



大鼠气滞血瘀证模型的建立及影响因素分析

王婷婷¹, 贾乘², 陈宇¹, 李新¹, 程嘉艺^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 沈阳医学院 奉天医院, 辽宁 沈阳 110024)

[摘要] **目的:**探索建立大鼠气滞血瘀证模型的方法,分析影响模型的因素。**方法:**采用正交设计实验,考察声光电、冰水浴、夹尾等多种联合刺激对造模结果的影响;采用“飞点”法动态模拟微循环血流速,采用 MOTO 压力传感技术检测血液流变学相关指标,采用凝固法检测凝血 4 项相关指标。**结果:**与空白对照组相比,各模型组大鼠肠系膜微循环血流速度降低,血液流变学指标中全血高、中、低切黏度与血浆黏度升高,凝血 4 项指标中纤维蛋白原含量升高,差异显著。**结论:**声光电刺激、夹尾、束缚、冰水浴 4 种因素对造模结果影响显著。

[关键词] 气滞血瘀;动物模型;微循环;血液流变学;凝血 4 项

气滞血瘀是指气机运行不畅,以致血液运行障碍,形成气滞与血瘀并存的中医病理变化,多由情志不舒,或外邪侵袭引起肝气久郁不解所致。情志异常是气滞血瘀证的主要病因。目前所制作的气滞血瘀证动物模型多以急性为主,且没有统一的标准^[1-5]。为了提炼出有意义的影响因素,建立符合中医血瘀证候的动物模型,本实验通过正交设计,观察了各实验因素对动物表征、肠系膜微循环、血液流变学以及凝血 4 项指标的影响,旨在建造一个符合中医肝郁气滞病机的气滞血瘀模型,为今后研究血瘀证及活血化瘀方药提供一个适宜的模型。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 68 只,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,由沈阳盛京医院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2009-0004。

1.2 药品与试剂 盐酸肾上腺素注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 0911181);台氏液由本实验室配制(氯化钠,批号 F20091013;碳酸氢钠,批号 F20091015;磷酸二氢钠,批号 F20070226;氯化钾,批号 F20070615;无水氯化钙,批号 F20061129;氯化镁,批号 F20060403,均由国药集团化学试剂有限公司提供);凝血酶原时间测定试剂(批号 R1001)、活化部分凝血活酶时间测定试剂(批号 R0002)、纤维蛋白原测定试剂(批号 R1001)、凝血酶时间测定试

剂(批号 504427)、TC 缓冲液(批号 R0003)、氯化钙溶液(批号 R0008)、清洗液(批号 964-0631-3),均由希森美康生物科技有限公司提供。

1.3 仪器 JTC-1 型惊觉及痛觉实验交流刺激仪(成都仪器厂);UC4-75 电铃(白云电子器材厂);CREE 强光变焦手电(泰顺倍思特光电有限公司);TGL20M-II 台式高速大容量冷冻离心机(湖南省凯达实业发展有限公司);BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);South990btt 全自动血液黏度动态分析仪(重庆南方数控设备有限责任公司);Sysmex CA-510 全自动血凝分析仪(日本 SYS-MEX 株式会社)。

2 方法

2.1 造模方法 将大鼠随机分为 17 组,每组 4 只,雌雄各半。除空白对照组外,其余 16 组按照正交表 $L_{16}(4 \times 2^{13})$ 对各组动物施加刺激因素(表 1)。其中,声刺激:8:00 ~ 8:05,每 2 h 刺激 5 min,每日 5 次;光刺激:8:10 ~ 8:15 用闪烁光刺激大鼠,每 2 h 刺激 5 min,每日 5 次;电刺激:8:20 ~ 8:25 在 30 ~ 35 V 电压下,每 2 s 通交流电 0.3 s,每 2 h 刺激 5 min,每日 5 次;夹尾:9:00 ~ 9:30,14:00 ~ 14:30 用纱布包裹的书夹夹大鼠鼠尾(力度约为 15 N),使其与其他大鼠撕打(当大鼠处于打斗状态时,可松开书夹),每次刺激 30 min,每日 2 次;冰水浴:9:40 ~ 9:45,14:40 ~ 14:45 冰水浴 5 min,每日 2 次;束缚:10:40 ~ 12:40 将大鼠放置于束缚笼内(用铁丝网自制长约 25 cm,直径约 5 cm 的圆筒,大鼠进入束缚笼后,笼口两端用夹子夹住,将大鼠固定在内),限制

[稿件编号] 20110924003

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(20102143)

[通信作者] *程嘉艺, Tel: (024) 31207194, E-mail: cjj. 61 @ 163. com



其自由活动 2 h, 每日 1 次; 倾斜: 17:00 ~ 19:00, 45° 倾斜鼠笼 2 h, 每日 1 次; 禁食禁水: 24 h, 每周 1 次; 昼夜颠倒: 改变照明 24 h, 每周 1 次; 盐酸肾上腺素: 取材前日于大鼠背部皮下注射 0.1% ADR(0.8 mg · kg⁻¹), 共 2 次, 间隔 4 h, 2 次注射之间将大鼠浸入冰水中 5 min。试验 4 周后, 各组动物禁食 14 h, 25% 乌拉坦麻醉(4 mL · kg⁻¹)。

表 1 正交试验 L₁₆(4 × 2¹³) 水平因素表
Table 1 Orthogonal design L₁₆(4 × 2¹³)

组别	刺激因素							
	声光 电	冰水 浴	夹尾	禁食 禁水	束缚	肾上 腺素	昼夜 颠倒	45° 倾斜
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	2	2	2
3	1	2	2	2	2	1	1	1
4	1	2	2	2	2	2	2	2
5	2	1	1	2	2	1	2	2
6	2	1	1	2	2	2	1	1
7	2	2	2	1	1	1	2	2
8	2	2	2	1	1	2	1	1
9	3	1	2	1	2	1	1	2
10	3	1	2	1	2	2	2	1
11	3	2	1	2	1	1	1	2
12	3	2	1	2	1	2	2	1
13	4	1	2	2	1	1	2	1
14	4	1	2	2	1	2	1	2
15	4	2	1	1	2	1	2	1
16	4	2	1	1	2	2	1	2

注: 声光电下的 1, 2, 3, 4 分别为声、光、电刺激及无刺激, 其他 1, 2 为用、不用。

2.2 微循环指标测定 将麻醉的大鼠剖腹, 轻轻拉出回盲部肠系膜放置于有机玻璃观察台上, 并滴入适量台氏液(恒温 37 °C), 应用 BI-2000 医学图像分析系统, 在显微镜下选取管径相近的血管, 测量血液流速。

2.3 血液流变学指标测定 腹主动脉取血, 肝素钠真空采血管采血 4 mL, 应用 South990btt 全自动血液黏度动态分析仪检测血液流变学相关指标。

2.4 凝血 4 项指标测定 柠檬酸钠(9:1) 真空采血管采血 2 mL, 于 15 °C 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min^[6], 应用 Sysmex CA-510 全自动血凝分析仪检测相关指标。

2.5 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用成组 *t* 检验法判别模型是否成功; 应用 SPSS 15.0 软

件, 对正交设计结果进行方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 表征 各模型组大鼠均出现精神萎靡不振、反应迟钝、耳朵发白、舌质紫暗、被毛无光泽现象。

3.2 各组刺激因素对微循环的影响 与对照组相比, 各模型组肠系膜血流速度明显降低(表 2)。

表 2 各组刺激对大鼠肠系膜微循环指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 The stimulating influence on indicators of rat mesenteric microcirculation ($\bar{x} \pm s, n = 4$)			$\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
组别	微静脉血流速	微动脉血流速	
对照	64.76 ± 5.59	79.86 ± 10.91	
1	40.20 ± 3.61 ²⁾	56.20 ± 6.24 ²⁾	
2	43.20 ± 4.39 ²⁾	59.40 ± 6.52 ¹⁾	
3	46.40 ± 8.32 ²⁾	63.00 ± 7.27 ¹⁾	
4	46.20 ± 9.17	63.26 ± 5.51 ¹⁾	
5	42.20 ± 5.67 ²⁾	63.20 ± 7.35 ¹⁾	
6	44.20 ± 9.17	61.40 ± 5.93 ¹⁾	
7	43.20 ± 6.01 ²⁾	61.50 ± 5.09 ¹⁾	
8	45.53 ± 8.16 ¹⁾	64.20 ± 5.10 ¹⁾	
9	44.20 ± 9.27 ¹⁾	61.50 ± 5.99 ¹⁾	
10	43.20 ± 7.00 ¹⁾	58.30 ± 7.85 ¹⁾	
11	42.20 ± 7.07 ²⁾	56.20 ± 8.94 ²⁾	
12	44.50 ± 7.71 ¹⁾	58.20 ± 8.72 ¹⁾	
13	43.80 ± 6.29 ¹⁾	60.00 ± 8.84 ¹⁾	
14	48.20 ± 9.64	66.30 ± 5.65	
15	46.30 ± 11.39 ¹⁾	63.20 ± 7.81 ¹⁾	
16	47.30 ± 11.28	63.60 ± 6.67 ¹⁾	

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.3 各组刺激因素对血液流变学的影响 与对照组相比, 各模型组血液流变学指标中全血高、中、低切黏度与血浆黏度明显升高(表 3)。

3.4 各组刺激因素对凝血 4 项的影响 与对照组相比, 各模型组可使凝血 4 项指标中纤维蛋白原含量明显升高, 而对凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间无明显影响(表 4)。

3.5 统计结果 分别对微循环指标、血液流变学指标进行综合加权评分^[7], 认为每部分指标作用相等(表 5)。应用 SPSS 15.0 软件, 对正交试验结果, 分别以微循环综合评分、血流变综合评分及纤维蛋白原含量为实验指标进行方差分析。筛选结果: 对微循环综合评分有影响的主要因素有声光电刺激、盐酸肾上腺素、夹尾、冰水浴($P < 0.05$); 对血流变综



表3 各组刺激对大鼠血液流变学指标的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 The stimulating influence on indicators of rat hemorheology($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	全血黏度/ $\text{mPa} \cdot \text{s}$			血浆黏度 $/\text{mPa} \cdot \text{s}$
	全血高切 $200 \cdot \text{S}^{-1}$	全血中切 $30 \cdot \text{S}^{-1}$	全血低切 $3 \cdot \text{S}^{-1}$	
对照	6.91 ± 0.66	8.59 ± 0.81	17.88 ± 1.68	1.60 ± 0.15
1	9.22 ± 0.70 ¹⁾	11.53 ± 1.13 ¹⁾	23.68 ± 2.34 ¹⁾	1.86 ± 0.12 ¹⁾
2	9.15 ± 1.08 ¹⁾	11.03 ± 1.30 ¹⁾	22.73 ± 2.50 ¹⁾	1.86 ± 0.12 ¹⁾
3	8.98 ± 1.19 ¹⁾	10.81 ± 1.36 ¹⁾	22.21 ± 2.61 ¹⁾	1.85 ± 0.11 ¹⁾
4	8.53 ± 0.97 ¹⁾	10.52 ± 1.12 ¹⁾	21.34 ± 2.01 ¹⁾	1.83 ± 0.09 ¹⁾
5	8.59 ± 0.84 ¹⁾	11.88 ± 1.54 ¹⁾	24.84 ± 2.96 ¹⁾	1.84 ± 0.07 ¹⁾
6	8.99 ± 1.36 ¹⁾	11.87 ± 2.09 ¹⁾	22.51 ± 2.64 ¹⁾	1.83 ± 0.10 ¹⁾
7	9.16 ± 0.93 ¹⁾	10.68 ± 1.22 ¹⁾	24.15 ± 1.86 ²⁾	1.83 ± 0.05 ¹⁾
8	8.79 ± 0.51 ²⁾	11.14 ± 1.15 ¹⁾	22.03 ± 1.87 ¹⁾	1.78 ± 0.03
9	8.99 ± 1.20 ¹⁾	11.23 ± 1.59 ¹⁾	22.82 ± 2.43 ¹⁾	1.87 ± 0.15 ¹⁾
10	8.25 ± 0.78 ¹⁾	11.52 ± 1.02 ¹⁾	23.35 ± 2.26 ¹⁾	1.83 ± 0.04 ¹⁾
11	9.27 ± 1.38 ¹⁾	12.04 ± 2.26 ¹⁾	24.20 ± 4.11 ¹⁾	1.90 ± 0.05 ¹⁾
12	9.10 ± 0.94 ¹⁾	11.17 ± 1.57 ¹⁾	22.87 ± 2.69 ¹⁾	1.85 ± 0.09 ¹⁾
13	8.78 ± 0.83 ¹⁾	10.79 ± 1.20 ¹⁾	21.57 ± 1.84 ¹⁾	1.85 ± 0.13 ¹⁾
14	8.66 ± 0.85 ¹⁾	10.56 ± 0.98 ¹⁾	20.66 ± 1.02 ¹⁾	1.83 ± 0.06 ¹⁾
15	9.07 ± 1.04 ¹⁾	11.08 ± 1.19 ¹⁾	22.78 ± 1.90 ¹⁾	1.85 ± 0.09 ¹⁾
16	8.64 ± 0.90 ¹⁾	10.68 ± 0.96 ¹⁾	21.89 ± 2.42 ¹⁾	1.84 ± 0.10 ¹⁾

表4 各组刺激对大鼠凝血4项指标的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 The stimulating influence on indicators of rat blood coagulation($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	凝血酶原时间	活化部分凝血活酶时间	纤维蛋白原	凝血酶时间
	PT/s	APTT/s	Fib/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TT/s
对照	13.13 ± 1.22	29.33 ± 4.11	2.30 ± 0.36	31.59 ± 7.11
1	14.10 ± 0.14	29.10 ± 1.56	4.54 ± 0.20 ²⁾	31.85 ± 6.43
2	13.55 ± 0.76	30.33 ± 8.73	4.22 ± 0.26 ²⁾	36.83 ± 9.54
3	13.90 ± 0.71	30.80 ± 5.94	3.81 ± 0.81 ¹⁾	38.75 ± 2.19
4	13.38 ± 0.36	23.73 ± 3.78	3.34 ± 0.48 ¹⁾	38.43 ± 10.15
5	13.82 ± 0.88	26.84 ± 2.45	3.94 ± 0.76 ²⁾	38.13 ± 1.74
6	13.80 ± 0.57	31.85 ± 10.11	4.31 ± 0.16 ²⁾	32.40 ± 1.56
7	13.15 ± 0.29	27.55 ± 1.33	3.88 ± 0.53 ²⁾	35.45 ± 2.90
8	13.68 ± 0.92	30.22 ± 2.18	3.75 ± 0.66 ¹⁾	32.17 ± 5.09
9	13.30 ± 0.10	29.30 ± 3.58	3.79 ± 0.56 ¹⁾	33.23 ± 6.62
10	14.20 ± 0.92	35.90 ± 4.38	3.23 ± 0.27	32.30 ± 7.21
11	13.87 ± 0.35	26.67 ± 3.16	4.24 ± 0.21 ²⁾	36.60 ± 10.15
12	13.30 ± 0.42	28.90 ± 3.04	3.97 ± 0.62 ²⁾	35.90 ± 10.81
13	13.20 ± 0.60	33.63 ± 1.95	3.70 ± 0.49 ¹⁾	35.33 ± 7.22
14	14.30 ± 0.82	25.47 ± 3.54	3.52 ± 0.45 ¹⁾	35.30 ± 13.22
15	13.75 ± 0.92	29.70 ± 10.04	3.85 ± 0.14 ²⁾	31.50 ± 5.63
16	14.17 ± 0.25	26.40 ± 1.85	3.51 ± 0.36 ¹⁾	37.17 ± 10.78

合评分有影响的主要因素为声光电刺激、盐酸肾上腺素、夹尾($P < 0.05$);对纤维蛋白原含量有影响的主要因素为声光电刺激、盐酸肾上腺素、夹尾、束缚($P < 0.05$)。对影响因素的不同水平计算极差,并

按极差大小排序(表6,极差越大,该因素对模型的贡献越大^[8])。从表6可以直观分析出,有意义的试验因素对模型的贡献由主到次依次为:声光电刺激、夹尾、盐酸肾上腺素、束缚、冰水浴。



表 5 综合评分

Table 5 Comprehensive marking

组别	微循环综合评分	血流变综合评分
1	-0.50	0.25
2	-0.26	0.06
3	0.23	-0.07
4	0.23	-0.32
5	-0.17	0.20
6	0.01	0.14
7	-0.04	0.04
8	0.24	-0.17
9	0.02	0.09
10	-0.21	-0.07
11	-0.38	0.45
12	-0.14	0.08
13	-0.08	-0.15
14	0.50	-0.32
15	0.23	0.04
16	0.31	-0.20

表 6 各因素水平极差及因素影响排序

Table 6 Factors levels range and the order of factors' effects

因素	极差 R		
	微循环综合评分 (排序)	血流变综合评分 (排序)	纤维蛋白原 (排序)
声光电	0.42(1)	0.30(1)	0.33(2)
冰水浴	0.17(3)	0.04(5)	0.20(5)
夹尾	0.22(2)	0.25(2)	0.45(1)
禁食禁水	0.05(6)	0.00(8)	0.01(8)
束缚	0.16(5)	0.05(4)	0.26(3)
肾上腺素	0.17(3)	0.21(3)	0.24(4)
昼夜颠倒	0.00(8)	0.04(5)	0.17(7)
倾斜	0.05(6)	0.01(7)	0.19(6)

4 讨论

气滞血瘀证的形成,多由情志不舒,或外邪侵袭引起肝气久郁不解所致。情志异常是气滞血瘀证的主要病因。中医认为情志与“肝”的关系最为密切,肝主疏泄,调畅气机,疏泄太过与不及均影响气血运行。为达到“怒伤肝,久则郁”之效,须惠仁^[1]采用夹尾刺激引发大鼠打斗的方法造模;唐已婷^[2]采用束缚法造模;和岚^[3]采用注射盐酸肾上腺素,使交感神经兴奋,模拟人体暴怒的方法造模;金光亮^[4]采用断食断水、冰水浴等慢性应激刺激方法造模;任建勋^[5]尝试用慢性轻度的不可预见性刺激(噪音、光、电复合性刺激)的方法复制气滞血瘀证动物模型。

综合上述造模方法,不难看出,目前建立的气滞血瘀证动物模型所选用的刺激因素具有多样性。多年来,人们并不知道所选用的因素哪一种对模型的贡献较大,为主要因素,哪些因素是可以舍弃不用的。据此,本试验综合了以上所涉及的 8 种刺激因素,按照正交设计,研制出了新的大鼠气滞血瘀证模型。在实验过程中,发现若声刺激的时间过长,会引起大鼠惊厥反应,故作者采取少量多次的刺激方法;为防止动物出现耐受现象,每日可更改实验顺序,也可随实验时间的延长而增加刺激时间;在测量肠系膜微循环时,为避免不同部位回盲部肠系膜微循环指标存在差异,本实验选取回肠末端 1 cm 处,并在显微镜下选取管径相近的血管,测量其血液流速。在分析因素的主次时,为了较全面的反映出血瘀证的影响因素,且为避免选用单一指标而存在较大误差,作者综合了多项指标,从多方面筛选出来了具有实际意义的实验因素,最终确定,声光电刺激为主要因素,夹尾次之,再次是盐酸肾上腺素、束缚、冰水浴。为了建立更加符合中医理论的大鼠气滞血瘀证模型,将上述因素中的药物刺激,即盐酸肾上腺素刺激排除。因此,最后作者选用的实验方案是:声光电、夹尾、束缚、冰水浴联合刺激的方式。为了使本造模方法具有可重复性,本实验是在预试验的基础上,又用少数动物进行了一次重复实验,从本次实验结果中可以看出,各模型组大鼠在各种复合性刺激的作用下,与正常对照组比较,肠系膜微循环血流速度明显降低,说明微循环发生障碍;血液流变学中全血高、中、低切黏度与血浆黏度都明显升高,提示血液黏度增高;虽然各模型组凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间没有明显改变,但纤维蛋白原含量明显升高,说明形成纤维蛋白单体的机会增多,从而促进血凝过程和血栓的形成。

综上,通过本次实验的观察与研究,分析出了各因素对模型贡献的主次,寻找出了一条比较简单的、能够符合中医肝郁气滞、气滞血瘀病机变化特点的模型,为今后研究血瘀证及活血化瘀方药提供一个新的思路与动物模型。

[参考文献]

[1] 须惠仁,傅湘琦,向丽华,等. 肝郁证的动物实验研究[J]. 中医杂志,1991(6):44.
[2] 唐已婷,陈家旭. 三种中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节[J]. 北京中医药大学学报,2002,25(3):23.



- [3] 和岚,蒋文跃,毛腾敏. 注射肾上腺素模拟“气滞”复制急、慢性血瘀模型初探[J]. 中国中西医结合杂志,2004,24(3):244.
- [4] 金光亮,南睿,郭霞珍. 慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(2):18.
- [5] 任建勋,林成仁,王敏,等. 多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究[J]. 中药药理与临床,2007,3(5):210.
- [6] 石泉贵,刘凌麟. 凝血四项检测过程中应注意的问题[J]. 西藏医药杂志,2010,31(4):35.
- [7] 杜强,贾丽艳. SPSS 统计分析[M]. 北京:人民邮电出版社,2009:556.
- [8] 高祖新. 医药数理统计方法[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社,2011:244.

Analysis on establishment and affecting factors of Qi stagnation and blood stasis rat model

WANG Tingting¹, JIA Cheng², CHEN Yu¹, LI Xin¹, CHENG Jiayi^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China;

2. Fengtian Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the method for establishing the Qi stagnation and blood stasis rat model and analyze the affecting factors. **Method:** The orthogonal design was adopted to study the influences of joint stimulations including noise, light, electricity, ice water bath, tail-clamping on model rats. The ‘flying spot’ method was used to dynamically simulate blood flow velocity in microcirculation. the pressure sensing technology of MOTO was adopted to detect hemorheology-related indicators. And the coagulation method was used to detect blood coagulation-related indicators. **Result:** Compared with the negative control group, all model groups showed significant reduction in the blood flow velocity in mesenteric microcirculation and increase in the whole blood viscosity at high, medium and low shear rate, the plasma viscosity and the fibrinogen content in four blood coagulation indicators. **Conclusion:** Noise, light, electricity, tail-clamping, bondage and icewater-bath make significant impact on model rats.

[Key words] Qi stagnation and blood stasis; animal model; microcirculation; hemorheology; four blood coagulation indicators

doi:10.4268/cjcm20121126

[责任编辑 张宁宁]