔动脉粥样硬化对氧磷酶活性及炎症因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):53.
- [2] Elizabeth S Gold, Stephen A Ramsey, Mark J Sartain. ATF3 protects against atherosclerosis by suppressing 25-hydroxy cholesterol - induced lipid body formation[J]. J Exp Med, 2012, 209(4): 807.
- [3] 赵明芬,安冬青.新疆胸痹秽浊痰阻证探源[J].新疆中医药杂志,2007,25(2):1.
- [4] 朱萌,安冬青.从三焦气化失常探讨新疆冠心病秽浊痰阻证之证型特点[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(5):88.
- [5] 药红梅,吕吉元.几种冠状动脉粥样硬化大鼠模型建立方法比较[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,4(9):450.
- [6] 高振,哈木拉提·吾甫尔.关于西北寒燥证证候动物模型建立的思考[J].中国中医药信息杂志,2010,17(1):6.
- [7] 阿地里江·阿布力米提,哈木拉提·吾甫尔.异致维医异常黑胆质证的干寒环境因素小鼠生物表征的影响[J].中国中医基础医学杂志,2010,15(7):498.
- [8] 刘燕池,雷顺群.中医基础理论[M].北京:学院出版社,2004:10.
- [9] Rosendfeld M E, Polinsky P. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse [J]. Arterioscler Thromb Vasc Bio, 2000, 20(12):587.
- [10] 刘涛,徐秋玲.高脂饮食诱导痰湿证动物模型的建立与评价[J].长春中医药大学学报,2009,25(3):334.

[责任编辑 邹晓翠]

《天津中医药》2013 年征订启事

《天津中医药》(原名《天津中医》)创刊于 1984 年,是由天津市卫生局主管、天津中医药大学、天津中医药学会和天津中西医结合学会主办的综合性中医药学术期刊。本刊继承与发展并重,中医与中药兼顾,理论与实践并举,坚持中医特色,内容丰富,实用性强,是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊、美国《化学文摘》(CA)俄罗斯《文摘杂志》(AJ)和波兰哥白尼索引(IC)源期刊、天津市一级期刊。2011 年被评为天津市优秀期刊、获得全国高校优秀科技期刊二等奖、第 3 届全国中医药优秀期刊奖。本刊设有专家论坛、名医精粹、博士之窗、临床论著、针灸与推拿、理论探讨、实验研究、中药研究、国际交流、留学生园地、科研动态、综述等专栏,以满足广大读者日益增长的需要。

本刊国内外公开发行,ISSN:1672-1519,CN:12-1349/R。国内邮发代号为 6-83,国外发行代号:1040-BM,2013 年每期定价 6.00 元,全年 6 期定价为 36 元。合订本 60 元。本刊编辑部也办理邮购。邮购地址:天津市南开区鞍山西道 312 号《天津中医药》编辑部收,邮编:300193,电话:(022)59596310,传真:(022)59596595,E-mail: xuebaobj@tjutc.edu.cn; xuebaobj@126.com