

功能性消化不良脾虚证动物模型的制作及评价

刘晶 李峰 唐旭东 马捷 葛东宇 李根茂 刘燕 刘艳阳 韩晨霞 吴卓耘

【摘要】 目的 复制并评价功能性消化不良脾虚证动物模型。**方法** 运用碘乙酰胺复合小平台劳倦因素造模法,制作功能性消化不良脾虚证动物模型,并观察动物一般状态、体重、饮食情况及胃病理改变,运用糖水偏好试验,球囊试验对功能性消化不良脾虚证进行评价。**结果** 碘乙酰胺及复合小平台大鼠,均出现饮食减少,糖水偏好降低,胃敏感性增高。但碘乙酰胺复合小平台组大鼠体重下降明显,并伴有倦怠等精神症状。**结论** 模型符合功能性消化不良脾虚证标准,但碘乙酰胺复合小平台组脾虚证表征更加明显。

【关键词】 功能性消化不良; 脾虚证; 动物模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.06.015

Reconstruction and assessment of functional dyspepsia with spleen deficiency in TCM LIU Jing, LI Feng, TANG Xu-dong, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Feng, E-mail: lifeng95@sina.vip.com

【Abstract】 Objective Reconstruction and assessment of animal model of function dyspepsia with spleen deficiency in TCM. **Methods** Animal model was reconstructed by transient neonatal gastric irritation with iodoacetamide (IA) oral gavages and modified multiple platform method. Appearance, body

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB531703)

作者单位:北京中医药大学基础医学院[刘晶(博士研究生)、李峰、马捷、葛东宇、李根茂、刘燕、刘艳阳(硕士研究生)、韩晨霞(博士研究生)、吴卓耘(硕士研究生)];中国中医科学院西苑医院消化内科(唐旭东)

作者简介:刘晶(1986-),女,2012 级在读博士研究生。研究方向:“脾主运化”的现代生物学机制研究。E-mail:lglangfang@sina.com

通讯作者:李峰(1966-),博士,教授,博士生导师。研究方向:中医“病证结合”规律研究。E-mail:lifeng95@sina.vip.com

weight, quantity of food and water in-take, sucrose preference, and gastric hypersensitivity were observed to assess whether it is the model of functional dyspepsia with spleen deficiency. **Results** The IA and IA with modified multiple platform method models all had less food and water in-take, low sucrose preference, and gastric hypersensitivity. The rats of IA with modified multiple platform method got lower body weight and more fatigue. **Conclusion** Both models met the standards of functional dyspepsia with spleen deficiency, however, IA with modified multiple platform method model appeared more spleen deficiency-like behavioral.

【Key words】 Functional dyspepsia; Spleen deficiency in TCM; Animal model

功能性消化不良表现为胃和十二指肠功能紊乱引起的症状,经检查排除引起这些症状的器质性疾病的一组临床综合征^[1]。根据目前国际公认的功能性胃肠病诊断标准—罗马Ⅲ标准,功能性消化不良必须包括以下症状的一条或多条:(1)餐后饱胀不适;(2)早饱感;(3)上腹痛;(4)上腹烧灼感。并且没有可以解释上述症状的功能性疾病。同时还应满足诊断前,症状出现至少 6 个月,近 3 个月符合以上标准^[2]。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^[3-5]，“痞满”脾气虚证主症是：脘腹痞满或胀痛，食少纳呆。次症表现为纳少泛恶，嗳气呃逆，大便稀溏，疲乏无力，舌淡，苔薄白，脉细弦。根据上述诊断及辨证标准，对功能性消化不良脾虚证动物模型进行复制及评估。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Spargue-Dawley 雄性乳鼠 45 只,7 日龄,带母鼠,每只母鼠带 5 只乳鼠,为其提供母乳。母鼠与所带乳鼠为一笼,饲养于清洁级动物房,12 小时节律,室温 22℃,湿度:60%~70%。母鼠以全价颗粒饲料喂养,自由饮水。实验动物均由斯贝福(北京)实验科技有限公司提供。[许可证号:SYXK(京)2012-0001]。

1.2 实验试剂及设备

1.2.1 自制改良多平台箱 改良多平台箱(110 cm×60 cm×40 cm)中固定 15 个平台(直径 6.5 cm,高 8.0 cm),在平台周边注满水,水温 22℃,水面低于平台表面 1.0 cm。大鼠放置在箱内平台上,可以在平台间活动,可自由饮食饮水,但无法正常休息,进而诱发大鼠疲劳。

1.2.2 实验试剂 碘乙酰胺,由西奥格玛公司提供;蔗糖,由拜尔迪公司提供。

1.3 功能性消化不良脾虚证动物模型的复制

模型复制参考功能性消化不良碘乙酰胺造模法^[6]及改良多平台造模法^[7]。

实验步骤:(1)适应性饲养 3 天,12 小时昼夜节律,室温 22℃,常规饲料喂养母鼠,并由母鼠提供母乳给乳鼠。(2)乳鼠 10 日龄,将乳鼠按笼随机分成 2 组,蔗糖组(15 只),碘乙酰胺干预组(30 只)。蔗糖组每天以 2% 蔗糖溶液对乳鼠进行灌胃,0.2 mL/只,连续 6 天。碘乙酰胺干预组每天以 0.1% 碘乙酰胺蔗糖溶液对乳鼠灌胃,蔗糖溶液浓度为 2%,0.2 mL/只,连续 6 天。之后正常饲养,饲养条件较之前不变。(3)饲养大鼠至 3 周龄,断奶,剔除母鼠。并将大鼠分笼,每笼 5 只,改用常规饲料饲养。(4)大鼠饲养至 6 周龄,再次将实验大鼠分组。正常组(15 只):为之前以蔗糖溶液灌胃的大鼠;将碘乙酰胺干预组大鼠按体重随机分成 2 组,模型 1 组(15 只),模型 2 组(15 只)。正常组与模型 1 组正常饲养,模型 2 组每天放入注水的平台箱内(18:00~8:00)进行疲劳诱发,连续 14 天。箱内水每天更换,水温维持 22℃。

1.4 功能性消化不良脾虚证动物模型评价

1.4.1 大鼠一般状态观察 每天对实验大鼠整体状态进行肉眼观察,观察大鼠皮毛色泽,耳廓颜色,精神状态及活动度,同时记录大鼠体重变化。

1.4.2 实验大鼠病理学检查 碘乙酰胺干预结束及小平台站立结束后,每组随机抽取 2 只大鼠,观察大鼠胃病理学改变。

1.4.3 大鼠饮食情况统计 数据收集期间,每组随机抽取 10 只大鼠单笼饲养,记录大鼠一天食物及饮水的消耗量。

1.4.4 糖水偏好试验 大鼠模型复制结束后,对实验大鼠进行糖水偏好试验^[8-10]。每组随机抽取 10 只大鼠,进行试验。试验前,对大鼠进行糖水适应性训练。训练期间,大鼠单笼饲养,笼上同时放置两个水瓶,一瓶为 1% 的蔗糖溶液,另一瓶为正常饮用水。每隔 12 小时,两个水瓶左右互换。训练连续进行 48 小时。训练结束后,仅供应饮用水 6 小时,随后禁食水 18 小时,此后进入试验阶段。试验期间,保持大鼠单笼饲养,每笼上再次放置 1% 的蔗糖

溶液及正常饮用水,持续 3 小时。记录糖水及饮用水试验前后重量差值。计算糖水偏好百分比。糖水偏好百分比(SP) = 糖水消耗量(g) ÷ [糖水消耗量(g) + 饮用水消耗量(g)]。统计 SP > 75% 大鼠在本组中所占百分比,各组比较运用卡方检验。

1.4.5 胃肠敏感性试验 模型复制结束后,大鼠进行胃肠敏感性试验^[6,11]。大鼠模型复制结束后,每组随机选取 3 只大鼠,进行胃肠敏感性试验。试验前,大鼠禁食 18 小时。1% 戊巴比妥钠麻醉实验大鼠,按大鼠体重 0.4 mL/100g 腹腔注射。切开大鼠腹部,暴露胃。在大鼠胃部作一切口,将气囊植入胃底部。气囊一端闭合,另一端接一 PE 管。缝合胃切口,PE 管留在胃外,埋入皮下。缝合腹部切口。术后,大鼠单笼饲养,恢复一周。一周后,将 PE 管从大鼠皮下取出,接压力计。将电极植入大鼠斜方肌肌群。用压力计向大鼠胃内气囊充气,气囊扩张分别至 10 mmHg、20 mmHg、30 mmHg、40 mmHg、50 mmHg 这 5 个数值,每次扩张持续 20 秒,间隔 2 分钟,同时检测在此胃内压下的斜方肌肌电变化。统计大鼠肌电变化率。

1.5 数据统计

数据采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。计量数据采用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据,每组均成正态分布,采用方差分析。组间两两比较采用 LSD 检验。计数数据采用卡方检验。 $P < 0.05$ 具有显著性差异; $P < 0.01$ 为极显著性差异,具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 大鼠一般状态

观察发现,模型组大鼠较正常组大鼠皮毛不泽,耳廓颜色较淡,懒惰嗜卧,活动度低。其中模型 2 组较模型 1 组更为明显。

2.2 大鼠体重变化

大鼠 6 周龄时,即碘乙酰胺干预 32 天后,将碘乙酰胺组大鼠按体重随机分组,对模型 2 组进行小平台干预,并记录大鼠体重变化。小平台干预期间,正常组与模型 1 组大鼠体重比较无显著差异($P > 0.1$),小平台干预后第 7 天,模型 2 组大鼠体重明显低于正常组及模型 1 组($P < 0.01$),此差异一直持续至小平台干预结束。见表 1。

2.3 大鼠胃病理切片

如图所示,碘乙酰胺干预后,幼年大鼠胃组织与蔗糖组比较除黏膜表面略有疏松外,无明显变化,

表 1 小平台干预后大鼠体重变化($\bar{x} \pm s, g, n = 15$)

时间	正常组	模型 1 组	模型 2 组
第 0 天	209.8 ± 6.67	201.2 ± 4.21	206.6 ± 5.45
第 7 天	242.3 ± 8.13	239.4 ± 4.50	206.4 ± 6.34 ^{ab}
第 14 天	288.1 ± 9.79	303.5 ± 4.77	219.4 ± 8.96 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型 1 组比较,^b $P < 0.01$

未见深层损伤及炎性浸润,如图 1。大鼠成年后,模型 1 组与正常组比较,组织也无明显差异。小平台干预组(模型 2 组)胃未见损伤及炎性浸润,胃组织与正常组,模型 1 组比较也无明显差异。各组均未见胃损伤(如图 2)。

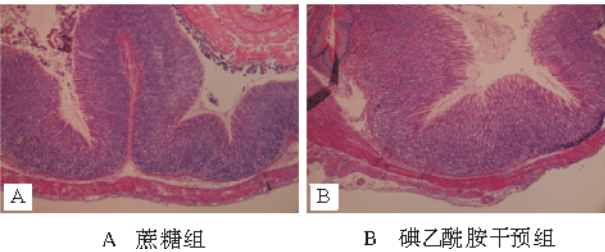


图 1 碘乙酰胺干预后大鼠胃病理

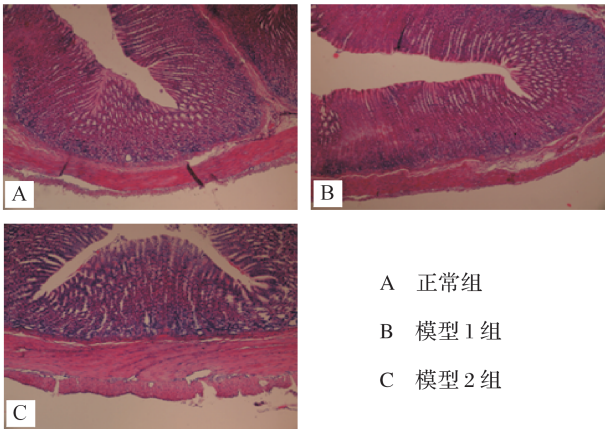


图 2 小平台干预后胃病理

2.4 大鼠进食量及饮水量统计

小平台结束后,记录各组大鼠进食量及饮水量。模型 1 组及模型 2 组大鼠进食量均明显低于正常组($P < 0.05$),与正常组及模型 1 组比较,模型 2 组进食量减少更为显著($P < 0.01$)。各组大鼠饮水量情况与进食情况相似,两模型组饮水量均低于正常组($P < 0.05$),且模型 2 组较正常组,模型 1 组减少更为显著($P < 0.01$)。如表 2。

2.5 糖水偏好试验

每组随机抽取 10 只,进行糖水偏好试验。各组

表 2 各组大鼠饮食情况统计($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	进食量(g)	饮水量(g)
正常组	21.5 ± 0.58	39.2 ± 2.3
模型 1 组	19.5 ± 0.43 ^a	30.0 ± 1.52 ^a
模型 2 组	15.4 ± 0.79 ^{bc}	27.3 ± 3.34 ^{bc}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与正常组比较,^b $P < 0.01$;与模型 1 组比较,^c $P < 0.01$

大鼠糖水消耗量比较,无显著差异($P > 0.1$)。但各组大鼠,糖水偏好百分比 $> 75\%$ 大鼠只数占各组总数百分比有明显差异,模型 1 组与模型 2 组均显著低于正常组($P < 0.01$)。如表 3。

表 3 各组大鼠糖水偏好试验($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	糖水消耗量(g)	SP $> 75\%$ (只)	百分比(%)
正常组	22.5 ± 3.52	8	80
模型 1 组	15.9 ± 1.57	1	10 ^a
模型 2 组	17.0 ± 5.42	2	20 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$

2.6 胃肠敏感性试验

向大鼠胃部植入的气囊充气,检测不同胃内压下,大鼠颈部肌电变化率。在胃内压 10 mmHg,三组肌电变化率比较无显著性差异($P > 0.1$),至 20 mmHg 时,两模型组肌电变化率较正常组明显升高($P < 0.01$),但两模型组之间比较无显著差异($P > 0.1$)。30 mmHg 时,三组比较与 20 mmHg 一致;40 mmHg 时,模型 1 组与正常组比较有极显著性差异($P < 0.01$),模型 2 组与正常组比较有显著性差异($P < 0.05$),两模型组之间没有显著差异($P > 0.1$)。50 mmHg 时,两模型组与正常组比较有显著差异($P < 0.05$),两模型组之间无显著性差异($P > 0.1$)。模型组大鼠肌电变化率在 30 mmHg 达到峰值,之后变化率开始减小。正常组大鼠肌电变化率在 40 mmHg 时达到峰值,之后变化率开始减小。如表 4 及图 3。

表 4 不同胃内压下大鼠颈部肌电变化率($\bar{x} \pm s$)

扩张压力	正常组	模型 1 组	模型 2 组
10mmHg	103.15 ± 4.69	114.94 ± 13.53	114.56 ± 14.70
20mmHg	179.30 ± 22.46	282.49 ± 17.22 ^a	288.83 ± 34.53 ^a
30mmHg	254.93 ± 30.05	420.12 ± 29.15 ^a	412.55 ± 61.85 ^a
40mmHg	315.41 ± 20.17	412.35 ± 33.53 ^a	378.80 ± 23.87 ^b
50mmHg	265.80 ± 34.06	333.88 ± 39.09 ^b	345.23 ± 14.36 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与正常组比较,^b $P < 0.05$

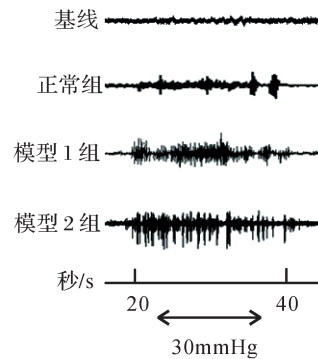
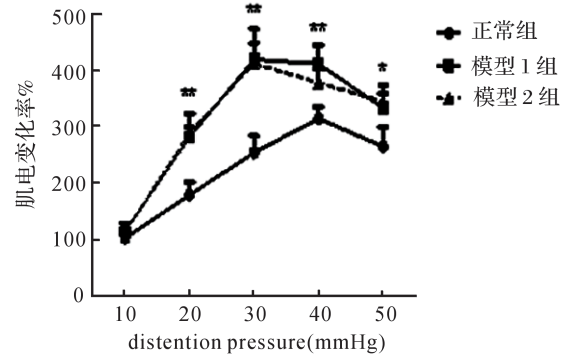


图 3 肌电变化率及示意图

3 讨论

功能性消化不良是西医病名,诊断要点包括:(1)餐后饱胀不适,早饱感,上腹痛,上腹烧灼感至少出现 1 项或多项;(2)慢性起病,病症持续至少 6 个月;(3)排除其它器质性疾病。功能性消化不良包括两个亚型。其中以中等程度上腹痛为主要症状的,称为上腹痛综合征,以餐后上腹部饱胀不适为主要症状的,称为餐后不适综合征。有研究发现,功能性消化不良上腹痛综合征患者的胃顺应性降低较健康人明显,而餐后不适综合征患者在胃敏感性增高方面更为显著^[12]。

中医内科学将功能性消化不良归入“痞满”的范畴。研究功能性消化不良中医学证候分布发现,各中医证型共有症状为腹胀^[13]。而根据西医学的疾病诊断,单纯的上腹痛综合征并不包括腹胀这一症状。因此,中医学认为的功能性消化不良(痞满),应属于西医餐后不适综合征的范畴,伴或不伴有上腹痛综合征。根据中医功能性消化不良(痞满)脾胃虚弱证的辨证标准^[3-5],其主症为脘腹痞满或胀痛,食少纳呆,次症为恶心,嗳气,呃逆,疲乏无力,舌淡,苔薄白,脉细弦。

因此功能性消化不良脾虚证动物模型评价标准,首先应符合罗马Ⅲ功能性消化不良诊断标准,

其次应符合中医脾胃虚弱证中的上腹胀,食少,食欲减退三大主症。根据这些标准,实验选择了国际上使用的碘乙酰胺造模法作为功能性消化不良模型^[6],对幼年大鼠胃进行刺激,从而降低成年大鼠胃功能。同时,根据中医“脾主肌肉”,“劳倦伤脾”理论,复合小平台站立因素,诱发大鼠疲劳,进而加重脾虚。

围绕中西医诊断标准,实验对模型进行评价。本次研究造模周期为 46 天,符合功能性消化不良慢性起病的标准。而对胃组织染色发现,模型组未出现炎性浸润及深层损伤,排除胃炎及胃溃疡等引起该症状的器质性疾病。从饮食情况来看,模型组较正常组饮食显著减少,其中以模型 2 组减少更为明显,这一结果符合中医脾虚证中的“食少”一症。糖水偏好试验反映大鼠对喜爱食物的兴趣程度。实验发现,模型组大鼠糖水偏好百分比 >75%,在本组中所占百分比正常组明显降低,结合进食量减退,可以反应大鼠食欲下降情况。这一症状也符合功能性消化不良脾虚证纳呆这一主症。上腹胀是功能性消化不良脾虚证最重要的主症,研究发现,上腹胀可能与胃对机械扩张敏感性增高有关^[12]。临床中也用球囊试验检测胃功能。本次研究中,借用球囊试验检测大鼠胃敏感性,研究发现在同等胃内压的条件下,两模型组大鼠均对胃内扩张的感受更为敏感,反映了大鼠胃敏感性增高。另外,两模型组大鼠出现感觉至不能耐受的胃内压变化较正常组明显降低,在一定程度上反应了模型组胃顺应性降低,其中以施加小平台因素的模型 2 组较为明显。球囊试验反映了大鼠腹胀及早饱方面的程度,结果显示,模型组大鼠可出现腹胀,早饱样症状,符合功能性消化不良脾虚证主症。

从功能性消化不良脾虚证中西医诊断标准来看,两模型组均符合疾病脾虚证的诊断标准,但两组在一些指标上还有差异。首先,施加小平台因素的模型 2 组大鼠体重显著低于正常组及模型 1 组;其次,模型 2 组大鼠饮食减少较模型 1 组更为显著。另外,从功能性消化不良脾虚证次症来看,模型组大鼠较正常组大鼠皮毛不泽,耳廓颜色较淡,懒惰嗜卧,活动度低。其中模型 2 组较模型 1 组更为明显。这些符合脾虚证疲乏无力,面色少华的特点,而模型 2 组这些特点更为明显。

综上,从功能性消化不良脾虚证主症来看,碘乙酰胺干预的模型 1 组与复合小平台劳倦因素的模

型 2 组,均符合功能性消化不良脾虚证动物模型。从次症来看,模型 1 组与模型 2 组分属于脾虚证的不同亚型。李东垣在《脾胃论》中提到:“脾胃均虚,则不能食而瘦,或少食而肥。”本研究中,模型 1 组符合“少食而肥”的脾虚证,而模型 2 组符合“不能食而瘦”的脾虚证,而施加劳倦因素的模型 2 组脾虚证表征更为明显。这一研究所建立的模型,将为功能性消化不良脾虚证的深入研究提供动物模型支持。

参 考 文 献

- [1] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] 罗马委员会. 功能性胃肠病罗马Ⅲ诊断标准[J]. 胃肠病学,2006,11(12):761-765.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:134.
- [4] 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,2004,06:381-383.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Suchecki D, Tu FK S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat[J]. Physiol Behav,2000,68(3):309-316.
- [8] Towell A, Muscat R, Willner P. Effects of pimozone on sucrose consumption and preference[J]. Psychopharmacology (Berl), 1987, 92(2):262-264.
- [9] Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, et al. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration[J]. Neuropsychopharmacology 2004, 29(11):2007-2017.
- [10] Wang X, Zhao T, Qiu Y, et al. Metabonomics approach to understanding acute and chronic stress in rat models[J]. J Proteome Res, 2009, 8(5):2511-2518.
- [11] Liu LS, Shenoy M, Pasricha PJ. The analgesic effects of the GABAB receptor agonist, baclofen, in a rodent model of functional dyspepsia[J]. Neurogastroenterol Motil, 2011, 23(4):356-361.
- [12] Di Stefano M, Miceli E, Tana P, et al. Fasting and postprandial gastric sensorimotor activity in functional dyspepsia: postprandial distress vs. epigastric pain syndrome[J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(10):1631-1639.
- [13] 刘晶,李峰,唐旭东,等. 功能性消化不良中医辨证及辨证标准的现代临床文献研究[J]. 世界中医药,2015,(1):56-59.

(收稿日期:2015-03-11)

(本文编辑:蒲晓田)