

气囊对腹壁撤退反射实验结果的影响

赵妍,周思远*,罗丹妮,陈颖,黄辰

(成都中医药大学针灸推拿学院,成都 610075)

【摘要】 目的 为腹壁撤退反射实验优选出恰当的制备气囊的材料。方法 分别通过数显游标卡尺及X光图像对不同气囊在不同压力值下的直径进行测量;并采用3分疼痛阈值作为判断标准,测试不同气囊对大鼠造成明显内脏疼痛时所对应的压力值。结果 圆形乳胶气球的直径随压力值增加变化均匀和缓,并且可以满足实验中常用的压力范围(20~80 mmHg),其对大鼠造成内脏疼痛的阈值在伤害性刺激值附近,不会对大鼠肠道造成不可逆的损伤。结论 腹壁撤退反射实验中使用圆形乳胶气球制备气囊较为理想。

【关键词】 大鼠;腹壁撤退反射实验(AWR);气囊;标准化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0050-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.08.010

Effect of air bag on the outcome of abdominal withdrawal reflex test

ZHAO Yan, ZHOU Si-yuan*, LUO Dan-ni, CHEN Ying, HUANG Chen

(College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

【Abstract】 Objective To optimize the preparation of air bag materials for abdominal withdrawal reflex test. **Methods** To measure the diameters of different pressure-air bags by digital vernier caliper and X ray imaging. Using the pain threshold (3 points) as a criterion to test the pressure values of different air bags in the rats with corresponding visceral pain sensitivity. **Results** With the increasing pressure, the changes of the diameter of round latex balloon were uniform and gentle, and could meet the pressure range used in the experiment (20~80 mmHg). The threshold of visceral pain in rats was near the nociceptive stimulus value, and would not cause irreversible damage to the rat intestinal tract. **Conclusions** Air bag made from round latex balloon is an ideal tool to be used in abdominal withdrawal reflex test in rats.

【Key words】 Rat; Abdominal withdrawal reflex test; Air bag; Standardization

内脏高敏感性是功能性胃肠病的重要临床表现之一^[1],在功能性胃肠病的动物模型研究中,内脏高敏是否存在也是评价模型成功和稳定性的重要指标。目前评价内脏高敏模型是否成功的方法主要有腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分和腹外斜肌放电实验^[2]。相较于腹外斜肌放电实验的有创性操作,腹壁撤退反射评分在动物实验中应用更为广泛。腹壁撤退反射评分,即通过肉眼观察受刺激大鼠的腹肌收缩强度,并给出评分^[3,4]。测试时通常采用20 mmHg、40 mmHg、60 mmHg、80 mmHg 4个压

力值对大鼠肠壁进行刺激,根据大鼠的反应从0到4有不同评分。腹壁撤退反射实验目前没有统一的测量装置及标准,现有的报道多为实验者自己制作测试装置,装置涉及多个环节,其中对测试结果影响最大的是气囊的制备。通常用作气囊的材料有医用橡胶指套^[5]及乳胶气球^[6],其材质和形状的不同对实验结果均有较大的影响,因此本实验通过对比橡胶指套、圆形乳胶气球、长条形乳胶气球所制备的气囊,筛选出最适合制作测试气囊的材料,以期对AWR测试标准化改良起到积极的作用。

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81503665);成都中医药大学校基金(ZRQN1538)。

【作者简介】 赵妍(1982-),女,主治中医师,博士研究生,研究方向:针灸的临床及机制研究。E-mail: 214012310@qq.com

【通讯作者】 周思远(1984-),女,讲师,研究方向:针刺治疗功能性消化不良的效应与机制研究。E-mail: zsysy6688@qq.com

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 8 周龄, 体重(250 ± 5)g, 由四川省医学科学院实验动物研究所养殖研究室提供[SCXK(川)2013-15]。动物在成都中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养[SYXK(川)2014-021], 昼夜节律 12 h/12 h, 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。实验操作过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验器材

8F 导尿管; 5 英寸圆形乳胶气球(Sempertex: ISO 9001:2008); 3 英寸长条形乳胶气球(Sempertex: ISO 9001:2008); 一次性医用橡胶手套(科邦 M7.5, 生产许可证号: 沪食药监械生产许 20 030 944 号); 手术缝合四线(4-0); 自制亚克力大鼠观察箱(20 cm × 8 cm × 6 cm); 台式血压计(鱼跃牌); 数显游标卡尺(MNT 美耐特); 电子秤; 数码相机(Canon EOS 600D); 兽用 DR 数字 X 光机(InnoVet)。

1.3 实验方法

1.3.1 材料制备方法

将三种气囊材料(医用橡胶指套选取中指), 在 4.5 cm 及 6 cm 处做标记, 沿 6 cm 处剪下, 用 AB 胶粘于 8F 导尿管前端, 外面用医用胶布固定, 于 4.5 cm 处以 4-0 手术缝合尼龙线系紧, 做成气囊导管。选用经密闭性测试合格者进行后续实验。

血压计改装方法: 将台式血压计袖带拆除, 经三通管与球囊导管连接, 以 AB 胶粘牢, 剩余一端连接气囊导尿管开口端(图 1)。



图 1 改装后的血压计

Fig. 1 Appearance of the modified blood pressure meter

1.3.2 实验设计方案

1) 不同气囊在体外的直径变化: 使用数显游标卡尺测量一次性医用橡胶指套、5 英寸圆形乳胶气

球、3 英寸长条形乳胶气球改良制成的气囊在 4 个压力值(20、40、60、80 mmHg)下的直径变化。

2) 不同气囊在结肠内的直径变化: 通过 X 光对大鼠进行成像, 等比例测量一次性医用橡胶手套、5 英寸圆形乳胶气球、3 英寸长条形乳胶气球改良制成的气囊在 4 个压力值(20、40、60、80 mmHg)下在大鼠结肠内的直径变化。

3) 不同气囊对 AWR 疼痛阈值的影响: 将大鼠顺序称重、记录、编号, 随机分为 3 组, 每组 10 只, 根据 AWR 评分标准^[7], 以出现 3 分的压力值作为疼痛阈值^[8], 分别测试一次性医用橡胶手套、5 英寸圆形乳胶气球、3 英寸长条形乳胶气球改良制成的气囊所对应的压力值, 并对其进行统计分析和比较。

1.4 统计学方法

统计学方法应用 SPSS 19.0 统计软件对实验三的数据进行数据处理和分析, 符合正态分布的计量资料以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)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, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各气囊直径与压力值的关系

医用橡胶指套所改良的气囊随压力值增大直径变化突兀且不稳定, 且能够稳定的压力值最高仅为 50 mmHg, 继续充气, 压力值并不会随着气囊的增大而上升, 反而下降(图 2); Sempertex 5 英寸圆形气球直径随压力值增大较为均匀和缓, 且最高压力值可达 70 mmHg, 之后随充气量增加, 体积增大, 压力值下降(图 3); 而 Sempertex 3 英寸长条形气球最高可以达到 140 mmHg, 但直径随压力值增加改变微弱(图 4)。血压计每升高 10 mmHg 所对应的各气囊直径变化见表 1。

2.2 各气囊在大鼠结肠内的直径与压力值的关系

在大鼠体内, 医用橡胶指套所改良的气囊直径最大, 能够稳定的压力值最高为 60 mmHg, 继续充气, 水银柱反而下降, 为避免对大鼠结肠造成损害, 未测量继续充气后的直径(图 5); Sempertex 5 英寸圆形气球所改良的气囊直径介于橡胶指套与长条形气球之间, 水银柱可以稳定在 80 mmHg(图 6); Sempertex 3 英寸长条形气球改良气囊在 80 mmHg 时水银柱也可以保持恒定, 但在大鼠结肠及降结肠中的直径随压力值增加改变较医用橡胶指套及圆形气球差异较小(图 7)。血压计每升高 20 mmHg 所对应的各气囊在大鼠结肠内直径变化见表 2。

表 1 不同气囊随压力值增大直径变化 (mm)

Tab. 1 The diameter of the air bag changes with the increasing pressure

	10 mmHg	20 mmHg	30 mmHg	40 mmHg	50 mmHg	60 mmHg	70 mmHg	80 mmHg	90 mmHg	100 mmHg	110 mmHg	120 mmHg	130 mmHg	140 mmHg
1	15.68	19.58	20.23	21.87	25.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	21.00	21.78	22.55	23.58	24.59	26.46	29.86	-	-	-	-	-	-	-
3	9.60	10.09	10.34	10.57	10.77	10.92	11.12	11.46	11.70	11.97	12.03	12.51	12.84	14.18

注: (1) 橡胶指套; (2) 圆形气球; (3) 长条形气球。

Note. (1) Rubber fingerstall; (2) Round balloon; (3) Long balloon.

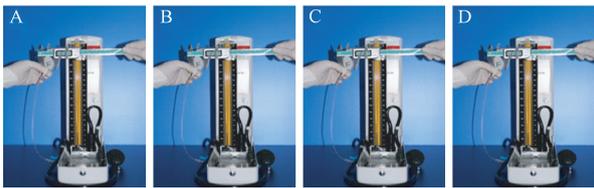
表 2 不同气囊在大鼠体内随压力值增加直径变化 (cm)

Tab. 2 Changes of the diameter of air bag put inside the rat colorectum following the increase of pressure

	0 mmHg		20 mmHg		40 mmHg		60 mmHg		80 mmHg	
	直肠 Rectum	降结肠 Descending colon								
1	0.53	0.50	0.71	0.81	0.94	0.95	1.02	1.09	-	-
2	0.36	0.54	0.51	0.58	0.58	0.70	0.70	0.94	0.71	1.01
3	0.52	0.60	0.53	0.65	0.58	0.67	0.65	0.74	0.67	0.83

注: (1) 橡胶指套; (2) 圆形气球; (3) 长条形气球。

Note. (1) Rubber fingerstall; (2) Round balloon; (3) Long balloon.

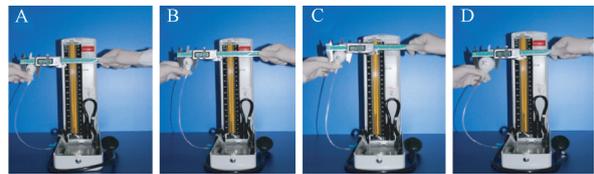


注: (A) 20 mmHg; 气囊最大直径 19.58 mm; (B) 40 mmHg; 气囊最大直径 21.87 mm; (C) 50 mmHg; 气囊最大直径 25.10 mm; (D) 继续注气 (36.6 mm), 压力值降低 (46 mmHg)。

图 2 橡胶指套直径

Note. (A) 20 mmHg; maximum diameter is 19.58 mm; (B) 40 mmHg; maximum diameter is 21.87 mm; (C) 50 mmHg; maximum diameter is 25.10 mm; (D) Further increase the diameter (36.6 mm), but the pressure value drops (46 mmHg).

Fig. 2 The diameter of a medical rubber fingerstall



注: (A) 20 mmHg; 气囊最大直径 21.78 mm; (B) 40 mmHg; 气囊最大直径 23.58 mm; (C) 70 mmHg 气囊最大直径 29.86 mm; (D) 继续注气 (36.5 mm), 压力值降低 (60 mmHg)。

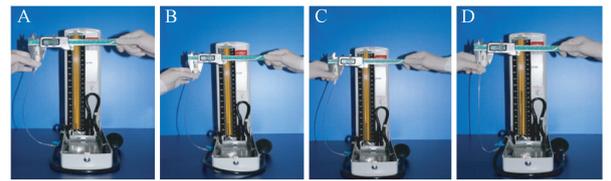
图 3 圆形气球直径

Note. (A) 20 mmHg; maximum diameter is 21.78 mm; (B) 40 mmHg; maximum diameter is 23.58 mm; (C) 70 mmHg; maximum diameter is 29.86 mm; (D) Further increase the diameter (36.5 mm), but the pressure value drops (60 mmHg).

Fig. 3 The diameter of a round balloon

2.3 各气囊对应的直肠扩张疼痛阈值

不同材质及形状的气囊所测得的疼痛阈值差异较大。橡胶指套改良气囊在 20 mmHg 左右大鼠即出现明显的疼痛反应, 圆形气球改良气囊致使大



注: (A) 20 mmHg; 气囊最大直径 10.09 mm; (B) 40 mmHg; 气囊最大直径 10.57 mm; (C) 60 mmHg; 气囊最大直径 10.92 mm; (D) 140 mmHg; 气囊最大直径 14.18 mm。

图 4 长条形气球直径

Note. (A) 20 mmHg; maximum diameter is 10.09 mm; (B) 40 mmHg; maximum diameter is 10.57 mm; (C) 60 mmHg; maximum diameter is 10.92 mm; (D) 140 mmHg; maximum diameter is 14.18 mm.

Fig. 4 The diameter of a long balloon

表 3 各组气囊测得的疼痛阈值 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Pain threshold measured in each rat group

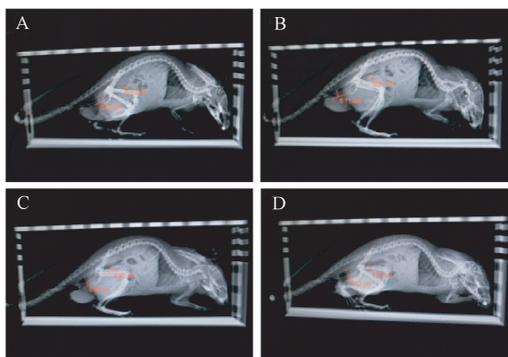
	疼痛阈值/mmHg Pain threshold
橡胶指套 Rubber fingerstall	21.110 ± 2.355
圆形气球 Round balloon	50.630 ± 3.889 [△]
长条形气球 Long balloon	89.259 ± 3.641 ^{△▽}

注: 与橡胶指套比较, [△] $P < 0.05$; 与圆形气球比较, [▽] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the medical rubber finger cover, [△] $P < 0.05$; Compared with the round balloon, [▽] $P < 0.05$.

鼠出现明显疼痛反应的阈值在 50 mmHg 附近, 长条形气球改良气囊的疼痛阈值最高, 在 90 mmHg 上下, 三种气囊对应的疼痛阈值之间两两比较均 $P < 0.05$, 差异有显著性 (表 3)。

3 讨论

腹壁撤退反射实验 (AWR) 是评价慢性内脏痛觉

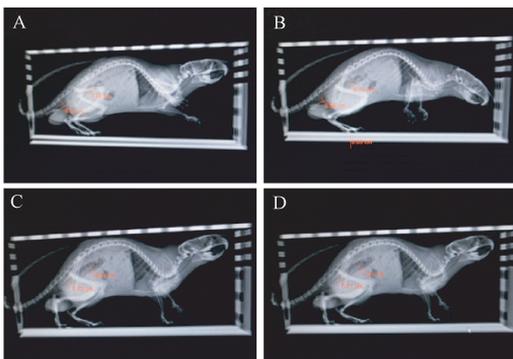


注:(A)未充气:气囊在直肠内最大直径 0.53 cm,在降结肠内最大直径 0.50 cm;(B)20 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.71 cm,在降结肠内最大直径 0.81 cm;(C)40 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.94 cm,在降结肠内最大直径 0.95 cm;(D)60 mmHg:气囊在直肠内最大直径 1.02 cm,在降结肠内最大直径 1.09 cm。

图 5 橡胶指套在大鼠体内直径

Note. (A) un-aerated; the maximum diameter of the balloon in the rectum is 0.53 cm, and that in the descending colon is 0.50 cm; (B) 20 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 0.71 cm, and that in the descending colon is 0.81 cm; (C) 40 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 0.94 cm, and that in the descending colon is 0.95 cm; (D) 60 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 1.02 cm, and that in the descending colon is 1.09 cm.

Fig. 5 The diameter of medical rubber fingerstall inside the rat body

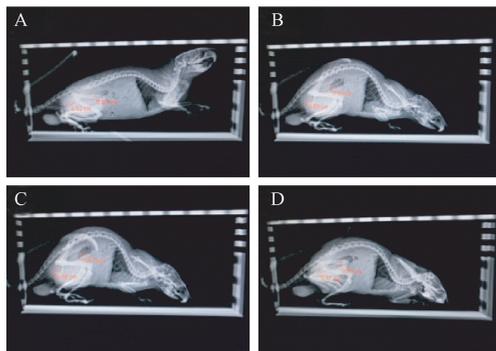


注:(A)20 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.51 cm,在降结肠内最大直径 0.58 cm;(B)40 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.58 cm,在降结肠内最大直径 0.70 cm;(C)60 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.70 cm,在降结肠内最大直径 0.94 cm;(D)80 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.71 cm,在降结肠内最大直径 1.01 cm。

图 6 圆形气球在大鼠体内直径

Note. (A) 20 mmHg; the maximum diameter of the balloon in the rectum is 0.51 cm, and that in the descending colon is 0.58 cm; (B) 40 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 0.58 cm, and that in the descending colon is 0.70 cm; (C) 60 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 0.70 cm, and that in the descending colon is 0.94 cm; (D) 80 mmHg; the maximum balloon diameter in the rectum is 0.71 cm, and that in the descending colon is 1.01 cm.

Fig. 6 The diameter of round balloon inside the rat body



注:(A)未充气:气囊在直肠内最大直径 0.52 cm,在降结肠内最大直径 0.60 cm;(B)20 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.53 cm,在降结肠内最大直径 0.65 cm;(C)40 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.58 cm,在降结肠内最大直径 0.67 cm;(D)80 mmHg:气囊在直肠内最大直径 0.67 cm,在降结肠内最大直径 0.83 cm。

图 7 长条形气球在大鼠体内直径

Note. (A) Un-aerated; the maximum diameter of the balloon in the rectum is 0.52 cm, and that in the descending colon is 0.60 cm; (B) 20 mmHg; the maximum diameter in the rectum is 0.53 cm, and that in the descending colon is 0.65 cm; (C) 40 mmHg; the maximum diameter in the rectum is 0.58 cm, and that in the descending colon is 0.67 cm; (D) 80 mmHg; the maximum diameter in the rectum is 0.67 cm, and that in the descending colon is 0.83 cm.

Fig. 7 The diameter of long balloon inside the rat body

敏化模型的重要指标,然而其测试装置和方法缺乏统一的标准。目前常用的测量 AWR 的方法主要有三类:等体积注水法^[8]、等体积注气法^[9]以及血压计恒定压力值充气法^[10]。通过前期实验对这三种实验方法进行验证,发现注水法在重复测量时无法保证气囊中的水完全抽取干净,每次都会残留无法确定体积的液体,导致实验出现偏差;注气法在重复测量时可以避免这一问题,但是在测量过程中由于注射器与导管并非完全密闭,如有漏气现象实验者无法及时觉察,同样会影响实验结果的准确性;而血压计法既可以在重复测量时减小误差,研究者又可以在漏气时通过观察水银柱的下降及时发现,故而在现阶段研究中应用最多的为血压计法,常选用的压力值分为 4 级:20 mmHg、40 mmHg、60 mmHg 和 80 mmHg^[11]。气囊的选择则多采用医用橡胶指套进行改良^[12,13]。然而前期实验发现采用此种方法,血压计的水银柱无法恒定的保持在 60 mmHg 和 80 mmHg,而在 20 mmHg 和 40 mmHg 不存在这一现象,本研究组更换了乳胶气球作为改良气囊,发现可以较好的实现 4 个等级的压力值,因此本实验对不同材质及不同形状的改良气囊进行了实验验证,以期筛选出满足该实验要求的合适的气囊材料。

由于橡胶材料力学性质复杂,仅在小应变时符合胡克定律,即在线性应变阶段,气球内部的压强会随着气球体积的增大而上升,但当压强达到其峰值后,气球内部的压强反而会随着气球体积的增大而减小^[14]。峰值后的形变则属于有限弹性理论(finite elasticity theory)范畴^[15]。而 AWR 实验中气囊利用的正是柔性橡胶材料在小应变范围内的线性表现。研究结果证实医用橡胶指套改良的气囊在 60 mmHg 和 80 mmHg 时无法恒定的维持实验所需压力值,而圆形乳胶气球和长条形乳胶气球则可以较好的实现这一点。因此圆形及长条形乳胶气球较医用橡胶指套的线性范围要大,更能满足实验的需要。通过体外及体内实验发现:在线性范围内气囊直径均随压力增加而增大,但同等压力下扩充气囊时,其直径增长幅度并不一致,而是呈现出长条形乳胶气球 < 圆形乳胶气球 < 医用橡胶指套的变化,这是由于不同柔性橡胶制品的压强峰值与其形状及材料均呈相关性,材质越厚其峰值越高,同等材质的情况下,长条形气球的压强峰值要高于球形气球^[16]。

腹壁撤退反射实验所选用的气囊须同时满足两个必要条件:一是线性应变范围不能过窄,二是在该范围内直径随压力变化须均衡而明显。实验发现橡胶指套改良气囊线性范围过窄,无法满足实验需求;长条形乳胶气球改良气囊线性应变范围足够,然而其随压力增高发生形变不明显,因此对应的压力值下气囊对大鼠结直肠的刺激差异不显著,对实验结果的判定造成困扰;圆球形乳胶气球则能较好的同时满足这两点,并且目前认为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^[17]。圆形气球改良气囊致使大鼠出现明显疼痛反应的阈值在 50 mmHg 左右,接近于伤害性刺激的阈值;橡胶指套改良气囊在 20 mmHg 左右大鼠即出现明显的疼痛反应,长条形气球改良气囊的疼痛阈值最高,在 90 mmHg 上下,这些都会对实验结果造成影响,导致目前的测试方法之间缺少有效的沟通。因此对气囊进行优化和筛选将对 AWR 测试方法的标准化研究起到重要的作用。

综上所述,根据胡克定律及有限弹性理论,在腹壁撤退反射实验中选择合适的材质及形状的橡胶制品是保证实验结果的准确性及可靠性的关键,圆形乳胶气球由于其具有形变均衡稳定,模型评价

特异性高,对大鼠肠道伤害性刺激小等优点,是较为理想的制备测试气囊的材料。

参考文献:

- [1] 彭珊,赵钢,李春艳. 肠易激综合征的发病机制研究进展[J]. 中国医药导报,2016,13(06):54-57.
- [2] 陈瑜,林春,陈爱琴,等. 评价清醒大鼠内脏痛觉敏感性的方法[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(01):54-55+59.
- [3] 樊江波,畅洪昇,董世芬,等. 慢性应激致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报,2010,18(02):91-95+88.
- [4] 刘艳霞,赵莹,刘蕾,等. 肠易激综合征动物模型的复制与评价[J]. 实验动物与比较医学,2012,32(02):165-169.
- [5] Chen Y, Lin C, Tang Y, et al. ZD 7288, an HCN channel blocker, attenuates chronic visceral pain in irritable bowel syndrome-like rats[J]. World J Gastroenterol,2014,20(8):2091-2097.
- [6] Shang JJ, Yuan JY, Xu H, et al. Shugan-decoction relieves visceral hyperalgesia and reduces TRPV1 and SP colon expression[J]. World J Gastroenterol,2013,19(44):8071-8077.
- [7] Yu YB, Zuo XL, Zhao QJ, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to abdominal pain in irritable bowel syndrome[J]. Gut,2012, 61(5):685-694.
- [8] Wang FY, Su M, Zheng YQ, et al. Herbal prescription Changán II repairs intestinal mucosal barrier in rats with post-inflammation irritable bowel syndrome[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(6):708-715.
- [9] La JH, Sung TS, Kim HJ, et al. Peripheral corticotropin releasing hormone mediates post-inflammatory visceral hypersensitivity in rats[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(5):731-736.
- [10] Weng ZJ, Wu LY, Zhou CL, et al. Effect of electroacupuncture on P2X3 receptor regulation in the peripheral and central nervous systems of rats with visceral pain caused by irritable bowel syndrome[J]. Purinergic Signal, 2015,11(3):321-329.
- [11] He YQ, Chen Q, Ji L, et al. PKC γ receptor mediates visceral nociception and hyperalgesia following exposure to PTSD-like stress in the spinal cord of rats[J]. Mol Pain,2013,9(1):35.
- [12] Zhang NZ, Ma L, Jun C, et al. Changes in mast cell infiltration: a possible mechanism in detrusor overactivity induced by visceral hypersensitivity[J]. Int Braz J Urol, 2016,42(2):373-382.
- [13] 赵迎盼,苏敏,王凤云,等. 肠安 I 号方对肠易激综合征内脏高敏感大鼠 5-HT 信号系统及海马 BDNF mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(10):1228-1235.
- [14] 胡斌,贺玲凤,张蕊. 橡胶材料弹性模量数字图像相关测定法[J]. 实验力学,2011,26(02):151-157.
- [15] 黄思议,班尔达,陈思聪,等. 气球的非线性力学特性探究[J]. 高中数理化,2012,(20):46-47.
- [16] 阳丽,肖华鹏,全文文,等. 用大学物理知识讲解连通气球实验现象[J]. 广西物理,2015,(04):37-39.
- [17] 孙燕,柳锋霖,宋耿青,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(01):38-41.

[收稿日期]2016-12-02