

本文引用:朱洁,王叶,郭璇,刘乐平,韩志飞.新型造模法制备功能性消化不良肝郁脾虚证大鼠模型[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):372-375.

新型造模法制备功能性消化不良肝郁脾虚证大鼠模型

朱洁,王叶,郭璇*,刘乐平,韩志飞
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 从病因胃排空延缓、内脏高敏性、心理因素等入手改良建立新的功能性消化不良肝郁脾虚证动物模型。方法 将SD大鼠随机分为5组:高脂组(A组)、大黄组(B组)、复合组(C组)、夹尾对照组(D组)、空白对照组(E组)。除空白对照组,其余4组以束缚和游泳为基础,在A组加入可以导致胃排空延缓的高脂,在B组加入可以导致脾虚的苦寒泻下药大黄煎剂,并将A、B进行结合形成复合组(C组),而D组是国内常用的造模方法即夹尾刺激法,且以D组作为对照,通过观察行为学状态,检测胃排空率、小肠推进率对造模结果进行评价。结果 造模结束后,A、B、C、D组大鼠均出现扎堆、靠边,活跃度降低,攻击性减少,易受惊吓且易怒,毛发枯乱无光泽,粪便变软等表现;与E组相比,其他4组造模组的胃排空率和小肠推进率均有降低,C、D组降低显著,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论 选用复合组的造模方法可以使大鼠出现一系列的肝郁脾虚症状,并且有效地降低大鼠的胃排空率和小肠推进率。

〔关键词〕 功能性消化不良;肝郁脾虚证;动物模型

〔中图分类号〕R285.5;R965.1;R57 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.002

A New Method for Building the Model of Functional Dyspepsia Rats with Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome

ZHU Jie, WANG Ye, GUO Xuan*, LIU Leping, HAN Zhifei
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective From the delay of gastric emptying, visceral hypersensitivity, psychological factors and other causes to improve the establishment of a new animal model of dyspepsia rats with liver depression and spleen deficiency syndrome. **Methods** The SD rats were randomly divided into five groups: high fat group (group A), rhubarb group (group B), combination group (group C), clip tail control group (group D), blank control group (group E). Except for the blank control group (group E), the remaining four groups were given the basis training of restraint and swimming. In group A, the high fat caused delay of gastric emptying was added. In group B, bitter cold diarrhea decoction caused spleen deficiency was added, and group C was formed by combination of group A and group B. Group D as a control group was given a commonly used modeling method of tailgating stimulation. The modeling results were evaluated by observing behavioral status, gastric emptying rate, small intestine propulsion rate. **Results** After modeling, rats in group A, B, C and D appeared the behavior of getting together, keeping to the side, decreased activity, reduced aggression, vulnerable to scared and irritable, hair dull and dull, and soft stool. Compared with group E, the gastric emptying rate and small intestine advance rate in other four groups decreased, and the decrease degree in group C and D was more obvious, the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The compounding method could make rats appear a series of symptoms of liver depression and spleen deficiency, and effectively reduce the gastric emptying rate and intestinal propulsion rate in rats.

〔Keywords〕 functional dyspepsia; liver depression and spleen deficiency; animal models

〔收稿日期〕2016-11-16

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81403384);湖南省教育厅优秀青年项目(15B181);湖南中医药大学校级创新性实验课题(30)。

〔作者简介〕朱洁,女,本科在读,口腔医学专业。

〔通讯作者〕*郭璇,女,讲师,E-mail:guoxuan749@qq.com。

功能性消化不良(functional dyspepsia,FD)是一种常见的功能性胃肠病,且尚无器质性原因可究,在全球范围内总患病率约为11.5%~14.5%^[1],在流行病学调查显示国内功能性消化不良的患病率为23.5%^[2]。临床表现主要为食欲不振、腹胀、腹痛、早饱、嗝气、恶心呕吐等,其发病机制尚未完全阐明,目前以胃容受性受损、内脏敏感性增高、胃肠动力障碍为主要病理生理改变^[3]。功能性消化不良动物模型是进行功能性消化不良相关研究的重要基础,目前国内外已建立多种FD动物模型,常用的有郭氏夹尾应激法^[4]即用夹鼠尾的方法来激怒大鼠;碘乙酰胺灌胃法则是根据炎症后内脏敏感性增高的机制设计的,刚刚出生10 d的大鼠用0.1%的碘乙酰胺蔗糖溶液进行灌胃,等到大鼠成熟期即可成为功能性消化不良大鼠模型^[5]等单因素造模方法;也有复合因素造模方法,碘乙酰胺联合夹尾刺激造模^[6];如韩秋艳等用慢性夹尾激怒加高浓度大黄灌胃法造模^[7]。但是单因素造模法存在刺激因素过于单一,存在与临床实际情况相差太大的问题,而复合因素的造模方法则能够更为全面地模拟FD发病因素的多样化、复杂化。研究人员从功能性消化不良的主要病因即胃排空延缓、内脏高敏感、肝郁脾虚以及外邪致病(如饮食不节、药物所伤)入手,将已有的造模方法进行组合改良,建立复合因素动物模型,试图探索出一种在造模过程中能降低动物死亡率、更贴近自然发病情况的造模方法,为功能性消化不良的造模提供更好的思路及方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠,SPF级,雌性,体质量180~220 g,许可证号:SCXK(湘)20110003,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

1.1.2 药物制备 生大黄(湖南中医药大学第一附属医院)、碘酒、高脂饲料(湖南斯莱克景达实验动物有限公司)^[8];生大黄,煎煮,浓缩成0.5 g/mL,备用。高脂饲料:84%玉米粉+15.5%猪油+0.5%胆固醇。半固体糊:取5 g羧甲基纤维素溶于100 mL蒸馏水中,分别加入奶粉8 g,糖4 g,淀粉4 g,2 mL碳素墨水,配成半固体糊^[9],置冰箱中冷藏保存,临用前两小时取出恢复至常温。

1.1.3 主要器材 自制束缚架、夹尾器;AR2140电子天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模 将30只大鼠适应性喂养1周

后,随机编号分组,即分为高脂组(A)、大黄组(B)、复合组(C)、夹尾对照组(D)及空白对照组(E)。空白对照组正常喂养,其余四组均进行束缚和游泳,每天早8:00~11:00将大鼠束缚于束缚架^[10]上进行固定,放入饲养箱中,每日3 h,连续21 d;另实验大鼠于每日14:00游泳12 min,持续3周。在上述造模方法基础上在A组大鼠食用高脂饲料2周;B组采用灌胃的方式给予大黄煎剂10 g/(kg·d)连续给药14 d;C组的造模方法为大黄煎剂+高脂饲料喂养+束缚+游泳;D组为国内较常用夹尾刺激法,将该组3只大鼠同笼,用长海绵钳夹大鼠尾巴远端1/3处,以不破皮为度,令其暴怒,寻衅与其他大鼠撕打,以激怒全笼大鼠。每次刺激30 min,每日1次,连续刺激21 d。

1.2.2 行为学状态观察 实验过程中通过肉眼观察大鼠的皮肤毛发、行为状态、活跃程度、情绪反应、兴奋程度、睡眠状态及大便状态,记录大鼠的体质量变化。

1.2.3 胃肠动力检测 (1)胃排空率的测定:造模结束后禁食不禁水24 h,给予半固体糊2 mL灌胃^[9],30 min后处死,迅速打开腹腔,剪取胃及全小肠,由吸水纸吸干胃外壁,称取质量后沿胃大弯剪开,用生理盐水冲洗,再吸干水分后称量,胃排空率=1-[(胃全重-胃净重)/灌胃量]×100%;(2)小肠推进率的测定:分离肠系膜,剪取幽门至回盲部的肠管^[11],置于白纸上,轻轻拉成直线,测量肠管长度为小肠总长度,从幽门至碳墨前沿的距离为碳墨在小肠内推进的距离。小肠推进率=碳墨在小肠推进的距离/小肠总长度×100%^[11]。

1.3 统计方法

统计学处理实验所有数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,均用SPSS 17.0软件处理,满足方差齐性采用单因素方差分析,反之则使用非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态

实验期间空白对照组无异常情况,随着造模时间的增加,四组模型组均出现皮肤毛发干枯少泽,少动扎堆,活跃度降低,情绪反应大、易怒或对外界刺激反应较少兴奋,淡漠,体质量减轻,倦怠嗜睡,便溏,肛门污秽等肝郁脾虚之相似症状。

造模第21天时,四组模型组大鼠体质量与空白组相比虽有下降,但差异无统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 胃肠动力检测

A、C、D 三组胃排空率低于空白对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);B 组胃排空率虽有下降,但差异不具有统计学意义 ($P>0.05$);A、B 组小肠推进率低于空白对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);C、D 组小肠推进率低于空白对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);C、D 组相比,没有显著差异性,不具有统计学意义 ($P>0.05$)。实验结果显示,复合组大鼠的胃排空率和小肠推进率降低显著,从胃肠动力障碍这个角度看采用新型造模方法可以有效制备肝郁脾虚证动物模型,且实验中选用的复合因素造模法在理论上可以较全面地模拟 FD 患者的复杂发病机制及临床表现。见表 2。因此可以认为进一步开发新型造模方法是必要且有意义的。

表 1 各组大鼠体质量比较 ($\bar{x}\pm s, g$)

组别	n	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
空白对照组	5	212.20±22.17	248.46±35.34	271.56±55.21	299.08±72.43
高脂组	6	212.86±9.95	231.78±15.08	231.33±19.51	241.62±16.94
大黄组	6	211.83±9.64	232.92±13.06	233.53±12.01	243.98±17.31
复合组	6	223.03±9.67	216.15±7.02	219.62±3.80	238.32±12.95
夹尾对照组	5	211.83±9.68	220.36±17.59	221.64±22.25	223.41±26.51
F		0.877	2.346	2.649	2.426
P		0.492	0.085	0.061	0.077

表 2 各组大鼠胃排空率、小肠推进率的比较 ($\bar{x}\pm s, %$)

组别	n	胃排空率	小肠推进率
空白对照组	5	67.00±18.23	74.53±3.90
高脂组	6	50.00±14.80*	67.87±7.21*
大黄组	6	55.83±11.58	67.08±3.71*
复合组	6	47.30±7.58*	60.36±5.23**
夹尾对照组	5	47.60±13.50*	61.99±2.42**
F		2.096	7.224
P		0.115	0.001

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

2.3 动物死亡率情况统计

在实验过程中,实验人员严格参照实验步骤与要求进行实验操作,尽量减少因实验技术造成的死亡,在此条件下,夹尾组出现 1 例死亡,经分析,可能与长期接受夹尾刺激,在饮食饮水减少,便溏等情况下造成免疫力降低有关,而其余模型组在实验过程中均未出现死亡。

3 讨论

中医学运用五行学说解释脏腑的生理及相互关

系,曰肝属木,主疏泄,脾属土,为气血生化之源,五行相克理论说明肝木克脾土。随着中医学的发展,衍生出“颠倒五行”学说以便于更加合理的解释五脏之间的相互作用,由此可知土亦克木,清·程芝田也曾提到“木可克土,土也可克木,脾土健旺则肝木自平也”。肝与脾之间相互制约、相互依赖的关系称为肝脾调和,高月香等指出若肝脾任何一方偏盛偏衰,则出现肝脾不调^[12],而肝郁脾虚证的病机便在于肝脾不调。在西医学研究中 FD 是一种常见的功能性胃肠病,且尚无器质性原因可究。

胃排空延缓是造成 FD 的重要发病机制之一,早期的 Meta 分析纳入了 17 项研究包含 868 名 FD 患者和 397 例对照,结果显示 40% 的 FD 患者存在胃排空的延缓^[13];近年来随着人们生活压力的增大,发病率逐渐增高,临床表现主要为食欲不振、腹胀、腹痛、早饱、暖气、恶心呕吐等^[14],欧洲的相关研究认为餐后不适、恶心、呕吐的症状与胃排空延缓相关^[15];Tack 等对连续入组的 800 例 FD 患者的研究发现:胃排空功能障碍与早饱、恶心、呕吐及饱胀感相关。由此表明胃排空延缓可能与功能性消化不良有一定的关系^[16]。长期的高脂饲料喂养能够上调位于胃肠道的 nNOS 以及 TGR5 的表达,影响非肾上腺能非胆碱能,最终造成胃排空延缓^[8];相关研究显示高脂饲料可以造成大鼠胃肠动力异常,如胃排空率的降低、胃节律的障碍等^[17];但是食用高脂饲料的大鼠血脂变化有一定的影响,给实验增添了不确定因素^[18],且长期喂养高脂饲料导致胃排空延缓的机制尚未清晰,有待进一步的研究。大黄性味苦寒,有“伤元气,耗阴血,损脾胃以致虚的性质”,其作用于健康机体的主要病理改变为损伤正气,会出现耗伤津液,丢失离子,降低体温,减缓代谢等不良反应^[19]。基于现有研究现状,高脂是造成胃排空延缓的有效方法,而大黄是脾虚证造模的经典方法,但将两者结合进行造模却不曾见,本实验将这两者有机结合,以期制备出合理有效的动物模型。

本实验中 A、B、C、D 四组均能有效降低大鼠小肠推进率,其差异具有统计学意义,但 A、B 组对大鼠小肠推进率降低的影响不及 C、D 组,C、D 组降低胃排空率效果明显,而 A、B 组不明显。通过对大鼠的胃排空率检测与行为状态学观察发现,在所有实验组中,C 组对大鼠胃排空率以及小肠推进率影响

最大,其一般状态也更接近于FD的临床特征。实验结果证明,C组复合组作为本实验创新的造模方法,该法不但能够有效造出FD模型,并且具有一定优势。高脂与大黄的组合不仅实现了多种致病因素的结合,还有效地实现了中西医的有机结合,与夹尾组相比,减少了对实验人员造成伤害的可能性,降低了大鼠死亡率,实验过程中该组无大鼠死亡;与其他各组相比,该组多种单一因素的结合与该病临床发病机制更为切合。但本实验依然存在一定的缺陷,实验中对FD模型大鼠胃收缩频率、胃内压、胃电图以及其它胃肠激素的影响均未涉及,有待于进一步的深入研究。本文认为实验造模方法更侧重于造成大鼠脾虚证,对大鼠肝郁证却有所忽略;功能性消化不良肝郁脾虚证的发病率逐渐增高,生理因素作为其主要因素值得深究,但心理因素对该病也有着不可忽略的影响。临床实践发现,心理压力、心情抑郁确实是造成机体发病不可忽视的因素,且精神心理因素既是致病因素,同时FD患者病情反复发作也会加重患者的抑郁情绪。在FD患者与正常人的心理调查中发现FD患者多伴有抑郁焦虑等负面情绪,FD患者的心理健康水平显著低于正常人^[20]。部分学者针对FD患者采用抗抑郁药物治疗,能有效改善临床症状,也提示心理因素在FD的发病机制中占据重要地位^[21]。《内经》中也有提及:“怒伤肝,久则郁……病多发于肝,三日而之脾”,肝郁则横逆犯脾,脾失健运。由此看来,FD与情志抑郁心理因素密切相关。基于前文所述,笔者认为实验有待进一步的研究改进。

参考文献:

- [1] EL-SERAG H B, TALLEY N, JEL-SERAG H B, et al. Systemic review: the prevalence and clinical course of functional dyspepsia[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004,19:643-654.
- [2] LI Y, NIE Y, SHA W, et al. The link between psychosocial factors and functional dyspepsia: an epidemiological study[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2002,115(7):1082-1084.
- [3] 吴震宇,张声生,张恒玉,等.简述功能性消化不良动物模型的建立与评价方法[J].*世界华人消化杂志*,2015,23(11):5190-5193.
- [4] 郭海军,林洁,李国成,等.功能性消化不良的动物模型研究[J].*中国中西医结合消化杂志*,2001,9(3):141-142.
- [5] LIU L S, WINSTON J H, SHENOY M M, et al. A rat model of chronic Gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal irritation[J]. *Gastroenterology*, 2008,134(7):2070-2079.
- [6] 吴震宇,张声生.碘乙酰胺灌胃联合夹尾应激诱导大鼠FD模型的建立及评价[J].2015,23(7):462-466.
- [7] 韩秋艳.肝郁脾虚证动物模型的建立[J].*贵阳中医学院学报*,2001,23(3):59.
- [8] ZHOU H, ZHOU SY. Upregulation of bile acid receptor TGR5 and nNOS in gastric myenteric plexus is responsible for delayed gastric emptying after chronic high-fat feeding in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308:G863-G873.
- [9] 程秋实,汪龙德,毛兰芳,等.平胃胶囊对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠胃肠动力及脑肠肽的影响[J].*时珍国医国药*,2015,26(8):1804-1807.
- [10] 赵迎盼,陶源,张北华,等.IBS-D肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价的初步研究[A].*世界中医药学会联合会消化病专业委员会第三届国际学术大会暨广西中西医结合学会消化病年会论文集*[C].南宁:2012,1-17.
- [11] 王煜姣,凌江红.复合病因造模法制备功能性消化不良大鼠模型[J].*世界华人消化杂志*,2014,22(2):210-214.
- [12] 高月香,梁玲玉.浅谈肝脾失调及治法[J].*光明中医*,2008,23(7):10-14.
- [13] WALDRON B, CULLEN P T, KUMAR R, et al. Evidence for hypomotility in non-ulcer dyspepsia: a prospective multifactorial study[J]. *Gut*, 1991,32(3):246-251.
- [14] 刘秋月,严祥.功能性消化不良胃肠动力研究进展[J].*国际消化病杂志*,2013,33(10):319.
- [15] STANGHELLINI V, TOSETTI C, PATEMICO A, et al. Risk indicators of delayed gastric emptying of solids in patients with functional dyspepsia[J]. *Gastroenterology*,1996,110(4):1036-1042.
- [16] TACK J, BISSCHOPS R, SAMELLI G. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(4):1239-1255.
- [17] 陈达明.糖尿病性胃病[J].*国外医学·消化系疾病分册*,2000,20(4):204-206.
- [18] 郭福川,李颖.高脂饲料诱导对大鼠血脂的影响[J].*卫生研究*, 2011,40(1):41-42.
- [19] 郑海金,宋小冬,李庆丰.大黄致脾虚及四君子汤复健小鼠血浆中cAMP与脾PFC含量的变化[J].*兰州大学学报*,1994(4):108-110.
- [20] 高彦,陈绳武,蓝宇.功能性消化不良患者的心理健康状况调查[J].*中国实用内科杂志*,2007,27(16):1311-1312.
- [21] 任建民.功能性消化不良发病机制及临床治疗的研究进展[J].*中国伤残医学*,2012,20(9):117-118.

(本文编辑 杨 瑛)