

• 方药研究 •

肝脾不调所致腹泻型肠易激综合征的动物模型研究

胡 瑞 唐 方

(天津医科大学总医院中医科, 天津市和平区鞍山道 154 号, 300052)

[摘 要] **目的** 探讨肝脾不调型腹泻型肠易激综合征(IBS-D) 动物模型的制备方法。 **方法** 为确定造模周期, 32 只乳鼠分为模型 3 天组、6 天组、9 天组和空白对照组; 为确定实验动物体重, 48 只大鼠按体重分层, 随机分为高、中、低体重模型组和相应空白对照组; 为确定致泻方法, 32 只大鼠分为高乳糖组、应激组、高乳糖加应激组和空白对照组, 分别比较相关各组大鼠体重、腹泻情况。确定造模方法后, 16 只大鼠分为模型组和空白对照组, 检测 5-羟色胺(5-HT)、乳酸脱氢酶(LDH) 及水通道蛋白(AQP4) 验证模型。 **结果** 依据造模周期实验、确定动物体重实验及不同致泻方法实验的结果, 确定最佳造模方法为: 实验周期 6 天, 选取高体重大鼠为实验对象, 采用高乳糖饲料加束缚应激联合致泻。模型验证实验: 与空白对照组比较, 模型组 5-HT 及 LDH 下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), AQP4 升高($P < 0.05$)。 **结论** 该模型模拟临床 IBS 以胃肠症状为主要表现、多与情绪相关的特点, 具备 IBS-D 病理改变, 可用于相关药物的实验研究。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征; 动物模型; 5-羟色胺; 乳酸脱氢酶; 水通道蛋白

Study on Making the Animal Model of Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome Due to Liver-Spleen Disharmony

HU Rui, TANG Fang

(General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052)

ABSTRACT **Objective** To explore the animal model making method for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) caused by the disharmony of liver and spleen in TCM. **Methods** In order to define the period of the animal model making, the 32 neonatal rats were divided into 3 days group, 6 days group, 9 days group and control group. In order to determine the weight of the experimental rats, the 48 rats with different weight were divided into lower weight model group, lower weight control group, medium weight model group, medium weight control group, higher weight model group and higher weight control group. In order to decide the method of causing diarrhea, the 32 rats were divided into lactose enriched diet group, restraint stress group, lactose enriched diet plus restraint stress group, and a control group. The body weight and diarrhea rate of all groups were compared respectively. After the method of model making was decided, the 16 rats were divided into a model group and a control group, and 5-hydroxytryptamin (5-HT), lactate dehydrogenase (LDH) and aquaporin 4 (AQP4) of the two groups were compared for model-proving. **Results** Based on the results step by step, the best method was decided: the period of the animal model making was 6 days, rats with higher body weight should be subjects, and the lactose enriched diet combining with restraint stress should be used to induce diarrhea. Model-proving test: compared with the control group, 5-HT and LDH decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$) and AQP4 increased ($P < 0.05$) in the model group. **Conclusion** The animal model has the symptoms of gastrointestinal system, and its pathological changes relate to emotion. So it can be used in the experimental study of IBS.

Key Words Diarrhea; Irritable bowel syndrome; Animal model; 5-hydroxytryptamin; Lactate dehydrogenase; Aquaporin

腹泻型肠易激综合征(IBS-D)^[1]是消化系统的常见病、多发病, 为一种原因不明的肠功能紊乱性疾病, 多呈慢性、间歇性发作。为科学评价药物作用机理, 阐释 IBS-D 发病机制, 多年来国内外学者对动物模型进行了大量研究^[2-3]。既往模型多以单一因素引发动物腹泻, 而 IBS 的发生通常是多种因素共同作用的结果。为研究一种与临床发病机制更加吻合的动物模型, 本课题通过多层次比较来建立复合因素致泻的动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠, 雌性, 购自军事医学科学院, 实验动物许可证号: SCXK-(军) 2002-001。

1.2 试剂

乳酸脱氢酶(LDH) 测试盒, 南京建成生物工程研究所生产, 批号 20071203; 5-羟色胺硫酸肌酐(批号 017K 1768)、邻苯二甲醛(批号 WA 22483), 美国 Sigma-Aldrich 公司生产; L-半胱氨酸, 天津市光复精细化工研究所生产, 批号 070723; 正丁醇, 天津市瑞金特化学品有限公司, 批号 20060828; 正庚烷, 天津市赢达稀贵

化学试剂厂,批号20050902;大鼠水通道蛋白4(AQP4)酶联免疫吸附测试盒,美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories 公司生产,批号 RT 110371;蛋白酶抑制剂,美国 Sigma 公司生产,批号 A 3428;便潜血试剂盒,购自珠海贝索生物技术有限公司,批号 070815。

1.3 仪器

TU-1810PC 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司生产;F-4500 荧光分光光度计,日本日立公司生产;Thermo Multiskan MK3 酶标仪,芬兰雷勃公司生产。

1.4 模型制备

高乳糖饲料配方:将基础饲料配方中的淀粉全部改为乳糖,参照文献[4]加工饲料,配方:酪蛋白 22.05%、乳糖 45.58%、蔗糖 15.00%、大豆油 3.75%、纤维素 8.00%、DL-蛋氨酸 0.4%、胆碱 0.2%、维生素 0.02%、无机盐 5.00%。由北京科澳协力饲料有限公司加工。束缚应激方法:参照文献[3]方法改良,用 0.8cm × 10cm 医用橡皮膏,捆绑于实验鼠双后肢膝踝关节之间,固定于高 20cm 的铁架上,倾斜 60° 放置,持续 1h。

1.5 观测指标

体重增长率计算:以模型制备当日体重作为初始体重,每日计测体重,体重增长率 = (每日体重 - 初始体重) / 初始体重 × 100%。

腹泻率观测:腹泻率 = 腹泻的动物数 / 该组动物总数 × 100%。

腹泻潜伏期指每只实验鼠自模型制备开始到出现溏稀便所用时间(h)。

腹泻指数^[5]计测:腹泻指数 = 稀便率 × 平均稀便级。稀便率:每只动物所排的稀便数与总便数之比。稀便级:表示每只动物稀便的程度,以稀便污染滤纸所形成污迹的直径分为 4 级: < 1cm (1 级)、≥ 1cm (2 级)、≥ 2cm (3 级)、≥ 3cm (4 级)。平均稀便级 = 稀便级数总和 / 稀便次数。

空肠组织病理观察:模型制备结束,麻醉剖腹,摘取空肠组织 2cm,清洁冲洗,10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肠组织形态。

复合性腹泻模型的判定:与对照组比较,模型组腹泻率升高,且有统计学意义。

1.6 根据造模周期分组及处理方法

分组:体重(65 ± 5)g 大鼠 32 只,采用随机数字表法分为 4 组,空白对照组(N₁组)、模型 3 天组(D₃组)、模型 6 天组(D₆组)、模型 9 天组(D₉组),每组 8 只。

模型制备:N₁组喂食基础饲料。各模型组均以高乳糖饲料喂养,每天束缚应激,D₃组连续 3 天,D₆组 6

天,D₉组 9 天。

1.7 根据体重分组及处理方法

分组:体重分别为(65 ± 5)g、(125 ± 10)g、(150 ± 10)g 大鼠各 16 只。实验动物按体重分组,每组 8 只,低体重模型组(C₆₅)、低体重对照组(N₆₅);中体重模型组(C₁₂₅)、中体重对照组(N₁₂₅);高体重模型组(C₁₅₀)、高体重对照组(N₁₅₀)。

模型制备:各对照组喂食基础饲料,自由活动。各模型组喂饲高乳糖饲料,连续 6 天。并给予束缚应激,应激前测便潜血(OB),若达弱阳性(±)停止应激。

1.8 根据不同致泻因素分组及处理方法

分组:体重(150 ± 10)g 大鼠 32 只,采用随机数字表法随机分为 4 组,高乳糖组、应激组、高乳糖加应激组、空白对照 2 组,每组 8 只。

模型制备:高乳糖组和高乳糖 + 应激组以高乳糖饲料喂饲,应激组喂食基础饲料;应激组和高乳糖 + 应激组给予束缚应激,应激前测便OB。空白对照 2 组喂食基础饲料,不予应激。连续 6 天。

1.9 模型验证实验

分组:体重为(150 ± 10)g Wistar 雌鼠 16 只,采用随机数字表法随机分为模型组和空白组,模型组采用高乳糖饲料喂饲,每日束缚应激。空白组喂饲基础饲料,自由活动。连续 6 天。

血清 5-羟色胺(5-HT)检测:实验结束,取血,分离血清,依据文献^[6]方法操作,在荧光分光光度计上测定各管吸光强度,计算血清 5-HT 含量。

小肠黏膜 LDH 活力测定:实验满 6 天,取小肠黏膜,按试剂盒说明操作,测定 LDH 活性。

AQP4 含量测定:模型制备结束,麻醉后剖腹,剪取近端结肠,与含蛋白酶抑制剂(40 μg/ml)的生理盐水混合,低温匀浆,按酶联免疫吸附测试盒说明操作,测定 AQP4 浓度。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用双侧 *t* 检验;多组间样本均数比较采用方差分析,率的比较采用卡方检验。

2 结果

2.1 模型制备周期的确定

2.1.1 体重增长率比较 表 1 示,与 N₁ 组相比,各模型组体重增长率均显著降低($P < 0.05$),其中模型制备后第 2~3 天,3 个模型组体重增长迟缓;至第 5 天 D₆、D₉ 组体重增长率呈下降趋势;第 9 天 D₉ 组体重增长率由持平转为负增长。

表1 不同造模周期大鼠体重增长率比较(%)

组别	鼠数	天数								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
D ₃ 组	8	0.84	2.34	2.44	—	—	—	—	—	—
D ₆ 组	8	-1.19	1.71	1.68	1.14	1.04	0.75	—	—	—
D ₉ 组	8	0.16	2.61	1.99	3.38	0.74	1.61	0.60	0.35	-0.93
N ₁ 组	8	9.72	16.41	24.18	33.48	43.84	52.61	62.38	70.51	81.35

2.1.2 腹泻率比较 各模型组在 48h 内腹泻率达 100%,并持续至造模结束。N₁ 组粪便呈干燥颗粒状,腹泻率为 0。各模型组与 N₁ 组间腹泻率之差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.1.3 肠组织病理学观察 光镜下可见,N₁ 组肠绒毛排列密集,呈指状,柱状上皮细胞排列整齐,间质未见炎细胞浸润。D₃ 组肠绒毛多呈指状,上皮细胞排列整齐,间质少见炎细胞浸润。D₆ 组肠绒毛萎缩、变短、乃至融合,多呈花叶状。上皮细胞排列紊乱,部分可见间质淋巴细胞浸润。D₉ 组肠黏膜损伤明显加重,部分肠绒毛萎缩、融合低平,或脱落、缺损,上皮细胞排列紊乱,间质可见大量炎细胞浸润。

总结以上结果,将模型制备周期确定为 6 天。需利用 OB 结果检测调整应激次数。

2.2 实验动物体重的确定

2.2.1 各组大鼠体重增长率比较 表 2 示,随体重增长,各体重对照组(N₆₅组、N₁₂₅组和 N₁₅₀组)体重增长趋缓。与相应体重对照组比较,各模型组体重增长率明显下降($P<0.05$),其中 C₆₅ 组表现为体重增长缓慢,C₁₂₅ 组和 C₁₅₀ 组呈现负增长。

表2 不同体重模型组与对照组造模不同时间体重增长率比较(%)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
C ₆₅ 组	8	-1.19	1.71	1.68	1.14	1.04	0.75
N ₆₅ 组	8	9.72	16.41	24.18	33.48	43.84	52.61
C ₁₂₅ 组	8	-6.20	-10.93	-13.71	-12.77	-12.36	-13.30
N ₁₂₅ 组	8	3.42	9.93	17.59	22.21	28.42	33.99
C ₁₅₀ 组	8	-6.31	-8.85	-9.81	-9.29	-8.31	-9.68
N ₁₅₀ 组	8	3.28	6.53	10.73	13.61	17.48	21.22

表3 不同体重组大鼠第6天体重增长率比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体重增长率	组别	鼠数	体重增长率
N ₆₅ 组	8	52.61±5.35	C ₆₅ 组	8	0.75±4.02
N ₁₂₅ 组	8	33.99±4.13**	C ₁₂₅ 组	8	-13.30±3.76△△
N ₁₅₀ 组	8	21.22±8.73**	C ₁₅₀ 组	8	-9.68±1.33△△

注:与 N₆₅ 组比较, ** $P<0.01$;与 C₆₅ 组比较;△△ $P<0.01$

表 3 示,至模型制备结束,N₆₅、N₁₂₅、N₁₅₀ 组间体重增长率具有统计学差异($P<0.01$),体重与体重增长率呈显著性负相关($r=-0.915$);且 C₆₅ 与 C₁₂₅、C₁₅₀ 组

间差异具有统计学意义($P<0.01$),但 C₁₂₅、C₁₅₀ 组间无统计学差异($P<0.05$)。

2.2.2 腹泻率、腹泻潜伏期和腹泻指数比较 表 4 示,高乳糖饲料喂饲 24h 内,不同体重模型组部分实验鼠出现淡黄色溏便,48h 后腹泻率达 100%。各组间腹泻潜伏期无统计学差异($P>0.05$)。表 5 示,不同体重大鼠腹泻指数间差异无统计学意义($P>0.05$)。可选用体重为(150±10)g 的大鼠为实验对象。

表4 不同体重组大鼠腹泻潜伏期比较[只(%)]

组别	鼠数	0~12h	12~24h	24~36h	36~48h
C ₆₅ 组	8	0	3(37.5)	4(50.0)	1(12.5)
C ₁₂₅ 组	8	0	2(25.0)	3(37.5)	3(37.5)
C ₁₅₀ 组	8	0	3(37.5)	3(50.0)	2(25.0)

表5 不同体重实验大鼠腹泻指数比较($\bar{x}\pm s$)

造模天数	鼠数	C ₆₅	C ₁₂₅	C ₁₅₀
2	8	1.03±0.04	0.85±0.16	0.98±0.19
3	8	1.19±0.16	1.07±0.07	1.17±0.12
4	8	1.23±0.11	1.24±0.12	1.23±0.17
5	8	1.23±0.08	1.32±0.15	1.28±0.28
6	8	1.17±0.06	1.22±0.10	1.24±0.16

2.3 不同致泻因素比较

2.3.1 体重增长率比较 表 6 示,与空白对照 2 组比较,高乳糖组和高乳糖+应激组均出现体重负增长,随模型制备时间延长,体重持续下降;应激组体重增长缓慢。

表6 不同致泻因素动物模型体重增长率比较(%)

组别	鼠数	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
应激组	8	-0.62	-1.05	0.84	0.001	2.21	5.36
高乳糖组	8	-4.76	-7.8	-8.54	-8.6	-9.13	-9.76
高乳糖+应激组	8	-6.31	-8.8	-9.81	-9.2	-8.30	-9.67
空白对照2组	8	3.28	6.53	10.73	13.61	17.47	21.22

2.3.2 腹泻率、腹泻潜伏期及腹泻指数比较 高乳糖组和高乳糖+应激组 48h 后腹泻率均达 100%。而应激组仅于束缚应激过程中出现排便次数增多,粪便仍呈颗粒状,因粪便水分有所增加,颗粒增大。表 7 示,高乳糖组较高乳糖+应激组腹泻指数有降低趋势,与两组间体重增长率变化趋势相近。在实验第 2 天至第 4 天,两组腹泻指数差异有统计学意义($P<0.05$)。而至第 5、6 天差异无统计学意义($P>0.05$)。总之,将高乳糖饲料与束缚应激相结合可加重腹泻程度。

2.4 模型验证实验

表 8 示,与验证对照组比较,验证模型组 5-HT 浓度降低($P<0.01$),LDH 活力下降($P<0.05$),AQP4 浓度增高($P<0.05$)。

表 7 高乳糖组与高乳糖+应激组不同造模时间腹泻指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
高乳糖组	8	0.68 $\pm$ 0.30	1.03 $\pm$ 0.47	1.07 $\pm$ 0.07	1.16 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.05
高乳糖+应激组	8	0.99 $\pm$ 0.19*	1.14 $\pm$ 0.11*	1.27 $\pm$ 0.21*	1.28 $\pm$ 0.23	1.27 $\pm$ 0.21

注:与高乳糖组比较,* $P<0.05$

表 8 验证实验两组大鼠 5-HT、LDH、AQP4 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	5-HT ($\mu\text{mol/L}$)	LDH (U/gprot)	AQP4 (ng/ml)
验证实验组	8	5.76 $\pm$ 0.62	2828.96 $\pm$ 296.77	6.60 $\pm$ 2.31
验证模型组	8	4.56 $\pm$ 0.49**	2394.89 $\pm$ 334.73*	14.88 $\pm$ 5.94*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

本研究以束缚应激法导致实验动物情志不遂,以喂饲高乳糖饲料模拟饮食积滞,将两者相结合,以建立符合中医肝脾不调型 IBS-D 大鼠模型。首先选择第 3、6、9 天 3 个时间点制备动物模型。结果表明,3 天组模型,由于造模时间短,动物刚发生腹泻,其身体状况接近空白对照组,不适用于药效学分析;9 天组模型,由于造模周期较长,动物持续腹泻,身体状况极差,已超出 IBS-D 范畴;6 天组腹泻状况稳定,体质状况尚可,肠组织病理表现接近正常,与人类 IBS 表现相一致。故造模周期确定为 6 天。

其次对不同体重动物模型进行比较。对于高乳糖饲料喂饲诱导腹泻的模型,文献多以乳鼠为实验动物。但本实验在叠加精神应激因素后,由于乳鼠对应激反应的个体差异较大,势必影响药物作用机理的研究,考虑与乳鼠神经发育尚未健全有关。为此探讨通过增加周龄,即选择较大体重大鼠复制 IBS-D 模型。结果表明,与低体重模型鼠比较,高体重模型鼠不仅腹泻率、腹泻潜伏期、腹泻指数表现相近,且应激反应、体能耐受程度均明显优于前者。虽然 C₁₂₅ 组和 C₁₅₀ 组体重增长率显著低于 C₆₅ 组,分析与低体重鼠正处于生长旺盛阶段有关。而 C₁₂₅ 组和 C₁₅₀ 组无统计学差异,因此,证实以高体重鼠代替乳鼠具有可行性。

再次对不同致泻方法进行对比。因大鼠体内缺少乳糖酶,摄入的乳糖在体内蓄积,实验动物即出现持续性水样泻^[7]。应激是神经体液调节的一种复杂反应,可导致胃肠功能失调,从而引发排便异常^[8]。本实验通过体重、腹泻情况等比较,证实两种因素联合作用,实验动物的腹泻程度较单一因素明显加重,且符合临床 IBS 病因复杂多样的特点。

为突出中医“证型”的统一标准,保持每只动物表现相近的证候,避免出现较大的个体差异,本研究改变常规模型制备严守统一时间点的方法,将粪便 OB 检测作为把握应激强度的标准。即当粪便 OB 出现弱阳性(±)时,中止应激。

通过多层次比较,本研究确定以体重(150 $\pm$ 10)g 大鼠为实验对象,采用高乳糖饲料喂饲与束缚应激相结合的致泻方法,实验周期为 6 天,复制 IBS-D 动物模型。并通过检测血清 5-HT 含量、小肠黏膜 LDH 活力、结肠 AQP4 含量,对模型进行验证。

5-HT 是机体内重要的血管活性物质和神经递质,参与胃肠运动、感觉、分泌等过程,与 IBS 密切相关;LDH 作为无氧情况下糖酵解过程中的催化酶,是反映细胞内糖无氧酵解水平的客观指标;AQP 表达超过或低于正常水平,则出现局部或全身水平紊乱。其中 AQP4 在结肠近端呈强阳性表达^[9]。本研究结果提示,模型组 5-HT、LDH 均显著降低,而 AQP4 显著升高,证实本模型存在胃肠动力异常、肠代谢功能减退、结肠水液蓄积等病理变化,可作为 IBS-D 发病中符合情致失调和胃肠功能紊乱互动特征的动物模型。因客观条件所限,本研究采用将实验鼠捆绑的方法模拟情志致病,如能使动物在可自主活动的状态下出现恐惧、忧虑的情绪变化,则能更接近疾病的病理生理过程。

参考文献

- [1]莫剑忠,袁耀宗,邹多武. 消化系功能性和动力障碍性疾病[M]. 上海:上海科学技术出版社,2005:280-298.
- [2]徐俊荣,罗金燕,尚磊. 大鼠肠易激综合征肠黏膜下神经丛可塑性的研究[J]. 中华消化杂志,2007,27(2):107-111.
- [3]徐海珍,谢建群,施斌. 腹泻型肠易激综合征大鼠结肠黏膜炎性细胞因子的表达及温中健脾方对其影响的研究[J]. 上海中医药杂志,2007,41(6):69-72.
- [4] Nieto N, Mesa MD, Lopez-Pedrosa JM, et al. Contribution of polyunsaturated fatty acids to intestinal repair in protein-energy malnutrition [J]. Dig Dis Sci, 2007,52(6):1485-1496.
- [5]杨蒙蒙,罗佳波. 止泻退热分散片主要药效学实验研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(2):418-419.
- [6]张秀明,顾仁俊,张中兴,等. 血清 5-羟色胺的快速荧光测定法[J]. 上海医学检验杂志,1994,9(1):21-22.
- [7]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1340.
- [8]石君杰. 宁肠汤对肠易激综合征大鼠自由基影响的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(2):323-325.
- [9]汪泳,张方信,令晓玲,等. 大鼠结肠中水通道蛋白 4 的表达与分布[J]. 第四军医大学学报,2004,25(2):142-143.

(收稿日期:2009-03-24;修回日期:2009-08-02)

[编辑:行之]