

本文引用:黄淑敏,廖晓倩,范星宇,王梓仪,胡思远,胡志希.基于“以方测证”理论探讨异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备及中医证型[J].湖南中医药大学学报,2023,43(3):368-375.

基于“以方测证”理论探讨异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备及中医证型

黄淑敏^{1,2},廖晓倩¹,范星宇¹,王梓仪¹,胡思远^{1*},胡志希^{1*}

1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.福建中医药大学附属第二人民医院,福建福州350003

[摘要] **目的** 构建异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)诱导的慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠模型,运用以方测证法反推其中医证型。**方法** 采用随机数字表法将SD大鼠分为正常组及ISO低、中、高剂量组。制备CHF大鼠模型,将成模大鼠按随机数字表法分为6组:模型组、参附组、丹红组、参麦组、黄芪组、普萘组。分别于造模结束后,给药15d后,检测各组大鼠心脏质量指数及左心室质量指数;超声心电图检测各组大鼠心功能;ELISA法检测大鼠氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro brain natriuretic peptide, NT-pro BNP);HE及Masson染色方法观察大鼠心脏组织病理形态以及纤维化状态改变。**结果** 不同剂量ISO诱导CHF大鼠模型的制备:与正常组比较,ISO低剂量组各方面均无明显改变;ISO中、高剂量组大鼠左室射血分数(left ventricular fraction shortening, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)、体质量降低($P<0.01$),左心室舒张末期内径(left ventricular internal dimension diame, LVIDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular internal systolic dimension, LVISD)、NT-pro BNP、心脏质量指数、左心室质量指数明显升高($P<0.01$),但ISO高剂量组死亡率低、炎性细胞浸润及纤维化程度更高。基于“以方测证”理论探讨ISO诱导CHF大鼠中医证型:与模型组比较,参附组LVEF、LVFS、体质量升高,LVIDD、LVISD、NT-pro BNP、心脏质量指数及左心室质量指数降低($P<0.05$,或 $P<0.01$);纤维结缔组织增生和炎性细胞浸润明显减少,胶原纤维沉积减轻,仅见少量胶原纤维。其余组各项指标均有改善,但无统计学意义($P>0.05$)。**结论** ISO中、高剂量均能制备CHF大鼠模型,但ISO高剂量更优。ISO诱导CHF大鼠模型可能属于心阳虚证。

[关键词] 以方测证;慢性心力衰竭;异丙肾上腺素;动物模型;大鼠;证型

[中图分类号]R256.2

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.002

Preparation of a rat model of chronic heart failure induced by isoprenaline based on "inferring pattern by the formula" and its pattern types

HUANG Shumin^{1,2}, LIAO Xiaolian¹, FAN Xingyu¹, WANG Ziyi¹, HU Siyuan^{1*}, HU Zhixi^{1*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China

[Abstract] **Objective** To construct a rat model of chronic heart failure (chronic heart failure, CHF) induced by isoprenaline (ISO) and to infer its TCM pattern types based on "inferring pathogenesis by the formula". **Methods** SD rats were randomly divided

[收稿日期]2022-11-17

[基金项目]国家自然科学基金项目(82274412);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4062,2020JJ5408);广东省重点领域研发项目(2020B1111100001);湖南省教育厅项目(21A0230,21B0361);湖南省学位与研究生教育教改项目(2020JGZX012);湖南省教育改革课题(HNJC-2021-0594);湖南省研究生培养创新基地(2019-45);湖南省学位办研究生导师团队项目(2019-111);湖南省学位办中医诊断研究生案例库建设项目。

[第一作者]黄淑敏,女,博士,研究方向:心血管疾病本质与生物学基础研究。

[通信作者]* 胡志希,男,医学博士,教授,博士研究生导师,E-mail:515800272@qq.com;胡思远,男,博士,讲师,E-mail:6484808@qq.com。

into normal group and low-, medium-, and high-dose ISO groups. The prepared CHF rat models were divided into six groups with the random number table method: model group, Shenfu group, Danhong group, Shenmai group, Huangqi group, and propranolol group. The cardiac mass index and left ventricular mass index of each group were respectively detected after modeling, and 15 d after administration. Echocardiogram was used to detect the cardiac function in each group; ELISA was adopted to detect N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-pro BNP); HE and Masson staining were used to observe the histopathological morphology and fibrotic state of rat hearts. **Results** Preparation of ISO-induced CHF rat models with different doses: Compared with the normal ISO group, there was no significant changes in all aspects of the low-dose ISO group. In medium- and high-dose ISO dosage group, there was decrease in left ventricular fraction shortening (LVEF), left ventricular fraction shortening (LVFS), and body mass ($P<0.01$). However, there was significant higher left ventricular end-diastolic internal dimension diameter (LVIDD), left ventricular internal systolic dimension (LVISD), NT-pro BNP, cardiac mass index, and left ventricular mass index ($P<0.01$). The high-dose ISO group had lower mortality, but higher inflammatory cell infiltration and higher degree of fibrosis. TCM pattern type analysis of CHF rats induced by ISO based on "inferring pathogenesis by the formula": Compared with model group, the LVEF, LVFS, and body mass of the Shenfu group increased, and the LVIDD, LVISD, NT-pro BNP, cardiac mass index and left ventricular mass index decreased ($P<0.05$, or $P<0.01$); fibrous connective tissue hyperplasia and inflammatory cell infiltration were significantly reduced; collagen fiber deposition decreased, and only a small amount of collagen fibers was seen. All the remaining groups showed improvement without statistically significance ($P>0.05$). **Conclusion** Both medium- and high-dose ISO can be used to prepare CHF rat model, but high-dose ISO can do better. The CHF rats induced by ISO may be categorized into the heart yang deficiency pattern.

[**Keywords**] inferring patterns by the formula; chronic heart failure; isoprenaline; animal models; rats; pattern types

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由于多种原因导致心脏结构和(或)功能的异常改变,心室收缩或舒张功能不全的临床综合征,是一种严重的心脏疾病,发病率与病程、年龄相关且有地区差异^[1-4]。CHF动物模型的建立可以很好地模拟人类CHF的病理过程,为CHF的诊治提供实验基础。“以方测证”是在中医辨证论治的原则下,依据“有是证,用是方”的对应关系而提出的,是中医学认识疾病辨别证候的研究方法之一,被广泛运用在病证结合动物模型的研究中。本课题组前期研究发现,CHF动物模型存在证型的差异且与造模方法有关^[5-8],通过“以方测证”法可对不同造模方法建立的CHF动物模型的中医证型进行有效辨析。

异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)诱导CHF大鼠模型有操作简单的优点,是CHF研究的理想动物模型之一,但由于不同批动物、药物及给药途径的不同,模型的复制成功率也不同^[9-10]。本研究通过对不同剂量ISO制备CHF大鼠的心功能进行评价,再基于“方证对应”理论,分析参麦注射液(益气养阴)、参附注射液(益气温阳)、黄芪注射液(益气养元)和丹

红注射液(活血化瘀)4种中药注射液干预后的疗效反应,探讨ISO诱导的CHF大鼠可能出现的中医证型,为构建CHF病证结合动物模型奠定基础,为临床辨证分型提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠106只,体质量(180±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号SCXK(湘)2019-0004,动物合格证号:4307272111030871,在湖南中医药大学实验动物中心SPF级实验室内饲养。研究方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号LLBH-202105180001。

1.2 药物

盐酸ISO(MedChemExpress,批号:HY-B0468/CS-2582);参附注射液(华润三九雅安药业有限公司,批号:201106AK05),丹红注射液(山东丹红制药有限公司,批号:21032003),参麦注射液(正大青春宝药业有限公司,批号:2012108),黄芪注射液(正大

青春宝药业有限公司,批号:2001081),普萘洛尔(山西云鹏制药有限公司,批号:D191101);乌拉坦(阿拉丁试剂有限公司,批号:U299635-100)。

1.3 试剂

氨基末端脑钠肽前体(N-terminal pro brain natriuretic peptide, NT-pro BNP)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:G28032936、I15035213);石蜡(Sigma)、中性树胶(Sigma);苏木素(Wellbio)、PBS(7.2-7.6)(Wellbio)、伊红(Wellbio)、Masson 染色试剂盒(Wellbio)。

1.4 仪器

便携式小动物超声(北京益仁恒业科技有限公司,型号:6 LAB);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812);多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500);切片机(浙江金华益迪试验器材,型号:YD-315);包埋机(常州中威电子仪器,型号:BMJ-A)。

1.5 造模方法和模型评价标准

采用 ISO 注射制备 CHF 大鼠模型^[9]。CHF 大鼠成模标准:超声心动图检测心功能及 ELISA 检查大鼠血清 NT-pro BNP 的水平,与正常组大鼠比较有统计学意义,则确认 CHF 大鼠模型制备成功^[11]。

1.6 分组与给药

1.6.1 不同剂量 ISO 诱导 CHF 大鼠模型的制备 依据文献中提及较常用的 ISO 诱导大鼠 CHF 方案^[9],选择了 3 种剂量造模方案。采用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组及 ISO 低、中、高剂量 4 组。详见表 1。

表 1 SD 大鼠分组及给药情况比较^[11-13]

组别	n	给药剂量及方法
正常组	10	皮下多点注射生理盐水;1 mg/kg, 21 d
ISO 低剂量组	10	皮下多点注射 ISO;1 mg/kg, 21 d
ISO 中剂量组	10	皮下多点注射 ISO;3 mg/kg, 14 d 后适应性喂养 7 d
ISO 高剂量组	10	皮下多点注射 ISO;5 mg/kg, 7 d 后适应性喂养 14 d

1.6.2 ISO 诱导 CHF 大鼠中医证型的研究 采用随机数字表法将 66 只大鼠随机选 6 只作为正常组。剩余 60 只将大鼠依据前期实验(不同剂量 ISO 诱导 CHF

大鼠模型的制备)得到的最终结果(5 mg/kg×7 d 后适应性喂养 14 d),制备 ISO CHF 大鼠模型。21 d 后经眼眶取血检测 NT-pro BNP、超声心动图等确认 CHF 成模,最终死亡 18 只,未成模 6 只,成功造模 36 只,随机分为 6 组。通过换算人与动物等效剂量^[14],确定给药方式(详见表 2)。因研究选用的中药注射液不宜久用,参照本课题组前期给药方法,确定给药时间 15 d^[5-7]。

表 2 大鼠分组及给药情况比较

组别	n	给药剂量及方法
正常组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 注射生理盐水+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
模型组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 注射生理盐水+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
参附组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 参附注射液+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
丹红组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 丹红注射液+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
参麦组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 参麦注射液+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
黄芪组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 黄芪注射液+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水
普萘组	6	腹腔注射 6.0 mL/kg 生理盐水+灌胃 10 mL/kg 蒸馏水 (蒸馏水含 10 mg/kg 普萘洛尔,相当于临床等效量)

1.7 观察指标与方法

1.7.1 心功能检测 将大鼠用乌拉坦(20%,65 mL/kg)腹腔注射麻醉后,应用小动物超声系统,测量左室舒张末期内径(left ventricular internal dimension di- amete, LVIDD)、收缩末期内径(left ventricular in-ternal systolic dimension, LVISD)、左室射血分数(left ventricular fraction shortening, LVEF)、及左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)。

1.7.2 ELISA 测定血清 NT-pro BNP 水平 大鼠采用乌拉坦麻醉后,腹主动脉采血 5 mL,离心机以 3000 r/min 运行 15 min 后(离心半径为 17.8 cm),保留上清液,运用 ELISA 法测定 NT-pro BNP 含量。严格按说明书操作。

1.7.3 大鼠心脏质量指数及左心室质量指数测定 大鼠称取体质量,腹主动脉取血后迅速解剖心脏组织,用生理盐水洗去残留血液,滤纸吸干后称量全心湿重量,沿冠状沟走行分离左心室并称量,计算心脏质量指数和左心室质量指数。

1.7.4 病理组织学观察 大鼠腹主动脉取血后迅速解剖心脏组织,洗去残留血液,切取心尖组织,放置于 4%多聚甲醛固定,行常规 HE 染色和 Masson 染色。

1.8 统计分析

结果采用 SPSS 24.0 软件进行分析,数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。组间比较用单因素方差分析,若方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Games-Howell 法,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

2 结果

2.1 不同剂量 ISO 诱导 CHF 大鼠模型的制备

2.1.1 大鼠一般情况和存活率

2.1.1.1 一般情况 ISO 中、高剂量组大鼠在注射 ISO 后出现活跃、兴奋,呼吸加快,饮水量增多的表现。造模结束后 ISO 中、高剂量组大鼠出现毛色发黄,活动量减少,不欲饮食,体质量增加缓慢,小便量增多的表现,ISO 高剂量组部分大鼠出现腹水、便溏及不耐运动等表现。

2.1.1.2 存活率 ISO 低剂量组无死亡,存活率 100%;ISO 中剂量组分别于第 1 天、第 9 天、第 12 天各死亡 1 只大鼠,存活率 70%;ISO 高剂量组分别于第 1 天、第 3 天各死亡 1 只大鼠,存活率 80%。在本次研究中发现,大鼠死亡主要发生于 ISO 注射后 30 min,考虑原因为:ISO 为 β_1 受体激动剂,可使心肌、血管强烈收缩,导致心功能障碍,易引起恶性心律失常或急性心肌梗死。

2.1.2 大鼠超声心动图分析 造模结束后,与正常组比较,ISO 中、高剂量组大鼠 LVEF、LVFS 显著下降 ($P<0.01$),LVIDD 与 LVISD 明显上升 ($P<0.01$);ISO 低剂量组 LVIDD 与 LVISD 有所上升 ($P<0.01$),但 LVEF、LVFS 无明显变化 ($P>0.05$)。详见图 1—2。

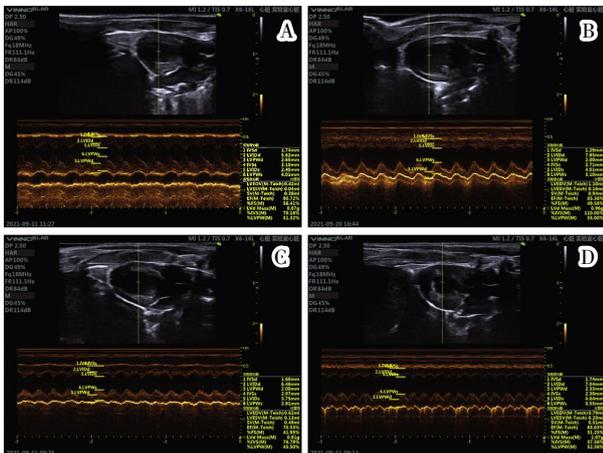


图 1 各组大鼠超声心动图情况

注:A.正常组;B.ISO 低剂量组;C.ISO 中剂量组;D.ISO 高剂量组。

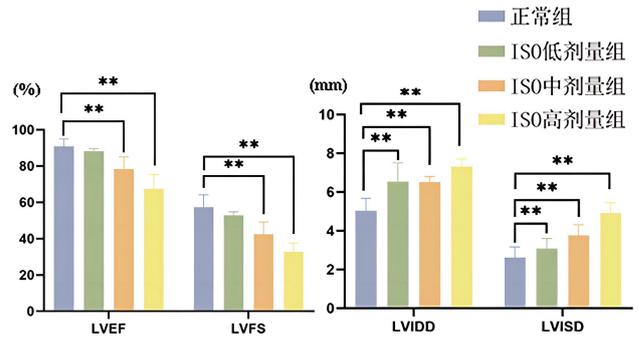


图 2 各组大鼠超声心动图比较 ($\bar{x}\pm s$)

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

2.1.3 血清 NT-pro BNP 表达 造模结束后,与正常组比较,ISO 中、高剂量组大鼠血清 NT-pro BNP 显著上升 ($P<0.01$);ISO 低剂量组无明显变化 ($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠血清 NT-pro BNP 比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NT-pro BNP/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
正常组	10	98.68 \pm 10.79
ISO 低剂量组	10	113.81 \pm 17.61
ISO 中剂量组	7	128.90 \pm 16.14**
ISO 高剂量组	8	232.91 \pm 26.50**

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。

2.1.4 大鼠心脏质量指数及左心室质量指数分析 造模结束后,与正常组比较,ISO 中、高剂量组大鼠体质量下降,心脏质量指数及左心室质量指数升高 ($P<0.01$);ISO 低剂量组体质量、心脏质量指数及左心室质量指数无明显变化 ($P>0.05$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠体质量、心脏质量指数及左心室质量指数分析 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量	心脏质量指数	左心室质量指数
正常组	10	447.82 \pm 37.46	2.81 \pm 0.19	0.32 \pm 0.02
ISO 低剂量组	10	445.36 \pm 18.80	2.94 \pm 0.06	0.33 \pm 0.02
ISO 中剂量组	7	377.03 \pm 39.43**	3.48 \pm 0.08**	0.51 \pm 0.03**
ISO 高剂量组	8	368.68 \pm 30.69**	3.84 \pm 0.12**	0.60 \pm 0.05**

注:与正常组比较,** $P<0.01$ 。心脏质量指数=全心质量/体质量;左心室质量指数=左心室质量/体质量。

2.1.5 心肌组织病理检测 HE 病理检查提示:与正常组比较,ISO 高剂量组大鼠心肌细胞体积缩小,结构模糊,间质可见明显纤维结缔组织增生并伴有炎症细胞浸润;ISO 中剂量组出现部分纤维结缔组织增生并伴有炎症细胞浸润,程度较轻;ISO 低剂量组无明显改变。详见图 3。

Masson 检查提示:与正常组比较,ISO 高剂量组

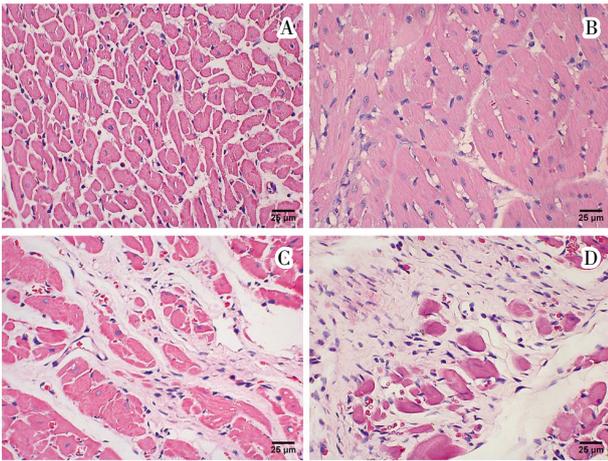


图 3 各组大鼠心肌病理情况(HE,×400)

注:A.正常组;B.ISO 低剂量组;C.ISO 中剂量组;D.ISO 高剂量组。

大鼠心肌细胞中有大量的胶原蛋白沉积,心肌纤维化程度较重;ISO 中剂量组出现部分胶原纤维沉积,心肌纤维化程度较 ISO 高剂量组轻;ISO 低剂量组出现少量胶原纤维沉积,心肌纤维化程度最轻。详见图 4。

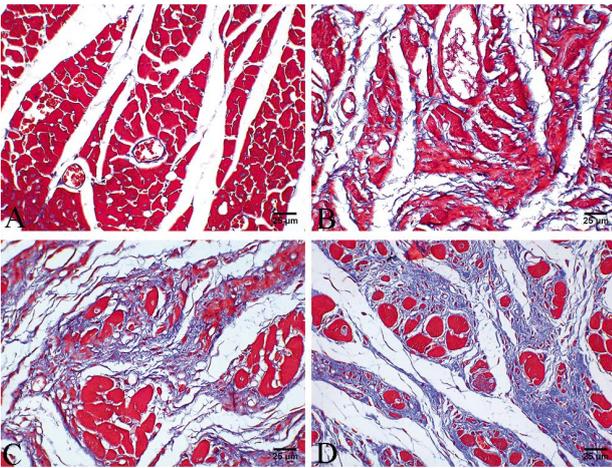


图 4 各组大鼠心肌组织纤维化情况(Masson,×400)

注:A.正常组;B.ISO 低剂量组;C.ISO 中剂量组;D.ISO 高剂量组。

2.2 ISO 诱导 CHF 大鼠中医证型的研究

2.2.1 大鼠存活率情况 造模期间第 1 天死亡 8 只大鼠,第 2 天死亡 5 只大鼠,第 3 天死亡 3 只大鼠,第 4 天、第 5 天各死亡 1 只大鼠,共计死亡 18 只大鼠,存活率 70.0%。成模后大鼠采用随机数字表法分为 6 组,经药物干预 15 d 后,各组大鼠均无死亡。

2.2.2 大鼠超声心动图分析 药物干预结束后,与正常组比较,模型组大鼠 LVEF、LVFS 显著下降($P<0.01$),LVIDD 与 LVISD 明显上升($P<0.01$);与模型组比较,参附组大鼠 LVEF、LVFS 上升, LVIDD、

LVISD 下降,普萘组 LVEF、LVFS 上升, LVISD 下降 ($P<0.05, P<0.01$),其余各组心功能指数无明显变化 ($P>0.05$)。详见图 5—6。

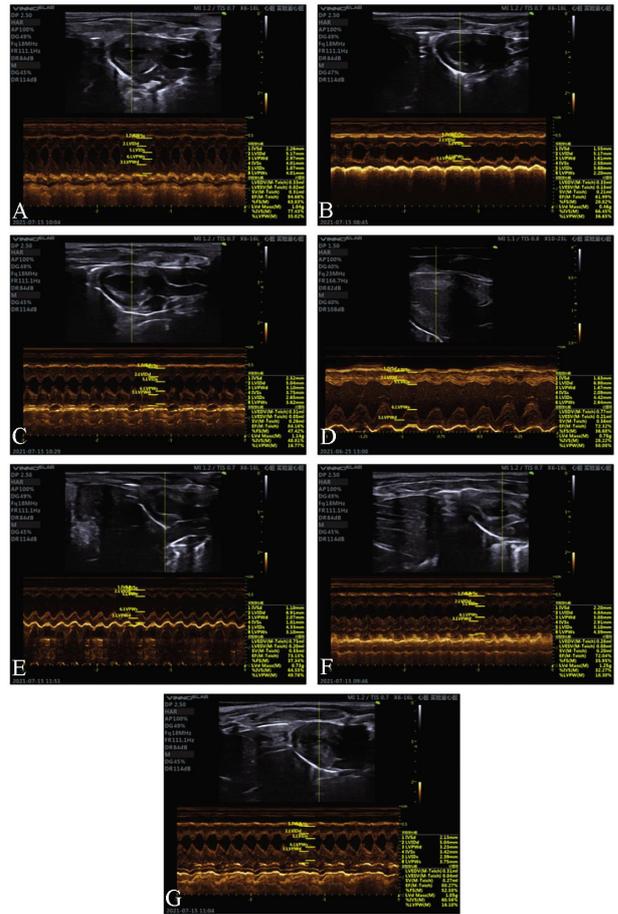


图 5 各组大鼠超声心动图情况

注:A.正常组;B.模型组;C.参附组;D.参麦组;E.丹红组;F.黄芪组;G.普萘组。

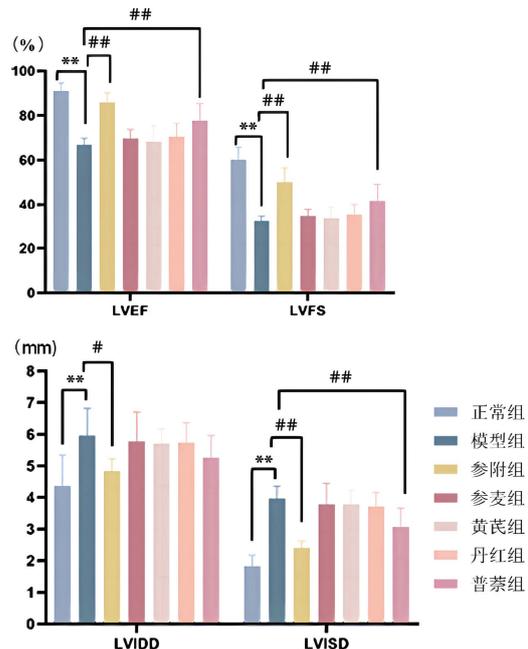


图 6 各组大鼠超声心动图比较($\bar{x}\pm s, n=7\sim 10$)

注:与正常组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

2.2.3 血清 NT-pro BNP 表达 药物干预结束后,与正常组比较,模型组大鼠血清 NT-pro BNP 显著上升($P<0.01$);与模型组比较,参附组 NT-pro BNP 显著下降($P<0.01$),参麦组轻微上升,黄芪组、丹红组、普萘组有所下降,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表5。

表5 各组大鼠血清 NT-pro BNP 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NT-pro BNP/(pg·mL ⁻¹)
正常组	6	113.31±38.53
模型组	6	212.98±68.05**
参附组	6	137.31±2.58 [#]
参麦组	6	221.42±55.11
黄芪组	6	171.17±47.21
丹红组	6	197.38±40.34
普萘组	6	205.51±56.86

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2.4 大鼠心脏质量指数及左心室质量指数分析 药物干预结束后,与正常组比较,模型组大鼠体质量下降,心脏质量指数及左心室质量指数增大($P<0.01$);与模型组比较,参附组及普萘组体质量上升($P<0.01$),参附组心脏质量指数及左心室质量指数降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);其余各组体质量、心脏质量指数及左心室质量指数有改善但无统计学意义($P>0.05$)。详见表6。

表6 各组大鼠体质量、心脏质量指数及左心室质量指数分析($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	心脏质量指数	左心室质量指数
正常组	6	448.53±39.11	2.68±0.32	0.35±0.03
模型组	6	352.70±31.52**	3.80±0.22**	0.61±0.05**
参附组	6	414.47±17.81 [#]	3.03±0.05 [#]	0.41±0.03 [#]
参麦组	6	352.35±52.76	3.45±0.13	0.56±0.03
黄芪组	6	365.10±31.22	3.45±0.12	0.52±0.01
丹红组	6	388.72±55.69	3.42±0.07	0.51±0.11
普萘组	6	405.52±21.73 [#]	3.38±0.20	0.52±0.08

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

2.2.5 心肌组织病理观察 药物干预结束后,HE 病理检查提示:正常组心肌细胞形态正常,结构清晰,无变性、坏死及间质炎症细胞浸润,未见明显纤维组织增生;与正常组相比,模型组大鼠心肌细胞体积缩小,结构模糊,间质可见明显纤维结缔组织增生并伴有炎症细胞浸润;参附组的间质纤维结缔组织

增生和炎症细胞浸润相比模型组明显减少,普萘组、丹红组、参麦组、黄芪组仍有较多炎症细胞浸润,间质纤维结缔组织增生明显。详见图7。

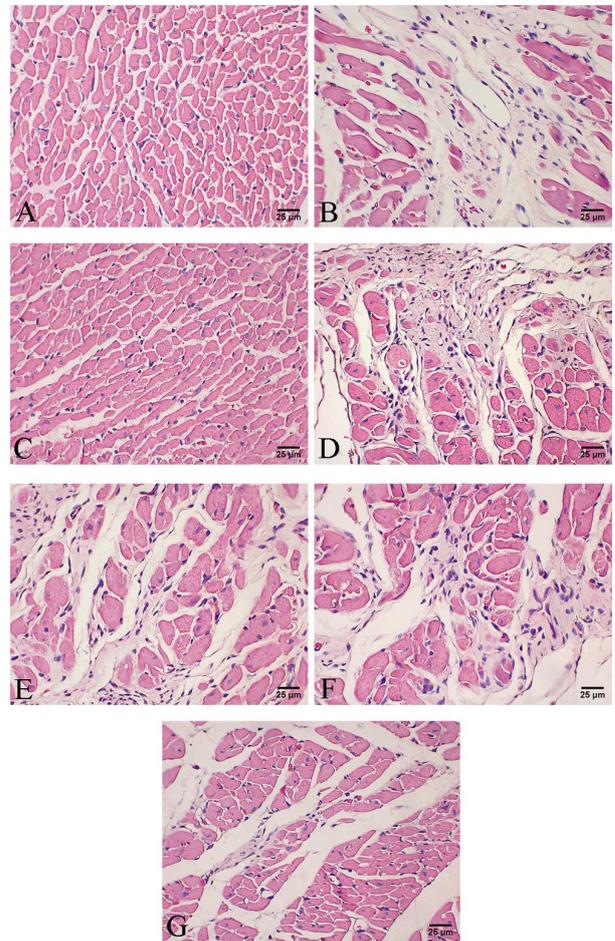


图7 各组大鼠心肌组织结构观察(HE,×400)

注:A.正常组;B.模型组;C.参附组;D.参麦组;E.丹红组;F.黄芪组;G.普萘组。

Masson 染色检测提示:正常组的心肌组织中未见明显胶原蛋白沉积,与正常组相比,模型组心肌组织中有大量的胶原蛋白沉积,心肌纤维化程度较重;与模型组相比,参附组心肌组织中的胶原蛋白明显减少,纤维化程度明显减轻,普萘组、丹红组、参麦组、黄芪组仍有较多胶原沉积。详见图8。

3 讨论

CHF 是各种心脏疾病的最终阶段,动物模型是基础实验的重要组成部分,能够很好地为科研工作服务,促进该疾病相关机制及药物防治研究的发展,其中,最常见的动物是大鼠、小鼠^[5]。现阶段大部分疾病在中医研究中缺乏公认的病证结合动物模型制

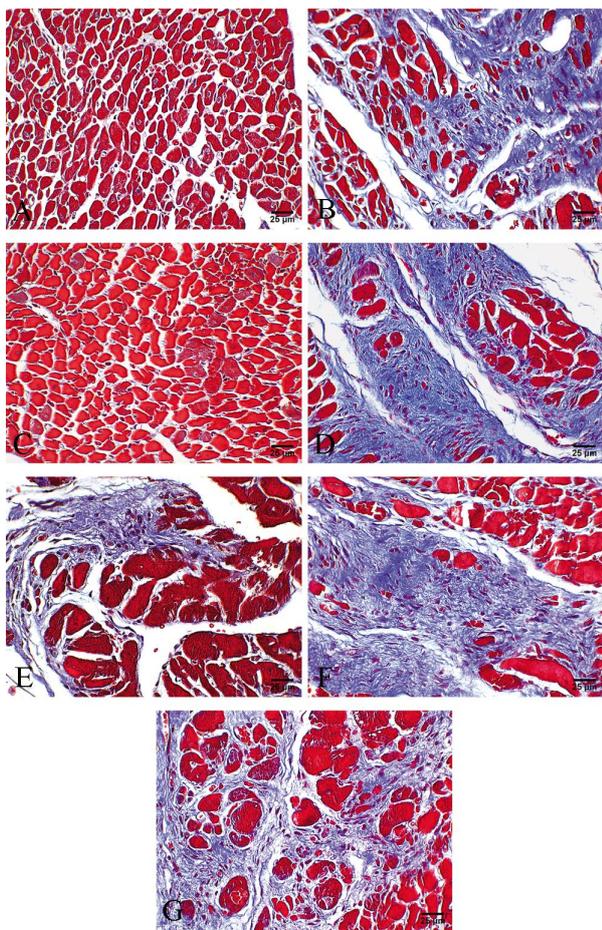


图 8 各组大鼠心肌组织纤维化(Masson,×400)

注:A.正常组;B.模型组;C.参附组;D.参麦组;E.丹红组;F.黄芪组;G.普萘组。

备方法,因此,疾病的证候本质研究受到阻碍。故当前建立符合中西医特点的病证结合动物模型是本团队努力的方向。

通过皮下多点注射 ISO 可诱导心脏抑制型 CHF 大鼠模型的建立^[16]。ISO 是 β 受体激动剂,可使心率加快,心肌收缩力增强,心肌耗氧量增加,从而诱导心肌细胞坏死、纤维化,使心脏负荷增加,导致 CHF 发生。此方法具有操作简单,模型稳定性、重复性高,能较好地反映 CHF 的病理发展过程,与临床诊断标准吻合度较高的优点^[15]。但其仍然存在问题:不同批次、类型的模型动物对于 ISO 的耐受不同,不同厂家批号的 ISO 也对造模结果有影响。目前,ISO 诱导制备 CHF 大鼠模型的剂量尚无统一标准,依据参考文献^[12,17-18],本研究分别选择 3 种不同剂量 ISO 制备 CHF 大鼠模型,以期选择出最佳造模剂量。在 CHF 动物模型评价中,LVIDD、LVISD、LVEF、LVFS 及血清 NT-pro BNP 是评价和衡量 CHF 模型是否制备成功的重要指标^[9]。研究显示,干预结束后

ISO 低剂量组大鼠无死亡,ISO 中剂量组大鼠死亡率最高,考虑原因可能为 ISO 长期使用相较于短期大剂量使用更容易引起大鼠恶性心律失常。超声心动图提示:ISO 中、高剂量组大鼠 LVEF、LVFS 均下降,LVIDD、LVISD 增加,ISO 低剂量组 LVIDD、LVISD 增加,但 LVEF、LVFS 与正常组比较无意义,考虑与心脏功能处于代偿期有关。血清 NT-pro BNP 提示:随着 ISO 剂量增加,各组大鼠血清 NT-pro BNP 水平逐渐上升。病理染色提示:ISO 高剂量组出现明显纤维结缔组织增生并伴有炎症细胞浸润,心肌纤维化程度最重。综上所述,本次研究发现 ISO 中、高剂量组均能成功诱导 CHF 大鼠模型,但 ISO 高剂量组死亡率较低,病理检测效果最为理想,故 ISO 诱导 CHF 大鼠模型最优方法为:5 mg/kg×7 d 后适应性喂养 14 d。

“以方测证”是中医辨证论治的常用方法,是中医认识疾病的一种手段,更是中医方证现代研究的重要逻辑依据。其主要原理为依据药物构成的属性及功效来观察服用该方剂后的反应,从而反向推测其中医证型,现已在中医证本质及病证结合动物模型的研究中广泛应用^[19-20]。课题组前期运用“以方测证”法对不同造模方法诱导 CHF 大鼠的中医证型进行了推测,成功对 3 种经典 CHF 大鼠模型的中医证型及其证候的生物学基础进行了研究。本研究也采用“以方测证”的方法,成功运用 ISO 诱导复制了 CHF 大鼠模型,并在课题组前期研究的基础上进行了改良:(1)依据《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[21]。CHF 本以气虚为主,标以血瘀为主,随着病情逐渐发展可兼有阳虚和阴虚,故在方药选择上选用益气、温阳、养阴、活血四类代表方剂;(2)选用中药注射液。中药注射剂具有药力专、药性稳定、疗效明确的优点,可避免传统汤剂因中药剂量、质量、炮制、熬制等差别而引发的误差。(3)结合现代生物学指标进行验证。

在本次研究中,药物分别选用黄芪注射液、参附注射液、参麦注射液和丹红注射液。从药物组成来看,黄芪注射液由黄芪提取而成,主要功效为益气养元,养心通脉;参附注射液由人参、附子提取而成,主要功效为回阳救逆、益气固脱;参麦注射液由人参和麦冬提取而成,主要功效为益气固脱、养阴生津;丹红注射液由丹参、红花提取而成,主要功效为

活血化瘀。4种注射液临床上均广泛用于治疗心力衰竭、冠心病、心绞痛等疾病。本研究中黄芪注射液对应心气虚证,参附注射液对应心阳虚证,参麦注射液对应心气阴两虚证,丹红注射液对应心血瘀阻证。依据《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》中提及这4种证型是CHF的基本证型,故对比观察这4种中药注射液改善心功能的作用效果,可明确CHF大鼠的基本中医证候。本研究发现,经4种中药注射液干预后,参附组能有效改善大鼠超声心动图的各项指标,恢复心肌组织病变,改善心脏及左心室质量指数,降低血清NT-pro BNP水平,其他3组注射液疗效无明显改变。由此,本研究证实益气、养阴、活血法对ISO诱导的CHF模型大鼠无明显改善作用,温阳法则表现出较好疗效。

4 结论

以ISO(5 mg/kg)皮下注射7 d后适应性喂养14 d制备CHF大鼠模型效果最为理想。依据“以方测证”理论,本团队推测:ISO诱导CHF大鼠模型可能属于心阳虚证。

参考文献

- [1] VERBRUGGE F H, STEELS P, GRIETEN L, et al. Hyponatremia in acute decompensated heart failure: Depletion versus dilution[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2015, 65(5): 480-492.
- [2] WRITING GROUP MEMBERS, MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4): e38-e360.
- [3] CHAN M, TSUYUKI R. Heart failure in the elderly[J]. *Current Opinion in Cardiology*, 2013, 28(2): 234-241.
- [4] 邱伯雍,王永霞.慢性心力衰竭流行病学及防治研究进展[J].*中华实用诊断与治疗杂志*,2017,31(6):619-621.
- [5] 李欣春,梁 昊,胡志希,等.高血压心衰大鼠证候本质及药物干预研究[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(8):853-857.
- [6] ZHOU Y, ZHONG S J, HU S Y, et al. Comparison of the ef-

- fects of Shenfu injection and Shenmai injection on doxorubicin-induced chronic heart failure in rats[J]. *International Journal of Clinical And Experimental Medicine*, 2018, 11(12): 13169-13179.
- [7] 吴 涛.基于中药制剂干预心肌梗死心衰大鼠的中医证型研究[D].长沙:湖南中医药大学,2016.
- [8] 钟森杰,熊震军,张 倩,等.基于“方证对应”理论探讨主动脉弓缩窄致心力衰竭大鼠模型的中医证型与代谢标志物[J].*中国实验方剂学杂志*,2022,28(16):130-139.
- [9] 李梦婷,彭 成,谢晓芳.心力衰竭小型动物模型研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(5):213-219.
- [10] 黄 明,熊 可,李 霄,等.心力衰竭动物模型的研究进展[J].*天津中医药大学学报*,2019,38(6):534-540.
- [11] 罗时珂,李 萍,程晓曙.异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的建立[J].*重庆医学*,2012,41(4):352-354.
- [12] 张 伟,靳晓晔,戴贵东,等.苦参碱调控 ADMA 代谢通路抑制异丙肾上腺素诱导大鼠慢性心力衰竭的作用[J].*陕西中医药大学学报*,2022,45(5):109-113.
- [13] 李 想,向绍杰,赵 磊,等.异丙肾上腺素诱发大鼠特异性心肌梗死所引起心肌细胞病理组织的变化[J].*实验动物科学*,2019,36(2):42-46.
- [14] 姚 涛,胡志希,李 琳,等.参麦注射液对高血压心衰大鼠肾纤维化 TGF- β 1/Smad 信号通路的作用研究[J].*时珍国医国药*, 2021,32(8):1821-1824.
- [15] 张 瑾,李秀敏,苗明三.基于中西医临床病症特点的心力衰竭动物模型分析[J].*中国中药杂志*,2021,46(4):786-791.
- [16] CHANG S C, REN S X, RAU C D, et al. Isoproterenol-induced heart failure mouse model using osmotic pump implantation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1816: 207-220.
- [17] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等.基于 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J].*中国中药杂志*,2022,47(20):5556-5563.
- [18] 王 洁,段坤坤,王亚峰.心力衰竭动物模型建立方法的研究现状[J].*西北民族大学学报(自然科学版)*,2022,43(1):52-57.
- [19] 钟森杰,李 静,李 琳,等.“以方测证”在中医证候模型研究中的应用述评[J].*中华中医药学刊*,2021,39(2):48-50.
- [20] 卢林竹,胡志希,李 琳,等.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(5):570-573.
- [21] 陈可冀,吴宗贵,朱明军,等.慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J].*心脑血管病防治*,2016,16(5):340-347.

(本文编辑 贺慧娥)