

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.24.011

腹泻型肠易激综合征脾肾阳虚证
小鼠模型的建立与验证邓娜, 谢诗琴, 谭周进[✉]

湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市岳麓区学士路300号, 410208

[摘要] **目的** 探索腹泻型肠易激综合征(IBS-D)脾肾阳虚证小鼠病证结合模型的建立方法。**方法** 模型建立:将20只小鼠随机分为正常组和模型组,每组10只。模型组给予0℃冰腺嘌呤混悬液50 mg/(kg·d)灌胃14天+离心管束缚加间断夹尾刺激7天+0℃冰番泻叶水煎液10 g/(kg·d)灌胃5天制备IBS-D脾肾阳虚证模型。正常组给予无菌水0.4 ml灌胃,每日1次,连续14天。观察两组小鼠一般行为学特征,比较饮食量、粪便含水率、体重、肛温,造模后检测疼痛阈值、胃残留率、肠推进率,血清短链脂肪酸(SCFAs)、5-羟色胺(5-HT)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)、D-木糖含量。模型验证:将40只小鼠随机分为空白组10只,造模组30只,造模组按照上述方法造模成功后分为模型对照组、四神丸组和匹维溴铵组,每组10只。四神丸组给予四神丸水煎液5 g/(kg·d)灌胃,匹维溴铵组给予21.63 mg/(kg·d)匹维溴铵溶液灌胃,空白组、模型对照组给予0.70 ml/d无菌水灌胃,均连续7天。检测指标同模型建立。**结果** 模型组小鼠精神状态较差,嗜睡,毛发无光泽,粪便稀软。与正常组比较,模型组小鼠饮食量显著降低,粪便含水率显著升高;造模第14天小鼠体重增长率、肛温显著降低;造模14日后,模型组小鼠小肠推进率及血清SCFAs、5-HT含量均升高,血清ACTH、CORT、D-木糖含量皆降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。模型验证结果显示,四神丸组小鼠精神状态、活跃度、皮毛光滑度、喜蜷缩聚集症状均改善,匹维溴铵组上述症状体征改善不明显。与模型对照组比较,四神丸及匹维溴铵组小鼠粪便含水率皆降低、饮食量均升高;第4天小鼠体重增长率、肛温均升高;给药第7天,匹维溴铵组肛温明显低于四神丸组,四神丸组小鼠血清SCFAs、5-HT含量均降低,ACTH、CORT、D-木糖含量皆上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),匹维溴铵组小鼠5-HT降低、CORT含量上升($P<0.01$)。**结论** 冰腺嘌呤叠加冰番泻叶灌胃联合夹尾和离心管束缚可成功构建IBS-D脾肾阳虚证病证结合模型。

[关键词] 腹泻型肠易激综合征;脾肾阳虚证;病证结合动物模型;腺嘌呤;番泻叶;束缚加夹尾刺激;四神丸

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛、腹胀、粪便性状及排便频率异常为主要临床表现的功能性胃肠疾病。该病的全球发病率约为9.2%,其中腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome-diarrhea, IBS-D)占IBS患者的70%以上^[1]。IBS-D病程长,难治愈,易复发,属中医学“泄泻”范畴,其中脾肾阳虚型IBS-D发病率占

比达13.1%,且近年呈上升趋势^[2]。目前IBS-D脾肾阳虚证常用的造模方法多不符合中医病因病机,或者操作困难、造模周期长达40~75天^[3]。制作符合中医病因病机的病证结合动物模型是中医方药研究及治则治法研究的关键前提。因此,本研究拟通过中西药合用叠加冰冷刺激联合心理应激刺激的方法制作脾肾阳虚IBS-D小鼠模型,既考虑了IBS-D的发病因素,也考虑了脾肾阳虚证的产生机理,且模型制作仅需14天,大大缩短了造模时间,且选用小鼠制作,价格相对大鼠低廉,且束缚、夹尾等刺激使用小鼠更易操作,有助于快速构建短时有效

基金项目:湖南省创新型省份建设专项(2024JJ6346);中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(23PT-KF1020)

✉ 通讯作者:tanzhjin@sohu.com

的 IBS-D 脾肾阳虚证动物模型，并应用“以方测证”法，选取脾肾阳虚证方证相应方剂“四神丸”对模型进行验证，旨在为建立符合中医病因病机的、简便易操作的 IBS-D 脾肾阳虚证动物模型提供方法参考。本实验经过湖南中医药大学动物伦理委员会批准（伦理编号：LL2023081010）。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性昆明种小鼠 60 只，体质量 (20 ± 2) g，由湖南斯莱克斯实验有限公司提供，质量合格证号：ZS-2023009190015。小鼠饲养在湖南中医药大学实验动物中心，在屏障环境下进行实验，室温 $23 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $50\% \sim 70\%$ ，每日光照/黑暗循环 12 h，自由饮食及饮水。

1.2 药物

腺嘌呤（长沙雅尔生物科技有限公司，批号：EZ7890C450），将 20 mg 腺嘌呤溶于 0.4 ml 0°C 无菌水中配置成 5 mg/ml 腺嘌呤混悬液。匹维溴铵片（法国苏威制药公司，批号：HJ20163096），取匹维溴铵片研碎后过筛，加入蒸馏水配制成 2.163 g/ml 的溶液， 4°C 保存。番泻叶（安徽普仁中药饮片有限公司，批号：2005302），按 100 g 加沸水 400 ml 的比例浸泡 30 min 后再煮 3 min，浓缩成含生药 1.0 g/ml 的水煎液， 0°C 保存。

四神丸组成：补骨脂 12 g，肉豆蔻 6 g，吴茱萸（浸炒）3 g，醋五味子 6 g，生姜 6 g，大枣 6 g。饮片由湖南君昊中药饮片科贸有限公司提供，批号分别为 HY21012203、湘 20160113、2020082806、HY21020306、2103120084、170905。按上述用药比例称取各味中药，予 5 倍量水浸泡 30 min，武火煮沸后转文火煎煮 30 min，用纱布滤出药液，再加 200 ml 水至药渣中，同法煎煮取滤液，将两次药液混合浓缩成含生药 1.0 g/ml 的水煎液， 4°C 保存。

1.3 主要试剂及仪器

ELISA 试剂盒：短链脂肪酸（SCFAs，批号：JM11498M1）、五羟色胺（5-HT，批号：JM02726M1）、促肾上腺皮质激素（ACTH，批号：JM02837M1）、皮质酮（CORT，批号：JM02344M1）、D-木糖（D-xylose，批号：JM12962M2），江苏晶美生物科技有限公司；异氟烷（批号 2023052902），山东安特牧业科技有限公司；活性炭（批号：Q/12HB 5029-2015），天津市津南区咸水沽镇工业区。

5810R 台式大容量通用冷冻离心机（德国 Ep-

pendorf 公司）；R520IP 麻醉机（中国瑞沃德公司）；SPARK 多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；XY1000-2C 体重秤（常州市电子设备有限公司）；YD-206 医用电子体温计（温州友尚医疗科技有限公司）。

1.4 模型建立

20 只 SPF 级雌性昆明种小鼠适应性喂养 3 日后，按随机数字表法分为正常组 10 只，模型组 10 只。造模方法参照本课题组前期肾阳虚 IBS 模型制作中优势模型组方法及文献 [4-5] 进行优化。从造模第 1 天开始，模型组小鼠给予 0°C 腺嘌呤混悬液 50 mg/（kg·d）灌胃，每日 1 次，连续 14 天；从造模第 8 天开始给予离心管束缚加间断夹尾刺激，束缚及间断夹尾时间均为 1 h，连续 7 天；从第 10 天开始，给予 0°C 冰番泻叶水煎液 10 g/（kg·d）灌胃，每日 1 次，连续 5 天。正常组小鼠给予 0.4 ml 无菌水灌胃，每日 1 次，连续 14 天。

1.5 模型验证

40 只 SPF 级雌性昆明种小鼠适应性喂养 3 天后，按随机数字表法分为空白组 10 只，造模组 30 只。造模后将造模组分为模型对照组、四神丸组、匹维溴铵组，每组 10 只。四神丸组小鼠给予四神丸水煎液 5 g/（kg·d）灌胃（根据《中药药理研究方法学》[6] 中实验动物与人用药量的换算方法换算出等效剂量），匹维溴铵组小鼠给予临床等效剂量 21.63 mg/（kg·d）的匹维溴铵溶液灌胃（按 60 kg 成人每日 150 mg 进行换算），模型组和空白组小鼠给予 0.70 ml/d 蒸馏水灌胃。各组均每日灌胃 2 次，连续 7 天。

1.6 观察指标及方法

根据 IBS-D 脾肾阳虚证的临床表现，结合《中医临床病证诊断疗效标准》[7]、《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见（2017）》[8]、《<2020 年中国肠易激综合征专家共识意见>解读》[9]、《病证结合脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠模型的建立与评价》[3] 拟定小鼠 IBS-D 脾肾阳虚证模型宏观体征诊断标准：大便稀溏或完谷不化，纳差，消瘦，形寒肢冷，懒动、神态萎靡，对疼痛刺激高敏感，据此确定以下观察指标。

1.6.1 一般情况 实验过程中观察小鼠的一般行为，包括精神状况、活跃程度、皮毛色泽、爪甲颜色、粪便形态、肛周洁净情况等，每天检测饮水量。每天固定时间添加定量的饲料（600 g），24 h 后测定剩余的饲料量。日平均饮食量（g）=（加料量-剩余量）/鼠数。

1.6.2 体重、肛温 在模型建立阶段的第 1、4、7、11、14 天及模型验证阶段的第 1、4、7 天检测小鼠体重、肛温，并计算体重增长率。分别以造模或给药第 1 日所测体重为初始体重，体重增长率=（当次实测体重-初始体重）/初始体重×100%。

1.6.3 粪便含水率 在模型建立阶段的第 10~14 天及给药的第 1~7 天，收集小鼠每天同一时段的新鲜粪便，每组同一笼盒内 5 只小鼠的样本收集为一份，称量并记录样本的湿重，110℃加热烘干至恒重，称记干重，并计算粪便含水率。粪便含水率=（湿重-干重）/湿重×100%。

1.6.4 疼痛阈值 在造模及给药最后一天，采用随机数字表法在每组选取 4 只小鼠测定疼痛阈值，各组小鼠禁食、不禁水 18 h，然后采用异氟烷吸入麻醉（浓度为 5%、气流速度 0.2 L/min，观察小鼠的状态对浓度稍作调整），再将涂有石蜡油且带气囊的 6F 导尿管（导尿管外连接注射器用于向气囊内注水）经肛门插入，使气囊末端距离肛门 1 cm，并将其固定在小鼠的尾根部。然后将小鼠放入自制的透明塑料笼盒子内（20 cm×6 cm×6 cm），以限制小鼠使其不能转身，仅能前后运动。待小鼠完全苏醒后先适应环境 15 min，再记录引起小鼠疼痛的最小注水量，即疼痛阈值（以小鼠腹背部肌肉出现强烈收缩或腹部抬离地面作为其疼痛阈值表现），具体参考文献[10]进行。

1.6.5 胃残留率和小肠推进率 小鼠禁食满 24 h 后，每只小鼠灌胃添加了 1% 碳粉的半固体营养糊 0.4 ml，20 min 后脱颈椎处死，结扎幽门、贲门和回盲部，分离肠系膜，剪取全胃和小肠，称量胃及内容物的全重。将取出的胃剪开，洗去附着的糊状物，洗干净后放置于吸水纸上吸干，称其胃净重。将取出的小肠测量其肠管长度以及从幽门至黑色半固体糊前沿的推进长度，计算胃残留率和小肠推进比。胃残留率=（胃全重-胃净重）/碳末半固体糊质量×100%；小肠推进比=（推进长度/小肠总长度）×100%。

1.6.6 ELISA 法检测血清中 SCFAs、5-HT、ACTH、CORT、D-木糖的含量 在无菌条件下对每组剩余的 6 只小鼠进行眼眶取血，分离血清，使用 ELISA 试剂盒检测血清中 SCFAs、5-HT、ACTH、CORT、D-木糖含量，严格按照试剂盒操作步骤进行检测。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，方差齐

的样本两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验；方差不齐则多组间比较采用 Welch 近似 *F* 检验，两两比较采用 Dunnett's *T* 法。数据不符合正态分布则以中位数和四分位间距 [*M* (*Q*₁, *Q*₃)] 表示，两组间数据比较采用非参数检验中 Mann-Whitney 检验，多组间比较采用非参数检验中 Kruskal Wallis 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IBS-D 脾肾阳虚证造模结果

2.1.1 造模阶段小鼠一般情况 造模期间，正常组小鼠精神状态良好，反应灵活，毛发平整光滑，爪甲颜色正常，肛周洁净，粪便软硬适中、呈黑褐色，用镊子夹取不变形、不沾镊，滤纸上按压粪便不易变形，未见明显透纸水渍迹。模型组小鼠嗜睡懒动，喜聚集扎堆，蜷缩拱背，反应迟缓，毛发稀疏脱落，爪甲颜色较淡，肛周毛发污秽，粪便湿度增大、呈黄褐色，用镊子夹取易变形、沾镊，滤纸上按压粪便易变形，有明显透纸水渍迹。

2.1.2 造模阶段两组小鼠不同时间饮水量比较 图 1 示，与同期正常组比较，模型组饮水量整体呈现降低趋势（ $F=13.99$, $P<0.001$ ）。

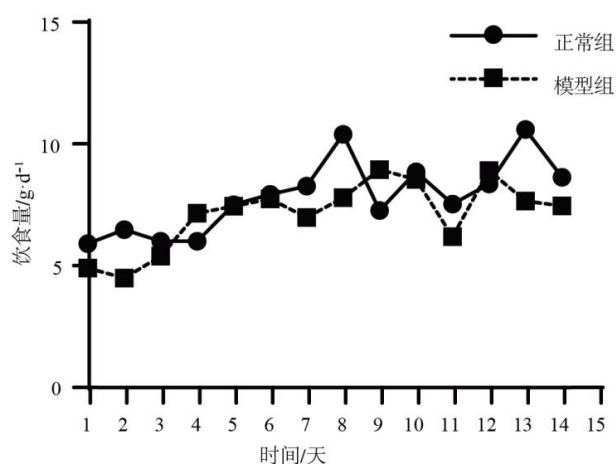


图 1 造模阶段模型组和正常组小鼠不同时间饮水量比较
Figure 1 Comparison of food intake between the model group and the normal group at different timepoints during the modeling period

2.1.3 造模阶段两组小鼠第 10~14 日粪便含水率比较 图 2 示，与同期正常组比较，模型组粪便含水率整体呈上升趋势（ $F=7.765$, $P=0.024$ ）。

2.1.4 造模阶段两组小鼠不同时间体重增长率比较 表 1 示，与同期正常组比较，造模第 4、7 天，模型组小鼠体重增长率升高（ $P<0.05$ ），造模第 14 天，模型组小鼠体重增长率降低（ $P<0.01$ ）。

表 1 造模后不同时间两组小鼠体重增长率比较

Table 1 Comparison of body weight growth rate of two groups of mice at different timepoints after modeling [% , ($\bar{x}\pm s$)/ $M(Q_1, Q_3)$]					
组别	鼠数	造模第 4 天	造模第 7 天	造模第 11 天	造模第 14 天
正常组	10	6.55 (5.83, 4.66)	12.72 $\pm$ 7.17	20.79 $\pm$ 7.60	20.51 $\pm$ 6.74
模型组	10	9.44 $\pm$ 2.14 ^{a)}	21.12 $\pm$ 5.97 ^{a)}	15.63 $\pm$ 6.10	9.62 $\pm$ 8.34 ^{b)}

注: a) 与同时时间正常组比较, $P<0.05$; b) 与同时时间正常组比较, $P<0.01$ 。

表 2 造模后不同时间两组小鼠肛温比较

Table 2 Comparison of rectal temperature of two groups of mice after modeling [°C, ($\bar{x}\pm s$)/ $M(Q_1, Q_3)$]						
组别	鼠数	造模第1天	造模第4天	造模第7天	造模第11天	造模第14天
正常组	10	36.26 (36.4, 0.47)	36.82±0.29	37.15±0.37	36.45±0.47	36.65±0.51
模型组	10	36.42 (36.5, 0.52)	36.31±0.43 ^{a)}	36.60±0.32 ^{a)}	36.74±0.35	35.88±0.90 ^{b)}

注: a) 与同时时间正常组比较, $P<0.01$; b) 与同时时间正常组比较, $P<0.05$ 。

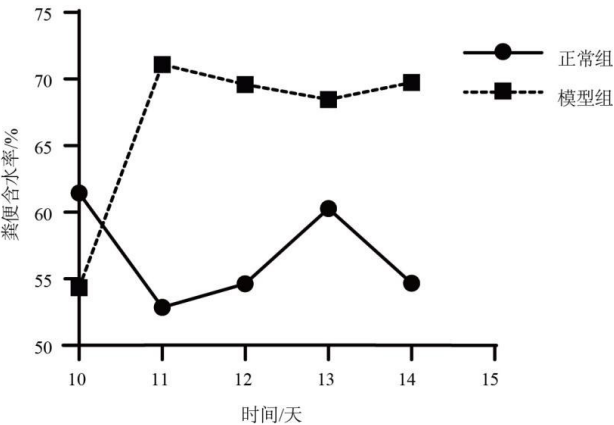


图 2 模型组和正常组小鼠不同时间粪便含水率比较
Figure 2 Comparison of fecal water content between the model group and the normal group at different timepoints

2.1.5 造模阶段两组小鼠不同时间肛温比较 表 2 示, 与同期正常组比较, 模型组小鼠肛温在造模第 4、7、14 天时显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.1.6 造模阶段两组小鼠胃肠运动及疼痛阈值测定比较 表 3 示, 与正常组比较, 模型组小鼠小肠推进率升高 ($P<0.01$), 胃残留率及疼痛阈值差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.1.7 造模阶段两组小鼠血清 SCFAs、5-HT、ACTH、CORT 及 D-木糖含量比较 表 4 示, 与正常组比较, 模型组血清 SCFAs、5-HT 含量皆上升, ACTH、CORT、D-木糖含量皆下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 3 两组小鼠造模 14 天后胃残留率、小肠推进率及疼痛阈值比较

Table 3 Comparison of gastric residual rate, small intestinal propulsion rate and pain threshold between the two groups of mice 14 days after modeling [$\bar{x}\pm s$ / $M(Q_1, Q_3)$]				
组别	鼠数	胃残留率/%	小肠推进率/%	疼痛阈值/ml
正常组	4	21.25 $\pm$ 4.33	43.33 $\pm$ 11.55	0.028(0.030, 0.008)
模型组	4	30.00 $\pm$ 7.36	83.74 $\pm$ 13.27 ^{a)}	0.015(0.015, 0.010)

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$ 。

2.2 IBS-D 脾肾阳虚证模型验证结果

2.2.1 模型验证阶段各组小鼠一般情况 模型验证期间, 空白组小鼠精神状态、自主活动情况等正常, 肛周洁净情况良好, 粪便性状正常。与空白组比较, 模型对照组小鼠精神状态差, 嗜睡懒动, 喜聚集扎堆, 蜷缩拱背, 反应迟缓, 毛发稀疏脱落, 爪甲颜色较淡, 肛周皮毛湿黏, 粪便湿度增大、呈黄褐色, 用镊子夹取易变形、沾镊, 滤纸上按压粪便易变形, 有明显透纸水渍迹。与模型对照组比较, 四神丸组小鼠精神状态、自主活动情况恢复, 毛发光滑度提高, 嗜睡懒动、聚集扎堆及蜷缩拱背现象改善, 匹维溴铵组上述症状体征恢复不明显。四神丸及匹维溴铵组小鼠肛周皮毛均恢复干爽, 粪便湿度变小、呈黑褐色, 其中四神丸组小鼠粪便使用镊子夹取不变形、不沾镊, 滤纸上按压粪便不易变形, 未见明显透纸水渍迹; 匹维溴铵组小鼠粪便使用镊子夹取稍有变形、少许沾镊, 滤纸上按压粪便稍

表 4 两组小鼠造模 14 天后血清 SCFAs、5-HT、ACTH、CORT 及 D-木糖含量比较

Table 4 Comparison of serum SCFAs, 5-HT, ACTH, CORT and D-xylose levels in the two groups of mice 14 days after modeling [$(\bar{x}\pm s)$ / $M(Q_1, Q_3)$]						
组别	鼠数	SCFAs/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	ACTH/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$	CORT/ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$	D-木糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组	6	57.56 $\pm$ 3.26	50.41 $\pm$ 2.37	73.06 $\pm$ 1.79	290.09 (290.21, 95.93)	3.58 $\pm$ 0.22
模型组	6	61.92 $\pm$ 3.25 ^{a)}	55.32 $\pm$ 3.07 ^{a)}	64.82 $\pm$ 4.06 ^{b)}	241.59 $\pm$ 20.80 ^{b)}	3.21 $\pm$ 0.29 ^{a)}

注: SCFAs, 短链脂肪酸; 5-HT, 五羟色胺; ACTH, 促肾上腺皮质激素; CORT, 皮质酮。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与正常组比较, $P<0.01$ 。

有变形, 未见明显透纸水渍迹。

2.2.2 模型验证阶段各组小鼠不同时间饮水量比较 图3示, 与空白组比较, 模型对照组饮水量随给药时间的增加整体呈现降低趋势; 与模型对照组比较, 四神丸组及匹维溴铵组饮水量随给药时间的增加整体呈现增加趋势 ($F=15.622, P<0.01$)。给药7天时, 四神丸组饮水量与空白组更为接近。

2.2.3 模型验证阶段各组小鼠不同时间粪便含水率比较 图4示, 与空白组比较, 模型对照组粪便含水率整体呈上升趋势; 与模型对照组比较, 四神丸组及匹维溴铵组粪便含水率整体呈现降低趋势 ($F=10.127, P=0.001$), 给药7天时, 四神丸组粪便含水率与空白组更为接近。

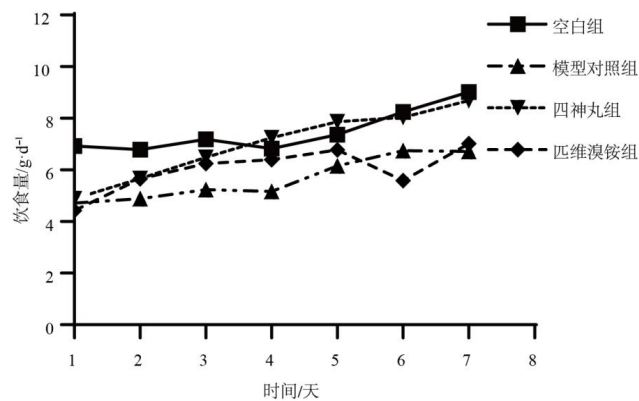


图3 各组小鼠不同时间饮水量比较

Figure 3 Comparison of food intake of mice in each group at different timepoints

2.2.4 模型验证阶段各组小鼠不同时间体重变化率比较 表5示, 与空白组同时间比较, 模型对照组小鼠体重增长率在给药第1、4、7天均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型对照组同时间比较, 四神丸组及匹维溴铵组小鼠体重增长率给药第1天均明显降低, 给药第4天均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。四神丸组与匹维溴铵组各时间点小鼠体重增长率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2.5 模型验证阶段各组小鼠不同时间肛温比较 表6示, 与空白组同时间比较, 模型对照组、

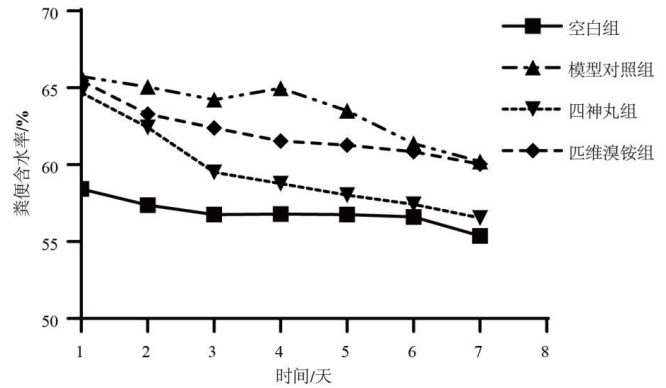


图4 各组小鼠不同时间粪便含水率比较

Figure 4 Comparison of feces water content of mice in each group at different timepoints

表5 各组小鼠给药后不同时间体重增长率比较

Table 5 Comparison of body weight growth rate of mice in each group at different timepoints after administration

(% , $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	给药第1天	给药第4天	给药第7天
空白组	10	25.17 $\pm$ 5.80	27.52 $\pm$ 4.33	26.47 $\pm$ 6.70
模型对照组	10	18.67 $\pm$ 1.25 ^{a)}	19.57 $\pm$ 2.88 ^{a)}	20.70 $\pm$ 2.83 ^{b)}
匹维溴铵组	10	13.82 $\pm$ 7.54 ^{c)}	26.59 $\pm$ 7.72 ^{d)}	23.91 $\pm$ 5.10
四神丸组	10	13.75 $\pm$ 4.03 ^{c)}	25.53 $\pm$ 5.70 ^{d)}	23.47 $\pm$ 6.59

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; c) 与模型对照组同时间比较, $P<0.05$; d) 与模型对照组同时间比较, $P<0.01$ 。

匹维溴铵组及四神丸组小鼠肛温在给药第1、4、7天均明显降低 ($P<0.01$); 与模型对照组同时间比较, 四神丸组小鼠肛温在给药第4、7天均明显升高, 匹维溴铵组在药第4天明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 给药第7天, 匹维溴铵组小鼠肛温明显低于四神丸组 ($P<0.05$)。

2.2.6 模型验证阶段各组小鼠胃肠运动及内脏敏感性比较 表7示, 各组小鼠胃残留率、小肠推进率及疼痛阈值差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2.7 模型验证阶段各组小鼠血清SCFAs、5-HT、ACTH、CORT及D-木糖含量比较 表8示, 与空白组比较, 模型对照组小鼠血清SCFAs上升,

表6 各组小鼠给药后不同时间肛温比较

Table 6 Comparison of rectal temperature of mice in each group at different timepoints after administration [$^{\circ}\text{C}$, ($\bar{x}\pm s$)/ $M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	给药第1天	给药第4天	给药第7天
空白组	10	36.74 $\pm$ 0.35	36.78 $\pm$ 0.23	36.55 $\pm$ 0.49
模型对照组	10	35.94 $\pm$ 0.69 ^{a)}	36.03 $\pm$ 0.30 ^{a)}	35.99 $\pm$ 0.34 ^{a)}
匹维溴铵组	10	36.06 $\pm$ 0.39 ^{a)}	36.32 $\pm$ 0.24 ^{a) d)}	36.21 (36.45, 1.53)
四神丸组	10	36.07 $\pm$ 0.22 ^{a)}	36.52 $\pm$ 0.30 ^{b) c)}	36.81 $\pm$ 0.30 ^{c) e)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; c) 与模型对照组同时间比较, $P<0.01$; d) 与模型对照组同时间比较, $P<0.05$; e) 与匹维溴铵组同时间比较, $P<0.05$ 。

表 7 各组小鼠给药 7 天后胃残留率、小肠推进率及疼痛阈值比较

Table 7 Comparison of gastric residual rate, small intestinal propulsion rate and pain threshold of mice in each group after 7 days of administration [$\bar{x}\pm s/M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	胃残留率/%	小肠推进率/%	疼痛阈值/ml
空白组	4	22.50±6.61	65.45±11.72	0.025(0.025, 0.010)
模型对照组	4	33.33±3.82	74.41±2.91	0.013(0.010, 0.010)
匹维溴铵组	4	26.67±7.64	64.11±2.54	0.023(0.020, 0.010)
四神丸组	4	26.67±6.29	67.11±13.33	0.023±0.010

ACTH、CORT 及 D-木糖含量皆明显下降 ($P<0.01$), 匹维溴铵组小鼠血清 SCFAs 上升, 5-HT、D-木糖含量皆下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 四神丸组 5-HT 含量下降 ($P<0.05$); 与模型对照组比较, 四神丸组小鼠血清 SCFAs、5-HT 含量皆下降, ACTH、CORT 及 D-木糖含量皆上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 匹维溴铵组小鼠血清 5-HT 含量下降, CORT 含量上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与匹维溴铵组比较, 四神丸组小鼠血清 SCFAs 含量下降, ACTH 含量上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

本研究通过冰腺嘌呤叠加冰番泻叶灌胃联合夹尾加离心管束缚制作脾肾阳虚 IBS-D 小鼠病证结合模型。IBS-D 发病机制复杂,《肠易激综合征中医诊疗专家共识意见(2017)》强调肝郁脾虚、气机失司是 IBS-D 发病的关键^[8]。夹尾加离心管束缚可对小鼠造成紧张、压力等心理刺激,导致气机失常,肝郁脾虚^[5]。而腺嘌呤被证实可用于构建肾阳虚模型^[4]。一方面,中医学认为肾为一身阳气之根,肾阳亏虚,不能助脾运化亦可发展为脾肾阳虚,另外番泻叶性寒味苦,是常用的苦寒泻下类中药,过服可损伤脾气,累及脾阳,使脾失健运,同时出现虚寒之象,加上冰冷刺激亦伤脾胃,药物的

寒凉之性与物理的冰冷刺激相结合可造成“过服寒凉之品,伤及脾阳”的病理基础^[11]。又因番泻叶致泄,久服不仅伤及脾阳,泄下过多亦可导致津液匮乏,形成便秘等变证。已有研究发现,采用番泻叶灌胃,前期表现为腹泻,后期反而引起排便困难^[12],故本研究仅在造模的最后 5 天灌胃番泻叶。应用此中西药合用叠加冰冷刺激联合心理应激的方法建立模型,并应用脾肾阳虚证经典名方四神丸以方测证对模型进行验证,既考虑了 IBS-D 疾病的发病因素,也考虑了脾肾阳虚证的发病机理,对于构建短时有效且符合中医因病机 IBS-D 脾肾阳虚证病证结合动物模型具有重要意义。

模型建立阶段,本研究结果显示,模型组小鼠精神状态差,反应迟缓,喜聚集扎堆,肛周毛发污秽,粪便湿度增大,有明显透纸水渍痕迹等脾肾阳虚 IBS-D 症状体征。与正常组比较,模型组饮水量明显降低,体重增长率逐渐下降,提示造模明显抑制了小鼠的摄食和体质量增长,这与 IBS-D 脾肾阳虚证“纳差,消瘦”相符合。粪便含水率是评价腹泻的客观指标,本研究发现,随着造模时间增加,模型组粪便含水率明显增加,体现了 IBS-D 脾肾阳虚证“大便稀溏”的病理表现;肛温检测结果显示,与正常组相比,模型组小鼠肛温在造模第 4、7、14 天时显著降低,这与 IBS-D 脾肾阳虚证“形寒肢冷”病理状态相符合。内脏高敏感和胃肠动力异常是各型 IBS 的关键共有特征,疼痛阈值常用来评价内脏高敏感,疼痛阈值越低提示内脏敏感性越高,胃残留率和肠推进率可用来评价胃肠动力。相关研究发现,SCFAs 参与内脏高敏感,在 IBS-D 呈升高趋势,而 5-HT 可通过调节胃肠分泌和蠕动影响内脏敏感性^[13-14]。本实验结果表明,模型组血清 SCFAs、5-HT 含量升高,小鼠的疼痛阈值降低,胃残留率和肠推进率均升高,说明造模使得小鼠的内

表 8 各组小鼠给药 7 天后血清 SCFAs、5-HT、ACTH、CORT 及 D-木糖含量比较

Table 8 Comparison of serum SCFAs, 5-HT, ACTH, CORT and D-xylose levels in mice in each group after 7 days of administration [$\bar{x}\pm s/M(Q_1, Q_3)$]

组别	鼠数	SCFAs/ng·ml ⁻¹	5-HT/ng·ml ⁻¹	ACTH/pg·ml ⁻¹	CORT/ng·ml ⁻¹	D-木糖/mmol·L ⁻¹
空白组	6	56.64±3.01	46.40±1.29	42.42±2.63	323.03±17.04	3.88±0.27
模型对照组	6	62.96±4.10 ^{a)}	48.10±1.74	38.22±2.52 ^{a)}	272.62±10.83 ^{a)}	2.90±0.19 ^{a)}
匹维溴铵组	6	63.96±1.92 ^{a)}	43.30 (43.97, 3.02) ^{b) d)}	39.46±2.94	329.48±33.77 ^{d)}	3.07±0.371 ^{a)}
四神丸组	6	58.27±2.53 ^{c) e)}	44.13±2.05 ^{b) d)}	42.94±1.89 ^{d) f)}	327.92 (320.64, 26.300) ^{c)}	3.40 (3.32, 0.24) ^{c)}

注: SCFAs, 短链脂肪酸; 5-HT, 五羟色胺; ACTH, 促肾上腺皮质激素; CORT, 皮质酮。
a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型对照组比较, $P<0.05$; d) 与模型对照组比较, $P<0.01$; e) 与匹维溴铵组比较, $P<0.01$; f) 与匹维溴铵组比较, $P<0.05$ 。

脏敏感性增高,胃肠动力异常,这可能是临床 IBS-D 表现“腹胀、腹痛、腹泻、完谷不化”的原因。血清 ACTH、CORT 水平可用来反映肾阳虚肾功能失常情况^[15],血清 D-木糖值可反映脾阳的运化功能^[16]。本研究结果显示,模型组小鼠血清 ACTH、CORT、D-木糖含量皆明显下降,说明模型组小鼠脾肾功能损伤,脾肾之阳不足。以上结果表明冰腺嘌呤叠加冰番泻叶灌胃联合夹尾和离心管束缚造模不仅符合 IBS-D 疾病内脏高敏感、腹痛、腹泻疾病特征,也与脾肾阳虚不足的体征和客观指标相符。

模型验证结果显示:给药后四神丸组小鼠的精神状态、自主活动情况恢复,毛发光滑度提高,嗜睡懒动、聚集扎堆及蜷缩拱背现象改善,肛温逐渐升高,匹维溴铵组上述症状体征恢复不明显,四神丸及匹维溴铵组小鼠体重增长率及饮食量均逐渐升高,粪便含水率下降,其中四神丸组与空白组更为接近。与模型对照组比,四神丸及匹维溴铵组小鼠胃残留率及小肠推进率均呈降低趋势,疼痛阈值均呈升高趋势,而 5-HT 含量均明显降低,SCFAs 含量仅四神丸组明显降低。同时四神丸给药可明显升高模型小鼠血清 ACTH、CORT 及 D-木糖含量,且与空白组接近,而匹维溴铵仅升高了模型小鼠血清 CORT 含量。临床上匹维溴铵组可用于改善 IBS-D 症状,并无温补脾肾阳气的疗效。四神丸是治疗脾肾阳虚泄泻的经典名方,方(四神丸)与证(脾肾阳虚证)相应,现代研究发现四神丸临床用于治疗 IBS-D 脾肾阳虚证效果显著^[17]。该研究中四神丸及匹维溴铵皆具有一定程度改善小鼠胃肠运动及提升疼痛耐受性趋势,并可通过降低粪便含水量和 5-HT 含量改善腹泻及内脏高敏感,发挥治疗 IBS-D 作用,同时四神丸能明显改善模型小鼠脾肾阳虚症状体征,还可有效促进小鼠脾肾之阳指标(ACTH、CORT、D-木糖)恢复,使其与空白组接近,而匹维溴铵组小鼠嗜睡懒动、聚集扎堆、肛温降低等脾肾阳虚症状体征改善均不明显,脾肾之阳指标中仅升高了模型小鼠血清 CORT 含量。说明本研究中的匹维溴铵针对该模型的 IBS-D 疾病疗效明显,而模型的中医证候及脾肾之阳指标并未因疾病症状改善而有效恢复,验证了该模型所对应的中医证候并不会因疾病向愈而有效改善,而四神丸对应模型的“病”和“证”均疗效显著,说明应用与(脾肾阳虚)证相应的方(四神丸)时能同时改善模型的疾病症状和相应中医证候,验证了该模型的中医证候与四神丸“证”相应。故本研究基于方(四神丸)

证(脾肾阳虚证)相应,通过“以方测证”法验证了该研究制作的模型符合 IBS-D 脾肾阳虚证。

综上,冰腺嘌呤叠加冰番泻叶灌胃联合夹尾和离心管束缚可成功构建 IBS-D 脾肾阳虚证病证结合动物模型。我们在检测反映内脏敏感性的宏观指标胃肠动力和疼痛阈值的基础上,结合了可调节内脏高敏感的微观指标 SCFAs、5-HT 及反映脾肾之阳的微观指标 ACTH、CORT、D-木糖进行评价,并采用以方测证法对模型进行了验证。以期在病证相关宏观症状体征的基础上,强化微观指标多样化,融合以方测证进行模型验证,构建高效完善的 IBS-D 脾肾阳虚证病证结合模型的建立方法。本研究还存在以下不足,基于方(四神丸)与证(脾肾阳虚证)相应,用四神丸以方测证来验证模型的过程中只设置了西药匹维溴铵进行对比,未能进一步设置“方证不相应”中药组来进行对比验证,需要在以后的研究中进一步深入。

参考文献

- [1] OKA P, PARR H, BARBERIO B, et al. Global prevalence of irritable bowel syndrome according to Rome III or IV criteria: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(10): 908-917.
- [2] 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.
- [3] 刘倩,韩博宇,苏晓兰,等. 三种脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征大鼠模型的比较[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(8): 959-965.
- [4] 李小雅,朱佳源,吴仪,等. 泄泻肾阳亏虚证小鼠模型的建立与验证[J]. 中医杂志, 2022, 63(14): 1368-1373.
- [5] 刘娅薇,吴仪,惠华英,等. 小鼠肝气乘脾泄泻模型的建立及痛泻要方的疗效[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(4): 1023-1027.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 1103-1105.
- [7] 王净净. 中医临床病证诊断疗效标准[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1993: 30-32.
- [8] 中华中医药学会脾胃病分会. 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.
- [9] 李彦楠,杨丽旋,赵钟辉,等. 《2020 年中国肠易激综合征专家共识意见》解读[J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(10): 1151-1155.
- [10] ED AL, KAWASKI M, PASRICHA PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroen

- terology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [11]李芹,张会永,吴天石,等. 脾阳虚证动物模型造模方法与模型评价的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(8): 1721-1728.
- [12]王婷,刘志勇,罗黎明,等. 当归生姜羊肉汤对脾肾阳虚型 IBS-D 大鼠中医证候的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 37-48.
- [13]SHAIDULLOV IF, SOROKINA DM, SITDIKOV FG, et al. Short chain fatty acids and colon motility in a mouse model of irritable bowel syndrome[J]. BMC Gastroenterol, 2021, 21(1): 37.
- [14]ASANO T, TANAKA KI, TADA A, et al. Ameliorative effect of chlorpromazine hydrochloride on visceral hypersensitivity in rats: possible involvement of 5-HT_{2A} receptor [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(19): 3370-3381.
- [15]唐维我,张会永,李芹,等. 肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(4): 1317-1324.
- [16]张广梅,李杰,吴萍,等. 血清 D-木糖与太阴病(脾阳虚证)“欲解时”及理中汤干预的研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4685-4688.
- [17]李珩,于慧娟,王克超. 督灸联合四神丸治疗腹泻型肠易激综合征脾肾阳虚证的疗效观察[J]. 中医药导报, 2022, 28(7): 90-95.

Establishment and Validation of a Mouse Model of Spleen-kidney Yang Deficiency Syndrome in Irritable Bowel Syndrome-diarrhea

DENG Na, XIE Shiqin, TAN Zhoujin

College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

ABSTRACT Objective To explore the method of establishing a disease-syndrome combined model of irritable bowel syndrome (IBS-D) with spleen and kidney yang deficiency in mice. **Methods** Model establishment: Twenty mice were randomly divided into a normal group and a model group, with 10 mice in each group. The model group was given 50 mg/(kg·d) of 0℃ ice adenine suspension by gavage for 14 days, plus tail-clamping stimulation and restrained in centrifuge tubes for 7 days, and 10 g/(kg·d) of 0℃ ice senna decoction by gavage for 5 days to prepare IBS-D spleen and kidney yang deficiency syndrome model. The normal group was given 0.4 ml of sterile water by gavage once a day for 14 days. Behavioral characteristics, food intake, fecal water content, body weight, and rectal temperature were observed in both groups. Pain threshold, gastric residual rate, intestinal propulsion rate, and the content of short-chain fatty acids (SCFAs), serotonin (5-HT), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT), and D-xylose in the serum were detected after modeling. Model validation: Forty mice were randomly divided into a blank group (n=10) and a modeling group (n=30). After successful modeling using the above method, the modeling group was divided into a model control group, *Sishen Pill* (四神丸) group, and pinaverium bromide group, with 10 mice in each group. The *Sishen Pill* group was given 5 g/(kg·d) of *Sishen Pill* decoction by gavage, and the pinaverium bromide group was given 21.63 mg/(kg·d) of pinaverium bromide solution by gavage, while the blank group and the model control group were given 0.70 ml/d of sterile water by gavage, all for 7 days. The indicators were detected as the same with model establishment. **Results** Mice in the model group had poor mental status, lethargy, dull hair and loose feces. Compared with the normal group, the model group exhibited reduced food intake and increased fecal water content; on the 14th day of modeling, the model group showed a slower body weight gain rate and decreased rectal temperature; after 14 days, the model group had increased small intestinal propulsion rate, and serum SCFAs and 5-HT levels with reduced serum levels of ACTH, CORT, and D-xylose ($P<0.05$ or $P<0.01$). Model validation indicated that the *Sishen Pill* group showed improvements in mental state, activity levels, fur smoothness and curling and gathering symptoms, while these symptoms in the pinaverium bromide group were not significantly improved. Compared to the model control group, the *Sishen Pill* group and pinaverium bromide group had reduced fecal water content and increased food intake, as well as increased body weight gain and elevated rectal temperature on day 4. On the 7th day of administration, the pinaverium bromide group showed lower rectal temperature than *Sishen Pill* group, and *Sishen Pill* group showed decreased serum SCFAs and 5-HT levels with increased ACTH, CORT, and D-xylose levels ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the pinaverium bromide group exhibited reduced 5-HT and elevated CORT level ($P<0.01$). **Conclusion** A combination of ice adenine plus ice senna leaf gavage, tail clamping, and centrifuge tube restraint can successfully establish a disease-syndrome combined mouse model of IBS-D with spleen-kidney Yang deficiency.

Keywords irritable bowel syndrome-diarrhea; spleen and kidney yang deficiency syndrome; animal model combining disease and syndrome; adenine; senna leaves; binding and tail clamping stimulation; *Sishen Pill* (四神丸)

(收稿日期: 2024-08-14; 修回日期: 2024-09-27)

[编辑: 王利芬]