

何佳慧,何杰滢,张百荣,等. 肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1555–1563.
He JH, He JY, Zhang BR, et al. Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1555–1563.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.005

肝郁证便秘型肠易激综合征模型的建立与评价

何佳慧,何杰滢,张百荣,张水娣,魏苑君,杨超燕,陈艳芬*

(广东药科大学中药学院,广州 510006)

【摘要】 目的 采用单因素造模法和多因素联合造模法分别制备肝郁证便秘型肠易激综合征 (IBS-C) 大鼠模型,通过比较不同指标,提供理想的 IBS-C 实验动物模型。**方法** 42 只 SD 大鼠随机分为空白组 (Normal 组)、冰水灌胃组 (Cold 组)、束缚组 (Restrain 组)、夹尾组 (Tail 组)、冰水灌胃 + 束缚组 (C + R 组) 和冰水灌胃 + 夹尾组 (C + T 组)。造模期间观测各组体重、进食量、饮水量和存活情况,进行旷场行为学、粪便 Bristol 评分、内脏敏感性、小肠推进等指标观测,HE 染色观察大鼠结肠病理改变,ELISA 法检测血清、结肠中 5-HT、VIP 含量。**结果** 造模后,各模型组大鼠体重下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),进食量、饮水量减少,各模型组血清中的 5-HT 含量均有上升。其中 Cold 组排便粒数及 Bristol 得分减少,结肠 5-HT 含量增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);Restrain 组旷场总路程及平均速度减少 ($P < 0.01$);Tail 组糖水偏好降低 ($P < 0.01$);C + T 组糖水偏好率、旷场总路程、小肠推进率、排便粒数及 Bristol 得分减少,结肠中 5-HT 含量增加, VIP 含量减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);C + R 组旷场总路程、平均速度、结肠中 VIP 含量减少 ($P < 0.05$);除 Tail 组,其余模型组与空白组相比,在造模 7、14 d,各压力值下均出现内脏高敏感性 ($P < 0.05, P < 0.01$);病理形态学观察显示,各模型组未见明显的炎性细胞浸润或病理学改变。**结论** 采用冰水灌胃结合夹尾法可以成功建立肝郁证 IBS-C 大鼠模型,是 5 种方法中的首选,为系统深入研究中医药防治 IBS-C 机制奠定了基础。

【关键词】 肝郁证便秘型肠易激综合征;大鼠;冰水;束缚;夹尾

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1555-09

Establishment and evaluation of constipated irritable bowel syndrome model with liver depression syndrome

HE Jiahui, HE Jieying, ZHANG Bairong, ZHANG Shuidi, WEI Yuanjun, YANG Chaoyan, CHEN Yanfen*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Corresponding author: CHEN Yanfen. E-mail: xwnai@163.com

【Abstract】 Objective To prepare rat models of liver stagnation syndrome constipation-type irritable bowel syndrome (IBS-C) using single and multi-factor modeling method with different indicators, to provide ideal experimental animal models of IBS-C. **Methods** Forty-two SD rats were divided randomly into blank (Normal), cold-water gavage (Cold), restraint (Restrain), tail-clamping (Tail), cold-water gavage + restraint (C + R), and cold-water gavage + tail-clamping groups (C + T). Body weight, food intake, water intake, and survival status, as well as open-field behavior, fecal Bristol score, visceral sensitivity, and small intestine propulsion were observed in each group during the modeling period. Pathological changes in the rat colon were observed by hematoxylin and eosin staining, and the serum and colon contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and vasoactive intestinal peptide (VIP) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The body weight in each group decreased after modeling ($P < 0.05, P < 0.01$), the food and water intakes decreased, and serum 5-HT levels increased. The number of fecal particles and Bristol score decreased

【基金项目】广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515011128)。
Funded by Guangdong Provincial Natural Science Foundation General Project (2023A1515011128).
【作者简介】何佳慧 (2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药效评价与应用研究。Email:jiahuihe1100@163.com
【通信作者】陈艳芬 (1977—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中药药效评价与作用机制研究。Email:xwnai@163.com

while the colon 5-HT content increased in the Cold group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the total distance and average speed of the restraint group in the open field decreased ($P < 0.01$); the preference for sugar water in the Tail group decreased ($P < 0.01$); the preference for sugar water, total open-field distance, small intestine propulsion rate, defecation particles, and Bristol score all decreased, while the colon 5-HT content increased and the VIP content decreased in the C + T group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and the total distance, average speed, and VIP content in the colon decreased in the C + R group ($P < 0.05$). Except for the Tail group, all the model groups showed visceral hypersensitivity ($P < 0.05$, $P < 0.01$) compared to the blank group at various pressure values on days 7 and 14 of modeling. Pathological observations showed no significant inflammatory cell infiltration or pathological changes in any of the model groups. **Conclusions** The combination of ice-water gastric lavage and tail clamping can be used to establish a rat model of liver depression syndrome in IBS-C. This may be the best of the five tested method, and the resulting model may lay the foundation for further systematic and in-depth research into the mechanism of traditional Chinese medicine in preventing and treating IBS-C.

[Keywords] constipation-type irritable bowel syndrome with liver depression syndrome; rat; cold water; restraint; tail clamping

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种反复腹痛或腹部不适,并伴排便异常或排便习惯改变为主要临床症状的功能性肠病,其中便秘型肠易激综合征(constipation type of irritable bowel syndrome, IBS-C)属其常见亚型之一,主要表现为排便困难或排便时间延长,患病率呈逐年升高趋势^[1]。但目前关于 IBS-C 的模型研究极少,不利于该病病机研究及药物研发。IBS-C 属中医学“便秘”“腹痛”等范畴,中医认为肝气郁结,情志不调,失于疏泄,肝气横逆乘脾,脾失健运,则运化之力不足,以致肠腑传导失司,糟粕内停而发为便秘,总结其病机为肝郁气滞,脾运失健所致^[2]。中医药治疗 IBS-C 疗效显著,建立与之相关的肝郁证 IBS-C 动物模型是重要的基础。因此,本研究结合 IBS-C 经典造模因素,从中医病因病机理论出发,采用 5 种造模方法进行比较研究,分别为:冰水灌胃法、束缚法、夹尾法、冰水灌胃结合束缚法、冰水灌胃结合夹尾法,探索建立肝郁证 IBS-C 大鼠模型,为日后的病理研究和药物治疗机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

42 只 7 周龄 SPF 级 SD 健康大鼠,雌雄各半,体重 180 ~ 200 g,购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】。期间自由饮水,饲喂普通维持饲料。饲养环境:昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 60%,温度 24 ~ 26℃,适应性饲养于广东药科大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(粤)2022-0125】。本实验方案及过程通过广东药科大

学实验动物中心伦理委员会批准(gdpulac 2017637)。

1.1.2 主要试剂与仪器

蔗糖(012070,天津市致远化学试剂有限公司);氯化钠(20211201,天津市致远化学试剂有限公司);异氟烷(22043001,瑞沃德生命科技有限公司);4%多聚甲醛(21348860, Biosharp);中性树胶(10004160,国药集团化学试剂有限公司);大鼠 5-HT ELISA 试剂盒(202203,江苏酶免实业有限公司);大鼠 VIP ELISA 试剂盒(Apr2022,泉州市睿信生物科技有限公司)。

旷场实验箱(广州必特生物科技有限公司,中国);超声波清洗器(SK8200 H,上海科导超声仪器有限公司,中国);高速冷冻离心机(H1850R,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国);万分之一分析天平(AUY120, SHIMADZU, 日本);智能程控生物组织自动脱水机(TC-120H,湖北泰维科技实业有限公司,中国);生物组织自动包埋机(TB-718,湖北泰维科技实业有限公司,中国);组织切片机(RM2235,徕卡显微系统(上海)有限公司,中国);恒温摊片烤片机(TK-218,湖北泰维科技实业有限公司,中国);生物组织自动染色机(TR-108I,湖北泰维科技实业有限公司,中国);载玻片(G6004,武汉赛维尔生物科技有限公司,中国);倒置显微镜(CKX41, Olympus Corporation, 日本);多功能酶标仪(X5 型, Bio Tek Instruments, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模方法

42 只 SD 大鼠随机分为空白组(Normal 组)、冰水灌胃组(Cold 组)、束缚组(Restrain 组)、夹尾组

(Tail 组)、冰水灌胃 + 束缚组(C + R 组)、冰水灌胃 + 夹尾组(C + T 组), 每组 7 只。

造模持续 14 d, 期间正常饮食饮水。Normal 组生理盐水灌胃, 每只 2 mL; Cold 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL; Restrain 组用松紧带将大鼠捆绑束缚在饲养笼铁盖上 1 h; Tail 组用医用纱布包裹金属钳夹住大鼠尾巴远端, 每天 2 次, 每次 30 min; C + R 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后将大鼠捆绑束缚在饲养笼铁盖上 1 h; C + T 组 0 ~ 4℃ 冰生理盐水灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后用医用纱布包裹的金属钳夹住大鼠尾巴远端, 每天 2 次, 每次 30 min。

1.2.2 体征指标检测

每天观察记录各组大鼠的体重、毛发色泽、精神状态、进食量、饮水量等。每周固定时间监测大鼠进食量, 计算各组日平均食量。进食量 = (初始饲料量 - 24 h 后剩余饲料量) / 每笼鼠数。饮水量计算同进食量。

1.2.3 糖水偏好实验

造模 0、14 d, 禁食禁水 24 h 后进行糖水偏好实验, 大鼠单笼饲养, 给予每只大鼠 1% 蔗糖水和纯水各 1 瓶, 测 1 h 的糖水偏好率。糖水偏好率 = (糖水消耗量 / 总液体消耗量) × 100%。

1.2.4 旷场实验(open field test, OFT)

造模 0、14 d, 将大鼠放入旷场实验箱中适应环境 3 min, 摄像头记录动物行为以及路径, 每只大鼠在旷场中自由运动 5 min。实验结束后, 用 75% 乙醇清理旷场上一只大鼠的排泄物, 避免影响下一只大鼠的运动。通过旷场实验仪器自带分析软件分析大鼠在整个实验中的运动总路程、平均速度等。

1.2.5 粪便粒数及 Bristol 评分

造模 0、14 d, 大鼠被放置在一个单独的代谢笼中, 记录 4 h 内粪便数量, 并根据 Bristol 标准进行评分: 1 分, 分散的类似于干球和坚果, 难以排泄; 2 分, 腊肠状, 但成块; 3 分, 腊肠状表面有裂纹; 4 分, 腊肠状或蛇形, 光滑柔软; 5 分, 软团具有清晰的边缘, 易于排泄; 6 分, 绒状物, 边缘不清或糊状; 7 分, 水样便或无固状物^[3-4]。

1.2.6 内脏敏感性

造模 0、7、14 d, 采用腹壁撤离反射实验(abdominal withdrawal reflex test, AWR)检测大鼠内脏敏感性^[5]。检测前 24 h 禁食不禁水, 将大鼠固定于不能随意翻转的固定盒中, 自制的气囊导管润滑

后, 插入大鼠肛门约 2 cm 处, 用胶带固定, 待大鼠适应后, 分别给予 20、40、60、80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 4 个压力级别进行刺激, 每个压力级别刺激 3 次, 每次 20 s, 间隔 180 s 后进行下一次刺激, 数据取均值^[6-7]。AWR 评分标准: 0 分, 大鼠情绪基本稳定, 无行为学反应; 1 分, 大鼠头部短暂静止不动; 2 分, 大鼠有轻微腹部肌肉收缩, 但腹部未抬离桌面; 3 分, 大鼠有强烈腹部肌肉收缩, 腹部抬离桌面; 4 分, 大鼠腹部强直收缩, 身体呈弓形, 腹部、骨盆及会阴部抬离桌面^[8]。

1.2.7 小肠推进率

造模 14 d, 禁食不禁水 24 h, 含炭末的半固定糊进行灌胃, 每只 2 mL, 30 min 后, 麻醉大鼠, 取出肠道, 将肠平铺在白纸上, 测量幽门至炭末距离及幽门至直肠末端距离分别为 L 和 S, 计算小肠推进率, 小肠推进率(%) = $L/S \times 100\%$ ^[9]。

1.2.8 病理组织学观察

造模 14 d, 麻醉大鼠, 剪取每只大鼠结肠组织, 4% 多聚甲醛固定液固定 24 h, 随后流水冲洗 1 h, 进行不同浓度乙醇梯度脱水, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 中性树胶封片。常规光镜下观察(100×)结肠的病理变化。

1.2.9 ELISA 法检测大鼠血清及结肠组织 5-HT、VIP 水平

造模 14 d, 大鼠麻醉后取腹主动脉血 5 mL, 静置后离心分离血清; 剪取大鼠结肠组织, 预冷生理盐水漂洗后, 滤纸擦干, 称重, 加入 9 倍量 PBS 缓冲液, 冰上充分研磨, 离心后取上清液, 按试剂盒说明书进行检测。

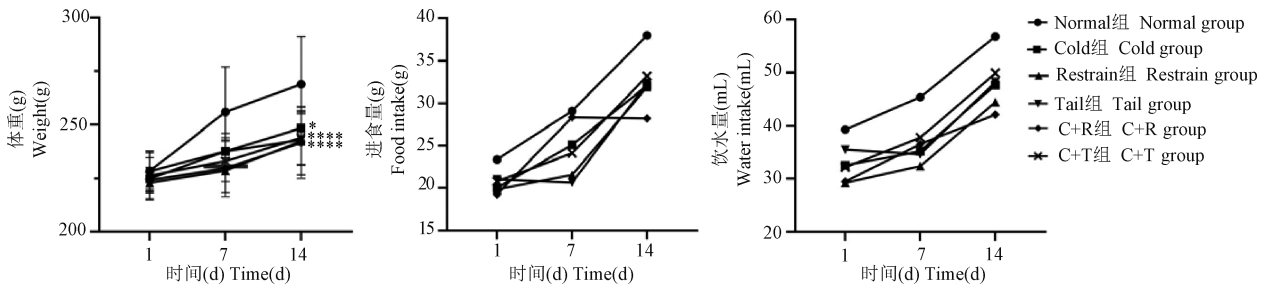
1.3 统计学分析

用 SPSS 23.0 软件进行统计分析, 数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 根据方差齐性检验, 方差齐用 LSD 分析, 方差不齐用 Tamhane's T2 分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 体征变化

大鼠初始体重无明显差异, 造模后, 各模型组较 Normal 组体重均显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 进食量、饮水量减少, 但无显著性差异(图 1)。各模型组大鼠精神萎靡不振, 皮毛无光泽。造模期间无大鼠死亡。



注:与 Normal 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)

Figure 1 Changes in physical signs of rats ($n = 7$)

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables and figures)

2.2 糖水偏好实验

糖水偏好实验是一种根据动物对甜味特殊偏爱设计的评估动物模型抑郁行为的重要检测方式^[10]。从图 2 结果可知,与正常组相比,Tail 组及 C + T 组糖水偏好率显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。C + R 组糖水偏好率降低,但无显著性差异。

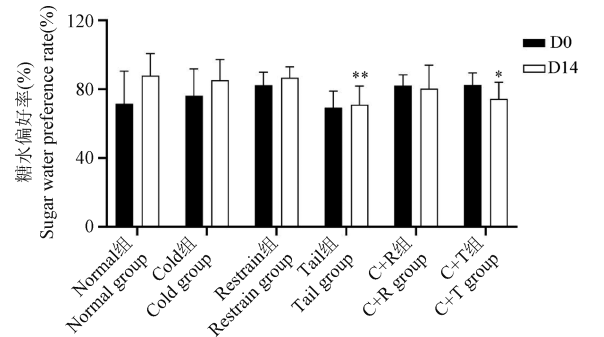


Figure 2 Changes in sugar water preference rate of rats in each group ($n = 7$)

2.3 旷场实验

Restrain 组和 C + R 组总路程及平均速度减少

($P < 0.01$, $P < 0.05$), C + T 组总路程明显减少 ($P < 0.05$) (表 1)。由图 3 可知,造模前各组大鼠自主运动无明显差异,且均往中央区域活动;造模 14 d 后,除 Normal 组及 Cold 组,其余 4 组活动区域主要集中在边角部位,说明可能夹尾及束缚都会造成大鼠的抑郁、焦虑倾向。

2.4 内脏敏感性

造模 7、14 d,除 Tail 组外,各组大鼠在 4 个压力值下均出现内脏高敏感性,存在显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示除 Tail 外的 4 种造模方法均可导致大鼠内脏高敏感性(图 4)。

2.5 排便情况

Cold 组、C + T 组的排便粒数及 Bristol 得分均明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),两组大鼠可能已出现较严重的便秘症状;而 Restrain 组粪便粒数及 Bristol 得分较 Normal 组有所增加,但无显著性差异,可能与本研究采用束缚刺激 1 h 有一定关系(见表 2)。有研究表明,束缚应激刺激量不充分时不能稳定地诱导 IBS-D 模型^[11]。

2.6 小肠推进率

造模后 Cold 组、C + T 组小肠推进率均下降,说

		表 1 各组大鼠旷场实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)			
		Table 1 Open field experimental results of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)			
组别 Groups		D0		D14	
		总路程 (mm) Total distance (mm)	平均速度 (mm/s) Average speed (mm/s)	总路程 (mm) Total distance (mm)	平均速度 (mm/s) Average speed (mm/s)
Normal 组	Normal group	2966.48 ± 620.91	9.89 ± 2.07	3577.85 ± 632.17	11.67 ± 2.42
	Cold 组	3185.87 ± 510.88	10.62 ± 1.70	3033.23 ± 987.48	10.11 ± 3.30
	Restrain 组	3108.20 ± 1382.06	10.50 ± 4.54	2355.60 ± 475.48**	7.85 ± 1.58**
	Tail 组	3411.92 ± 1175.13	11.38 ± 3.92	3016.90 ± 737.32	10.06 ± 2.46
	C + R 组	3438.98 ± 846.32	11.47 ± 2.82	2532.97 ± 1008.52*	8.44 ± 3.36*
	C + T 组	2883.50 ± 566.95	9.67 ± 1.88	2741.30 ± 557.98*	9.14 ± 1.86

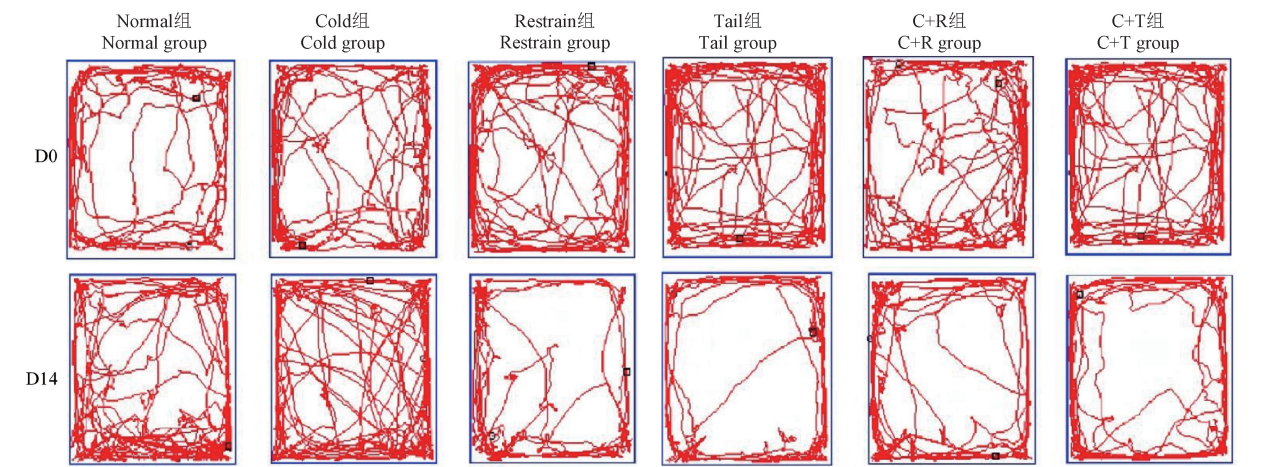


图 3 旷场实验轨迹变化

Figure 3 Changes in the trajectory of open field experiments

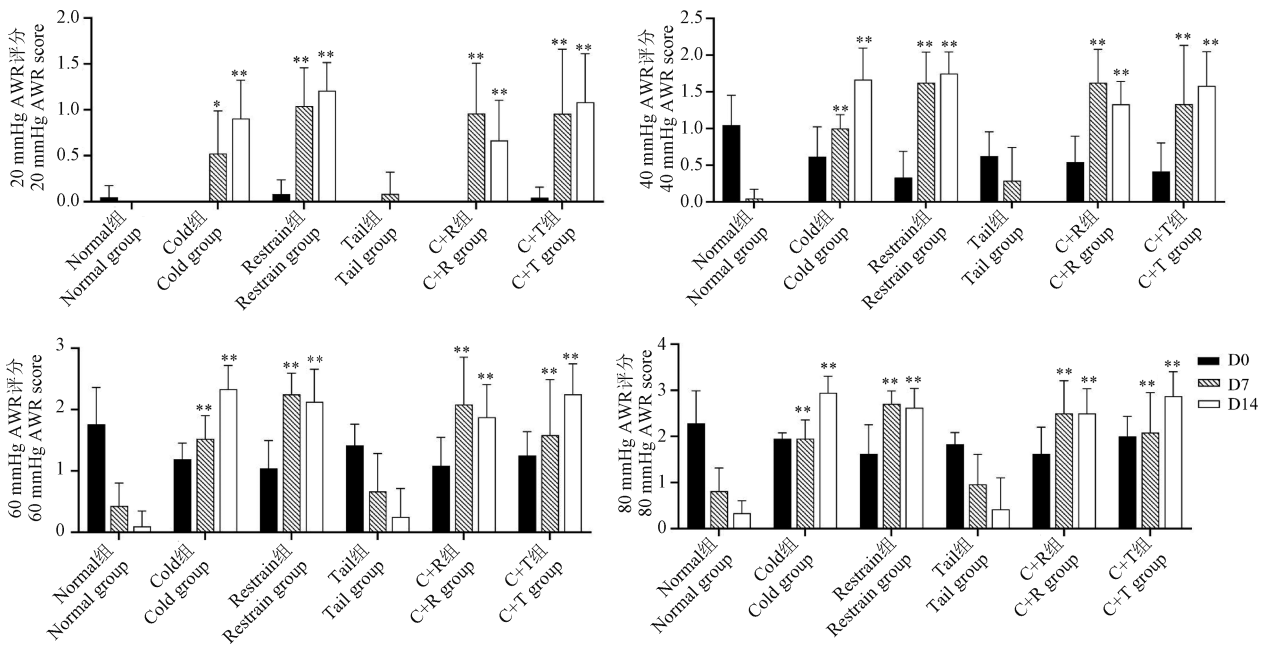


图 4 不同压力值下 AWR 得分变化情况($n = 7$)

Figure 4 Changes in AWR scores under different pressure values($n = 7$)

表 2 排便情况变化($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	粪便粒数(粒/只) Fecal particles (particles/piece)		Bristol 得分 Bristol score	
	D0	D14	D0	D14
Normal 组 Normal group	6.76 ± 2.82	5.57 ± 2.82	3.46 ± 0.44	3.21 ± 0.22
Cold 组 Cold group	6.90 ± 5.56	2.17 ± 1.64 *	3.28 ± 1.52	1.38 ± 0.96 **
Restrain 组 Restrain group	6.22 ± 6.06	7.00 ± 2.65	3.14 ± 0.75	3.56 ± 0.22
Tail 组 Tail group	6.18 ± 2.49	5.41 ± 1.81	3.32 ± 0.59	3.31 ± 0.41
C + R 组 C + R group	6.30 ± 2.61	4.29 ± 3.55	3.03 ± 0.61	3.08 ± 0.55
C + T 组 C + T group	6.57 ± 6.29	2.14 ± 2.85 *	3.07 ± 0.73	1.26 ± 1.28 **

明这两种方法造模后均能导致小肠推进率速度减慢,其中 C + T 组更为显著($P < 0.01$),Restrain 组及 C + R 组大鼠小肠推进率有升高的趋势,但与 Normal 组比较无显著性差异(图 5)。

2.7 血清、结肠中 5-HT、VIP 含量结果

ELISA 检测结果显示,各模型组血清 5-HT 含量均有上升。Cold 组与 C + T 组结肠 5-HT 含量显著增加($P < 0.05$);C + R 组与 C + T 组结肠中 VIP 含量明显减少($P < 0.05$)(表 3)。

2.8 病理形态学观察

各组大鼠结肠组织 HE 染色结果如图 6 所示,各模型组腺体排列较为整齐,未见明显的炎性细胞浸润或明显病理学改变,提示这些造模因素不会造成大鼠出现器质性病理改变。

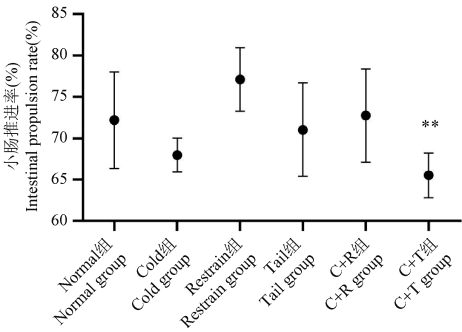


图 5 小肠推进率变化($n = 7$)
Figure 5 Changes in small intestine propulsion rate($n = 7$)

表 3 血清、结肠中 5-HT、VIP 含量($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 3 5-HT and VIP content in serum and colon($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别 Groups	血清 5-HT(ng/L) Serum 5-HT (ng/L)	结肠 5-HT(ng/L) Colon 5-HT (ng/L)	结肠 VIP(pg/mL) Colon VIP (pg/mL)
Normal 组 Normal group	299.36 ± 28.21	337.27 ± 46.28	56.85 ± 6.97
Cold 组 Cold group	325.01 ± 28.66	409.44 ± 89.03 *	51.80 ± 4.39
Restrain 组 Restrain group	321.49 ± 14.89	364.96 ± 18.34	55.02 ± 4.14
Tail 组 Tail group	313.44 ± 18.67	387.59 ± 72.44	51.27 ± 4.38
C + R 组 C + R group	306.25 ± 29.29	326.84 ± 17.47	39.50 ± 4.84 **
C + T 组 C + T group	323.24 ± 47.03	405.73 ± 18.62 *	45.42 ± 7.61 **

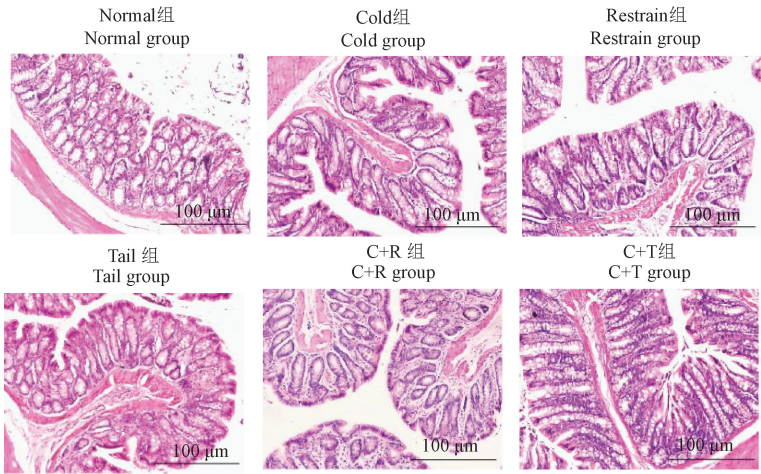


图 6 结肠 HE 染色
Figure 6 HE staining of colon

3 讨论

通过文献调研比较分析国内外 IBS-C 模型构建方法后可以发现,冰水灌胃是比较公认的 IBS-C 造模方法,冷饮危险因素中的温度被认为是引起肠道运动异常的关键因子,能够诱发大鼠的大便粒数减少和含水量减少^[12-20]。根据“多食生冷寒凉,损伤脾胃阳气”的中医理论,通过冰水灌胃给予连续的寒凉刺激,能够模拟实寒证的中医证候。但仅冰水灌胃单一因素刺激无法造成焦虑、抑郁等肝郁表

现,不符合 IBS 的发病特点。国家标准《中国临床诊疗术语》明确 IBS 病名为“肠郁”,大量研究表明本病症状出现或加重往往与精神因素有关,即与“郁证”密切相关^[20]。然而目前肝郁型 IBS-C 研究比较空缺,虽然也有个别文献报道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,但造模因素较复杂,因此亟需探索简便易行的肝郁证 IBS-C 造模方法^[21]。肝气郁多因郁怒所致,根据“怒伤肝,久则郁”,首先考虑通过经典的夹尾刺激、束缚应激因素分别建立肝郁模型。束缚应激和夹

尾刺激均是现代医学根据 IBS 发病的精神、神经因素用来诱发 IBS 动物模型的刺激因素,尤以前者在腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 模型中较为常用,一般采用番泻叶灌胃结合束缚应激刺激法,也有单独采用慢性束缚应激法^[22]。夹尾刺激极少单用做 IBS 模型的造模因素,可和疲劳、昼夜颠倒、断食水等因素一起诱发慢性应激致 IBS 大鼠模型^[22]。因此本研究结合目前关于 IBS-C 和肝郁模型的造模方法,采用冰水灌胃法、慢性束缚法、夹尾法、冰水灌胃结合慢性束缚、冰水灌胃结合夹尾法分别构建模型并采用多指标进行综合评价,为系统深入研究治疗中医药防治 IBS-C 机制奠定基础^[20]。

在研究过程中发现,虽然 5 种方法均能成功复制一定证候特征的大鼠模型,但在症状表现、出现时间及稳定性上有一定差异。现有研究表明 IBS-C 没有结肠器质性和结构改变,肠道转运缓慢和内脏超敏反应被认为是便秘肠易激综合征 (IBS-C) 的主要病理生理机制^[23-24]。本研究通过小肠推进来评价肠道运转快慢,造模后 Cold 组、C + T 组小肠推进率均下降,说明这两种方法造模后均能导致胃肠道运转减慢,其中 C + T 组更为显著。目前公认的内脏敏感性评价指标是 AWR 评分,当 AWR 评分升高,表明大鼠内脏敏感性增加,本研究中 Cold 组、Restrain 组、C + R 组、C + T 组均能显著提高大鼠的内脏敏感性;而 Tail 组的内脏敏感性没有显著增加,提示可能单独采用夹尾刺激大鼠这种刺激程度尚不够达到影响肠道敏感性。此外,单独束缚应激的 Restrain 组的排便量虽有增加,但与空白组比无显著性差异,可能和本实验采用的刺激量不够有关。根据文献报道,束缚应激刺激量不充分时不能稳定地诱导 IBS-D 模型,研究表明束缚模型 1 h 组和束缚模型 2 h 组所诱导 IBS-D 模型的内脏高敏感性程度相当($P > 0.05$),但 2 h 造模的动物在排便、结肠 5-HT_{3A}R 表达程度方面均有差别($P < 0.05$)^[11]。

糖水偏好实验及旷场实验都是评价抑郁动物模型的重要检测指标。本研究结果表明造模 14 d 后,与 Normal 组相比,仅 Tail 组和 C + T 组有显著性差异,C + R 组糖水偏好率虽有降低,但无显著性差异。根据文献报道,大鼠对于 1% 蔗糖溶液的消耗本身存在个体差异,最高和最低水平的大鼠可以相差 2 倍以上^[25];其次,由于糖水偏好测试前 1 d,对动物进行了饥饿处理,研究表明在食物(和/或水)匮乏的情况下,以饥饿为动机对甜味溶液的消

耗有很大的影响。饱养动物主要因其愉悦或有益的特性而消耗甜味溶液,而食物匮乏的动物主要是由于代谢/能量需求。食物匮乏增强了动物获取食物的动机,故大鼠在食物剥夺 24 h 后可能会消耗更多的蔗糖^[25]。因此,推测本实验中糖水偏好率结果可能受这些因素影响存在一定误差,提示将来可以对此进行深入比较研究。应用精神应激方法复制内脏高敏感动物模型过程中大鼠可能出现心理行为学渐变变化^[26]。所以旷场实验的单一参数不能充分反映动物的认知、情绪及探索能力方面的变化,将不同参数进行组合分析能更全面地反映实验动物的行为特征变化。本研究表明,造模 14 d 后,Restrain 组和 C + R 总路程及平均速度减少,C + T 组总路程明显减少;除 Normal 组及 Cold 组,其余 4 组活动区域主要集中在边角部位。因此,综合旷场实验的总路程、平均速度、轨迹图,夹尾及束缚可能都会造成大鼠的焦虑、抑郁倾向。

神经递质作为胃肠道神经和胃肠道平滑肌的中间介质,在调节肠动力中发挥重要作用,如 5-HT、VIP 等。5-HT 具有调节消化道功能的作用,有研究认为 5-HT 的增加导致了内脏高敏感,激活多种神经活性物质,使参与脑肠调节的化学信号异常表达;并且 5-HT 作用于其各种受体,引起患者的肠道运动、分泌的改变,导致产生各种临床症状^[27-28]。血管活性肠肽(VIP)是抑制胃肠运动的主要神经递质之一,具有松弛胃肠平滑肌和促进分泌和吸收功能,可促进肠道水和电解质的分泌^[29]。本实验对大鼠血清、结肠 5-HT 和结肠 VIP 含量测定发现,C + T 组 5-HT 及 VIP 含量增加,提示 5-HT 及 VIP 含量升高可能与 IBS-C 发生密切相关。

综上所述,对 5 种因素大鼠造模方式进行对比研究,多因素联合造模的动物相比单因素造模(冰水灌胃)更符合人类 IBS 的表现,其中冰水灌胃结合夹尾法建立的 IBS-C 大鼠模型的 Bristol 得分、排便粒数均降低,对糖水兴趣降低以及自主活动行为减少,肠道敏感性显著升高,小肠推进率降低,从各方面比较符合中医肝气郁滞证 IBS-C 动物特征,具有肝郁证候稳定,肠道动力障碍显著的优点,可作为比较理想的肝郁证 IBS-C 发病机制及相关中药药效评价的模型。但由于时间和条件的限制,研究也存在诸多不足,今后可以进一步扩大实验样本量,增加观察时间及检测指标,对造模过程中的复杂因素进行更全面的比较研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 李军祥, 陈諳, 唐旭东, 等. 肠易激综合征中西医结合诊疗共识意见(2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(3): 227-232.
- Li JX, Chen J, Tang XD, et al. Consensus on diagnosis and treatment of irritable bowel syndrome with integrated traditional Chinese and western medicine (2017) [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2018, 26(3): 227-232.
- [2] 刘建乔, 刘仍海, 吴承东, 等. 健脾疏肝丸治疗便秘型肠易激综合征肝郁气滞证临床疗效观察 [J]. 北京中医药, 2023, 42(4): 394-397.
- Liu JQ, Liu RH, Wu CD, et al. Clinical observation on treatment of constipation irritable bowel syndrome of stagnation of liver Qisynndrome with Jianpi Shugan Pill [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2023, 42(4): 394-397.
- [3] Ju M, Kim N, Shin CM, et al. A randomized, double-blind, active-controlled exploratory clinical trial for the evaluation of the efficacy and safety of goodmorning S granule® on constipation [J]. Korean J Gastroenterol, 2022, 80(1): 17-27.
- [4] Li L, Cui H, Li T, et al. Synergistic effect of berberine-based Chinese medicine assembled nanostructures on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome *in vivo* [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 1210.
- [5] 陈颖, 赵妍, 罗丹妮, 等. 腹壁撤退反射实验测量方法概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 89-93.
- Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. asurement methods for abdminal withdrawal reflex test [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 89-93.
- [6] 张立霞, 闫波, 潘颖, 等. 酸敏感离子通道 3 对肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响及其机制 [J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1162-1166.
- Zhang LX, Yan B, Pan Y, et al. Effect and mechanism of acid-sensing ion channel 3 on visceral hypersensitivity in rats with irritable bowel syndrome [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2023, 48(10): 1162-1166.
- [7] 潘晓鸥, 赵燕, 赵远桥, 等. 石斛碱对肝郁脾虚型肠易激综合征小鼠 GFAP、NGF、BDNF 表达及内脏敏感性的影响 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1186-1190.
- Pan XO, Zhao Y, Zhao YQ, et al. Effects of dendrobine on visceral sensitivity associated GFAP, NGF, BDNF ex-pressions in mice with irritable bowel syndrome of liver Qi-Stagnation & Spleen-Deficiency pattern [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(5): 1186-1190.
- [8] 高鸿智, 杨勇军, 刘仕鸿, 等. 中药治疗便秘型肠易激综合征 SD 大鼠的实验研究 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(4): 161-165.
- Gao HZ, Yang YJ, Liu SH, et al. Experimental study on treatment of constipation irritable bowel syndrome sd rats with traditional Chinese medicine [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2021, 37(4): 161-165.
- [9] 何杰滢, 桂蓓, 李梦秋, 等. 胃寒型功能性消化不良大鼠模型的构建 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(2): 212-217.
- He JY, Gui B, Li MQ, et al. Construction of functional dyspepsia models of Weihan syndrome in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(2): 212-217.
- [10] Monleon S, D'Aquila P, Parra A, et al. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine [J]. Psychopharmacology (Berl), 1995, 117(4): 453-457.
- [11] 周天然, 张瑶, 逯晓旭, 等. 慢性束缚应激腹泻型肠易激综合征大鼠模型的改良与评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 163-168.
- Zhou TR, Zhang Y, Lu XX, et al. Improvement and evaluation of rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome induced by chronic restrain stress [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2018, 35(1): 163-168.
- [12] 刘芳, 张芮苑, 刘畅, 等. 发汗前后厚朴对 IBS-C 大鼠肠道菌群分布及 5-HT、SP 水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(14): 141-149.
- Liu F, Zhang RY, Liu C, et al. Effect of *Magnolia officinalis* cortex before and after sweating on distribution of intestinal flora and levels of 5-HT and SP in IBS-C rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(14): 141-149.
- [13] 祁赛. 摩腹法对 IBS-C 模型大鼠肠活动效应及 EGCs、GDNF、AKt 的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学; 2020.
- Qi S. Study on the effect of abdominal massage on intestinal activity and EGCs, GDNF, AKt in IBS-C model rats [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine; 2020.
- [14] Filippone A, Ardizzone A, Bova V, et al. A combination of xyloglucan, pea protein and *Chia* seed ameliorates intestinal barrier integrity and mucosa functionality in a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Clin Med, 2022, 11(23): 7073.
- [15] Chen Y, Li Z, Yang Y, et al. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of experimental irritable bowel syndrome rat models [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(3): 607-613.
- [16] 杨倩, 杜妤, 郭子敬, 等. 麻枳降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠肠道间质细胞的影响 [J]. 中医杂志, 2015, 56(12): 1058-1060.
- Yang Q, Du Y, Guo ZJ, et al. Effect of *Mazhi Jiangzhuo Fang* on intestinal interstitial cell of rats with constipation type of irritable bowel syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 56(12): 1058-1060.
- [17] 刘永, 谷诺诺, 王凯星, 等. 通腑降浊方对便秘型肠易激综合征大鼠粪便菌群结构的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(6): 1127-1133.
- Liu Y, Gu NN, Wang KX, et al. Effect of bowels-unblocking and turbidity-purging recipe on microbial communities in faeces of rats with constipation-predominant irritable bowel syndrome [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(6): 1127-1133.
- [18] 刘梦茹, 邱仁静, 田耀洲, 等. 运脾柔肝方对便秘型肠易激综合征大鼠胃动素、生长抑素影响的实验研究 [J]. 中国医

- 药导报, 2020, 17(8): 4-8, 16, 198.
- Liu MR, Qiu RJ, Tian YZ, et al. Experimental study on effect of Yunpi Rougan Recipe on motilin and somatostatin in rats with constipation type irritable bowel syndrome [J]. Chin Med Her, 2020, 17(8): 4-8, 16, 198.
- [19] Mnatsakanyan MG, Dyukova GM, Pogromov AP, et al. Emotional and personality features of patients with irritable bowel syndrome and bowel inflammatory diseases [J]. Klin Med, 2016, 94(10): 764-769.
- [20] 黄烨, 殷惠军, 陈可冀. 病证结合的基础研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 299-303.
- Huang Y, Yin HJ, Chen KJ. Basic research on the combination of disease and syndrome [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2012, 32(3): 299-303.
- [21] 涂星, 柴玉娜, 唐洪梅, 等. 肝郁脾虚型肠易激综合征便秘大鼠模型的建立和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 30-34.
- Tu X, Chai YN, Tang HM, et al. Establishment and evaluation of a rat model of constipation-predominant irritable bowel syndrome with liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(1): 30-34.
- [22] 陈奇, 张伯礼. 中药药效研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2016.
- Chen Qi, Zhang BL. Methodology for the study of traditional chinese medicine pharmacodynamics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2016.
- [23] Huang Z, Lin Z, Lin C, et al. Transcutaneous electrical acustimulation improves irritable bowel syndrome with constipation by accelerating colon transit and reducing rectal sensation using autonomic mechanisms [J]. Am J Gastroenterol, 2022, 117(9): 1491-1501.
- [24] Kanazawa M, Palsson OS, Thiwan SIM, et al. Contributions of pain sensitivity and colonic motility to IBS symptom severity and predominant bowel habits [J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(10): 2550-2561.
- [25] Markov DD. Sucrose preference test as a measure of anhedonic behavior in a chronic unpredictable mild stress model of depression: outstanding issues [J]. Brain Sci, 2022, 12(10): 1287.
- [26] 易丽莎, 陈莹, 孙会会, 等. 精神应激致内脏高敏感大鼠的心理行为学变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(35): 1-6.
- Yi LS, Chen Y, Sun HH, et al. Psychological behavior changes in visceral hypersensitivity rat model induced by mental stress [J]. Chin J Modern Med, 2013, 23(35): 1-6.
- [27] 杨倩, 邱贝, 马赞, 等. 便秘型肠易激综合征大鼠肠组织中 5-HT 的实验研究 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(30): 35-37.
- Yang Q, Qiu B, Ma B, et al. Experimental study of 5-HT in intestinal tissues of rats with constipation predominant irritable bowel syndrome [J]. Clin J Chin Med, 2014, 6(30): 35-37.
- [28] 郑超伟, 李桂贤, 李敏, 等. 加味柴芍六君颗粒对便秘型肠易激综合征模型大鼠结肠组织 5-HT 的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(4): 386-388.
- Zheng CW, Li GX, Li M, et al. Effect of Jiawei Chaishao Liujun Granule on 5-HT in the intestine tissue of constipation-predominant irritable bowel syndrome model rats [J]. J Pract Tradit Chin Med, 2019, 35(4): 386-388.
- [29] 黄重发, 金韩. 结肠水疗对便秘型 IBS 患者胃肠激素影响的相关性研究 [J]. 重庆医学, 2008, 37(5): 516-518.
- Huang CF, Jin H. Correlation study on the effect of colon hydrotherapy on gastrointestinal hormones in patients with constipation IBS [J]. Chongqing Med, 2008, 37(5): 516-518.

[收稿日期] 2023-07-29