

赖碧玉,洪梦颖,李兴,等. 乙酸灌肠联合束缚夹尾应激诱导肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 317-328.

LAI B Y, HONG M Y, LI X, et al. Preparation of a rat model of diarrheal irritable bowel syndrome induced by an acetic acid enema combined with binding tail-clamping stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 317-328.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.005

乙酸灌肠联合束缚夹尾应激诱导肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征大鼠模型的制备

赖碧玉¹,洪梦颖¹,李兴²,何永嘉¹,陈瑶¹,李新伍¹,石佳¹,田子寒¹,
李丹²,聂晶³,余畅^{2*}

(1. 湖南中医药大学研究生院,长沙 410208;2. 长沙市中医医院(长沙市第八医院)针灸康复科,长沙 410100;3. 中南大学,长沙 410083)

【摘要】 目的 建立理想的大鼠肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征 (diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 的造模方法,为 IBS-D 伴焦虑抑郁状态的临床研究提供动物模型基础。**方法** 本研究共用 60 只大鼠:(1) 首先将 20 只大鼠随机分为空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,造模及观察期结束后,通过腹泻相关指数、结肠病理组织学等观察不同造模浓度引起的腹泻状态及结肠损伤程度。(2) 评估出较优造模浓度后,将另外 40 只大鼠随机分为对照组(a组)、单纯乙酸灌肠组(b组)、乙酸+束缚组(c组)、乙酸+束缚+夹尾组(d组),分别予以不同干预,共干预 8 d。干预结束后对大鼠一般情况、腹泻相关指数、旷场实验(open-field test, OFT)评分、结肠病理组织学等指标进行评价。**结果** (1) 与空白组比较,4%乙酸灌肠组干预后第 1~3 天粪便性状评分升高($P < 0.001$),干预后第 4~7 天粪便性状评分逐渐降低,1 周后,与空白组相比,粪便性状评分无显著性差异($P > 0.05$),体重相对较低($P < 0.01$),粪便含水量升高($P < 0.001$);与空白组相比,5%乙酸灌肠组体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$);3%乙酸灌肠组与空白组相比,无显著性差异($P > 0.05$)。结肠病理组织显示,与空白组相比,4%乙酸灌肠组黏膜结构完整,有少量炎症细胞浸润,病理组织评分无显著性差异($P > 0.05$),5%乙酸灌肠组有中量-大量炎症细胞浸润,病理组织评分升高($P < 0.01$)。(2) 与 a 组比较,b 组体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$),与 a 组及 b 组比较,c 组和 d 组,体重较低($P < 0.001$),粪便性状评分、粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.01$),结肠运转时间减少($P < 0.01$);与 c 组相比,d 组粪便含水量较高($P < 0.001$)。在 OFT 评分方面,与 a 组及 b 组相比,c 组及 d 组 OFT 评分在总距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$);与 c 组相比,d 组在 OFT 评分总距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。结肠病理组织显示,4 组黏膜结构均完整,有不同程度的炎症细胞浸润,病理组织评分上,与 a 组及 b 组相比,c 组和 d 组较高($P < 0.05$)。**结论** 4%乙酸浓度为 IBS-D 造模适宜浓度,叠加束缚后,能更好地模拟 IBS-D 腹泻、内脏高敏感特征性状态,叠加夹尾后能成功制备出肝郁脾虚型 IBS-D 模型。

【关键词】 腹泻型肠易激综合征;4%乙酸灌肠;慢性束缚;夹尾应激;造模

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 03-0317-12

【基金项目】 湖南省自然科学基金项目 (2021JJ70066), 湖南省中医药科研计划项目 (B2023108, 2020143), 国家级大学生创新训练项目 (202110541024), 湖南中医药大学 2022 年度校级科研项目 (2022XYLH088)。

Funded by Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ70066), Traditional Chinese Medicine Research Project of Hunan Province (B2023108, 2020143), National Innovative Training Program for College Students (202110541024), Hunan University of Chinese Medicine 2022 University-Level Scientific Research Project (2022XYLH088)。

【作者简介】 赖碧玉,女,在读硕士研究生,研究方向:针灸治病的临床机理研究。Email:1494029288@qq.com

【通信作者】 余畅,女,博士,主任医师,研究方向:针灸治病的临床机理研究。Email:shechang159@163.com

Preparation of a rat model of diarrheal irritable bowel syndrome induced by an acetic acid enema combined with binding tail-clamping stress

LAI Biyu¹, HONG Mengying¹, LI Xing², HE Yongjia¹, CHEN Yao¹, LI Xinwu¹, SHI Jia¹,
TIAN Zihan¹, LI Dan², NIE Jing³, SHE Chang^{2*}

(1. School of Graduate, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Department of Rehabilitation, Changsha Chinese Medicine Hospital / Eighth Hospital of Changsha City, Changsha 410100, China; 3. Central South University, Changsha 410083, China)

Corresponding author: SHE Chang. E-mail:shechang159@163.com

[Abstract] Objective To establish an ideal modeling method for diarrhea predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) with anxiety and depression in rats, and to provide a basis for the clinical study of IBS-D. **Methods** 60 rats were used in this study. (1) At first, 20 rats were randomly divided into blank, 3% acetic acid enema, 4% acetic acid enema, and 5% acetic acid enema groups. After the modeling and observation period, the diarrhea status and the degree of colon injury caused by different modeling concentrations were observed by diarrhea related index and colon histopathology. (2) After the optimal modeling concentration was assessed, 40 rats were randomly divided into control(a), acetic acid enema(b), acetic acid + binding(c), and acetic acid + binding + tail clip(d) groups and correspondingly treated for 8 days. After the treatments, the general condition, diarrhea-related index, open field test (OFT) score, and colonic histopathology of rats were evaluated. **Results** (1) Compared with the blank group, the fecal trait score of 4% acetic acid enema group was increased on days 1 to 3 after intervention ($P < 0.001$), and gradually decreased on days 4 to 7 after intervention. After 1 week, there was no significant difference between the fecal trait score and that of the blank group ($P > 0.05$). Body weight was lower ($P < 0.01$), fecal water content was higher ($P < 0.001$). Compared with blank group, body weight of the 5% acetic acid enema group was decreased ($P < 0.001$), the fecal trait score and diarrhea index were increased ($P < 0.01$). No significant difference was found between 3% acetic acid enema and blank groups. The pathological colon tissue showed that, compared with the blank group, the mucosal structure of the 4% acetic acid enema group was complete with a small amount of inflammatory cell infiltration, and the pathological tissue score showed no significant difference ($P > 0.05$), whereas the 5% acetic acid enema had a medium to large amount of inflammatory cell infiltration, and the pathological tissue score was increased ($P < 0.01$). (2) Compared with group a, group b had lower body weight ($P < 0.001$), and higher fecal trait score, fecal water content and diarrhea index ($P < 0.01$). Compared with a and b groups, the body weight of c and d groups was lower ($P < 0.001$), the fecal traits score, fecal water content, and diarrhea index were increased ($P < 0.01$), and the colon running time was decreased ($P < 0.01$). Compared with group c, Fecal water content in group D was higher ($P < 0.001$). In the OFT score, compared with a and b groups, the OFT distance, standing times, and upright times in c and d groups were lower ($P < 0.05$). Compared with c, the OFT distance, standing times, and upright times in d group were lower ($P < 0.05$). The pathological tissue of colon showed that the mucosal structure of the four groups was complete, and there were different degrees of inflammatory cell infiltration. The pathological tissue scores of groups c and d were higher than those of groups a and b ($P < 0.05$). **Conclusions** The 4% acetic acid concentration is appropriate for IBS-D modeling. After superposition and binding, the IBS-D diarrhea and internal hypersensitivity characteristic state can be better simulated. After superposition of a tail clip, the IBS-D model of liver stagnation and spleen deficiency can be established successfully.

[Keywords] diarrheal predominant irritable bowel syndrome; 4% acetic acid enema; chronic bondage; tail-clamping stress; molding

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

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是以反复发作的腹痛、腹泻为主要特征的临床常见功能性疾病^[1]。建立符合临床特征的动物模型是动物实验的基础,也

是探索发病机制和治疗方案的重要一环。乙酸灌肠联合慢性束缚在 IBS-D 造模中应用广泛,可以较好地模拟 IBS-D 腹泻症状及内脏高敏感状态^[2],但当药物剂量、浓度难以统一或者束缚刺激阈值及周期未达时,难以稳定诱导 IBS-D 模型^[3],而现有文献研究尚无统一标准,因此对此进行探索完善十分重要。另外除腹泻和高敏感状态外,目前在临床上,IBS-D 患者常伴有焦虑、抑郁等情志方面的改变,肝郁脾虚型 IBS-D 最为常见,因此建立符合肝郁脾虚型 IBS-D 模型值得探索^[4]。有研究发现,夹尾应激常被应用于肝郁造模中^[5]。本研究在乙酸灌肠基础上,同时联合束缚、夹尾等应激方法诱导肝郁脾虚型 IBS-D 模型,探讨各项具体操作、存在问题及应对方法,为建立客观、可靠且重复性好的肝郁脾虚型 IBS-D 模型提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠共 60 只,体重 210 ± 10 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养环境:温度 $20 \sim 25$ °C,湿度 50% ~ 70%,自由饮食饮水,昼夜交替 12 h/12 h,饲养于湖南斯莱克景达实验动物基地【SYXK(湘)2019-0017】。本实验研究经长沙市中医医院(长沙市第八医院)伦理委员会批准(2019 005),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

石蜡油(20191002, 500 ± 25 mL,武昌炎威医疗科技有限公司);磷酸缓冲生理盐水(Phosphate buffer saline, PBS)(MA0015-Nov-05H,每瓶 500 mL,大连美仑);异氟烷(兽药字 031217015,河北金达福药业有限公司);苏木素-伊红(HE)染色液(S191003,武汉市皮诺飞生物科技有限公司);乙酸(10000218)、无水乙醇(10009228)、中性树胶(10004160)、二甲苯(10023418)、正丁醇(10005218)均购自国药集团化学试剂有限公司。

电热鼓风干燥箱(101A-3,上海光地仪器设备有限公司);脱水机(JT-12S,武汉俊杰电子有限公司);包埋机(JB-L5,武汉俊杰电子有限公司);切片机(RM2016,德国 Leica);显微镜(E100,日本 Nikon);扫描仪(Pannoramic SCAN II,济南丹吉尔电子有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 阶段(1)构建 IBS-D 模型,对不同乙酸灌肠浓度进行观察

选用 20 只 SD 大鼠,适应性饲养 7 d 后随机分为空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,每组 5 只。操作:第 1 天分组进行乙酸灌肠,灌肠前禁食不禁水 8 h,使用透明束缚笼将大鼠固定,在大鼠肛门处涂抹石蜡润滑后插入硅胶管(连有注射器),于约距肛门 8 cm 处,向内注入不同浓度乙酸 1 mL,按组分别予以 3%乙酸灌肠(乙酸 3 mL + 0.01 mol/L PBS 97 mL)、4%乙酸灌肠(乙酸 4 mL + 0.01 mol/L PBS 96 mL)、5%乙酸灌肠(乙酸 5 mL + 0.01 mol/L PBS 95 mL),3 组分别灌肠后,轻柔缓慢将导尿管拔出,并压迫大鼠肛门后将其尾巴抬高 60 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,观察 1 周。1 周后评估出适宜的乙酸灌肠浓度进行 IBS-D 造模。

1.2.2 阶段(2)构建 IBS-D 模型,对不同应激造模因素观察

选用 40 只 SD 大鼠,适应性饲养 7 d 后随机分为对照组(a组)、4%乙酸灌肠组(b组)、4%乙酸灌肠 + 束缚组(c组)、4%乙酸灌肠 + 束缚 + 夹尾组(d组)。b 组操作:分别于第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,具体同阶段(1)灌肠操作,除灌肠期外其他时间大鼠自由进食及活动;c 组操作:第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,于非灌肠日将大鼠每日束缚 1 h(放置于自制束缚笼,限制大鼠的肢体但不影响呼吸);d 组操作:第 1、5 天进行 4%乙酸灌肠,除灌肠外的时间大鼠每天束缚 1 h,在束缚 1 h 后,于大鼠尾端 3 ~ 5 cm 处使用夹子夹持其尾巴 5 min,以上操作结束后将大鼠放回笼内任其自由活动。4 组干预总时长皆为 8 d。造模第 8 天进行模型评价,以大鼠一般状态变化、粪便性状评分、粪便含水量及腹泻指数高于空白组为造模成功标准^[6]。对照组于第 1、5 天予 0.9%氯化钠溶液灌肠,灌肠操作同阶段(1)灌肠操作。

1.2.3 取材

两阶段分别在干预结束后和观察结束后,使各组大鼠吸入流速 0.7 L/min、浓度 1.5%的异氟烷麻醉,处死后打开腹腔,于距大鼠肛门 6 cm 处取其结肠 5 cm,纵向剖开结肠并采用 PBS 清洗,之后放入 4%多聚甲醛中固定,用于结肠组织形态及病理观察。

1.2.4 观察指标及方法

(1)一般状态及粪便性状评分:实验过程中每天记录各组大鼠的一般状况(体重、精神、皮毛色泽、活动度、反应力、存活情况、排便情况),每日记录大鼠粪便性状评分。采用 Bristol 粪便性状评分标准^[7]:1 分:坚果状、分散的硬块;2 分:团块状、成型正常;3 分:香肠状、表面有裂缝;4 分:香肠状、表面光滑柔软;5 分:团块状、软且边缘清楚;6 分:糊状或泥浆状、边缘模糊不清;7 分:水样便、无固状物。

(2)粪便含水量及腹泻指数:粪便含水量:两阶段干预结束时(阶段(1)为灌肠后 1 周,阶段(2)为干预第 8 天),分别收取大鼠新鲜粪便,记录电子秤所称此时的重量,为粪便湿重。然后将粪便放入烘干箱,烘干至粪便重量稳定不变,此为粪便干重。粪便含水量 = $[(\text{湿重} - \text{干重}) \div \text{湿重}] \times 100\%$ ^[8]。于同一时间点记录大鼠的粪便粒数及稀便数(污迹数)后,计算大鼠腹泻指数,腹泻指数 = $[\text{稀便数} \div (\text{粪便粒数} + \text{稀便数})] \times \text{平均稀便级}$ 。稀便级:按照稀便直径分为四级:< 1 cm 为一级,1 ~ 2 cm 为二级,2 ~ 3 cm 为三级,> 3 cm 为四级。平均稀便级 = 稀便级数总和 $\div$ 稀便数^[9]。

(3)结肠运转时间:阶段(2)干预结束后(第 8 天),大鼠麻醉后,将直径 3 mm 玻璃小球放入大鼠直肠(距离肛门 3 cm)内。待大鼠苏醒后,使其放在铺有干净滤纸的笼内,任其自由进食。自大鼠苏醒后开始计时,记录排出玻璃小球的时间^[10]。

(4)旷场实验评分:阶段(2)干预结束后(第 8 天)将大鼠放入自制旷场箱中,自制旷场箱用木板做成,箱体高约 40 cm,将底面边长为 100 cm 的正方形平均划分为 25 个方格,大鼠于实验环境中适应 10 min 后放入旷场箱正中方格内,观察并记录 5 min 内大鼠经过交叉点次数、直立次数及总运动距离^[5]。

(5)结肠粘膜屏障完整性评价及病理学评分:两阶段干预结束后,将取得的结肠放入多聚甲醛固定液中固定,进行包埋、脱水、切片、染色,光镜下观察并进行结肠病理组织评价炎症分级。结肠病理损伤程度评分^[11]:炎性细胞浸润:固有层无或少量炎性细胞浸润:0 ~ 1 分;固有层大量炎性细胞浸润:2 ~ 3 分;固有层大量炎性细胞且延伸至黏膜下层:4 ~ 5 分;炎性细胞沿黏膜下层透壁扩展:6 ~ 7 分。组织结构的完整性:损伤小,组织结构完整,肠壁正常无增厚:0 ~ 1 分;隐窝脓肿,隐窝炎,肠壁增厚,占整个视野的 2/5:2 ~ 3 分;隐窝结构改变,隐

窝缺失,肠壁增厚,占整个视野的 3/5:4 ~ 5 分;UC 结构改变,黏膜层大量细胞坏死,肠壁增厚,占整个视野的 4/5 或充满整个视野:6 ~ 7 分。结肠组织病理损伤评分 = (炎性细胞浸润 + 组织结构的完整性)/2。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,先进行正态分布检验,呈正态分布的数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;方差不齐时多组间采用 Games-Howell 分析,两两比较采用 Dunnett's *T* 检验。数据不符合正态分布时,则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 阶段(1)不同乙酸浓度造模大鼠情况

2.1.1 一般状态、体重及粪便性状评分比较

干预 1 周后,空白组一般情况良好,精神状态良好、反应灵敏、活动度正常、皮毛光泽、粪便成型。与空白组相比,3%乙酸灌肠组一般情况良好,仅有部分大鼠在灌肠当天及第 1 天出现腹泻症状,其后粪便成型,体重与空白组无显著性差异($P > 0.05$);4%乙酸灌肠组精神较萎靡、反应力下降、活动度减少,在灌肠后 1 ~ 3 d 出现不同程度的腹泻,水样、糊样便,与空白组相比,第 1 ~ 3 天粪便性状评分升高($P < 0.001$),但第 4 天开始总体各项情况趋向恢复正常,粪便成型,体重增长幅度较大,粪便性状评分降低,1 周后,粪便性状评分与空白组无显著性差异($P > 0.05$);5%乙酸灌肠组皮毛无光泽、精神萎靡、反应力明显下降、活动度差,体重 1 周内有所下降现象,总体增长缓慢,与空白组相比,具有显著性差异($P < 0.001$),粪便性状评分升高($P < 0.01$)。见图 1。

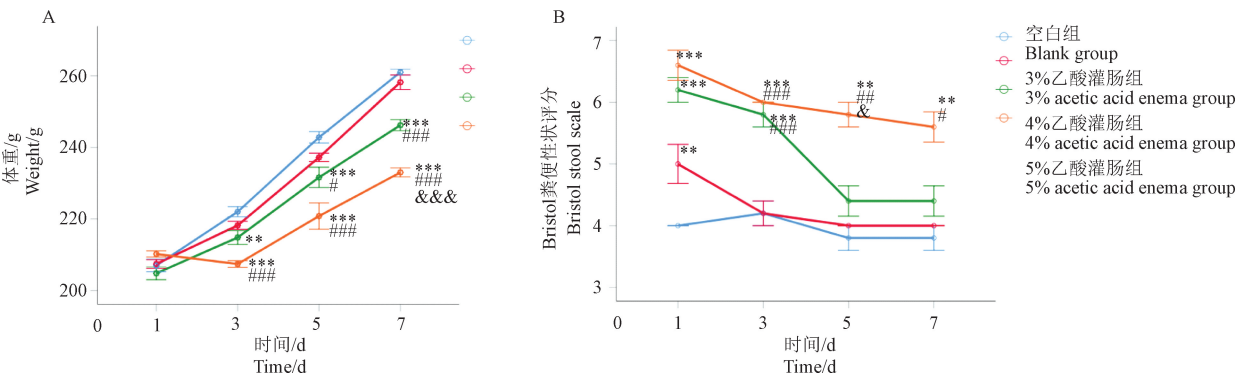
2.1.2 粪便含水量、腹泻指数比较

干预 1 周后,与空白组比较,4%乙酸灌肠组及 5%乙酸灌肠组粪便含水量增加($P < 0.001$),5%乙酸灌肠组腹泻指数升高($P < 0.001$),3%乙酸灌肠组与空白组无显著性差异($P > 0.05$)。见图 2。

2.1.3 结肠病理组织学观察

1 周后解剖肉眼结肠观察,空白组及 3%乙酸灌肠组结肠无明显变化,4%乙酸灌肠组结肠轻度充血,5%乙酸灌肠组结肠明显充血,个别有糜烂现象。

光镜下结肠病理观察,空白组及 3%乙酸灌肠

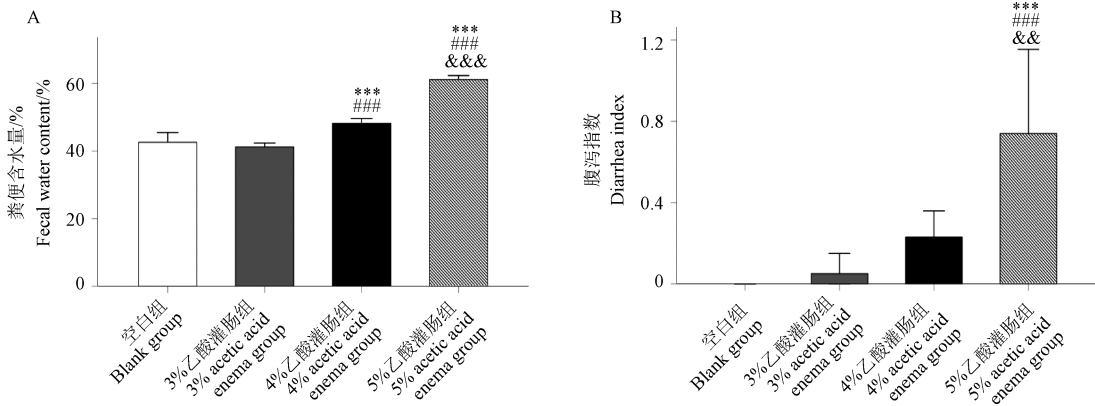


注:与空白组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与3%乙酸灌肠组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与4%乙酸灌肠组相比, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$ 。(下同)

图1 阶段(1)各组大鼠体重及粪便性状评分比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the 3% acetic acid enema group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with the 4% acetic acid enema group, & $P < 0.05$, && $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 Stage(1) comparison of body weight and fecal traits scores of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:与4%乙酸灌肠组相比, && $P < 0.01$ 。(下同)

图2 阶段(1)各组大鼠粪便含水量、腹泻指数比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. Compared with the 4% acetic acid enema group, && $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Stage(1) comparison of fecal water content and diarrhea index of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组两组结肠黏膜上皮较完整,细胞排列规整,未见肠黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体亦无萎缩,黏膜下层未见明显改变,间质无水肿。4%乙酸灌肠组轻度炎症,黏膜上皮细胞排列欠规则,轻度间质水肿,固有层腺体稍萎缩,有少量炎性细胞浸润;5%乙酸灌肠组固有层中量到大量中性粒细胞浸润,黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体萎缩减少,间质中度-重度水肿,其病理组织损伤评分高于其他3组($P < 0.01$)(见图3)。综合各组指标及结肠病理,4%乙酸灌肠组可出现较持续性的腹泻,且无器质性损伤,为适宜浓度。另外通过观察4%乙酸灌肠组腹泻状态只能持续3d左右,因此后续对于灌肠频次进行测定,发现每3d灌肠1次为理想灌肠频次,

且结直肠组织无器质性改变。

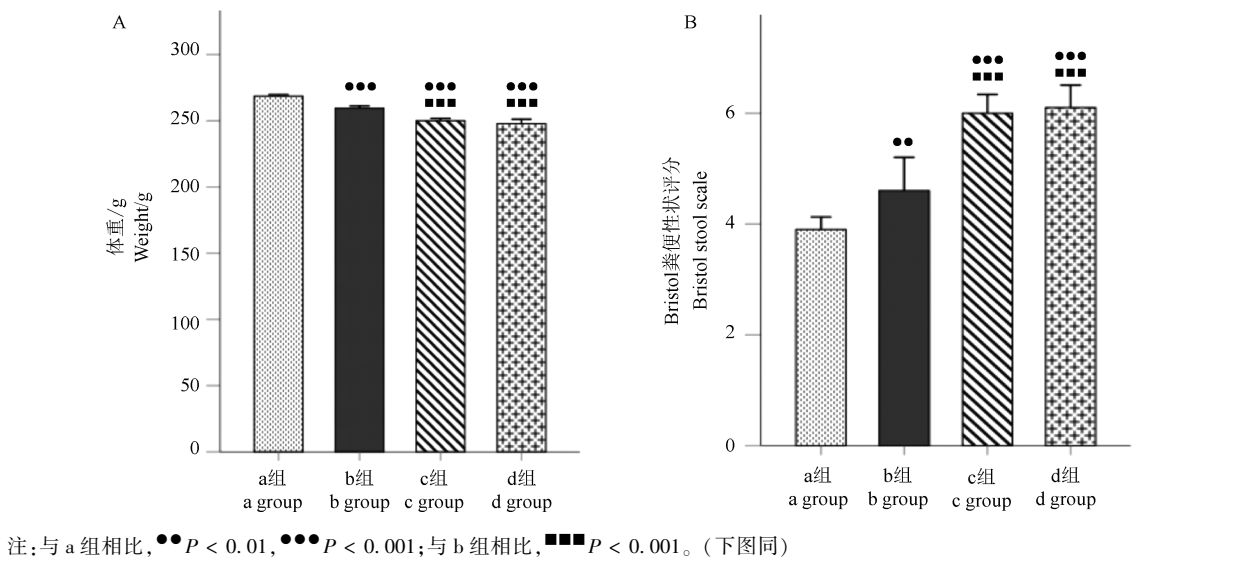
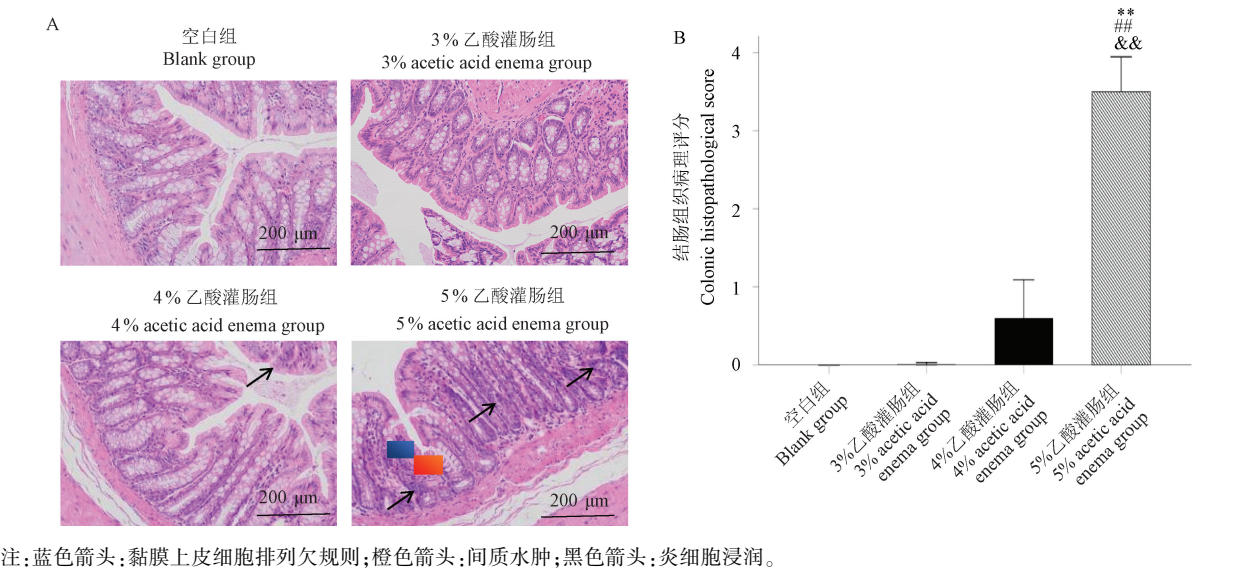
2.2 阶段(2)叠加应激因素造模大鼠情况

2.2.1 一般状态、体重及粪便性状评分比较

阶段(2)干预结束后(第8天),a组一般情况良好,精神状态良好,反应灵敏,活动度正常,皮毛光泽,粪便成型。b组一般情况良好,反应较灵敏,活动度正常,体重较a组降低($P < 0.001$),粪便大部分成型,粪便性状评分与a组相比,具有显著性差异($P < 0.01$);与a组及b组相比,c组及d组体重降低($P < 0.001$),粪便性状评分升高($P < 0.001$)。见图4。

2.2.2 粪便含水量、腹泻指数及结肠运转时间比较

阶段(2)干预结束后(第8天),与a组相比,b



组的粪便含水量、腹泻指数升高($P < 0.001$),结肠运转时间减少($P < 0.05$);与 a 组及 b 组比较,c 组和 d 组的粪便含水量升高($P < 0.001$),腹泻指数升高($P < 0.01$),结肠运转时间减少($P < 0.01$);与 c 组相比,d 组的粪便含水量较高($P < 0.001$)。见图 5。

2.2.3 旷场实验(OFT)评分比较

阶段(2)干预结束后(第 8 天),与 a 组相比,b 组旷场实验总距离、站立次数、直立次数均减少

($P < 0.01$);与 a 组及 b 组相比,c 组及 d 组旷场实验距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。与 c 组相比,d 组旷场实验距离、站立次数、直立次数均减少($P < 0.05$)。见表 1。

2.2.4 结肠病理组织学观察

4 组结肠黏膜上皮均完整,a 组细胞排列规整,黏膜及黏膜下层未见明显改变,但其余 3 组均有不同程度的炎症细胞浸润。与 a 组相比,c 组、d 组其病理组织损伤评分较高($P < 0.05$)。见图 6。

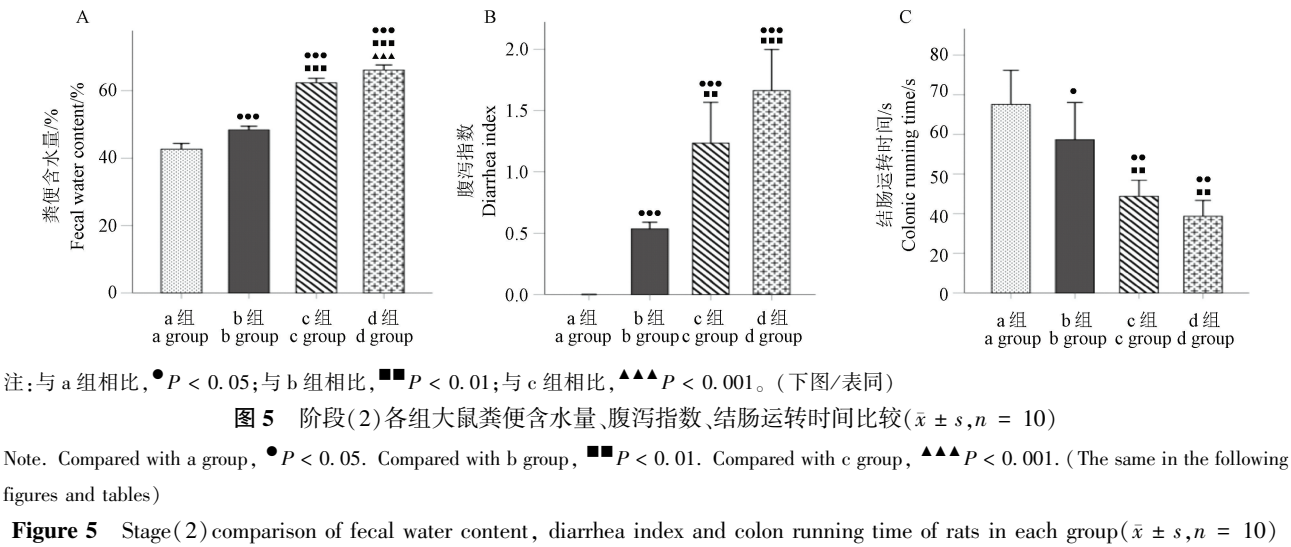


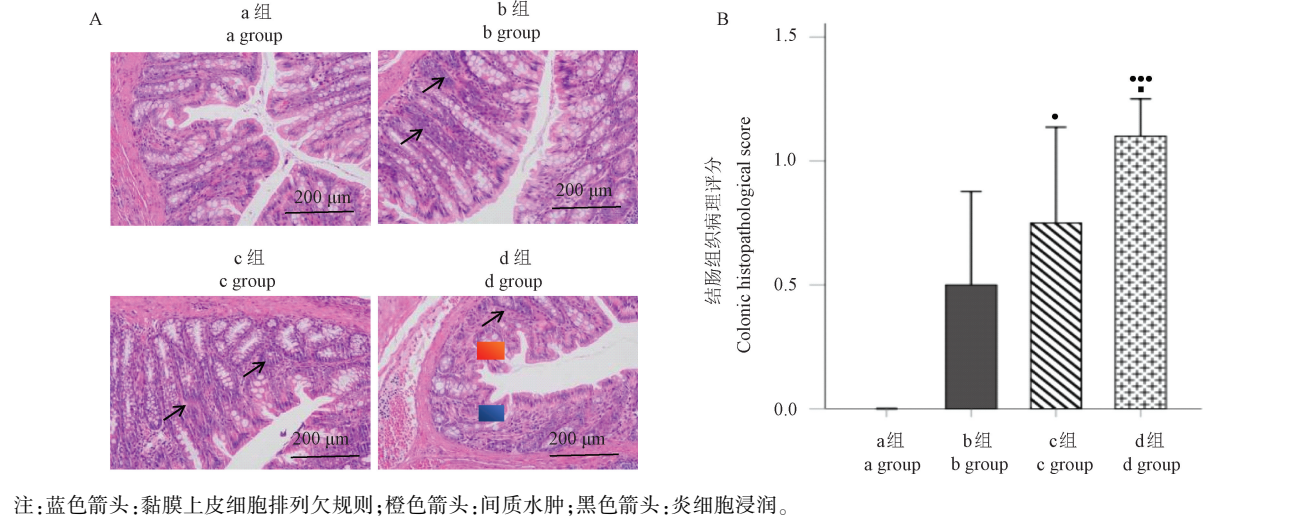
表 1 阶段(2)各组大鼠旷场实验各指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Stage(2) comparison of indexes in open field experiment of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	OFT 总距离/cm OFT total distance/cm	OFT 交叉点/个 OFT intersections/pcs	OFT 直立次数/次 OFT upright times /times
a 组 a group	41.80 ± 6.40	15.50 ± 3.20	28.70 ± 6.71
b 组 b group	32.80 ± 5.80 ^{●●}	8.50 ± 2.12 ^{●●}	23.70 ± 4.54 ^{●●}
c 组 c group	22.50 ± 3.43 ^{●●■}	7.20 ± 1.98 ^{●■■}	17.40 ± 3.16 ^{●■■}
d 组 d group	16.50 ± 4.55 ^{●●■▲}	4.50 ± 2.91 ^{●■■▲}	11.40 ± 3.30 ^{●■■▲}

注:与 b 组相比, ■ $P < 0.05$; 与 c 组相比, ▲ $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Compared with b group, ■ $P < 0.05$. Compared with c group, ▲ $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)



3 讨论

IBS 是最常见的功能性胃肠病之一,我

国普通人群 IBS 总体患病率为 1.4% ~ 11.5%^[1]。其中 IBS-D 发病率最高^[12]。IBS-D 的发病机制并未完全阐明,目前研究表明,多与脑肠互动异常、胃肠

动力异常、内脏高敏感性、肠道微生物失调、胃肠道感染与低度炎症、肠黏膜通透性增加等因素相关^[13]。其中,内脏高敏感性在制备动物模型时,也常作为 IBS-D 的特征性指标^[3,14]。

IBS-D 动物模型的造模方法包括母婴分离法、束缚应激、番泻叶灌胃、化学物质刺激、理化因素刺激等^[15],虽然造模方法多样且各有优点,但造模操作复杂、周期长、成本高,因而存在很多的局限性。而乙酸灌肠相对而言操作简单、造模周期短、成本较低,在模拟肠道功能性腹泻及肠道低度炎症方面较有优势,并且对肠道黏膜的通透性、肠道动力以及高敏感性也有影响,因此被广泛应用于 IBS-D 模型的研究^[16-17]。另外许多研究表明^[3,18-19],应用多因素联合法制备 IBS-D 动物模型比较成熟,也较为接近临床的典型表现,其中常将乙酸灌肠与束缚应激联合造模,两者在复制动物模型内脏高敏感性及功能性腹泻方面较为成功^[2,16]。

另外,近年来发现,IBS-D 患者中,除胃肠道症状外,多伴有精神心理问题,其中高发生率的焦虑抑郁状态已成为 IBS 的显著危险因素^[20-21]。IBS-D 在传统医学中也属于“郁证”范畴^[22-23]。精神心理障碍易影响肠道动力,诱发内脏高敏感,引发肠道低度炎症,并且引起肠道菌群的变化^[24]。因此,肝郁脾虚证成为临床上 IBS-D 多发的证型^[25]。本研究加入了夹尾应激这一诱导肝郁状态的方法^[5,26]。采用乙酸灌肠、束缚、夹尾 3 者联合诱导 IBS-D 大鼠模型,观察总结实验中各方面的问题,探索脾虚肝郁型 IBS-D 模型的较优造模方式,为后期相关研究奠定实验基础。

3.1 不同浓度的乙酸灌肠后大鼠临床指标的差异

基于文献研究发现,乙酸灌肠制备腹泻型肠易激综合征模型时,应用浓度 3% ~ 5%^[2,15,27],因此本实验前期设立空白组、3%乙酸灌肠组、4%乙酸灌肠组、5%乙酸灌肠组,通过对大鼠的一般情况、粪便性状评分、稀便次数及腹泻指数等观察,发现 4%浓度的乙酸符合 IBS-D 的临床特点,可引起大鼠功能性腹泻症状。有研究表明,过低乙酸浓度腹泻症状不明显且不能维持内脏高敏感,过高则易使大鼠结肠组织粘连甚至死亡^[18],这与本研究中低浓度 3%引起腹泻症状不明显,较高浓度 5%则引起结肠病理中重度炎症甚至黏膜充血坏死的结果相符。

除浓度这一关键造模因素外,动物种类、试剂用量、试剂停留肠道时间、灌肠频次等与造模也密

切相关。在浓度探索过程中,对以下 3 个方面进行了文献梳理及实验观察:(1)模型动物选择:有研究结果显示,在 IBS 动物模型中,SD 雄性成年大鼠为常用实验动物^[19]。雄性大鼠相比于雌性大鼠可减少激素对实验结果的影响,成年大鼠体型相对完善,耐受程度较好,死亡率较低^[28]。(2)乙酸试剂应用:文献研究中乙酸灌肠常用量为 1 ~ 1.5 mL,停留肠道的时间为 30 ~ 60 s,结束后采用 PBS 或磷酸盐等稀释并冲洗^[6,29]。因此,本实验采用 1 mL 4%乙酸灌肠,停留肠道 60 s 后使用 PBS 冲洗,与既往的研究报道一致。(3)灌肠频次:既往研究^[2,30]认为采用连续灌肠与不连续灌肠对造模结果有差别,不连续灌肠往往要结合其他应激方法才能引起持续性腹泻,连续灌肠引起腹泻明显,但频繁灌肠可能对大鼠肠道黏膜产生机械性损害及药物过度刺激,本研究中的联合实验过程中采用了每隔 3 d 进行一次灌肠,结果显示可引起较稳定腹泻症状,避免了过往研究中不连续灌肠的腹泻不持续性,以及连续灌肠对肠道黏膜的损害。

3.2 束缚方法之间的差异

近年来,常采用应激反应联合其他方法制备 IBS-D 动物模型,例如束缚、夹尾、昼夜颠倒、强光及闪烁灯照射、电击、声波刺激等多种方法联合交替^[31],但许多方法实行难度大,难以统一且重复性差。而慢性束缚应激方法相对简单,个体差异性可控,成功率高,常作为主要的造模变量^[18]。束缚操作方面,有使用软带、纤维绳、网状绷带等进行捆绑束缚,但软带、绳子等会引起大鼠挫折应激,绷带则弹性过大,易挣脱达不到束缚刺激量^[18,32]。在对多种束缚装置及材料实验后,本实验中最终创新采用 350 mL 的矿泉水空瓶进行束缚,该装置瓶口符合大鼠头颈部大小,可供呼吸的同时起到束缚作用,瓶身与大鼠身体相合,瓶底剪开后呈半开口,用胶带将大鼠固定,防止挣脱,整个设计达到束缚要求,可引起应激,且装置简单、操作便易。

束缚时长及频次方面,本实验除乙酸和夹尾外,每天束缚 1 h,持续 1 周。在 HOU 等^[6]建立的经典 IBS-D 大鼠模型中,发现急性束缚 1 h,大鼠结肠运动增强,大肠加速排空,排便量增加^[30]。近年来的实验中,束缚时长有 1 ~ 3 h 的不同,频次有每天 1 ~ 2 次的差别^[30,33-35]。但研究发现当时长与频次增加,刺激量并不会增加,大鼠反而容易对环境适应,从而达不到应激目的,也耗费时间和人力^[36]。

因此,本实验中,考虑束缚还结合了乙酸、夹尾,采用束缚时长 1 h,非乙酸灌肠期间即加入束缚,最少持续 1 周,模型稳定,达到标准成果,用时短,可操作性强。

3.3 夹尾在肝郁模型中的应用

中医认为 IBS-D 的病因与情志密切相关,病机主要为肝气疏泄失职,气郁太过则犯脾,继则脾失运化而致泄泻^[3],肝脾脾虚型 IBS-D 为临床最常见。在肝郁模型中,有研究发现,夹尾法(13.25%)和束缚法(12.04%)是最常用的情志刺激造模法^[23]。束缚法可使大鼠的学习记忆减退,表现出焦虑、抑郁状态,与临床肝郁脾虚患者很相似^[37]。而夹尾刺激作为在肝郁造模中选择最多的方法,所产生的应激可使下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)兴奋增高,并出现焦虑抑郁情况^[38]。而本实验中,将两者结合,每日束缚 1 h 后夹尾 5 min,既可使内脏敏感性增高又是肝郁证造模的方法^[21]。其中夹尾时长选择 5 min,除考虑叠加了束缚这一致郁因素,也避免了长时间高强度夹尾引起大鼠过于激怒不安,以及对胃黏膜及尾部皮肤刺激过度产生炎症^[39]。

3.4 模型评价指标

在既往研究中,对于肝郁脾虚型 IBS-D,研究者主要从 3 个方面进行评价^[3,23]:(1)一般状态观察:皮毛、反映度、心理状态;(2)肝郁症状,常参考内脏敏感性增加、糖水偏爱度增加,高架十字迷宫、旷场实验水平等实验观察指标;(3)脾虚症状评价:饮食减少,体重增长不明显,大便不成型等状态,大便频次、腹泻指数等指标进行脾虚症状的评价^[40-41]。而本实验所采用的指标与既往报道^[42]一致,对大鼠一般状态进行观察,脾虚腹泻状态选择了粪便性状评分、粪便含水量、稀便率及腹泻指数等,稀便率和腹泻指数被认为是腹泻评价的金指标,内脏高敏感状态采用结肠运转时间进行评定,内脏敏感性越高,结肠运转时间越短,肝郁状态则用旷场实验进行了观察,大鼠运动总距离及直立次数可以反应大鼠的兴奋或抑郁程度^[5]。结果显示,乙酸联合束缚夹尾的腹泻指征以及肝郁指征最为明显,且与其他组有差异,这与既往研究^[41]中束缚夹尾可引起肝郁症状一致,也说明采用的指标较为合理。

4 小结

本次实验证实了此造模方案的可行性,同时对

灌肠浓度、频次、束缚方法、材料、时长、夹尾方式进行了探讨,探索出可行性强、成功率较高的肝郁脾虚型 IBS-D 动物造模方案。既往研究报道中也表明,乙酸灌肠联合心理应激(慢性束缚应激、夹尾刺激)是最常用的造模方法,符合肝郁久犯脾,可致脾虚的情志致病的方法^[23];也有研究表明,此造模方法可表现出内脏敏感性、抑郁和肝郁脾虚等多种特征^[41],其中乙酸灌肠能模拟 IBS-D 腹痛及腹泻症状,夹尾及束缚应激可以造成大鼠内脏高敏性,且能模拟肝郁脾虚证型症状,因此,此联合方法可模拟临床肝郁脾虚型 IBS-D 的典型特征。

本研究也存在一些不足之处:首先 IBS-D 临床诊断要求症状至少出现 6 月,近 3 月内每月至少有 3 d 出现症状^[43],而动物造模的观察周期不足,无法判断造模结束后的腹泻状态,是否会引起长期持续规律发作的腹泻,因此在观察时长上可以进一步延长;其次,在肝郁脾虚型模型评价上,对于肝郁方面的评价,除旷场实验、强迫游泳、糖水实验外,可以结合一些理化指征,如 5-HT、木糖醇等去评价,尽可能更加客观^[5];最后,在 IBS-D 中医证型制备方面尚不成熟,缺乏客观的评价标准,除肝郁脾虚证型外,对于其他证型方面也需要进一步研究和探索。

综上所述,4% 乙酸浓度为 IBS-D 造模适宜浓度,叠加束缚后,能更好地模拟 IBS-D 腹泻、内脏高敏感特征性状态,当叠加夹尾后,不仅腹泻和内脏高敏感状态更加稳定,还能诱导出明显的焦虑抑郁状态,更符合目前 IBS-D 的临床状态。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 2020 年中国肠易激综合征专家共识意见[J]. 中华消化杂志, 2020, 40(12): 803-818.
Functional Gastrointestinal Diseases Collaboration Group, Chinese Society of Gastroenterology, Gastrointestinal Dynamics Group, Chinese Society of Gastroenterology. Chinese expert consensus of irritable bowel syndrome in 2020 [J]. Chin J Dig, 2020, 40(12): 803-818.
- [2] 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.
AN Y, BAI D Q, FU J, et al. Establishment and evaluation of a rat IBS model induced by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress [J]. World Chin J Dig, 2009, 17(15): 1548-1551.
- [3] 王宁,纪昌春,万鹏,等. 病证结合模式下腹泻型肠易激综

- 合征实验动物模型的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(4): 533-538.
- WANG N, JI C C, WAN P, et al. Research progress on experimental animal model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome combining disease and syndrome [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2021, 40(4): 533-538.
- [4] 张成明, 刘力, 王捷虹, 等. 腹泻型肠易激综合征脾虚肝郁证论治探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 858-861.
- ZHANG C M, LIU L, WANG J H, et al. Treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome of liver depression and spleen deficiency type [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2017, 35(4): 858-861.
- [5] 王凤, 张会永, 杨关林. 肝郁证动物模型研究进展及实验应用现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(10): 68-73.
- WANG F, ZHANG H Y, YANG G L. Research progress and analysis of problems in application of animal model of liver depression syndrome in various diseases [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2021, 23(10): 68-73.
- [6] HOU Q, HUANG Y, ZHU Z, et al. Tong-Xie-Yao-Fang improves intestinal permeability in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome rats by inhibiting the NF- κ B and Notch signalling pathways [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 337.
- [7] LEWIS S J, HEATON K W. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time [J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(9): 920-924.
- [8] 杨易陈, 周子娴, 薛婷, 等. 电针对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏敏感性及其结肠 NGF、TrkA、TRPV1 表达的影响 [J]. 中国针灸, 2022, 42(12): 1395-1402.
- YANG Y C, ZHOU Z X, XUE T, et al. Effect of electroacupuncture on visceral sensitivity and colonic NGF, TrkA, TRPV1 expression in IBS-D rats [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2022, 42(12): 1395-1402.
- [9] 周干南, 胡芝华, 汪亚先, 等. 小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数数的应用 [J]. 中草药, 1994, 25(4): 195-196, 199.
- ZHOU G N, HU Z H, WANG Y X, et al. An inquiry into preparing diarrhea model of mice and application of diarrhea index [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1994, 25(4): 195-196, 199.
- [10] 史先芳, 尚精娟, 徐晖. 艾灸对肠易激综合征模型大鼠 IL-1 β 、IL-10 和 CGRP 表达的影响 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2021, 55(5): 462-465.
- SHI X F, SHANG J J, XU H. Influence of moxibustion on IL-1 β , IL-10 and CGRP expression in irritable bowel syndrome model rats [J]. J Harbin Med Univ, 2021, 55(5): 462-465.
- [11] OFICJALSKA K, RAVERDEAU M, AVIELLO G, et al. Protective role for caspase-11 during acute experimental murine colitis [J]. J Immunol, 2015, 194(3): 1252-1260.
- [12] 温艳东, 李保双, 王彦刚, 等. 消化系统常见病肠易激综合征中医诊疗指南(基层医生版) [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(7): 3518-3523.
- WEN Y D, LI B S, WANG Y G, et al. Clinical practice guideline of TCM for common digestive system diseases: irritable bowel syndrome (Edition for primary physician) [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(7): 3518-3523.
- [13] 李彦楠, 杨丽旋, 赵钟辉, 等. 《2020 年中国肠易激综合征专家共识意见》解读 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(10): 1151-1155.
- LI Y N, YANG L X, ZHAO Z H, et al. Interpretation of expert consensus on irritable bowel syndrome in China in 2020 [J]. Chin J Clin, 2021, 49(10): 1151-1155.
- [14] VAN DIEST S A, STANISOR O I, DE JONGE W J, et al. Visceral hypersensitivity in IBS: from bench to bedside [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011, 53(2): S34-S35.
- [15] 张薇, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 肠易激综合征内脏高敏动物模型的研究现状 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5655-5658.
- ZHANG W, ZHENG Q H, JIANG Y L, et al. Research status on animal models of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5655-5658.
- [16] 程斌, 黄琴, 王军蒙, 等. 乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 153-160.
- CHENG B, HUANG Q, WANG J M, et al. Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 153-160.
- [17] 旺建伟, 胥风华, 殷越, 等. 痛泻要方对多因素复制肠易激综合征大鼠作用的方证相关研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 553-559.
- WANG J W, XU F H, YIN Y, et al. Effects of Tongxie Yaofang Formula on multiple factors-induced rat model of irritable bowel syndrome based on the theory of correlation between formula and syndrome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(2): 553-559.
- [18] 林雨康, 陈涛, 李幸展, 等. 腹泻型肠易激综合征动物模型研究进展 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32(1): 133-136.
- LIN Y K, CHEN T, LI X Z, et al. Research progress in animal model of diarrhea irritable bowel syndrome [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 32(1): 133-136.
- [19] 何宗卿, 经双双, 智沐君, 等. 基于数据挖掘的肠易激综合征动物模型应用特点分析 [J]. 中医研究, 2022, 35(5): 70-77.
- HE Z Q, JING S S, ZHI M J, et al. Analysis of application characteristics of animal model of irritable bowel syndrome based on data mining [J]. Tradit Chin Med Res, 2022, 35(5): 70-77.
- [20] 黄丹, 梁列新, 方秀才, 等. 精神心理因素对腹泻型肠易激

- 综合征患者生命质量的影响 [J]. 中华消化杂志, 2015, 35(9): 599-605.
- HUANG D, LIANG L X, FANG X C, et al. Effect of psychological factors on quality of life in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Chin J Dig, 2015, 35(9): 599-605.
- [21] PINTO-SANCHEZ M I, FORD A C, AVILA C A, et al. Anxiety and depression increase in a stepwise manner in parallel with multiple FGIDs and symptom severity and frequency [J]. Am J Gastroenterol, 2015, 110(7): 1038-1048.
- [22] 王艳玲, 苏晓兰, 闫思萌, 等. 桂芍欢苓汤联合匹维溴铵治疗腹泻型肠易激综合征临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 3(1): 105-108.
- WANG Y L, SU X L, YAN S M, et al. Clinical observation on the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with Guishao huanling decoction and pinaverium bromide [J]. World J Integr Tradit West Med, 2017, 3(1): 105-108.
- [23] 任培培, 汪龙德, 刘俊宏, 等. 腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的研究方法 [J]. 中医研究, 2019, 32(6): 49-52.
- REN P P, WANG L D, LIU J H, et al. Research method of rat model of diarrhea irritable bowel syndrome with liver depression and spleen deficiency combined with disease and syndrome [J]. Tradit Chin Med Res, 2019, 32(6): 49-52.
- [24] 许东, 王承党, 李晓青, 等. 腹泻型肠易激综合征合并心理异常对肠道症状的影响 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(9): 603-608.
- XU D, WANG C D, LI X Q, et al. Impact of comorbid psychological disorders on intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome with diarrhea [J]. Chin J Dig, 2018, 38(9): 603-608.
- [25] 刘康毅. 腹泻型肠易激综合征中医证候规律及临床特征调查 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2015.
- LIU K Y. Investigation on TCM syndrome regularity and clinical characteristics of diarrhea irritable bowel syndrome [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2015.
- [26] WOUTERS M M, VAN WANROOY S, NGUYEN A, et al. Psychological comorbidity increases the risk for postinfectious IBS partly by enhanced susceptibility to develop infectious gastroenteritis [J]. Gut, 2016, 65(8): 1279-1288.
- [27] 李慧, 田耀洲, 张训兵, 等. 熄风化湿方对腹泻型肠易激综合征大鼠内脏高敏感性的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 704-707.
- LI H, TIAN Y Z, ZHANG X B, et al. Effect of Xifeng Huashi recipe on visceral hypersensitivity in rats with diarrhea predominant irritable bowel syndrome [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2019, 35(6): 704-707.
- [28] 管洁, 邓娜, 蔺晓源, 等. 腹泻型肠易激综合征及其中医病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(5): 73-78.
- GUAN J, DENG N, LIN X Y, et al. Study advances in animal models of IBS-D and TCM combination of disease and syndrome [J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(5): 73-78.
- [29] 祝姗姗, 王娇娇, 邹玲, 等. 基于多个 miRNAs 调节 NF- κ B 信号通路探讨艾灸干预腹泻型肠易激综合征模型大鼠的抗炎机制研究 [J]. 中国针灸, 2022, 42(6): 654-662.
- ZHU S S, WANG J J, ZOU L, et al. Anti-inflammation effect of moxibustion for rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome based on multiple miRNAs regulating NF- κ B signal pathway [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2022, 42(6): 654-662.
- [30] 丁晓洁, 孙喜灵, 于晓飞, 等. 乌梅丸对腹泻型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.
- DING X J, SUN X L, YU X F, et al. Effect of Wumei pill on intestinal flora and inflammatory factors in rats with diarrhea-type irritable bowel syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.
- [31] 赵义红, 王菲, 娄静. 小檗碱对腹泻型肠易激综合征大鼠肠屏障功能、炎症反应及 NF- κ B p65 的影响 [J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(6): 592-596.
- ZHAO Y H, WANG F, LOU J. Effect of berberine on the intestinal barrier function, inflammatory response and NF- κ B p65 in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. West Chin J Pharm Sci, 2019, 34(6): 592-596.
- [32] 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 T R, ZHANG Y, LU X X, 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.
- [33] 崔国艳, 丁境文, 刘正江, 等. 利福昔明对腹泻型肠易激综合征大鼠肠道菌群的影响 [J]. 长治医学院学报, 2020, 34(1): 28-30, 60.
- CUI G Y, DING J W, LIU Z J, et al. The effectiveness of Rifaximin on intestinal microflora in irritable bowel syndrome in rats [J]. J Changzhi Med Coll, 2020, 34(1): 28-30, 60.
- [34] 曹佳男, 刘霞, 刘涛, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 5-HT 及 5-HT_{3R} 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(10): 1493-1497.
- CAO J N, LIU X, LIU T, et al. Effect of moxibustion on colon 5-HT and 5-HT_{3R} in diarrhea predominant irritable bowel syndrome rats [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2021, 41(10): 1493-1497.
- [35] 张杰, 李红, 王进海, 等. 肠道微生态对腹泻型肠易激综合征的影响及其作用机制探讨 [J]. 世界临床药物, 2019, 40(5): 340-346.
- ZHANG J, LI H, WANG J H, et al. The effect and mechanism of intestinal microbiota in the pathogenesis of diarrhea type

- irritable bowel syndrome [J]. *World Clin Drugs*, 2019, 40(5): 340–346.
- [36] 蒋慧灵, 郑倩华, 赵映, 等. 结直肠扩张法诱导大鼠内脏高敏感模型制作概述 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 528–534.
- JIANG H L, ZHENG Q H, ZHAO Y, et al. Establishment of a rat colorectal distension-induced model of visceral hypersensitivity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 528–534.
- [37] 李晓红, 莫兴夏, 陈秋霞, 等. 5-羟色胺与其受体亚型在肝郁脾虚证大鼠的表达及逍遥散的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(11): 2593–2597.
- LI X H, MO X X, CHEN Q X, et al. Expressions of 5-hydroxytryptamine and its receptor subtypes in rats with liver-stagnation and spleen-deficiency syndrome and effects of Xiaoyao Powder [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(11): 2593–2597.
- [38] 刘昊, 李文静, 王馨媛, 等. 基于数据挖掘的功能性消化不良动物模型的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(4): 478–491.
- LIU H, LI W J, WANG X A, et al. Analysis of the application characteristics of functional dyspepsia animal models based on data mining [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(4): 478–491.
- [39] 石敬依, 周滔, 蔡文君, 等. 基于中医证型的功能性消化不良动物模型的研究进展 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(17): 1923–1928.
- SHI J Y, ZHOU T, CAI W J, et al. Research progress of animal models of functional dyspepsia based on TCM syndrome types [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2021, 30(17): 1923–1928.
- [40] 黄辰, 李瑛, 赵妍, 等. 脾虚证动物模型评价方法评述 [J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(2): 433–437, 447.
- HUANG C, LI Y, ZHAO Y, et al. Review of animal model evaluation method of liver-stagnation and spleen-deficiency [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2018, 45(2): 433–437, 447.
- [41] 叶晓梅, 王东明, 袁康瑞, 等. 药对枳实-白芍配伍比例对肝郁脾虚型肠易激综合征大鼠的药效学研究 [J]. *广东医科大学学报*, 2019, 37(6): 619–622, 626.
- YE X M, WANG D M, YUAN K R, et al. Pharmacodynamics of Zhishi-Baishao pair in rats with spleen deficiency-type irritable bowel syndrome [J]. *J Guangdong Med Univ*, 2019, 37(6): 619–622, 626.
- [42] 郭军雄, 许小敏, 刘雨娟, 等. 腹泻型肠易激综合征“肝郁脾虚证”病证结合大鼠模型的动态评估 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(11): 2590–2592.
- GUO J X, XU X M, LIU Y J, et al. Dynamic assessing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats with liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2018, 36(11): 2590–2592.
- [43] DROSSMAN D A. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features and Rome IV [J]. *Gastroenterology*, 2016, 19: S0016-S0085.

[收稿日期] 2023-05-21