

## · 基础研究 ·

## 脾虚证高乳糖腹泻模型建立和评价

薛 红 王凤云 张 敏 石啸双 唐旭东

**摘要** **目的** 建立和评价慢性腹泻并符合脾虚证证候特点的病证结合动物模型。**方法** 40 只成年 Wistar 大鼠随机分为正常组(10 只)、高乳糖饲料喂养组(高乳糖组,10 只)、水环境小平台站立组(小平台组,10 只)、高乳糖饲料叠加小平台组(叠加组,10 只)。正常组使用正常标准饲料喂养,高乳糖组分别用 50%、60%、70% 递增高乳糖饲料喂养 3 周,小平台组是每天在水环境站立 9 h,叠加组是将高乳糖组与小平台站立两种处理因素叠加模拟乳糖不耐受慢性腹泻脾虚证模型,观察大鼠一般体征、粪便含水量,测定抓力及血 D-木糖水平。**结果** 与正常组比较,高乳糖组大鼠体重下降( $P<0.001$ ),进食量增加( $P<0.01$ ),大便含水量增加( $P<0.01$ ),抓力测定值降低( $P<0.05$ );小平台组体重下降( $P<0.001$ ),进食量减少( $P<0.05$ ),但无腹泻。叠加组大鼠体重下降( $P<0.001$ ),进食量减少( $P<0.05$ ),大便含水量增加( $P<0.01$ ),抓力测定值降低( $P<0.01$ ),肠胀气明显,D-木糖含量下降( $P<0.01$ )。叠加组较高乳糖组体重下降( $P<0.001$ )。小平台组较高乳糖和叠加组血清 D-木糖明显升高( $P<0.05$ )。**结论** 梯度增加高乳糖浓度喂养大鼠合并小平台站立可以成功建立乳糖不耐受慢性腹泻脾虚证模型。

**关键词** 乳糖不耐受;脾虚证;高乳糖腹泻;小平台;病证结合模型

**Establishment and Evaluation of High-lactose Diarrhea Model with Pi Deficiency Syndrome** XUE Hong, WANG Feng-yun, ZHANG Min, SHI Xiao-shuang, and TANG Xu-dong *Digestive Laboratory/Beijing Institute of Spleen and Stomach Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)*

**ABSTRACT** **Objective** To establish and evaluate chronic diarrhea rat model in line with Pi deficiency syndrome (PDS). **Methods** Forty male adult Wistar rats were randomly divided into four groups: the normal control group ( $n=10$ ), high lactose diet group ( $n=10$ ), small platform group ( $n=10$ ), high lactose diet plus small platform group (superimposed group,  $n=10$ ). Rats in the normal control group were fed with normal standard diet. Those in the high lactose group were fed with 50%, 60% and 70% increased lactose for 3 successive weeks. Rats in the small platform group stood in water environment for 9 h every day. And rats in the superimposed group were treated with two factors of high lactose group and small platform group (to simulate PDS model of lactose intolerance induced chronic diarrhea). General signs, fecal water content, grasp power, and D-xylose level were observed and determined. **Results** Compared with the normal control group, body weight was reduced ( $P<0.001$ ), food intake reduced ( $P<0.01$ ), fecal water content increased ( $P<0.01$ ), and grasping power decreased ( $P<0.05$ ) in rats of the high lactose group ( $P<0.05$ ). Body weight was reduced ( $P<0.001$ ) and food intake reduced ( $P<0.05$ ) in rats of the small platform group, but with no diarrhea. In rats of the superimposed group, body weight was reduced ( $P<0.001$ ), food intake reduced ( $P<0.05$ ), fecal water content increased ( $P<0.01$ ), and grasping power decreased ( $P<0.01$ ), the flatulence was obviously seen, and the D-xylose content decreased ( $P<0.01$ ). The body weight decreased more significantly in the superimposed group than in the high lactose diet group ( $P<0.001$ ). The level of D-xylose significantly increased in the small platform group ( $P<0.05$ ),

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81403393, 81973838, 81373580, 81673853, 81830118); 国家科技部重点研发计划 (No. 2016YFC1302203); 中国中医科学院重点项目 (No. ZZ10-020)

作者单位: 中国中医科学院西苑医院消化实验室/北京市中医脾胃病研究所 (北京 100091)

通讯作者: 唐旭东, Tel: 010-62835678, E-mail: txdl@sina.com.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200708. 322

as compared with the superimposed group and the high lactose group. **Conclusion** The model of high lactose induced-diarrhea with PDS could be successfully established by feeding high lactose diet with gradient increase concentrations plus standing on the small platform in water environment.

**KEYWORDS** lactose intolerance; Pi deficiency syndrome; high lactose induced diarrhea; small platform; animal model of combination of disease and syndrome

慢性腹泻是指排便次数增多(>3次/d),粪便稀薄(含水量>85%),粪便量增加(>200 g/d),且病程超过3周或者病程反复发作者,主要分为渗透性腹泻、分泌性腹泻、炎症性腹泻、动力性腹泻<sup>[1]</sup>。当人体乳糖酶缺乏或乳糖酶活性较低时,乳糖不能被小肠消化、吸收,直接进入大肠,产酸产气,出现腹痛、腹胀、腹泻、肠鸣等症状,称为乳糖不耐受(lactose intolerance, LI)<sup>[2-4]</sup>。随着乳制品大量摄入增加,乳糖吸收不良或者不耐受引起的慢性腹泻目前在我国发病呈逐渐增加趋势<sup>[4-6]</sup>。

慢性腹泻属于中医学“泄泻”范畴,认为是脾病湿盛,脾胃运化功能失调,肠道分清泌浊、传导功能失司。久泻多偏于虚证,由脾虚不运而生湿水谷不化所致<sup>[7]</sup>。建立并规范脾虚证高乳糖腹泻模型对于阐明脾虚证本质发挥重要作用。本研究在以往动物模型基础上<sup>[8]</sup>改良,旨在探索一种更好模拟临床慢性腹泻及符合中医脾虚证候特点的病证结合动物模型。采用依次递增乳糖浓度分别用50%、60%、70%高乳糖饲料喂养Wistar大鼠3周可以克服大鼠对乳糖引起腹泻的适应性,并叠加小平台站立模拟劳倦因素观察模型大鼠宏观表征和脾虚证指标。

## 材料与方法

1 动物 雄性无特殊病原微生物(specific pathogen free, SPF)Wistar成年大鼠40只,体重260~280 g,购于北京维通利华公司。常规饲料适应性喂养5天,40 W日光灯照射(08:00-20:00),室内温度(22±2)℃。动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。实验室合格证号:SYXK(京)2015-0011。本实验经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批(No. 2019XLC004-2)。

2 试剂及仪器 饲料基础配方和50%、60%和70%高乳糖饲料配方(表1),购自北京科奥协力公司。D-木糖购自Sigma(批号:X1500),D-木糖试剂盒购自美国Chondrex公司(批号:#6601)。水环境小平台站立箱(112 cm×62 cm×41 cm)箱体,设置了15个小平台,平台直径8 cm,高10 cm,平台周边注水,水深2 cm,水温保持(20±2)℃(自制)。高速冷冻离心机(美国Thermo公司),酶标仪(美国Biotek公司),YLS-13A大小鼠抓力测定仪(上海移数信息科技有限公司)。

表1 高乳糖饲料配方表

| 原料         | AIN-93G<br>标准配方 | 50%<br>高乳糖 | 60%<br>高乳糖 | 70%<br>高乳糖 |
|------------|-----------------|------------|------------|------------|
| 酪蛋白        | 4.0000          | 2.0000     | 2.0000     | 2.0000     |
| 胱氨酸        | 0.0600          | 0.0300     | 0.0300     | 0.0300     |
| 玉米淀粉       | 7.9500          | 1.2000     | 0.2000     | 0.0000     |
| 乳糖         | 0.0000          | 5.0000     | 6.0000     | 6.9950     |
| 麦芽糖糊精      | 3.0400          | 0.2950     | 0.2950     | 0.0000     |
| 蔗糖         | 2.0000          | 0.0000     | 0.0000     | 0.0000     |
| 纤维素        | 1.0000          | 0.5000     | 0.5000     | 0.0000     |
| 豆油         | 1.0000          | 0.5000     | 0.5000     | 0.5000     |
| 酒石酸氢胆碱     | 0.0500          | 0.0250     | 0.0250     | 0.0250     |
| AIN 矿物质混合物 | 0.7000          | 0.3500     | 0.3500     | 0.3500     |
| AIN 维生素混合物 | 0.2000          | 0.1000     | 0.1000     | 0.1000     |
| BHT        | 0.0028          | 0.0014     | 0.0014     | 0.0014     |

注:AIN为美国营养学会(American Institute of Nutrition);BHT:为二丁基羟基甲苯

3 分组和造模 按照随机数字表法将40只Wistar大鼠分为4组,分别为正常组、高乳糖饲料喂养组((高乳糖组)、水环境小平台站立组(小平台组)、高乳糖饲料叠加小平台组(叠加组),每组10只。正常组:基础配方饲料喂养;高乳糖组:分别递增给予50%、60%、70%高乳糖饲料喂养3周:第一周50%高乳糖,第二周60%高乳糖,第三周70%高乳糖;小平台组:基础配方饲料喂养每日22:00至次日7:00置入小平台站立箱<sup>[8]</sup>;叠加组(高乳糖饲料叠加小平台站立):分别递增给予50%、60%、70%高乳糖饲料喂养同时每日22:00至次日7:00置入小平台站立箱。均共为3周。

## 4 检测指标及方法

4.1 体重、进食量、饮水量及粪便含水量测定 每天观察动物毛发神态,每3天称量动物体重、进食量和饮水量。每周抽取5只大鼠做代谢笼检测记录粪便含水量。

4.2 抓力测定 每组大鼠进行抓力测定,每周测1次,连续测两次取平均值。

4.3 D-木糖含量测定 21天成模后给大鼠1 mL/100 g剂量灌服3% D-木糖溶液。2 h后给与合氯醛(10%, 0.4 mL/100 g)麻醉动物,腹主动脉取血,离心取血清,采用试剂盒测动脉血D-木糖含量。

4.4 粪便含水量 通过代谢笼收集大鼠湿便称重,收集2次/24 h,放入60℃烤箱中烘烤24 h干便

称重,含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

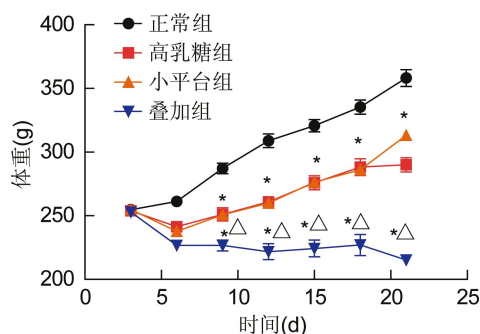
**4.5 脾虚证的判定标准** 参考 2017 年中华中医药学会脾胃病分会《脾虚证中医诊疗专家共识意见》<sup>[9]</sup> 中脾虚证诊断标准。动物模型高乳糖腹泻脾虚证判定:具备松软或者水样便,肠道胀气,出现体重增加缓慢或减轻,纳呆、少动、毛发干枯、抓力降低等症状。

**5 统计学方法** 应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计处理。数据以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示,用成组设计的两样本均数的  $t$  检验分析,或用成组设计的两样本以上的多样本单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 各组大鼠一般体征** 正常组大鼠毛发光泽,活动度良好,粪便呈颗粒固体状。给予高乳糖饲料喂养 24~48 h 后大鼠出现明显便溏,黄色水样稀便。小平台组在后期较正常组出现劳倦现象。叠加组大鼠毛发泛黄,光泽度下降;肛周出现污秽,活动状态明显较单独处理因素组减弱。高乳糖组及叠加组大鼠呈稀便和明显盲肠增大并胀气。3 周造模成功后,叠加组由于站立小平台时间过长过度疲倦并且合并腹泻导致有 4 只动物死亡。

**2 各组大鼠体重比较(图 1)** 正常组、小平台组和高乳糖组体重随时间逐渐增长,正常组增长幅度最大,较初始体重在第 9 天时体重明显增加。小平台组和高乳糖组,第 6 天时体重有所降低,之后开始明显升高但与同期正常组比较明显降低( $P < 0.001$ )。叠加组体重出现下降现象,后期才有缓慢增加但仍低于初始体重,与同期正常组和高乳糖组体重比较明显减少( $P < 0.001$ )。

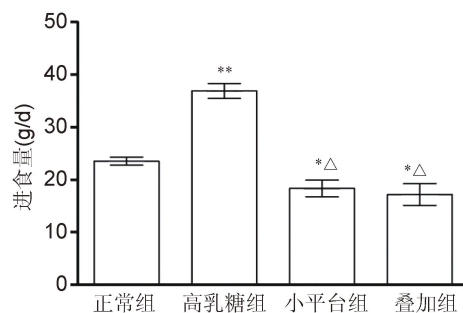


注:与正常组同期比较,\* $P < 0.001$ ;与高乳糖组比较, $\Delta P < 0.001$

图 1 各组大鼠体重比较

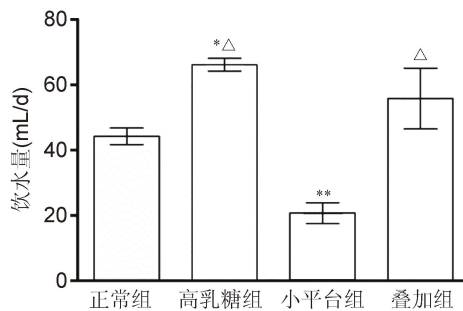
**3 各组大鼠平均日进食量、进水量比较(图 2、3)** 平均日进食量高乳糖组较正常组明显增加( $P < 0.01$ ),叠加组和小平台站立组较正常组减低( $P < 0.05$ )。与高乳糖组比较,小平台组和叠加组进食量显著减少

( $P < 0.001$ )。平均进水量高乳糖组较正常组增加( $P < 0.05$ ),小平台组较正常组减少( $P < 0.01$ ),叠加组进水量与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与小平台组比较,高乳糖组和叠加组进水量明显增加( $P < 0.001$ )。



注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;  
与高乳糖组比较, $\Delta P < 0.001$

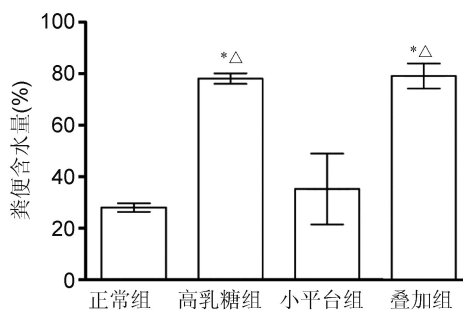
图 2 各组大鼠日平均进食量比较



注:与正常组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;  
与小平台组比较, $\Delta P < 0.001$

图 3 各组大鼠日平均饮水量比较

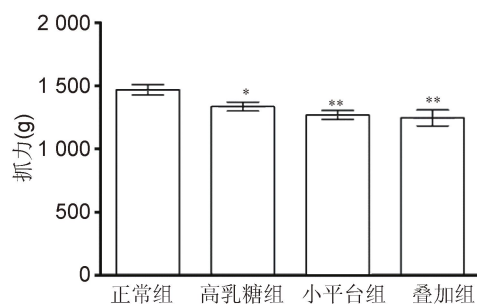
**4 各组大鼠粪便含水量比较(图 4)** 与正常组比较,高乳糖组和叠加组粪便含水量明显增加( $P < 0.01$ )。小平台组粪便含水量与正常组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与小平台组比高乳糖组和叠加组增加( $P < 0.05$ )。



注:与正常组比较,\* $P < 0.01$ ;与小平台组比较, $\Delta P < 0.05$

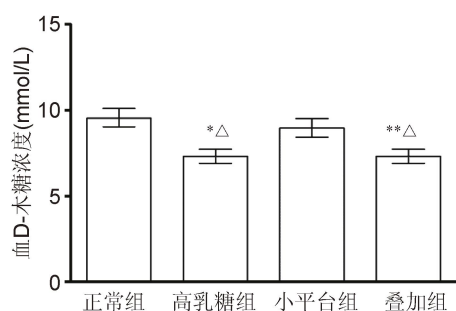
图 4 各组大鼠粪便含水量比较

5 各组大鼠抓力及血 D-木糖比较(图 5、6) 高乳糖组、小平台组及叠加组抓力较正常组降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。高乳糖组和叠加组动脉血中 D-木糖含量较正常组和小平台组明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )



注:与正常组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

图 5 各组大鼠抓力比较



注:与正常组比较, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ;

与小平台组比较, Δ  $P<0.05$

图 6 各组大鼠血 D-木糖含量比较

## 讨 论

中医学认为脾为后天之本,气血生化之源,运化水液和水谷精微敷布全身,化为精、气、血、津液,内养五脏六腑。脾运化失常表现为脾气虚,以脾失健运的症状为主,胃动力障碍出现浊气在上之腹胀、暖气等尚未出现器质性病变之功能性消化不良症状。化湿能力减弱、吸收能力降低出现清气在下之大便稀薄、甚至完谷不化尚未出现器质性病变之功能性腹泻症状。

乳糖不耐受在人群中具有较高的发生率,亚洲人群更高<sup>[5,6]</sup>。主要表现为腹泻、腹胀和腹痛,是引起慢性腹泻的主要因素之一。高乳糖腹泻动物模型模拟临床乳糖不耐受的症状,并且具有中医学脾虚泄泻的临床表现。小平台水环境站立使大鼠为避免落入水中,必须站立在小平台中不能休息造成劳倦伤脾。使用小平台站立叠加在慢性腹泻疾病中制作病证结合模型可以更好模拟中医脾虚证。

以往对脾虚证模型的研究多使用中医学病因结合西药药理方法复合因素造模。中医学病因如耗气破气法、苦寒泻下、饥饱失常法、过度劳累法<sup>[10]</sup>。以往多使用大黄或者番泻叶等药物导泻<sup>[10-12]</sup>。本课题组认为大黄或者番泻叶这些药物的毒副反应较大,为更好模拟脾虚证中的腹泻症状,本研究使用高乳糖饲料喂养大鼠,模拟临床上乳糖不耐受疾病并结合小平台站立造成劳倦使用复合因素造模可以更好的模拟临床脾虚证并且有效避免了药物的毒副反应。

本研究的动物模型是在前期研究的模型基础上进行改良<sup>[13]</sup>,由于大鼠对高乳糖饲料具有一定适应性<sup>[14]</sup>,为维持大鼠的持续腹泻使用梯度增加乳糖浓度,分别使用 50%、60%、70% 浓度乳糖喂养 21 天。结果显示水样稀便可以维持 3 周。叠加小平台后模型鼠呈现疲倦,毛发枯涩,体重明显下降。粪便含水量较单一浓度乳糖浓度明显增加。叠加组抓力较正常组明显降低,说明叠加组出现明显乏力症状。高乳糖组和叠加组较正常组进水量增加可能是由于腹泻导致体内失水导致饮水量增加,与文献结果类似<sup>[15]</sup>。小平台组饮水量较正常组明显降低可能由于大鼠在小平台水环境里自由饮水,无法测量。高乳糖组平均日进食量较正常明显增加可能由于使用 50%、60% 和 70% 的高浓度乳糖饲料,这种饲料较正常饲料和相对较低浓度如 30%~40% 乳糖饲料的质地较松软,不利于大鼠磨牙导致很多食物散落在外面,不易称量,因此在称量上会有一些误差。小平台组和叠加组较正常组进食量有所减少,符合脾虚证表现。D-木糖目前是诊断脾虚证的较特异的指标<sup>[16]</sup>,结果显示梯度增加高乳糖叠加小平台组的血 D-木糖降低,反映大鼠的吸收功能下降。

综合以上指标,梯度增加高乳糖浓度合并小平台站立通过复合因素造模较单独因素如高乳糖或者小平台造模症状更加明显,表现为大鼠精神萎靡,毛发枯槁,体重明显减低,进食和抓力明显减少,粪便含水量明显增多,血 D-木糖吸收明显减少,提示模型符合脾虚证的体征。因此可以作为脾虚证慢性腹泻病证结合的优选模型。

利益冲突:无。

## 参 考 文 献

- [1] 葛均波,徐永健主编.内科学[M].第8版.北京:人民卫生出版社,2013:402-405.
- [2] Deng YY, Misselwitz B, Dai N, et al. Lactose intoler-

- ance in adults: Biological mechanism and dietary management[J]. *Nutrients*, 2015, 7(9): 8020–8035.
- [3] Yang J, Fox M, Cong Y, et al. Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(3): 302–311.
- [4] Zhu Y, Zheng X, Cong Y, et al. Bloating and distention in irritable bowel syndrome: the role of gas production and visceral sensation after lactose ingestion in a population with lactase deficiency[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 8(9): 1516–1525.
- [5] Zheng X, Chu H, Cong Y, et al. Self-reported lactose intolerance in clinic patients with functional gastrointestinal symptoms: prevalence, risk factors, and impact on food choices[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27(8): 1138–1146.
- [6] Xiong L, Wang Y, Gong X, et al. Prevalence of lactose intolerance in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: data from a tertiary center in southern China[J]. *J Health Popul Nutr*, 2017, 36(1): 38.
- [7] 吕林, 唐旭东, 王凤云, 等. 胃动力障碍型功能性消化不良动物模型的建立[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(8): 944–949.
- [8] 康楠, 王凤云, 陈婷, 等. 脾虚四号方干预对功能性腹泻脾虚证模型大鼠肠上皮细胞微绒毛形态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17): 79–83.
- [9] 张声生, 胡玲, 李茹柳. 脾虚证中医诊疗专家共识意见(2017) *中医杂志*, 2017, 58(17): 1525–1530.
- [10] 蒋且英, 黄国勇, 孔小强, 等. 三种脾虚证建模方法建模效果的比较研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 28(11): 2780–2782.
- [11] 曲长江, 林庶如, 夏淑杰. 苦寒泻下两种脾虚模型的免疫学比较研究[J]. *辽宁中医杂志*, 1999, 26(3): 133–134.
- [12] 北京师范大学生物系消化生理教研组. 脾虚证动物模型的建立及其实质的探讨[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 1979, 1: 113.
- [13] 白世敬, 李峰, 唐旭东, 等. 功能性腹泻脾虚证动物模型制作方法[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(1): 86–88.
- [14] Lawrence JV, Fischer JE, Sutton TS, et al. Adaption of the rat to a high lactose diet: Effect of the size of the cecum[J]. *Ohio J Sci*, 1956, 56(2): 87–92.
- [15] Boakye PA, Brierley SM, Pasilis SP, et al. *Garcinia buchananii* bark extract is an effective anti-diarrheal remedy for lactose-induced diarrhea[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(2): 539–547.
- [16] 高洁, 韩冰冰, 韩旭, 等. 复合造模因素诱导脾虚水湿不化模型大鼠胃肠功能的改变[J]. *辽宁中医杂志*, 2014, 41(9): 1999–2000.
- (收稿: 2018–10–13 在线: 2020–09–17  
责任编辑: 李焕荣  
英文责编: 张晶晶)

## Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2019 年 SCI 影响因子为 1.545

2020 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2019 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.545。

*Chinese Journal of Integrative Medicine* 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2019 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!