

DOI:10.16305/j.1007-1334.2016.09.004

病证结合复制大鼠脾肾阳虚腹泻型肠易激综合征模型的探讨

朱佳杰^{1,2}, 苏晓兰¹, 刘 珊³, 杨 晨⁴

1. 中国中医科学院望京医院脾胃病科(北京 100102); 2. 北京中医药大学东直门医院脾胃病科(北京 100700); 3. 北京中医药大学基础医学院(北京 100029); 4. 北京市密云中医医院内二科(北京 101500)

【摘要】 探讨病证结合脾肾阳虚腹泻型肠易激综合征大鼠模型的建立和评价方法。认为可采用较为公认的母婴分离、直肠扩张、避水应激等方法建立疾病模型,同时以饮食不节、苦寒泻下结合劳倦过度、惊恐伤肾的复合因素复制中医脾肾阳虚证模型;模型评价可从宏观体征、个别理化指标、药物反证和造模因素反推 4 个维度进行,使得相关模型更符合中医理论。

【关键词】 肠易激综合征;腹泻型;脾肾阳虚;模型;病证结合

Discussion on the establishment of rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome with yang deficiency in spleen and kidney based on the combination of disease and syndrome

ZHU Jia-jie^{1,2}, SU Xiao-lan¹, LIU Shan³, YANG Chen⁴

1. Department of Stomach, Wangjing Hospital of Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100102;
2. Department of Stomach, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700;
3. School of Basic Medical Science, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100029; 4. Department of Internal Medicine, Miyun Distinct Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 101500

Abstract: This paper discussed the establishment and evaluation of rat model of diarrhea-predominant irritable bowel (D-IBS) syndrome with yang deficiency in spleen and kidney based on the combination of disease and syndrome. It was held that maternal separation, colorectal distention and water avoidance stress were the accepted methods for establishment of D-IBS model, as the animal model with yang deficiency in spleen and kidney was established by improper diet, diarrhea induced by bitter and cold herbs combined with overstrain and panic; model evaluation could be conducted in the following aspects as macroscopic sign, individual physicochemical index, drug reduction and model factors, which conform to the theory of Chinese medicine.

Keywords: irritable bowel syndrome; diarrhea; yang deficiency in spleen and kidney; animal model; combination of disease and syndrome

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是消化科临床常见的功能性肠病,约占消化科门诊的 20%~50%,其中又以腹泻型为主^[1-2]。近年来的临床研究结果显示,在腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)患者中,脾肾阳虚证者占 52.5%^[3],温肾健脾法对其疗效显著^[4]。动物实验是研究温肾健脾法作用机制的主要方法,其基础则在于选择合适的病证结合模型。

病证结合动物模型是指在中医理论指导下,在西

医复制疾病模型的基础上,结合一种或多种符合中医病因学说的致病因素,复制中医证候模型,令动物模型同时具有西医疾病与中医证候的特征^[5]。病证结合模型符合中医研究的特殊性^[6],但目前尚无关于 D-IBS 脾肾阳虚病证结合的动物模型。本文就如何建立脾肾阳虚证 D-IBS 动物模型,以及对模型进行评价的方法探讨如下。

1 疾病模型的建立及评价

1.1 疾病模型的建立 D-IBS 动物模型主要有两大特征,即腹泻和内脏高敏感。目前运用较多的造模方法有母婴分离^[7]、新生儿期直肠扩张刺激^[8]、避水应激^[9]、束缚应激^[10]、醋酸等化学药物灌肠刺激^[11]、复合因素^[12]等。其中母婴分离法和新生儿期直肠扩张刺激较好地模拟了早期负面生活事件导致的心理应激,形成的内脏高敏感可持续到成年^[8,13];避水应激法采用

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81072800);国家自然科学基金青年基金项目(81403389);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZZ0908026)

【作者简介】 朱佳杰,男,博士,医师,主要从事中西医结合内科临床研究工作

【通讯作者】 杨晨,硕士,主治医师。E-mail:lan_r@126.com

成年大鼠,缩短了造模时间,且内脏高敏感稳定持久^[9]。上述造模方法均较为成熟,也是目前国际上比较认可的造模方法。

1.2 疾病模型的评价 对于 D-IBS 疾病模型的评价,腹泻可采用 bristol 大便分级、腹泻指数等指标,内脏高敏感可采用腹壁撤退反射(AWR)、腹壁肌电活动等方法。此外,结合结肠组织学观察,其病理变化应符合功能性肠病的特点^[14]。

2 脾肾阳虚证候模型的建立及评价

2.1 常见的造模方法及存在的问题 目前已有较多脾阳虚及肾阳虚的动物模型^[15-16],但脾肾阳虚模型较少。

2.1.1 西药造模 李晨等^[17]以腹腔注射利血平(0.5 $\mu\text{g/g}$) 14 天,成功复制出脾阳虚大鼠模型。该模型具有操作简单、可控性好、易于重复等优点,目前应用较多^[18]。但该造模方法是利用利血平的胃肠道不良反应,其原理不符合中医病因理论,且模型动物常兼夹抑郁等其他症状^[19]。

大量注射外源性皮质激素(如氢化可的松)是目前运用最多的建立肾阳虚模型的方法。其能反馈性抑制肾上腺皮质功能,当突然停用糖皮质激素时,皮质功能抑制暴露,出现一系列“耗竭”现象,类似中医的肾阳虚证表现^[15]。但亦有观点指出,大量外源性皮质激素的注入,使得体内皮质激素水平明显升高,与阳虚证患者皮质功能低下的特点相反,进而认为该模型是由于药物在体内大量蓄积导致动物亚急性中毒性反应的结果^[20]。

傅晓晴等^[21]以腺嘌呤混悬液灌胃,成功建立了肾阳虚证大鼠模型。但大量摄入的腺嘌呤,在动物体内经一系列酶的水解,形成极难溶解于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,容易沉积、堵塞肾小管,造成肾衰竭^[22],因而更适用于慢性肾衰竭肾阳虚病证结合模型的复制。

2.1.2 中医病因造模 西药造模多利用药物的毒副作用,不符合中医病因理论。另外,由于中医存在同病异证、异病同证的概念,因此在建立脾肾阳虚证候模型的同时,需考虑疾病的特点;而西药造模导致机体生理紊乱,甚至出现病理损害,不符合 D-IBS 功能性疾病的特点。因此,根据中医传统理论,进行中医病因造模较为贴切,但目前常用的方法亦存在一定的问题。

如王焱需等^[23]以冰水喷洒然后以电风扇吹干毛发等方法模拟“寒伤阳”,建立了大鼠肾阳虚模型。但过分的寒冷刺激可造成寒凝血瘀,故此模型可能兼夹有血瘀的存在,不完全符合肾阳虚的特征。杨裕华等^[24]根据“房事不节”“劳倦过度”理论,以雄性小鼠频繁交

配结合疲劳游泳建立了肾阳虚模型。但该方法存在无法客观量化的问题,尚未被广泛认可。杜维祥等^[25]根据“恐伤肾”理论,以猫吓鼠的方式,使其精神-神经-内分泌紊乱,复制出肾阳虚模型。该方法符合中医传统理论,但不符合实验动物伦理,且由于实验室清洁等级的控制,一般实验室较难实现猫与鼠的共同饲养。

2.2 理想的脾肾阳虚证造模方法的设想 基于以上分析,我们认为以中医饮食不节、苦寒泻下伤阳、劳倦过度及惊恐伤肾等理论为指导,以物理因素为主模拟中医病因,多因素联合的造模方式较为可取。具体方法如下。

(1)饮食不节。模拟现代人饮食不节的生活特点。每周禁食 1 次,每次禁食 24 h;隔日交替灌胃精炼猪油和喂食甘蓝,每周 2 次。上述方法连续干预 4 周。

(2)苦寒泻下伤阳。基于苦寒泻下伤脾阳、久泻及肾原理,予番泻叶水煎液灌胃,每日 1 次,连续 2 周。

(3)劳倦过度。将大鼠置于 60 cm × 50 cm × 40 cm 的水池中游泳,水温 20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,以力竭为度(口鼻下沉,冒气泡)。每日 1 次,连续 2 周。

(4)惊恐伤肾。利用大鼠对水的天生畏惧感,进行避水应激,既符合中医惊恐伤肾原理,又可诱导 IBS 内脏高敏感。造模装置为 45 cm × 25 cm × 25 cm 水池,中央置一 10 cm × 8 cm × 8 cm 的小岛样平台,池内注水(25 $^{\circ}\text{C}$)至平台上沿下 1 cm;将大鼠放在平台上,每天放置 1 h,连续 2 周。

2.3 脾肾阳虚证候模型的评价 对于病证结合模型的评价,可从模型动物的宏观体征、个别理化指标、药物反证、造模因素 4 个方面进行^[26]。

2.3.1 宏观体征 脾肾阳虚大鼠常表现为活动减少、反应迟钝、弓背蜷缩、体温下降、体毛枯疏、饮食减少、体重减轻、大便稀软等。

动物模型证候属性的判定应采用临床诊断标准的等效对应方法^[26]。根据中华中医药学会脾胃病分会于 2010 年制定的《肠易激综合征中医诊疗共识意见》^[27]中脾肾阳虚的诊断标准,可从腹泻、形寒肢冷、腰膝酸软、不思饮食等方面,对脾肾阳虚证模型的宏观体征进行评判。其中腹泻以腹泻指数表示;形寒肢冷以体温表示,每周测量大鼠肛温,与空白对照组比较;腰膝酸软以负重游泳实验^[28]及旷场试验表示,该方法可反映脾肾阳虚大鼠自主活动能力的下降;不思饮食以进食量及饮水量表示。

2.3.2 个别理化指标 尿 D-木糖排泄率或血清 D-木糖含量可测定大鼠的吸收功能,能客观反应脾主运化的功能^[16]。其次,血浆中环磷酸腺苷(cAMP)下降、环

磷酸鸟苷 (cGMP) 升高、cAMP/cGMP 降低^[29], 以及 24 h 尿 17-羟类固醇含量减少^[30], 是公认地反映肾阳虚证特异性病理变化的指标。

2.3.3 药物反证 本研究团队自拟的温肾健脾方是在四神丸基础上加入党参、白术、郁金组成, 功效为温补脾肾、涩肠止泻。前期研究显示, 该方可有效改善 D-IBS 大鼠腹泻、倦怠蜷卧、饮食减少、体重下降等一般状况^[31], 提示其可用于脾肾阳虚型 D-IBS 大鼠模型的药物反证。

2.3.4 从造模因素推测 《脾胃论》明确指出: “饮食失节、寒温不适, 则脾胃乃伤。”禁食 24 h、灌胃精炼猪油和喂食甘蓝乃模拟饥饱无常、过食肥甘、恣食生冷, 三者均可损伤脾胃, 耗伤脾阳。

《杂病广要》载: “脾虚, 忌下、降泄、破气。”番泻叶苦寒泻下伤阳, 轻则损伤脾阳, 重则累及肾阳, 致脾肾阳虚。

此外, 疲劳游泳乃基于中医理论模拟“劳倦伤脾”, 所谓“脾胃之伤于外者, 唯劳倦最能伤脾”(《景岳全书》)。避水应激是模拟中医的“惊恐伤肾”。

从造模因素分析, 我们提出的饮食不节、苦寒泻下伤阳、劳倦过度及惊恐伤肾等方法, 符合中医病因理论, 可导致动物形成脾肾阳虚的证候。

3 结语

综上所述, 在复制 D-IBS 脾肾阳虚型病证结合动物模型时, 可首先采用国际认可的母婴分离、新生儿直肠扩张或避水应激诱导 D-IBS 疾病模型。在此基础上, 以中医理论为指导, 以物理因素为主, 联合饮食不节、苦寒泻下伤阳、劳倦过度及惊恐伤肾模拟中医病因, 采用复合因素制备脾肾阳虚证模型。对于模型的评价, 应以客观指标为主, 从宏观体征、个别理化指标、药物反证和造模因素反推 4 个维度进行。

本文探讨的以复合因素复制的 D-IBS 脾肾阳虚病证结合动物模型, 不仅更真实地模拟了实际患者的特点, 也更符合中医理论, 更贴近中医辨证论治的特色, 可用于研究中医温肾健脾法治疗 D-IBS 的作用机制。我们拟计划开展动物实验, 以对本文提出的 D-IBS 脾肾阳虚病证结合动物模型进行实际验证。

参考文献:

- [1] Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2006, 15(3): 237-241.
- [2] 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 等. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2000, 21(1): 26-29.

- [3] Li Q, Yang GY, Liu JP. Syndrome differentiation in Chinese herbal medicine for irritable bowel syndrome: a literature review of randomized trials[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013. doi: 10.1155/2013/232147.
- [4] Su X, Tang Y, Zhang J, et al. Curative effect of warming kidney and fortifying spleen recipe on diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(5): 615-619.
- [5] 康洁, 高碧珍. 病证结合动物模型研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11): 2357-2359.
- [6] 李晓娟, 白晓晖, 陈家旭, 等. 中医动物模型研制方法及展望[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2263-2266.
- [7] O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses[J]. Biol Psychiatry, 2009, 65(3): 263-267.
- [8] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [9] Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained visceral hyperalgesia[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(1): G42-G53.
- [10] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rats: a model for irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 1988, 94(3): 611-621.
- [11] 严博, 邓莉, 陈建明. 肠易激综合征相关动物模型研究进展[J]. 药学与临床研究, 2013, 21(5): 557-562.
- [12] 苏晓兰, 魏玮. 肠易激综合征动物模型研究进展[J]. 山东中医药, 2013, 32(2): 133-135.
- [13] Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2): G307-G316.
- [14] 张北华. IBS-D 肝郁脾虚型病证结合大鼠模型的建立与评价[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [15] 李广曦. 肾阳虚证动物模型的造模方法及其相关指标回顾[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(4): 46-54.
- [16] 李芹, 张会永, 吴天石, 等. 脾阳虚证动物模型造模方法与模型评价的研究进展[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2015, 17(8): 1721-1728.
- [17] 李晨, 王垂杰. 3 种脾虚证模型大鼠胃黏膜损伤情况的比较[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(3): 127-130.
- [18] 羊燕群, 郭文峰, 李茹柳, 等. 脾阳虚大鼠模型建立及理中汤疗效观察[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(1): 83-86.
- [19] 郭建丽, 冯玛莉. 利血平致肝郁脾虚动物模型的探讨[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(5): 19-21.
- [20] 何帮剑, 肖鲁伟, 童培建. 肾阳虚证动物模型的研究进展[J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1293-1294.
- [21] 傅晓晴, 林若勤, 武一曼, 等. 腺嘌呤制作肾阳虚型慢性肾功能衰竭大鼠模型的生化研究[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(1): 22-24.
- [22] 肖静, 王毅兴, 高建东, 等. 肾阳虚证的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(2): 73-77.

[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(35):3898-3899.

师·医学专业杂志, 2010, 12(24):124.

[9] 顾文忠. 重用苍术治疗顽固性湿证举隅[J]. 实用中医药杂志, 2001, 17(9):43.

编辑:张旭珍

收稿日期:2016-04-12

[10] 王扬. 重用苍术治疗湿阻湿浊困阻型临床体会[J]. 中国社区医

【专家小传】顾文忠,男,上海市浦东新区名中医,上海市基层名老中医专家学术经验传承研究工作室建设项目指导老师。担任中国民间中医医药研究开发协会特色医疗分会常务理事,中国疑难病研究协会委员,中华中医药学会亚健康分会委员,上海市中医药学会男科分会委员,《实用中医药杂志》编委会顾问等职。主诊中医内科、男科,擅长治疗慢性胃炎、慢性肝炎、肝硬化,以及男子功能障碍、不育症和慢性前列腺炎等常见病和疑难病症。尤其对慢性胃炎和慢性前列腺炎的治疗具有独特经验。经验方“胃炎平汤”治疗慢性胃炎荣获原南汇区科技进步二等奖;经验方“前列清汤”治疗慢性前列腺炎荣获原南汇区科技进步三等奖,被评为“浦东中医优势技术”。主编出版中医专著《经典心悟》和《朱仲德医疗经验集》。荣获浦东新区“最美老干部奖”、上海市劳动模范和全国“五一”劳动奖章。

【诊余感言】此病案正如《神农本草经》所云:“若用毒药疗病,先起如黍粟,病去即止,不去倍之,不去十之,取去为度。”

【经验点滴】在治疗寒热错杂的慢性胃炎时,常选用《伤寒论》半夏泻心汤加减,辨证施治,寒热并用。

(上接第 17 页)

[23] 王焱霏,朱莹,王璇. 溃疡性结肠炎(脾肾阳虚证)大鼠模型的实验研究[J]. 中国中医急症, 2015, 24(8):1332-1335.

[24] 杨裕华,李震. “劳倦过度、房室不节”肾虚小鼠模型脑基因芯片研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5):396-401.

[25] 杜维祥,沈世林,马玉清,等. 金锁二仙饮对雄性肾虚质小鼠雄激素的调节作用[J]. 中国中医药科技, 2012, 17(5):393.

[26] 赵慧辉,郭书文,王伟. 病证结合动物模型判定标准的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(6):365-368.

[27] 中华中医药学会脾胃病分会. 肠易激综合征中医诊疗共识意见[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(7):1062-1065.

[28] Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, et al. Establishment and

assessment of a rat model of fatigue[J]. Neurosci Lett, 2003, 352(3):159-162.

[29] 陈英华,欧阳轶强,孙琪,等. 肾虚证动物模型规范化研究中诊断指标选择的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(10):26-30.

[30] 沈自尹,王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中西医结合杂志, 1986(10):1062-1065.

[31] 苏晓兰,唐艳萍,张静,等. 温肾健脾法干预腹泻型肠易激综合征大鼠的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2):197-202.

编辑:李艳红

收稿日期:2016-05-20