

大黄酸与大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型的比较

刘兴, 王文革, 次苗苗

■背景资料

应用刺激性泻剂所建立的“泻剂结肠”动物模型, 是目前研究慢传输型便秘最常用的动物模型之一。大黄是目前最常用的造模药物, 但因其造模的过程中存在诸多问题, 影响了所建立模型的稳定性及可靠性, 因此寻找一种稳定、可控性好的药物是建立“泻剂结肠”动物模型的首要任务。

刘兴, 次苗苗, 河北北方学院 河北省张家口市 075000
王文革, 中国人民解放军空军总医院儿科 北京市 100142
刘兴, 在读硕士, 主要从事儿童消化系统疾病的研究。
北京市自然科学基金资助项目, No. 7122180
作者贡献分布: 此课题由王文革与刘兴设计; 研究过程由刘兴与次苗苗操作完成; 研究所用试剂由王文革提供; 数据收集与分析由刘兴与次苗苗完成; 本论文写作由刘兴与王文革共同完成。
通讯作者: 王文革, 副主任医师, 硕士研究生导师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院儿科。
1264516006@qq.com
电话: 010-68410099
收稿日期: 2013-12-27 修回日期: 2014-01-20
接受日期: 2014-02-03 在线出版日期: 2014-03-28

Comparison of rat models of cathartic colon established with rhein and rhubarb

Xing Liu, Wen-Ge Wang, Miao-Miao Ci

Xing Liu, Miao-Miao Ci, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Wen-Ge Wang, Department of Pediatrics, Air Force General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100142, China
Supported by: Beijing Natural Science Foundation, No. 7122180
Correspondence to: Wen-Ge Wang, Associate Chief Physician, Department of Pediatrics, Air Force General Hospital of People's Liberation Army, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. 1264516006@qq.com
Received: 2013-12-27 Revised: 2014-01-20
Accepted: 2014-02-03 Published online: 2014-03-28

Abstract

AIM: To find a simple and stable drug for the induction of cathartic colon by comparing two rat models which were established with rhein and rhubarb, respectively.

METHODS: Thirty-three healthy 3-4-week-old Wistar rats were divided into three groups, namely, a control group, a rhubarb group and a rhein group. Normal saline was given by intragastric administration in the control group. Rhubarb suspension was given in the rhubarb group, and rhein suspension was given in the rhein group. The intestinal transit function was assessed using the activated carbon suspension transit method.

RESULTS: Modeling time was 136 and 114 days for the rhubarb group and rhein group, respectively. Activated carbon transit length in the rhubarb and rhein group was significantly shorter than that in the control group. The symptom of loose stools in the rhein group was stable in the modeling process, and the dose and modeling cycle were consistent with the reference literature.

CONCLUSION: A rat model of cathartic colon could be successfully established with both rhubarb and rhein. As a monomer, the efficacy of rhein is more stable than rhubarb. Concentration of rhein is easy to control and it is associated with a relatively short period of time in establishing the animal model. Rhein is better than rhubarb in establishing the rat model of cathartic colon.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cathartic colon; Animal model; Rhubarb; Rhein; Monomer

Liu X, Wang WG, Ci MM. Comparison of rat models of cathartic colon established with rhein and rhubarb. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(9): 1262-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1262.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i9.1262>

摘要

目的: 应用大黄酸及大黄建立大鼠泻剂结肠模型, 二者进行比较, 寻找一种简单、稳定的建立泻剂结肠动物模型的药物。

方法: 健康3-4周龄Wistar大鼠33只, 均分为对照组、大黄组、大黄酸。对照组给予生理盐水灌胃; 大黄组给予大黄粉悬液灌胃; 大黄酸组给予大黄酸粉悬液灌胃。造模完成后采用活性炭悬液推进法测定大鼠肠道传输功能。

结果: 大黄组、大黄酸组造模时间分别为136 d和114 d; 大黄组及大黄酸组大鼠活性炭末推进长度及推进率较对照组明显缩短。大黄酸组

■同行评议者
甘华田, 教授, 四川大学华西医院老年消化内科

造模过程中大鼠稀便稳定, 且给药剂量及造模周期同参考文献报道一致。

结论: 大黄及大黄酸均可成功建立大鼠泻剂结肠模型, 但作为单体大黄酸药效更稳定, 浓度易于控制, 且造模时间相对较短, 故作为造模药物, 效果优于大黄。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 泻剂结肠; 动物模型; 大黄; 大黄酸; 单体

核心提示: 本研究通过比较大黄酸及大黄建立的“泻剂结肠”模型的优劣, 进一步证实了单体大黄酸药效更稳定, 浓度易于控制, 造模时间相对较短, 作为造模药物效果优于大黄。为以后慢传输型便秘的研究提供了一种更稳定、可靠的动物模型。

刘兴, 王文革, 次苗苗. 大黄酸与大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(9): 1262-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1262.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i9.1262>

0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是一种涉及全胃肠道动力紊乱, 尤其是结肠传输减慢导致的便秘^[1]。目前国内外建立STC动物模型方法主要有泻剂结肠、复方苯乙哌啶法、吗啡法。泻剂结肠(cathartic colon)是指便秘患者长期应用刺激性泻剂使结肠神经系统紊乱和相应的功能失调, 导致结肠动力障碍, 对泻剂反应性下降, 对泻剂产生依赖的一种状况^[2], 是STC的一种重要临床类型。目前建立“泻剂结肠”动物模型的泻剂主要有大黄和酚酞, 大黄因有价廉、来源广等优点成为最常用的建立该模型的药物。但因大黄建立“泻剂结肠”动物模型存在用量、造模周期与以往研究^[3-5]报道出入较大等问题, 在实验研究中模型的复制性较差, 导致后续实验难以进行。因此寻找一种成分单一、药效稳定的造模药物对该模型的建立有重要意义。随着大黄提取工艺的改进, 发现大黄的提取物大黄酸泻下作用明显, 故近来有用大黄酸建立大鼠“泻剂结肠”模型的相关报道。本实验采用单体大黄酸建立大鼠“泻剂结肠”模型, 并与大黄建立的该动物模型进行比较, 从而找到一种稳定、可控性好的建立“泻剂结肠”动物模型的药物。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂Wistar大鼠33只, 清洁级, 3-4周

龄, 体质量50-80 g, 由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供[许可证号SCXK(京)2011-0004]。饲养条件: 分笼饲养, 实验室清洁安静, 室温20℃-25℃, 相对湿度50%-70%。大黄粉(北京同仁堂连锁药店有限责任公司, 产地: 甘肃); 大黄酸粉(南京泽朗医药技术有限公司, 批号ZL20130310A); 活性炭粉末(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备: 按照随机化分组原则, 将实验大鼠均分为对照组、大黄组、大黄酸组, 每组11只。3组大鼠在普通干饲料饲养的基础上, 分别再给予生理盐水、大黄粉悬液、大黄酸粉悬液灌胃, 给药量按照每只大鼠的体质量计算得出。整个实验过程分3个循环完成。对照组给予10 mL/(kg·d)生理盐水灌胃。大黄组参照张连阳等^[3]和童卫东等^[6]的方法给予大黄粉悬液灌胃, 第1循环约50 d, 起始剂量为300 mg/(kg·d), 以后按300 mg/(kg·d)递增, 增长至3300 mg/(kg·d)时, 约半数大鼠出现稀便, 维持此剂量灌胃, 直至80%大鼠稀便消失后开始下一循环; 第2循环约38 d, 在3300 mg/(kg·d)的基础上再按300 mg/(kg·d)递增, 增至4200 mg/(kg·d)时, 半数大鼠出现稀便, 维持此剂量直至80%大鼠稀便消失; 第3循环约48 d, 在4200 mg/(kg·d)的基础上增至5400 mg/(kg·d)时, 半数大鼠出现稀便, 维持此剂量直至80%大鼠稀便消失; 3个循环结束共用136 d, 整个过程结束1 wk后停止灌胃, 普通干饲料饲养待处理。大黄酸组参照张波等^[7]的方法给予大黄酸粉悬液灌胃, 第1循环约33 d, 给药剂量为240 mg/(kg·d), 灌2 d停1 d, 直至半数大鼠出现稀便, 维持此剂量至80%大鼠稀便消失后开始下一循环; 第2循环约36 d, 给药剂量同上, 灌5 d停2 d, 直至80%大鼠稀便消失; 第3循环约45 d, 给药剂量为320 mg/(kg·d), 灌5 d停2 d, 直至80%大鼠稀便消失; 3个循环共约114 d, 整个过程结束1 wk后停止灌胃, 普通干饲料饲养待处理。

1.2.2 肠道传输功能测定: 采用活性炭悬液推进法检测肠道传输功能。停药1 wk后的大鼠禁食, 不禁水24 h, 经口灌入100 g/L活性炭悬液2 mL, 30 min后颈椎脱臼法处死, 立即剖腹, 取出幽门至直肠末段的全部肠管, 在无张力的条件下测量肠道全长及活性炭悬液推进长度。炭末推进率(%) = (炭末前端与幽门的距离/肠道总长度) × 100。

统计学处理 采用SPSS17.0软件包进行统计

■ 研究前沿

随着对大黄酸药理机制的深入研究, 发现其泻下作用明显, 故有学者尝试用大黄酸建立“泻剂结肠”动物模型, 并取得了初步成功, 但使用该药物所建立模型的稳定性、可靠性及引发便秘的机制需要进一步探讨。

■ 相关报道

国内已有报道长期大剂量使用大黄酸可致大鼠肠道传输功能减慢, 推测大黄酸可损伤肠道神经系统引起, Cajal间质细胞改变, 导致胃肠道动力障碍, 最终形成“泻剂结肠”。

■创新盘点

本实验通过对大黄酸及大黄建立的“泻剂结肠”动物模型比较,以进一步证实大黄酸建立“泻剂结肠”动物模型的稳定性及可靠性。

表 1 3组大鼠造模前后体质量变化表(mean ± SD)

分组	造模前		造模后	
	n	体质量(g)	n	体质量(g)
对照组	11	117.73 ± 4.52	11	485.73 ± 11.96
大黄组	11	114.00 ± 4.79	10	384.27 ± 35.31 ^b
大黄酸组	11	117.00 ± 4.65	9	402.45 ± 10.73 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

分析,计量资料均以mean ± SD表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模过程中3组大鼠一般情况记录 大黄组造模时间为136 d,造模过程中死亡1只,死亡原因不明。大黄酸组造模时间为114 d,死亡2只,1只为误灌入气管致死,另1只死亡原因不明。两组大鼠均形体消瘦,体质量约平均下降20%,虽大黄组大鼠体质量下降更为明显,但两组大鼠体重变化比较无统计学差异($P = 0.067$)(表1)。两组大鼠饮水量较对照组明显增多,皮毛色泽发红,大部分大鼠在饲喂过程中出现血便,约50%大鼠出现血尿。4只大鼠在饲养过程中出现脱肛,其中大黄酸组3只,大黄组1只。

2.2 肠道传输功能测定 腹部正中剖开后可见大黄组及大黄酸组大鼠结肠较对照组粗大、迂曲,肠腔内可见大块粪便存留。3组大鼠肠道总长度无明显差异;大黄组和大黄酸组炭末推进长度分别为58.20 cm ± 6.66 cm、55.11 cm ± 6.78 cm,而对照组则为82.64 cm ± 7.33 cm;大黄组和大黄酸组炭末推进长度明显短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。大黄酸组炭末推进长度略短于大黄组,但两组之间比较无统计学差异($P > 0.05$)(表2)。

3 讨论

STC是慢性便秘中的一种常见临床类型^[8],发病率呈逐年升高趋势。由于临床上难以对STC患者进行前瞻性研究,因此建立稳定、可靠的实验动物模型对慢传输型便秘的研究意义重大。近年来,国内外学者尝试着建立了多种STC的动物模型,经各种模型制作方法的比较,发现仅刺激性泻剂对肠神经系统损伤明显,并且经一系列研究发现“泻剂结肠”建立的模型与STC有相似的肠道病理生理改变^[9-11],是目前研究STC的常用模型。同时“泻剂结肠”大鼠模型复制了便秘患

者长期服用泻剂后由腹泻到加重便秘的疾病过程,最接近临床上STC患者的疾病形成过程,作为研究STC的动物模型具有代表性。目前常用于建立“泻剂结肠”动物模型的刺激性泻剂大黄造模时存在以下问题:(1)不同文献报道大黄导致腹泻时用药量差距较大,目前报道大鼠首次出现稀便时大黄用量从800-2700 mg/kg不等;(2)大鼠在饲喂大黄造模过程中可出现粥样便、泥状便、水样便等不同程度稀便,而目前对造模过程中大鼠稀便程度尚无统一判断标准;(3)大黄是一味成分复杂的中药,除对胃肠道有影响外,对全身如肾脏、肝脏等多个系统具有不同功效,长期大剂量应用后对其他系统的作用与“泻剂结肠”形成有无相互影响,需进一步研究;(4)有文献报道大黄使便秘大鼠肌间神经丛中的胆碱能神经分布趋于正常,这可能是调节结肠功能、治疗慢传输型便秘的机制之一^[12]。此结论与多数文献报道的大黄致使STC大鼠胆碱能神经减少的报道不一致,需进一步探讨大黄对肠道胆碱能神经的影响。虽然本实验用大黄粉最终成功复制了“泻剂结肠”大鼠模型,但在造模过程中也遇到了用药量同文献报道相差较大、稀便情况不稳定及造模周期与大多数报道不一致等问题,导致模型的可复制性较差。因此,近年来国内外学者尝试寻找更稳定的建立“泻剂结肠”的药物,有学者尝试用大黄的提取物大黄酸建立该模型,并取得初步成果。本实验旨在对大黄酸及大黄二者建立大鼠“泻剂结肠”模型优劣进行比较,寻找一种更稳定、可靠的造模药物。

大黄酸是大黄的提取物,为单体,化学名为1,8-二羟基蒽醌衍生物,在抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化、降糖调脂、保肝抗纤维化等多方面具有活性^[13]。大黄酸本身无泻下作用,但其结肠内菌转化产物大黄酸蒽醌具有泻下活性。泻剂结肠是全胃肠动力障碍性疾病,以肠道传输功能减慢为主要特点,故造模完成后采用活性炭悬液推进长度(肠管黑染长度)初步鉴定模型是否成功。3个循环结束后大黄酸组肠道传输功能较对照组明显减慢;与大黄组相比炭末推进长度略短,但二者之间无统计学差异。大黄酸组在给予大黄酸粉悬液灌胃第2 d开始,约80%大鼠出现水样便,易于观察,稀便稳定。给药量及造模周期与参考文献报道差异不大,说明大黄酸药效稳定,给药量容易掌握,用于建立“泻剂结肠”模型时重复性及可控性好。近期研究表明STC患者结肠黏膜水通道蛋白4(aquaporin,

■应用要点

大黄酸及大黄均可成功复制大鼠“泻剂结肠”模型,但作为单体,大黄酸药效更稳定,浓度易于控制,造模时间相对较短,稳定性及可控性优于大黄,为研究慢传输型便秘提供了一种简单模型。

表 2 3组大鼠肠道传输功能比较(mean ± SD)

分组	n	肠道总长度(cm)	炭末推进长度(cm)	百分比(%)
对照组	11	133.36 ± 8.02	82.64 ± 7.33	61.94 ± 3.86
大黄组	10	130.50 ± 5.54	58.20 ± 6.66 ^b	44.56 ± 4.32
大黄酸组	9	132.44 ± 3.91	55.11 ± 6.78 ^b	41.65 ± 4.04

^bP<0.01 vs 对照组.

AQP4)高表达^[14],而在大黄酸药理机制的研究中发现其能抑制LoVo细胞AQP4基因的转录与翻译^[15],推测大黄酸的长期大剂量服用使得这种抑制作用减弱,AQP4基因表达增高,导致肠道水分吸收增加,引起大便干燥,加重便秘.而目前关于STC大鼠近端结肠中水通道蛋白的研究却显示AQP3表达下调^[16],推测此改变对便秘的加重有一定的延缓作用.以上研究提示结肠黏膜中AQP4、AQP3的表达异常在“泻剂结肠”形成与发展中起重要作用.

本实验造模药物大黄酸及大黄均成功复制了“泻剂结肠”大鼠模型,但大黄酸为单体泻剂,药效稳定,避免了大黄成分复杂所致的用药剂量相差较大,排除了品种、产地、采收时间等因素对大黄泻下作用的影响;同时大黄酸粉悬液灌胃后稀便明确,大便性状容易判断,造模周期稳定,解决了大黄造模过程中用药剂量和造模周期与文献报道不一这两个主要问题.大黄酸质量稳定,浓度易于控制,给药方法简单,可重复及可控制性强,适用于慢传输型便秘动物模型的建立.

4 参考文献

- Bharucha AE, Phillips SF. Slow transit constipation. *Gastroenterol Clin North Am* 2001; 30: 77-95 [PMID: 11394038]
- 童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯. 酚酞对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 723-726
- 张连阳, 高峰, 童卫东, 张胜本, 黄显凯. 大鼠泻剂结肠模型的建立. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 864-866
- 郑晨果, 金纯, 金定国. 大鼠泻剂结肠模型的再探讨. *浙江中西医结合杂志* 2006; 16: 687-688
- 张兴, 范一宏, 李延玲, 吕宾, 张璐. 外源性胶质细胞源性神经营养因子对慢传输型便秘大鼠肠道传输功能的影响. *胃肠病学* 2013; 18: 16-19
- 童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 665-667
- 张波, 丁义江. 大黄酸建立“泻剂结肠”大鼠模型的研究. *时珍国医国药* 2012; 23: 1815-1816
- Shahid S, Ramzan Z, Maurer AH, Parkman HP, Fisher RS. Chronic idiopathic constipation: more than a simple colonic transit disorder. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 150-154 [PMID: 22011587 DOI: 10.1097/MCG.0b013e318231fc64]
- He CL, Burgart L, Wang L, Pemberton J, Young-Fadok T, Szurszewski J, Farrugia G. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow-transit constipation. *Gastroenterology* 2000; 118: 14-21 [PMID: 10611149 DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70409-4]
- Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298 [PMID: 16048580 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2005.03809.x]
- Wedel T, Roblick UJ, Ott V, Eggert R, Schiedeck TH, Krammer HJ, Bruch HP. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 54-62 [PMID: 11786765 DOI: 10.1007/s10350-004-6114-3]
- 汪兴伟, 刘海峰, 徐梅, 王国安, 孙永刚, 房殿春. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛胆碱能神经的影响. *重庆医学* 2008; 37: 1685-1689
- 冯素香, 谢新年, 李建生, 屈凌波, 梁生旺, 王淑美. 固相萃取-高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度及在大鼠体内的药动学规律. *中国实验方剂学杂志* 2011; 17: 140-143
- 王笑军, 袁维棠, 宋军民, 张志永. 水通道蛋白4在慢传输型便秘患者结肠黏膜的表达和意义. *中华胃肠外科杂志* 2010; 13: 445-447
- 张文生, 李锋, 鲍军强, 王胜春, 尚刚伟, 李军昌, 王长海. 大黄酸对LoVo细胞水通道蛋白4表达的调节效应. *中药材* 2008; 31: 702-706
- 智会, 袁维棠. 水通道蛋白3、4、8在大鼠慢传输型便秘模型结肠黏膜中的表达. *中华胃肠外科* 2011; 14: 459-461

编辑 田滢 电编 鲁亚静



同行评价

本文设计合理,有一定的实用价值,为研究便秘提供了一种简单模型.