

IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究

赵迎盼¹ 唐旭东¹ 卞兆祥² 王凤云¹ 杨俭勤¹ 苏敏³ 王微³

摘要 目的 建立一种疾病—证候—症状相结合的腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 肝郁脾虚型大鼠模型。方法 (1) 模型建立方法: 采用新生母子分离 + 慢性束缚 + 番泻叶灌胃法复制 IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型。将 48 只实验动物分为正常组、母子分离组、束缚组、母子分离 + 束缚组、母子分离 + 番泻叶组、三因素组(母子分离 + 束缚 + 番泻叶组) 6 组, 每组 8 只。(2) 模型评价方法: 以结直肠扩张的疼痛阈值代表内脏敏感性, 评价“疾病”模型的建立; 以旷场实验和血清 D-木糖水平评价肝郁脾虚“证型”的建立; 以排便粒数和稀便率评价腹泻“症状”的建立。结果 (1) 与正常组比较, 三因素组大鼠的体重增长量较少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2) 三因素组大鼠疼痛阈值明显降低, 与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3) 与正常组比较, 三因素组大鼠总穿格数、站立次数、修饰次数均明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(4) 与正常组比较, 三因素组大鼠血清 D-木糖含量显著下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。(5) 与正常组比较, 三因素组大鼠排便粒数及稀便率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 新生母子分离 + 慢性束缚 + 番泻叶灌胃的三因素复合 SD 模型大鼠符合 IBS-D 肝郁脾虚型疾病特点, 可能是一种较好的研究中医药治疗 IBS 疗效机制的动物模型, 但仍需要进一步的深入研究。

关键词 肠易激综合征; 肝郁脾虚证; 动物模型

Preliminary Study of Establishing and Assessing IBS-D Model Rats of Gan Stagnation and Pi Deficiency Syndrome
ZHAO Ying-pan¹, TANG Xu-dong¹, BIAN Zhao-xiang², WANG Feng-yun¹, YANG Jian-qin¹, SU Min³, and WANG Wei³ 1 Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 2 School of Chinese Medicine of Hong Kong Baptist University; 3 Graduate School, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China

ABSTRACT Objective To establish a new disease-syndrome-symptom integrated diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) rat model of Gan stagnation and Pi deficiency syndrome (GSPDS). Methods (1) The model establishment method: We combined mother-infant separation, chronic restraint, and senna gavage to establish a new IBS-D model of GSPDS. Totally 48 experimental rats were divided into the normal group (Group A), the mother-infant separation group (Group B), the chronic restraint group (Group C), and the senna gavage group (Group D), the mother-infant separation + senna gavage group (Group E), and the mother-infant separation + chronic restraint + senna gavage group (Group F), 8 in each group. (2) The model evaluation method: We used pain threshold indicating colorectal distension to represent for the visceral sensitivity, thus evaluating the establishment of "disease" model; open field test and serum D-xylose levels to evaluate the establishment of GSPDS model; defecation numbers of grain and loose stool rate to evaluate the establishment of diarrhea symptom. Results (1) Compared with Group A, the body weight gained less in Group F, showing statistical difference ($P < 0.05$). (2) The pain threshold significantly decreased in Group F, showing statistical difference when compared with

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81173209)

作者单位: 1. 中国中医科学院西苑医院(北京 100091); 2. 香港浸会大学中医药学院(香港); 3. 中国中医科学院研究生院(北京 100700)

通讯作者: 唐旭东 Tel: 010-62835001 E-mail: txdlly@sina.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1507

Group A ($P < 0.05$)。 (3) Compared with Group A, the total cross number, the standing number, and the decoration number in Group F significantly decreased ($P < 0.05$)。 (4) Compared with Group A, the serum D-xylose level of Group F significantly decreased ($P < 0.05$)。 (5) Compared with Group A, the defecation numbers of grain and the loose stool rate significantly increased, showing statistical difference ($P < 0.05$)。 Conclusions A new disease-syndrome-symptom integrated IBS-D animal model of GSPDS successfully established might be a better animal model used for studying IBS by Chinese medicine. However, further studies are needed.

KEYWORDS irritable bowel syndrome; Gan stagnation and Pi deficiency syndrome; animal model

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS) 是消化系统的常见病与多发病,该病易反复发作,给患者带来沉重的心理和经济负担,严重影响患者的生活质量。IBS 临床最常见的亚型是腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D),占患者总数的 74.0%^[1]。肝郁脾虚证是 IBS-D 最常见的中医证型,可占到 50% 以上^[2]。现代医学治疗本病临床疗效尚不能令人满意^[3-5],虽已有一些严格设计的临床试验^[6]或系统评价^[7]证明中医药对 IBS 确有疗效,但其疗效机制尚未阐明,需要开展大量的动物实验研究。因此,建立适宜的动物模型是开展中医药治疗 IBS 疗效机制研究的基础和重中之重。目前已有的中医药治疗 IBS 疗效机制的动物实验研究多采用内脏高敏感大鼠作为动物模型,多不能很好模拟中医药治疗中临床患者的特征。已有学者提倡建立一种“复合”的动物模型以模拟 IBS 复杂的生理机制^[8]。本研究旨在建立一种 IBS-D 肝郁脾虚型疾病—证候—症状相结合的大鼠模型。

材料与方法

1 实验动物及分组 雌性 SPF 级 SD 孕鼠 10 只,孕期 19 天左右,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证编号:SCXK(京)2009-2011。以新生雄性大鼠为实验造模动物。取 48 只新生雄性大鼠分为正常组、母子分离组、束缚组、母子分离+束缚组、母子分离+番泻叶组、三因素组(母子分离+束缚+番泻叶组)6 组,每组 8 只。动物在中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心饲养,昼夜节律 12/12,温度、湿度及昼夜光线恒定,自由摄食、进水。

2 药物及试剂 番泻叶溶液的制备^[9]:番泻叶捡择后置入沸水中浸泡 25 min,双层纱布过滤。滤液减压浓缩成生药含量为 0.6 g/mL, -4℃ 冰箱保存备用。D-木糖及 D-木糖测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

3 IBS-D 病证症结合大鼠模型的建立

3.1 疾病模型的建立 参考文献[10],疾病模型的建立采用新生母子分离法。将 6 只孕鼠所产幼鼠进行母子分离造模,另外 4 只不造模。造模组连续造模 14 天,从第 15 天后不进行任何操作,仍旧母子同笼。所有幼鼠在出生 24 天断奶,并从母鼠中分离出,28 天对雌雄大鼠分笼饲养,56 天时雌雄复核,为避免雌性大鼠月经周期变化对研究结果的影响,弃雌性大鼠不用,保留雄性大鼠,正常饲养。第 8 周内脏敏感性评估后随机分组,选择未进行母子分离的 16 只雄性大鼠分为 2 组,分别为正常组和束缚组;选择进行母子分离造模的 32 只雄性大鼠分为 4 组,分别为母子分离组、母子分离+束缚组、母子分离+番泻叶组、三因素组(母子分离+束缚+番泻叶组),每组 8 只。

3.2 “证”模型的建立 参考文献[11],“证”模型的建立采用慢性束缚法,建立肝郁脾虚型大鼠模型。第 8 周内脏敏感性评估后的第 2 天开始进行束缚法造模。将大鼠束缚于束缚架上,2 条粘贴软带分别固定大鼠的胸部和腹部,放入饲养箱中,每日 3 h,早 8 点到 11 点,连续 21 天。正常组、母子分离组、母子分离+番泻叶组不予束缚,但在相同时间点禁食,放置于各自饲养箱中,每日 3 h,连续 21 天。自制木质 T 型束缚架:底座宽 10 cm、长 20 cm、厚 2.8 cm,上端束缚台长 22 cm,最宽处 6.6 cm,束缚台两端分别固定 2 条可调节的粘贴软带用于束缚大鼠。

3.3 “症”模型的建立 “症”模型的建立采用番泻叶灌胃法。从束缚第 8 天开始每天上午 11 点束缚结束后,母子分离+番泻叶组、三因素组进行番泻叶灌胃(0.45 g/mL, 1 mL/100 g),其余组大鼠不予处理,连续 14 天,于灌胃第 1、7、14 天观察各组大鼠的排便粒数和稀便数,计算稀便率。

3.4 番泻叶最佳灌胃浓度确定的预实验 文献报道中,采用番泻叶灌胃方法复制腹泻模型的灌服浓度多为 0.3 g/mL^[12]或 0.6 g/mL^[13,14],为确定本研究最适宜的番泻叶浓度,在实验初期进行了预实验。取

18 只大鼠随机分为番泻叶高(0.6 g/mL)、中(0.45 g/mL)、低(0.3 g/mL)剂量 3 组,按 1 mL/100 g 的给药量给药,观察给药后 6 h 各组的稀便情况。结果发现,低剂量组部分大鼠未出现稀便,中剂量组大鼠全部出现稀便,而高剂量组大鼠绝大多数在出现稀便的同时伴见大量的粘液脓血排出。故确定本研究的番泻叶浓度为 0.45 g/mL。

4 模型评价指标及方法 每日束缚前,观察大鼠的精神状态、皮毛色泽、活动度、对束缚的反应性等情况。实验开始后每 4 天及束缚第 7、14、21 天上午 7:00 用电子秤称量大鼠体重。根据体重调整番泻叶的给药量。计算第 7、14、21 天大鼠体重增长情况并进行比较。体重变化 = 周末体重(g) - 上一次周末体重(g)。

4.1 内脏敏感性评估 参考文献[15],结肠扩张球囊为乳胶医用指套(中号),长 7~8 cm,用直尺在 4.5 cm 及 6 cm 处划横线标记,从 6 cm 处剪断,用 4 号手术丝线在 4.5 cm 标记处与 8 号橡胶导尿管扎紧,并经注气检测,扎口处无漏气。血压计、血压计球囊及导尿管分别与三通管连接,通过血压计球囊注入空气。

取各组大鼠于束缚前(出生后 8 周)及束缚结束后行直肠气囊扩张(colon rectal distension, CRD)。进行结肠扩张前大鼠禁食 12 h,不禁水。由大鼠肛门插入球囊 6 cm 左右,将大鼠放入编号大小约 35 cm × 20 cm × 20 cm 的透明塑料箱中,待大鼠适应 5 min 后经血压计的球囊注气,根据腹部回缩反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分标准^[15]确定疼痛压力阈值。AWR 评分标准如下:0 级:大鼠在接受直肠扩张时无行为学反应;1 级:身体静止不动,头部运动减少;2 级:大鼠腹部肌肉轻微收缩,腹部不抬离平面;3 级:腹肌强烈收缩,腹部抬离平面;4 级:骨盆抬起,身体呈弓形。以大鼠出现 3 级表现时的压力为大鼠疼痛阈值,每只大鼠进行 3 次球囊扩张,每次持续 20 s,间隔 5 min,取平均压力值。

实验过程中采用了严格的质量控制方法。首先,为避免主观偏倚,整个实验过程由 2 人操作完成:1 人负责球囊肛门插入及实验动物的安排,并记录动物编号及相应塑料箱编号;实验操作者负责球囊注气并观察大鼠的行为学反应,确定大鼠出现 3 级反应后记录压力值,实验操作者不知道动物编号及分组情况。其次,为避免生物节律影响,两次测量均在下午 1:00 ~ 5:00 之间,且实验安排人员采用 1 组 1 只的轮流实验方法。

4.2 旷场实验 参考文献[11],束缚后第 1、7、14、21 天进行旷场实验,为避免生物节律影响,实验均在当日早 7:00 开始。环境要求安静,室内灯光采用动物房夜间光照强度,四周由全封闭的遮光帘隔离人及电脑干扰并杜绝参照物。实验方法参照文献所述。实验结束后通过录像人工计量如下指标:(1)总穿格数;(2)站立次数;(3)修饰次数。为避免人工评价的主观偏倚,对指标计量人员采用盲法:实验当天记录大鼠编号、分组及相应录像编号,该记录由专人保管;对指标计量人员盲动物分组及编号情况,仅能根据录像编号计量相应指标。最后由统计人员进行数据录入及统计。自制木质旷场箱:长 × 宽 × 高为 100 cm × 100 cm × 40 cm,内侧壁及底面为灰色。底面用黑线划分为 25 块面积相等的正方形(大小为 20 cm × 20 cm)。沿侧壁的格称为外周格(16 个周边正方形),其余为中心格(9 个中心正方形)。正中格正上方安置摄像头。

4.3 血清 D-木糖含量测定 参考文献[11],造模完成后,除正常组一半大鼠外,其余大鼠按 1 mL/100 g 剂量灌服 3% D-木糖溶液。1 h 后采用水合氯醛腹腔注射方法(10%, 0.4 mL/100 g)麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心后取上清,4 °C 冰箱中保存备用。采用间苯三酚法^[11]测量血清 D-木糖水平。

4.4 稀便率的计算 参考文献[16],番泻叶灌胃后第 1、7、14 天评估大鼠稀便率。番泻叶灌胃后将每组大鼠单笼饲养,笼底为不锈钢网格,网格下放置垫有滤纸的托盘。观察灌胃后 6 h 内各组的稀便率。为了保证稀便率的有效计算,将 6 h 内无大便的大鼠的大便粒数由 0 调整为 1。稀便率等于单位时间内每只大鼠所排的稀便数与总排便粒数之比,即稀便率(%) = 稀便数/总排便粒数 × 100%。干稀便的区分以滤纸上有无污迹为标准。

4.5 远端结肠病理组织学检查 参考文献[17],大鼠致死,取距肛门 5~6 cm 处远端结肠,用 10% 福尔马林固定。由病理科医生显微镜下观察以下内容:固有层有无中性粒细胞浸润,间质有无水肿。具体评分如下:+ 轻度:固有层少量中性粒细胞浸润,轻度或无间质水肿;++ 中度:固有层中等量粒细胞浸润,间质中度水肿;+++ 重度:中量到大量中性粒细胞弥漫性浸润固有层,严重间质水肿。

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据做正态性检验和组间方差齐性检验;两项符合,采用参数统计的

单因素方差分析进行统计处理,组间比较采用 *Dunnett-T*、*SNK* 法;若有一项不符合,则采用非参数统计中的多个独立样本 *Kruskal-Wallis H* 检验进行统计处理,组间比较采用 *Nemenyi* 法。若为重复测量数据,则采用重复测量数据的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般状态及体重增长情况比较(表 1) 造模前,各组大鼠精神状态良好、皮毛洁白有光泽,活泼好动。初次束缚时,各造模组大鼠表现为强烈的反抗、嘶叫、毛须竖立、拼命撕咬束缚架。造模结束后,各模型组大鼠神态倦怠、易激惹、防御性强、毛发散乱无光泽、扎堆或蛰伏在角落、多数弓背静卧少动。重复测量数据的单因素方差分析显示,造模结束时,不同组间大鼠的体重变化差异有统计学意义($F = 10.132, P < 0.05$)。与正常组比较,束缚第 7、14、21 天,含束缚因素造模组大鼠的体重增长量较少,差异有统计学意义($P < 0.05$);含与不含束缚因素造模组内比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。束缚第 14 天,母子分离 + 番泻叶组大鼠的体重增长量较正常组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着造模时间的延长,各组大鼠体重的变化量均逐渐减少,而含束缚因素的造模组的这种变化尤其明显。

表 1 各组大鼠体重增长情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重增长情况		
		第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常	8	92.94 ± 13.11	40.60 ± 6.69	22.54 ± 12.82
母子分离	8	79.24 ± 15.34	29.50 ± 8.79	31.88 ± 4.08
束缚	8	42.36 ± 16.57*	29.80 ± 6.18*	30.00 ± 4.53*
母子分离 + 束缚	8	50.10 ± 3.87*	23.20 ± 5.81*	28.20 ± 5.72*
母子分离 + 番泻叶	8	81.42 ± 5.59	22.80 ± 2.77*	27.40 ± 5.55
三因素	8	51.98 ± 15.03*	26.22 ± 5.66*	22.78 ± 3.29*
F		13.501	13.416	10.132
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$

2 内脏敏感性评估(表 2) 造模结束后,各组大鼠的疼痛阈值差异有统计学意义($F = 41.299, P < 0.05$)。与正常组比较,束缚前 1 天含母子分离因素的大鼠组疼痛阈值下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);造模结束后,与正常组比较,其余各组大鼠疼痛阈值下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);造模结束后,束缚组疼痛阈值高于母子分离组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠疼痛阈值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	疼痛阈值	
		束缚前 1 天	造模结束
正常	8	36.73 ± 0.49	40.00 ± 1.56
母子分离	8	27.33 ± 2.45*	29.33 ± 2.62*
束缚	8	38.20 ± 2.53	29.73 ± 3.60*△
母子分离 + 束缚	8	26.87 ± 2.73*	28.80 ± 4.72*
母子分离 + 番泻叶	8	27.20 ± 1.80*	31.60 ± 2.48*
三因素	8	25.00 ± 5.72*	24.40 ± 1.92*
F		27.904	41.299
P		0.000	0.000

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$;与母子分离组同期比较,△ $P < 0.05$

3 旷场实验

3.1 各组大鼠穿格数比较(表 3) 束缚第 1 天,各组大鼠穿格数相差不大($P > 0.05$)。束缚第 7 天,含束缚因素组大鼠穿格数减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。束缚第 14 天及第 21 天,束缚组、母子分离 + 束缚组、母子分离 + 番泻叶组及三因素组大鼠穿格数明显下降,与正常组同期比较差异有统计学意义($P < 0.05$);母子分离组大鼠穿格数与正常组同期比较差异无统计学意义($P > 0.05$);束缚组第 14 及 21 天大鼠穿格数与母子分离组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而母子分离 + 番泻叶组与母子分离 + 束缚组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 各组大鼠站立次数比较(表 4) 束缚第 1 天,各组大鼠站立次数差别不大($P > 0.05$),三因素组站立次数表现出下降的趋势,但与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。束缚第 7、14、21 天,三因素组大鼠站立次数与正常组同期比较明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与母子分离组同期相比,束缚组站立次数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);而母子分离 + 番泻叶组大鼠与母子分离 + 束缚组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.3 各组大鼠修饰次数比较(表 5) 束缚第 1 天,各组大鼠修饰次数相差不大,差异无统计学意义($P > 0.05$)。束缚第 7、14 及 21 天,与正常组比较,束缚组、母子分离 + 束缚组及三因素组修饰次数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与母子分离组比较,束缚组修饰次数减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与母子分离 + 番泻叶组大鼠比较,母子分离 + 束缚组修饰次数减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 各组大鼠血清 D-木糖含量比较(表 6) 单因素方差分析显示,各组大鼠血清 D-木糖含量差异有统计学意义($F = 143.614, P < 0.05$)。与正常组比较,除母子分离组外,其他各组血清 D-木糖含量均显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠穿格数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿格数			
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常	8	61.60 ± 16.38	52.60 ± 11.10	49.40 ± 3.51	50.40 ± 4.72
母子分离	8	68.00 ± 16.69	54.80 ± 20.32	48.60 ± 16.44	49.40 ± 4.34
束缚组	8	65.00 ± 8.16	13.40 ± 2.97	11.60 ± 5.68 ^{*△}	15.00 ± 4.18 ^{*△}
母子分离 + 束缚	8	73.60 ± 32.30	15.00 ± 2.83	8.40 ± 5.60 [*]	8.80 ± 8.01 [*]
母子分离 + 番泻叶	8	50.00 ± 6.72	46.60 ± 9.61	8.40 ± 8.14 [*]	8.60 ± 5.13 [*]
三因素	8	58.80 ± 26.53	15.60 ± 2.88	4.80 ± 4.09 [*]	4.40 ± 1.67 [*]
F		0.822	2.770	8.303	19.338
P		0.546	0.051	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,^{*}P < 0.05;与母子分离组同期比较,[△]P < 0.05

表 4 各组大鼠站立次数比较 (次, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	站立次数			
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常	8	18.60 ± 7.09	18.20 ± 2.68	17.80 ± 4.09	14.80 ± 3.96
母子分离	8	18.60 ± 7.73	20.20 ± 6.98	21.40 ± 2.07 [*]	20.80 ± 2.59
束缚	8	17.00 ± 2.12	6.60 ± 3.78 [△]	4.00 ± 1.87 ^{*△}	5.00 ± 4.36 ^{*△}
母子分离 + 束缚	8	25.40 ± 8.76	6.60 ± 1.82	5.00 ± 3.00 [*]	5.20 ± 5.50 [*]
母子分离 + 番泻叶	8	18.20 ± 7.79	27.20 ± 1.30	2.60 ± 3.21	6.40 ± 2.07
三因素	8	11.40 ± 3.65	5.00 ± 1.23 [*]	1.40 ± 1.14 [*]	4.60 ± 2.73 [*]
F		2.257	7.755	17.506	26.033
P		0.081	0.000	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,^{*}P < 0.05;与母子分离组同期比较,[△]P < 0.05

表 5 各组大鼠修饰次数比较 (次, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	修饰次数			
		第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常	8	5.40 ± 1.52	6.40 ± 2.07	7.60 ± 1.14	8.80 ± 1.48
母子分离	8	6.00 ± 3.00	9.40 ± 2.07	9.80 ± 3.19	8.40 ± 1.82
束缚	8	4.20 ± 1.92	2.20 ± 0.84 ^{*△}	5.40 ± 3.51 ^{*△}	3.40 ± 3.21 ^{*△}
母子分离 + 束缚	8	4.60 ± 1.82	2.40 ± 0.89 ^{*▲}	5.00 ± 3.16 ^{*▲}	4.20 ± 3.19 ^{*▲}
母子分离 + 番泻叶	8	6.80 ± 1.79	7.60 ± 4.62	6.20 ± 2.68	6.80 ± 1.79
三因素	8	7.80 ± 1.10	2.20 ± 0.84 [*]	1.80 ± 1.79 [*]	2.40 ± 1.67 [*]
F		2.432	9.052	10.842	16.087
P		0.064	0.000	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,^{*}P < 0.05;与母子分离组同期比较,[△]P < 0.05;与母子分离 + 番泻叶组同期比较,[▲]P < 0.05

表 6 各组大鼠血清 D-木糖含量比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 D-木糖含量
正常	8	42.09 ± 4.15
母子分离	8	40.41 ± 2.19
束缚	8	18.11 ± 2.01 [*]
母子分离 + 束缚	8	20.32 ± 2.65 [*]
母子分离 + 番泻叶	8	7.49 ± 3.82 [*]
三因素	8	5.25 ± 2.19 [*]

注:与正常组同期比较,^{*}P < 0.05

表 7 各组大鼠排便粒数 (粒, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	排便粒数		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
正常	8	9.60 ± 7.23	4.60 ± 2.88	4.60 ± 4.04
母子分离	8	6.40 ± 6.84	3.80 ± 3.03	2.20 ± 2.39
束缚	8	2.00 ± 3.08	6.60 ± 4.22	2.40 ± 2.51
母子分离 + 束缚	8	4.80 ± 2.95	3.40 ± 2.30	3.00 ± 4.00
母子分离 + 番泻叶	8	10.20 ± 4.43	13.60 ± 13.00 [*]	19.40 ± 9.04 [*]
三因素	8	13.60 ± 5.32	13.00 ± 6.89 [*]	19.80 ± 6.42 [*]
F		3.166	8.343	20.460
P		0.025	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,^{*}P < 0.05

5 各组大鼠排便粒数及稀便率比较
5.1 各组大鼠排便粒数比较(表 7) 番泻叶灌胃第 1 天,与正常组比较,母子分离 + 番泻叶组、三因素

组大鼠排便粒数表现出增多的趋势,但各造模组大鼠排便粒数差异无统计学意义($P > 0.05$);灌胃第 7 及 14 天,母子分离+番泻叶组、三因素组大鼠排便粒数明显增多,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

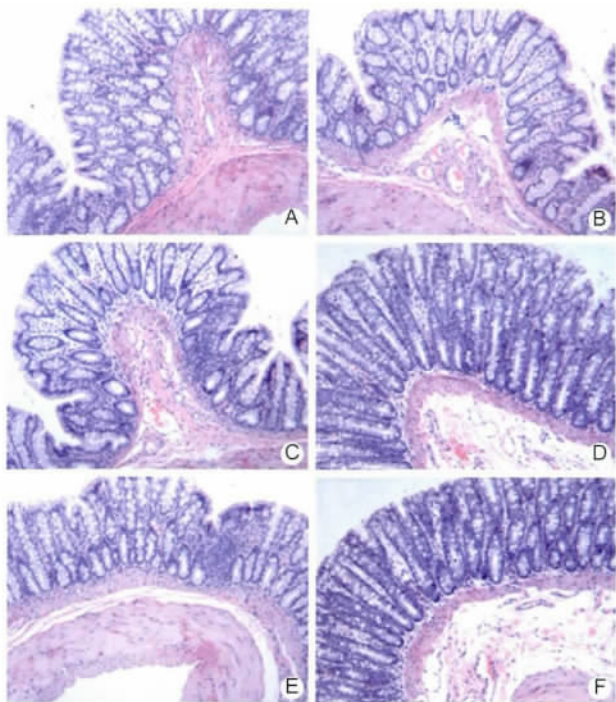
5.2 各组大鼠稀便率比较(表 8) 番泻叶灌胃第 1、7 及 14 天,与正常组比较,母子分离+番泻叶组、三因素组大鼠稀便率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 8 各组大鼠稀便率比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	稀便率		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
正常	8	6.00 $\pm$ 13.42	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
母子分离	8	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	20.00 $\pm$ 44.72
束缚	8	2.86 $\pm$ 9.39	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
母子分离+束缚	8	15.00 $\pm$ 33.54	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
母子分离+番泻叶	8	65.05 $\pm$ 6.60*	64.08 $\pm$ 10.03*	67.65 $\pm$ 18.48*
三因素	8	71.11 $\pm$ 12.43*	31.62 $\pm$ 20.37*	65.93 $\pm$ 7.59*
F		42.324	44.201	48.083
P		0.000	0.000	0.000

注:与正常组同期比较,* $P < 0.05$

6 各组大鼠结肠病理组织学检查结果(图 1) 各组大鼠结肠未见明显组织损伤,组织切片普通 HE 染色均有轻度的中性粒细胞浸润,间质无明显水肿,属于轻度。



注: A 为正常组; B 为母子分离组; C 为束缚组; D 为母子分离+束缚组; E 为母子分离+番泻叶组; F 为三因素组

图 1 各组大鼠结肠黏膜组织病理学检查结果

(HE, $\times 100$)

讨 论

1 模型的建立与评价 研究采用复合造模思路,关键在于三因素造模方式的选择和三因素间的组合方式。对于造模方法的选择,笔者选用了经典的母子分离法复制 IBS 内脏高敏感大鼠,选用国内比较公认的慢性束缚法造成肝郁脾虚的证候模型,选用最为常用的番泻叶灌胃的方法造成大鼠的腹泻症状。对于三因素间的组合方式,目前 IBS 动物研究中最常用的复合造模方式即为新生期造模+成年后应激,慢性应激结合番泻叶灌胃也是常用的造成 IBS-D 的方法,多在束缚中后期结合番泻叶灌胃^[12,16,18-21]。以此为借鉴,研究采用新生期母子分离复制“疾病”模型,待大鼠成年后进行为期 21 天的慢性束缚复制肝郁脾虚模型,束缚第 7~21 天时同期进行番泻叶灌胃造成大鼠腹泻的症状。

番泻叶灌胃致腹泻模型的选择依据:(1)前期文献研究发现,涉及 IBS-D 的动物实验研究中,采用番泻叶灌胃造成腹泻的文献大约占到 50%,而其余 50% 的研究多采用急性束缚及其他应激的方法,其模型评价多为粪点数等不能直接反映大便含水量的指标,可能急性束缚等应激改变了肠道动力而非造成腹泻,故本研究“证”的模型的建立部分采用了慢性束缚应激的方法;(2)从“证”的角度而言,番泻叶灌胃通常被认为是复制脾虚泄泻动物模型的首选方法^[22,23],故不会引入新的中医“证”的因素;(3)研究发现,小鼠胃肠道组织在番泻叶提取物灌胃后无光镜可见的变化,且不会产生药物依赖性^[24,25]。

模型建立成功与否需经相应评价指标的测评。本研究模型的评价指标应由 3 方面组成:(1)疾病的评价:内脏敏感性增高是 IBS 发病最主要的病理机制,结直肠扩张时的 AWR 是目前应用最广的评价内脏敏感性的指标,本研究采用结直肠扩张时的疼痛阈值作为评价 IBS 病是否建立成功的指标;(2)肝郁脾虚证的评价:参考文献[11],以旷场实验及血清 D-木糖含量为指标评价“证”的建立;(3)腹泻症状的评价:以排便粒数和稀便率评价腹泻症状的建立与否,其中稀便率为主要指标。

本研究的大多数结果同以往的研究类似,唯一不同的地方在于束缚第 1 天旷场实验各指标的观测结果并未像文献[11]报道的一样在正常组与模型组之间表现出差异。分析可能的原因是束缚造模跟旷场实验观察的时间间隔,以往的研究在束缚第 1 天的当天进行旷场实验的指标观测,而笔者的实验在束缚第 2 天

的束缚造模前进行。推测束缚后即刻进行的旷场实验中,首次束缚给大鼠带来的急性应激效应尚未完全消失,而在束缚第 2 天的束缚前进行旷场实验,其急性应激效应已经基本消失,而慢性应激效应尚未确立,故而各组间未表现出明显的差异。

2 设立多个分组的目的 从本研究的分组设计来讲,似乎不需要设立除正常组和三因素组以外的其他组别,设立多个分组可以得出如下结论:(1)慢性束缚应激方法也可导致大鼠内脏敏感性的增高;(2)母子分离组大鼠不伴“肝郁”表现:从临床来看,有学者发现^[26]54%以上的患者有不同程度的精神障碍,尤其是抑郁症;也有研究^[27]表明 IBS 患者抑郁评分显著高于对照组。从新生母子分离法的造模机制^[28]来说,笔者的假设是母子分离组大鼠可能存在焦虑或抑郁的状态。本研究以旷场实验为观测指标验证“肝郁”的存在与否,结果发现母子分离组大鼠旷场实验各指标同正常组无明显差别;(3)单用母子分离法不会引起腹泻:本研究表明,母子分离组大鼠并未出现大便粒数和稀便率的增加。中医药的特色和优势是可以显著改善患者的临床症状,在中医药疗效机制阐述的实验研究中,实验用模型大鼠应模拟出类似 IBS-D 临床发作期的表现;(4)三因素造模缺一不可:慢性束缚应激可导致大鼠内脏敏感性增高;母子分离组、母子分离+番泻叶组大鼠无“肝郁”表现;母子分离组、束缚组、母子分离+束缚组大鼠无腹泻表现。即:有“病”不一定有“证”,有“证”不一定有“症”,3 种造模方法对建立三因素 IBS 动物模型必不可少、不可或缺。

3 研究过程中的质量控制 为了避免主观因素可能造成的干扰,本研究中行为学指标观测人员固定;同时借鉴临床研究中的盲法原则,在结直肠扩张确定疼痛压力阈值中对操作人员施盲;在旷场实验中对指标计数人员施盲,施盲因素为动物分组及编号情况。此外,为避免生物节律影响,同一实验操作固定在一天中的特定时段。

4 本研究的不足之处和展望 研究实验设计和统计方法的应用均基于三因素间无交互作用的假设,对三因素间的交互作用情况并未涉及。研究总造模时间接近 3 个月,周期较长,可能影响其实际应用。已经发现慢性束缚可造成内脏高敏感,今后可能找到一种既造成“病”也造成“证”的造模方法,简化造模过程,缩短造模时间。虽然本研究发现 3 种造模方法必不可少,可能是由于对“证”的存在与否的评价指标的选择问题造成的。此外,本研究缺乏药物或其他手段的反证或验证,需要进一步的深入研究。

动物模型建立的成功与否很大程度上取决于对疾病研究的深入与否,应将临床研究与动物实验研究密切结合。今后应加强中医“证本质”的研究,可能会对 IBS 证候模型的建立提供支持。证候模型建立成功与否的评价方法可进一步丰富,如采用“以方测证”的方法等。

参 考 文 献

- [1] 熊理守,陈旻湖,陈惠新,等. 社区人群中肠易激综合症的症状学特征[J]. 胃肠病学,2004,9(5): 277-279.
- [2] 汤小龙. 肠易激综合征腹泻型的证型分布规律及其相关性研究[D]. 南京:南京中医药大学第一临床医学院,2010.
- [3] 上海市双歧三联活菌协作组. 双歧三联活菌治疗肠易激综合症的临床多中心研究[J]. 上海医学,2004,27(10): 728-731.
- [4] 陈淑洁. IBS 的生活质量研究[J]. 国外医学·消化系统疾病分册,2002,22(1): 25-27.
- [5] 王承党,陆崇,吴婷,等. 不同药物治疗肠易激综合症的临床疗效[J]. 胃肠病学,2003,8(5): 272-275.
- [6] Bensoussan A, Talley NJ, Hing M, et al. Treatment of irritable bowel syndrome with Chinese herbal medicine - a randomized controlled trial[J]. JAMA, 1998, 280(18): 1585-1589.
- [7] Liu JP, Yang M, Liu YX, et al. Herbal medicines for treatment of irritable bowel syndrome[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006, 25(1): CD004116. pub2.
- [8] Naliboff BD, Chang L, Munakata J, et al. Towards an integrative model of irritable bowel syndrome[J]. Prog Brain Res, 2000, 122: 413-423.
- [9] 滕茜华,李德勤. 不同浸出时间和方法对番泻叶有效成分的影响[J]. 时珍国药研究,1991,2(2): 75-80.
- [10] Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to visceral somatic nociceptive stimuli in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2): G307-G316.
- [11] 岳利峰,丁杰,陈家旭,等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(6): 396-400.
- [12] 林媚,唐旭东,王凤云. 肠安 1 号对实验性腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜 NF- κ B 的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(12): 2339-2341.
- [13] 费晓燕,谢建群,郑昱,等. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合征模型大鼠胃动素和胆囊收缩素的影响[J]. 上海中医药杂志,2008,42(4): 63-65.
- [14] 王迎寒,陈光晖,刘玉玲,等. 健脾化湿颗粒对 IBS 模型

- 大鼠结肠 NO 和 NOS 的影响[J]. 承德医学院学报, 2010 27(2): 129-131.
- [15] AL-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ, et al. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [16] 李冬华, 朱飞鹏, 李珊珊, 等. 疏肝健脾法调控肠易激综合征动物模型胃肠激素水平的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(7): 20-23.
- [17] 李延青, 郭玉婷, 左秀丽, 等. 肠易激综合征内脏感觉过敏动物模型的建立[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2003, 12(4): 332-335.
- [18] 李华燕, 张涛, 潘锋. 痛泻要方对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠肥大细胞及辣椒素受体的影响[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(5): 400-402.
- [19] 谢建群, 陆雄, 龚丽萍, 等. 健脾温中法对脾胃虚寒型肠易激综合征模型大鼠血管活性肠肽影响的实验研究[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(4): 49-51.
- [20] 白露, 谢小磊, 李梦, 等. 加味四逆散对肠易激综合征大鼠不同脑区核团 c-fos 蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(1): 40-41.
- [21] 吴美玉, 胡团敏, 郑溪水. 黄芩灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜 VIP 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(28): 2966-2970.
- [22] 陆佰荣, 李林. 脾虚动物模型研制的进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2006, 27(2): 194-195.
- [23] 陈学习. 脾虚证动物模型复制方法研究概况、评价与思考[J]. 中国当代医药, 2010, 17(33): 5-6, 47.
- [24] 王新, 韩月东, 吴汉平, 等. 番泻叶提取物对小鼠胃肠运动及其组织形态学的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6): 66-65.
- [25] 高晔, 朱艳华, 贺微, 等. 番泻叶的药用研究进展[J]. 中国药理学, 2006, 24(11): 2145-2146.
- [26] Walker FA, Roy-byml PP, Kalon WJ, et al. Irritable bowel syndrome and psychiatric illness[J]. Am J Psychiatry, 1990, 147(5): 565-572.
- [27] Sugaya N, Nomura S. Relationship between cognitive appraisals of symptoms and negative mood for subtypes of irritable bowel syndrome[J]. Biol Psychol Social Med, 2008, 2(1): 9-15.
- [28] 李延青, 郭玉婷. 肠易激综合征的动物模型研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 13(4): 435-439.

(收稿: 2012-09-12 修回: 2013-08-20)

《中国中西医结合杂志》获 2012 年度中国科协精品科技期刊工程

期刊学术质量提升项目资助

为进一步促进中国科协科技期刊创新发展, 增强科技期刊核心竞争力, 大力培育精品科技期刊, 中国科协 2012 年继续实施精品科技期刊工程, 主要项目有精品科技期刊培育计划、科技期刊国际推广计划和科技期刊能力发展建设平台项目。

截止到 2012 年 8 月 10 日, 2012 年度中国科协精品科技期刊工程项目评审工作已经结束, 共评出精品科技期刊培育计划 77 项, 科技期刊国际推广计划 7 项, 科技期刊发展能力建设平台 3 项。

《中国中西医结合杂志》获精品科技期刊培育计划资助, 资助亚类为期刊学术质量提升项目。以此次资助为契机, 本刊将进一步提高学术质量, 扩大影响。欢迎广大中医及中西医结合工作者积极给本刊赐稿或组稿, 积极参加本刊的审稿工作, 共同推进杂志影响力和竞争力的提升, 为打造精品科技期刊而继续努力!