

- [5] DAI S, ZHANG M, CHENG W M, et al. Simultaneous determination of eight active components in chrysanthemum indicum by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(12): 1961-1965.
- [6] HUANG X W, FAN H J, CHEN C G, et al. Extraction and determination of linarin in *Chrysanthemum indicum* L. [J]. Chem Anal Meter(化学分析计量), 2010, 19(3): 39-44.
- [7] ZHANG J J, LV W W, WEN Y C, et al. Antimicrobial activity and HPLC fingerprint of flavonoids in *Flos chrysanthemi* indici [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2013, 40(6): 807-812.
- [8] YANG P P, CONG X D, CAI B C. Determination of curcumin-meglumine cocrystal by near-infrared spectroscopy rapidly [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(8): 991-994.
- [9] ZHANG Y, WU Y J, WU C Y, et al. Online monitor multi-component content of Danhong injection in the alcohol precipitation on process using near-infrared spectroscopy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(1): 67-72.

收稿日期: 2015-06-05

体位性低血压大鼠模型的建立及应用研究

李论^a, 朱柳^a, 袁牧^{a*}, 戴丽军^{b*} (广州医科大学, a.药物研究中心; b.实验动物中心, 广州 510182)

摘要: 目的 建立体位性低血压大鼠模型并进行初步应用。方法 从倾斜角度(30°, 45°, 75°, 90°)和倾斜时间(1, 2 min)两方面优化建立大鼠低血压模型的条件, 再用哌唑嗪(1.1~220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和萘哌地尔(30~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)多剂量给药, 探讨模型有效性和可靠性。结果 随着倾斜角度的增加, 大鼠的血压和心率变化幅度加大, 体位持续时间与血压、心率的变化没有明显的相关性。哌唑嗪剂量依赖性强化了体位性低血压, 对血压和心率都表现出明显的抑制作用; 萘哌地尔仅在3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量表现出对血压和心率的抑制效应。结论 45°头朝上位倾斜、持续时间 60 s 是建立体位性低血压大鼠模型的最适条件, 哌唑嗪和萘哌地尔检验的结果与文献报道一致, 证明了本模型有效、可靠。

关键词: 动物模型; 体位性低血压; 心血管; 不良反应; 哌唑嗪

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)12-1432-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.12.005

Establishment and Application of A Rat Model of Orthostatic Hypotension

LI Lun^a, ZHU Liu^a, YUAN Mu^{a*}, DAI Lijun^{b*} (Guangzhou Medical University, a. Drug Research Center; b. Laboratory Animal Center, Guangzhou 510182, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore establishment and preliminary application of a rat model of orthostatic hypotension. **METHODS** The rat model of orthostatic hypotension was optimized from angle of tilt(30°, 45°, 75°, 90°) and tilt time(1 min or 2 min). The validity and reliability of the model were observed by administrated with prazosin(1.1~220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and naphthalene(30~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). **RESULTS** With the increase of angle, variation amplitude of rats' blood pressure and heart rate all increased. The duration of position and the change of blood pressure and heart rate had no obvious correlation. Prazosin dose dependent strengthened orthostatic hypotension. Blood pressure and heart rate were obviously inhibited. Only 3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ naphthalene had inhibitory effect on blood pressure and heart rate. **CONCLUSION** 45° head-up tilt and 60 s is the optimum condition to establish a rat model of orthostatic hypotension; the results of administrating prazosin and naphthalene are consistent with the literature reports proving the validity and reliability of the model.

KEY WORDS: animal models; orthostatic hypotension; cardiovascular; adverse effects; prazosin

体位性低血压是从卧位到直立位转变过程中发生的血压急剧下降。站立时, 重力导致血液大量积聚在腿部的静脉容量血管中, 瞬时静脉回流减少, 健康个体位于主动脉弓和颈动脉窦的压力

感受器能引起交感神经反射, 迅速调节血压至正常^[1]。某些受体拮抗药物能抑制这种调节反应, 加剧体位性低血压, 从而限制其临床应用。建立体位性低血压动物模型验证具有 5-HT 受体、多巴胺

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013B060300023)

作者简介: 李论, 女, 硕士生 Tel: (0756)7830877 E-mail: 2532235915@qq.com *通信作者: 戴丽军, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (020)81340161 E-mail: lijundai@21cn.com 袁牧, 男, 硕士, 研究员, 教授 Tel: (020)37104150 E-mail: mryuanmu838@sina.com

受体、 α_1 -肾上腺素受体拮抗作用药物对体位性低血压的影响, 可对这些药物的临床应用提出指导性意见^[2], 相关研究多见于国外报道, 国内尚无相关报道。本实验在优化体位性低血压动物模型的基础上, 探讨 α_1 -肾上腺素受体拮抗剂哌唑嗪对动物自身血压调节反应的抑制效应。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量 200~250 g, 广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(粤)2013-0034。

1.2 仪器与试剂

ML870 Powerlab 8/30 八通道高速记录仪(ADInstruments OCTAL Bridge); ML228 八通道桥式放大器(ADInstruments MLT0380); 压力换能器(ADInstruments); 自制体位性低血压模拟倾斜装置。戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, 分析纯, 批号: Merck-Q/H8L-F158); 盐酸哌唑嗪(美国 Sigma 公司, 分析纯, 批号: 069k1303); 萘哌地尔(广州医科大学药研中心, 分析纯, 批号: 090916); 肝素钠粉末(万邦医药公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物麻醉及准备 正常大鼠用 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 水平仰卧位放置在恒温加热垫上(37.5°C), 左颈动脉插入充满肝素钠生理盐水的聚乙烯导管, 导管另一端连接压力换能器。压力传感器放置于心脏的水平位置。用胶布使动物连同恒温加热板固定在倾斜板上。倾斜实验之前动物需稳定至少 20 min。倾斜板是 1 个固定在金属基座上的 $20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 宽的塑料板。1 个小金属架被固定在板的底部, 通过旋转倾斜板至一定角度, 使动物在实验中维持倾斜状态。

1.3.2 体位性低血压动物模型建立 10 只大鼠, 雌雄各半, 分别以 30° , 45° , 75° , 90° 直立位进行倾斜测试, 角度的顺序随机选取, 每次倾斜持续 60 s 或 120 s, 每 2 次倾斜间隔 5 min; 每 4 个不同角度的倾斜测试视为 1 轮, 每轮间隔 15 min, 每只动物重复 3 轮测试。如果相同条件的倾斜测试缺乏可重复性, 或数次倾斜中没有观察到正常的血压反应则剔除该大鼠。

动脉压稳定后, 迅速旋转倾斜板至头朝上直立位至一定角度(1 s 内), 维持动物直立体位 60 s 或 120 s, 测定动脉压和心率, 然后回到水平位(1 s

内)。5 min 后, 换一个倾斜角度执行上述过程。

倾斜角度: 倾斜诱导的血压最低值小于水平位血压的 85%, 同时代偿血压反应大于水平位血压的 90%且能在较短时间内($<10 \text{ s}$)恢复, 同一角度倾斜测试的动脉压可重复性良好^[3]。

倾斜时间: 以直立体位导致的血压下降在倾斜过程的中后期回复到水平位的 90%为标准, 考虑到时间成本和异常体位对动物状态的不利影响, 在同样条件下选择较短的倾斜时间。

设定倾斜实验开始前的第 0 秒为倾斜前值, 余下时间点为倾斜后值。取倾斜测试的 0, 3, 5, 10, 30, 60, 90, 120 s 的平均动脉压(mean arterial blood pressure, MBP)或心率的实际测量值(倾斜前值-倾斜后值)。

1.3.3 哌唑嗪和萘哌地尔应用实验 大鼠随机分为哌唑嗪($1.1, 2.2, 22, 220 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)或萘哌地尔($30, 300, 3000 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)单剂量给药组和生理盐水组, 每组 6 只。麻醉动物右股静脉插入 Y 型静脉留置针(静脉给药)。动脉压稳定后进行给药前倾斜实验: 旋转倾斜板至 45° 头朝上位维持 60 s, 测定动脉压和心率, 5 min 后重复上述倾斜过程。如果 2 次倾斜不可重复, 或数次没有测得正常的血压反应, 剔除该大鼠。最后 1 次给药前倾斜测定数值为给药前值。倾斜 5 min 后给药, 10 min 后进行倾斜测试, 作为给药后值。

参照倾斜前的基线值(100%), 以平均动脉压对时间作图, 计算 0~60 s 的曲线下面积(AUC_{0-60})。药物在倾斜测试中的剂量效应为 $\Delta\text{AUC}_{0-60} = \text{AUC}_{0-60}(\text{给药前}) - \text{AUC}_{0-60}(\text{给药后})$ 。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism5.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用重复测量的双因素方差分析, 分别对生理盐水组的 5 次倾斜测试、哌唑嗪和萘哌地尔不同剂量组与给药前值进行比较, 如果两者有显著性差异, 进一步采用 Bonferroni's test 比较不同剂量在对应时间点的效应; 采用 Kruskal-Wallis 检验确定每个药物整体剂量水平相是否有差异, 再用 Dunn'test 比较每个剂量与生理盐水组(第 1 次倾斜)的差异; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倾斜时间和角度对血压的影响

随着倾斜角度的增大, 血压下降的程度随之

增加。体位变化诱导的血压在第 3 秒达到极值, 然后迅速回升。在时长 1 min 的测试中, 30°, 45°, 75°, 90°倾斜, 第 3 秒血压分别下降 (9.69 ± 2.28) , (15.75 ± 2.55) , (23.04 ± 3.41) , (23.85 ± 4.01) mmHg; 在 2 min 的测试中, 第 3 秒血压分别下降 (9.75 ± 1.82) , (16.89 ± 2.82) , (22.72 ± 5.56) , (23.68 ± 3.71) mmHg, 表明时长对血压的影响无差异。30°、45°、75°倾斜在第 10 秒, 90°倾斜在第 30 秒恢复到倾斜前血压的 90%; 30°倾斜最低血压大于倾斜前血压的 85%, 而 90°倾斜持续 30 s 后才恢复到水平位的 90%。45°, 75°测试血压都在合格范围内, 但是 75°测试在第 3 秒下降幅度较大, >22 mmHg, 第 5 秒仍>17 mmHg。在 60~120 s, 所有角度组的血压持续回升, 各角度之间的差异逐渐缩小。

伴随体位性低血压的发生, 心率代偿性上升。随着倾斜角度增大, 心率的反应性上升程度有小幅减少。在 60~120 s, 心率保持平稳或稍有下降。

综上所述, 45°为最适倾斜角度。由于 60 s 可以满足倾斜实验的观察要求, 因此选择 60 s 作为实验时间。

2.2 哌唑嗪对体位性低血压大鼠的影响

生理盐水组大鼠 5 次倾斜测试的血压和心率整体及各时间点的差异均无统计学意义。结果见图 1~2。

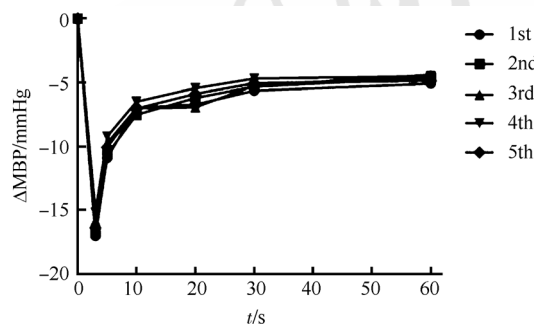


图 1 倾斜测试中生理盐水组大鼠的血压
Fig. 1 Blood pressure of rats of the normal saline in tilt test

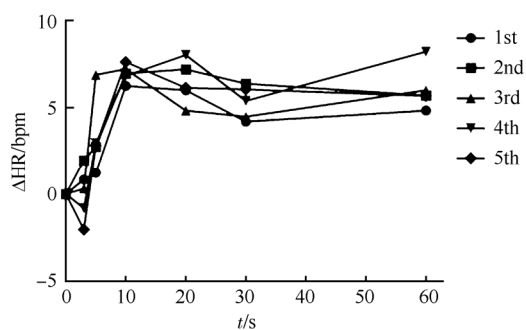


图 2 倾斜测试中生理盐水组大鼠的心率
Fig. 2 Heart rate of rats of the normal saline in tilt test

2.3 哌唑嗪对体位性低血压大鼠的影响

与给药前相比, 哌唑嗪 1.1, 2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 MBP 和心率整体各时间点均无显著差异, 22 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组在 5~60 s MBP 显著降低($P<0.01$), 在 10~60 s 心率显著降低($P<0.01$), 220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组在 3~60 s MBP 显著下降($P<0.05$ 或 0.01), 在 5~60 s 心率显著下降($P<0.01$), 结果见图 3~4。哌唑嗪 ΔAUC_{0-60} 随剂量升高而增加, 与生理盐水组 $[(8.86 \pm 26.45)\text{mmHg}]$ 相比, 1.1, 2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组[分别为 $(40.93 \pm 22.56)\text{mmHg}$, $(176.13 \pm 17.82)\text{mmHg}$] ΔAUC_{0-60} 无统计学差异; 22, 220 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组[分别为 $(370.62 \pm 17.48)\text{mmHg}$, $(499.38 \pm 36.41)\text{mmHg}$] ΔAUC_{0-60} 显著升高($P<0.01$)。

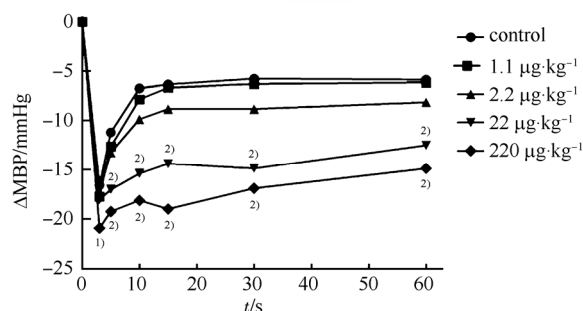


图 3 哌唑嗪对体位性低血压大鼠 MBP 的影响
与给药前相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of prazosin on the MBP of rats with orthostatic hypotension
Compared with before administrating, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

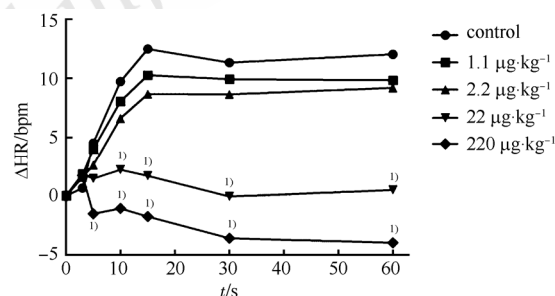


图 4 哌唑嗪对体位性低血压大鼠心率的影响
与给药前相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of prazosin on the heart rate of rats with orthostatic hypotension
Compared with before administrating, ¹⁾ $P<0.01$.

2.4 萘哌地尔对体位性低血压大鼠的影响

结果显示, 与给药前相比, 萘哌地尔 30, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组对 MBP 和心率的影响无统计学意义; 3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 MBP 第 10 秒显著降低($P<0.01$), 在第 20 秒和第 60 秒心率显著降低($P<0.05$ 或 0.01), 结果见图 5~6。与生理盐水组 $[(8.87 \pm 16.81)\text{mmHg}]$ 相比, 30, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组

[分别为 $(27.82 \pm 18.72)\text{mmHg}$, $(59.34 \pm 20.44)\text{mmHg}$] ΔAUC_{0-60} 无统计学差异, $3\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 $[(146.12 \pm 33.12)\text{mmHg}] \Delta\text{AUC}_{0-60}$ 显著升高($P < 0.05$)。

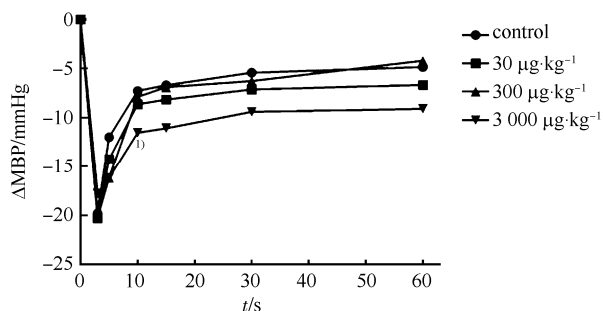


图5 萘哌地尔对体位性低血压大鼠 MBP 的影响与给药前相比, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Effects of naftopidil on the MBP of rats with orthostatic hypotension Compared with before administrating, ¹⁾ $P < 0.01$.

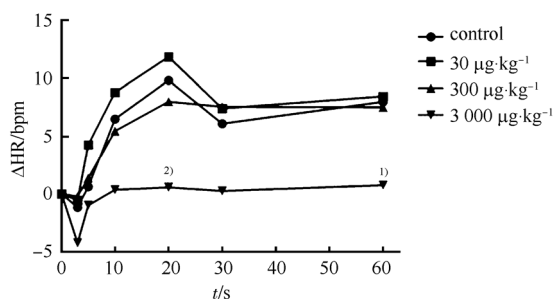


图6 萘哌地尔对体位性低血压大鼠心率的影响与给药前相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Effects of naftopidil on the heart rate of rats with orthostatic hypotension Compared with before administrating, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3 讨论

体位性低血压的影响因素众多^[4-7], 其中药物及用药剂量是临床最常见的影响因素, 如降血压药、镇静药、肾上腺素受体拮抗剂、血管扩张剂、降血糖药等, 一般多见于老年患者联合用药或大剂量用药^[8]。

动物模型被广泛应用于病理生理条件下交感神经反射敏感性变化的研究^[1]。本实验观察到, 头朝上倾斜导致血压下降, 而头朝下位倾斜使血压上升, 血压变化与重力作用对回心血量的影响有关, 这也是建立体位性低血压或高血压模型的生理学基础, 如 Raffai 等^[9]使用正常血压和先天性高血压大鼠, 通过头朝上位体改变建立了体位性高血压模型。使用麻醉或清醒状态的动物建模均有文献报道, 清醒动物更接近自然状态, 通常使用无线遥测设备对动物的心血管指标进行长时间记录^[10], 但遥测植入手术难度大, 动物恢复时间长,

对仪器设备要求高且数据变异大; 麻醉动物手术简便, 心血管指数重复性较好, 仪器设备简单, 被广泛采用。

麻醉程度与动物状态密切相关。动物必须完全麻醉, 否则将记录不到稳定的血压和心率, 可通过捏爪或观测心电指数判断麻醉是否充分。由于麻醉剂可不同程度地抑制血压, 麻醉过深的大鼠在血压降低后不能恢复到倾斜前水平, 导致实验失败。

文献报道了不同的直立位倾斜角度对血压的影响, 本实验比较了 45° , 75° , 90° 倾斜角度的效果, 并设置 1 个较小的角度(30°)作为对照, 结果表明, 血压下降幅度与角度相关。在本实验室条件下, 45° 倾斜能满足模型对血压变化的要求, 下降程度适中, 避免更大角度导致血压下降过多($>20\text{mmHg}$)而无法恢复。

倾斜时间是另一个需要考虑的变量。文献报道中麻醉状态下曾用 30, 60, 120 s 等, 经观察各角度倾斜的血压和心率在 60 s 内都可以恢复到倾斜前水平的 90%, 为避免异常体位长时间刺激动物导致其状态不稳定, 本研究选择 60 s。

哌唑嗪在 $22\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 完全强化了体位性低血压(包括对血压和心率的抑制), 并有剂量依赖性。 ΔAUC_{0-60} 从整体上反应了动脉压的变化, 哌唑嗪对直立性低血压的强化效应与文献^[2]描述一致, 表明建立的模型有良好的药物反应。萘哌地尔与哌唑嗪同为 α_1 -肾上腺受体拮抗剂, 由于哌唑嗪对 α_1 -肾上腺素受体亚型不具选择性, 而萘哌地尔对 $\alpha_{1A/1D}$ 有较好的选择性, 对体位性低血压模型应有不同的效应。萘哌地尔仅 $3\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量在一定程度上抑制了 MBP 和心率。萘哌地尔对心血管的选择性较小, 所以仅在高剂量组表现出潜在的致体位性低血压作用。

本研究介绍的动物模型技术较简单, 倾斜装置可自制, 便于在不同实验室复制应用。倾斜过程中麻醉大鼠产生的体位性低血压反应重复性良好, 还可进行多剂量累计给药。类似的实验方法成功用于检测可能与药物有关、伴随姿势改变而发生的心血管代偿机制、评价药物的治疗安全性, 为药物的临床应用提供依据。

REFERENCES

[1] GUILLAUME P, HERVÉ S, PICARD S, et al. Orthostatic

- Hypotension Induced by Postural Change in the Rat (Tilt Test) [M/OL]. Curr Protoc Pharmacol, 2008, 5.45.1-5.45.8 [2008-03-01]. <http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471141755.ph0545540>.
- [2] NOURIAN Z, MOW T, MUFTIC D, et al. Orthostatic hypotensive effect of antipsychotic drugs in Wistar rats by in vivo and in vitro studies of α_1 -adrenoceptor function [J]. Psychopharmacology(Berl), 2008, 199(1): 15-27.
 - [3] HUMPHREY S J, MCCALL R B. A rat model for predicting orthostatic hypotension during acute and chronic antihypertensive drug therapy [J]. J Pharmacol Methods, 1982, 7(1): 25-34.
 - [4] PHIPPS M S, SCHMID A A, KAPOOR J R, et al. Orthostatic hypotension among outpatients with ischemic stroke [J]. J Neurol Sci, 2012, 314(1/2): 62-65.
 - [5] LI H, KEM D C, REIM S, et al. Agonistic autoantibodies as vasodilators in orthostatic hypotension: a new mechanism [J]. Hypertension, 2012, 59(2): 402-408.
 - [6] ASO Y, WAKABAYASHI S, TERASAWA T, et al. Elevation of serum high molecular weight adiponectin in patients with Type 2 diabetes and orthostatic hypotension: association with arterial stiffness and hypercoagulability [J]. Diabet Med, 2012, 29(1): 80-87.
 - [7] ZENG Y FU, YAO L Y, ZHONG A J, et al. SGLT2 inhibitor canagliflozin: a new drug for the treatment of patients with Type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(9): 1154-1160.
 - [8] ZHANG Y T, FANG S Y, WANG Y. Progressin diagnosis and treatment of orthostatic hypertension and orthostatic hypotension [J]. Chin Gen Pract(中国全科医学), 2012, 15(9): 2982-2985.
 - [9] RAFFAI G, DÉZSIB L, MÉSZÁROS M, et al. Both sustained orthostasis and inverse-orthostasis may elicit hypertension in conscious rat [J]. 2006, 60(4/7): 415-419.
 - [10] RAFFAI G, MÉSZÁROS M, KOLLAI M, et al. Experimental orthostasis elicits sustained hypertension, which can be prevented by sympathetic blockade in the rat [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005, 45(4): 354-361.

收稿日期: 2015-07-06

本刊 2015 年度特邀审稿专家名单

本刊 2015 年特邀请以下医药专家 110 人(以审稿数量为主序, 同数量者以姓氏拼音为辅序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿, 并提出修改意见, 保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者, 在此表示衷心的感谢!

梁文权	苗明三	周 权	郑高利	许东航	何俏军	吴永江	谢升阳	杨明华	刘丽娟
方红梅	郑彩虹	王 梦	王书芳	杨 波	吕圭源	叶益萍	李功华	王泽民	赵瑞芝
朱全红	郭瑞臣	曾 苏	余露山	张信岳	陈金亮	周 萍	傅旭春	周长新	王 建
卢晓阳	瞿海斌	戴海斌	韩 峰	应美丹	詹金彪	杨伟峰	俞 佳	秦玉花	马忠俊
徐云根	孙德清	匡 荣	陶巧凤	吕良忠	王 珏	吴耀东	程国华	王胜浩	倪韶青
温 清	江 波	陈 悦	王志强	黄 真	王玮琴	陈碧莲	楼洪刚	盛炳义	陈枢青
刘 滔	王知坚	申屠建中	王向军	张志清	沈水杰	范晓辉	盛 荣	陈红梅	狄 斌
袁 洪	韩 旻	胡永洲	郭青龙	李焕德	阮邹荣	茹仁萍	葛卫红	张 健	杜 光
管凌燕	王金朝	郭建军	黄永焯	张 波	王长连	洪利娅	张幸国	金银秀	高建青
张如松	王溶溶	俞旭平	王选锭	赵梦丹	胡巧红	郑志昌	范灵灵	袁 弘	蒋惠娣
李范珠	陈志卫	马 珂	陆森泉	毛秀红	陈 孝	王志安	倪维芳	杨 劲	黄红兵