

痰瘀互结证慢性心肌缺血小型猪模型的建立

潘永明, 陈亮, 徐孝平, 朱科燕, 徐剑钦, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 采用高脂、静脉注射维生素 D₃ (VD₃) 和异丙肾上腺素建立痰瘀互结证慢性心肌缺血小型猪模型。方法 15 只雄性巴马小型猪随机分成正常对照 (Ctr) 组、高脂 (HFC) 组和痰瘀互结证心肌缺血模型 (CMI) 组, 每组 5 只, Ctr 组饲喂普通饲料, HFC 组饲喂高脂饲料, CMI 组采用高脂饮食、静脉注射 VD₃ 和异丙肾上腺素联合建立痰瘀证慢性心肌缺血模型, 连续造模 24 周, 分别通过测定动物体重、心电图、活动、血脂、心肌酶、血液流变学、炎症、心脏指数 (CI) 和心肌缺血面积 (MIS) 来评价模型的建立及痰瘀互结证的病理进程。结果 与 Ctr 组, HFC 组体重、心率 (HR)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、动脉粥样硬化指数 (AI)、低、中、高切全血粘度和还原粘度、红细胞电泳时间 (EPT)、超敏 C-反应蛋白 (hs-CRP) 和白介素 -6 (IL-6) 水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); CMI 组体重、HR、24 h 总的 ST 段升高数 (Σ ST)、24 h 内平均 ST 段升高数 (ST_{average})、活动度、TC、甘油三酯 (TG)、LDL-C、HDL-C、AI、肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌钙蛋白 -1 (cTn-1)、低、中、高切全血粘度和还原粘度、EPT、卡松粘度 (CV)、hs-CRP、IL-6、CI 和 MIS 均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 脂联素 (APN) 水平则显著降低 ($P < 0.05$); 与 HFC 组比, CMI 组 AI、CK、LDH、cTn-1、低、中、高切全血粘度、EPT、CI 和 MIS 均明显高于 HFC 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 APN 水平则显著低于 HFC 组 ($P < 0.05$)。相关分析显示, MIS 与 TC、LDL-C、AI、CK、LDH、cTn-1、APN、高、中、低切全血粘度、EPT、CV、hs-CRP 和 IL-6 有关 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 同时线性回归分析显示, 痰瘀与 TC、LDL-C、AI、CK、LDH、cTn-1、APN、EPT、CV、hs-CRP 和 IL-6 有关 ($P < 0.01$), 进一步线性逐步回归分析显示痰瘀衍变与 TC、CK 和 IL-6 密切相关 ($P < 0.01$)。结论 高脂喂养和注射 VD₃ 和异丙肾上腺素能成功建立痰瘀互结证慢性心肌缺血小型猪模型, 且脂质代谢、血液流变学、心肌酶代谢和炎症可作为痰瘀互结证的客观生化物质基础, 这些变化可反映了中医理论“痰瘀互结、瘀毒致变”的相关生物学基础。

【关键词】 痰瘀互结证; 慢性心肌缺血模型; 小型猪

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 09-0001-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.001

Establishment of a minipig model of chronic myocardial ischemia of phlegm-blood stasis syndrome type

PAN Yong-ming, CHEN Liang, XU Xiao-ping, ZHU Ke-yan, XU Jian-qin, CHEN Min-li

(Laboratory Animal Research Center/Comparative Medical Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To establish a disease syndrome combined animal model, the miniature pig model of

【基金项目】 1. 省部共建科研基金 (WKJ2009-2-032); 2. “浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目”资助; 3. 浙江中医药大学比较医学创新团队 (XTD201301)。

【作者简介】 潘永明 (1979-), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: pym918@126.com。

【通讯作者】 陈民利 (1963-), 女, 教授, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@aliyun.com。

chronic myocardial ischemia of phlegm-blood stasis syndrome type, by high fat/cholesterol diet feeding and intravenous injection with VD₃ and isoproterenol. **Methods** Miniature pigs were randomly divided into the control (Ctr) group, high fat/cholesterol diet (HFC) group and chronic myocardial ischemia model of phlegm-blood stasis syndrome (CMI) group, 5 pigs in each group. The Ctr group was fed with normal regular chow diet, HFC group was fed with high fat/cholesterol diet, while the CMI group was fed with high fat/cholesterol diet and intravenous injection with VD₃ and isoproterenol. The experiment lasted for 24 weeks. The model establishment and its pathological process of phlegm-blood stasis syndrome were evaluated by examinations of body weight, electrocardiogram, activity, blood lipid, myocardial enzymes, hemorheology, inflammation, cardiac index(CI) and myocardial ischemia size (MIS). **Results** Compared with the Ctr group, the body weight, heart rate(HR), Total cholesterol(TC), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), atherosclerosis index(AI), low/middle/high shear rate of whole blood viscosity and reduced viscosity, erythrocyte electrophoresis time(EPT), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and IL-6 levels in the HFC group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the body weight, heart rate, total ST, ST_average, activity, TC, TG, LDL-C, HDL-C, AI, CK, LDH, cTn-1, low/middle/high shear rate of whole blood viscosity and reduced viscosity, EPT, Casson viscosity(CV), hs-CRP, IL-6, CI and MIS in the CMI group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and APN level in the CMI group was significantly decreased ($P < 0.05$). Moreover, AI, CK, LDH, cTn-1, low/middle/high shear rate of whole blood viscosity, EPT, CI and MIS in the CMI group were significantly higher than those of HFC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while APN in the CMI group was significantly lower than that of HFC group ($P < 0.05$). Correlation analysis showed that MIS was closely correlated to TC, LDL-C, AI, CK, LDH, cTn-1, APN, high/middle/low shear rate of whole blood viscosity, EPT, CV, hs-CRP and IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The linear regression analysis also showed that phlegm-blood stasis was closely correlated to TC, LDL-C, AI, CK, LDH, cTn-1, APN, CV, EPT, hs-CRP, and IL-6 ($P < 0.01$), and further linear stepwise regression analysis showed that the evolution of phlegm-blood stasis was closely related to TC, CK and IL-6. **Conclusions** Minipig model of chronic myocardial ischemia of phlegm-blood stasis syndrome type can be established by high fat/cholesterol diet feeding and intravenous injection with VD₃ and isoproterenol. Their blood lipid metabolism, hemorheology, myocardial enzymes and inflammatory indexes can be used as external biochemical basis of phlegm-blood stasis syndrome type, which may reflect related biological basis of the traditional Chinese medicine theory of “phlegm and stasis cementation, blood-stasis & toxin causing catastrophe”.

【Key words】 Phlegm-blood stasis syndrome, Chronic myocardial ischemia model, Minipig

冠心病(coronary heart disease, CHD)为冠状动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)性心脏病,其基本病理过程为心肌供血不足所致心肌损伤,又称缺血性心脏病。中医学认为缺血性心脏病是心脉不通而产生胸痹心痛,且其发病率的升高与现代生活方式和饮食结构改变有关,如饮食不节,过食肥甘厚味,嗜酒无度致脾胃失健,运化无力,聚液为痰,痰浊阻塞脉道,使气血运行不畅而诱发胸痹心痛。故膏脂不化是冠心病“痰浊”化生的启动子,“痰浊”、“血瘀”为其主要的中医病理改变,且痰瘀互结证是CHD常见的证型之一^[1],因此,探讨胸痹心痛痰瘀衍变与脂代谢的关系成为当前研究的焦点,然而痰浊与血瘀间的病理关系如何,脂质异常如何影响痰瘀衍变的发生发展,是否还有其它因子参与目前还均不明确。可见,建立理想的动物模型是研究中医学痰瘀互结证缺血性心脏病的病理机制和干预治疗的重要手段之一。

小型猪的饮食行为、生理解剖、脂质构成与代谢机制均与人类最为接近,并随年龄增长可自发AS,且其冠脉侧枝循环少,对缺血性损伤敏感,相比犬、兔、鼠等实验动物具有明显优势。而以往缺血性模型大多采用冠脉结扎或药物注射引起血管急性狭窄或闭塞,但其病程为急性经过,与临床的病理生理进程差异较大。尽管近来也有采用球囊损伤加高脂诱导或 Ameriod 缩窄环等手术方法建立慢性心肌缺血模型^[2,3],但均需要有高超的人员手术技能和设备条件所支撑,不利于推广,同时存在术后感染或破坏胸腔内环境等并发症的危险。因此,本文根据中医理论,采用高脂饮食和静脉注射维生素 D₃(VD₃)和异丙肾上腺素(Iso)复制痰瘀互结证慢性心肌缺血小型猪模型,从多角度评价该模型的特征,探讨痰瘀互结证慢性心肌缺血的中医生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~5 月龄雄性巴马小型猪 15 只, 体重为 10~14 kg, 购于上海南汇区老港镇华新特种养殖场 [SCXK(沪)2007-0013]; 饲养于本中心普通级实验室 [SYXK(浙)2008-0116], 室内温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (50 ± 5)%, 12 h/12 h 明暗交替。

1.2 主要仪器及试剂

7020 全自动生化分析仪, 日本日立公司; 酶标仪, 芬兰 Thermo Fisher 公司; 大动物无创生理信号遥测系统, 法国 EMKA 公司; FASCO-3020B 全自动血液流变学分析仪, 重庆大学维多生物工程研究所。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)试剂盒由上海申能德赛诊断技术有限公司提供; 肌钙蛋白-1(cTn-1)、脂联素(APN)、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)、白介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒由上海卓康生物技术有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 模型建立: 适应 6 周后, 按体重和血脂水平随机分成 3 组, 每组 5 只, 即正常对照(control, Ctr)组饲喂基础饲料; 高脂(high fat-cholesterol diet, HFC)组, 饲喂高脂饲料; 痰瘀互结证慢性心肌缺血(chronic myocardial ischemia, CMI)组在饲喂高脂饮食的同时, 并于造模 0、4、8 周时耳缘静脉注射 5 万 IU/kg VD_3 , 从第 12 周开始每周 1 次耳缘静脉注射 Iso 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 直至第 24 周结束。连续饲养 24 周, 饲喂量按体重 2.5% 给予, 分成两等份, 1 日两次, 每两周称重更换 1 次饲料量, 高脂饲料配方为 10% 蛋黄粉、15% 起酥油、1.5% 胆固醇、73.5% 基础饲料。

1.3.2 观察指标:

1.3.2.1 临床表征观察: 观察各组小型猪的外观毛色、精神、行为活动、舌质和体重等。

1.3.2.2 生化测定: 造模 24 周时取前腔静脉血 2 mL, 分离血清, 在全自动生化分析仪上测定血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、LDH 和 CK 水平; 并用 ELISA 法测定血清 cTn-1、APN、hs-CRP 和 IL-6 水平, 并计算动脉粥样硬化指数 AI(即 $AI = \text{LDL-C}/\text{HDL-C}$)。

1.3.2.3 血液流变学测定: 造模 24 周取枸橼酸钠

抗凝血, 测定各组小型猪低(LWBV)、中(MWBV)、高(HWBV)切全血粘度、低(LRV)、中(MRV)、高(HRV)切还原粘度、红细胞电泳时间(EPT)和卡松粘度(CV)。

1.3.2.4 生理监测: 造模 24 周后, 按文献[4]方法用无创生理信号遥测系统监测清醒自由活动状态下各组小型猪 24 h 的心电和活动情况, 并按每小时划分进行统计分析, 观察心率(HR)、24 h 总的 ST 段升高数(Σ ST)、24 h 内平均 ST 段升高数(ST_aver)和活动度。

1.3.2.5 心肌缺血面积(myocardial ischemia size, MIS)测定: 经 3% 戊巴比妥钠溶液 1 mL/kg 麻醉后, 再静脉注射 10% KCl 溶液 1 mL/kg 处死, 立即取心脏, 将心脏均匀分成 5 份, 用 0.1% NBT 染液在 37°C 水浴 10 min, 随后用蒸馏水冲洗心肌片, 数码相机摄像, 用 Image J 软件分析 MIS。

1.4 统计学方法

所有数据均用平均数 $\pm s$ 表示, 并采用 SPSS19.0 统计软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析和 L-S-D 检验, 相关性分析采用 Pearson R 和多元线性回归分析, $P < 0.05$ 表示有显著性。

2 结果

2.1 临床表征

试验期间, Ctr 组体重呈缓慢增长, 行走时不时地摆尾, 拱地行为较多, 被毛光泽, 鼻盘湿润, 精神较好, 贪食饱后多睡, 舌苔淡红薄白; HFC 组高脂饮食后体重增加显著($P < 0.01$), 饱后多睡, 拱地行为有所减少, 被毛油腻, 脱毛明显, 鼻盘湿润, 后期活动略有增加, 舌苔厚腻; CMI 组首次注射 VD_3 后食欲降低, 2 周适应后增重明显并显著高于 Ctr 组($P < 0.01$), 前期表现与 HFC 组类似, 饱后多睡, 拱地行为有所减少, 被毛油腻杂乱, 无光泽, 脱毛明显, 后期活动增加, 焦虑抵抗行为增多, 易激惹, 鼻盘湿润略紫, 舌苔暗紫且厚腻; 当注射 Iso 后出现明显的缺血症状, 表现为机体背部、下腹部出现红色瘀斑, 喘息急促, 趴伏烦躁或不动, 并且耳部皮肤瘀紫等。电生理遥测显示, 24 周后 HFC 组和 CMI 组 HR 均明显增加($P < 0.05$), 且 CMI 组 Σ ST、ST_aver 和活动度均显著高于 Ctr 组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 1。

表 1 各组体重、心电和活动的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 1 Changes of body weight, electrocardiogram and activity in each group

指标 Parameters	体重 (Weight) (kg)	心率 (HR) (bpm)	24 h 总的 ST 段升高数 (Σ ST) (mv)	24 h 内平均 ST 段升高 数(ST_average) (mv)	活动度 activity(g)
正常对照 Ctr 组	25.05 ± 1.60	76.08 ± 0.53	1.28 ± 0.48	0.055 ± 0.020	0.022 ± 0.002
高脂 HFC 组	37.06 ± 1.74 **	86.60 ± 4.20 *	2.17 ± 0.56	0.099 ± 0.020	0.029 ± 0.005
痰瘀互结证慢性心肌缺血 CMI 组	36.34 ± 3.92 **	86.89 ± 6.05 *	4.00 ± 0.88 *	0.167 ± 0.037 *	0.032 ± 0.001 **

注:与 Ctr 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HFC 组比较, # $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Ctr group; # $P < 0.05$ vs. HFC group.

2.2 血脂代谢的变化

与 Ctr 组比,造模 24 周时 HFC 和 CMI 组 TC、LDL-C、HDL-C 和 AI 指数均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 CMI 组 TG 水平升高显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);同时 CMI 组 AI 指数显著高于 HFC 组 ($P < 0.05$),见图 1。

2.3 心肌酶的变化

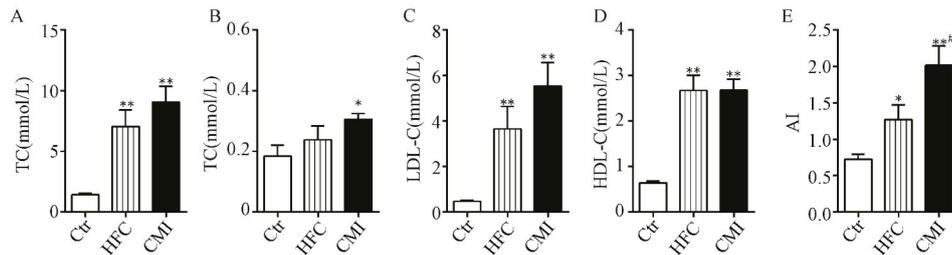
造模 24 周时 CMI 组 CK、LDH 和 cTn-1 水平均显著高于 Ctr 组和 HFC 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时 APN 水平则显著低于 Ctr 组和 HFC 组 ($P < 0.05$),见图 2。

2.4 血液流变学分析

与 Ctr 组比,HFC 和 CMI 组小型猪低、中、高切全血粘度和还原粘度、红细胞电泳时间均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 CMI 组卡松粘度亦升高显著 ($P < 0.01$);同时,CMI 组低、中、高切全血粘度和红细胞电泳时间均显著高于 HFC 组 ($P < 0.05$),见表 2。

2.5 炎症和心肌缺血面积 (MIS) 的变化

与 Ctr 组比,HFC 和 CMI 组血清 hs-CRP 和 IL-6 水平均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);另外,CMI 组 CI 和 MIS 均显著高于 Ctr 和 HFC 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 3。



注:与 Ctr 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HFC 组比较, # $P < 0.05$ 。(A) 总胆固醇, TC;

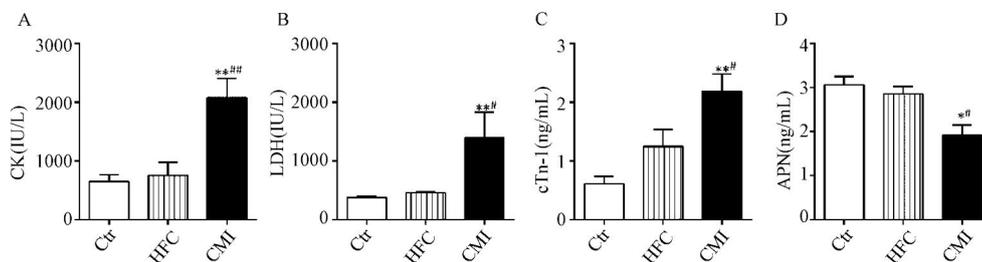
(B) 甘油三酯, TG; (C) 低密度脂蛋白, LDL-C; (D) 高密度脂蛋白, HDL-C; (E) 动脉粥样硬化指数, AI。

图 1 各组血脂代谢的变化

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Ctr group; # $P < 0.05$ vs. HFC group. (A) total cholesterol, TC;

(C) low density lipoprotein, LDL-C; (D) high density lipoprotein, HDL-C; (E) LDL-C: HDL-C ratio.

Fig. 1 Changes of serum lipid metabolism in each group



注:与 Ctr 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HFC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(A) 肌酸激酶, CK;

(B) 乳酸脱氢酶, LDH; (C) 肌钙蛋白-1, cTn-1; (D) 脂联素, APN。

图 2 各组心肌酶代谢的变化

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Ctr group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. HFC group. (A) Creatine kinase, CK;

(B) Lactate dehydrogenase, LDH; (C) Troponin-1, cTn-1; (D) Adiponectin, APN.

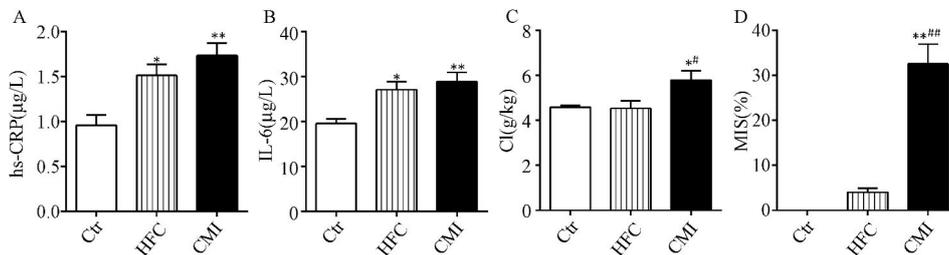
Fig. 2 Changes of myocardial enzyme metabolism in each group

表 2 各组血液流变学的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 2 Changes of hemorheological parameters in each group

组别 Groups	全血粘度(WBV, mPa·s)			还原粘度(RV, mPa·s)			红细胞电泳 时间 EPT (s)	卡松粘度 CV (mPa·s)
	高切 HWBV (200/S)	中切 MWBV (30/S)	低切 LWBV (3/S)	高切 HRV (200/S)	中切 MRV (30/S)	低切 LRV (3/s)		
正常对照 Ctr 组	3.55 ± 0.68	3.55 ± 0.68	3.55 ± 0.68	3.39 ± 1.23	4.33 ± 1.50	11.41 ± 3.11	13.31 ± 2.55	1.87 ± 0.32
高脂 HFC 组	4.49 ± 0.21*	4.49 ± 0.21*	4.49 ± 0.21*	4.68 ± 0.42*	5.88 ± 0.50*	14.38 ± 1.04*	16.84 ± 0.78*	2.19 ± 0.19
痰瘀互结证慢性心 肌缺血 CMI 组	5.65 ± 0.41**	5.65 ± 0.41**	5.65 ± 0.41**	5.54 ± 0.84*	7.06 ± 1.06*	16.96 ± 2.31*	21.16 ± 1.52**	2.92 ± 0.24**

注:与 Ctr 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HFC 组比较, # $P < 0.05$ 。
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Ctr group; # $P < 0.05$ vs. HFC group.



注:与 Ctr 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HFC 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

(A) 超敏 C-反应蛋白, hs-CRP; (B) 白介素-6, IL-6; (C) 心脏指数, CI; (D) 心肌缺血面积, MIS。

图 3 各组炎症与心肌缺血面积的变化

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Ctr group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. HFC group. (A) hs-CRP; (B) IL-6; (C) CI; (D) MIS.

Fig. 3 Changes of inflammatory and MIS area in each group

2.6 相关性及线性回归分析

相关分析显示 MIS 与脂质代谢 (TC、LDL-C、AI)、心肌酶 (CK、LDH、cTn-1)、血液粘滞 (高、中、低切全血粘度、EPT 和 CV)、炎症 (hs-CRP 和 IL-6) 呈显著正相关 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与 APN 呈显著负相关 ($P < 0.01$), 见表 3。同时, 根据中医“痰、瘀”病理结合相关指标进行回归分析, 以“痰、瘀”因素为因变量 (y (Ctr 组 = 0, HF 组 = 1, CMI 组 = 2)), 以相关指标为自变量, 进入线性回归分析得到进入模型的变量为: TC、LDL-C、AI、CK、LDH、cTn-1、APN、

EPT、CV、hs-CRP 和 IL-6 ($R = 0.995$, $P = 0.009$); 进一步线性逐步回归分析后进入模型的变量为 TC、CK 和 IL-6; 共得到三个回归方程, 即 $y = 0.018 + 0.168TC$, $R = 0.640$, $P = 0.000$; $y = -0.431 + 0.136TC + 0.001CK$, $R = 0.910$, $P = 0.000$; $y = -1.108 + 0.108TC + 0.001CK + 0.035IL-6$, $R = 0.939$, $P = 0.000$; 可见, “痰、瘀”衍变与 TC、CK 和 IL-6 密切相关, 是诱发或加重痰瘀互结证慢性心肌缺血的关键因子。

表 3 MIS 与脂质代谢、心肌酶代谢、血液粘滞和炎症指标的相关性

Tab. 3 Relationship between MIS and blood lipid metabolism, myocardial enzyme metabolism, blood viscosity and inflammatory parameters

心肌缺 血面积 MIS	脂质代谢 Lipid metabolism			心肌酶代谢 Myocardial metabolism				血液粘滞 Blood viscosity				炎症 Inflammation		
	总胆固 醇 TC	低密度 脂蛋白 LDL-C	动脉粥样 硬化指 数 AI	肌酸 激酶 CK	乳酸脱 氢酶 LDH	肌钙 蛋白-1 cTn-1	脂联素 APN	高切全 血粘度 HWBV	中切全 血粘度 MWBV	低切全 血粘度 LWBV	红细胞 电泳时 间 EPT	卡松 粘度 CV	超敏 C- 反应蛋白 hs-CRP	白介 素-6 IL-6
相关 系数 R	0.560	0.574	0.664	0.768	0.673	0.676	-0.755	0.614	0.619	0.629	0.613	0.638	0.573	0.566
P 值	0.03	0.03	0.007	0.001	0.006	0.006	0.001	0.02	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.05

3 讨论

中医证候是疾病发生和演变过程中某阶段以及个体当时所处特定内外环境本质的反映,也就是说,疾病的病因和病理共同构成了证候的本质。目前认为中医胸痹心痛的发生与饮食结构失衡、高脂高蛋白高糖等饮食过度摄入、人类生活方式改变如运动量和强度减少,导致体内脂质代谢紊乱,且脂质异常已被证实与心脑血管疾病密切相关。小型猪是一种理想的且正开发的实验动物,其冠脉侧枝血管较少,心脏解剖结构和血管大小、凝血因子和纤溶系统亦与人类的接近程度远优于其它动物^[5],且心肌缺血后的血管生成能力有限;并可克服试验研究中生长过快、不易操作等缺点,故小型猪模型的稳定性较好。AS 是 CHD 的病理基础,其主要特征是动脉血管壁钙化和动脉壁的脂质沉积。赵娟等^[6]采用 VD₃ 联合高脂饲料能引起大鼠血清 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 的升高,导致动脉病变早期内皮细胞的损伤,使血管内皮的完整性被破坏,形成 AS。同时,注射异丙肾上腺素诱导动物心肌缺血或心肌肥厚是经典的心肌重构模型,其通过增加心率和心肌收缩力等途径,使得心肌耗氧量增加,导致心脏超负荷和心肌微循环障碍,冠脉痉挛和心肌梗死或心肌细胞肥大、坏死,而这些病理损伤与氧化应激和细胞凋亡等均有密切的联系^[7]。同样,本课题组前期已证实氧化应激途径参与了慢性心肌缺血的形成外^[8],本研究也发现痰瘀互结证慢性心肌缺血组心肌酶指标 CK、LDH 和 cTn-I 均明显升高,APN 显著降低,表明心肌缺血发生时心肌细胞结构遭到破坏,引起多种胞浆酶如 CK、LDH 的大量释放,使血清中酶活性增高,而且心肌肌钙蛋白 cTn 作为临床诊断冠心病急性心肌缺血的金标准,缺血时 cTn-I 在血中浓度升高迅速。最近,也发现急性冠脉综合征患者中脂联素水平均有明显的降低^[9]。此外,也观察到痰瘀互结证慢性心肌缺血小型猪有明显的心率加快、喘息急促、心电图异常、舌质暗紫、舌苔厚腻和心肌缺血等症状,表明本模型已成功模拟了人类中医痰瘀互结证冠心病的病因和病理过程。

中医认为“痰浊、血瘀”都是“有形之邪”,既是病理产物也是致病因素。临床研究表明冠心病痰浊型与脂代谢紊乱密切相关,且血脂异常是痰凝心脉的物质基础^[10],TC、TG 和 LDL-C 升高是“痰浊”

证的重要生化指标和物质基础;同时也发现血液流变学异常是痰瘀痹阻的物质基础,并在痰证和痰瘀证中均表现为血液粘滞性的异常变化^[11]。这与本研究结果一致,单纯高脂组和慢性心肌缺血组均出现 TC 和 LDL-C 水平的升高,表明高脂饮食能形成明显的“痰浊”证;同时全血粘度和还原粘度、红细胞电泳时间亦出现明显升高,这也证实了痰证和痰瘀证中均有血液流变学的明显异常改变,血液存在高粘滞性、瘀滞明显,符合中医“血瘀”的病理改变。另外,尽管长期单纯高脂饮食可致轻微的缺血症状,但无心肌酶代谢的异常改变来看,符合“痰可挟瘀”的观点;此外,从慢性心肌缺血组不仅出现心肌酶代谢 CK、LDH、cTn-I 的明显升高和 APN 的显著降低,还出现明显的缺血症状来看,这也支持了“痰可致瘀”的观点。综合以上结果,提示痰瘀互结证比痰浊、血瘀的病理改变更为严重。因此,本文建立的慢性心肌缺血模型能真实的反映“痰中挟瘀”和“痰可致瘀”的特点,且痰、瘀两者相互纠结,最终形成痰瘀互阻,提示痰瘀具有共同的病理生理基础,而脂质紊乱可能是痰瘀共同致病的病因所在;且痰瘀互结能加重血管内皮细胞的损伤、促使脂质沉积,心肌供血减少,形成恶性循环,加速 AS 病变的发生发展,故痰瘀互结是 CHD 发生的主要病机,并贯穿其全过程。

《诸病源候论》中云:“诸痰者,此由血脉壅塞,饮水积聚而不消散,故成痰也”,揭示瘀血化痰的病理进程。在本研究也发现慢性心肌缺血组 TG 水平明显高于高脂组,且 TG 升高也是 CHD 痰浊的重要生化物质基础,表明“瘀可致痰”;也证实“痰瘀证”病理程度比痰证更严重。众所周知,AS 是 CHD 的病理基础,而全身炎症也是影响冠脉 AS 斑块稳定性的重要因素。研究认为 CHD 炎症学说中提及的各种病因和炎症介质,均可归于中医毒邪学说中的内毒或外毒,各种炎性因子对机体而言实为毒邪^[12],且热毒与胸痹心痛的关系密切^[13]。何启扬等^[14]认为 CHD 热毒形成需经历三个阶段:即脏腑功能失常,气血津液紊乱,最终毒损心络。Wang 等研究表明在急性冠脉综合征患者中血清 CRP 和 IL-6 等炎症因子明显升高,与斑块稳定性有关^[15]。黄衍寿等^[16]研究表明急性冠脉综合征患者用三黄片治疗后明显降低炎症指标 IL-6 和 CRP 水平,揭示冠心病毒邪致病的机制。此外,于俊生等^[17]提出 AS 斑块与痰浊、瘀血、毒邪密切相关。在本研究中

管高脂组和慢性心肌缺血组血清 hs-CRP 和 IL-6 水平均明显升高,但痰瘀互结证慢性心肌缺血组均高于单纯高脂组,恰这与动脉粥样硬化指数 AI 显著高于单纯高脂组是相一致,这也反映了痰瘀互结证慢性心肌缺血模型存在痰浊、血瘀、毒邪三者,且密不可分。另外,慢性心肌缺血组 MIS 程度、心肌酶水平、血液的粘滞性和炎症水平均较长期单纯高脂组严重,这也从侧面反映了“痰浊”是 CHD 的启动因子,“血瘀”和“毒邪”则是促进斑块易损和突发心血管事件的关键病理环节,这与陈可冀院士及其课题组^[18]提出的“瘀毒致变”假说是相一致的,阐释“瘀毒”衍变是由量变到质变的渐进过程,最终毒损心络,导致心血管事件的突发。最后,本研究相关分析亦显示, MIS 与 TC、LDL-C、AI、CK、LDH、cTn-1、APN、全血粘度、红细胞电泳时间、卡松粘度、hs-CRP、IL-6 等指标密切相关,证实心肌缺血程度与“痰、瘀、毒”三者是密不可分。另外,对“痰、瘀”病理进行回归分析显示,“痰、瘀”与 TC、LDL-C、AI、CK、LDH、cTn-1、APN、红细胞电泳时间、卡松粘度、hs-CRP 和 IL-6 等相关;进而线性逐步回归分析得到 TC、CK 和 IL-6 这三个关键因子,而这也证实“痰、瘀、毒”的衍变是一个渐进、量变到质变的进程。

综上所述,本研究以中医理论为指导并结合现代医学技术,成功建立了痰瘀互结证心肌缺血小型猪模型,且其病程相对缓慢,符合中医“痰浊、血瘀、毒邪”的衍变规律;且脂质代谢、血液流变学、心肌酶代谢和炎症指标可作为评价该模型的生物学基础,这为人类中医证候冠心病的研究和药物干预机制提供可靠的参考依据。

参考文献:

- [1] 张晗,康立源,张伯礼. 心脑血管疾病痰瘀互结证述析 [J]. 天津中医药, 2009, 26(2): 172 - 174.
- [2] 李欣志,马晓斌,李磊,等. 小型猪冠心病模型痰瘀互结证候诊断与评分 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(11): 825 - 827.
- [3] Robich MP, Osipov RM, Chu LM, et al. Temporal and spatial changes in collateral formation and function during chronic myocardial ischemia [J]. J Am Coll Surg, 2010, 211(4): 470 - 480.
- [4] 潘永明,陈亮,何欢,等. 摄食行为对小型猪心脏自主神经功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(1): 43 - 47.
- [5] Schwartz RS, Holmes DR. Pigs, dogs, baboons, and man: lessons for stenting from animal studies [J]. J Interv Cardiol, 1994, 7(4): 355 - 368.
- [6] 赵娟,李相军,孙波,等. 维生素 D3 联合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型 [J]. 实用医学杂志, 2009, 25(21): 3569 - 3571.
- [7] Kubavat JB, Asdaq SM. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 124(1): 162 - 165.
- [8] 徐孝平,潘永明,陈亮,等. 慢性心肌缺血小型猪的氧化应激反应指标观测 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(5): 401 - 406.
- [9] Mittal A, Gupta MD, Meennahalli Pallela G, et al. Relationship of plasma adiponectin levels with acute coronary syndromes and coronary lesion severity in north Indian population [J]. ISRN Cardiol, 2013, 10; doi: 10.1155/2013/854815.
- [10] 宋剑南,刘东远,牛晓红,等. 高脂血症与中医痰浊关系的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1(1): 49 - 51.
- [11] 王东生,袁肇凯,黄献平,等. 冠心病痰瘀证的微观辨证研究 [J]. 中医杂志, 2007, 48(9): 831 - 833.
- [12] 范砚超,张国平,唐明. 从毒论治动脉粥样硬化初探 [J]. 山东中医杂志, 2004, 23(5): 261 - 263.
- [13] 陈新宇,唐阿芳,谢海波,等. 泻心胶囊对火邪热结型冠心病心绞痛临床观察及对炎症因子干预作用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(6): 48 - 50.
- [14] 何启扬,乔志强,张敏州,等. 清热解毒中药与冠心病证治 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(1): 53 - 54.
- [15] Wang XH, Liu SQ, Wang YL, et al. Correlation of serum high-sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in patients with acute coronary syndrome [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 4260 - 4266.
- [16] 黄衍寿,莫鸿辉,洪永敦,等. 清热解毒法治疗急性冠脉综合征 55 例 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(1): 13 - 16.
- [17] 于俊生,王砚琳. 痰瘀毒相关论 [J]. 山东中医杂志, 2000, 19(6): 323 - 325.
- [18] 徐浩,史大卓,殷惠军,等. “瘀毒致变”与急性心血管事件:假说的提出与临床意义 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(10): 934 - 937.

[修回日期] 2015-07-24