

· 基础研究 ·

三种脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征大鼠模型的比较

刘 倩^{1,2} 韩博宇³ 苏晓兰² 魏 玮²

摘要 **目的** 构建并比较三种脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 大鼠模型的优劣。**方法** 72 只 SD 大鼠, 按随机数字表法分为模型 9 组: 母子分离 3 组 (予番泻叶灌胃 2、4、6 周)、直肠扩张 3 组 (予番泻叶灌胃 2、4、6 周)、避水应激 3 组 (予番泻叶灌胃 2、4、6 周); 正常组 3 组 (予蒸馏水灌胃 2、4、6 周)。共 12 组, 每组 6 只。分别在灌胃第 2、4、6 周评价大鼠的日进食量、日饮水量、粪便粒数、粪便 Bristol 评分、内脏敏感性、肛温、握力、负重游泳时间、血清 D-木糖、血清促肾上腺皮质激素 (ACTH)、血清肾上腺皮质酮 (CORT) 以及病理改变。**结果** 番泻叶灌胃 2 周后, 与正常组比较, 模型 9 组大鼠日饮水量增加、粪便粒数增加、Bristol 评分增高、血清 D-木糖降低 ($P<0.05$), 避水应激组大鼠握力降低 ($P<0.05$), 直肠扩张组大鼠 AWR 评分增高 ($P<0.05$); 番泻叶灌胃 4 周后, 与正常组比较, 模型 9 组大鼠日饮水量增加、粪便粒数增加、Bristol 评分增高、握力降低、血清 D-木糖降低 ($P<0.05$), 母子分离组及直肠扩张组大鼠负重游泳时间减少、AWR 评分升高、血清 CORT 降低 ($P<0.05$); 番泻叶灌胃 6 周后, 与正常组比较, 模型 9 组大鼠进食减少、饮水量增加、肛温降低、握力降低、负重游泳时间减少、粪便粒数增加、Bristol 评分升高、血清 D-木糖、ACTH 降低 ($P<0.05$); 母子分离组与直肠扩张组大鼠内脏敏感性增加、血清 CORT 降低 ($P<0.05$)。各组大鼠肠道黏膜病理组织学表现均未见明显异常。**结论** 番泻叶灌胃分别联合母子分离、避水应激、直肠扩张造模 6 周均可较好的建立脾肾阳虚证 IBS-D 大鼠模型, 直肠扩张合番泻叶灌及母子分离合番泻叶灌胃相对较好, 避水应激合番泻叶灌胃相对较差。

关键词 腹泻型肠易激综合征; 动物模型; 脾肾阳虚; 生物学基础

Comparison of Three Types of Diarrhea Predominant IBS Rat Model with Pi-Shen Yang Deficiency Syndrome LIU Qian^{1, 2}, HAN Bo-yu³, SU Xiao-lan², and WEI Wei² 1 Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Department of Gastroenterology, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100102); 3 Department of Gastroenterology, Beijing Longfu Hospital, Beijing (100010)

ABSTRACT Objective To construct and compare the advantages and disadvantages of three rat models of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) with Pi-Shen yang deficiency syndrome (PSYDS). **Methods** Totally 72 SD rats were randomly divided into 9 model groups [including mother-child separation combined with senna leaf gavage groups (2, 4, 6 weeks), rectal dilated combined with senna leaf gavage groups (2, 4, 6 weeks), water avoidance stress combined with senna leaf gavage groups (2, 4, 6 weeks)], and 3 normal groups (administered with distilled water at 2, 4, 6 weeks), 12 groups in total, 6 rats in each group. Feed intake, water intake, fecal particle number, fecal Bristol score, visceral sensitivity, anal temperature, grip strength, weight-bearing swimming time, serum D-xylosa, serum adrenocorticotrophic hormone (ACTH), serum corticosterone (CORT), and pathological changes were evaluated at week 2, 4, 6 of senna leaf gavage. **Results** After 2 weeks of intragastric gavage with senna leaf, as compared with the normal group, water intake increased, fecal particle number and fecal Bristol score increased, serum D-xylose level decreased in the nine

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81774066)

作者单位: 1. 北京中医药大学研究生院 (北京 100029); 2. 中国中医科学院望京医院脾胃病科 (北京 100102); 3. 北京市隆福医院消化内科 (北京 100010)

通讯作者: 魏 玮, Tel: 010-84739719, E-mail: sxxyy@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210625.175

model groups ($P<0.05$)。The grip strength decreased in water avoidance stress combined with senna leaf gavage group ($P<0.05$)。The AWR decreased in rectal dilated combined with senna leaf gavage group ($P<0.05$)。After 4 weeks of intragastric gavage with senna leaf, as compared with the normal group, water intake, fecal particle number, and fecal Bristol score increased, the grip strength and serum D-xylose level decreased in the 9 model groups ($P<0.05$)。The weight-bearing swimming time decreased, AWR score increased, and serum CORT level decreased in the mother-child separation combined with senna leaf gavage group and rectal dilated combined with senna leaf gavage group ($P<0.05$)。After 6 weeks of intragastric gavage with senna leaf, as compared with the normal group, food intake decreased, water intake increased, anal temperature decreased, grip strength decreased, load-bearing swimming time decreased, fecal particle number increased, Bristol score increased, serum levels of D-xylose and serum ACTH decreased the 9 model groups ($P<0.05$)。Visceral sensitivity increased and CORT level decreased in mother-child separation combined with senna leaf gavage group and rectal dilated combined with senna leaf gavage group ($P<0.05$)。There was no obvious abnormality in intestinal mucosa histopathological findings of rats in each group. **Conclusions** Mother-child separation combined with senna leaf gavage, rectal dilated combined with senna leaf gavage, water avoidance stress combined with senna leaf gavage for 6 weeks could all be used to establish the IBS-D rat model with PSYDS. Mother-child separation combined with senna leaf gavage and rectal dilated combined with senna leaf gavage were relatively better, while water avoidance stress combined with senna leaf gavage was relatively poorer.

KEYWORDS diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; animal model; Pi-Shen yang deficiency syndrome; biological basis

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是以腹泻、腹痛为症状基础, 以症状反复、病程漫长、无器质性病变、精神心理因素突出为特征, 为临床治疗常见病。中医药治疗 IBS-D 具有优势, 在开展中医病因、病机学研究, 探讨证候形成机制、演变规律, 评价中药方剂疗效、阐明其药理机制的研究中, 病证结合动物模型不可或缺, 但目前涉及中医证型的病证结合模型研究较少, 也缺乏相应的模型评价方法。本研究利用番泻叶灌胃模拟中医病因建立脾肾阳虚证候模型^[1], 同时叠加了公认的 IBS 造模方法 (母子分离、避水应激、直肠扩张), 构建并比较 IBS-D 的病证结合模型。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级 SD 乳鼠 12 窝, 每窝雄性乳鼠 6 只, 母鼠 12 只 [由北京斯贝福实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2016-0002]。饲养于中国中医科学院针灸研究所 SPF 级实验动物房, 予标准饲料和饮水, 室温 (23 ± 2) °C, 相对湿度为 (60 ± 5) %, 12 h 昼夜交替。本实验通过中国中医科学院针灸研究所伦理委员会审批 (No. D2021-03-16-4)。

2 主要试剂和仪器 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20140827)。福尔马林 (北京益利精细化学品有限公司, 批号: YZB/京 0099-

2011)。D-木糖 (河南万邦实业有限公司, 批号: 201706262517)。5810R 高速冷冻台式离心机 (德国 Eppendorf 公司)。电子体温计 (Omron 公司, 型号: MC-342FL)。大、小鼠抓力测定仪 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: YLS-13A)。电子显微镜 (Olympus, U-Tv0.5xC.24H01726)。自制结直肠测压计: 将台式血压计的束缚带拆除, 将灌胃针针尾固定在橡胶管的一侧, 截取长约 5 cm 的橡胶手套套在灌胃针上作为气囊, 用手术线扎牢, 最后用三通管将其连接, 并确保充气后水银柱不下降。

3 药物制备 番泻叶颗粒 (四川新绿色药业科技发展有限公司, 批号: 15060209), 制成折合生药浓度为 1.0 g/mL 的番泻叶水溶液。

4 分组及造模

4.1 分组 SD 大鼠 72 只。按随机数字表法分为模型 9 组: 母子分离 (M) 3 组 (分别予番泻叶灌胃 2、4、6 周, 为 M2、M4、M6 组); 直肠扩张 (K) 3 组 (予番泻叶灌胃 2、4、6 周, 为 K2、K4、K6 组); 避水应激 (B) 3 组 (予番泻叶灌胃 2、4、6 周, 为 B2、B4、B6 组)。以及正常组 (N) 3 组 (分别予蒸馏水灌胃 2、4、6 周, 为 N2、N4、N6 组)。共 12 组, 每组 6 只。

4.2 造模方法

4.2.1 母子分离 乳鼠自出生第 2 天起, 每天上午 9:00–12:00 与母鼠分离 3 h, 连续 3 周, 其余各组不

予干预, 3 周后断奶, 予常规自由饮食。第 5 周起番泻叶灌胃 10 mL/(kg·d)。

4.2.2 避水应激 正常饲养至第 5 周, 第 5 周起番泻叶灌胃 10 mL/(kg·d)。并进行避水应激: 取一透明玻璃水槽内 (55 cm×35 cm×35 cm), 中央有一岛样小平台 (10 cm×8 cm×8 cm), 水槽内注满水, 距平台面下 1 cm, 每天上午 9:00–11:00 将造模大鼠置于平台上, 每天 1 h, 连续 10 天。

4.2.3 直肠扩张 正常饲养至第 5 周, 第 5 周起番泻叶灌胃 10 mL/(kg·d)。并进行直肠扩张: 每次直肠扩张前先轻触大鼠肛门部, 使其排尽大便后, 将自制的球囊涂抹石蜡油后塞入肛门约 7 cm 在肛门外 1 cm 处用医用胶带将其固定在大鼠尾根部, 然后将大鼠置于 18 cm×8 cm×6 cm 的特制小笼中, 使其不得转头; 待其完全平静后以 80 mmHg 压力间断刺激结直肠部 5 min, 每天 2 次, 连续 2 周。

5 模型评价指标

5.1 一般状况 观察大鼠皮毛变化、肛周情况、活动度和精神状态等情况。

5.2 体重 每周固定时间对各组大鼠进行称重, 观察体重变化情况。

5.3 进食量及饮水量测定 每组大鼠的日进食量和饮水量。实验前对饲养笼、水瓶进行检查, 确保无漏料、漏水。每天固定时间开始, 添加定量的饲料 (500 g) 和水量 (500 mL), 24 h 后测定剩余的饲料和水量。日平均进食量 (g) = (加料量 - 剩余量) / 每组鼠数。日平均饮水量 (mL) = (加水量 - 剩余量) / 每组鼠数。

5.4 肛温 分别于番泻叶灌胃的第 0、2、4、6 周上午 9:30 对各组大鼠进行肛温测定。测定前轻触大鼠肛门部, 使其排尽粪便, 一人轻轻固定大鼠, 一人将涂抹石蜡油的体温计轻轻插入肛门约 6 cm, 手法轻柔, 确保大鼠情绪稳定。插入后等待 3~5 min, 以读数不再升高为准, 读得电子体温计的读数。

5.5 握力试验 于造模第 0、2、4、6 周以 YLS-13A 大、小鼠抓力测定仪测定各组大鼠握力, 每只重复 3 次, 间隔 10 min, 取平均值。

5.6 负重游泳试验 于造模第 0、2、4、6 周测定负重游泳时间。将大鼠体重 10% 的铅块用细绳固定其尾根部, 然后将大鼠置于充满水的水箱内 [60 cm×30 cm×40 cm, (25±2)℃], 使其足不能触碰箱底, 观察并记录其游泳至力竭的时间。力竭标准为整个身体沉入水面持续 8 s 不能上浮。

5.7 排便频次及性状 各组大鼠在灌服番泻叶的

第 0、2、4、6 周后观察排便频次及性状。将大鼠放在垫有滤纸的鼠笼内, 记录 4 h 内大鼠的排便粒数, 并以 Bristol 分级量表^[2] (Bristol stools scale, Bristol 分型) 对粪便性状进行分级。

5.8 内脏高敏感评价 腹壁撤退反射 (abdominal withdraw reflex, AWR): 于每次取材前采用自制结直肠测压计, 对各组大鼠分别进行内脏敏感性评价。测试前, 大鼠禁食不禁水 18 h。轻触大鼠肛门部使其排尽大便, 然后将涂抹石蜡油后的球囊塞入肛门约 7 cm, 在肛门外 1 cm 处用医用胶带将其固定在大鼠尾根部, 然后将大鼠置于 18 cm×8 cm×6 cm 的特制小笼中, 使其不得转头。待其完全平静后慢慢向气囊内充气, 观察大鼠腹壁对肠腔球囊扩张刺激的反应。分别采用 20、40、60 和 80 mmHg 个压力, 每次扩张持续 20 s, 每个压力连续测 3 次, 间隔 4 min, 取 3 次评分均值。AWR 评分标准^[3]: 0 分, 给予结直肠扩张刺激大鼠情绪基本稳定; 1 分, 给予刺激时变得不稳定, 偶尔扭动头部; 2 分, 腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面; 3 分, 腹背部肌肉较强烈收缩并把腹部抬离地面; 4 分, 腹部肌肉强烈收缩, 腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面。

5.9 血清 D-木糖、肾上腺皮质激素、皮质酮含量 采用间苯三酚法测定血清 D-木糖, 按照说明书标准操作。大鼠血清肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、血清皮质酮 (corticosterone, CORT) 含量采用 ELISA 法检测。

5.10 肠道黏膜病理组织学表现 观察各组造模结束后, 截取距肛门约 10 cm 处的结肠段 3 cm, 用生理盐水将血迹和杂质冲洗干净, 放入 10% 的中性福尔马林溶液中固定, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 常规切片 (5 μm), 经苏木素-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 观察其病理变化。

6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计分析软件进行分析。计量资料首先进行正态性检验, 采取 Shapiro-Wilk 检验; 采用 Levene 检验进行方差齐性检验。符合正态和方差齐的计量资料用单因素方差分析; 使用 F 检验比较总体均值, 用 SNK 检验进行组间两两比较; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠形态学表现 实验期间, 大鼠无死亡。正常组大鼠反应灵敏, 精神状态佳, 活动性良好, 毛发整齐有光泽, 粪便呈颗粒状。造模组给予番泻叶灌胃 2~3 天开始出现腹泻, 但无血便。随着造模时间

的延长,大鼠显萎靡,活动减少,出现倦怠蜷卧、扎堆、贴边、拱背等表现,被毛较松散,毛色偏黄少光泽,胡须下垂,体重下降,进食量下降,但饮水增多明显,并可见稀便和(或)肛周体毛被稀便沾染。

2 各组大鼠体重比较(表1) N6组体重平稳上升,其余各组体重增加幅度较小。同时期各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 各组大鼠日进食量、日饮水量、肛温比较(表2) 番泻叶灌胃2周及4周后,各组大鼠日进食量差异无统计学意义($P>0.05$)。番泻叶灌胃6周,各模型组与N6组比较,日进食量均减少($P<0.05$),K6组进食量最少,其次为B6组和M6组,但三组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

番泻叶灌胃前,各组间饮水量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃2周后,各模型组与N6组比较,日饮水量均增加($P<0.05$)。灌胃6周后,M6组组饮水量最多($P<0.05$)。

番泻叶灌胃2周及4周后,各组大鼠肛温差异无统计学意义($P>0.05$)。番泻叶灌胃6周,各组肛温低于Z6组($P<0.05$)。K6组肛温最低,其次为M6组和B6组,但三组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组大鼠握力、负重游泳时间、粪便粒数、粪便 Bristol 评分比较(表3) 番泻叶灌胃2周,B6组间握力低于Z6($P<0.05$)。灌胃4周和6周,各组握力明显低于N6组($P<0.05$)。灌胃2周,各组负重游泳时间差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃4周和6周,各模型组负重游泳明显低于Z6组($P<0.05$)。灌胃6周,K6组时间最短,其次为M6组和B6组,但三组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃2、4、6周,各模型组粪便粒数明显高于Z6组($P<0.05$)。灌胃6周后,M6组粪便粒数最多,其次为K6组和B6组,三组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃2、4、6周,各模型组粪便 Bristol 评分明显高于Z6组($P<0.05$),灌胃6周,K6组积分最高,其次为M6组和B6组,三组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

5 各组大鼠 AWR 评分比较(表4) 灌胃2周,K6组在60 mmHg 和 80 mmHg 压力值下 AWR

表2 各组大鼠日进食量、日饮水量、肛温比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	灌胃时间	n	日进食量(g)	日饮水量(ml)	肛温(℃)
M6	0周	6	14.50 ± 2.07	19.17 ± 1.47	37.99 ± 0.12
	2周	6	19.17 ± 1.47	32.83 ± 1.47* [△]	38.11 ± 0.45
	4周	6	24.83 ± 2.04	47.17 ± 1.47*	37.99 ± 0.41
	6周	6	24.83 ± 1.47*	61.67 ± 2.07* [△]	37.61 ± 0.53*
B6	0周	6	14.33 ± 1.97	17.83 ± 1.94	38.00 ± 0.20
	2周	6	20.50 ± 1.87	33.50 ± 1.87*	37.93 ± 0.28
	4周	6	23.17 ± 2.14	45.50 ± 2.07*	37.8 ± 0.29
	6周	6	24.67 ± 1.03*	56.17 ± 1.47*	37.72 ± 0.74*
K6	0周	6	15.17 ± 2.93	19.33 ± 1.37	38.00 ± 0.26
	2周	6	22.00 ± 2.53	37.33 ± 2.16* [△]	38.32 ± 0.21
	4周	6	23.00 ± 1.41	45.00 ± 1.79*	37.91 ± 0.42
	6周	6	23.67 ± 1.86*	52.83 ± 1.17* [△]	37.43 ± 0.52*
N6	0周	6	14.67 ± 1.37	19.00 ± 1.79	37.94 ± 0.36
	2周	6	21.33 ± 2.80	30.50 ± 1.05	38.16 ± 0.48
	4周	6	25.33 ± 2.16	39.50 ± 1.87	38.42 ± 0.33
	6周	6	27.33 ± 1.75	38.17 ± 1.72	38.80 ± 0.49

注:与同期N6组比较,* $P<0.05$;与同期M6组比较,[△] $P<0.05$;与同期K6组比较,[▲] $P<0.05$

评分明显高于正常组($P<0.05$);灌胃4周,K6组及M6组在60 mmHg 和 80 mmHg 压力值下 AWR 评分明显高于正常组($P<0.05$);灌胃6周,K6组在60 mmHg 和 80 mmHg 压力值下 AWR 评分明显高于正常组($P<0.05$),M6组在80 mmHg 压力值下 AWR 评分明显高于正常组($P<0.05$)。同时期同压力值下各模型组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

6 各组大鼠血清 D- 木糖、血清 CORT、血清 ACTH 比较(表5) 番泻叶灌胃2、4、6周,各组大鼠血清 D- 木糖均低于同时期正常组($P<0.05$),灌胃6周,K6组血清 D- 木糖最低,其次为M6组和B6组,3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。番泻叶灌胃2周,各组间血清 CORT 含量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃4周,K4组和M4组血清 CORT 明显低于Z4组和B4组($P<0.05$),灌胃6周,K6组和M6组血清 CORT 明显低于正常组($P<0.05$),番泻叶灌胃2周及4周,各组间血清 ACTH 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。灌胃6周,各模型组血清 ACTH 明显低于Z6组($P<0.05$),各

表1 各组大鼠体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	灌胃0周	灌胃1周	灌胃2周	灌胃3周	灌胃4周	灌胃5周	灌胃6周
M6	6	82.00 ± 5.66	146.50 ± 20.20	180.17 ± 17.96	258.67 ± 31.61	289.67 ± 17.75	314.17 ± 21.28	355.67 ± 18.47
B6	6	84.33 ± 7.20	153.67 ± 23.16	192.33 ± 26.01	279.00 ± 34.90	308.33 ± 25.79	343.83 ± 26.00	381.33 ± 26.72
K6	6	80.33 ± 6.92	152.83 ± 12.07	198.67 ± 22.51	268.00 ± 24.67	293.33 ± 28.10	319.00 ± 37.00	358.83 ± 32.72
N6	6	83.83 ± 8.86	150.83 ± 15.93	200.83 ± 17.14	266.50 ± 20.00	322.17 ± 17.98	366.50 ± 31.30	418.50 ± 39.85

表 3 各组大鼠握力、负重游泳时间、粪便粒数、粪便 Bristol 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	灌胃时间	n	握力 (g)	负重游泳时间 (s)	粪便粒数 (粒)	粪便 Bristol 评分 (分)
M6	0 周	6	511.17 ± 43.89	131.50 ± 51.29	6.83 ± 1.47	3.50 ± 0.45
	2 周	6	665.28 ± 77.36	167.17 ± 60.91	6.67 ± 1.63*	5.16 ± 0.74*
	4 周	6	921.17 ± 84.34*	169.50 ± 17.39*	9.83 ± 1.72*	5.25 ± 0.36*
	6 周	6	1 425.78 ± 84.05*	165.83 ± 54.6*	7.00 ± 1.26*	5.56 ± 0.36*
B6	0 周	6	522.94 ± 45.51	145.33 ± 50.47	5.33 ± 1.21	3.82 ± 0.42
	2 周	6	627.80 ± 26.14*	172.80 ± 75.48	7.17 ± 1.47*	5.11 ± 0.61*
	4 周	6	948.95 ± 64.37*	196.17 ± 42.36	7.83 ± 1.72*	5.01 ± 0.45*
	6 周	6	1 594.28 ± 141.44* [△]	176.83 ± 50.8*	6.67 ± 1.21*	5.30 ± 0.37*
K6	0 周	6	505.11 ± 35.45	167.33 ± 69.99	5.17 ± 1.47	3.87 ± 0.46
	2 周	6	676.06 ± 110.56	123.33 ± 41.78	8.00 ± 1.79*	4.84 ± 0.53*
	4 周	6	877.39 ± 48.74*	175.17 ± 17.75*	8.67 ± 1.75*	5.19 ± 0.39*
	6 周	6	1 254.67 ± 176.67* [△]	159.17 ± 41.46*	6.83 ± 1.17*	5.64 ± 0.30*
N6	0 周	6	491.83 ± 16.35	144.83 ± 58.48	6.17 ± 1.17	3.80 ± 0.65
	2 周	6	710.73 ± 58.62	206.33 ± 70.79	4.50 ± 1.38	3.89 ± 0.81
	4 周	6	1115.39 ± 107.86	223.00 ± 41.81	4.17 ± 1.17	3.55 ± 0.34
	6 周	6	1 755.89 ± 64.34	242.67 ± 33.75	2.17 ± 0.75	3.33 ± 0.98

注: 与同期 N6 组比较, * $P < 0.05$; 与同期 B6 组比较, [△] $P < 0.05$; 与同期 K6 组比较, [△] $P < 0.05$ 表 4 各组大鼠 AWR 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	灌胃时间	n	压力			
			20 mmHg	40 mmHg	60 mmHg	80 mmHg
M6	0 周	6	0.33 ± 0.52	1.17 ± 0.75	1.67 ± 1.03	2.00 ± 0.89
	2 周	6	1.00 ± 0.89	2.00 ± 0.63	2.83 ± 0.75	3.33 ± 0.52
	4 周	6	0.67 ± 0.52	2.17 ± 0.98	3.00 ± 0.63*	3.50 ± 0.55*
	6 周	6	1.00 ± 0.63	1.67 ± 0.52	2.83 ± 0.75	3.50 ± 0.55*
B6	0 周	6	0.17 ± 0.41	0.83 ± 0.75	1.33 ± 0.82	1.83 ± 0.98
	2 周	6	0.50 ± 0.84	1.67 ± 0.82	2.50 ± 0.84	2.83 ± 0.75
	4 周	6	0.83 ± 0.41	1.67 ± 0.82	2.83 ± 0.41	3.33 ± 0.52
	6 周	6	0.67 ± 0.82	1.83 ± 0.75	2.50 ± 0.55	2.67 ± 0.52
K6	0 周	6	0.17 ± 0.41	0.67 ± 0.52	1.50 ± 0.55	1.83 ± 0.75
	2 周	6	1.33 ± 0.82	2.33 ± 0.82	3.00 ± 0.89*	3.50 ± 0.55*
	4 周	6	1.17 ± 0.41	2.67 ± 0.82	3.50 ± 0.84*	3.50 ± 0.55*
	6 周	6	1.50 ± 0.55	2.33 ± 0.82	3.17 ± 0.75*	3.33 ± 0.82*
N6	0 周	6	0.33 ± 0.52	0.83 ± 0.75	1.33 ± 0.82	1.83 ± 0.75
	2 周	6	0.67 ± 0.82	1.33 ± 0.52	1.50 ± 0.55	2.17 ± 0.75
	4 周	6	0.33 ± 0.52	0.67 ± 0.52	0.83 ± 0.75	1.50 ± 0.84
	6 周	6	0.33 ± 0.52	0.83 ± 0.75	1.17 ± 1.17	1.50 ± 1.05

注: 与同期 N6 组比较, * $P < 0.05$ 模型组间无明显差异 ($P > 0.05$)。

7 肠道黏膜病理组织学表现观察 (图 1) HE 染色显示, 各组大鼠结肠黏膜完整, 上皮细胞形态一致且排列整齐, 未见溃疡、糜烂等改变。有轻度的炎性细胞浸润 (如箭头所示), 余未见异常。

讨 论

动物模型的建立应当尽可能再现疾病状态, 可

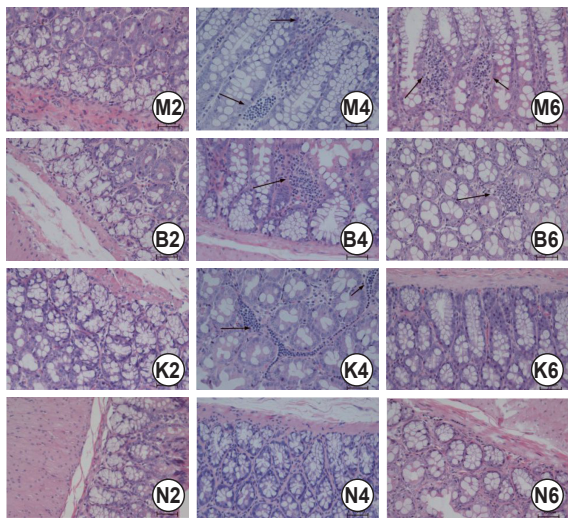
靠的动物模型是后续试验质量的重要保证。临床中, 无论是患者的证候分析, 还是以温肾健脾法以方测证, 均证实了脾肾阳虚在 IBS-D 病机中的重要地位^[4-6]。因此本研究中动物模型的建立, 综合考虑了证型和疾病的特点, 采用番泻叶灌胃法联合慢性应激建立脾肾阳虚证 IBS-D 模型。

IBS-D 的动物模型主要有两大特征, 即腹泻和内脏高敏感, 目前国际上比较认可的造模方法有母婴分

表 5 各组大鼠血清 D- 木糖、血清 CORT、血清 ACTH 比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	D- 木糖 (mmol/L)	CORT (ng/mL)	ACTH (pg/mL)
M2	6	0.77 ± 1.75*	38.26 ± 10.62	10.40 ± 4.72
B2	6	0.85 ± 0.22*	32.04 ± 9.23	11.77 ± 5.75
K2	6	0.70 ± 0.17*	37.83 ± 11.76	10.36 ± 6.07
N2	6	1.52 ± 0.30	51.74 ± 27.00	16.53 ± 4.01
M4	6	0.69 ± 0.15*	133.30 ± 42.13* [△]	28.15 ± 10.44
B4	6	0.77 ± 0.14*	194.34 ± 54.54 ^{△○}	29.73 ± 16.78
K4	6	0.59 ± 0.18*	125.46 ± 47.55* [△]	22.94 ± 7.03
N4	6	1.96 ± 0.25	204.19 ± 52.20	48.79 ± 23.06
M6	6	0.59 ± 0.08*	125.95 ± 36.03*	23.32 ± 7.17*
B6	6	0.64 ± 0.07*	143.41 ± 26.69	27.20 ± 10.13*
K6	6	0.51 ± 0.10*	104.23 ± 22.50*	20.33 ± 9.30*
N6	6	1.84 ± 0.16	180.06 ± 68.56	58.02 ± 22.42

注: 与同期 N 组比较, * $P < 0.05$; 与同期 M 组比较, [△] $P < 0.05$; 与同期 B 组比较, [△] $P < 0.05$; 与同期 K 组比较, [○] $P < 0.05$



注: 箭头示轻度炎性细胞浸润

图 1 各组大鼠肠道黏膜病理组织学表现 (HE, ×400)

离^[7]、直肠扩张刺激^[3]、避水应激^[8]等,其中母婴分离法和直肠扩张刺激较好的模拟了早期负面生活事件产生的心理应激,形成内脏高敏感^[7, 9],避水应激法缩短了造模时间,且内脏高敏稳定而持久^[8]。对于腹泻,国内常采用番泻叶灌胃进行诱导^[1]。番泻叶苦寒泻下,长期灌胃可达到泄泻日久、迁延不愈、脾虚及肾的目的。

大鼠模型的评价主要基于以下几个方面。(1)对于腹泻的评价,番泻叶灌胃 2~3 天即可出现腹泻,灌胃 2 周即可很好的复制出腹泻模型。(2)通过 AWR 评分对大鼠内脏高敏感进行评价,发现番泻叶灌胃 6 周后, M6 组和 K6 组都能较好的复制内脏高敏感 ($P < 0.05$),而 B6 组大鼠 AWR 评分增加不明显

($P > 0.05$)。(3)行为学指标中,以体重变化、日进食量、饮水量衡量脾阳虚运化失司、纳差情况^[10];以肛温反应肾阳虚畏寒情况^[11];以握力、负重游泳反应脾肾阳虚倦怠乏力情况^[12]。灌胃 6 周后,与 Z6 组比较,各模型组除体重外差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此各模型组均可较好的复制脾肾阳虚证型。(4)生物标志物检测中,以血清 D- 木糖含量衡量肠道吸收功能^[13];反应脾阳虚运化失健;以 ACTH、CORT 反应肾阳虚情况^[14]。本研究发现番泻叶灌胃 6 周后, M6 组和 K6 组与 Z6 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而 B6 组 CORT 降低无统计学意义。(5)各组大鼠肠道黏膜病理组织学表现均未见明显异常。

本研究使用的 3 种造模方法均可较好的建立脾肾阳虚证 IBS-D 大鼠模型。且通过对 3 种造模方法的比较发现,直肠扩张合番泻叶灌胃与母子分离合番泻叶灌胃复制的病证结合模型更好,避水应激合番泻叶灌胃相对较差。

本研究叠加了 3 种公认的 IBS 造模方法(母子分离、避水应激、直肠扩张),评价了番泻叶灌胃叠加 IBS 疾病造模方法的优劣,为 IBS-D 机制研究奠定基础,对脾肾阳虚证 IBS-D 大鼠模型的选择具有借鉴意义。

利益冲突:所有作者不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Su X, Tang Y, Zhang J, et al. Curative effect of Warming Kidney and Fortifying Spleen Recipe on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33 (5): 615-619.
- [2] Thabit AK, Nicolau DP. Lack of correlation between Bristol stool scale and quantitative bacterial load in *Clostridium difficile* infection[J]. Infect Dis, 2015, 8: 1-4.
- [3] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119 (5): 1276-1285.
- [4] 张声生, 魏玮, 杨俭勤. 肠易激综合征中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58 (18): 1614-1620.
- [5] 刘康毅. 腹泻型肠易激综合征中医证候规律及临床特征调查 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

- [6] 时岱, 唐薇, 彭文潘, 等. 中医辨治 IBS-D 的证型及剂型分布近况分析[J]. 光明中医, 2017, 32(9): 1253-1255.
- [7] O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses[J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(3): 263-267.
- [8] Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(1): G42-G53.
- [9] Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2): G307-G316.
- [10] 张望, 张海燕, 黄穗平. 中医复合因素造模法塑造脾虚型大鼠模型的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 1022-1024.
- [11] 吕银娟, 周安方, 张智华, 等. 双侧肾上腺大部切除肾虚动物模型的建立[J]. 湖北中医药大学学报, 2013, 15(5): 21-23.
- [12] 欧阳波, 肖作奇, 王秀梅, 等. 强肾益精颗粒对肾虚小鼠的影响[J]. 中医药导报, 2015, 21(7): 16-18.
- [13] Martinez-Olmos MA, Peino R, Prieto-Tenreiro A, et al. Intestinal absorption and pancreatic function are preserved in anorexia nervosa patients in both a severely malnourished state and after recovery[J]. Eur Eat Disord Rev, 2013, 21(3): 247-251.
- [14] Zhao L, Wu H, Qiu M, et al. Metabolic signatures of Kidney yang deficiency syndrome and protective effects of two herbal extracts in rats using GC/TOF MS[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 540957.

(收稿: 2019-12-11 在线: 2021-08-02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

第九次世界中西医结合大会征文通知

由中国中西医结合学会主办的第九次世界中西医结合大会定于 2021 年 12 月 2-5 日在海南省海口市鲁能希尔顿酒店召开, 本次大会主题是“中西医结合, 开创健康新时代”。大会将全面展示近 5 年世界结合医学(包括中西医结合)的最新成果和研究进展, 并邀请国内外著名专家学者进行精彩报告, 通过相互交流和共同提高, 促进医学创新, 欢迎各位同仁踊跃投稿。

1 征文内容

(1) 中西医结合理论研究, 包括对结合医学学术地位与作用的认识, 对新形势下发展结合医学的思路、途径和方法的理论探讨与经验总结等;

(2) 近 5 年来结合医学在临床研究、基础研究、药学研究、教学研究、学科建设、政策研究等方面取得的重要成果和宝贵经验;

(3) 结合医学各临床专业学科新诊疗经验的结合和分析, 中西医结合新技术、新方法的推介与评价, 以及实现科研成果向临床应用转化的新经验与新模式;

(4) 中西医结和优势病种临床诊疗路径的实践经验与临床共性问题的探讨, 中西医结合标准化研究等;

(5) 结合医学的未来研究, 以及其他促进结合医学发展的相关研究等。

2 征文要求

(1) 向本次大会所提交的论文应为未正式发表的论文;

(2) 中、英文摘要各 800~1000 字左右;

(3) 投稿前应成为大会官网正式注册用户并详细填写真实信息, 务必注明作者所属专业委员会(专业)、工作单位、职务职称、通讯地址、电子邮箱及手机号码等信息;

3 投稿方式 网上投稿。截稿日期: 2021 年 10 月 31 日。

请登录官网录官网: <http://www.wimco2021.com>。