

一种新型病证相结合肝阳上亢证颈性眩晕大鼠模型的制备方法

姜炳辰¹, 沈佳莹², 莫文¹

(1.上海中医药大学附属龙华医院骨伤科, 上海 200000; 2.上海中医药大学附属曙光医院风湿免疫科, 上海 200021)

【摘要】 目的: 建立一种简单、可靠的符合肝阳上亢证的颈性眩晕大鼠模型, 同时建立一种简便可行的反应动物眩晕程度的评价方法。方法: 选用 SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 8 周龄, 体重 280~320 g, 随机进行分组(每组 6 只), 使用局部注射聚桂醇注射液(硬化剂)与附子汤灌胃相结合的方法制备肝阳上亢证颈性眩晕大鼠模型(联合造模组), 与单用局部注射硬化剂的大鼠(硬化剂组)、单用附子汤灌胃的大鼠(附子汤组)、空白对照组进行对照, 以大鼠通过一段玻璃管的时间(跑管时间)反应大鼠的眩晕程度, 分别于造模前、造模后第 2 周、造模后第 3 周进行观测。结果: 附子汤组与空白对照组跑管时间比较差异无统计学意义; 联合造模组与硬化剂组跑管时间比较差异无统计学意义; 硬化剂组与联合造模组跑管时间延长, 不仅与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$), 且与附子汤组的差异有统计学意义($P < 0.01$)。造模后的跑管时间较造模前相比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 比较造模后 2、3 周的跑管时间, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 该造模方法能有效制成肝阳上亢证颈性眩晕大鼠模型, 且跑管时间能在一定程度上反映大鼠的眩晕程度, 为今后颈性眩晕的动物研究提供了一种简便可行的动物模型与眩晕的检测方法。

【关键词】 颈性眩晕; 病证结合; 大鼠模型

中图分类号: R229

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.02.017

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



A method to create a new rat model of combination of disease and syndrome with cervical vertigo hyperactivity of liver-yang syndrome JIANG Bing-chen, SHEN Jia-ying, and MO Wen*. *Department of Orthopaedics, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

ABSTRACT Objective: To establish a simple and reliable model of cervical vertigo in rats with hyperactivity of liver-yang syndrome, and to establish a simple and feasible method for evaluating the degree of vertigo in animals. **Methods:** SPF male SD rats (aged 8 weeks, weighing 280 to 320 g) were randomly divided into 4 groups (6 rats in each group). The model of cervical vertigo of hyperactivity of liver-yang syndrome (joint modeling group) was established by combining local injection of lauromacrogol (hardener) and receiving fuzi decoction by gavage. The joint modeling group was compared with the hardener group, the fuzi decoction group and the blank control group. The vertigo degree of rats was measured by the time of passing through a glass tube (running time) before modeling, 2 weeks and 3 weeks after the established model. **Results:** There was no statistical difference in the running time between control group and fuzi decoction group, between joint modeling group and hardener group. The running time in the hardener group and the joint modeling group was longer than that in the control group ($P < 0.05$), and was even longer than that in the fuzi decoction group ($P < 0.01$). There was significant difference in running time after modeling compared with that before modeling ($P < 0.05$); there was no significant difference in running time between 2 and 3 weeks after modeling ($P > 0.05$). **Conclusion:** This method can effectively establish a rat model of cervical vertigo with hyperactivity of liver-yang syndrome, and the running time can reflect the degree of vertigo in rats to a certain extent. This experiment provides a simple and feasible animal model and detection method for research of cervical vertigo in the future.

KEYWORDS Cervical vertigo; Combination of disease and syndrome; Rat model

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81603635); 上海市申康医院发展中心(编号: 16CR3074B, 16CR4011A); 上海市科学技术委员会(编号: 16401930600, 17401934400, 18401903200); 上海市卫生与计划生育委员会(编号: 20164Y0081, ZYKC201701003, 201840010); 上海市浦东新区卫生与计划生育委员会(编号: PW2018D-07); 国家中医临床研究基地龙医学者编号:(编号: LYTD-60); 上海市体育科技“腾飞计划”项目(编号: 18T009)

Fund program: National Nature Science Foundation of China (No.81603635)

通讯作者: 莫文 E-mail: mw2218@126.com

Corresponding author: MO Wen E-mail: mw2218@126.com

颈性眩晕(cervical vertigo)是由于颈部组织病理性改变,直接或间接导致椎-基底动脉血流障碍,引起脑供血不足,临床上以眩晕为主要表现^[1]。目前,基于椎-基底动脉血流障碍的颈性眩晕动物模型大多采用手术、物理压迫等方法,手术操作复杂,成功率低,对于颈性眩晕程度的测量大多采用多普勒血流仪测量椎-基底动脉的血流变化。本文旨在建立一种切实可行且操作简便的肝阳上亢证颈性眩晕大鼠模型,同时,创立一种全新的测量方法以更简便地测量颈性眩晕程度。现将本实验结果总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠(合格证编号:20130016001939)24 只,8 周龄,体质量 280~320 g,随机分组。

1.1.2 药物 (1)硬化剂:聚桂醇注射液 10 ml:100 mg×3 支(陕西天宇制药有限公司,国药准字 H20080445)。(2)附子汤制备:单味制附子(上海雷允上药房中达大药房店购买),将药物先浸泡 30 min,煎煮 2 次(每次 45 min)再将药液合并浓缩为含生药 0.2 g/ml。(3)15%水合氯醛溶液(临用时配制)。

1.1.3 有机玻璃管 天长市瑞慈有机玻璃有限公司提供,规格:直径 120 mm×1 m,取 2 根有机玻璃管连接制成长 2 m 的玻璃管。

1.2 实验方法

1.2.1 颈性眩晕大鼠模型的建立 将大鼠随机分为 4 组,每组 6 只。即单用硬化剂造模组(硬化剂组),单用附子汤造模组(附子汤组),硬化剂联合附子汤造模组(联合造模组),空白对照组。

1.2.2 造模方法 (1)运用硬化剂造模:将大鼠适应性喂养 1 周后,侧向定位于大鼠左侧腋骨头上缘,向颈椎方向垂直进针,注射器回抽无血后注射硬化剂 1.5 ml,制成颈性眩晕模型。(2)运用附子汤造模:将大鼠适应性喂养 1 周后,将制备好附子汤参照鄯东红等^[2]的方法,灌胃给药 3 周,按 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹,

相当于生药 2 g·kg⁻¹·d⁻¹,造成肝阳上亢证大鼠模型。(3)硬化剂联合附子汤造模:将大鼠适应性喂养 1 周后,局部注射硬化剂加灌胃附子汤共 3 周,造成颈性眩晕肝阳上亢证大鼠模型。

1.3 观察项目与方法

1.3.1 声响逃避反射训练 将大鼠置于有机玻璃管内一端,于后方敲击一端管壁,并在玻璃管的另一头放置喂养饲料,引诱大鼠快速通过玻璃管。连续训练 3 d,每天 2 次,上下午各 1 次,建立起牢固的声响逃避反射反应。

1.3.2 眩晕测试(跑管法) 将大鼠置于有机玻璃管内一端,于后方敲击一端管壁,并在玻璃管的另一头放置喂养饲料,引诱大鼠快速通过玻璃管,同时在玻璃管中央架设摄像机,记录每只大鼠通过玻璃管的情况(玻璃管两端做好标记,当大鼠鼻尖越过标记线后开始计时),随后通过视频播放软件逐帧回放,数出老鼠通过两端标记线的总帧数(拍摄设备拍摄 30 帧/秒的画面)。由于产生了眩晕,可见大鼠爬行速度变慢,且停顿、环顾次数增多。在建立良好的声响逃避反射的前提下,认为大鼠眩晕程度越大,其通过玻璃管两端标记线的时间(总帧数)越多(之后简称为跑管时间)。并在造模前、造模后 2 周、造模后 3 周各测得 1 次跑管时间(单位:帧)。跑管法眩晕测试示意图见图 1。

1.4 统计学处理

将造模前、造模后 2 周、造模后 3 周测得的跑管时间分别进行统计分析,将 4 组大鼠的跑管时间进行重复测量设计的方差分析,软件采用 SPSS 21.0 中 General Linear Models 的 Repeated Measures 进行统计分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

造模前测得各组跑管时间发现,多数大鼠跑管时间在 120~130 帧,且各组跑管时间差异无统计学意义(P>0.05)。造模 2、3 周后再次测得跑管时间,通过比较不同组的跑管时间发现,附子汤灌胃组与空

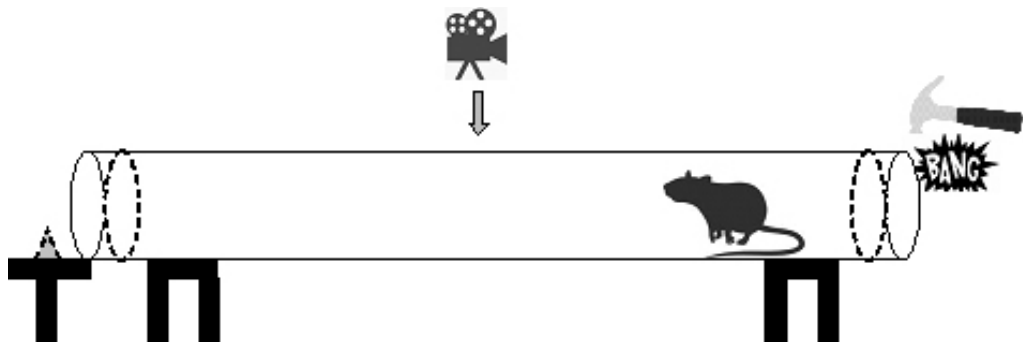


图 1 跑管法眩晕测试示意图 图中 A 为大鼠喂养饲料,B 为测量大鼠跑管时间的摄像机,C 表示大鼠的跑管距离为 2 m

Fig.1 Diagram of vertigo test by running through tube method A is feed to rats; B is a camera that measures the running time of rats; C indicates that the running distance of rats is 2 meters

白对照组差异无统计学意义；联合造模组与注射硬化剂组相比差异无统计学意义；注射硬化剂组与联合造模组跑管时间延长，不仅与空白对照组的差异有统计学意义 ($P<0.05$)，且与附子汤组的差异也有统计学意义 ($P<0.01$)。通过比较不同时间测量的跑管时间发现，造模后的跑管时间较造模前相比，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；比较造模后 2、3 周的跑管时间发现，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 造模试验各组大鼠跑管时间比较

Tab.1 Comparison of running time of rats in model test groups

组别	例数 (只)	跑管时间(帧)		
		造模前	造模后 2 周 [▲]	造模后 3 周 [▲]
空白对照组	6	134±28	123±40	119±23
硬化剂组**	6	137±17	189±76	181±75
附子汤组	6	121±22	96±12	105±23
联合造模组**	6	120±30	200±63	191±69

注：*与空白对照组相比， $P<0.05$ ；#与附子汤组相比， $P<0.01$ ；▲与造模前相比， $P<0.05$

Note: *Compare with control group, $P<0.05$; #compare with fuzi decoction group, $P<0.01$; ▲compare with that before modeling, $P<0.05$

3 讨论

3.1 制附子对动物模型的作用

本实验显示附子汤组的跑管速度最快，空白联合造模组的跑管速度最慢，这与实验之前的预期不同。制附子在其中的作用体现为双相型。有研究表明，制附子能使血压升高，并产生眩晕、头痛加重的类肝阳上亢症状^[2]，使得联合造模组的大鼠眩晕症状加重，出现跑管时间延长；同时，有现代药理学证明附子具有明显的强心、抗炎、镇痛、促血液循环等兴奋性功效^[3]，可能是附子的这一系列药理作用导致单用附子汤灌胃组的大鼠具有最短的跑管时间。

3.2 聚桂醇注射液对动物模型的作用

聚桂醇注射液是一种硬化剂，能使组织周围纤维化，压迫静脉，临床上多用于内镜下食管曲张静脉出血的急诊止血，故能被用于该实验中，使颈部组织纤维化进而压迫椎动脉。本文证实了局部注射硬化剂法运用于制造大鼠的颈性眩晕模型的可行性。

3.3 不足之处

即便局部注射硬化剂法运用多年，但其仍有不足之处，其主要作用于颈椎周围软组织，使其纤维化进而压迫椎动脉，这与该疾病本身由于颈椎的退行性变进而导致椎动脉的血流动力学改变还有一定差异，但影响椎动脉血流的结局是相似的。

本文所采用的观察指标较为单一，在以后的研究中应联合经颅多普勒(TCD)进一步观察脑血流动力学改变，以对该模型加以验证。本实验每组动物数为 6 只，但仍能检测到显著差异，单从结果来看，跑管时间能在一定程度上反映大鼠的眩晕程度。

“跑管法”简便易行，然而，正如所有行为学实验方法一样，实验动物个体差异对于实验结果也有较大的影响，有时出现标准差较大的情况。为了减少个体差异对实验结果影响，前期训练大鼠建立起良好的条件反射很重要。

3.4 应用与展望

肝阳上亢证是中医常见证型，尤其多见于眩晕病；颈性眩晕是椎动脉型颈椎病中常见症状，其主要表现即为眩晕。本文作者采用注射硬化剂法与附子汤灌胃相结合，制成肝阳上亢证颈性眩晕模型，实验结果证实了模型的可靠性，填补了病证结合的椎动脉型颈椎病模型的空白。

本文首创的“跑管法”属行为学实验的范畴。需要建立在良好的条件反射的基础上，因此实验前期的声响逃避反射训练尤为重要。“跑管法”相较于常用的“跳台法”^[4]，其前期条件反射训练更简便，所需设备简易，对实验动物的伤害也更小。因此，“跑管法”在运用于眩晕程度的测试上具有很大优势。

本文的实验结果显示，造模 3 周与造模 2 周的跑管时间差异没有统计学意义，说明在此期间大鼠的表现比较稳定，试验结果较为可靠。该病证结合法制造肝阳上亢证颈性眩晕模型，为研究药物治疗肝阳上亢证颈性眩晕的疗效提供可能，为这类新药的临床前药效学研究奠定了基础。

参考文献

[1] 畅亚鑫,李文雄,杨锋. 中医整脊法治疗椎动脉型颈椎病研究进展[J]. 陕西中医, 2017, 38(9): 1315-1316.
CHANG YX, LI WX, YANG F. Advances in the treatment of vertebral artery type cervical spondylosis with TCM chiropractic therapy [J]. Shaan Xi Zhong Yi, 2017, 38(9): 1315-1316. Chinese.

[2] 鄢东红, 金益强, 肖纯, 等. 自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型的复制[J]. 湖南中医学院学报, 1999, 10(4): 35-38.
YAN DH, JIN YQ, XIAO C, et al. Reproduction of spontaneously hypertensive rat model of hyperactivity of liver yang [J]. Hu Nan Zhong Yi Xue Yuan Xue Bao, 1999, 10(4): 35-38. Chinese.

[3] 袁雯. 附子的药理研究[J]. 中医临床研究, 2018, 10(4): 145-147.
YUAN W. Pharmacological study of Fuzi [J]. Zhong Yi Lin Chuang Yan Jiu, 2018, 10(4): 145-147. Chinese.

[4] 傅继华, 余书勤, 刘军, 等. 实验性眩晕动物模型的建立[J]. 中国药科大学学报, 2002, (6): 64-66.
FU JH, YU SQ, LIU J, et al. Establishment of animal model of vertigo [J]. Zhongguo Yao Ke Da Xue Xue Bao, 2002, (6): 64-66. Chinese.

(收稿日期: 2019-02-19 本文编辑: 王宏)