

刘倬秀,郝阳晶,付豪,等. 慢性脑缺血气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(8): 1091–1104.

LIU Z X, HAO Y J, FU H, et al. Establishment and evaluation of a disease-syndrome combined rat model of chronic cerebral ischemia with Qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(8): 1091–1104.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.08.001

慢性脑缺血气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立与评价

刘倬秀¹, 郝阳晶¹, 付豪¹, 李钦青¹, 张建军¹, 楚世峰², 张钊²,
曹卓青^{1*}, 贺文彬^{1*}

(1. 山西中医药大学, 中医脑病学山西省重点实验室, 太原 030024;
2. 中国医学科学院药物研究所 & 神经科学中心, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立一种慢性脑缺血气虚血瘀证病证结合大鼠模型并对其评价。**方法** 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术(sham)组、双侧颈总动脉结扎(2-VO)组与睡眠剥夺联合双侧颈总动脉结扎(SD + 2-VO)组, 每组 10 只; 采用力竭游泳和舌色采集评价动物气虚血瘀证体征, 采用巴恩斯迷宫检测动物认知能力, 激光散斑血流成像比较动物脑血流量, 苏木素-伊红(HE)和髓鞘(LFB)染色分别观察海马及白质病理学变化, 透射电镜(TEM)观察海马 CA1 区神经元超微结构改变, Western Blot 检测 NeuN、VEGFA 蛋白表达, 免疫荧光(IF)检测 CD31 荧光强度。**结果** 与 sham 组相比, 2-VO 组大鼠表现出脑血流量降低, 但并不能完全模拟气虚血瘀的临床表现。与 2-VO 组相比, SD + 2-VO 组大鼠表现出活动量减少, 脑血流显著下降, 游泳时间显著缩短, 舌色黯淡的特点; 巴恩斯迷宫显示, SD + 2-VO 组动物学习记忆能力显著降低; HE 染色、TEM 和 LFB 染色显示, SD + 2-VO 组神经元及脑白质损伤显著, Western Blot 结果显示, 2-VO 组和 SD + 2-VO 组 NeuN 表达下降, VEGFA 表达升高, IF 结果显示 2-VO 组和 SD + 2-VO 组 CD31 表达水平升高。**结论** 睡眠剥夺结合双侧颈总动脉结扎手术能够建立慢性脑缺血气虚血瘀证大鼠模型, 与 2-VO 组相比, 气虚血瘀体征更显著, 更符合临床慢性脑缺血气虚血瘀证的表现, 为慢性脑缺血中医药研究提供了动物模型基础。

【关键词】 慢性脑缺血; 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 (2025) 08-1091-14

Establishment and evaluation of a disease-syndrome combined rat model of chronic cerebral ischemia with Qi deficiency and blood stasis syndrome

【基金项目】 国家自然科学基金(U21A20410), 山西省中医药管理局科研课题(2022ZYCY270), 山西中医药大学优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金项目(2022BKS18), 山西中医药大学研究生教育改革及创新创业项目(2023CX049)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (U21A20410), Scientific Research Project of Shanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (2022ZYCY270), Outstanding PhD Graduates in Shanxi University of Chinese Medicine Come to Shanxi for Work and are Rewarded with Research Start-Up Funds (2022BKS18), Graduate Education Reform and Innovation and Entrepreneurship Project of Shanxi University of Chinese Medicine (2023CX049).

【作者简介】 刘倬秀, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理。Email: liuzhuoxiu@stu.sxtcm.edu.cn

【通信作者】 贺文彬, 男, 博士, 教授, 研究方向: 脑健康防护理论与技术。Email: hewb@sxtcm.edu.cn;

曹卓青, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 脑病的中医药防治。Email: caozhuoqing@sxtcm.edu.cn。

* 共同通信作者

LIU Zhuoxiu¹, HAO Yangjing¹, FU Hao¹, LI Qinqing¹, ZHANG Jianjun¹, CHU Shifeng², ZHANG Zhao²,
CAO Zhuoqing^{1*}, HE Wenbin^{1*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Key Laboratory of Chinese Brain Diseases, Taiyuan 030024, China;
2. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica &
Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Corresponding author: CAO Zhuoqing. E-mail: caozhuoqing@sxtcm.edu.cn;

HE Wenbin. E-mail: hewb@sxtcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish and evaluate an integrated disease-syndrome rat model of chronic cerebral ischemia with Qi deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** Thirty male Wistar rats were allocated randomly into three groups ($n = 10$ per group): sham operation (sham), 2-vessel occlusion (2-VO) group, and sleep deprivation combined with 2-VO (SD + 2-VO) group. We comprehensively assessed Qi deficiency and blood stasis syndrome manifestations in the rats using a dual evaluation approach, combining exhaustive swimming tests with quantitative tongue chroma analysis. Cognitive function was evaluated using the Barnes maze, and cerebral blood flow was compared using laser speckle contrast imaging. The histopathology of the hippocampal cytoarchitecture and white matter were examined using hematoxylin-eosin (HE) and Luxol fast blue (LFB) staining, respectively, and ultrastructural alterations of neurons in the hippocampal CA1 region were observed by transmission electron microscopy (TEM). Protein expression levels of NeuN, vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and CD31 were detected by Western Blot and immunofluorescence. **Results** Cerebral blood flow was significantly reduced in rats in the 2-VO group compared with the sham group, but they failed to recapitulate the key clinical hallmarks of Qi deficiency and blood stasis syndrome. In contrast, rats in the SD + 2-VO group exhibited significantly reduced locomotor activity, exacerbated cerebral hypoperfusion, shortened swimming duration, and darkened tongue color compared with 2-VO rats. Rats in the SD + 2-VO group demonstrated significantly impaired learning and memory abilities in the Barnes maze test. Consistent with these observations, HE staining, TEM, and LFB staining revealed substantial neuronal and white matter damage in the SD + 2-VO group. NeuN expression was decreased and VEGFA and CD31 expression levels were increased in the 2-VO and SD + 2-VO groups, as shown by Western Blot. Taken together, these findings indicated that the SD + 2-VO model effectively recapitulated the clinical features of chronic cerebral ischemia with Qi deficiency and blood stasis pattern. **Conclusions** The combination of sleep deprivation and bilateral carotid artery occlusion successfully established a rat model of chronic cerebral ischemia with Qi deficiency and blood stasis syndrome. Compared with the 2-VO model, SD + 2-VO model demonstrates more pronounced syndrome manifestations and better clinical relevance, thus providing a valuable animal model for traditional Chinese medicine research on chronic cerebral ischemia.

【Keywords】 chronic cerebral ischemia; Qi deficiency and blood stasis syndrome; disease-syndrome combination; sleep deprivation; animal model

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

慢性脑缺血 (chronic cerebral ischemia, CCI) 是指多种原因引起的脑血管结构性病变或血液黏度及血流动力学异常的低灌注状态, CCI 发生时大脑整体水平或前、后循环区域性供血减少^[1-2]。CCI 发病率高, 极易引起阿尔茨海默病、血管性痴呆等多种神经退行性疾病。现代中医学认为, 气虚血瘀是慢性脑缺血的病机之一^[3], 《景岳全书·眩运》中记载本病的病因“有气虚

者……当升阳补气; 有血虚者……当益阴补血”^[4]。气虚血瘀作为慢性脑缺血的常见证型之一, 其主要病机为气虚无力推动血液运行, 血行不畅而脑络瘀滞不通, 形成慢性脑缺血, 气虚血瘀日久则脑窍失养, 神机失用, 导致认知功能及记忆力减退。

双侧颈总动脉结扎手术 (2-vessel occlusion, 2-VO) 是常用的慢性脑缺血动物疾病造模方

法^[5],然而该模型不能全面反映中医气虚血瘀证型的临床特点,中医注重辨证论证用药,因此构建病证结合的动物模型更有助于中医药药效研究。本实验团队前期已建立小鼠气虚血瘀模型^[6],但尚无慢性脑缺血气虚血瘀证大鼠模型的报道,因此本研究旨在 2-VO 慢性脑缺血动物模型的基础上,建立并探索慢性脑缺血气虚血瘀证病证结合大鼠动物模型,以期慢性脑缺血的中医药研究提供更精准的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄的健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 180 ~ 200 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司【SCXK(京)2024-0010】。动物饲养于山西中医药大学动物房【SYXK(晋)2020-0006】,饲养环境为温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 55% ~ 65%,12 h 光暗循环的环境中,自由食水。适应性饲养 10 d 后开始实验。动物实验所有程序符合山西中医药大学《实验室动物伦理和使用指南》中的标准并通过山西中医药大学伦理委员会批准(2021DW098)。

1.1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(批号:R510-22-10,购自深圳瑞沃德生命科技有限公司);氨苄青霉素钠(批号:MB1378,购自大连美仑生物技术有限公司);4%多聚甲醛(批号:DF0135,购自北京雷根生物技术有限公司);髓鞘染液(批号:G1030-100,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);苏木素-伊红(HE)染液(批号:DH0006,购自北京雷根生物技术有限公司);NeuN Rabbit mAb(批号:A19086,购自爱博泰克生物科技有限公司);VEGFA Rabbit mAb(批号:R26073,购自成都正能生物技术有限公司); β -actin Rabbit mAb(批号:AC038,购自爱博泰克生物科技有限公司);HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H + L)(批号:AS014,购自爱博泰克生物科技有限公司);柠檬酸钠抗原修复液(批号:AR0024,购自武汉博士德生物工程有限公司);曲拉通 Triton X-100(批号:T8200,购自北京索莱宝科技有限公司);DAPI 染色液(批号:AR1177,购自武汉博士德生物工程有限公司);5% BSA 封闭

液(批号:AR0004,购自武汉博士德生物工程有限公司);组织自发荧光淬灭剂(批号:G1221,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);抗荧光衰减封片剂(批号:AR1109,购自武汉博士德生物工程有限公司);Anti-CD31 Rabbit pAb(批号:GB11063-2-100,购自武汉赛维尔生物科技有限公司);CY3 Conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG(H + L)(批号:BA1036,购自武汉博士德生物工程有限公司);电镜固定液(批号:G1102,购自武汉赛维尔生物科技有限公司)。

小动物麻醉机(型号:R540,购自深圳瑞沃德生命科技有限公司);巴恩斯(Barnes)迷宫(型号:63027,购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);小动物行为学视频追踪系统(型号:SMART 3.0,购自Panlab);非吸收性缝线(型号:3-0,5-0,均购自强生(中国)医疗器材有限公司);激光散斑血流成像仪(型号:RFLSI III,购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);索尼数码相机(型号:FDR-AX100E,购自上海索广电子有限公司);透射电镜(型号:HT7700,购自hitachi);数理切片扫描仪(型号:KF-PRO-005-EX;购自宁波江丰生物信息技术有限公司);电泳仪(型号:DYY-6C,购自北京市六一仪器厂);凝胶成像系统(型号:SH-523PLUS;购自杭州申花科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立

将动物随机分为假手术(sham)组、双侧颈总动脉结扎(2-VO)组与睡眠剥夺(sleep deprivation,SD)联合双侧颈总动脉结扎(SD + 2-VO)组,每组 10 只。sham 组不进行睡眠剥夺与双侧颈总动脉结扎,仅钝性分离颈总动脉与神经。2-VO 组采用双侧颈总动脉结扎手术建立慢性脑缺血模型:术前大鼠禁食 12 h、禁水 4 h,异氟烷(500 ~ 700 mL/min)诱导麻醉,将大鼠仰卧位于操作台固定,颈部皮肤剃毛备皮,在颈前中部剪开皮肤,逐层分离组织,暴露双侧颈总动脉,钝性分离迷走神经与颈总动脉,使用 5-0 丝线先结扎一侧动脉,再结扎另一侧,将氨苄青霉素钠粉末撒于伤口后用 3-0 丝线逐层缝合。SD + 2-VO 组睡眠剥夺与双侧颈总动脉结扎手术相结合,2-VO 术前先采用多平台水环境法每天 7:00 ~

23:00 睡眠剥夺,共 16 h,连续 7 d,气虚血瘀证模型成功建立后进行双侧颈总动脉结扎。多环境水平台法是将大鼠置于四周环水的平台上,平台直径为 6.5 cm,距底面高度 9.5 cm,水面高度在平台下 1 cm。当动物进入睡眠,则会因鼻尖触水而醒或因肌肉松弛而掉入水中,水面低于大鼠的身高,利用大鼠畏水的特性,驱使大鼠再次爬上平台,如此往复,以达到睡眠剥夺的目的。实验结束后,每组取 3 只大鼠麻醉,经心脏灌注生理盐水和 4%多聚甲醛后取脑,于 4%多聚甲醛固定 24 h,经梯度脱水后石蜡包埋切片。其余大鼠麻醉后腹主动脉取血,于冰上收集脑组织,液氮冻存后储存于 -80°C 冰箱。

1.2.2 一般状态观察

观察大鼠在实验过程中体质量、毛发的变化以及精神状态与行为活动的改变。

1.2.3 激光散斑监测脑血流

在第 35 天(2-VO 术后 28 d)异氟烷(500 ~ 700 mL/min)诱导麻醉大鼠,麻醉后将其固定于立体定位仪上,用手术刀沿颅顶正中矢状线划开皮肤,钝性分离浅筋膜,以中囟为基点,暴露颅骨,并用棉球和生理盐水擦洗,使用高速牙科钻打磨中囟至后囟的颅骨,钻磨期间加生理盐水降低高速牙科钻及颅窗的温度,在保留硬脑膜完整的情况下小心打磨直至骨片透明,颅窗大小约为 $8\text{ mm} \times 8\text{ mm}$,使得皮层上血管在显微镜下清晰可见,待大鼠血流稳定后,连续记录 20 s 大鼠的脑血流。

1.2.4 舌色采集

分别在第 7(2-VO 前)、35(2-VO 术后 28 d)天将大鼠麻醉后,采用索尼数码 4K 摄相机镜头对大鼠进行舌象图像采集。保证拍摄环境一致,灯光一致,机位固定,每只大鼠均采集 3 张舌相照片,取均值进行舌色分析,避免麻醉时间差异对舌色的干扰。舌色照片以 JPG 格式输出,用 Image J 1.54 g 软件分析动物舌色,记录红色(R)、绿色(G)、蓝色(B)分量值。

1.2.5 力竭游泳

分别在第 1(SD 前)、7(2-VO 前)、14(2-VO 术后 7 d)、21(2-VO 术后 14 d)天将大鼠放入高为 60 cm,直径为 30 cm 的透明水桶中(其水深 35 cm,水温 $21 \sim 23^{\circ}\text{C}$),记录大鼠力竭时间,以

大鼠口鼻沉入水中 10 s 仍不能返回水面作为力竭标准。

1.2.6 巴恩斯迷宫测试

在第 21 天(2-VO 术后 14 d)进行 Barnes 迷宫测试。Barnes 迷宫为哑光圆盘(直径 80 cm),上有等距分布在边缘的 18 个圆洞(直径 10 cm),圆盘下固定逃避箱($18\text{ cm} \times 14\text{ cm} \times 10\text{ cm}$),起始箱为不透光材质。实验图像记录分析软件为 smart 3.0 分析系统。实验时伴有强光刺激,实验分为适应期、训练期和测试期。适应期:将大鼠置于迷宫中央,起始箱扣住大鼠 5 s 后撤去,开始记录,180 s 内大鼠未找到逃避箱则引导至内适应 30 s,每只动物适应 1 次;训练期与适应期同样操作,无论是否找到逃避箱,均需要引导大鼠至逃避箱适应 30 s,时间 180 s,每天训练 1 次,共 3 次;测试期撤去逃避箱,大鼠测试 180 s,操作同训练期,测试 1 次。大鼠第 1 次找到逃避箱的时间记为潜伏期,未找到则潜伏期记为 180 s。记录潜伏期和在目标区域探索时间。

1.2.7 透射电镜

切取 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小海马组织,2.5%戊二醛固定至少 6 h 后放置于 4°C 冰箱中,用缓冲液冲洗后用锇酸固定 2 h,缓冲液冲洗后梯度乙醇脱水,丙酮脱水,丙酮树脂浸透后树脂包埋, $36 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 聚合,对树脂块进行修块,制成超薄切片后染色,置于电镜下观察。

1.2.8 髓鞘染色

牢固蓝染液 60°C 预热 0.5 h,将切片脱蜡后置于 LFB 液中染色 4 h;放至常温后用自来水洗去浮色,0.05%碳酸锂溶液分化 5 s,自来水洗终止反应;70%乙醇溶液分化 5 s,自来水洗终止反应;0.05%碳酸锂溶液和 70%乙醇溶液交替分化至灰白质分辨明显,充分水洗后进行脱水、透明、封片。

1.2.9 苏木素-伊红(HE)染色

脑组织石蜡切片脱蜡,再水化后,将切片在苏木素溶液染色 3 min,自来水冲洗;1%乙醇盐酸分化 10 s,自来水冲洗;1%氨水反蓝 10 s,自来水冲洗;1%伊红染液染色 30 s,自来水冲洗。梯度乙醇脱水,置于脱蜡液中透明,中性树脂封片。最后,镜下观察组织病理形态变化。

1.2.10 Western Blot

取海马组织匀浆后提取蛋白;制备 SDS-

PAGE 凝胶,放入电泳槽中,将蛋白上样;80 V, 10 min,120 V, 50 min 电泳;冰浴 1 h 电转至 PVDF 膜上;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;将 PVDF 膜置于封闭液摇床室温封闭 30 min;加入一抗 (NeuN 及 VEGFA 抗体稀释比例均为 1:1000),4 ℃ 过夜;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入二抗 (HRP 抗体稀释比例为 1:10 000),室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;滴加发光液,置于成像仪中曝光成像。

1.2.11 免疫荧光法 (immunofluorescence, IF)

取石蜡切片,脱蜡并水化后,柠檬酸钠修复液抗原修复 30 min,96 ℃,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;0.1% Triton 浸润 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;5% BSA 封闭 30 min,37 ℃,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;使用一抗 (CD31 抗体稀释比例 1:200)孵育,4 ℃ 过夜,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;二抗 (CY3 抗体稀释比例 1:200)孵育 1 h,37 ℃,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;DAPI 室温孵育 10 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;自发荧光淬灭剂 B 液孵育 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;滴加抗荧光衰减封片剂,荧光显微镜下观察。

1.3 统计学分析

实验数据采用 Graphpad Prism 9.5.0、SPSS 26.0 软件进行分析,多组之间比较若结果符合正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,事后检验 LSD,数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述;方差不齐,采用 Tamhane' T2 检验,若不符合正态分布,则采用 *H* 检验 (Kruskal-Wallis test),数据采用中位数 $\pm$ 四分位距 ($M \pm IQR$) 描述,并绘制箱式图进行描述;连续资料若符合正态分布,采用重复测量方差分析,若不符合,则采用 Friedman。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 气虚血瘀证的评价

sham 组大鼠体型正常,精神状态、摄食、活动均良好,毛发光顺;与 sham 组相比,2-VO 组大鼠体质量显著下降,活动量少,毛发枯黄;与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组大鼠摄食减少,体质量显著下降,活动较前减少,毛发枯黄无光泽,见图 1A。

气虚会引起乏力,可表现为运动能力的减退,研究人员采用力竭游泳测试动物的运动能

力,作为气虚证形成的判断依据。如图 1B,在 1 周的睡眠剥夺后,SD + 2-VO 组大鼠游泳时间较 sham 组与 2-VO 组显著缩短 ($P < 0.01$);双侧颈总动脉结扎后,与 sham 组相比,2-VO 组及 SD + 2-VO 组大鼠第 3、4 周力竭游泳时间持续缩短,第 4 周时 2-VO 组及 SD + 2-VO 组大鼠力竭游泳时间与 sham 组相比具有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组大鼠游泳时间较短 ($P < 0.05$)。

舌色是判断血瘀的重要标志之一,选取实验第 7 天 (SD 建立后,2-VO 术前) 及第 35 天 (2-VO 术后第 28 天) 时各组动物的舌色做比较,见表 1,进行 7 d 睡眠剥夺后,SD + 2-VO 组大鼠较 2-VO 组,舌色变暗,G 值显著升高 ($P < 0.05$),较 sham 组,B 值显著升高 ($P < 0.05$);见表 2,实验第 35 天时 (2-VO 术后第 28 天),sham 组大鼠舌色淡红,与 sham 组相比,2-VO 组大鼠舌色暗红,R 值降低,且有显著性差异 ($P < 0.01$);与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组大鼠舌色暗紫,R 值显著降低 ($P < 0.01$),如图 1C。

2.2 脑血流量检测

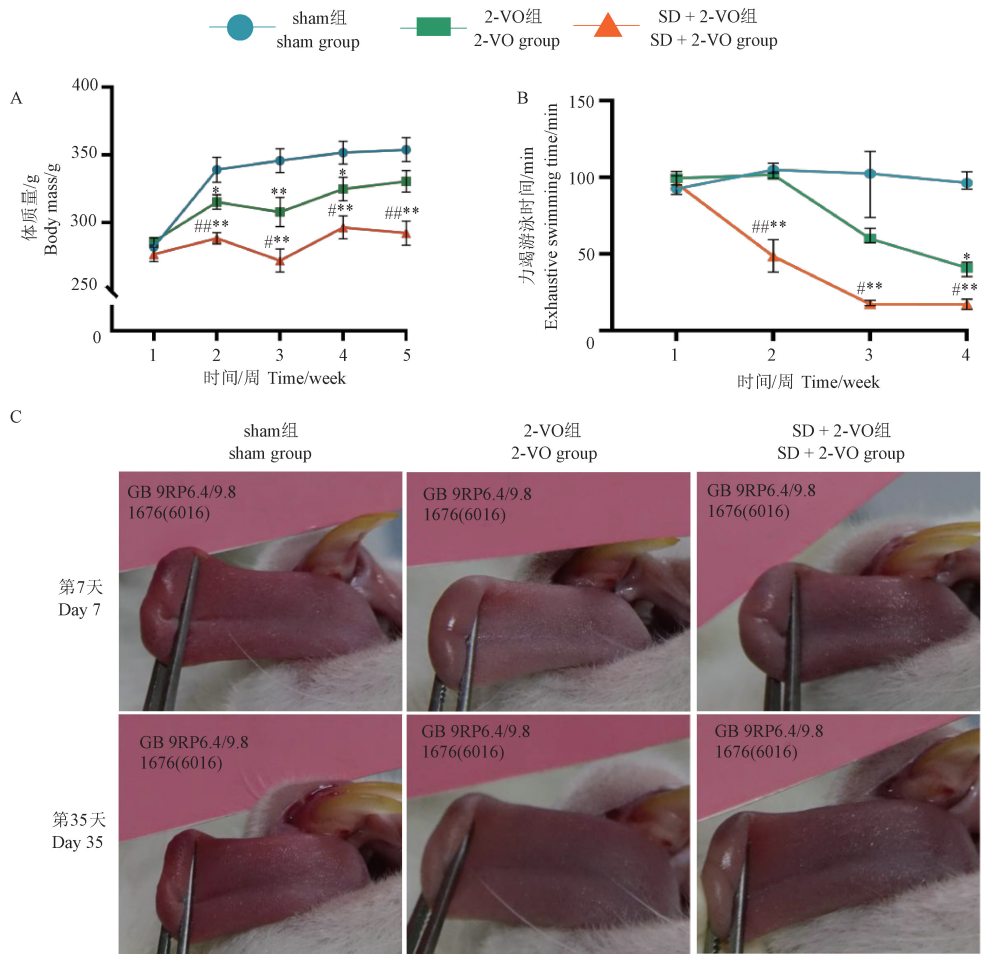
2-VO 会引起脑血流的降低,因此采用激光散斑测定大鼠脑血流,结果显示,与 sham 组相比,2-VO 组和 SD + 2-VO 组的脑血流均显著下降 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组大鼠的脑血流显著下降 ($P < 0.01$),见图 2。

2.3 学习记忆能力检测

脑血流降低与学习记忆损伤联系密切,因此,研究人员采用巴恩斯迷宫测试中的逃避潜伏期以及在目标区域探索的时长作为大鼠学习记忆能力的检测指标。在训练期,sham 组和 2-VO 组动物的逃避潜伏期随着训练次数的增加而缩短,见图 3。在测试期撤去逃避箱后,sham 组大鼠逃避潜伏期最短,且在目标区域探索时间最长;与 sham 组相比,2-VO 组动物的逃避潜伏期较长且探索时间较短 ($P < 0.01$);与 2-VO 组相比较,SD + 2-VO 组大鼠潜伏期延长 ($P < 0.01$) 且探索时间较短 ($P < 0.05$)。

2.4 脑白质病理学变化

学习记忆和信息的传递依赖于脑白质中髓鞘的完整性,然而慢性脑缺血会导致神经脱髓鞘病变。因此,采用 LFB 染色观察各组动物髓鞘损



注:A:体质量;B:力竭游泳时间;C:舌色图;与 sham 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 2-VO 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 各组大鼠气虚血瘀体征评价($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A. Body mass. B. Exhaustive swimming time. C. Tongue color image. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with 2-VO group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Evaluation of Qi deficiency and blood stasis signs in rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 1 第 7 天各组大鼠舌色 RGB 比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison of tongue color RGB of rats in each group on the 7th day($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Groups	R 值 R value	G 值 G value	B 值 B value	R 值/G 值 R value/G value	R 值/B 值 R value/B value
sham 组 sham group	79.570 $\pm$ 2.947	42.850 $\pm$ 1.533	52.460 $\pm$ 1.595	1.860 $\pm$ 0.043	0.890 $\pm$ 0.073
2-VO 组 2-VO group	78.340 $\pm$ 2.562	41.710 $\pm$ 2.230	52.880 $\pm$ 3.090	1.900 $\pm$ 0.061	0.860 $\pm$ 0.073
SD + 2-VO 组 SD + 2-VO group	86.360 $\pm$ 6.791	56.700 $\pm$ 4.822 [#]	69.990 $\pm$ 5.718 [*]	1.540 $\pm$ 0.032 ^{**##}	0.810 $\pm$ 0.016

伤情况。如图 4, sham 组大鼠的髓鞘结构紧密,排列整齐,与 sham 组相比,2-VO 组大鼠髓鞘排列散乱,结构疏松,神经髓鞘空泡显著增多 ($P < 0.05$);与 2-VO 相比,SD + 2-VO 组大鼠髓鞘排列散乱,细胞间间隙变大,神经髓鞘空泡显著增多

($P < 0.05$)。

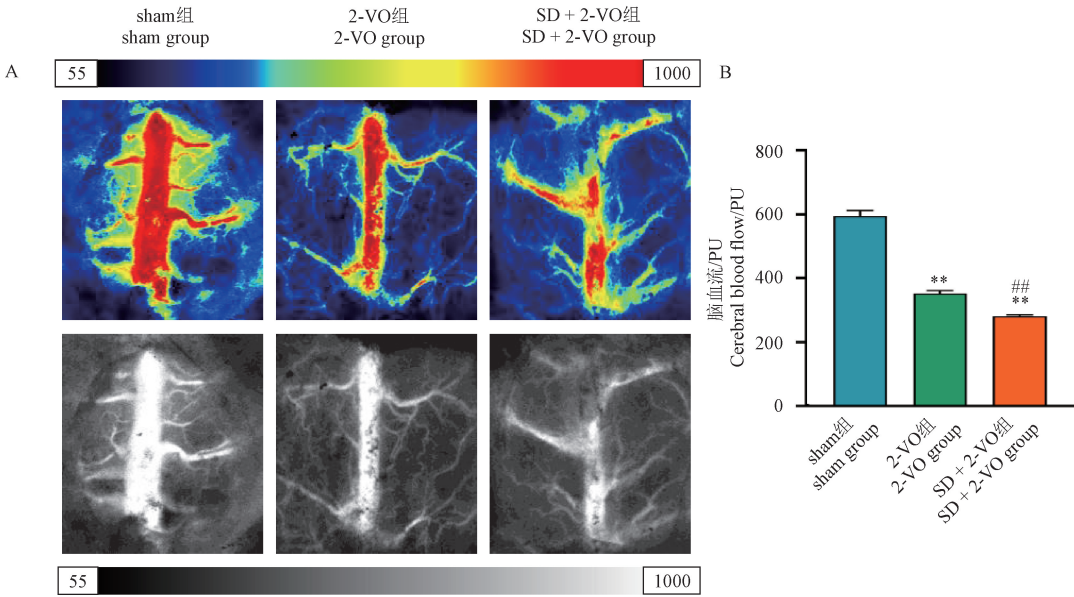
2.5 海马 CA1 区和 CA3 区神经元病理学变化

学习记忆及信息处理还与海马体密切相关,长期的慢性脑缺血会导致海马缺血缺氧,进而导致神经元损伤。海马 CA1 区和 CA3 区在学习记

表 2 第 35 天各组大鼠舌色 RGB 比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of tongue color RGB of rats in each group on the 35th day ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组 Groups	R 值 R value	G 值 G value	B 值 B value	R 值/G 值 R value/G value	R 值/B 值 R value/B value
sham 组 sham group	91.830 ± 2.429	52.580 ± 1.825	60.470 ± 2.635	1.760 ± 0.047	1.540 ± 0.056
2-VO 组 2-VO group	82.270 ± 2.077 **	49.890 ± 2.301	61.650 ± 3.113	1.670 ± 0.060	1.360 ± 0.061
SD + 2-VO 组 SD + 2-VO group	72.570 ± 2.018 ***	43.410 ± 2.177 ***	52.670 ± 2.867#	1.690 ± 0.057	1.410 ± 0.070



注:A:激光散斑血流成像伪彩图与灰度图;B:脑血流量统计。

图 2 各组大鼠脑血流($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. Pseudo-color image and grayscale image of laser speckle blood flow imaging. B. Cerebral blood flow.

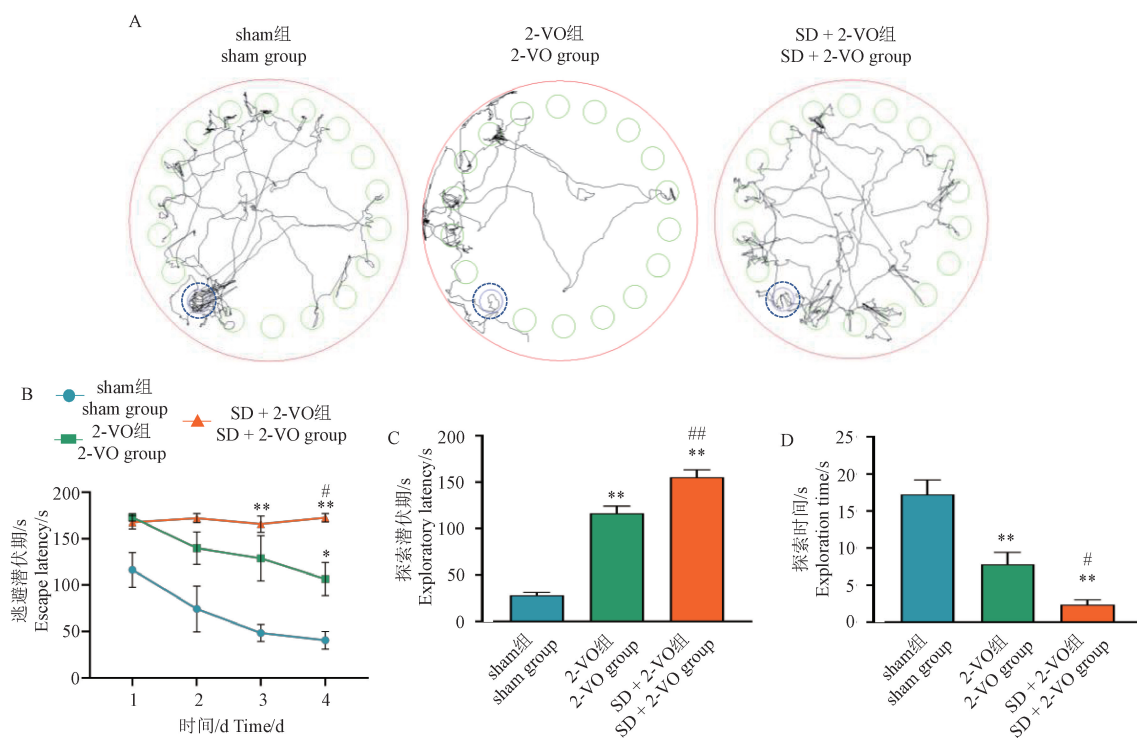
Figure 2 Cerebral blood flow in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

忆中发挥着重要的作用,因此采用 HE 染色观察海马 CA1 区和 CA3 区神经元的细胞结构。如图 5 所示,sham 组大鼠 CA1 区和 CA3 区神经元细胞结构清晰,排列整齐紧密,胞体完整,细胞形态规整;与 sham 组相比,2-VO 组大鼠海马 CA1 区神经元数量减少,CA3 区神经元数量显著减少($P < 0.05$),排列松散,边界模糊;SD + 2-VO 组大鼠海马 CA1 区神经元数量显著减少($P < 0.05$),CA3 区神经元数量显著减少($P < 0.01$)。与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组大鼠海马 CA1 区神经元数量减少,CA3 区神经元数量显著减少($P < 0.05$),排列紊乱,胞膜溶解,边界模糊,间隙变大,细胞形态不规则。

2.6 海马 CA1 区神经元胞内超微结构改变

如图 6,sham 组大鼠的海马 CA1 区神经元细

胞结构正常,未见固缩或肿胀,细胞膜完整,胞质均匀,细胞核(N)核膜为圆形且光滑完整,核仁(Nu)为圆形,染色质均匀;细胞器丰富且结构正常;线粒体(M)丰富且大多结构正常,嵴平行排列;粗面内质网(RER)未见明显扩张,上有核糖体附着;高尔基体(Go)结构清晰,未见明显增大,溶酶体(Ly)个别存在。与 sham 组比较,2-VO 组大鼠海马 CA1 区神经元形态明显损伤,表现为细胞呈中度水肿,胞质稀疏,细胞核(N)椭圆,核仁(Nu)变形且较小;细胞器结构清晰度较差:线粒体(M)肿胀,嵴断裂减少;高尔基体(Go)结构破坏;溶酶体(Ly)较多。SD + 2-VO 组大鼠海马 CA1 区神经元细胞严重水肿变形,细胞核(N)固缩,染色质溶解;细胞器丢失:线粒体(M)嵴消失,呈现空泡化;粗面内质网(RER)肿大断裂。

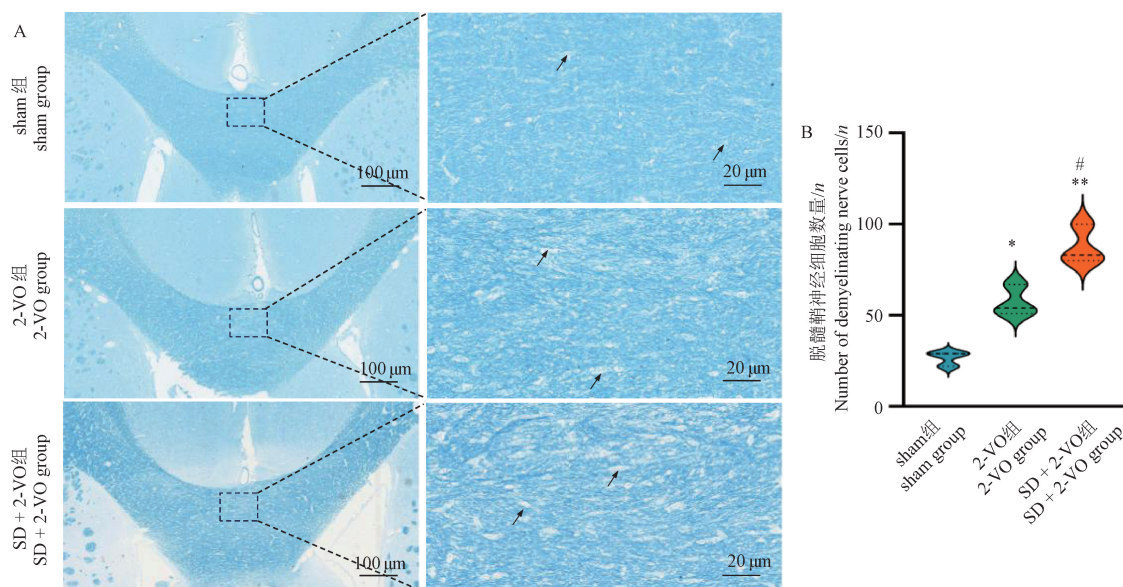


注:A:测试期大鼠的轨迹图(蓝圈内为目标区域);B:训练期大鼠的逃避潜伏期;C:测试期大鼠的探索潜伏期;D:测试期大鼠在目标区域的探索时间。

图3 各组大鼠巴恩斯迷宫结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. A. Trajectory diagram of rats during the test period (target area in blue circle). B. Escape latency of rats during the training period. C. Exploratory latency of rats in the test period. D. Exploration time of rats in the target area during the test period.

Figure 3 Results of Barnes maze in rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

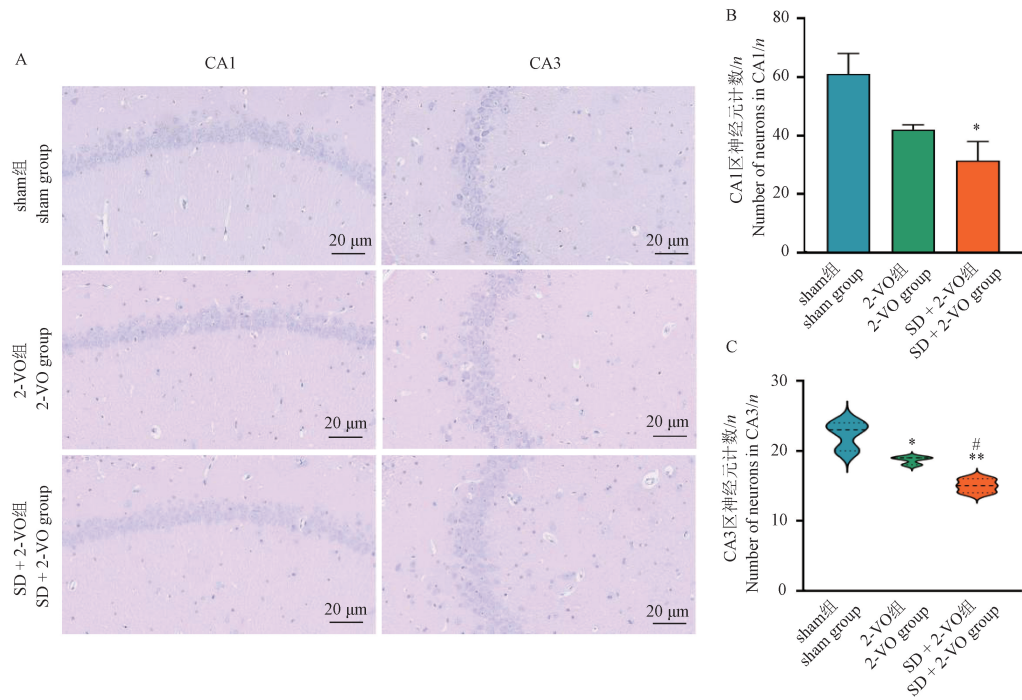


注:A:大鼠胼胝体髓鞘 LFB 染色(黑色箭头指神经细胞髓鞘空泡);B:脱髓鞘神经细胞数量统计。

图4 各组大鼠脑白质比较($M \pm IQR, n = 3$)

Note. A. LFB staining of myelin sheath of the corpus callosum in rats (black arrows refer to myelin vacuoles of nerve cells). B. Statistics on the number of demyelinating nerve cells.

Figure 4 Comparison of white matter in rats in each group($M \pm IQR, n = 3$)



注:A:大鼠海马 CA1、CA3 区 HE 染色;B:大鼠海马 CA1 区神经元数量($\bar{x} \pm s, n = 3$);C:大鼠海马 CA3 区神经元数量($M \pm IQR, n = 3$)。

图 5 各组大鼠海马神经元比较

Note. A. HE staining in CA1 and CA3 regions of rat hippocampus. B. Number of neurons in the CA1 region of the rat hippocampus($\bar{x} \pm s, n = 3$). C. Number of neurons in the CA3 region of the rat hippocampus($M \pm IQR, n = 3$)

Figure 5 Comparison of hippocampal neurons in rat groups

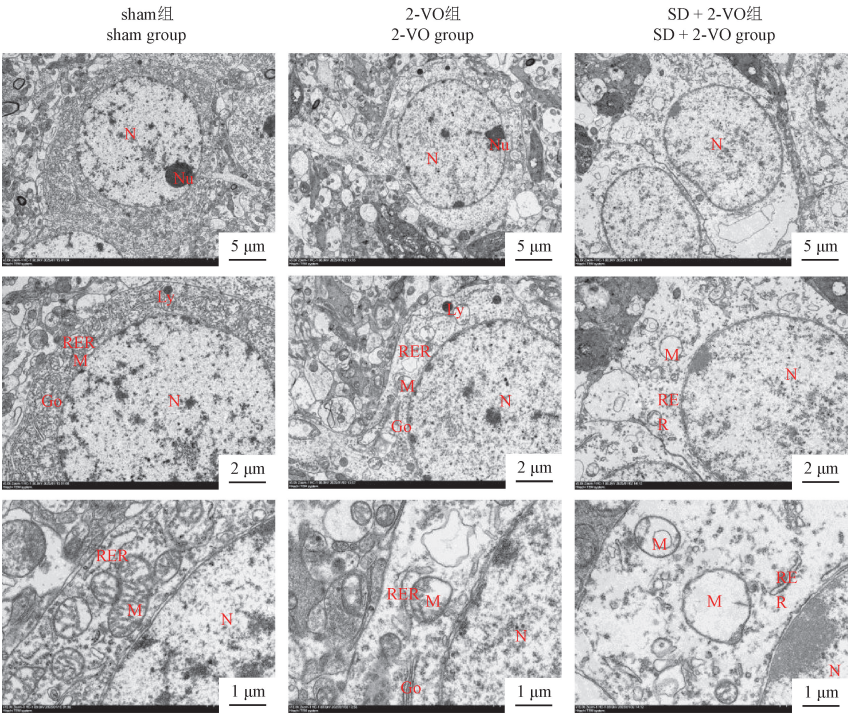


图 6 海马 CA1 区神经元胞内超微结构改变

Figure 6 Ultrastructural changes of neurons in the CA1 region of the hippocampus

2.7 海马区 NeuN、VEGFA 及 CD31 表达水平变化

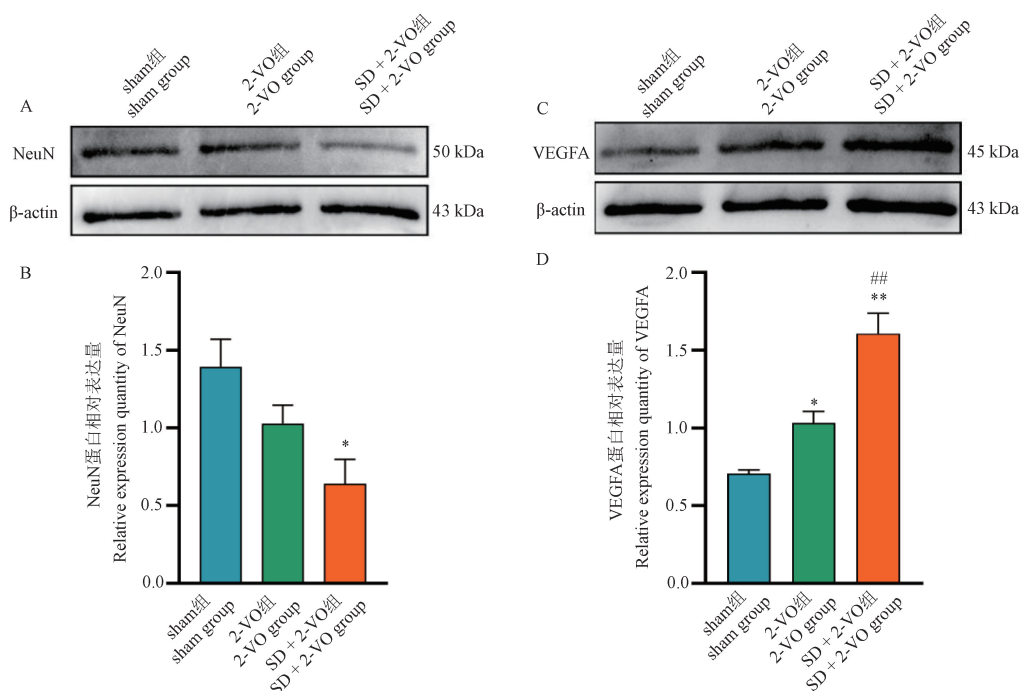
与 sham 组相比,2-VO 组 NeuN 蛋白表达量有降低趋势,VEGFA 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$);SD + 2-VO 组 NeuN 蛋白表达量显著减低 ($P < 0.05$),VEGFA 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组 NeuN 蛋白表达量有降低趋势,VEGFA 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$),见图 7。与 sham 组相比,2-VO 组的 CD31 表达有升高趋势,SD + 2-VO 组 CD31 表达显著升高 ($P < 0.01$);与 2-VO 组相比,SD + 2-VO 组 CD31 表达显著升高 ($P < 0.05$),见图 8,图 9。

3 讨论

慢性脑缺血主要表现为头晕头痛,记忆力减退,注意力不集中等症状^[7],中医将慢性脑缺血归类于“眩晕”“头痛”“健忘”“不寐”等病,现代中医学认为气虚血瘀是慢性脑缺血的病因之一^[8],《灵枢·口问》^[9]记载“上气不足,脑为之不

满,耳为之苦鸣,头为之苦倾,目为之眩”。气为血之帅,气虚而清阳不升,血行迟滞,瘀阻脑络,清窍失养,发为本病。越来越多的证据也表明,气虚血瘀是缺血性脑病早期的证候^[3,10]。大量研究表明,失眠患者的证型主要包括气虚证、血瘀证等多种证型^[11-14]。由此可见,睡眠不足可能会造成气虚血瘀证。长期睡眠不足,节律失常或睡眠障碍所表现出的症状符合气虚证精神倦怠、食欲减退、疲乏无力等症状^[15-20]。

传统的慢性脑缺血动物模型多采用 2-VO 为代表的血管闭塞方法造模^[21],2-VO 操作简单、结果稳定、死亡率低,能较好还原慢性脑缺血的临床表现。中医药讲求辨证论治,审证求方,病证结合的动物模型更能够还原中医临床患者的身体状态,更有助于科研工作者从中医的角度研究发病及药理作用机制。研究表明长期睡眠不足是慢性脑缺血的病因之一,会引起气虚血瘀^[15],因此本课题组采用睡眠剥夺与 2-VO 结合的方法尝试造模慢性脑缺血气虚血瘀证大鼠模型,以期临床辨证用药的研究提供更丰富的动物模型。



注:A:大鼠海马 NeuN 蛋白表达;B:大鼠海马 NeuN 蛋白相对表达量;C:大鼠海马 VEGFA 蛋白表达;D:大鼠海马 VEGFA 蛋白相对表达量。

图 7 各组大鼠海马区 NeuN、VEGFA 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. NeuN protein expression in rat hippocampus. B. Relative expression of NeuN protein in rat hippocampus. C. VEGFA protein expression in rat hippocampus. D. Relative expression of VEGFA protein in rat hippocampus.

Figure 7 Expression of NeuN and VEGFA proteins in the hippocampus of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

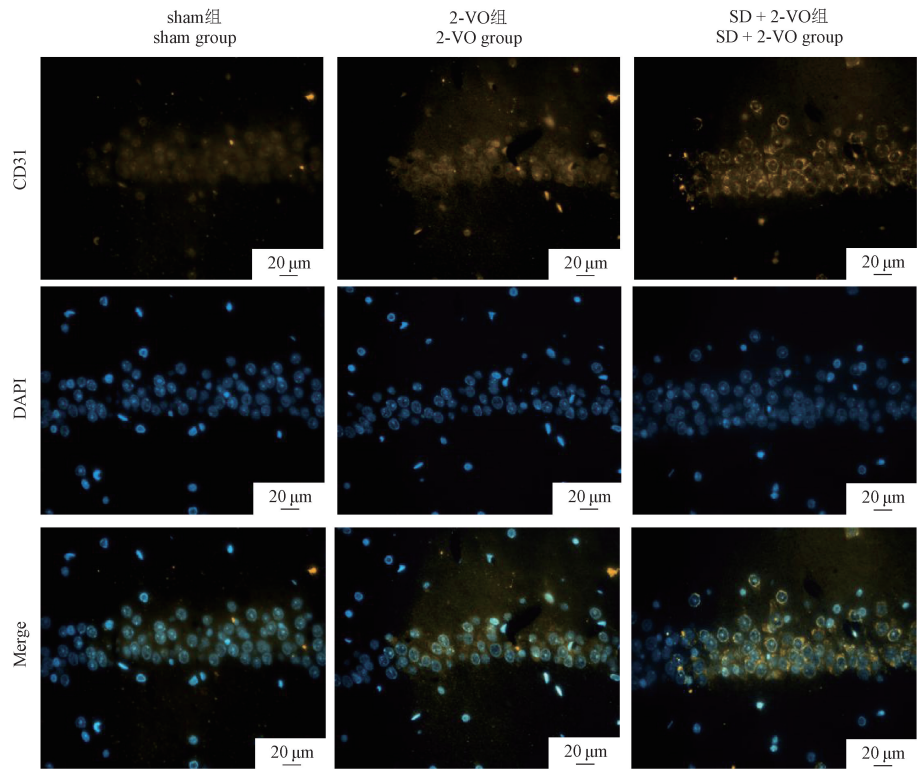


图 8 大鼠海马 CD31 免疫荧光图

Figure 8 Immunofluorescence images of CD31 in the rat hippocampus

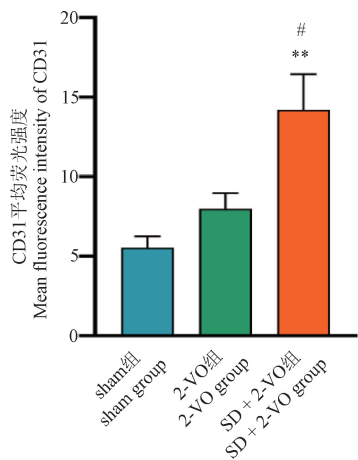


图 9 大鼠海马 CD31 平均荧光强度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Figure 9 Mean fluorescence intensity of CD31 in the rat hippocampus($\bar{x} \pm s, n = 3$)

大鼠表现为白天休息夜间活动的生物节律,因此利用它们的生物特点,选择每天 7:00 ~ 23:00 对其进行睡眠剥夺。同时,有研究表明,1 d 对动物进行 16 h 睡眠剥夺较为合理^[22-25]。动物在睡眠剥夺期间,因困倦而减少进食,加重气虚;双侧颈总动脉结扎手术截断前循环血流供应,加重血瘀。气虚血瘀可能会导致运动能力和舌色

的变化,研究人员采用力竭游泳和舌色对动物的气虚血瘀体征进行评价,气虚会引起乏力,表现出运动能力的降低,力竭游泳和舌色结果表明在睡眠剥夺结束后,SD + 2-VO 组大鼠舌色黯淡,运动时间缩短,较 2-VO 组大鼠气虚血瘀体征更为显著,且在实验的 28 d 内未有恢复,说明睡眠剥夺联合双侧颈总动脉结扎的方法能够形成较为稳定的气虚血瘀证模型。

临床对慢性脑缺血诊断的辅助手段包括脑灌注量检查^[1],激光散斑血流成像能够显示大鼠脑皮层血流量,侧枝循环建立情况^[26]。2-VO 组和 SD + 2-VO 组动物均出现脑血流下降,SD + 2-VO 组动物脑血流下降更为显著,表明慢性脑缺血模型成功建立。脑血流下降是慢性脑缺血的结果之一,研究表明,脑缺血发生时加快侧枝循环的建立,VEGFA 作为促进血管新生的重要因子,在此过程中发挥着重要的作用^[27],2-VO 组和 SD + 2-VO 组 VEGFA 及 CD31 表达均上调,说明脑缺血大鼠可能通过血管再生加快改善微循环,CD31 是一种参与血管生成和转运的细胞黏附和信号分子,主要在内皮细胞中表达^[28],结合行为

学、脑血流及病理学检测结果,考虑海马区 CD31 升高可能为代偿性血管生成,试图改善局部血供。

临床对慢性脑缺血诊断同样包括对认知能力的评估^[1],长期的慢性脑缺血会引起脑白质损伤、神经元丢失、认知功能的减退^[29],巴恩斯迷宫测试中 SD + 2-VO 组动物的学习记忆能力显著降低;TEM、HE 染色及 Western Blot 结果表明,海马神经元细胞减少,损伤严重。表明与 2-VO 组模型相比,SD + 2-VO 组模型可加重海马神经元损伤,对学习记忆能力的损伤更为严重。在 LFB 染色中,SD + 2-VO 组动物髓鞘细胞空泡明显,表明其髓鞘损伤更为严重,由此引起的信息传递功能降低,可能是 SD + 2-VO 组动物学习记忆能力下降的因素之一。

从激光散斑实验结果来看,SD + 2-VO 组脑血流较低,说明此时期动物仍处于脑缺血状态,行为学结果显示动物存在认知障碍损伤;SD + 2-VO 组的 VEGFA 和 CD31 表达水平结果虽然较 2-VO 组和 sham 组高,但结合动物体征、病理学状态等结果来看,考虑脑缺血后 VEGFA 及 CD31 表达水平升高是一种生理性保护的表现,其表达水平及强度不足以逆转缺血所引起的病理性损伤,因此 SD + 2-VO 组模型大鼠仍有一系列神经功能缺失的表现。此外,文献表明,睡眠剥夺及慢性脑缺血发生后,脑组织处于缺血缺氧状态,神经炎症损伤和氧化应激是这一过程中的重要病理过程,可能会干扰新生血管的形成或导致血管通透性增加,反而加重脑损伤与炎症浸润,造成白质损伤及海马神经元损伤、丢失^[30-31]。

4 结论

本研究在课题组前期研究基础上,通过睡眠剥夺结合双侧颈总动脉结扎手术建立了慢性脑缺血气虚血瘀证病证结合大鼠模型,并采用力竭游泳、舌色、激光散斑血流成像、巴恩斯迷宫测试、LFB 染色及 HE 染色、TEM 等方法,多方面考察了慢性脑缺血气虚血瘀证大鼠病理变化。研究结果较符合中医临床实际,为中医药研究提供了一种病证结合模型。但 SD + 2-VO 模型的深入研究及检验,还需在后续的中医药药效学评价及机制探索中挖掘。

参 考 文 献 (References)

- [1] 中国中西医结合学会神经科专业委员会. 慢性脑缺血中西医结合诊治专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2024, 44(3): 273-281.
Professional Committee of Neurology, Chinese Association of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Experts consensus on diagnosis and treatment of chronic cerebral ischemia with integrative medicine [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2024, 44(3): 273-281.
- [2] 李建章, 张杰文, 刘恒方. 慢性脑缺血临床诊治专家共识 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2022, 25(6): 661-667.
LI J Z, ZHANG J W, LIU H F. Expert consensus on clinical diagnosis and treatment of chronic cerebral ischemia [J]. Chin J Pract Nerv Dis, 2022, 25(6): 661-667.
- [3] 侯晓凤, 王岩玲, 徐宗佩. 慢性脑缺血中医证候分布规律研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(1): 116-119, 168.
HOU X F, WANG Y L, XU Z P. Study on the distribution of TCM syndromes in chronic cerebral ischemia [J]. J Basic Chin Med, 2023, 29(1): 116-119, 168.
- [4] 彭鑫, 杨琳. 张景岳治疗眩晕临证经验研究 [J]. 中医基础医学杂志, 2014, 20(7): 886-887.
PENG X, YANG L. A study on Zhang Jingyue's clinical experience in treating vertigo [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2014, 20(7): 886-887.
- [5] 胡志斌, 黄纛, 丁玉强. 脑缺血动物模型的制备及评估进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4): 271-283.
HU Z B, HUANG Y, DING Y Q. Construction and evaluation of animal models for cerebral ischemia [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(4): 271-283.
- [6] 杨鞠祥, 贺文彬, 楚世峰, 等. 小鼠慢性脑缺血气虚血瘀模型制备及评价 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(11): 76-82.
YANG J X, HE W B, CHU S F, et al. Establishment and evaluation of mouse models of chronic cerebral ischemia with qixuxueyu syndrome [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2024, 40(11): 76-82.
- [7] 王美玲, 高敏, 徐臻, 等. 芪归通络口服液治疗气虚血瘀型慢性脑缺血的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(10): 2451-2458.
WANG M L, GAO M, XU Z, et al. Clinical observation of qigui Tongluo oral liquid for the treatment of chronic cerebral hypoperfusion of qi deficiency and blood stasis type [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 40(10): 2451-2458.
- [8] 项丽玲, 李艳, 曹利华, 等. 基于临床病症特点的慢性脑缺血动物模型分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32

- (1): 93–98.
- XIANG L L, LI Y, CAO L H, et al. Animal model analysis on chronic cerebral hypoperfusion based on clinical symptom characteristics [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(1): 93–98.
- [9] 李生绍, 陈心智(点校). 黄帝内经灵枢 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997.
- LI S S, CHEN Z X (collated & punctuated). *Huangdi Neijing Ling Shu* [M]. Beijing: PUB House of Anc Chin Med Books; 1997.
- [10] 王岩玲, 任明, 张翔宇, 等. 慢性脑缺血证候分布和辨证用药规律的文献研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(3): 394–397.
- WANG Y L, REN M, ZHANG X Y, et al. Literature study on syndrome distribution and syndrome differentiation treatment of chronic cerebral ischemia [J]. *J Basic Chin Med*, 2022, 28(3): 394–397.
- [11] 朱彦名, 马进. 中医辨证治疗中风后失眠的临床研究进展 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2024, 11(1): 238–240.
- ZHU Y M, MA J. Clinical research progress of TCM syndrome differentiation in treating insomnia after stroke [J]. *World J Sleep Med*, 2024, 11(1): 238–240.
- [12] 余琦, 尚芙蓉, 高运苓, 等. 卒中后患者睡眠障碍的研究进展 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2024, 19(8): 475–477, 482.
- YU Q, SHANG F R, GAO Y L, et al. Research progress on sleep disorders in post-stroke patients [J]. *Neural Inj Funct Reconstr*, 2024, 19(8): 475–477, 482.
- [13] 户家轩, 周岳君, 刘媛, 等. 失眠患者 637 例证型与体质类型的相关性研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(7): 3372–3375.
- HU J X, ZHOU Y J, LIU Y, et al. Study on correlation between syndrome types and physique types of 637 cases of insomnia [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(7): 3372–3375.
- [14] 韩晓霞, 段莹, 张蕊, 等. 高海拔地区部队官兵常见睡眠障碍与中医体质相关性研究 [J]. *光明中医*, 2023, 38(23): 4529–4533.
- HAN X X, DUAN Y, ZHANG R, et al. Study on the correlation between common sleep disorders and TCM constitution of soldiers in high altitude areas [J]. *Guangming J Chin Med*, 2023, 38(23): 4529–4533.
- [15] 金正龙, 余涛, 梁敏莹, 等. 通窍活血汤联合丁苯酞对老年慢性脑缺血患者血清 S100 β 、HMGB1、sICAM-1、CXCL12、Lp-PLA2 的影响 [J]. *中药材*, 2021, 44(5): 1244–1248.
- JIN Z L, YU T, LIANG M Y, et al. Effects of Tongqiao Huoxue Decoction combined with butylphthalide on serum S100 β , HMGB1, sICAM-1, CXCL12, and Lp-PLA2 in elderly patients with chronic cerebral ischemia [J]. *J Chin Med Mater*, 2021, 44(5): 1244–1248.
- [16] 李林旺, 张国清, 李多. 从中医体质学说探讨失眠的研究进展 [J]. *中国民族医药杂志*, 2023, 29(4): 65–66.
- LI L W, ZHANG G Q, LI D. Discussion on the research progress of insomnia from the theory of TCM constitution [J]. *J Med Pharm Chin Minor*, 2023, 29(4): 65–66.
- [17] 于艺, 党娇娇, 张喜, 等. 心脾两虚失眠患者与正常人群脉图参数的比较研究 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(1): 163–165.
- YU Y, DANG J J, ZHANG X, et al. Comparative study on pulse chart parameters between insomnia patients with deficiency of heart and spleen and normal people [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(1): 163–165.
- [18] 邵珺, 张振贤, 史佳宁, 等. 180 例失眠患者中医证型分布及其与多导睡眠图的相关性分析 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(4): 377–386.
- SHAO J, ZHANG Z X, SHI J N, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndrome types in 180 patients with insomnia and its correlation with polysomnography [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 64(4): 377–386.
- [19] 韩铁军. 失眠症中医病机学说的构建与探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(11): 2699–2700.
- HAN T J. Construction and discussion on pathogenesis theory of insomnia in traditional Chinese medicine [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2019, 30(11): 2699–2700.
- [20] 荣立洋, 王明三, 李毓秋. 中风病气虚血瘀证证候特点概述 [J]. *吉林中医药*, 2016, 36(7): 750–752.
- RONG L Y, WANG M S, LI Y Q. Characteristics of qi deficiency and blood stasis syndrome in stroke patients [J]. *Jilin J Tradit Chin Med*, 2016, 36(7): 750–752.
- [21] 王丽晔, 陈志刚, 罗玉敏. 动物慢性脑缺血模型的研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 67–73.
- WANG L Y, CHEN Z G, LUO Y M. Current research status on animal models of chronic cerebral ischemia [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(4): 67–73.
- [22] 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 L L, WANG Z Y, 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.
- [23] 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 J C, LIU J X, 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.
- [24] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.
LI X, ZHANG Y, ZHANG W Z, et al. Animal model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(2): 228-234.
- [25] 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.
HUANG S, REN J X, WANG S C, et al. Establishment of coronary heart disease models of Qi-deficiency and blood-stasis syndrome in rats [J]. Chin J Chin Mater Med, 2016, 41(9): 1699-1705.
- [26] 唐鑫, 谭洁. 激光散斑衬比成像技术在慢性脑缺血动物模型中的应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(2): 154-160.
TANG X, TAN J. Advances in the application of laser speckle contrast imaging in animal models of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(2): 154-160.
- [27] 韩富华, 刘剑刚, 孙林娟, 等. 益气活血中药组分对慢性脑缺血模型小鼠认知功能的影响及机制 [J]. 中国药房, 2022, 33(20): 2466-2470, 2476.
HAN F H, LIU J G, SUN L J, et al. Effects of the components of traditional Chinese medicine for invigorating qi and activating blood circulation on cognitive function of chronic cerebral ischemia model mice and its mechanism [J]. Chin Pharm, 2022, 33(20): 2466-2470, 2476.
- [28] KYRIATZIS G, BERNARD A, BÔLE A, et al. In the rat hippocampus, pilocarpine-induced status epilepticus is associated with reactive Glia and concomitant increased expression of CD31, PDGFR β , and collagen IV in endothelial cells and pericytes of the blood-brain barrier [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(3): 1693.
- [29] 陈利佳, 付海鸥, 赫英龙, 等. 慢性脑缺血发病机制的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(16): 4085-4088.
CHEN L J, FU H O, HE Y L, et al. Research progress on pathogenesis of chronic cerebral ischemia [J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(16): 4085-4088.
- [30] WANG Z, CHEN W H, LI S X, et al. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(11): 6277-6292.
- [31] YAN N, XU Z, QU C, et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107844.

[收稿日期] 2025-01-07