

全文娟, 廖端芳, 度勤慧. 动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 147-150.
Quan WJ, Liao DF, Tuo QH. Advances in integrated animal models of atherosclerosis combined with disease and syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 147-150.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.020

动脉粥样硬化病证结合动物模型研究进展

全文娟¹, 廖端芳^{1*}, 度勤慧^{2*}

(1. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南中医药大学药学院, 长沙 410208;
2. 湖南中医药大学医学院, 长沙 410208)

【摘要】 动脉粥样硬化是多种急慢性心脑血管疾病的共同发病机理, 受感人群广泛。近年来, 祖国医学在防治动脉粥样硬化上发挥重要作用, 深入探究中医药治疗动脉粥样硬化的药理机制有利于指导临床用药及新药开发。因此, 如何精准建立动脉粥样硬化的病证结合动物模型亟待解决。本文就动脉粥样硬化病证结合动物模型的研究进展进行综述, 以期为中医实验研究动物模型的制备提供依据。

【关键词】 动脉粥样硬化; 病证结合; 动物模型; 中医药; 综述

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0147-04

Advances in integrated animal models of atherosclerosis combined with disease and syndrome

QUAN Wenjuan¹, LIAO Duanfang^{1*}, TUO Qinhui^{2*}

(1. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, the School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China. 2. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208)

【Abstract】 Atherosclerosis is the common pathogenesis of many acute and chronic cardiovascular and cerebrovascular diseases, which are affected by a wide range of people. In recent years, Chinese medicine has played an important role in the prevention and treatment of atherosclerosis, and in-depth exploration of the pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of atherosclerosis is beneficial to guide clinical drug use and new drug development. Therefore, it is urgent to establish accurate animal model of atherosclerosis combining disease and syndrome. This paper reviews the research progress of animal models of atherosclerosis combining disease and syndrome to provide basis for animal models of traditional Chinese medicine experimental research.

【Keywords】 atherosclerosis; combination of disease and syndrome; animal models; TCM; reviews

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)以动脉粥样硬化斑块形成为特征, 是缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)、缺血性中风(ischemic stroke)、外周动脉疾病(peripheral arterial disease, PAD)^[1]

等多种疾病的病理基础。据最新统计, AS 相关疾病每年占全球死亡人数的 1/3, 其发病率和流行率居高不下, 给全球医疗保健带来巨大负担^[2-4]。

中医在防治动脉粥样硬化上发挥重要作用, 根

【基金项目】 湖南省科技创新计划资助(2021RC4064); 湖南省科技厅重点项目(2022SK2011); 湖南教育厅重点项目(20A379)。

【作者简介】 全文娟(1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 心血管药理机制。E-mail: 506919875@qq.com

【通信作者】 廖端芳(1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 调脂抗炎药理机制。E-mail: dfliao@hnu.edu.cn

度勤慧(1974—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管药理机制。E-mail: qhtuo@aliyun.com

* 共同通信作者

据症状和疾病的不同,动脉粥样硬化归属于中医“胸痹”“脉痹”“血痹”、“中风-中经络”等范畴^[5]。外邪入侵、饮食失调、情志不节、劳倦久病等均可导致“痰”、“瘀”、“毒”、“浊”沉积脉管,痹阻阳气^[6],随阻滞部位不同,发为“胸痹”、“脉痹”、“血痹”等。中医从整体观念入手,注重病证结合,辨证论治,疗效显著,但具体分子机制不明。深入探究中医药分子作用机制离不开病证结合动物模型的精准建立,近年来,病证结合动物模型的研究取得了一定的进展,本文旨在对目前动脉粥样硬化病证结合动物模型进行综述,为动物模型的制备提供依据。

1 常用的病症结合模型(9种)

1.1 痰湿血瘀毒损证

“痰”、“瘀”、“毒”存在于 AS 病理过程的各个阶段,应根据病邪的轻重主次遣方用药,临床可表现为眩晕头痛、痰多气短、胸闷作恶,身热、口渴等症。白云绮等^[7]结合中西医理论评价 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型为痰湿血瘀毒损证。通过检测血清血脂水平,观察主动脉和肝脏的病理变化,评价是否为血瘀痰湿证;通过 IL-6、TNF- α 炎症因子免疫组学变化评价是否为毒损证。该模型选用客观指标评价痰湿、血瘀、毒损证型的建立,并用具有清热解毒功效的四妙勇安汤进行反证,从正反两个方面对模型进行验证,模型的建立方法有一定的可取性。

1.2 气滞血瘀证

情志不节是动脉粥样硬化的始因,忧思伤脾,脾失健运,津液不布,聚而生痰;或郁怒伤肝,进而化火,灼津成痰,均可使血行失畅,脉络不利,而致气滞血瘀。临床可见胸闷胁胀、喜太息,可见刺痛,随情绪波动,舌紫暗,可见瘀斑瘀点。樊华^[8]采用高脂饲料喂养和应激性刺激联合诱导 SD 大鼠气滞血瘀型动脉粥样硬化模型。采用高脂饲料饲喂成年 SD 大鼠 12 周,在第 1~3 天腹腔注射 600 000 IU/kg 维生素 D₃,并对大鼠施加额外物理刺激,刺激因素包括光刺激:每 2 h 给予闪烁光刺激大鼠 5 min,每天 2 次;声刺激:每 2 h 给予声音刺激大鼠 5 min,每天 2 次;电刺激:每 2 h 在 30~35 V 电压下给予电刺激大鼠 5 min,刺激过程中每 25 s 通电流刺激 0.3 s,每天 2 次。通过组织血流量、血流动力学、凝血因子及生物学表征指标和胸主动脉病变情况评价气滞血瘀证及斑块形成情况,以血脂指

标、动脉硬化指数、肝肾功能指标及肝组织病理学检查评价体内脂代谢和肝脂肪变情况。采用声、光、电等因素对大鼠进行慢性刺激,使大鼠产生紧张焦虑情绪,模拟现代快节奏生活对机体产生的慢性刺激,符合中医学对气滞证的理解,气滞久则血瘀,形成气滞血瘀证,具有创新性。

1.3 秽浊痰阻证

“高粱之变,足生大丁”,饮食不节,嗜食肥甘厚味之品,以致脾胃损伤,聚湿生痰,阻滞气血,损伤脉络,清气不升,浊气不降,发为秽浊痰阻证,临床可见痰多气短,肢体沉重,舌胖大,边有齿痕,苔浊腻或白滑。古丽加玛力等^[9]采用寒燥环境联合高脂饲喂对 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型进行探索性造模。将雄性 ApoE^{-/-}小鼠每天定时放入气候箱(温度:(6 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度:25%~32.8%)11 h 并予高脂饲料喂养。采用宏观表现(体重、饮水量、进食量、情绪变化、大便、舌象、被毛)与微观表现(血脂、主动脉形态学)相结合的方式对模型进行评价,符合秽浊痰阻证的表现。病证造模方式联合中医多病因因素进行造模,考虑新疆地区气候差异对模型的影响,针对性强,具有因地制宜的优点。

1.4 痰瘀互结证

《医宗必读》云“脾土虚弱,清者难升,浊者难降,留中滞膈,瘀而成痰”。“痰”、“瘀”皆为阴邪,两者常兼夹致病,病程较长,胶着难解,临床表现为神疲乏力、身体困重、痰多、唇色紫暗,舌黯有瘀点,苔滑腻,脉滑涩。陈丽娟等^[10]采用高脂饲料饲喂联合腹腔注射维生素 D₃ 的方法复制 SD 大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结证模型。高脂饲料喂饲 SD 大鼠,并同时一次性腹腔注射 400 000 IU/kg 维生素 D₃。陈洁等^[11]同样采用高脂饲喂联合大剂量腹腔注射 VD₃ 方法,但在此基础上配合球囊损伤内膜可加快脂质斑块的快速形成。张方申等^[12]采用腹腔注射大剂量维生素 D₃ 联合高脂乳剂长期灌胃的方法建立痰瘀互结型 AS 大鼠模型。6 周龄 Wistar 大鼠按 700 000 IU/kg 的总剂量分 3 次腹腔注射 VD₃,1 次/天,连续 3 d;第 1、2 天给予 200 000 IU/kg,第 3 天 300 000 IU/kg。第 4 天采用高脂乳剂灌胃,10 mL/kg,1 次/天,连续 60 d。灌胃第 60 天,大鼠禁食 12 h,断尾取血,离心后取血浆。酶法测定 TC、选择性沉淀法测定 HDL,根据公式(TC-HDL)/HDL 计算动脉硬化指数(AI)。将 AI \geq 4.0 并且爪、唇、舌体暗紫,舌下脉络紫胀,苔腻或黄或白滑,涎液者确定为

痰瘀互结型 AS 成模大鼠。痰瘀互结证是动脉粥样硬化中常见的证候表现,高脂饮食损伤脾胃,久而酿湿成痰,阻滞气血,痰瘀互结,无需外界刺激因素诱导,造模方式相对简单。

1.5 热毒证

毒邪致病,若自外而来,其势必急,灼血伤津;若自内发,则是日久化热之故,临床可见身热较甚。王县委等^[13]采用静脉注射脂多糖(LPS)联合高脂饲料喂养建立热毒型动脉粥样硬化模型。逐渐添加高脂饲料对新西兰白兔进行适应性喂养,1 周后更换高脂饲料喂养,同时静脉注射 200 ng/kg LPS,1 次/周,第 5 周始给予不同药物或蒸馏水灌胃处理。通过血脂水平、心组织病理形态观察 AS 形成情况;通过骨髓穿刺对自体内皮祖细胞(EPCs)进行体外培养,并制备黄连解毒汤含药血清进行干预,观察黄连解毒汤对 EPCs 的影响。LPS 加高脂饲料联合应用是动脉粥样硬化的造模方法之一^[14-15],模型组可见显著斑块形成,但 LPS 静注过快容易造成高死亡率,注射时应注意小剂量缓慢静注。LPS 是强致炎性物质,符合中医“热毒致病”理论。

1.6 湿热证

因于湿,首如裹,湿热不攘,湿与热相兼致病,热势不扬,临床表现可见口渴,痛如针刺,舌质暗红夹瘀紫,苔黄腻或厚,脉数或涩。李亮^[16]采用高脂高糖饲喂 SD 大鼠,并连续 3 d 给予维生素 D3 (700000 U/kg),在此基础上尾静脉注射 LPS(2 μg/kg,2 次/周,持续 6 周)复制 SD 大鼠湿热证动脉粥样硬化模型,大鼠出现食欲欠佳和(或)便溏和(或)小便黄浊即可判定为湿热证。湿热证与热毒证的造模方式类同,但从证候辨析,热毒证与湿热证,均有热,独异在湿邪轻重,在临床上湿热证在热证的基础上同时兼具身热不扬、出汗粘腻不爽等症状,故在造模上也应予以辨析。

1.7 气虚血瘀证

病至后期,心气不足,阴血亏耗,血行涩滞,临床表现为胸闷气短,神倦乏力,舌质淡黯或有瘀斑瘀点,脉弱而涩。潘继兴等^[17]采用高糖高脂饲料联合腹腔注射垂体后叶素制备冠心病气虚血瘀证模型。高糖高脂饲料喂养 5 周,第 6 周给予垂体后叶素 6 U/kg(浓度为 2 U/mL)进行造模给药,30 min 后对大鼠体温、心电图等指标观察。若大鼠出现以下症状为造模成功:(1)体征:大鼠唇周、爪子颜色紫暗,爪温下降,耳壳、尾巴变白发凉,大便湿烂。(2)体温:体温显著下降。(3)心电图:J 点位移显著增加,心率减慢。单次腹腔注射垂体后叶素诱导

AS 模型容易出现造模不稳定的情况^[18],该造模方式在此基础上进行改进,通过多次腹腔注射垂体后叶素联合高脂饲料成功建立疾病模型,并通过具体指标对疾病、气虚证、血瘀证模型建立进行评价,造模方法具有创新性。

1.8 脾虚痰浊证

“脾虚不运清浊,停留津液而痰生”,且脾居中州,为全身水道、气机之枢纽,脾之一病,百病丛生,从而产生痰、饮、湿等病理产物。临床可表现为头身困重,食少纳呆、短气懒言、乏力,苔白腻、脉滑。王佳等^[19]采用中医经典复合因素造模法:饮食不节加劳倦过度造脾虚模型,配合现代医学冠脉内皮损伤手术造动脉粥样硬化模型,建立动脉粥样硬化脾虚痰浊证动物模型。根据 6~8 月雄性广西巴马小型猪体重的不同,每天给予体重 3% 的高脂高热量喂饲共喂养 48 周(每周称重 1 次更改喂饲量);第 2 周予冠脉机械损伤干预建立 AS 模型:LAD 中远段 1/3 处进行球囊挤压伴拉伤手术;第 6 周开始加入跑步过劳干预建立脾虚模型。第 24 周末行冠脉血管内超声(IVUS)检查见斑块明显增大,平均面积狭窄率(39.55±4.56)%,提示 AS 模型构建成功。LDL-C、TC 等指标数值均显著升高,提示模型动物脂质代谢异常亦切合中医的痰浊证的概念。同时根据自制脾虚痰浊证模型评价量表进行打分,统计结果有显著差异。饮食不节最易损伤脾胃,脾在体合肉,在此基础上加入跑步损伤肌肉,诱导脾虚模型建立,该法值得借鉴。

1.9 阳虚血瘀证

阳虚不振,阴寒之邪趁虚上乘,阻滞气血,脉络不畅,临床可见胸闷气短,面色晄白,四肢欠温。常艳鹏^[20]采取高脂饮食、脑垂体后叶素皮下注射及寒冷刺激的造模方法,建立阳虚血瘀证动物模型。造模方法为高脂饮食+脑垂体后叶素(Pit)大剂量皮下注射+可调冰柜(-2℃~4℃ 2 h/d 冷藏)。同时运用彩色多普勒、心电图等诊察方法及生化、光镜等现代检测技术,分析验证模型的成功建立。该方法主要采用高脂饲喂药物诱导联合寒冷刺激造模,模拟冠心病发病病机,避免了手术损伤内膜对机体造成应激反应。

2 总结与展望

动物是科学研究的主要手段之一,有效动物模型的建立是保障实验顺利进行的基石。目前中医药的相关实验以病证结合模型为主,在建立疾病模型的基础上给予不同证型的病因刺激。动脉粥样

硬化的病证结合模型主要有以上 9 种,疾病的造模方式与文献报道一致,主要是通过高脂饮食联合机械损伤、药物诱导或选用易感型 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠进行复刻^[21-22],动脉斑块的显著形成、血脂水平的显著升高标志着疾病模型的成功建立。相较于手术和药物造模方式,笔者建议采用 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠,造模更稳定成功率更高。证型的造模方式主要是联系中医理论施加刺激因素,可根据不同证型给予单因素或复合因素进行造模:气滞证采用声光电慢性刺激,脾虚证采用跑步过劳干预,热毒证采用 LPS 静注,阳虚证采用低温刺激等,通过血脂水平评价痰浊证的建立,炎症因子水平评价热毒证的建立,并综合体征、心电图、心脏超声及模型评价量表评价证型模型的建立。

但中医病证结合动物模型存在以下问题:(1)无标准量化指标评价不同证型动物模型成功与否;(2)无标准量化指标区分相近证型动物模型,缺乏证型金指标;(3)实验模型稳定性、重复性差;(4)所造模型能否真正反映疾病的病理机制存疑。笔者认为可以从以下几点模型的评价指标进行完善:(1)使用特定功效方剂对模型进行反证时可以设置相反功效的方剂进行辅助证明证型模型的成功建立。(2)热毒证和湿热证在使用炎症因子进行体内评价时可以辅助红外探测仪对小鼠体温进行整体评估,从体内体外两个方面说明热证模型的建立。未来随着科技的飞跃进步,研究者们能对评价体系进行不断完善,使病证结合模型更接近疾病发病机制,中医证型发病机理,为深入挖掘中医药的广袤宝库夯实基础。

参考文献:

- [1] Libby P, Buring JE, Badimon L, et al. Atherosclerosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [2] Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 535-546.
- [3] Hu P, Dharmayat KI, Stevens C, et al. Prevalence of familial hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Circulation, 2020, 141(22): 1742-1759.
- [4] Ismaiel A, Dumitrascu DL. Cardiovascular risk in fatty liver disease: the liver-heart axis-literature review [J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6: 202.
- [5] 尤心怡, 王文凤, 徐霞, 等. 补阳还五汤治疗动脉粥样硬化的物质基础及作用机制研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1575-1581.
- [6] 梁丽喆, 胡镜清, 李国信. 通阳化浊方与四妙勇安汤干预动脉粥样硬化模型家兔的粪便代谢组学比较研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 7(1): 1-11.
- [7] 白云绮, 李慧, 宋珂, 等. ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型 [J]. 世界中医药, 2021, 16(1): 71-76.
- [8] 樊华. 灯笼花中野黄芩苷对气滞血瘀型动脉粥样硬化的干预作用及机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
- [9] 古丽加玛力·尼亚孜, 安冬青, 李梅. 动脉粥样硬化秽浊痰阻证动物模型的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 265-269.
- [10] 陈丽娟, 杜莹, 贾连群, 等. 动脉粥样硬化痰瘀互结证大鼠脂蛋白亚类分布特征研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8): 159-162.
- [11] 陈洁, 缪静, 周鑫斌, 等. 大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结病证结合模型的建立及方药干预研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 22-27, 87.
- [12] 张方申, 彭欣, 秦林, 等. 痰瘀互结型动脉粥样硬化大鼠视网膜和肠系膜微循环观察 [J]. 微循环学杂志, 2015, 25(1): 10-13, 22, 83.
- [13] 王县委, 桑文凤, 裴强, 等. 黄连解毒汤对热毒所致兔动脉粥样硬化及内皮祖细胞的影响 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2121-2124.
- [14] Zhou L, Long J, Sun Y, et al. Resveratrol ameliorates atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS in ApoE^{-/-} mice and inhibits the activation of CD4⁽⁺⁾ T cells [J]. Nutr Metab (Lond), 2020, 17: 41.
- [15] Lu Z, Li Y, Syn WK, et al. Amitriptyline inhibits nonalcoholic steatohepatitis and atherosclerosis induced by high-fat diet and LPS through modulation of sphingolipid metabolism [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 318(2): E131-E144.
- [16] 李亮. 基于自噬探讨小檗碱抗湿热证动脉粥样硬化的机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [17] 潘继兴, 邓文祥, 曾光, 等. 加味生脉补心丹对冠心病气虚血瘀证大鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(7): 1303-1306.
- [18] Belous AA. Effect of pituitrin on the development of experimental atherosclerosis [J]. Biull Eksp Biol Med, 1959, 47(3): 27-30.
- [19] 王佳, 贾连群, 宋囡, 等. 健脾化痰祛瘀方对动脉粥样硬化巴马猪小肠线粒体呼吸链复合物及 ATP 活性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2677-2681.
- [20] 常艳鹏. 冠心病阳虚血瘀证病证结合研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [21] Asare Y, Koehncke J, Selle J, et al. Differential role for activating FcγRIII in neointima formation after arterial injury and diet-induced chronic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Front Physiol, 2020, 11: 673.
- [22] Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer G, et al. Animal models of atherosclerosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816: 3-13.

[收稿日期]2021-11-09