

慢性束缚应激联合番泻叶灌胃法制备IBS-D大鼠模型的量效及时效关系评价

赵妍, 罗丹妮, 陈颖, 黄辰, 周思远

■背景资料

腹泻型肠易激综合征(diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)动物模型仍处于探索阶段, 在多种造模方法中, 束缚应激联合其他刺激方法能较好地模拟人类IBS发病, 且方法较为简单, 造模成本较低, 应用最为广泛, 但缺乏统一规范的量化标准。

赵妍, 罗丹妮, 陈颖, 黄辰, 周思远, 成都中医药大学针灸推拿学院 四川省成都市 610075

赵妍, 主治医师, 主要从事针灸的临床及机制研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, No. 81503665。

作者贡献分布: 本课题实验设计、数据分析及论文撰写由赵妍完成; 罗丹妮、陈颖及黄辰共同完成实验操作与数据采集; 周思远指导实验与审阅文章。

通讯作者: 周思远, 讲师, 610075, 四川省成都市十二桥路37号, 成都中医药大学针灸推拿学院. zsy6688@qq.com
电话: 028-87683962

收稿日期: 2016-10-26
修回日期: 2016-11-01
接受日期: 2016-11-07
在线出版日期: 2017-05-28

Chengdu 610075, Sichuan Province, China. zsy6688@qq.com

Received: 2016-10-26

Revised: 2016-11-01

Accepted: 2016-11-07

Published online: 2017-05-28

Abstract

AIM

To observe the effects of gavage with different concentrations of senna for different durations plus different durations of chronic restraint stress (CRS) in inducing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) in rats, in order to optimize the creation of the rat model of IBS-D.

METHODS

Thirty-two SD rats were randomly and equally divided into four groups: A (0.2 g/mL senna + CRS for 1 h), B (0.3 g/mL senna + CRS for 1 h), C (0.2 g/mL senna + CRS for 1.5 h), and D (normal control group). The pain threshold of abdominal wall withdrawal reflex was evaluated at 7, 10, and 14 d. Diarrhea index was used for evaluation of the degree of diarrhea, and histological changes in the intestinal mucosa were also evaluated.

RESULTS

The pain threshold of each model group was significantly lower than that of the normal control group at 7, 10, and 14 d ($P < 0.05$). Diarrhea indexes at 7 d, 10 d and 14 d were significantly increased in groups A-C compared with group D ($P < 0.05$). Pain threshold at 7 and

Dose-effect and time-effect relationship of chronic restraint stress combined with senna extract gavage in inducing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats

Yan Zhao, Dan-Ni Luo, Ying Chen, Chen Huang, Si-Yuan Zhou

Yan Zhao, Dan-Ni Luo, Ying Chen, Chen Huang, Si-Yuan Zhou, College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81503665.

Correspondence to: Si-Yuan Zhou, Lecturer, College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 37 Shi'erqiao Road,

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

14 d in group B was significantly lower than that in group A ($P = 0.006$ for both), but did not differ significantly when compared with group C ($P = 1.000$, $P = 0.198$). Diarrhea indexes at all three time points were significantly higher in group B than in groups A and C ($P < 0.05$). Histological analysis showed that the rats in each group had no significant inflammatory manifestations.

CONCLUSION

CRS for 1 h plus 0.3 g/mL senna is superior to other parameters in inducing IBS-D in rats with regard to visceral sensitivity and diarrhea index.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Chronic restraint stress; Senna extract gavage; IBS-D rat model; Dose-dependency and time-dependency

Zhao Y, Luo DN, Chen Y, Huang C, Zhou SY. Dose-effect and time-effect relationship of chronic restraint stress combined with senna extract gavage in inducing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2017; 25(15): 1360-1367 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i15/1360.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i15.1360>

摘要

目的

观察不同番泻叶浓度、束缚时间及造模持续时间对腹泻型肠易激综合征(diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)大鼠模型造成的影响, 筛选一种较为理想的IBS-D大鼠模型制作方法。

方法

SD大鼠32只, 雌雄各半。随机分为空白组、模型1组(0.2 g/mL番泻叶+束缚1 h)、模型2组(0.3 g/mL番泻叶+束缚1 h)、模型3组(0.2 g/mL番泻叶+束缚1.5 h), 每组8只, 雌雄各半。以造模7、10、14 d时腹壁撤退反射时的疼痛阈值评价其内脏敏感性, 腹泻指数评价其腹泻程度, 同时对肠黏膜的组织学改变进行评价。

结果

各组模型大鼠疼痛阈值在7、10、14 d均较空白组明显降低($P < 0.05$); 腹泻指数在7、10、14 d均较空白组明显增加($P < 0.05$)。模型2组的疼痛阈值较模型1组在7 d和14 d低(均

为 $P = 0.006$), 与模型3组比较差异不明显($P = 1.000$, $P = 0.198$); 模型2组的腹泻指数较模型1组和模型3组在3个时间点高($P < 0.05$)。组织学分析显示各组大鼠均无明显的炎症性表现。

结论

3种造模方法在7、10、14 d均可建立IBS-D的动物模型, 其中束缚1 h联合番泻叶0.3 g/mL灌胃的方法在内脏敏感性及腹泻指数上要优于其他两种造模方法。

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 慢性束缚应激; 番泻叶浸剂灌胃; IBS-D大鼠模型; 量效及时效关系

核心提要: 腹泻型肠易激综合征一直是消化系统疾病的研究热点, 然而对该病的实验研究难点之一是迄今未有理想的动物模型。建立合理可靠的动物模型是当前的研究重点。

赵妍, 罗丹妮, 陈颖, 黄辰, 周思远. 慢性束缚应激联合番泻叶灌胃法制备IBS-D大鼠模型的量效及时效关系评价. *世界华人消化杂志* 2017; 25(15): 1360-1367 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i15/1360.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v25.i15.1360>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性肠道疾病。罗马III标准^[1]主要依据粪便性状将其分为便秘型(constipation predominant irritable bowel syndrome, IBS-C)、腹泻型(diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)、混合型(mixed irritable bowel syndrome, IBS-M)和未分型(unspecified irritable bowel syndrome, IBS-U)4种亚型。流行病学调查表明, IBS为全球范围高发病, 一项发表于《新英格兰杂志》的研究^[2]发现在英美等发达国家所有年龄段中发病率高达20%-30%, 其中最为常见的为IBS-D。据我国流行病学调查资料也显示: 在各类型中IBS-D所占比例最高, 为45.2%-74.1%^[3]。IBS-D一直是消化系统疾病的研究热点, 然而对该病的实验研究难点之一是迄今未有理想的动物模型。在现有造模方法中, 两种方法联合建模所占比例最高(45.00%), 这其中番泻叶煎剂灌胃法结合束缚

■ 研究前沿

在造模动物的选择上, 幼鼠母子分离模型造模时间长且实验条件要求高、耗资大、死亡率高; 以成年大鼠造模与IBS后天获得性发病机制相似, 但相关研究相对较少。

■ 相关报道

近年来IBS实验中两种方法联合建模的应用比例已经超过单一方法建模, 其中应用较多的就是番泻叶煎剂灌胃法结合束缚应激刺激法, 已有较多研究发表在《世界华人消化杂志》、《中国中西医结合杂志》及*BMC Complement Altern Med*等核心期刊上。

应激刺激法应用比例最高(29.63%)^[4]。然而由于药物制备方法 & 束缚造模工具等差异, 很难量化不同造模方法的应激强度, 难以把握模型的具体程度和分期。因此本研究基于主流的造模方法^[5-9], 进一步观察不同番泻叶浓度、束缚时间及造模持续时间对模型造成的影响, 以期量化其中的量效与时效关系, 弥补现有造模方式的不足, 为进一步的发病机制及治疗等研究提供可靠的动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 健康SPF级SD大鼠雌雄各16只, 体质量 $250\text{ g} \pm 5\text{ g}$, 由四川省医学科学院实验动物研究所养殖研究室提供, 合格证编号: SCXK(111)2013-15。动物在成都中医药大学 SPF级实验动物中心饲养, 昼夜节律12/12, 温度、湿度及昼夜光线恒定, 自由摄食、进水。实验开始前所有动物适应性喂养7 d。

1.1.2 试剂: 番泻叶溶液的制备^[10,11]: 番泻叶生药(太极集团四川绵阳制药有限公司, 药品生产许可证: 川20100094)捡择后以4倍于药量体积的沸水($100\text{ }^{\circ}\text{C}$)浸泡30 min, 双层纱布过滤, 浸泡4次, 将4次滤液混合, 混合滤液减压浓缩至生药含量为 0.6 g/mL , $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。其他试剂有乙醚、液体石蜡、水合氯醛及蒸馏水。

1.1.3 器材及仪器: 自制束缚木架($20\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 5\text{ cm}$), 8F导尿管; 5英寸圆形乳胶气球(Sempertex: ISO 9001:2008); 手术缝合四线(4-0); 自制透明观察箱($20\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 6\text{ cm}$); 电子秤; 中速滤纸; 恒温水浴箱; 全自动真空组织脱水机: Leica ASP300 S; 组织包埋机: Leica EG1160; 轮转式石蜡切片机: Leica RM2235; 光学显微镜及显微摄像系统: Nikon55i。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模方法: 健康成年SD大鼠雌雄各16只, 顺序称质量、记录、编号, 随机分为空白组、模型1组(0.2 g/mL 番泻叶+束缚1 h)、模型2组(0.3 g/mL 番泻叶+束缚1 h)、模型3组(0.2 g/mL 番泻叶+束缚1.5 h), 每组8只, 雌雄各半。各模型组于每日上午9:00进行束缚, 将大鼠仰面置于木架上, 以魔术贴条带($1\text{ cm} \times 20\text{ cm}$)对其上、下肢进行固定, 全部束缚结束后给予相应浓度的番泻叶溶剂灌胃(将 0.6 g/mL 番泻叶制备剂以蒸馏水等比稀释至 0.2 g/mL 及

0.3 g/mL , 置于 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水箱中备用)。空白组不予任何干预。分别在造模7 d, 造模10 d和造模14 d进行评价。

1.3 模型评定标准

1.3.1 一般情况: 观察大鼠造模期间神态、毛色、进食量、排泄物性状及体质量变化等。

1.3.2 腹泻指数测定: 分别在造模前1 d及7、10、14 d于造模结束后测当日14:00-19:00之间5 h内腹泻指数。腹泻指数测定时在鼠笼内垫清洁滤纸, 每隔1 h换滤纸。腹泻指数 = 稀便率(每只大鼠所排稀便数与总便数之比) \times 稀便级(每只大鼠所有稀便级数总和与稀便数之比)^[12]。

稀便级数分级方法: 以稀便污染滤纸形成污迹面积的大小定级, 分为4级: 1级为污染直径 $<1\text{ cm}$, 2级污染直径 $1.0\text{--}1.9\text{ cm}$, 3级污染直径 $2\text{--}3\text{ cm}$, 4级污染直径 $>3\text{ cm}$ 。

污染直径的测量方法: 粪便形状为圆形, 则直接量直径; 若粪便形状为椭圆形则测量最长和近似圆的直径, 相加除以2。

干便与稀便的区分方法: 以滤纸上有无污迹为标准。粪便次数以每粒或每堆(不能分清粒数者)为1次。

1.3.3 内脏敏感性测定: 分别在造模前1 d及各个时间点造模结束后, 对各组大鼠进行内脏敏感性检测。检测前24 h禁食不禁水, 检测当天称重, 予乙醚吸入麻醉。预先制备气囊导管: 将5英寸圆形乳胶气球在5 cm和6 cm处标记, 沿6 cm处剪下, 将气球用AB胶固定于8F导尿管, 在5 cm处系以手术缝合线, 气球黏接处以手术胶带缠绕固定, 经检测无漏气方可选用。将石蜡油润滑后的自制气囊导管经肛门插入, 气囊尾部距肛门1 cm左右, 用医用胶带将导管与大鼠尾巴根部固定。将大鼠置于自制亚克力观察箱中($20\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 6\text{ cm}$), 待大鼠苏醒并适应30 min后开始实验, 对大鼠结肠内气囊分段加压(每10 mmHg), 记录直到出现腹壁撤退反射(wall withdrawal reflex, AWR)评分3分的压力值, 重复测量3次, 每两次测量间隔5 min^[13,14]。

AWR评分标准^[15]: (1)大鼠情绪基本稳定, 评分为0分; (2)大鼠情绪不稳定, 偶尔扭头, 评分为1分; (3)大鼠腹背部肌肉轻微收缩, 但腹部未抬离地面, 评分为2分; (4)大鼠腹背部肌肉较强收缩并把腹部抬离地面, 评分为3分; (5)大鼠腹部肌肉强烈收缩, 背部成弓形并把腹部、骨盆及会阴部抬离地面, 大鼠肢体伸展紧绷, 评

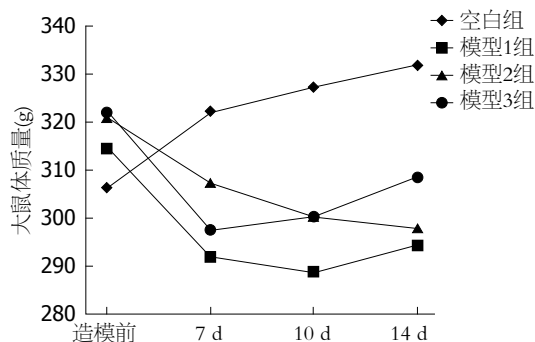


图1 大鼠体重(g).

分为4分.

1.3.4 胃肠组织形态学变化: 各组大鼠在造模14 d结束后第2天, 用10%水合氯醛(7 mL/kg)腹腔注射麻醉后, 取十二指肠球部及距肛门11 cm处结肠2 cm, 于4%多聚甲醛中固定48 h以上, 蒸馏水冲洗, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、HE染色, 光镜下观察十二指肠及结肠病理学变化.

1.3.5 研究过程中的质量控制: 为了避免主观因素可能造成的干扰, 本研究中行为学指标观测人员固定, 同时借鉴临床研究中的盲法原则, 在结肠扩张确定疼痛压力阈值中对操作人员施盲, 施盲因素为动物分组及编号情况. 此外, 为避免生物节律影响, 同一实验操作固定在一天中的特定时段.

统计学处理 统计学方法应用SPSS19.0统计软件进行数据处理和分析, 符合正态分布的计量资料以mean±SD表示, 非正态分布的计量资料以中位数, 极差[M(Q)]表示, 采用两个独立样本比较的Wilcoxon秩和检验和单因素方差分析(ANOVA)行数据统计, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般情况及体质量比较 造模前, 各组大鼠精神状态良好, 活泼好动, 皮毛顺滑光泽, 眼角口鼻干净, 耳廓呈淡粉色, 大便干稀适中. 造模后, 3个模型组的大鼠渐渐出现精神倦怠、易激怒、躲避、畏惧, 少动, 皮毛干枯散乱无光泽, 肛门口有粪便附着, 体质量下降、进食减少等. 造模后大鼠与空白组相比, 3个模型组的大鼠体质量呈现负增长趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$, 图1).

2.2 造模前后各组之间腹泻指数比较 在造模7、10、14 d时: 3个模型组的大鼠腹泻指数与

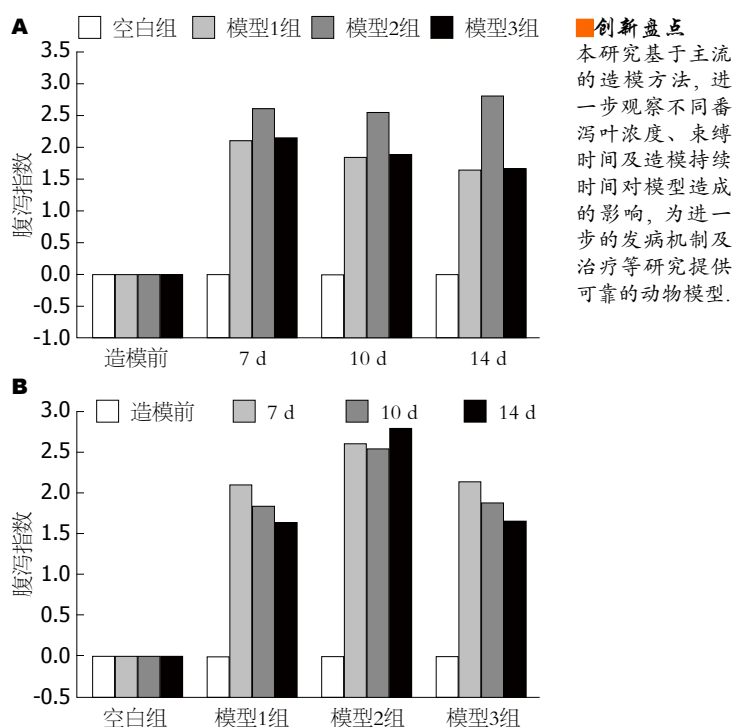


图2 腹泻指数. A: 组间; B: 组内.

空白组比较均有明显增高, 差异具有统计学意义($P = 0.000$); 模型2组腹泻指数要高于模型1组(7 d: $P = 0.017$, 10 d: $P = 0.002$, 14 d: $P = 0.000$)和模型3组(7 d: $P = 0.027$, 10 d: $P = 0.004$, 14 d: $P = 0.000$), 差异具有统计学意义; 模型1组与模型3组差异不明显(7 d: $P = 0.832$, 10 d: $P = 0.834$, 14 d: $P = 0.923$, 图2A及表1).

2.3 各组随造模时间延长腹泻指数变化 空白组在各时间点均无腹泻. 模型1组和模型3组的腹泻指数随时间延长逐渐降低, 造模7 d与10 d(模型1组: $P = 0.202$, 模型3组: $P = 0.170$)、10 d与14 d比较(模型1组: $P = 0.314$, 模型3组: $P = 0.229$), 差异无统计学意义; 但造模7 d与14 d比较(模型1组: $P = 0.029$, 模型3组: $P = 0.015$), 差异有统计学意义. 模型2组腹泻指数随时间延长变化不明显, 各时间点比较差异均无统计学意义($P > 0.05$, 图2B, 表1).

2.4 造模前后各组之间疼痛阈值比较 在造模7、10、14 d: 3个模型组的大鼠疼痛阈值与空白组比较均有明显降低, 差异具有统计学意义($P = 0.000$); 模型2组疼痛阈值较模型1组低(7 d: $P = 0.006$, 10 d: $P = 0.047$, 14 d: $P = 0.006$), 差异具有统计学意义; 模型2组与模型3组差异不明显(7 d: $P = 1.000$, 10 d: $P = 0.508$, 14 d: $P = 0.198$); 模型3组在第7天疼痛阈值较模型1组低, 差异具有统计学意义, 随时间延长二者差

应用要点

通过本实验研究, 量化采用慢性束缚应激联合番泻叶浸剂灌胃造模方法对成年大鼠进行造模的量效及时效关系, 对IBS-D基础研究动物模型的丰富及规范有所帮助。

表 1 腹泻指数 (n = 8, mean ± SD)

分组	造模前	7 d	10 d	14 d
空白组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型1组	0.00 ± 0.00	2.12 ± 0.40 ^{ag}	1.85 ± 0.47 ^{ag}	1.65 ± 0.30 ^{agi}
模型2组	0.00 ± 0.00	2.62 ± 0.39 ^{acg}	2.57 ± 0.36 ^{acg}	2.82 ± 0.62 ^{acg}
模型3组	0.00 ± 0.00	2.16 ± 0.37 ^{aeq}	1.90 ± 0.39 ^{aeq}	1.67 ± 0.33 ^{aeqi}

^aP<0.05 vs 空白组; ^cP<0.05 vs 模型1组; ^gP<0.05 vs 模型2组; ^{ag}P<0.05 vs 造模前; ^{gi}P<0.05 vs 造模7 d.

表 2 疼痛阈值 (n = 8, mean ± SD)

分组	造模前	7 d	10 d	14 d
空白组	51.11 ± 1.72	53.89 ± 2.51	55.56 ± 2.72 ^e	58.89 ± 4.56 ^{eg}
模型1组	51.67 ± 1.82	23.89 ± 2.51 ^{ae}	23.33 ± 3.65 ^{ae}	27.22 ± 6.12 ^{ae}
模型2组	51.67 ± 2.79	19.45 ± 2.51 ^{ace}	20.00 ± 2.98 ^{ae}	19.45 ± 3.27 ^{ace}
模型3组	51.11 ± 1.72	19.45 ± 2.51 ^{ace}	21.11 ± 1.72 ^{ae}	22.78 ± 2.51 ^{aeq}

^aP<0.05 vs 空白组; ^cP<0.05 vs 模型1组; ^eP<0.05 vs 造模前; ^gP<0.05 vs 造模7 d.

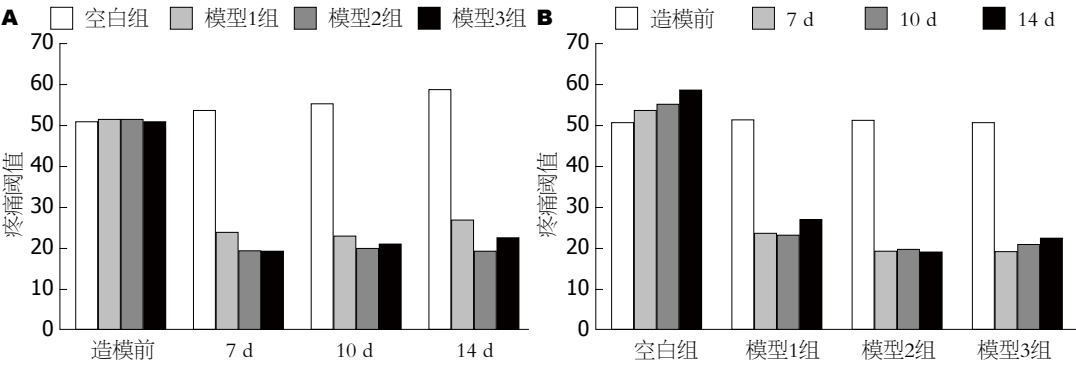


图 3 疼痛阈值. A: 组间; B: 组内.

异不明显(7 d: $P = 0.006$, 10 d: $P = 0.193$, 14 d: $P = 0.091$, 图3A, 表2).

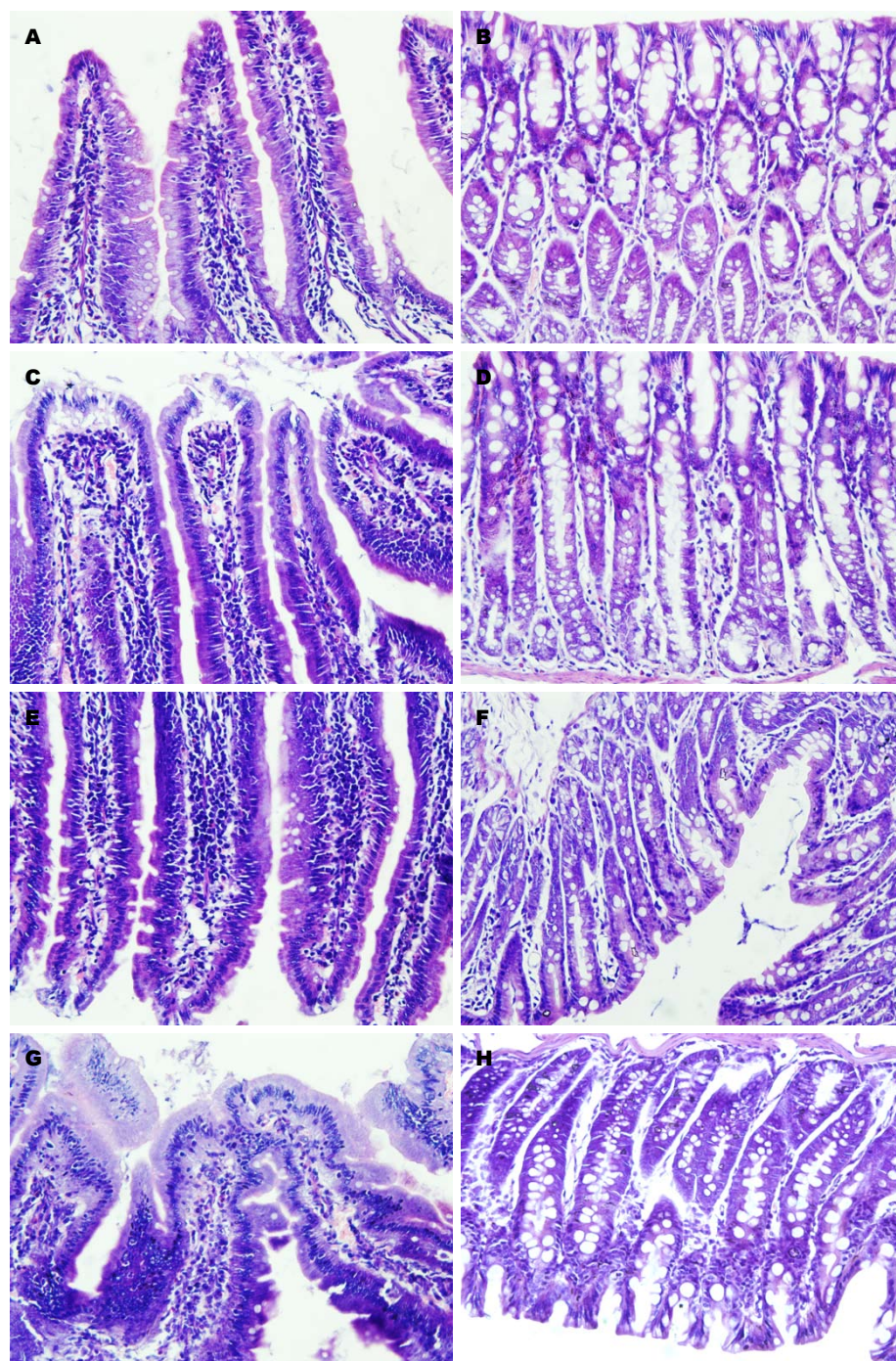
2.5 各组随造模时间延长内脏敏感性变化 空白组随时间延长, 疼痛阈值逐渐增高, 造模前与造模7 d($P = 0.131$), 7 d与10 d($P = 0.357$), 10 d与14 d比较($P = 0.074$), 差异均无统计学意义; 造模前与造模10 d($P = 0.020$)、14 d($P = 0.000$), 7 d与14 d比较($P = 0.010$), 差异均有统计学意义. 模型1组和模型2组疼痛阈值随时间延长变化不明显, 各时间点比较差异均无统计学意义($P > 0.05$). 模型3组随时间延长疼痛阈值也有升高趋势, 造模7 d与10 d($P = 0.195$), 10 d与14 d比较($P = 0.195$), 差异无统计学意义; 造模7 d与14 d比较($P = 0.014$), 差异有统计学意义(图3B, 表2).

2.6 各组大鼠十二指肠及结肠黏膜的组织形态 各组大鼠十二指肠及结肠肠道绒毛上皮柱状

细胞排列整齐, 上皮中散在分布着杯状细胞和内分泌细胞; 肠道黏膜层、黏膜下层和肌层结构完整, 未见有病理学改变(图4).

3 讨论

3.1 造模方法的选择 制备良好的IBS动物模型是研究IBS发病机制、病理生理以及治疗等方面的基础, 然而目前尚没有公认统一的IBS模型. 在现有的多种造模方法中转基因动物价格昂贵, 且不易获得; 幼鼠母子分离模型造模时间长且实验条件要求高、耗费大, 死亡率高; 其他外周致敏模型(如肠道感染模型)与IBS疾病本质有较大差异^[16]. 而束缚应激联合其他刺激方法由于能较好地模拟人类IBS发病, 且方法较为简单, 造模成本较低, 故而应用越来越广泛^[17]. 一项关于肠易激综合征国内实验研究



同行评价

本研究立题有依据, 设置严谨, 研究动物规范, 方法比较先进, 观察详细, 统计合理, 结果可信, 观点明确, 其结果对IBS-D的发病机制和临床诊治有一定参考意义。

图 4 各组大鼠十二指肠及结肠黏膜的组织形态(HE, $\times 400$)。A: 空白组; B: 模型1组; C: 模型2组; D: 模型3组。A, C, E, G: 十二指肠; B, D, F, H: 结肠。

现状的调查^[4]也证实在国内IBS实验中两种方法联合建模的应用比例已经超过单一方法建模, 其中应用较多的就是番泻叶煎剂灌胃法结合束缚应激刺激法。在这种两个因素联合造模方法中, 慢性束缚应激模型作为非损伤性刺激更接近于人的心理应激, 与IBS发病机制较吻合, 可重复性也比较好; 番泻叶煎剂灌胃法为造成泄泻动物模型的首选方法, 有研究^[18,19]发现, 小鼠胃肠道组织在番泻叶提取物灌胃后无

光镜可见的变化, 且不会产生药物依赖性。吕妍等^[20]对该造模方法进行深入研究发现, 通过改良束缚强度, 束缚2 h及番泻叶浓度为0.2 g/mL的造模方法最佳, 但造模时间不应超过6 d。然而在我们前期实验中发现, 此造模方式所致腹泻通常在48 h内全部自愈, 因此在模型建立后, 治疗与造模仍需同时进行。对治疗周期较长的研究而言, 6 d的造模时间不足以满足研究需要。因此本研究在其基础上调整番泻叶浓度与

束缚时间比例,以期得到一种可以适应较长时间研究的优良的IBS-D动物模型。

3.2 评价指标测量方法的确立 内脏高敏感(visceral hypersensitivity, VHS)包括痛觉过敏和感觉异常,前者指对于生理性刺激产生痛觉,后者指对于疼痛或者伤害性刺激反应强烈,常伴随痛阈降低^[21]。VHS是IBS主要的病理生理学基础^[22],更是目前研究IBS等功能性胃肠病发病机制的切入点。结直肠扩张时的AWR是目前应用最广的评价内脏敏感性的指标^[23,24]。AWR原理在于通过肉眼观察在不同压力值下行结直肠扩张时大鼠腹部的反应,间接反应内脏疼痛反射,以此来判断内脏敏感性的变化,其优点是易于观察,且无创伤性。在我们的前期研究中发现,在60 mmHg和80 mmHg时,正常大鼠肠道扩张压力 ≤ 40 mmHg对大鼠为非伤害性刺激,而 >40 mmHg为伤害性刺激^[25]。故本研究采用结直肠扩张时的疼痛阈值作为评价疾病模型建立成功的指标,避免过高的压力对其造成伤害,干扰实验结果的准确性。采用腹泻指数作为腹泻症状的判定指标,既可以体现其排便点数的改变,观察肠道动力学的变化;又可以体现其粪便含水量的差异,避免了束缚应激造成的暂时性排便性状的异常。

3.3 实验结果分析 本研究通过对三种不同组合的造模方式进行观察,发现模型2组(束缚1 h联合番泻叶0.3 g/mL)的造模方式在内脏敏感性、腹泻指数及体质量下降方面均有较好的表现。提示腹泻的症状变化与番泻叶浸剂浓度呈正相关,低浓度致泄的效果较弱,并且易出现耐受现象,表现为腹泻症状的减轻及体质量的增加。而高浓度致泄的效果较好且比较稳定。在内脏敏感性方面,模型2组(束缚1 h联合番泻叶0.3 g/mL)与模型3组(束缚1.5 h联合番泻叶0.2 g/mL)要优于模型1组(束缚1 h联合番泻叶0.2 g/mL)。考虑到模型1组由于束缚时间短且番泻叶浓度低,体质量降低较少,因此内脏敏感性要低于束缚时间较长的模型3组及番泻叶浓度较高的模型2组,表明内脏敏感性不仅单纯与束缚时间相关,而且与大鼠体质量亦呈现相关性。此外亦有研究^[26]显示大鼠内脏敏感性与体质量密切相关,体质量增加,内脏敏感性降低。模型3组尽管束缚时间长,但由于对低浓度番泻叶耐受后体质量有所回升,故内脏敏感性亦有回落,导致与模型2组差异不甚明显。综

合多种因素判断,模型2组所选用的造模方式较为理想。而三种造模方法在14 d造模结束后的十二指肠及结肠形态组织学检查均未发现病理性改变,提示适当时间的木板仰面束缚法联合适宜浓度的番泻叶浸剂灌胃的造模方法符合IBS的功能性肠病的模型要求。

3.4 不足及展望 IBS临床流行病学调查显示,男女发病率比例为1:2^[4]。本研究采用了雌雄各半的研究方案,在实验中观察到雌性大鼠比雄性大鼠更易诱发内脏敏感性增高,但是腹泻程度较雄性大鼠略轻,但由于样本量较少,未做相关的数据统计分析。究其原因可能与雌性激素有关,目前IBS相关研究^[27]表明,雌激素与内脏高敏感性评分呈正相关。因此在今后的研究中将进一步扩大样本量,对IBS-D大鼠性别差异进一步探索。Yadid等^[28]提出作为一种理想的动物模型,首先应符合所研究疾病的理论模型,即模型可复制该疾病关键的病理生理特征,有较高的结构效度;并有助于验证人体研究提出的假说,对疾病的关键病理生理和临床特征予以合理解释,即具有较高的表面效度。就IBS而言,肠道运动功能紊乱和内脏敏感性增高是其病理生理的主要方面,心理社会因素在诱发或加重症状上具有重要作用,其实质就是脑-肠互动异常^[29,30]。慢性束缚应激具有导致内脏敏感性增高及情绪应激性障碍的双重作用,番泻叶浸剂灌胃法可引起肠功能紊乱,二者结合可以建立较为理想的IBS-D模型,且具有操作简便、实验周期短、经济易行等特点。总之,0.2 g/mL番泻叶+束缚1 h、0.3 g/mL番泻叶+束缚1 h、0.2 g/mL番泻叶+束缚1.5 h的造模方法在7、10、14 d均可建立IBS-D的动物模型,其中束缚1 h联合番泻叶0.3 g/mL灌胃的方法在内脏敏感性及腹泻指数上要优于其他两种造模方法。

志谢: 感谢郑倩华在数据统计方面给予的指导与帮助。

4 参考文献

- 1 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390 [PMID: 16678553 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.03.008]
- 2 Mayer EA. Clinical practice. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2008; 358: 1692-1699 [PMID: 18420501 DOI: 10.1056/NEJMc0801447]
- 3 张北华. IBS-D肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立

- 与评价. 北京: 中国中医科学院, 2013
- 4 吴晓亮, 孙建华. 肠易激综合征国内实验研究现状的调查. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3818-3823
 - 5 Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988; 94: 611-621 [PMID: 2828144 DOI: 10.1016/0016-5085(88)90231-4]
 - 6 徐海珍, 谢建群, 施斌, 张涛. 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. 上海中医药杂志 2007; 41: 69-72
 - 7 李冬华, 李春淼, 李伍善, 邹志东, 张炎. 痛泻要方对肠易激综合征模型大鼠血管活性肠肽的影响. 时珍国医国药 2007; 18: 2098-2099
 - 8 费晓燕, 谢建群, 郑昱, 吴大正, 袁建业. 疏肝饮对腹泻型肠易激综合征模型大鼠胃动素和胆囊收缩素的影响. 上海中医药杂志 2008; 42: 63-65
 - 9 Sun J, Wu X, Meng Y, Cheng J, Ning H, Peng Y, Pei L, Zhang W. Electro-acupuncture decreases 5-HT, CGRP and increases NPY in the brain-gut axis in two rat models of Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome(D-IBS). *BMC Complement Altern Med* 2015; 15: 340 [PMID: 26419631 DOI: 10.1186/s12906-015-0863-5]
 - 10 滕茜华, 李德勤. 不同浸出时间和方法对番泻叶有效成分的影响. 时珍国医研究 1991; 2: 75-80
 - 11 林观祥, 潘晓军, 蔡进章. 不同浸泡方法对番泻叶中番泻苷A浸出率的影响比较. 医药导报 2006; 25: 816-817
 - 12 刘美荣, 肖瑞飞, 彭芝配, 左和宁, 朱克, 王思明. 针刺“足三里”“太冲”穴对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素的影响. 针刺研究 2012; 37: 363-368
 - 13 赵迎盼, 唐旭东, 卞兆祥, 王凤云, 杨俭勤, 苏敏, 王微. IBS-D肝郁脾虚型病症结合大鼠模型的建立与评价的初步研究. 中国中西医结合杂志 2013; 33: 1507-1514
 - 14 La JH, Sung TS, Kim HJ, Kim TW, Kang TM, Yang IS. Peripheral corticotropin releasing hormone mediates post-inflammatory visceral hypersensitivity in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 731-736 [PMID: 18205263 DOI: 10.3748/wjg.14.731]
 - 15 Yu YB, Zuo XL, Zhao QJ, Chen FX, Yang J, Dong YY, Wang P, Li YQ. Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gut* 2012; 61: 685-694 [PMID: 21997550 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300265]
 - 16 樊江波, 畅洪昇, 董世芬, 闫丽红, 王晶, 洪纓. 慢性应激致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价. 中国实验动物学报 2010; 18: 91-95, 88
 - 17 安荣, 韩佩玉, 徐秋颖, 丁维俊. 肠易激综合征动物模型的建立及评价. 新乡医学院学报 2016; 33: 434-439
 - 18 王新, 韩月东, 吴汉平, 李玲, 陈宝军, 金建平, 樊代明. 番泻叶提取物对小鼠胃肠运动及其组织形态学的影响. 中国中西医结合杂志 2001; 21: 66-65
 - 19 高晔, 朱艳华, 贺微. 番泻叶的药用研究进展. 中医药学刊 2006; 24: 2145-2146
 - 20 吕妍, 李丹, 唐方. 藿香正气提取物对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠动力调控机理研究. 中国中西医结合杂志 2011; 31: 941-945
 - 21 Camilleri M. Testing the sensitivity hypothesis in practice: tools and methods, assumptions and pitfalls. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i34-i40 [PMID: 12077062 DOI: 10.1136/gut.51.suppl_1.i34]
 - 22 Posserud I, Syrous A, Lindström L, Tack J, Abrahamsson H, Simrén M. Altered rectal perception in irritable bowel syndrome is associated with symptom severity. *Gastroenterology* 2007; 133: 1113-1123 [PMID: 17919487 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.07.024]
 - 23 Chen Y, Lin C, Tang Y, Chen AQ, Liu CY, Lu DL. ZD 7288, an HCN channel blocker, attenuates chronic visceral pain in irritable bowel syndrome-like rats. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2091-2097 [PMID: 24587682 DOI: 10.3748/wjg.v20.i8.2091]
 - 24 Liu HR, Fang XY, Wu HG, Wu LY, Li J, Weng ZJ, Guo XX, Li YG. Effects of electroacupuncture on corticotropin-releasing hormone in rats with chronic visceral hypersensitivity. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 7181-7190 [PMID: 26109804 DOI: 10.3748/wjg.v21.i23.7181]
 - 25 孙燕, 柳锋霖, 宋耿青, 汪步海, 钱伟, 侯晓华. 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. 中华消化杂志 2006; 26: 38-41
 - 26 姚明, 杨建平, 肖旺频, 矫勇铁, 蒋星红, 印其章. 大鼠结肠扩张内脏痛模型痛阈的影响因素. 中华麻醉学杂志 2004; 24: 74-75
 - 27 钟杰, 祝金泉. 雌激素与大鼠内脏高敏感关系的实验研究. 实验与检验医学 2010; 28: 123-126
 - 28 Yadid G, Nakash R, Deri I, Tamar G, Kinor N, Gispan I, Zangen A. Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Prog Neurobiol* 2000; 62: 353-378 [PMID: 10856609 DOI: 10.1016/S0304-0082(00)00018-6]
 - 29 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 肠易激综合征的发病机制. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 99-102
 - 30 Naliboff BD, Chang L, Munakata J, Mayer EA. Towards an integrative model of irritable bowel syndrome. *Prog Brain Res* 2000; 122: 413-423 [PMID: 10737074 DOI: 10.1016/S0079-6123(08)62154-8]

编辑: 马亚娟 电编: 李瑞芳





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

