

实验性肾虚血瘀动物模型的建立和评价

胡心伟* 指导:陆 华*

(* 成都中医药大学临床医学院, 成都十二桥路 37 号, 610075)

摘要 目的:寻找有助于评价补肾化痰促卵泡发育及排卵药效的动物模型。方法:对单纯孕激素避孕药 LNG、癸息汤所致排卵抑制模型的血液流变学、血清 E_2 、P、卵巢、子宫指数、卵巢生长卵泡、成熟卵泡、闭锁卵泡、黄体数等指标进行考察,与正常对照组相比较。结果:孕激素 LNG 及癸息汤所致的动物模型出现不同程度的血黏滞度升高,生长卵泡、闭锁卵泡数增多,黄体数明显减少,孕激素水平低下。其中,血液流变学的改变以癸息汤组明显,排卵抑制以孕激素组较为明显。结论:孕激素 LNG 及癸息汤所致排卵抑制动物模型可初步用于补肾活血促排卵方药的药效研究及疗效判定。

关键词 肾虚,血瘀/动物模型

Establishment and Evaluation of Model of Kidney Deficiency-Blood Stagnation in Lab Animal

Hu Xinwei, Lu Hua

(School of Clinical Medicine, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Abstract **Objective:** to search for model of laboratory animal suitable for facilitation of evaluating follicular development and ovulation by tonifying kidney and removing stasis. **Method:** several parameters were observed and compared between the model of ovulation inhibition induced by pure lutein contraceptive (LNG) or Guixi Decoction and the normal control group, for instance, blood rheology, blood serum E_2 , P, index of ovaries and hystera, growing follicle of ovaries, vesicula graafiana, corpora atretica, amount of corpus luteum, etc. **Result:** the model groups presented with a rise in blood viscosity, amount of growing follicle and corpora atretica to varied degrees, a marked decrease in amount of corpus luteum and depression of lutein level. Guixi Decoction group appeared significant change in blood rheology; lutein group was notable in arresting ovulation. **Conclusion:** animal model of arresting ovulation induced by lutein or Guixi Decoction could be used to study drug action and therapeutic effect for ovulation-facilitating medicine with the nature of tonifying kidney and removing stasis.

Key Words kidney deficiency, blood stagnation/ lab animal model

下丘脑-垂体-卵巢轴功能失调所致卵泡发育及排卵障碍病症包括月经后期、月经过少、崩漏、闭经、不孕等,通过临床观察发现,该类患者在卵泡发育及排出障碍的同时,存在卵巢、子宫供血障碍及全身血液流变学的异常升高^[1],因此,有研究认为,该类病症的基本病机是肾虚血瘀,补肾化痰是其基本治法^[2]。本研究以癸息汤及孕激素 LNG 造成大鼠实验性肾虚血瘀状态,旨在为筛选补肾活血促卵泡发育及排卵的药物提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物:雌性 SD 大鼠 30 只,3~4 月龄,体重为 220~250g,由成都中医药大学实验动物中心提供,检疫合格。

1.2 实验动物环境:二级实验室,室温 22~25℃,湿度 45%~65%,日夜明暗交替照明 12/12h。适应性喂养 5 天。

1.3 实验药物:(1)左炔诺孕酮硅胶棒 (LNG),为 (97)卫药准字 X-181 号上海达华制药厂生产,批号:20001016。(2)癸息汤,成人日用量 4g(生药)/kg,制

剂由本校制剂教研室提供,批号:020509。

1.4 分组、给药方法:将 30 只大鼠分为 3 组。(1)正常组:10 只,每日 1 次灌服生理盐水 2ml/100g,连续 20 日。(2)LNG 组:10 只,按 37.5mg/100g 皮下埋置于大鼠颈背部,20 日后处死。(3)癸息汤组:10 只,给药剂量为临床用量的 20 倍,每日按 2ml/100g 体重灌胃给药 1 次,连续给药 20 天。

1.5 标本的采集与处理方法:(1)阴道上皮脱落细胞的采集、涂片、固定:无菌棉签蒸馏水浸湿后插入大鼠阴道,沾取分泌物在玻片上滚动,自然风干,放入乙醚酒精各半的固定液中固定 10min 后取出备用。(2)血的采集与处理:称取大鼠体重,股动脉放血约 5ml 放于有肝素的瓶中,摇匀,立即送至成都中医药大学附属医院测定血液流变学;约 3ml 置于干净试管中,放入 4℃ 冰箱 30min 后,以 3000 转/min 速度离心 5min,取上清液,用于测定血清 E_2 、P。(3)组织标本的采集与处理:大鼠分批处死后,立即取出卵巢用 AAF 液固定,用于病理切片。

1.6 实验仪器、试剂、监测指标与方法:(1)主要仪器、

试剂:日本 CK40 - F200OLYMPUS 倒置显微镜;医学图象分析仪 BI - 2000(成都泰盟电子有限公司生产);elecsys1010 电化学发光免疫分析仪(瑞士罗氏公司生产);E₂、P 试剂检测盒[E₂(批号:16150901)、P(批号:15909701)];R80A 全自动血液粘度仪(北京中勤世帝医疗器械有限公司生产)。(2)检测指标与方法:①一般观察:在随机分组后,观察各组大鼠给药前后毛发、行为、体征、体重等变化。②阴道脱落细胞检测:于给药 24h 后每日作阴道涂片 1 次,连续至处死当日。将固定好的玻片置于光学显微镜 40 倍镜下观察,计数细胞中角化细胞的个数,以角化细胞 > 50% 判定为雌激素阳性反应^[3]。在本实验中,连续 5 天无雌激素阳性反应定为性周期消失。③血液流变学检测指标:检测全血黏度、血浆黏度、红细胞压积、全血高切还原黏度、全血低切还原黏度、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、纤维蛋白原、全血高切相对黏度、全血低切相对黏度、红细胞变形指数。④血清 E₂、P 的检测:采用电化学发光免疫分析法测定血中 E₂、P 含量。使用双抗体夹心法,竞争法。操作规程按试剂盒说明书进行。⑤大鼠卵巢组织形态学:卵巢在 AAF 固定液中固定 48h 后取出,经常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚 4μm),作常规 HE 染色。在 OLYMPUS 倒置显微镜下计数卵巢各级卵泡、黄体数目。

1.7 资料统计与处理:所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件进行处理,定量指标用 One-Way ANOVA 方差分析,组间比较采用 LSD 及 SNK 分析。

2 实验结果

2.1 一般观察:癸息汤组大鼠出现被毛疏松、脱毛、活动量减少、便秘等虚损症状。其余两组大鼠发育正常,行动自如,被毛浓密有光泽,粪粒正常。

2.2 各组药物对大鼠发情周期的影响:结果显示 LNG 组大鼠给药后均出现性周期消失,癸息汤组部分出现性周期消失(资料略)。

2.3 药物对大鼠血液流变学的影响:结果提示,LNG 组、癸息汤组在全血黏度 200/s、30/s、5/s、1/s、纤维蛋白原、全血高切相对黏度,与正常组比较有显著性差异(P < 0.05)。LNG 组全血高切还原黏度、红细胞变形指数 TK 较正常组有显著性差异(P < 0.05)(资料略)。

2.4 药物对大鼠血清 E₂、P 水平的影响:由表 1 可看出,LNG 组、癸息汤组孕酮含量减少,与正常组有显著性差异(P < 0.05)。

2.5 药物对大鼠卵巢各级卵泡及黄体的影响:从表 2~3 中可以看出,LNG 组和癸息汤组窦前卵泡数较多,与正常组比较有显著性差异(P < 0.05),正常组闭

锁卵泡明显少于 LNG 组、癸息汤组,与之比较有显著性差异(P < 0.05),LNG 组、癸息汤组成熟卵泡数与正常组比较有显著性差异(P < 0.05),LNG 组黄体数明显少于正常组、癸息汤组,与之比较有极显著性差异(P < 0.01)。

表 1 各组大鼠 E₂、P 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	E ₂	P
正常组	10	29.07 ± 6.45	37.14 ± 18.34
LNG 组	10	22.72 ± 2.59	4.60 ± 1.38 *
癸息汤组	10	32.81 ± 11.03	7.57 ± 4.73 *

注: * 表示与正常组有显著性差异(P < 0.05)。

表 2 各组大鼠窦前、窦状、闭锁卵泡的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	窦前卵泡数	窦状卵泡数	闭锁卵泡数
正常组	10	18.12 ± 9.05	3.31 ± 3.45	4.46 ± 2.18
LNG 组	10	29.67 ± 6.15 *	4.83 ± 2.99	9.83 ± 3.76 *
癸息汤组	10	27.60 ± 11.46 *	5.36 ± 4.04	10.60 ± 4.27 *

注: * 表示与正常组有显著性差异(P < 0.05)。

表 3 各组大鼠成熟卵泡、黄体数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	成熟卵泡数	黄体数
正常组	10	1.92 ± 1.55	12.46 ± 3.28 Δ
LNG 组	10	6.50 ± 3.02 *	3.66 ± 3.14
癸息汤组	10	4.50 ± 2.41 *	9.50 ± 2.83 Δ

注: * 表示与正常组有显著性差异(P < 0.05); Δ 表示与 LNG 组有显著性差异(P < 0.01)。

3 讨论

避孕药由雌、孕激素或单纯孕激素组成,可通过抑制下丘脑-垂体-卵巢轴而抑制卵泡发育及排卵。为排除雌激素对凝血功能及卵泡发育的影响,本实验选用纯孕激素制剂避孕药 LNG 来造模。癸息汤由牵牛子等药物组成,功效息胞抑癸。在前期的实验中,我们发现癸息汤在部分抑制卵泡发育及排卵的同时,还可以引起血液流变学的异常升高。

对肾虚动物模型的判定包括肾虚的外在表现及与肾虚本质相关的异常。肾主骨,其华在发,肾中所藏天癸是促进生长、发育和生殖的基本物质,因此,符合肾虚病机的动物可出现下丘脑-垂体-肾上腺、下丘脑-垂体-甲状腺、下丘脑-垂体-性腺、代谢器官、免疫系统均出现功能紊乱和病理变化^[4],外在表现为被毛脱落,活动迟缓,畏寒喜暖,四肢不温,耐力、耐寒力降低,大便稀溏,肾主生殖的本质表现为卵巢卵泡数、黄体数减少,子宫腺体数量减少、内膜菲薄,促卵泡生成素、雌激素、孕激素分泌降低,交配生育力降低等。本实验发现,癸息汤模型大鼠出现被毛疏松、脱毛、活动量减少、便秘等虚损症状,而孕激素 LNG 模型未出

丹红注射液对实验动物抗凝抑栓作用的研究

付 樱* 何 娟* 卢 露*

(* 陕西步长集团科研部, 西安市高新路 50 号, 710075)

摘要 目的: 探讨丹红注射液治疗心脑血管疾病的作用机制。方法: 以血小板最大聚集率、环状动静脉血栓湿重、血栓形成抑制率、血液流变学等为指标, 观察其抗凝抑栓的作用。结果: 丹红注射液各剂量组均可显著降低家兔血小板聚集率, 改善急性血瘀模型大鼠血液流变学, 抑制家兔血栓形成, 减轻血栓湿重等作用。结论: 丹红注射液具有显著的抗凝抑栓作用。

关键词 丹红注射液/药理学

Study on Anticoagulation of Danhong Injection on Lab Animal

Fu Ying, He Juan, Lu Lu

(R&D of Shanxi Buchang Group, Xi'an 710075)

Abstract Objectives: to investigate the action mechanism of Danhong Injection on cardio-cerebral-vascular disease. **Method:** Anticoagulation effect of the Injection was investigated using parameters such as maximum platelet aggregation rate, wet weight of thrombus, inhibitive rate of cerebral thrombosis, and hemorheological parameters, etc. **Results:** Danhong Injection at all doses studied could significantly reduce rates of platelet aggregation in rabbits, improve hemorheology of rats of acute blood stasis, and inhibit cerebral thrombosis, and lower wet weight of thrombus. **Conclusion:** Danhong Injection has marked anticoagulative effect.

Key Words Danhong Injection/ Pharmacology

丹红注射液是根据中医药理论及多年临床经验, 通过大量实验研究研制开发的复方注射液, 由丹参及红花两味药材组成。其中丹参味苦性微寒, 为主药; 红花味辛性温, 为辅药。二药皆入心、肝经, 相辅相成生新, 除邪而不伤正。丹红注射液能滋补肝肾、活血祛瘀、安神宁心, 临床上主要用于治疗瘀血闭阻所致的冠心病、心绞痛、心肌梗塞, 瘀血型肺心病, 缺血性脑病、脑血栓等病症。本实验就丹红注射液对实验动物抗凝抑栓作用进行初步研究。

1 实验材料

1.1 受试药物: 倍通丹红注射液由济南步长制药有限

公司提供, 为淡红棕色的澄明液体, 批号: 20060415。

1.2 剂量设计: 以临床人日用量为基础, 人按 70kg 计算, 实验用剂量按动物与人公斤体重换算^[1], 中等剂量约相当于人临床等效剂量, 再按 1/2 和 2 倍临床剂量各设一个剂量组。即大鼠分别注射丹红注射液小剂量 (3.6g 生药/kg)、中剂量 (7.2g 生药/kg)、大剂量 (14.4g 生药/kg), 家兔分别注射丹红注射液小剂量 (1.85g 生药/kg)、中剂量 (3.7g 生药/kg)、大剂量 (7.4g 生药/kg)。

1.3 阳性对照药: 维脑路通注射液, 动物给药剂量按动物与人公斤体重换算^[1], 大鼠临床等效剂量为

现上述肾虚外在表现。孕激素 LNG 模型、癸息汤模型均表现为排卵抑制、孕激素降低。可见, 癸息汤模型符合肾虚外在表现及生育力降低, 孕激素 LNG 模型无肾虚外在表现, 但有生育力降低的本质表现。

血瘀证动物模型的判定包括血瘀证的相关脉证的重现, 如舌质青紫、瘀斑、出血等, 且能反映引起血瘀证的病因病机, 如寒邪、郁怒、气虚、血热、创伤等, 同时还应具备血瘀证所共有的病理生理改变, 如血液流变学异常、微循环障碍等。本实验结果显示, LNG 组、癸息汤组全血黏度值、纤维蛋白原、全血高切相对黏度值升高, 与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。此外, LNG 组全血高切还原黏度升高、红细胞变形指数 TK 值降低, 与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 表示其红细胞

万方数据

变形能力减弱。结果提示, 孕激素 LNG 模型、癸息汤模型符合血瘀证的病理生理改变。

综上所述, 孕激素及癸息汤所致排卵抑制动物模型可初步用于补肾活血促排卵方药的药效研究及疗效判定。

参考文献

- 1 陆华, 刘敏如, 李春梅. 养精汤促卵泡发育的临床观察. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(4): 217 ~ 220.
- 2 胡心伟. 卵泡发育及排卵障碍的肾虚血瘀动物模型研究. 成都中医药大学硕士学位论文, 2003.
- 3 李仪奎. 中药药理学实验方法学. 上海科学技术出版社, 1991: 226.
- 4 彭成. 氢化可的松肾虚动物模型的反思. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(2): 55 ~ 57.

(2007-07-18 收稿)