



乙酸联合束缚应激对大鼠内脏敏感性及 肠道肥大细胞状态的影响

庄肇朦, 王霄腾, 吕 宾

(浙江中医药大学附属第一医院消化科, 杭州 310000)

【摘要】 目的 探讨腹泻型肠易激综合征动物模型的建立方法及模型评估。**方法** 将 30 只成年 SD 大鼠随机分为乙酸刺激加束缚应激组($n=10$ 只), 束缚应激组($n=10$ 只), 和正常对照组($n=10$ 只)。采用乙酸刺激加束缚应激方法建立 IBS 动物模型, 进行大便情况评估和直肠敏感性测试, 盐酸甲苯胺蓝染色观察肠道肥大细胞数量及脱颗粒现象。**结果** 在实验第 7 天, 模型组大鼠粪便点数较正常组增多, 差异有统计学意义($P<0.05$); 乙酸联合束缚应激组稀便数较其余两组增多, 差异有统计学意义($P<0.05$)。乙酸联合束缚应激组大鼠直肠敏感性较其余两组增高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。乙酸联合束缚应激组大鼠肠道肥大细胞的数量较正常组增多, 差异有统计学意义($P<0.05$), 乙酸联合束缚应激组大鼠肠道肥大细胞可见脱颗粒现象。组织学分析显示各组大鼠均无明显的炎症性表现。**结论** 乙酸联合束缚应激可增加大鼠内脏敏感性, 并且使大鼠肠道肥大细胞数量增多, 细胞脱颗粒现象增强。该综合造模方法能够较好的模拟人类 IBS 的发病形式, 为我们进一步研究 IBS 的发生发展机制提供了理想的动物模型基础。

【关键词】 内脏高敏感; 乙酸; 束缚应激; 肥大细胞; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0073-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.014

Influence of intra-colonic infusion of acetic acid irritation combined with chronic external bondage stress on the visceral sensitivity and mast cell state in the colon of rats

ZHUANG Zhao-meng, WANG Xiao-teng, LV Bin

(The First Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to explore the establishment method of an animal model of irritable bowel syndrome (IBS) and the evaluation of this animal model. **Methods** 30 adult SD rats were randomly divided into two groups: acetic acid irritation and bondage stress group ($n=10$), bondage stress group ($n=10$), and normal control group ($n=10$). The rats of the intervention group received an intra-colonic infusion of 0.4% acetic acid irritation combined with bondage stress to establish an animal model of IBS. The colonic sensitivity of the intervention group rats was assessed by stool test and colorectal distension (CRD) test. Hydrochloric acid toluidine blue staining was used to observe the number degranulation phenomenon of mast cells in the ileocecum. **Results** On the 7th day, the number of soft

【基金项目】 国家自然科学基金 H0307。

【作者简介】 庄肇朦(1988-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 消化系统疾病的实验与临床研究; 王霄腾(1991-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 消化系统疾病的实验与临床研究。

【通讯作者】 吕宾(1964-), 男, 教授, 主要研究方向: 消化系统疾病的实验与临床研究。

feces was 8 and loose stool was 4 in the model group, significantly higher than that in the bondage stress group (0 and 0) ($P < 0.05$), and normal control group (1 and 0) ($P < 0.05$). On the 10th day, when the AWR = 2, the average rectal distension volume was 1.2 mL, significantly lower than that in the bondage stress group (1.37 mL) ($P < 0.05$), also significantly lower than in the normal control group (1.49 mL) ($P < 0.05$), and when the AWR = 4, the average rectal distension volume was 1.49 mL, significantly lower than that in the bondage stress group (1.74 mL) ($P < 0.05$), and the normal control group (1.77 mL) ($P < 0.05$). These results indicated that the visceral sensitivity of the model group was significantly higher than that in the bondage stress group and normal control group. Histological analysis showed that the rats of all groups had no obvious inflammatory changes. **Conclusions** Chronic bondage stress combined with intra-colonic infusion of 0.4% acetic acid irritation can be used to increase the visceral sensitivity and amount and degranulation of mast cells in the intestinal tissue in rats. This established rat model shows pathogenetic changes resembling the pathogenesis of human irritable bowel syndrome, and provides a useful animal model for further studies of the pathogenesis of this disease.

【Key words】 Visceral hypersensitivity; Irritable bowel syndrome, IBS; Acetic acid; Bondage stress; Mast cell; Rats

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以肠道局部症状为突出表现的全身性疾病,其发病率正在逐年上升^[1]。前期实验研究表明:IBS患者及模型大鼠肠道均存在肥大细胞数量增多,细胞脱颗粒增强的现象。近年来有研究发现^[2]:大鼠乙酸灌肠后第7天肠黏膜组织学和髓过氧化物酶活性恢复正常,但大鼠对直肠扩张刺激的敏感性持续增高。同时早有相关研究发现^[3]:慢性束缚应激可以引起大鼠排便的明显增多,内脏敏感性增高。这些表现均与IBS的特征吻合。目前建立IBS动物模型的刺激方法主要有三种类型:躯体应激、心理应激和综合应激。躯体应激的方法包括醋酸刺激法、冰水灌胃法等;心理应激的方法包括束缚应激法、母婴分离法等。鉴于IBS病因、病机的复杂性及多重性,建立多成分综合性动物模型更符合IBS的实际情况^[4]。因而本实验分别模拟心理因素和躯体因素两种病因,以乙酸联合束缚应激这种方法,通过与单纯的束缚应激比较,试图建立综合因素所致的IBS模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

成年雄性SD大鼠30只,体质量(200 ± 5)g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司生产,许可证号:SCXK(沪)2013-0016;实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2013-0184。

1.2 仪器与试剂

8F导尿管(直径2 mm,球囊最大容量3 mL,最大直径2 cm),用作结直肠内球囊扩张导管(浙江康康医疗器械有限公司生产);冰乙酸。

1.3 动物实验

1.3.1 分组:整个实验操作过程均饲养于标准的Ⅱ级动物房。适应性饲养1周后随机分为3组:IBS组;模型组1:乙酸灌肠+束缚应激组,模型组2:束缚应激+生理盐水灌肠组;正常对照组。

1.3.2 大鼠模型制备:IBS组:实验前24 h禁食不禁水,乙醚麻醉后经肛门插入连接注射器的硅胶管(距肛门8 cm),结肠内灌入40 mL/L的乙酸1 mL,缓慢拔出硅胶管,用手压迫肛门并将大鼠尾巴抬高30 s,后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠,放回笼中自由活动进食水^[2];模型组2则用生理盐水代替乙酸进行灌肠处理。于第7天行束缚应激,按照Williams方法略作修改^[5]将大鼠置于一限制起肢体但不影响其呼吸的特制透明圆柱形筒内,3 h后将大鼠放入饲养笼中,连续束缚3 d。正常对照组:不做处理。

1.3.3 大鼠粪便颗粒及形态实验:实验第7天,将每只大鼠分别放在大鼠固定器内,限制其活动(不限制呼吸)约2 h,期间大鼠的粪便分为硬便、软便、不成形便,分别计数。

1.3.4 大鼠结直肠扩张:实验第10天禁食24 h,禁水12 h。两组大鼠分别于清醒状态下放入自制的固定器,使大鼠只能上下运动,无法前后活动及转身,将8F导尿管经肛门缓慢插入,气囊末端距肛门约2 cm并固定。30 min后大鼠适应,经外口气囊内先后注入气体,按腹壁撤回反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)试验标准评分,分别记录评分达到伤害阈值2分时(大鼠腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面)和4分(大鼠腹部肌肉强烈收缩,背部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面)时球囊所注入的气体量,每4 min一次,每次约30 s,每只重复3次,取平均值。

1.3.5 结肠标本的采集及 HE 染色、回盲部肠道标本盐酸甲苯胺蓝染色:实验第 2 天,随机取各组大鼠各 3 只,3% 巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后取大鼠结肠(距肛门约 6 cm)1 cm 肠段。实验第 10 天,取所有大鼠结肠(距肛门约 6 cm)1 cm 肠段,行 HE 染色;取回盲部肠段 1 cm,盐酸甲苯胺蓝染色。

1.3.6 统计方法及分析:以 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。各组间 AWR 评分比较,排便计数的比较以及肠道粘膜肥大细胞数量比较均采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 粪便结果

如表 1 所示结果分析:于造模第 7 天行束缚应激刺激后,可见模型组大鼠在排便数量上大于对照组,有统计学意义($P<0.05$)。且模型组 1 软便及稀便数量明显较模型组 2 和对照组增多。此项结果显示,模型组在乙酸灌肠联合束缚应激后排便次数明显增多,排便性状改变,符合 IBS 特征。

2.2 结直肠球囊扩张 (colorectal distension, CRD) 结果——腹部回撤反应

腹壁撤回反射 (abdominal withdrawal reflex, AWR) 评分结果如表 2 所示:第 10 天时,直肠扩张达到伤害感受阈值 AWR = 2 分时,模型组 1 直肠扩张容量平均为 1.2 mL,模型组 2 平均为 1.37 mL,而对照组平均为 1.49 mL,两两之间有统计学意义(P

<0.05);当直肠扩张达到 AWR = 4 分时,模型组 1 直肠扩张容量平均为 1.49 mL,模型组 2 平均为 1.74 mL,而对照组平均为 1.77 mL,模型组 1 与后两者之间有统计学意义($P<0.05$),说明模型组大鼠内脏敏感性较对照组增高。

2.3 结肠外观变化及 HE 结果

乙酸灌肠后第 1 天,肉眼观察,模型组大鼠结肠外观管壁增厚,伴充血及出血,光学显微镜下观察,与对照组(图 3 A)相比,模型组乙酸刺激后(图 3 B)可见粘膜层、粘膜下层水肿明显,出现片状出血点。

而待到实验第 10 天,完成 CRD 测评后,取材后肉眼观察发现,两组肠粘膜外观无充血、水肿、出血;光学显微镜下观察发现,对照组(图 3 C)、模型组 1(图 3 C)两组大鼠结肠粘膜结构均较为完整,隐窝、上皮及各层组织均较为完整,未见溃疡等组织病理学改变,因此可排除炎症性肠病等疾病可能(图 3 见封三)。

2.4 甲苯胺蓝染色结果

光学显微镜下示肥大细胞(MC)细胞质呈紫红色,胞核呈蓝色,散在于粘膜下层和粘膜固有层中。电镜下可见其中未脱颗粒者胞膜完整,胞质均匀(图 4 C),脱颗粒者胞膜破裂,有颗粒涌出,细胞不规则(图 4 D、4E、4F)。经 SPSS 软件统计后(表 3)模型组 1 大鼠结肠 MC 数目较模型组 2 及对照组明显增多($P<0.05$)。(图 4 见封三)。

表 1 两组大鼠排便情况差异

Tab.1 Differences of defecation conditions in the two groups of rats

组别 Groups	硬便数 Number of hard stools	软便数 Number of soft stools	稀便数 Number of Loose stools	总便数 The total number of stools
模型组 1 model group 1	8	8	4	20
模型组 2 model group 2	10	1	0	11
对照组 control group	7	1	0	8

表 2 当 AWR = 4 分时两组结直肠球囊扩张容量差异(单位 mL)

Tab.2 When AWR = 4, the differences of the balloon volumes in the two groups of rats(mL)

分组 Groups	每组内每只大鼠的结果 The data of each rat in each group						均值 average
模型组 1 Model 1	1.6	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.49
模型组 2 Model 2	1.6	1.8	1.8	1.6	1.8	1.8	1.74
对照组 control	1.8	1.8	1.8	1.6	1.8	1.8	1.77

表 3 两组大鼠结肠 MC 数目比较差异

Tab.3 Differences of the mast cell numbers in the two groups of rats

分组 Groups	每组内每只大鼠的结果 The data of each rat in each group						肥大细胞总数 total number of mast cells
模型组 1 model group 1	0	2	1	1	1	0	6
模型组 2 model group 2	1	0	0	0	0	0	2
对照组 control group	0	1	1	0	0	0	2

3 讨论

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是世界范围内的多发病。其中欧美国家人发病率达 10% ~ 20%^[6], 亚洲国家的发病率达 6.5% ~ 10.1%, 且近年发病率有逐渐升高的趋势^[1]。由于其病因和发病机制不明确, 临床上缺乏有效的诊治手段, 导致 IBS 患者的症状长期存在, 严重影响其工作和生活, 因此, IBS 不仅是一个临床问题, 更是值得关注的社会问题。因而对 IBS 病因及发病机制的研究日渐得到各方研究者的关注, 而其中关于 IBS 动物模型的建立, 由于 IBS 病因及发病机制的复杂性, 患者症状的多样化, 导致动物模型研制的困难。因而, 作为进行深入研究的对象和基础, IBS 动物模型的建立方法以及模型有效性的评估仍是诸多研究者所关注的。

近年来已出现了可模拟 IBS 某些病理生理学特征的动物模型, 并获得部分成功。目前较多的都是根据体外单因素建立的符合 IBS 某一方面的病理生理机制的动物模型, 如通过刺激肠道建立的内脏痛觉过敏模型, 通过化学物质刺激或病原体感染肠道造成的内脏痛模型, 通过应激刺激造成的动物胃肠动力紊乱等, 以及涉及转基因或基因沉默、基因敲除而制得的动物模型。

现有的 IBS 动物模型主要分为两大类, 一类是以中枢为靶点的刺激; 二是以外周为靶点的刺激造成的 IBS 动物模型^[7]。

以中枢为靶点刺激造成的 IBS 动物模型: 主要模拟了精神心理因素在 IBS 中的作用。流行病学相关研究发现^[8], 急慢性应激是诱发和加重 IBS 患者症状的重要因素之一, 其作用机制是应激可以通过促进促肾上腺皮质激素释放因子 CRF 释放, 以及肥大细胞的聚集活化等进而导致胃肠功能紊乱^[9]。多项研究表明: 束缚应激可导致大鼠对直肠球囊扩张的敏感性增加, 应激后大鼠排便量增加, 其所导致的胃肠道动力及内脏感觉的改变与 IBS 的特征相符^[10-11]。虽然这类动物模型模拟了人类的 IBS 的重要病因之一即精神心理因素, 与人类 IBS 有一定的相似性^[12], 但临床上精神创伤并不是导致 IBS 的单一以及直接原因, 只是诱发或加重 IBS 症状的重要因素之一, 因而仅可将其作为 IBS 动物模型造模的单一因素。

以外周为靶点刺激造成的 IBS 动物模型: 其特

征是黏膜炎症反应消失后异常的肠道感觉及运动功能仍持续存在。研究较多的是病原体感染和化学刺激物诱导制成的 IBS 动物模型^[13]。其中病原体感染所致模型与临床上感染后 IBS 较为符合, 急性胃肠炎患者在早期症状缓解后出现类似 IBS 的肠功能紊乱症状, 现有研究表明早期胃肠道感染持续时间和严重程度、致病微生物因素、精神因素、基因多态性等均会影响 PI-IBS 的发病^[14], 然而大多数 PI-IBS 的临床病例为细菌、病毒等感染而非仅仅由寄生虫感染后诱发, 故而此模型与 PI-IBS 的病因学特征不完全相符。化学刺激所造成的 IBS 模型则可直观地模拟临床上因食物刺激以及病原体急性感染后所致的急性肠黏膜炎症反应。新近研究发现^[1]: 大鼠乙酸灌肠后第 7 d 肠黏膜组织学和髓过氧化物酶活性恢复正常, 但大鼠对直肠扩张刺激的敏感性持续增高。

Arebi 等^[15]发现 IBS 发病为多种因素相互作用所致。鉴于 IBS 病因的复杂性、病机的多重性, 因此, 建立多成分综合性动物模型更符合 IBS 的实际情况。

相关研究已证实肥大细胞(MC)与 IBS 发病直接相关^[16-17], 结肠 MC 浸润和介质释放是 IBS 患者产生症状的原因, 亦与 IBS 患者内脏高敏感密切相关^[18]。MC 活化后释放组胺、5-羟色胺、纤维蛋白溶酶等介质, 激活包括胃肠道在内的感觉神经元, 导致痛觉增敏或异常疼痛。因而肠道黏膜肥大细胞数量的增多、活化脱颗粒是 IBS 的特征之一。

本实验通过乙酸联合慢性束缚应激对 SD 大鼠进行造模刺激, 与单纯的束缚应激进行比较, 通过观察粪便情况、内脏敏感性的观察, 来评估此综合造模方法的有效性; 并且通过对肥大细胞的数量及脱颗粒情况的观察, 发现该综合造模方法可对 IBS 模型动物肠道免疫应答起到激活作用。

4 结论

乙酸联合束缚应激可增加大鼠内脏敏感性, 并使大鼠肠道肥大细胞数量增多, 细胞脱颗粒现象增强。该综合造模方法能够较好的模拟人类 IBS 的发病形式, 为我们进一步研究 IBS 的发生发展机制提供了理想的动物模型基础。

参考文献:

- [1] Chang FY, Lu CL, Chen TS. The current prevalence of irritable bowel syndrome in Asia [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010,

- 16(4): 389–400.
- [2] La JH, Kim TW, Sung TS, et al. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis [J]. *World J Gastroenterol* 2003, 9(19): 2791–2795.
- [3] 孙艳, 柳锋霖, 侯晓华, 等. 急性和慢性束缚应激对大鼠内脏敏感性和神经内分泌的影响 [J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(1): 38–41.
- [4] 安钰, 白殿卿, 付健, 等. 乙酸灌肠加束缚应激致大鼠肠易激综合征模型的建立及其评价 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(15): 1548–1551.
- [5] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat; a model for irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1988, 94: 611–621.
- [6] Krogsgaard LR, Engsbro AL, Bytzer P. The epidemiology of irritable bowel syndrome in Denmark. A population-based survey in adults ≤ 50 years of age [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48(5): 523–529.
- [7] Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signaling and synaptic plasticity [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5: 173–183.
- [8] Kerckhoffs APM, ter Linde JJM, Akkermans LMA, et al. Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2008; 20:900–907.
- [9] Reber SO, Peters S, Slattery DA, et al. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25: 1153–1161.
- [10] Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, et al. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2002, 14, 75–82.
- [11] 吕红, 王伟岸, 钱家鸣. 传统束缚应激动物模型内脏感觉的新评价 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2005, 14:111–113.
- [12] Lackner JM, Brasel AM, Quigley BM, et al. The ties that bind: perceived social support, stress, and IBS in severely affected patients [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, 22: 893–900.
- [13] Collins SM, McHugh K, Jacobson K, et al. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 1509–1515.
- [14] Bashashati M, Rezaei N, Bashashati H, et al. Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(12): 1102–e566.
- [15] Arebi N, Gurmany S, Bullas D, et al. Review article: the psychoneuroimmunology of irritable bowel syndrome—an exploration of interactions between psychological, neurological and immunological observations [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 28: 830–840.
- [16] Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(3):163–173.
- [17] Vivinus-Nébot M, Dainese R, Anty R, et al. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107:75–81.
- [18] Levy D, Kainz V, Burstein R, et al. Mast cell degranulation distinctly activates trigeminocervical and lumbosacral pain pathways and elicits widespread tactile pain hypersensitivity [J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26: 311–317.

[修回日期] 2014-09-17