

康静,杨丽丽,王紫艳,等. 冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1530–1538.

Kang J, Yang LL, Wang ZY, et al. Establishment and evaluation of a rat model of coronary microvascular disease with qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1530–1538.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.002

冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型的建立及评价

康静^{1,2}, 杨丽丽¹, 王紫艳¹, 尤越¹, 史跃¹, 马彦雷¹, 孟红旭^{1*}, 李磊^{1,2*}

(1. 中国中医科学院西苑医院 中药药理北京市重点实验室, 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 冠状动脉微血管疾病 (coronary microvascular disease, CMVD) 发病率逐年增高, 中医认为 CMVD 属中医学“络脉”的范畴, 气虚血瘀证是 CMVD 主要证型, 然而目前尚无气虚血瘀证 CMVD 动物模型的报道, 因此本研究探索建立冠状动脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型并进行评价。**方法** 雄性 SD 大鼠 45 只, 随机分为假手术组、冠脉微血管疾病组和冠脉微血管疾病气虚血瘀证组, 每组 15 只。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组动物每天随机 14 ~ 16 h 睡眠剥夺, 持续 6 周, 复制气虚证大鼠模型; 假手术组及冠脉微血管疾病组动物正常饲养 6 周。实验 6 周后, 冠脉微血管疾病组和冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠麻醉后开胸, 向左心室内注射栓塞微球 (40 ~ 120 μm), 假手术组动物行开胸手术但不注射栓塞微球。术后 7 d, 各组测定相关检测指标。**结果** 冠脉微血管疾病组与假手术组相比, 左室射血分数、左室缩短率明显降低, 肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB) 以及乳酸脱氢酶 (LDH) 活性明显增加。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组与假手术组相比, 心功能下降、心肌损伤标志物活性显著升高、血浆及全血粘度明显升高。**结论** 睡眠剥夺复合心室内注射栓塞微球可成功建立冠脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型, 比较符合临床发病特征适合于发病与中药作用机制研究。

【关键词】 冠状动脉微血管疾病; 气虚血瘀证; 病证结合; 睡眠剥夺; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1530-09

Establishment and evaluation of a rat model of coronary microvascular disease with qi deficiency and blood stasis syndrome

KANG Jing^{1,2}, YANG Lili¹, WANG Ziyang¹, YOU Yue¹, SHI Yue¹, MA Yanlei¹, MENG Hongxu^{1*}, LI Lei^{1,2*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, Beijing 100091, China. 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Corresponding author: LI Lei. E-mail: lilei0502@126.com; MENG Hongxu. E-mail: amfd003@163.com

【基金项目】 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04609), 国家自然科学基金面上项目 (82174015), 国家中医心血管病临床医学研究中心专项科研基金项目 (CMC2022006), 安徽省高校协同创新项目 (GXXT-2020-024)。

Funded by Science and Technology Innovation Project of China Academy of Chinese Medical Sciences (CI2021A04609), General Program of National Natural Science Foundation of China (82174015), Special Research Fund Project of National Center for Clinical Medical Research of Cardiovascular Diseases of Traditional Chinese Medicine (CMC2022006), University Collaborative Innovation Project of Anhui (GXXT-2020-024).

【作者简介】 康静 (1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管中药药理研究。Email: kj17693569660@163.com

【通信作者】 孟红旭 (1972—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管中药药理研究。Email: amfd003@163.com;

李磊 (1982—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学研究。Email: lilei0502@126.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective The incidence of coronary microvascular disease (CMVD) is increasing annually. According to traditional Chinese medicine (TCM), CMVD belongs to the category of “collaterals”, and qi deficiency and blood stasis are the main syndrome type of CMVD. Notably however, no studies have reported on the use of animal models of CMVD with qi deficiency and blood stasis. The current study therefore aimed to establish and evaluate a rat model of CMVD with qi deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** Forty-five male SD rats were divided randomly into sham group, CMVD group, and CMVD + QXXY group ($n = 15$ rats per group). Rats in the CMVD + QXXY group were randomly deprived of sleep for 14 ~ 16 h/day for 6 weeks, and the model of qi deficiency syndrome was established. Animals in the sham group and the CMVD group were fed normally for 6 weeks. After 6 weeks, rats in the CMVD and CMVD + QXXY groups were anesthetized, their chests were opened, and embolic microspheres (40 ~ 120 μm) were injected into the left ventricle. Rats in the sham group underwent thoracotomy without injection of embolic microspheres. On day 7 after operation, relevant detection indicators were measured in each group. **Results** Compared with the sham group, the CMVD group showed a significant decrease in left ventricular ejection fraction and left ventricular shortening rate, while the activities of creatine kinase MB isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased. Heart function, hemorheology, myocardial enzyme index, and the degree of myocardial cell damage differed significantly between the CMVD + QXXY group compared with the sham group. **Conclusions** A rat model of CMVD + qi deficiency + blood stasis syndrome can be successfully established by sleep deprivation combined with intraventricular injection of embolic microspheres. This model will be suitable for the study of the pathogenesis of CMVD and the mechanisms of TCM.

[Keywords] coronary microvascular disease; qi deficiency and blood stasis syndrome; combination of disease and syndrome; sleep deprivation; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

冠状动脉微血管疾病 (coronary microvascular disease, CMVD) 是指在多种致病因素的影响下, 冠状动脉的小动脉 (直径 $< 100 \mu\text{m}$) 及前小动脉 (直径 $100 \sim 500 \mu\text{m}$) 的结构和功能受损, 从而导致心肌缺血或心绞痛的临床综合征^[1]。目前, CMVD 的发病机制仍然在探索之中, 研究显示冠状动脉微血管内皮功能障碍、血管平滑肌损伤、机械性压迫以及冠脉微栓塞等是 CMVD 发生的主要原因^[2-3]。现代中医学认为, CMVD 属“胸痹”“真心痛”“络病”等病的范畴, 证候多见血瘀、气虚、气滞等^[4]。气虚血瘀证为 CMVD 最常见的复合证型, 其主要病机为气虚行血无力, 瘀血内阻, 可用益气活血、通络止痛等治则中药治疗^[5-6]。目前, 尚无研究 CMVD 气虚血瘀证动物模型, 本课题组前期建立了 CMVD 大鼠、气虚血瘀证大鼠等动物模型^[7-8], 在此基础上, 本实验探索建立冠脉微血管疾病气虚血瘀证大鼠模型, 并对其模型进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

45 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (250 ± 20) g, 购于斯贝福生物技术有限公司【SCXK (京)

2019-0010】。SPF 级屏障环境中 (温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $50\% \sim 60\%$, 大鼠自由饮食进水, 明/暗周期为 12 h; 饲料为⁶⁰Co 辐照实验鼠维持饲料), 饲养于中国中医科学院西苑医院实验动物中心【SYXK (京) 2018-0018】。实验动物处置严格遵循 3R 原则, 给予人道主义关怀。本研究方案经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审批通过后开展实验 (2021XLC037)。

1.1.2 主要试剂与仪器

栓塞微粒球 (40 ~ 120 μm , 美国 Merit Medical 公司, 批号 X2321032); 肌酸激酶 (CK) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 110622); 肌酸激酶 MB 同工酶 (CK-MB) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 211230); 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (上海光纯耀化学有限公司产品, 批号 103424)。

小动物呼吸机 (DW-3000S 型, 安徽正华生物仪器设备有限公司, 中国); 小动物超声仪 (Visual-Sonics Vevo 2100, Fujifilm, 日本); 血液流变测定仪 (LBV-N6C 型, 北京普利生仪器有限公司, 中国); 台式脉搏血氧仪 (Starr Life Science, 美国); 大小鼠抓力测定仪 (YLS-13A 型, 北京众实迪创科技发展有限公司, 中国); 生化分析仪 (LABOSPECT003 型,

Hitachi, 日本); 数码单镜反光相机 (D90, Nikon, 日本); 高速低温离心机 (ICE-CL31R 型, 赛默飞, 美国); 计算机彩色病理图像分析系统 (MPIAS-500 型, 北京正恒博诚科技发展有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备

将大鼠随机分为 3 组, 每组各 15 只, 具体分组如下: (1) 假手术组: 不进行睡眠剥夺, 不注射栓塞微球; (2) 冠脉微血管疾病组: 不进行睡眠剥夺, 心室内注射栓塞微球; (3) 冠脉微血管疾病气虚血瘀证组: 根据本课题组前期睡眠剥夺法建立的气虚血瘀证大鼠方法^[9], 先将大鼠每日随机睡眠剥夺 14 ~ 16 h, 连续睡眠剥夺 6 周后, 成功复制气虚血瘀证模型, 然后采用心室内注射栓塞微球法建立冠状动脉微血管疾病模型^[10]。将大鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 行气管插管术, 然后连接小动物呼吸机机械通气, 于大鼠胸骨左侧缘第 4 肋纵向剪断, 轻柔分离心包膜, 完全暴露心脏, 将主动脉弓起始部分离出来, 并在下面穿手术线, 大鼠心脏稳定后, 轻柔将手术线的两端提起, 夹闭主动脉弓, 从心尖向左心室内注射 0.2 mL 栓塞微球 (直径 40 ~ 120 μm), 动脉夹阻断主动脉弓血流 20 s 后, 恢复主动脉血流, 大鼠稳定 2 ~ 3 min 后, 逐层缝合, 拔除气管插管。冠脉微血管疾病组正常饲养 6 周后, 采用心室内注射栓塞微球法建立冠状动脉微血管疾病模型。假手术组亦在实验 6 周后进行手术操作, 区别仅在于大鼠注射的为 0.2 mL 生理盐水。心室内注射栓塞微球术后 1 周 (实验 7 周), 各组测定相关检测指标并处死取材。

1.2.2 一般状态观察

在造模前后观察各组大鼠的体重、毛发、进食量、活动情况、精神状态等。

1.2.3 脉搏幅度检测

使用台式小动物无创脉冲血氧仪对大鼠脉搏幅度进行检测, 将带有红外感受器的探头夹住大鼠右侧后足, 待出现连续 30 个有效的数据后, 记录数据并计算均值。

1.2.4 舌象采集

大鼠麻醉后, 采用尼康 D90 数码单镜反光相机配合 60 mm 微距镜头进行舌象图像采集。5500 K 色温光源进行布光, 舌体处照度 2500 ~ 3000 lx。舌象照片以 JPG 格式输出, 选取 3 点舌体区域, 记录 R、G、B 分量值, 按照前期实验方法将 RGB 转化为

HIS 色度空间^[11], HIS 分别表示色调 (H)、亮度 (I) 和饱和度 (S), 是从人眼中认识颜色的 3 个特征。

1.2.5 抓力测定

将大鼠轻轻地放在抓力板上, 抓住鼠尾轻轻向后牵拉, 待大鼠抓牢抓力板后, 给大鼠施加最大力量向后拉, 致使大鼠松爪, 记录抓力机上的最大抓力, 每只大鼠测量 3 次, 获取大鼠的平均抓力值, 将不同实验组的抓力值进行对比分析。

1.2.6 超声心动图评价心功能

大鼠麻醉后, 剃净心脏投影部位的胸部体毛, 躯体左倾 30° 并涂抹超声耦合剂, 使用日本 Fujifilm 公司的小动物超声诊断仪, 频率为 9 ~ 18 MHz 的 MS210 型探头, 采用 M 型超声左室长轴切面二尖瓣腱索水平, 测量左室收缩期后壁厚度 (LVPWs)、左室收缩期前壁厚度 (LVAWs)、左心室收缩末期容积 (LVESV)、左室舒张期后壁厚度 (LVPWd)、左室舒张期前壁厚度 (LVAWd)、左心室舒张末期容积 (LVEDV) 等指标, 工作站软件计算左室射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (LVFS)、每搏输出量 (SV)、心输出量 (CO) 等指标。

1.2.7 血液、血浆黏稠度检测

在大鼠腹主动脉穿刺取血 (肝素抗凝) 3 mL, 将 1 mL 抗凝血放于血液流变仪样本位上, 在低切 5 s^{-1} , 中切 60 s^{-1} , 高切 150 s^{-1} 切变率下进行全血粘度测定, 2 mL 余血于 2000 r/min 离心 10 min 后, 取上清 0.8 mL 用于血浆粘度测定 (切变率 100 s^{-1})。

1.2.8 血清 CK、CK-MB 及 LDH 活性检测

大鼠腹主动脉取血后, 首先在室温环境下静置 1 h, 然后在 3000 r/min, 4℃ 条件下离心 10 min, 分离血清备用, 应用日本 LABOSPECT003 型自动生化分析仪及试剂盒, 测定血清 CK、CK-MB、LDH 值, 并将各组大鼠进行比较分析。

1.2.9 TTC 染色法测定心肌缺血、梗死面积

实验结束后, 取出心脏, 用生理盐水冲洗, 用吸水滤纸吸干多余水分, 从心脏冠状沟以下平行切取心肌, 心尖部一点弃之, 其余部分横切 4 片, 每片厚度 2 ~ 3 mm, 在 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 中避光染色 15 min 左右, 染色完成后, 使用高清单反相机拍照, 所得图像经 Image-Pro Plus 6.0 软件计算梗死面积心脏切片总面积。经 TTC 染色后, 心肌组织呈现红色的为正常组织, 呈现白色的为梗死区, 以梗死面积/心脏面积百分比代表梗死范围。

1.2.10 HE 染色观察心肌组织病理形态

实验结束后,取动物心室心肌组织,投入预先配好的 4%多聚甲醛溶液中固定,24 h 后修整,放入包埋盒中,流水冲洗 30 min,乙醇梯度脱水、于二甲苯中透明、石蜡包埋,后置于切片机上切成薄片(5 ~ 8 μm)。使用二甲苯脱蜡,脱蜡完成后,置于不同浓度乙醇中各浸泡 5 min 以达到充分水化,使用 PBS 溶液浸泡清洗,行苏木素-伊红染色 1 ~ 3 min,反复流水冲洗,随后入二甲苯中脱水透明,将切片从二甲苯中拿出来稍晾干,中性树胶封片,显微镜镜检,数码相机采集图像分析。

1.3 统计学分析

计量资料均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,多组之间比较采用单因素方差分析,方差齐性应用 SNK 检验,不足方差齐性的多组比较选择 Tamhane's T2 检验。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状态观察

假手术组大鼠可见体型正常,精神状态、摄食、活动均良好,毛发光顺,舌面呈粉嫩色;与假手术组相比,冠脉微血管疾病组大鼠体重显著下降($P < 0.01$),活动量少,毛发枯黄欠光泽,舌面暗红,冠脉

微血管疾病气虚血瘀证组大鼠体重显著下降($P < 0.01$)(见表 1),精神略显萎靡,活动较前减少,毛发枯黄无光泽,舌面暗淡。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组体重下降,但未见显著性差异。

2.2 对大鼠脉搏幅度及抓力的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组大鼠脉搏幅度为 $61.51 \pm 10.75 \mu\text{m}$,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组脉搏幅度为 $28.12 \pm 8.00 \mu\text{m}$ 脉搏幅度明显减慢($P < 0.01$),与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组脉搏幅度显著下降($P < 0.01$)。与假手术组相比,各模型组抓力均显著下降($P < 0.01$);与冠脉微血管疾病模型组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组抓力下降明显($P < 0.01$)。见表 1,图 1。

2.3 对大鼠舌象的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组 S 值降低($P < 0.05$),冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 R/G 及 R/B 均降低($P < 0.01$),同时 R 值($P < 0.01$)分量值降低,S 值也出现降低($P < 0.01$)。提示冠脉微血管疾病气虚血瘀证组随着造模时间的变长,舌象图像 R 分量值降低,舌色饱和度下降。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 R 值($P < 0.05$)分量值降低,提示舌象饱和度下降。见

表 1 各组大鼠体重、脉象和抓力变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes in body weight, pulse intensity and grasping strength in each group($\bar{x} \pm s$)				
分组 Groups	<i>n</i>	体重(g) Body weight(g)	脉搏幅度(μm) Pulse intensity(μm)	抓力(g) Grasping strength(g)
假手术组 Sham group	15	420.07 ± 15.49	76.66 ± 19.65	582.48 ± 22.68
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	392.91 ± 30.86**	61.51 ± 10.75**	350.09 ± 68.52**
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	386.30 ± 36.33**	28.12 ± 8.00**##	320.60 ± 28.66**##

注:与假手术组相比,** $P < 0.01$;与冠脉微血管疾病组相比,## $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$. Compared with CMVD group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

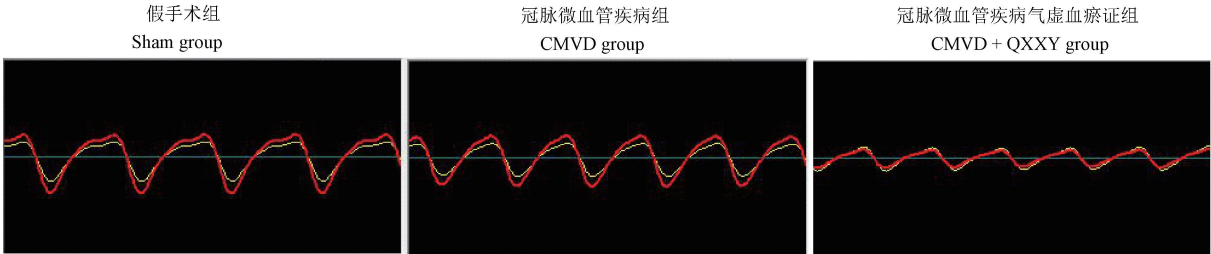


图 1 各组大鼠脉象
Figure 1 Pulse status of rats in each group

图 2,表 2。

2.4 对大鼠超声心动图的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组 LVIDs 明显增大 ($P < 0.01$), EF、FS 值均显著降低 ($P < 0.01$),表明左心室内注射栓塞微球构建疾病模型,对大鼠心功能具有较大的影响。冠脉微血管疾病气虚血瘀证组, LVIDs 显著增大 ($P < 0.01$), SV、CO

显著降低 ($P < 0.01$), EF、FS 亦显著降低 ($P < 0.01$),提示睡眠剥夺 6 周 + 左心室内注射栓塞微球,能够显著降低大鼠的心功能。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组,左室舒张末期容积明显增加 ($P < 0.05$), SV、CO 显著降低 ($P < 0.01$),提示病证结合造模比单纯疾病造模心功能损伤更为严重。见图 3,表 3。



图 2 各组大鼠舌象

Figure 2 Tongue picture of rats in each group

表 2 各组大鼠舌像变化($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

Table 2 Changes in tongue images of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

分组 Groups	R	G	B	R/G	R/B	I	S	H
假手术组 Sham group	153.89 ± 6.64	93.69 ± 7.08	100.61 ± 8.91	1.65 ± 0.07	1.45 ± 0.35	124.29 ± 29.22	0.22 ± 0.06	89.84 ± 0.20
冠脉微血管 疾病组 CMVD group	150.40 ± 7.23	100.30 ± 11.80	107.00 ± 6.78	1.51 ± 0.11**	1.41 ± 0.05**	114.91 ± 13.43	0.16 ± 0.04*	86.88 ± 9.44
冠脉微血管疾 病气虚 血瘀证组 CMVD + QXXY group	142.73 ± 5.71***	99.90 ± 8.46	105.77 ± 6.20	1.44 ± 0.10**	1.35 ± 0.08**	116.13 ± 5.99	0.14 ± 0.03**	89.87 ± 0.10

注:像素区域 R(红色)、G(绿色)、B(蓝色); HIS 色度空间(色调 H、饱和度 S 及亮度 I); 与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与冠脉微血管疾病组相比, # $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Pixel regions R (red), G (green), B (blue). HIS chromaticity space (hue H, saturation S, and brightness I). Compared with the sham group, * $P < 0.05$. Compared with CMVD group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

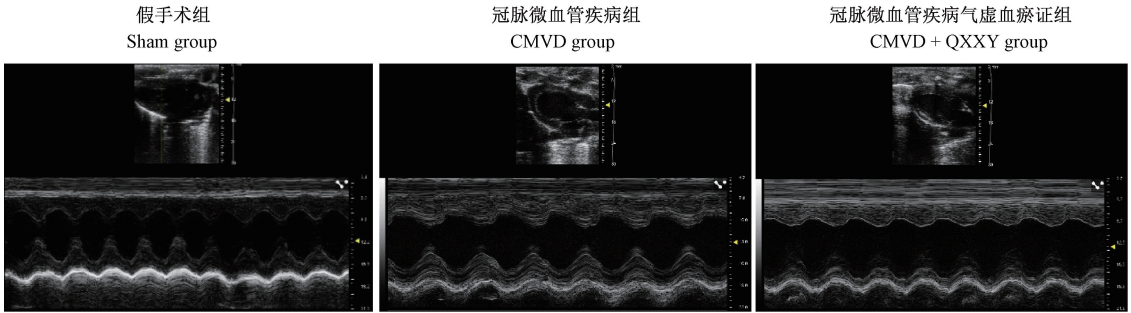


图 3 各组大鼠超声心动图

Figure 3 Echocardiogram of rats in each group

表 3 各组大鼠超声心动图参数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

Table 3 Measurement results of echocardiography parameters in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 15$)

类型 Types	假手术组 Sham group	冠脉微血管疾病组 CMVD group	冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group
LVAWs (mm)	3.37 ± 0.23	2.95 ± 0.70 *	2.85 ± 0.54 **
LVAWd (mm)	1.59 ± 0.22	1.67 ± 0.32	1.76 ± 0.33
LVPWs (mm)	3.66 ± 0.32	3.35 ± 0.64	2.57 ± 0.50 ** ##
LVPWd (mm)	1.99 ± 0.43	1.88 ± 0.28	1.77 ± 0.26
LVIDs (mm)	3.24 ± 0.41	4.79 ± 0.81 **	4.53 ± 0.77 **
LVIDd (mm)	7.80 ± 0.50	8.08 ± 0.67	7.64 ± 0.85
LVV s (μL)	43.57 ± 13.45	111.59 ± 43.14 **	98.10 ± 37.88 **
LVVd (μL)	327.37 ± 47.47	383.79 ± 77.60 *	298.25 ± 74.67 #
SV (μL/beat)	283.80 ± 42.37	272.20 ± 39.25	200.15 ± 74.67 ** ##
CO (mL/min)	99.33 ± 14.83	95.27 ± 13.74	70.05 ± 19.86 ** ##
EF (%)	86.71 ± 3.54	71.79 ± 6.01 **	66.94 ± 10.92 **
FS (%)	58.39 ± 4.60	43.05 ± 5.16 **	39.05 ± 8.39 **

注:LVAWs:左室收缩期前壁厚;LVAWd:左室舒张期前壁厚;LVPWs:左室收缩期后壁厚;LVPWd:左室舒张期后壁厚;LVIDs:左室收缩末期径;LVIDd:左室舒张末期径;LVVs:左室收缩末期容积;LVVd:左心室舒张末期容积;SV:每搏输出量;CO:心输出量;EF:射血分数;FS:短轴缩短率。
Note. LVAWs. Left ventricular systolic anterior wall thickness. LVAWd. Left ventricular diastole anterior wall thickness. LVPWs. Left ventricular systolic posterior wall thickness. LVPWd. Left ventricular diastole posterior wall thickness. LVIDs. Left ventricular end systolic inner diameter. LVIDd. Left ventricular end diastolic diameter. LVVs. Left ventricular end systolic volume. LVVd. Left ventricular end diastolic volume. SV. Stroke volume. CO. Cardiac output. EF. Ejection fraction. FS. Short axis shortening rate.

2.5 对大鼠血液流变学的影响

与假手术组相比,冠脉微血管疾病组血流动力学指标未见明显差异($P > 0.05$);冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠低、中、高切变率下全血黏度及

血浆黏度升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠低、中、高切变率下全血黏度明显升高($P < 0.01$),血浆粘度没有统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 大鼠血液流变学指标测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Measurement results of hemorheology indexes in rats ($\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	<i>n</i>	全血黏度(mPa/s) Whole blood viscosity (mPa/s)			血浆黏度(mPa/s) Plasma viscosity (mPa/s)
		低切(5 s ⁻¹) Low shear(5 s ⁻¹)	中切(60 s ⁻¹) Medium shear(60 s ⁻¹)	高切(150 s ⁻¹) High shear(150 s ⁻¹)	
假手术组 Sham group	15	9.31 ± 1.11	4.44 ± 0.38	3.87 ± 0.30	1.19 ± 0.03
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	9.79 ± 1.05	4.57 ± 0.40	3.96 ± 0.34	1.21 ± 0.05
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	12.08 ± 1.33 ** ##	5.54 ± 0.46 ** ##	4.86 ± 0.60 ** ##	1.24 ± 0.05 *

2.6 对大鼠心脏生化标志物的影响

与假手术相比,冠脉微血管疾病组大鼠血清CK、CK-MB及LDH活性明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠血清

CK、CK-MB及LDH活性显著升高($P < 0.01$)。与冠脉微血管疾病组相比,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组大鼠血清CK活性具有显著性差异($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 各组大鼠血清 CK、CK-MB 及 LDH 变化($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Changes in serum CK, CK-MB, and LDH of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组 Groups	<i>n</i>	CK(U/L)	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)
假手术组 Sham group	15	570.67 ± 156.48	566.87 ± 154.56	904.87 ± 195.93
冠脉微血管疾病组 CMVD group	11	710.09 ± 145.21 *	725.18 ± 110.51 **	1382.82 ± 572.81 **
冠脉微血管疾病气虚血瘀证组 CMVD + QXXY group	10	1210.60 ± 531.57 ** ##	1039.70 ± 488.64 **	1557.20 ± 595.67 **

2.7 对大鼠心肌梗死范围的影响

经 TTC 染色以后,正常心肌组织染红色,梗死区不被染色,呈现白色,表明假手术组未出现梗死区。冠脉微血管疾病组,可见心肌组织有散在白色梗死区域;冠脉微血管疾病气虚血瘀证组,心肌周

围及心肌组织内部均出现白色梗死区(见图 4A)。由图 4B 中可见,冠脉微血管疾病气虚血瘀证组梗死区相比明显,其梗死面积/心脏面积比例显著高于模型组($P < 0.05$),表明造模成功,具有统计学意义。

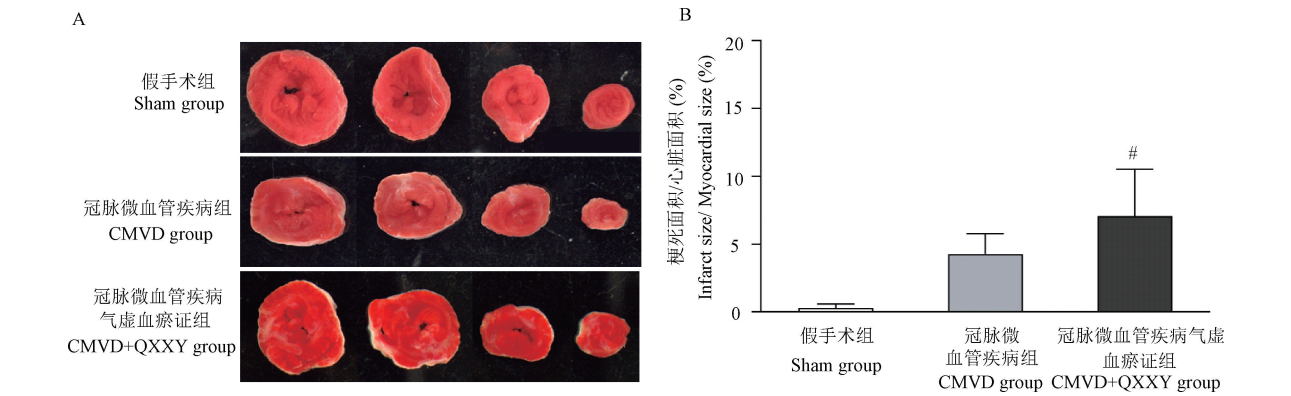
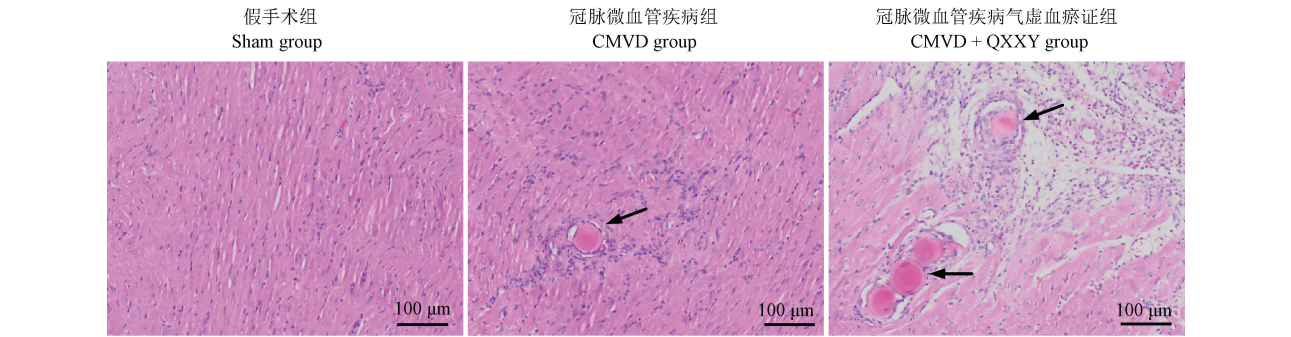


图 4 各组动物心肌 TTC 染色和心肌梗死面积
Figure 4 TTC staining diagram of myocardium and myocardial infarction area of animals in each group

2.8 对大鼠心肌病理形态影响

大鼠心肌组织经 HE 染色处理,在显微镜下观察可见,假手术组大鼠心肌细胞完整,形态规则,纤维排列规律整齐。冠脉微血管疾病组心肌组织可见栓塞微球,栓塞微球周围可见心肌组织出现较小

的溶解、断裂,心肌细胞破坏,心肌纤维排列错位明显;冠脉微血管疾病气虚血瘀证组可见栓塞微球周围心肌组织炎性扩散,纤维组织增生,出现严重的心肌溶解、断裂,心肌细胞彻底破坏,心肌纤维消失。见图 5。



注:箭头指示的为栓塞微球。
图 5 各组动物心肌组织形态(HE 染色)

Note. The arrow indicates microsphere embolism.
Figure 5 Myocardial tissue morphology of animals in each group (HE staining)

3 讨论

冠脉微血管疾病是指由于冠状动脉微血管功能(或)结构异常造成的心肌供血不足,从而引起一系列心肌缺血主观症状(或)客观依据的一类疾病^[12],是影响冠状动脉微循环结构和功能的疾病亚组,普遍存在于心血管危险因素中^[13]。动物疾病模型是认识疾病发病过程与药物干预机理研究的常

用方法,小型猪、大鼠等动物的冠脉微血管疾病模型已较为成熟^[14]。冠脉微血管疾病动物模型造模常见方法有栓塞微球法、自体血栓栓塞法、缺血再灌注损伤法等^[15]。栓塞微球法造模具有不开胸、微创的特点,动物死亡率较低,其优势在于可以稳定建立冠脉微血管疾病模型,相对于小型猪、犬等大动物,大鼠冠脉微血管动物模型有着更广泛的应用。本课题组前期通过心室内注射栓塞微球法建

立了大鼠冠脉微血管疾病模型并进行了中药作用机制研究^[16],本研究成功复制了前期建立的模型,动物模型表现出血清心肌酶活性升高、心肌损伤、心功能降低等,说明该造模方法比较稳定可靠。然而冠脉微血管病病证结合动物模型尚无报道。本研究在前期研究的基础上,采用睡眠剥夺(气虚血瘀)复合心室内注射栓塞微球(冠脉微血管疾病)的方法探索建立了冠脉微血管疾病气虚血瘀证动物模型。

现代中医学认为冠脉微血管疾病的病机属心络受损,血瘀阻络之证,乃属本虚标实之为病,属于中医学中的络脉病范畴,气虚血瘀证是其最常见的证型^[17]。有研究认为,长期睡眠失常易产生精神恍惚、不欲饮食、神疲乏力等临床类似气虚证的症状表现。另外,通过心室内注射栓塞微球法构建疾病模型,使冠状动脉微血管疾病在病理条件下由于气血推动无力,不能充实于心络,心络失养而受损,血瘀内结阻于心络而形成血瘀证的病机变化,充分体现出病症结合动物模型具有与中医临床相符合的特点^[18]。

疾病动物模型有助于发病机制的认识、药物作用及机理的研究,然而目前冠脉微血管疾病气虚血瘀证动物模型尚无报道。气虚血瘀证动物模型常见的造模方法有睡眠剥夺法,评价的方法(或指标)有大鼠舌象、脉象、凝血功能、血浆 ACTH、超声心动图、血管组织 HE 染色等^[19]。本研究结果显示,气虚血瘀证冠脉微血管疾病大鼠即使停止睡眠剥夺因素 1 周后仍出现了明显的血瘀证表现,如血液流变学、舌象改变,同时也出现了气虚证的表现,如活动量少、毛发枯黄欠光泽、抓力降低等,说明该证候因素造模具有好的稳定性和持续性。与单纯疾病因素造模的冠脉微血管疾病大鼠相比,病证结合造模方法建立的动物模型除了反应血瘀证的血流变有明显差异之外,心功能、抓力、心肌酶、梗死面积等指标也显示病证结合动物模型的损伤更为严重。

本研究在前期研究的基础上,以中医理论为指导,通过睡眠剥夺复合心室内注射栓塞微球方法成功建立了气虚血瘀证冠脉微血管疾病大鼠模型。一般指标、血液流变学、血清心肌酶、心功能等体现出了临床气虚血瘀证及冠脉微血管疾病特征疾病一致的客观指标,充分证实了病证结合的动物模型可行性和可靠性,为中医药基础和临床研究提供有价值的实验数据。本研究也将应用系统生物学、微

血管功能与形态及气-脉-血等各种观察指标,从基础到临床等各方面对证候模型以及相应方药药效及作用机制进行深入探索。

参 考 文 献(References)

- [1] 张运,陈韵岱,傅向华,等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.
Zhang Y, Chen YD, Fu XH, et al. China expert consensus on diagnosis and treatment of coronary microvascular disease [J]. Chin Circ J, 2017, 32(5): 421-430.
- [2] Vancheri F, Longo G, Vancheri S, et al. Coronary microvascular dysfunction [J]. J Clin Med, 2020, 9(9): 2880.
- [3] Deng J. Research progress on the molecular mechanism of coronary microvascular endothelial cell dysfunction [J]. Int J Cardiol Heart Vasc, 2021, 34: 100777.
- [4] 黄爱玲,姚方方,张泉,等. 冠脉慢血流导致胸痛心痛的临床证候观察及分析 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(9): 152-153.
Huang AL, Yao FF, Zhang Q, et al. Observation and analysis of clinical syndromes of chest pain and heartache caused by slow coronary flow [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2018, 14(9): 152-153.
- [5] Yang Z, Lin S, Liu Y, et al. Traditional Chinese medicine in coronary microvascular disease [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 929159.
- [6] Taqueti VR, di Carli MF. Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(21): 2625-2641.
- [7] Sun YH, Su Q, Li L, et al. Expression of p53 in myocardium following coronary microembolization in rats and its significance [J]. J Geriatr Cardiol, 2017, 14(5): 292-300.
- [8] 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.
Huang S, Liu JX, Li L, et al. Comparison of 4 types of coronary heart disease model of Qi deficiency and bloodstasis syndrome in rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2016, 41(22): 4216-4225.
- [9] 任建勋,尹春园,史雅红,等. 睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 428-434.
Ren JX, Yin CY, Shi YH, et al. Evaluation on sleep deprivation combined with left anterior descending coronary artery ligation to establish rat model of heart failure with qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(5): 428-434.
- [10] 李磊,孟红旭,付建华,等. 两种造模方法建立大鼠冠脉微循环障碍模型比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 20-26.
Li L, Meng HX, Fu JH, et al. Comparative study of the establishment of rat coronary microvascular dysfunction models

- [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 20-26.
- [11] 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.
- Li L, Lin CR, Ren JX, et al. Research on symptoms for coronary heart disease model of mini swine with phlegm-stasis syndrome type [J]. World Chin Med, 2013, 8(10): 1132-1136.
- [12] Task Force Members, Montalescot G, Sechtem U, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease; the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology [J]. Eur Heart J, 2013, 34(38): 2949-3003.
- [13] Thakker RA, Rodriguez Lozano J, Rodriguez Lozano P, et al. Coronary microvascular disease [J]. Cardiol Ther, 2022, 11(1): 23-31.
- [14] 李磊, 刘建勋, 任建勋, 等. 冠状动脉微循环功能障碍动物模型及中医药防治研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 254-258.
- Li L, Liu JX, Ren JX, et al. Advances in animal model and traditional Chinese medicine prevention in coronary microvascular dysfunction [J]. Chin J Chin Mater Med, 2017, 42(2): 254-258.
- [15] Berry C, Duncker DJ. Coronary microvascular disease: the next frontier for cardiovascular research [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(4): 737-740.
- [16] 李磊, 孟红旭, 辛高杰, 等. 双参宁心胶囊对冠状动脉微循环障碍大鼠心脏功能及血流动力学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 41-50.
- Li L, Meng HX, Xin GJ, et al. Effects of Shuangshen ningxin capsule on cardiac function and hemodynamics in rats with coronary microcirculatory disorder [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(22): 41-50.
- [17] 苏斌杰, 程劲松, 魏毅东, 等. 冠状动脉微血管疾病诊治进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(3): 334-336.
- Su BJ, Cheng JS, Wei YD, et al. Progress in diagnosis and treatment of coronary microvascular diseases [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2018, 20(3): 334-336.
- [18] 史雅红, 任建勋, 刘建勋, 等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3341-3345.
- Shi YH, Ren JX, Liu JX, et al. Effect of blood stasis syndrome induced by sleep deprivation on platelet activation in rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(16): 3341-3345.
- [19] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229-234.
- Chen JC, Liu JX, Ma B, et al. Establishment and evaluation of rat model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(3): 229-234.

[收稿日期] 2023-04-06