

功能性消化不良脾虚证大鼠模型的建立及评价

刘成全¹, 邓青¹, 谭志超¹, 杨华³, 姜德建¹, 曾贵荣^{1,2*}

(1. 湖南省药物安全评价研究中心新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331; 2. 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100001; 3. 湖南汉森医药研究有限公司, 长沙 410013)

【摘要】 **目的** 探讨功能性消化不良脾虚证动物模型的建立及比较。**方法** 分别采用碘乙酰以及复合小平台站立或复合游泳法建立功能性消化不良脾虚证大鼠模型, 通过观察动物一般状态、体重及摄食量变化, 检测血清胃动素、胆囊收缩素、乳酸、胃泌素的含量、尿 D-木糖排泄率来评价成模效果。**结果** 碘乙酰胺单因素组大鼠体重增长减缓、摄食量减少; 复合因素组大鼠出现消瘦、毛发枯涩、腹泻等脾虚症状, 且大鼠尿 D-木糖排泄率、血清胃动素、胃泌素含量明显降低, 而血清胆囊收缩素、乳酸含量明显升高。**结论** 三种造模方法均能导致功能性消化不良脾虚症状, 但复合因素处理组脾虚症状更明显, 碘乙酰胺复合小平台站立法成模效果最佳。

【关键词】 功能性消化不良; 脾虚症; 碘乙酰胺; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0311-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.014

Establishment and assessment of a rat model of functional dyspepsia with spleen deficiency

LIU Cheng-quan¹, DENG Qing¹, TAN Zhi-chao¹, YANG Hua³, JIANG De-jian¹, ZENG Gui-rong^{1,2*}

(1. Hunan Center for Safety Evaluation And Research of Drugs, Hunan Key Laboratory for Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China; 2. Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100001; 3. Hunan Hansen Medical Research Co., Ltd. Changsha 410013)

【Abstract】 **Objective** To establish animal models of functional dyspepsia with spleen deficiency and to compare the efficacy of different methods. **Methods** Rat models were established by iodoacetamide (IA) - treatment or combined with swimming. Appearance, body weight, food intake of the rats were observed, and serum motilin, cholecystokinin, lactate, gastrin content and urinary D-xylose excretion rates were detected to confirm whether the model of functional dyspepsia with spleen deficiency was established. **Results** The IA-treated rats had less food intake and a slower body weight gain. The IA-treated combined with swimming rats presented spleen-hypofunction symptoms, such as emaciation, hair dry and loose stools, their urinary D-xylose excretion rate, serum motilin, gastrin content were decreased, and serum cholecystokinin and lactate contents were increased significantly ($P < 0.05$ for all). **Conclusions** All the three methods used in this study can result in symptoms of functional dyspepsia with spleen deficiency. However, IA-treatment combined with swimming models appear more close to spleen deficiency-like presentation, and the best model is the IA-treated combined with platform standing.

【Key words】 Functional dyspepsia; Spleen deficiency; Iodoacetamide; Rats

Corresponding author: ZENG Gui-rong. E-mail: zengguirong@hnse.org

[基金项目] 湖湘青年创新人才基金。

[作者简介] 刘成全, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 新药安全性评价。E-mail: 836744381@qq.com

[通讯作者] 曾贵荣, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 神经药理与毒理学。E-mail: zengguirong@hnse.org

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是临床一种常见疾病,指一组起源于胃、十二指肠区域的消化不良症状,并以缺乏可引起上述症状的器质性疾病为特征^[1]。中医学认为,功能性消化不良可与“痞满”对应,其中脾气虚证是“痞满”一病的重要证型,根据其辨证标准^[2,3]，“痞满”脾气虚证主症是脘腹痞满或胀痛、食少纳呆,次症表现为纳少、大便稀溏、疲乏无力等。目前有两种较为经典的 FD 动物模型,分别是郭氏适度夹尾法^[4]和张氏不规则喂养及饮用酸化水法^[5]。前者是考虑到精神因素在 FD 致病过程中的重要作用,属于肝郁气滞证型模型;后者则是根据 FD 患者普遍存在的胃电节律失常现象提出的实验构想,属于脾气虚弱证型模型。目前已有模型制作方法比较单一,以复制单一症状为主;另外,FD 发病机制不明,模型评价主要以症状为主,缺乏客观指标评价。本研究采用碘乙酰胺、碘乙酰胺复合游泳或小平台站立法探索制备大鼠 FD 模型,通过症状观察结合客观指标检测对上述模型进行比较评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生 6 d 的 SPF 级幼年 SD 大鼠 40 只(4 窝,带母鼠),雌雄各半。由湖南斯莱克景达实验有限公司提供【SCXK(湘)2011-0003】,饲养于湖南省药物安全评价研究中心屏障环境【SYXK(湘)2015-0016】。实验期间环境温度 20~26℃,湿度 40%~70%。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要仪器

自制改良多平台箱(110 cm × 60 cm × 40 cm)中固定 10 个平台(直径 6.5 cm,高 8.0 cm),在平台周边注满水,水温(22 ± 1)℃,水面低于平台表面 1.0 cm;MR-96A 酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);AUY 型分析天平(日本岛津公司生产);PL2002 型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易有限公司,上海)。

1.2.2 试剂

碘乙酰胺(批号:RQ9523R156,上海瑞永生物科技有限公司);蔗糖(批号:20141012,天津市福晨化学试剂厂);D-木糖(批号:X5629,Ruibio 公司);大鼠 D-木糖、胃动素(motilin,MTL)、胃泌素(gastrin,GAS)、乳酸(lactate,LA)、胆囊收缩素(chole-

cystokinin,CCK)ELISA 检测试剂盒(批号:201606,上海哈灵生物科技有限公司产品)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模与分组

大鼠均窝调整适应 3 d 后,随机选取 10 只作为正常对照组灌胃给予 2% 的蔗糖溶液,其余动物灌胃给予 0.1% 的碘乙酰胺 2% 蔗糖溶液,灌胃体积每只 0.2 mL,连续灌胃 6 d。继续饲养大鼠至 21 日龄,断乳,剔除母鼠,并将大鼠分笼,每笼 5 只,改用常规饲料饲养。大鼠饲养至 28 日龄,再将碘乙酰胺干预组大鼠按性别体重随机分成 3 组,分别为模型组 1(碘乙酰胺组)、模型组 2(碘乙酰胺 + 游泳组)、模型组 3(碘乙酰胺 + 小平台站立组),每组 10 只。正常组与模型组 1 正常饲养,模型组 2 的大鼠置于水深 30 cm,水温(22 ± 1)℃ 的游泳池内,每天游泳 30 min。模型组 3 的大鼠每天放入注水的平台箱内站立 6 h,各组连续造模 28 d。

1.3.2 检测指标

1)一般状态观察:每天肉眼观察大鼠毛发色泽、精神状态、粪便情况。

2)体重和摄食量检查:检测造模前、复合造模前、复合造模 14、28 d 动物体重和摄食量。

3)指标检测:复合造模 14、28 d 眼眶后静脉丛采血 3 mL,3000 r/min 分离血清,采用 ELISA 法检测 MTL、CCK、LA、GAS 含量和尿 D-木糖排泄率。尿 D-木糖排泄率测定方法:每只大鼠灌胃 4% D-木糖溶液 3 mL,收集 5 h 尿液(期间禁食不禁水),测定每只大鼠总尿量、尿 D-木糖浓度,按公式计算尿 D-木糖排泄率:尿 D-木糖排泄率 = [(尿 D-木糖浓度 × 总尿量)/(40 mg/mL × 3 mL)] × 100%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行统计分析,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Leven's test 方法检验正态性和方差齐性,如果符合正态性和方差齐性($P > 0.05$),用单因素方差分析(ANOVA)和 LSD test 进行统计分析;如果不符合正态性和方差齐性($P \leq 0.05$),则用 Kruskal-Wallis 检验。评价时考虑统计学差异和生物学意义。

2 实验结果

2.1 大鼠一般状态

与正常对照组比较,模型组 1 的大鼠一般状态

无明显差异。模型组 2 和模型组 3 的大鼠出现毛发不泽、神疲乏力、嗜睡和软便,部分动物出现腹泻,模型组 3 的大鼠上述症状出现更早,更为明显。

2.2 大鼠体重变化情况

如图 1 所示,第 10 天为碘乙酰胺干预前,第 28 天为复合造模前,第 42 天为复合造模 14 d,第 52 天为复合造模 28 d。造模后,造模组动物体重较正常对照组动物体重增长明显缓慢,且模型组 2、3 动物体重增长更为缓慢。

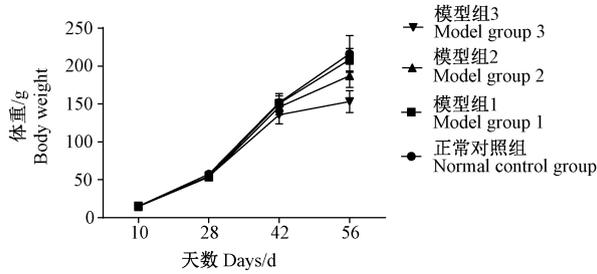
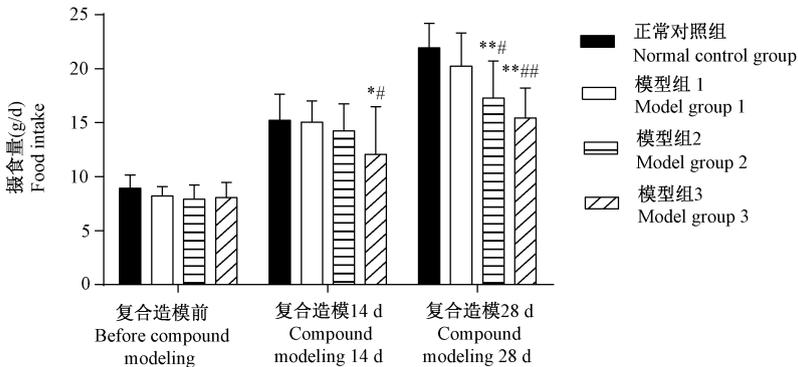


图 1 大鼠体重变化情况

Fig. 1 Changes of body weight of the rats



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组 1 相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 2 大鼠摄食量变化情况

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with the model group 1.

Fig. 2 Changes of food intake of the rats

3 讨论

功能性消化不良是一种非器质性损伤的慢性疾病,其确切病因与发病机制尚不明确,一般认为多种因素导致内脏高敏性或胃肠运动功能障碍而发病,其中与精神心理因素密切相关^[6]。现代医学认为,FD 的发生与胃动力异常、内脏高敏感性、社会心理学因素、幽门螺杆菌、遗传、过度的胃酸分泌、环境、饮食及生活方式有关,且脑-肠轴、自主神经系统和胃肠激素在其中可能起着重要的作用^[7]。胃肠激素,其中包括胆囊收缩素、胃动素、胃泌素等。胃肠

2.3 大鼠摄食量变化情况

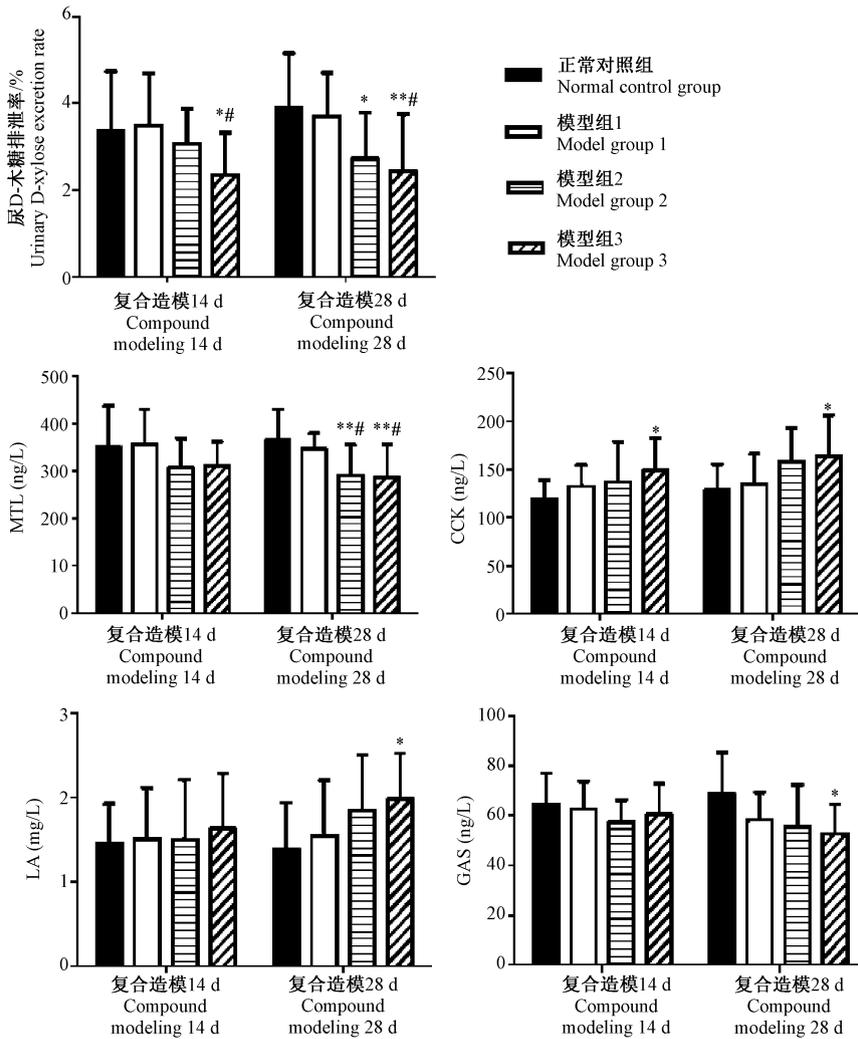
如表 2 所示,复合造模 14 d,模型组 3 动物摄食量明显低于正常对照组、模型组 1($P < 0.05$);复合造模 28 d,模型组 2、3 动物摄食量明显低于正常对照组和模型组 1($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 大鼠胃肠激素及相关指标变化情况

如图 3 所示,复合造模 14 d,模型组 3 大鼠尿 D-木糖排泄率明显低于正常对照组和模型组 1($P < 0.05$),血清 CCK 含量明显高于正常对照组($P < 0.05$)。复合造模 28 d,模型组 2 大鼠尿 D-木糖排泄率明显低于正常对照组($P < 0.05$),血清 MTL 含量明显低于正常对照组和模型组 1($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);模型组 3 大鼠尿 D-木糖排泄率、血清 MTL 含量均明显低于正常对照组和模型组 1($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),血清 GAS 含量明显低于正常对照组($P < 0.05$),血清 CCK、LA 含量均明显高于正常对照组($P < 0.05$)。

激素分泌紊乱与功能性消化不良密切相关^[8-14]。研究表明,尿 D-木糖排泄率降低是脾虚患者的临床表现之一,是诊断功能性消化不良的客观指标,脾虚症状程度越重,尿 D-木糖排泄率越低^[15]。另外,实验结果表明,乳酸堆积及其代谢异常与功能性消化不良脾虚症状密切相关,脾气虚证患者血乳酸含量异常升高,且在治疗后随上述症状的改善而下降^[16]。

本研究选择国际公认的碘乙酰胺造模法作为功能性消化不良模型^[17],对幼年大鼠胃进行刺激,产生炎症致内脏敏感性增高。同时,根据中医“脾主



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组1相比,# $P < 0.05$ 。

图3 大鼠胃肠激素及相关指标变化情况

Note.* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, compared with the normal group;# $P < 0.05$, compared with the model group 1.

Fig. 3 Changes of gastrointestinal hormone and related indicators in the rats

肌肉”,“劳倦伤脾”理论,复合游泳和小平台站立因素,诱发大鼠疲劳,小平台站立因素还可加重大鼠恐惧心理,使其情绪暴躁,进而加快成模。采用碘乙酰胺单因素或复合因素造模后,模型大鼠均出现摄食减少、体重增长缓慢,复合因素造模组大鼠出现毛发不泽、神疲乏力、消瘦、便软,部分动物出现稀便,且复合小平台站立组大鼠上述症状出现更早更严重。这可能与复合因素的强度差异有关。结果表明碘乙酰胺组大鼠体重增长减缓、摄食量减少;复合因素组大鼠出现消瘦、毛色不泽、稀便等脾虚症状。复合因素组(平台站立和游泳)大鼠尿D-木糖排泄率、血清胃动素、胃泌素含量明显降低,而胆囊收缩素、乳酸值明显升高。

综上所述,通过症状和客观指标的评价,碘乙酰胺

单因素法、碘乙酰胺复合游泳或小平台站立法均能造成功能性消化不良症状,但碘乙酰胺复合小平台站立法成模效果最佳,且该模型与脑肠轴及其调节的相关胃肠激素有密切相关。

参考文献

- [1] Tack J, Talley NJ, Camilleri M, et al. Functional gastroduodenal disorders [J]. Gastroenterology, 2006, 130(5): 1466 - 1479.
- [2] 张万岱,危北海,陈治水等.功能性消化不良的中西医结合诊治方案(草案)[J].中国中西医结合消化杂志,2004,12(6): 381 - 383.
- [3] 中华中医药学会脾胃病分会.消化不良中医诊疗共识意见(2009)[J].中国中西医结合杂志,2010,30(5): 533 - 537.
- [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] 张勇,王振华.大鼠胃电节律失常模型的建立[J].世界华人

消化杂志, 1998, 6(7): 612 - 613.

- [6] Stanghellini V, De Giorgio R, Barbara G, et al. Delayed gastric emptying in functional dyspepsia[J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2004, 7(4): 259 - 264.
- [7] Miwa H, Watarai J, Fukui H, et al Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(Suppl 3): 53 - 60.
- [8] 李景南, 钱家鸣. 胃肠激素与消化系统疾病[J]. *中华消化杂志*, 2005, 25(4): 253 - 254.
- [9] 刘未艾, 刘密, 何亚敏, 等. 功能性胃肠病脑肠肽的研究进展[J]. *中国中医急症*, 2012, 21(6): 951 - 953.
- [10] Luiking, YC, Akkermans LM, Peeters TL, et al. Effects of motilin on human interdigestive gastrointestinal and gallbladder motility, and involvement of 5HT3 receptors[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2002, 14(2): 151 - 159.
- [11] Kamerling IM, van Haarst AD, Burggraaf J, et al. Exogenous motilin affects postprandial proximal gastric motor function and visceral sensation[J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(8): 1732 - 1736.

- [12] Baile CA, McLaughlin CL, Della-Fera MA. Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake[J]. *Physiol Rev*, 1986, 66(1): 172 - 234.
- [13] Chua AS, Keeling PW. Cholecystokinin hyperresponsiveness in functional dyspepsia[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(17): 2688 - 2693.
- [14] 杨凤江, 郝悦, 李小丽, 等. 功能性消化不良患者血浆胃肠激素水平的变化[J]. *武警医学*, 2003, 14(10): 614 - 615.
- [15] 陈淑芬. 脾虚证与血清胃泌素、D - 木糖排泄率及 T 细胞亚群关系探讨[J]. *四川中医*, 1999, 17(11): 6 - 7.
- [16] 杨维益, 梁嵘, 李峰. 脾气虚证与乳酸代谢[J]. *河南中医*, 1997, 17(1): 23 - 24.
- [17] Liu LS, Winston JH, Shenoy MM, et al. A rat model of chronic gastric sensorimotor dysfunction resulting from transient neonatal gastric irritation[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7): 2070 - 2079.

[收稿日期] 2016 - 11 - 21

(上接第 305 页)

患者 AFP 检测为阴性, 另外亦有部分原发性肝癌不分泌 AFP^[9], 因此采用 AFP 阳性细胞检测 CTCs 存在一定的局限性。因此, 建立多标记蛋白联合标记进行检测 CTC 的方法更有临床意义。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359 - E386.
- [2] Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127(4): 679 - 695.
- [3] Shariff MI, Cox J, Goma AI, et al. Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics [J]. *Hepat Med Evidence Res*, 2009, 3(4): 353 - 367.
- [4] Wang JH, Wang CC, Hung CH, et al. Survival comparison between surgical resection and radiofrequency ablation for patients in BCLC very early/early stage hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 412 - 418.

- [5] Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. *Sci Translat Med*, 2010, 2(25): 25ra23 - 25ra23.
- [6] Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5): 931 - 939.
- [7] Liberko M, Kolostova K, Bobek V. Essentials of circulating tumor cells for clinical research and practice [J]. *Crit Rev Oncol/hematol*, 2013, 88(2): 338 - 356.
- [8] Fujiki M, Takada Y, Ogura Y, et al. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin in selection criteria for living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(10): 2362 - 2371.
- [9] Zhao L, Mou DC, Wu ZA, et al. Diagnostic value of cancer-testis antigen mRNA in peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32): 4072 - 4078.

[收稿日期] 2016 - 10 - 14