

肝郁脾虚型肠易激综合征便秘大鼠模型的建立和评价

涂星^{1,2}, 柴玉娜¹, 唐洪梅^{2*}, 李得堂², 丘振文², 张庆业²

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

【摘要】 目的 筛选便秘型肠易激综合征动物模型的最佳建立方法,并探讨所建立模型的中医证候属性。方法 分别采用母婴分离法、冰水灌胃法、限水法、母婴分离结合冰水灌胃法、母婴分离结合限水法制作便秘大鼠模型,观察大鼠一般行为学变化、体重和 24 h 进食量,测定 4 h 内排便颗粒数,并对大鼠粪便进行 Bristol 分型积分和含水量测定,采用直肠扩张实验评价内脏敏感性,观察各组大鼠肠组织形学变化,筛选出符合 IBS-C 临床特征的动物模型建立方法。并采用复方中药逍遥散进行反证,判定模型的中医证候范畴。结果 采用母婴分离结合冰水灌胃法建立的模型具有排便颗粒数减少,粪便含水量降低, Bristol 分型积分显示为便秘型的特征,且其肠道敏感性显著升高,结肠组织无形态学改变,符合 IBS-C 的临床特征。经逍遥散验证,该 IBS-C 模型属于中医“肝郁脾虚证”范畴。结论 母婴分离结合冰水灌胃法能够建立中医肝郁脾虚证 IBS-C 大鼠模型,能高度拟合 IBS-C 的临床特征,造模成功率高。

【关键词】 便秘型肠易激综合征;肝郁脾虚证;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0030-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.006

Establishment and evaluation of a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome with liver-stagnation and spleen-deficiency

TU Xing^{1,2}, CHAI Yu-na¹, TANG Hong-mei², LI De-tang², QIU Zhen-wen², ZHANG Qing-ye²

(1. Guangzhou University of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. the First Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To create an optimal method for establishment of a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS-C), and evaluate the traditional Chinese medicine (TCM) syndrome in this generated IBS-C model. **Methods** One hundred and thirty-three SPF neonatal rats of 20 litters were used in this study. Using maternal separation (MS), ice water stimulation, water limitation, MS combined with ice water stimulation, and MS combined with water limitation to establish rat constipation model. The Chinese medicine Xiao-Yao powder was administered to the rat models. To observe the general behavior, body weight and daily food-intake, to measure the defecation numbers and water content of the feces within 4 hours, and the types of feces were assessed by Bristol stool scale. Colorectal distention test was used to assess the intestinal sensitivity, and histological examination using haematoxylin staining was performed to observe the alterations of intestinal tissues. **Results** MS combined with ice water stimulation was the best method to induce the rat models with decreased defecation number and decreased water content of feces. There were no obvious histological alterations in the intestinal tissue. The scores by Bristol stool scale indicated that the model was an IBS-C model with visceral hypersensitivity, and the results of Xiaoyao powder administration indicated that this IBS-C model met the requirement of clinical characteristics of liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome. **Conclusions** Maternal separation combined with ice water stimulation is a good method to successfully establish an IBS-C rat model with liver-stagnation and spleen-deficiency, highly simulating the clinical symptoms of this syndrome.

【Key words】 Constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS-C); Liver-stagnation and spleen-deficiency; Animal model; Rat

[基金项目] 国家自然科学基金(81073160);广东省自然科学基金项目(S2012010010539)。

[作者简介] 涂星(1987-),男,博士研究生,研究方向:中药新药开发与安全性评价。E-mail: kuangsheng1234@126.com。

[通讯作者] 唐洪梅,女,(1970-),教授,博士生导师,研究方向:中药新药开发与安全性评价。E-mail: tanghongmei2000@163.com。

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是常见的功能性肠病,临床上以腹痛或腹胀,常伴有排便习惯改变和(或)粪便性状改变为特征,多缺乏公认的形态学、生化指标或基因异常的改变,常分为腹泻型肠易激综合征、便秘型肠易激综合征和交替型肠易激综合征^[1-3]。IBS-C 属于中医“便秘”、“气秘”、“脾虚”等范畴,病机关键在于脾虚气滞,但与肝的关系密切。肝郁是本病的一个诱因,脾虚气弱是本病的一个基本病理过程,肝郁脾虚气滞是 IBS-C 发病的一个重要病理机制。肝与情绪恼怒变化关系最为密切,因肝为将军之官,不受遏郁,主疏泄气机,易为情志所伤,而肝木有病则气机拂郁,脾运化受制。因此,IBS-C 是因肝郁日久伤脾,加之素体脾气虚弱,中气不足,推动无力,气虚而滞导致大肠传导功能失常^[4-6]。

前期研究已完成了 IBS-D 动物模型的建立及评价,发现早期母婴分离能造成脑-肠轴功能的紊乱^[7,8],为本研究提供了借鉴。目前,便秘动物模型的建立多采用冰水灌胃法、黄连素或复方地芬诺酯诱导法、禁水不禁食法等^[9,10],前期研究表明,这些方法所建立的模型具有便秘的特征,其重复性和稳定性均较好,但无法复制 IBS-C 反复发作的临床特征,且停止刺激后动物可自愈,不适合应用于药效验证。本研究拟采用早期母婴分离诱导脑-肠轴功能紊乱,分别结合冰水灌胃法、限水法制作 IBS-C 大鼠模型,并建立其评价体系,筛选出最佳的 IBS-C 模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

剔除雌性的初生 SD 乳鼠 20 窝(133 只),SPF 级,购自广州中医药大学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0020】,与母鼠同笼,第 21 天后断奶并与母鼠分笼,实验操作在广州中医药大学第一附属医院 SPF 级实验设施中进行【SYXK(粤)2013-0092】,常规摄食饮水,光照为保持昼夜节律各 12h。温度控制在 18~24℃,相对湿度控制在 50%~70%,实验时室温维持在 24~26℃。

1.2 主要仪器与试剂

电子分析天平(日本岛津);烘箱(苏州台华烘箱设备有限公司);大鼠粪尿分离代谢笼(北京佳源兴业科技有限公司);Olympus-BX60 光学显微镜,Olympus-DP10 数码相机,均购于日本奥林巴斯公司;直肠扩张实验仪为本实验室自制。

1.3 动物分组

取 SD 大鼠 20 窝,按窝随机分为 6 组。A 组 3 窝 18 只,B 组 3 窝 23 只,C 组 3 窝 19 只,D 组 4 窝 26 只,E 组 3 窝 19 只,F 组 4 窝 28 只。其中 A 组作为正常组,B 组为母婴分离组,C 组为冰水灌胃组,D 组为母婴分离结合冰水灌胃组,E 组为限水组,F 组为母婴分离结合限水组。

1.4 造模方法

各组大鼠均从出生后适应性饲养 1 周,第 21 天断奶,雌雄分笼。分别按照以下方法造模:

母婴分离法^[11]:每天将乳鼠与母鼠分离,单笼饲养 180 min 后再与母鼠同笼饲养,共 14 天。

冰水灌胃法^[9]:给予大鼠 0~4℃生理盐水 2 mL 灌胃,每日 1 次,共 14 d。

限水法:采用普通饮水瓶手持辅助饮水,每天分两次给水,第一次给 1/3,第二次给 2/3,间隔 12 h。于开始限水第 1、2 天分别给予未限水前 5d 平均水量的 1/6,第 3~6 天给 1/5,第 7~10 天给 1/4,第 10~14 天给 1/3,取整数。

A 组正常饲养,不做任何处理;B 组从第 8~21 天进行母婴分离操作,之后正常饲养;C 组第 8~21 天正常饲养,第 22~35 天冰水灌胃;D 组第 8~21 天进行母婴分离,第 22~35 天冰水灌胃;E 组第 8~21 天正常饲养,第 22~35 天限水;F 组第 8~21 天进行母婴分离,第 22~35 天限水。

2 结果

2.1 模型的评价

2.1.1 大鼠一般行为及生理指标评价

造模结束后(第 36 天)观察并记录各组大鼠的毛色、大便、进食和饮水、精神状态等。结果 A 组活动快速,毛发浓密有光泽,进食和饮水正常,大便未见异常;B 组大鼠活动正常,毛发有光泽,进食和饮水正常,形体略有消瘦,可见便溏或便秘;C、D、E、F 组大鼠出现毛色无光泽且竖起、拱背、活动减少、易躁易怒、进食量减少、形体消瘦、大便数量减少且颗粒变小质地坚硬。分别随机抽取各组大鼠 10 只,测定各组大鼠体重及 24h 进食量,结果见表 1。

体重测定结果发现,母婴分离组和正常组大鼠体重差异无显著性($P>0.05$),而以冰水灌胃法、限水法及母婴分离结合冰水灌胃法、限水法的大鼠的体重较母婴分离组和正常组比较均显著降低($P<0.05$);与母婴分离组和冰水灌胃组比较,母婴分离

结合冰水灌胃法体重显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 与母婴分离组比较, 限水组和母婴分离结合限水组的体重均显著下降 ($P < 0.05$), 但限水组和母婴分离结合限水组的体重差异无显著性。

进食量的研究表明, 与正常组大鼠比较, 其他各组大鼠的 24 h 进食量均显著降低 ($P < 0.05$); 与母婴分离组比较, 冰水灌胃组、母婴分离结合冰水灌胃组和母婴分离结合限水组 24h 进食量显著降低 ($P < 0.05$); 母婴分离结合冰水灌胃组的 24 h 进食量显著低于冰水灌胃组 ($P < 0.05$), 但母婴分离结合限水组 24 h 进食量显著高于母婴分离结合冰水灌胃组 ($^dP < 0.05$), 与限水组的 24 h 进食量差异无显著性 ($P < 0.05$)。

2.1.2 粪便相关评价

每组取 3 只大鼠解剖, 观察各肠道粪便分布及形态。结果发现, A 组和 B 组大鼠回肠和结肠中可见呈软柱状大便, 空肠中无明显粪便残留; C、D、E、F 组大鼠粪便集中于结肠部, 多呈连珠状或球状, 色泽较深, 空肠和回肠无明显粪便残留。

依据前期研究^[8], 分别于造模结束后 (第 36 天) 随机抽取每组大鼠 10 只单独置于代谢笼中, 禁水禁食, 收集 4 h 内大鼠的粪便, 记录 4 h 内排便颗粒数, 根据 Bristol 大便性状图谱^[2] 记录大便形态, 并按照中国药典附录烘干法测定粪便含水量。结果见表 1。

表 1 各组大鼠的评价指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Evaluation of the indexes in rats of different groups

组别 Groups	一般生理学评价 General physiological evaluation		粪便评价 Evaluation of feces			肠道压力阈值 Pressure threshold mmHg
	体重 Weight g	进食量 Food-intake g/d	排便数 Defecate number 粒/只	Bristol 分值 Bristol scores	含水量 Water content/%	
A 组	149.541 ± 6.394	14.386 ± 1.098	19.50 ± 3.34	3.20 ± 0.42	43.0490 ± 1.8761	44.41 ± 1.77
B 组	145.828 ± 5.833	12.928 ± 1.056 ^a	19.70 ± 7.21	4.00 ± 1.89	45.9005 ± 7.3081	40.18 ± 0.98 ^a
C 组	133.571 ± 11.637 ^{ab}	11.407 ± 0.829 ^{ab}	11.10 ± 1.91 ^{ab}	1.80 ± 0.63 ^{ab}	36.8190 ± 2.8065 ^{ab}	39.95 ± 0.98 ^a
D 组	119.862 ± 8.437 ^{abc}	9.371 ± 0.709 ^{abc}	9.60 ± 1.51 ^{ab}	1.30 ± 0.48 ^{ab}	37.2849 ± 3.9192 ^{ab}	38.08 ± 1.33 ^{abc}
E 组	136.071 ± 5.681 ^{abd}	11.854 ± 0.681 ^{ad}	9.20 ± 2.35 ^{ab}	1.60 ± 0.70 ^{ab}	34.2111 ± 2.9649 ^{ab}	44.19 ± 1.34 ^{bcd}
F 组	134.013 ± 4.280 ^{abd}	11.530 ± 1.490 ^{abd}	7.20 ± 1.69 ^{abc}	1.60 ± 0.70 ^{ab}	33.7792 ± 2.3483 ^{ab}	39.42 ± 0.90 ^{ade}

注: 与 A 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 D 组比较, ^d $P < 0.05$; 与 E 组比较, ^e $P < 0.05$ 。

Note. ^a $P < 0.05$, compared with the group A. ^b $P < 0.05$, compared with the group B. ^c $P < 0.05$, compared with the group C. ^d $P < 0.05$, compared with the group D. ^e $P < 0.05$, compared with the group E.

2.1.4 结肠组织形态学观察

经解剖观察, C、D、E、F 组大鼠粪便多集中于结肠部, 空肠和回肠较少, 提示大鼠便秘状态可能与结肠组织功能改变有关。取各组大鼠的结肠 2cm, 生理盐水洗净, 浸入 5% 甲醛溶液中, 使用脱水机和包埋机对结肠标本进行石蜡包埋, 切成 2 μm 厚度的

切片, 苏木素染色, 置于光镜下观察。结果见图 1。由图 1 可见, 正常组、母婴分离组、冰水灌胃组、母婴分离结合冰水灌胃组结肠组织完整, 未见糜烂及溃疡, 杯状细胞形态和数量无显著改变, 未见水肿及炎细胞浸润。限水组和母婴分离结合限水组结肠组织完整, 未见糜烂和溃疡, 杯状细胞和数量无显著

2.1.3 肠道敏感性评价

于造模结束后第 36 天随机抽取各组大鼠 10 只, 参考前期研究^[8], 测定各组大鼠腹部回缩反射评分为 3 分时的压力阈值, 每只大鼠测定 3 次, 间隔 5 min。结果见表 1。由表 1 可知, 与 A 组比较, B、C、D、F 组的肠道压力阈值显著降低 ($P < 0.05$), E 组的压力阈值无显著改变 ($P > 0.05$); 与母婴分离组比较, 母婴分离结合冰水灌胃组的肠道压力阈值显著降低 ($P < 0.05$)。结果提示母婴分离法、冰水灌胃法、母婴分离结合冰水灌胃和母婴分离结合限水法均能导致肠道敏感性升高, 限水法对肠道敏感性无明显影响, 其中母婴分离结合冰水灌胃法的肠道超敏感性最为显著。

改变,但可见中性粒细胞减少和少量炎细胞浸润。

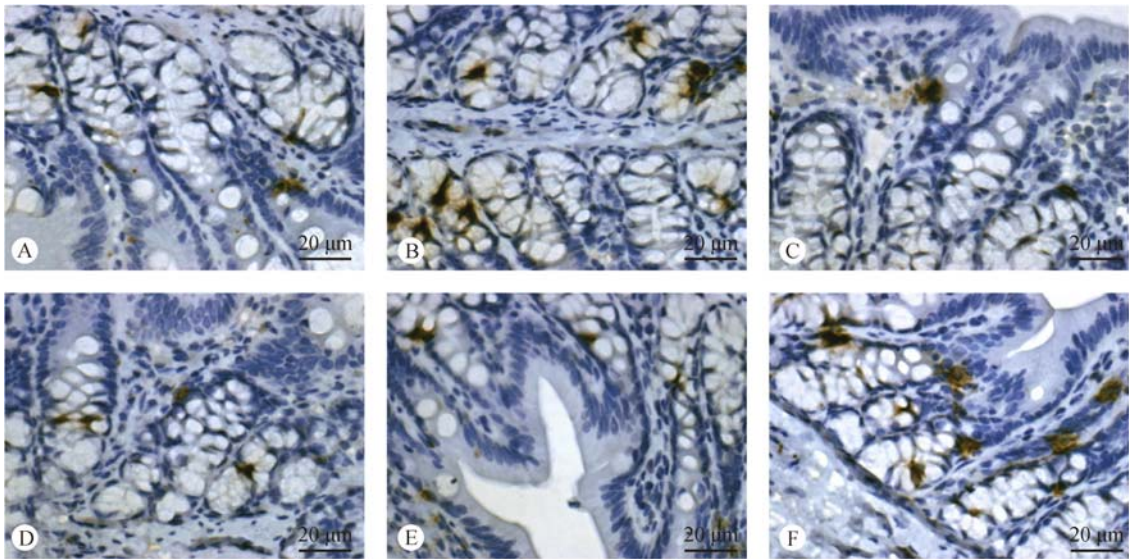


图 1 各组大鼠结肠组织切片图谱(苏木素染色,bar:20 μm/cm,×400)
Fig.1 Histopathological changes of intestinal tissues in the rats of different groups. Haematoxylin staining, 20μm/cm

2.4 模型的验证

根据 2.3 项下的模型评价结果,最终确定以母婴分离结合冰水灌胃法建立的大鼠模型为 IBS-C 模型。该 IBS-C 模型一般行为学表现出肝郁证和脾虚证的特点,具有排便颗粒数减少、粪便形态改变及粪便含水量显著降低等临床便秘的特征,肠道敏感性显著升高且肠组织无明显的病理改变,提示以该方法建立的模型能较高程度拟合 IBS-C 的临床特点,且表现出肝郁脾虚的中医证候特点。故采用具有疏肝解郁、理气健脾的名方逍遥散作为干预药物进行反证。

取乳鼠 3 窝 28 只,按照 2.1 项下母婴分离结合

冰水灌胃法建立 IBS-C 大鼠模型,并对模型进行评价,以排便颗粒数减少、粪便形态改变及粪便含水量显著降低,肠道敏感性显著升高的大鼠为成功的 IBS-C 模型,计算造模成功率为 82%。取符合要求的 IBS-C 模型大鼠 23 只,随机分为模型对照组和药物验证组。于造模结束当天,药物验证组每日给予逍遥散一包溶于 3 mL 蒸馏水灌胃给药,模型组每天灌胃蒸馏水 3 mL,持续一周。另取一窝 14 只健康乳鼠不作任何处理,在模型组和药物验证组给药时同法灌胃蒸馏水 3 mL。分别测定给药结束后排便颗粒数、Bristol 积分、粪便含水量和肠道压力阈值,结果见表 2。

表 2 各组大鼠粪便特征和肠道压力阈值的测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Measurement results of the colon pressure threshold and characteristics of feces in different groups

组别 Groups	n Cases	粪便评价 evaluation of feces			肠道压力阈值 Pressure threshold mmHg
		排便数 Defecate number 粒/只	Bristol 分值 Bristol scores	含水量 Water content %	
IBS-C 模型组 IBS-C model group	12	8.79 ± 1.34 ^a	1.17 ± 0.53 ^a	38.1376 ± 5.8341 ^a	39.12 ± 2.15 ^a
逍遥散验证组 Xiao-yao powder group	11	17.41 ± 3.34 ^{ab}	3.13 ± 0.72 ^{ab}	41.1546 ± 3.5463 ^{ab}	46.31 ± 4.35 ^a
正常组 Control group	14	20.36 ± 4.11	4.17 ± 1.02 ^a	45.1372 ± 2.1644	46.92 ± 2.61

注:与正常组比较,^a*P* < 0.05;与 IBS-C 模型组比较,^b*P* < 0.05。
Note. ^a*P* < 0.05, compared with the group A. ^b*P* < 0.05, compared with the group B.

由表 2 可知,与正常组比较,母婴分离结合冰水灌胃法建立的 IBS-C 模型大鼠的排便颗粒数、Bristol 积分值、粪便含水量和肠道压力阈值均显著降低(*P* < 0.05);以逍遥散干预后粪便指标和压力阈值均

显著升高(*P* < 0.05),且肠道压力阈值与正常组无显著差异。结果表明,具有疏肝解郁、益气健脾功效的逍遥散可较好的改善母婴分离结合冰水灌胃所致 IBS-C 大鼠的排便异常和肠道超敏感性。结合该模

型大鼠的一般行为学特征所表现的肝郁证和脾虚证,提示以母婴分离结合冰水灌胃所建立的 IBS-C 模型符合中医肝郁脾虚证的特点。

3 讨论

目前的便秘模型主要有寒积型便秘、实热型便秘、燥结失水模型、气虚型、阳虚型、阴虚血瘀型、脾虚型和药物型^[9,12,13],但这些模型只能模拟出便秘的临床特征,不符合 IBS-C 的临床症状,且未能与 IBS-C 的中医病因病机相符合,体现“肝郁脾虚证”相似的主要症状。本研究在分析和总结目前关于 IBS 和便秘模型的基础上,从造模的思路、理论依据、观察指标等,考察了母婴分离法、冰水灌胃法、限水法和母婴分离结合冰水灌胃法、母婴分离结合限水法建立的便秘模型及其中医证候特点。

莫国强等^[14]研究发现,母婴分离法可导致大鼠肠道敏感性增强,表现出类似肠易激综合症的肠道痛阈值降低反应,提示采用母婴分离结合目前的便秘模型造模方法或许可以诱导高拟合度的 IBS-C 模型。本研究结果显示,当初使用母婴分离法建立的模型具有肠道敏感性升高的特点,但其排便颗粒数、Bristol 分型积分和粪便含水量波动较大,呈现便秘、正常和腹泻三种状态。提示母婴分离能引起大鼠肠道痛阈值降低,使得排便出现异常,可能与大鼠脑-肠轴功能紊乱有关^[11]。

大鼠有随时排便的习性,且其粪便形态和含水量与大鼠体重和饲料有关。为避免实验人为差异,本研究将各组大鼠喂以干燥的标准饲料,并单独饲养于代谢笼中使粪尿分离。本研究发现,以限水法制作的便秘模型肠道敏感性无显著变化,且结肠组织出现炎细胞浸润;以母婴分离结合限水法制作的便秘模型虽然肠道敏感性显著升高,但结肠组织也出现炎细胞浸润。且对于采用了限水法的大鼠来说,干燥的饲料使其吞咽困难,表现为给水后进食,因而进食量和大便量影响较大,不易控制。因此,以限水法和母婴分离结合限水法制作的模型不符合 IBS-C 的临床特征且稳定性较差。

研究发现,以母婴分离结合冰水灌胃建立的大鼠模型具有排便颗粒数减少、粪便形态改变及粪便含水量显著降低、肠道敏感性显著升高且肠组织无明显的病理改变的 IBS-C 临床特征,与文献报道一致^[15,16],又表现出易躁易怒、活动减少、进食量减少、形体消瘦特点,而采用具有疏肝解郁、理气健脾功效的逍遥散

进行反证,发现肝郁脾虚证的症状有较大好转。本研究结果提示,提示采用母婴分离结合冰水灌胃法建立的大鼠模型属于肝郁脾虚证 IBS-C 模型。

参 考 文 献

- [1] 秦环龙,杨俊. 功能性肠病的多学科治疗 [J]. 中国实用外科杂志, 2011, 31(1): 50-51.
- [2] 姚欣,杨云生,赵卡冰,等. 罗马 III 标准研究肠易激综合征临床特点及亚型 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(5): 563-566.
- [3] Longstreth G F, Thompson WG, Chey WD. Functional Bowel Disorders. In: Drossman DA (eds). Rome III: The Functional Gastrointestinal Disorders [M]. Mclean: Degnon Associates, 2006: 487-555.
- [4] 李伟新. 六磨汤加味治疗便秘型肠易激综合征 32 例 [J]. 实用中医内科杂志, 2002, 16: 138.
- [5] 王奎平. 疏肝理气润肠汤治疗便秘型肠易激综合征 36 例-附西沙比利治疗 30 例对照 [J]. 浙江中医杂志, 2004, 39: 125.
- [6] 张静华. 通便汤治疗便秘型肠易激综合征 36 例疗效观察 [J]. 新中医, 2004, 36: 32-33.
- [7] 唐洪梅,何嘉仑,闫雪,等. 醋酸刺激加母婴分离致大鼠肠易激综合征模型的建立及评价 [J]. 中医研究, 2010, 23(10): 19-21.
- [8] 张庆业,廖小红,范丽霞,等. 肝郁脾虚泄泻大鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 20-22.
- [9] 郑慧伶,李艳霞,张翠丽,等. 四种小鼠便秘模型建立方法的比较 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(28): 5456-5459.
- [10] 吴迪,范明松,李志雄,等. 小檗碱诱导大鼠便秘模型的初步研究 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(36): 62-63.
- [11] Siobhain M, O'Mahony Niall P, Hyland Timothy G, et al. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction [J]. Psychopharmacology, 2011, 214(1): 71-88.
- [12] 钱伯初,史红,郑晓亮. 正常和便秘模型动物排便实验研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(12): 1339-1343.
- [13] 索静宇,徐华,毕淑英,等. 慢传输型便秘大鼠胃结肠黏膜 5-羟色胺 3 受体的表达 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(27): 2815-2819.
- [14] 莫国强,郭钟慧,何风雷,等. 补脾益肠丸对肠易激综合征内脏高敏模型大鼠的影响 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 138-140.
- [15] 肖文斌,刘玉兰,赵丽莉. 腹泻型、便秘型肠易激综合征和功能性便秘患者的直肠感觉阈值比较 [J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10: 1291-1294.
- [16] Dickhaus B, Mayer EA, Firooz N, et al. Irritable bowel syndrome patients show enhanced modulation of visceral perception by auditory stress [J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(1): 135-143.

[收稿日期] 2014-09-11