

·基础研究·

本文引用:白辰,郑子安,徐竞男,万宇翔,王云辉,于河,刘铁钢,谷晓红.食积胃肠积热动物模型的探索与评价[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):125-129.

食积胃肠积热动物模型的探索与评价

白辰,郑子安,徐竞男,万宇翔,王云辉,于河,刘铁钢*,谷晓红*
(北京中医药大学中医学院,北京 10029)

[摘要] **目的** 探索高热量饲料灌胃大鼠制备食积胃肠积热动物模型的方法,并对其进行评价。**方法** 将幼龄SD大鼠分为正常组与模型组,采用高热量饲料灌胃的方法建立食积胃肠积热模型。采集大鼠宏观表征,检测代谢指标,进行食积胃肠积热的诊断及考证;取大鼠结肠组织,做HE染色,观察大鼠肠组织炎症情况,并以免疫组化法观察大鼠结肠NF- κ B p65的表达。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠体态消瘦、体质量增加缓慢、攻击性较强、饮食量降低($P<0.01$)、排便时间有延长趋势($P>0.05$)、排便量降低($P<0.01$);病理示大鼠结肠黏膜层变薄,杯状细胞数量减少,黏膜下固有层局部充血、水肿、纤维增生,结肠黏膜NF- κ B p65呈弥漫性分布,为深棕黄色粗颗粒,有向固有层扩散趋势。模型表征与小儿食积临床诊断要点具有一定符合度,符合食积胃肠积热成模标准。**结论** 高热量饲料灌胃大鼠制备食积动物模型符合中医学胃肠积热特点。

[关键词] 食积;胃肠积热;高热量饲料;模型制备;模型评价

[中图分类号] R965.1;R272

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.003

Establishment and Evaluation of Dyspeptic Model Animals with Accumulated Heat in Stomach and Intestine

BAI Chen, ZHENG Zian, XU Jingnan, WAN Yuxiang, WANG Yunhui, YU He, LIU Tiegang*, GU Xiaohong*
(School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To establish and evaluate the dyspeptic animal model with accumulated heat in stomach and intestine by administrating a high calorie diet. **Methods** The young SD rats were divided into the normal group and model group. Dyspeptic animal model with accumulated heat in stomach and intestine was established by administrating a high calorie diet. The diagnosis and research of dyspeptic animal model with accumulated heat in stomach and intestine were assessed by collecting the macroscopic characterization and detecting the metabolic index. Colon tissue was measured by HE staining, and the expression of NF- κ B p65 in colon tissue was observed by immunohistochemistry to evaluate the intestinal inflammation in rats. **Results** Compared with the normal group, the rats in the model group were thinner, slower in weight gain, more aggressive, with less intake food ($P<0.01$), prolonged defecation time ($P>0.05$) and decreased defecation amount ($P<0.01$). Pathology showed that the colonic mucosa of rats became thinner and the number of goblet cells decreased. Local hyperemia, edema and fibrous hyperplasia were observed in the submucous lamina propria. The expression of NF- κ B p65 in the colonic mucosa was diffusely distributed, with a deep brown and coarse grain, and a diffusion trend to the lamina propria. The model characterization was consistent with clinical diagnosis of infantile dyspepsia, which fitted the standard of dyspeptic animal model with accumulated heat in stomach and intestine. **Conclusion** The method of administration with a high calorie diet can successfully establish the dyspeptic animal model with accumulated heat in stomach and intestine, which is in accordance with the characteristics of TCM.

[Keywords] dyspepsia; accumulated heat in stomach and intestine; high heat fodder; model preparation; model evaluation

[收稿日期] 2017-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金(81403328);北京中医药大学基本科研业务费自主选题(2017-JYB-XS-001)。

[作者简介] 白辰,男,在读博士研究生,主要从事温病学辨治思路指导临床相关热证的研究。

[通讯作者] *谷晓红,女,教授,博士研究生导师,E-mail:Guxh1003@126.com; *刘铁钢,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:liutiegang2009@163.com。

食积,又称积滞,指小儿内伤乳食,积而不化所形成的一种胃肠疾患,是临床儿科常见疾病。该病以患儿不思乳食,脘腹胀满,嗳气酸腐,大便溏薄或秘结酸臭为特征^[1]。胃肠积热是无形热邪或有形热结壅于胃肠,而致胃肠气分热盛的证态,常见于小儿食积。

中医动物模型的确立是中医药理论研究、药效评价的前提条件,是现代中医药事业发展的重要环节^[2]。既往对小儿食积胃肠积热模型的研究仅限于小鼠,操作具有一定难度,取材量较少,同时模型缺少系统评价。本研究利用幼龄大鼠探索小儿食积胃肠积热模型的复制方法,以期为食积证候模型进行有意义的探索,为中医药防治食积的进一步研究提供良好的实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级健康SD大鼠30只,雄性,3周龄,体重(110±10)g。由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,质量合格证号:11401500008911,许可证号:SCXK(京)2011-0004。动物饲养室采用自然光照,温度为20~25℃,空气湿度保持于50%~60%。

1.2 实验饲料

常规饲料为SPF级普通大鼠维持饲料。高热量饲料为由白糖(购自市场)、奶粉(伊利全脂奶粉,购自市场)、猪脂膏(即板油,购自市场)按质量2:1:2配制而成,每150g饲料加入20mL蒸馏水搅拌为乳糜液。4℃保存,使用前100℃水浴加热,静置恢复到室温。

1.3 实验药品

NF-κB p65一抗,购自沈阳万类生物科技有限公司。山羊抗大鼠IgG,中杉金桥生产,购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。印度墨水,批号:120G021,购自北京索莱宝科技有限公司。

1.4 实验仪器

X53正置智能型显微镜及采集系统,奥林巴斯生产。

2 方法

2.1 分组

大鼠适应性喂养3d后,随机分为2组:正常

组10只、模型组20只。

2.2 造模

模型组大鼠不予常规饲料,每次灌胃高热量饲料5mL,早中晚每日3次,每次间隔6h,自由饮水。正常组大鼠予常规饲料,自由饮水。第7天造模结束后,去除正常饲料。

2.3 取材

造模结束24h后,断头处死各组大鼠,取结肠,生理盐水中洗净,置于25%福尔马林溶液中,4℃保存。

2.4 指标检测

2.4.1 大鼠形态变化 观察并记录大鼠毛色、大便颜色、大便性状、小便颜色、活动度。每日称量大鼠,记录体质量。

2.4.2 造模后体质量、进食量、饮水量 造模结束第2日晨,各大鼠分笼饲养,均予正常饲料,自由饮食水,称量并记录24h内大鼠体质量、进食量、饮水量变化。

2.4.3 造模后排便量、排便时间、粪便含水量 造模结束第2日晨,各大鼠予1mL/100g印度墨水灌胃,观察并记录各大鼠首粒黑便出现时间,收集并称量24h内各大鼠新鲜排便量。将新鲜粪便于室温通风下静置,干燥后称质量,以(新鲜粪便质量-粪便干燥后质量)/粪便干燥后质量为单位粪便内含水量。

2.4.4 造模后各指标系数 以造模后24h观察指标除以造模后体质量,为各指标系数。分别计算质量变化系数、进食量系数、饮水量变化系数、排便量系数。

2.4.5 大鼠结肠组织病理 取大鼠结肠组织,做石蜡切片,HE染色后,光镜下观察结肠组织炎症改变情况。

2.4.6 大鼠结肠组织NF-κB p65蛋白的表达 常规脱腊,封闭内源性过氧化物酶,10%正常山羊血清封闭。滴加一抗(1:100),即抗NF-κB p65蛋白多克隆抗体,37℃孵育1h,PBS溶液冲洗;滴加二抗生物素化山羊抗大鼠IgG,室温20min,PBS溶液冲洗;滴加SABC复合物,室温20min,PBS溶液冲洗;DAB-H₂O₂显色,苏木素轻度复染;乙醇脱水、透明、中性胶封片,选取同批染色切片进行显微镜观察。用Cellsens Standard系统进行拍摄,用ImageJ

软件进行免组分析,视野内深棕黄色粗颗粒即为目标蛋白。

2.5 食积胃肠积热判定标准

参考文献[3]和方肇勤主编的《大鼠/小鼠辩证论治试验方法学》^[4],从大鼠的表征诊断食积胃肠积热,动物模型需同时具备如下标准:(1)饮食量降低、腹围增大、体质量增加缓慢,2项或以上;(2)大便间隔长、大便粒数减少、大便含水量降低、粪便中检出淀粉颗粒和脂肪球、大便不成形、大便黄臭,2项或以上;(3)眵多黄浊、肛门污秽、小便色黄,2项或以上;或舌(爪、尾、吻、耳)偏红、舌红点、目赤、齿龈红肿、小便色赤、肛门红肿,2项或以上。

2.6 统计学方法

计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,正态分布的资料采用独立样本 t 检验;非正态分布的资料采用非参数检验。所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件包分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠形态变化

正常组大鼠毛色同造模前,体态均匀,大便黑褐色,小便淡黄色,平均体质量逐渐增加,性情较温顺。与正常组相比,模型组大鼠毛色较黄略蓬乱,体态消瘦体质量增加较慢;第2日起大便颜色较浅,质地粘、较松散、可见不成形便,第4日起逐渐出现干硬大便;小便黄色;第3日起舌红、精神萎靡,第4日起出现攻击性较强。体质量变化见图1。

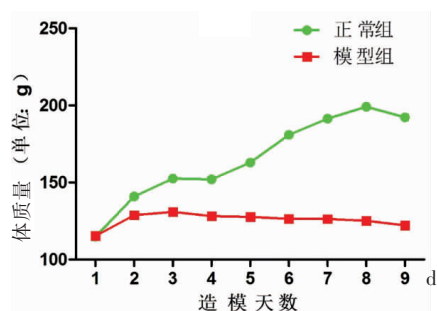


图1 造模前后大鼠体质量变化

3.2 造模后24 h内大鼠体质量、进食量、饮水量

如表1所示,与正常组相比,模型组大鼠造模后24 h内体质量变化高于正常组,差异无统计学意义($P>0.05$);24 h内进食量低于正常组,差异具有统计学意义($P<0.01$);24 h内饮水量低于正常组,差

异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 造模后24 h内大鼠体质量及进食、饮水情况 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	代谢基础指标		
		体质量/g	进食量/g	饮水量/mL
正常组	10	16.08±4.45	24.40±2.07	48.48±5.92
模型组	20	17.58±4.49	13.81±2.67**	45.25±15.11
F/Z		-0.418	0.205	2.376
P		0.676	0.000	0.522

注:与正常组相比,** $P<0.01$ 。

3.3 造模后大鼠排便时间、24 h内排便量、粪便含水量

如表2所示,与正常组相比,模型组大鼠造模后排便时间高于正常组,差异无统计学意义($P>0.05$);24 h内排便量低于正常组,差异具有统计学意义($P<0.01$);24 h内粪便含水量高于正常组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表2 造模后24 h内大鼠排便情况 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	排便时间/min	排便量/g	粪便含水量/mL·g ⁻¹
正常组	10	294.40±48.24	6.93±1.19	1.28±0.38
模型组	20	324.75±48.86	3.82±0.74**	2.04±1.03**
F/Z		-1.679	4.941	-2.663
P		0.093	0.000	0.008

注:与正常组相比,** $P<0.01$ 。

3.4 造模后大鼠体质量、进食量、饮水量、排便量系数

如表3所示,与正常组相比,模型组大鼠造模后24 h体质量改变量与体质量的比值增加,差异具有统计学意义($P<0.01$);24 h内进食量与体质量的比值降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);24 h内饮水量与体质量的比值增加,差异具有统计学意义($P<0.01$);24 h内排便量与体质量的比值降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表3 造模后大鼠各指标系数 ($\bar{x}\pm s$)

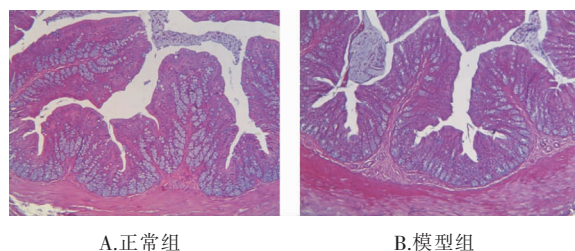
组别	n	体质量系数	进食量系数	饮水量系数	排便量系数
正常组	10	0.084±0.023	0.127±0.011	0.253±0.338	0.036±0.006
模型组	20	0.145±0.041**	0.113±0.019*	0.370±0.129**	0.031±0.0069*
F/Z		-4.047	1.257	-3.608	0.056
P		0.000	0.039	0.000	0.036

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.5 造模后大鼠肠道病理

正常组大鼠结肠黏膜完好,无炎细胞浸润及溃疡,黏膜上皮完整、连续、腺体排列规则、结构清楚、分泌功能活跃、黏膜下固有层内血管纤维内质正常,

肌层无异常。模型组大鼠黏膜层变薄,杯状细胞数量减少,黏膜下固有层局部充血、水肿、纤维增生。见图2。

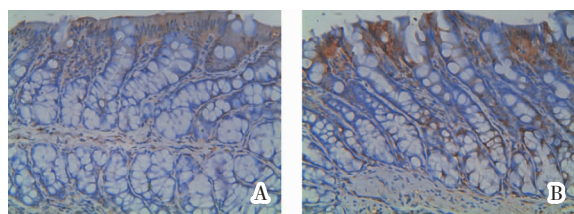


A.正常组 B.模型组

图2 大鼠结肠光镜图(HE,×100)

3.6 造模后大鼠肠道 NF-κB p65 蛋白的表达

正常组大鼠结肠黏膜仅在上皮层有 NF-κB p65 表达,模型组大鼠结肠黏膜 NF-κB p65 呈弥漫性分布,为深棕黄色粗颗粒,有向固有层扩散趋势。见图3。



A.正常组 B.模型组

图3 大鼠结肠 NF-κB p65 光镜图(免疫组化,×400)

4 讨论

小儿脏腑娇嫩,胃肠薄弱。随着现代生活水平的提高,加之家长对儿童爱护有余,造成小儿过多摄入高热量食物。小儿饮食失节,则难以正常消化吸收,易形成积滞壅于胃肠^[5]。中医学将胃肠归属于阳明范畴,包括足阳明胃和手阳明大肠。胃肠积热临床表现为易头汗出、手足心热、口中异味、烦躁易怒、夜间磨牙、小便黄、大便干、舌红苔厚、脉滑或脉数等。高热量食物的摄入,促使胃肠积热的患儿在临床上愈加常见,并导致多种疾病的发生和发展。构建符合中医规律的食积胃肠积热模型具有重要临床意义。

4.1 模型的制备

模拟中医传统病因造模存在稳定性、可靠性和可重复性差的问题,而模拟西医病因病理造模存在难以真实反应证候特点的问题。中医动物模型的确立,需要通过临床调查研究、选择有密切联系的疾病和证候,即寻找两者在临床的结合点,分别或同时复

制两者特征用于观察研究的模型动物^[6],即“病证结合”法造模。由于“食积”是中医的病名,在西医中无完全等同的疾病,因此本研究采用“中医传统病因”+“西医病理”的造模方法,在前期研究基础上,用高热量食品干预(中医病因)+体征和肠道病理验证(西医病理)的方法制备模型。

根据团队前期横断面研究^[7]结果显示,对275例胃肠积热患儿饮食规律进行分析,牛肉、鸭肉等肉类食品以及饼干等零食与胃肠积热的发生呈正相关,而蔬菜、水果、豆腐类为保护性因素。

大鼠常规维持饲料,由谷物为主制备而成,根据2001年颁布的《中华人民共和国国家标准-实验动物大鼠小鼠配合饲料》,其常规营养成分以粗蛋白、粗脂肪、粗灰分等为主。团队前期参照相关文献,制定了由奶粉:豆粉:鱼松:面粉=1:2:1:1的小鼠食积饲料^[8]。但既往研究,发现存在着特制饲料与临床关系不紧密、动物自由饮食不稳定、取材量少等问题。

因此,本研究以大鼠为实验对象,以灌胃为实验方法,避免了自由饮食不稳定、需要动物进行造模结束后剔除的问题。同时,结合实验动物的饮食特点和前期临床、实验研究基础,改变饲料成分,增加肉类、脂类、糖类食品,即增加蛋白质、脂肪、糖分等含量。将高热量饲料营养换算为百分比,与常规饲料营养对比,见表4。适应性饲养期间,大鼠每日饮水量在15 g/只左右,因此拟定灌胃量为15 mL/(只·d⁻¹),为避免短时间内单次大容量灌胃对胃的刺激,遂分3次进行。考虑大鼠的自愈性及鼠龄,遂以前期研究^[9-10]为基础,造模时间拟定为1周。由于采用的是3周龄已断奶幼鼠,以确定食积饲料和造模方法为目标,为避免雌激素的影响,以雄鼠为研究对象。

表4 大鼠维持饲料与高热量饲料常规营养成分对比

	常规饲料*	高热量饲料
kcal/100g	360.1	524.62
水分/%	≤10	11.8
蛋白质/%	≥18	4.188
脂肪/%	≥4	36.33
纤维/%	≥5	0
灰分/%	≤8	0.035
钙/%	1.0~1.8	0.1654
磷/%	0.6~1.2	0.0063

注:* 常规饲料为粗蛋白质、粗脂肪、粗纤维、粗灰分。

对比可知,高热量饲料的蛋白质、纤维含量低于常规饲料,而能量和脂肪含量高于常规饲料,其他成

分基本满足大鼠正常生理需求。此造模方法模拟了临床小儿食积的病因,其食积饲料中供吸收的营养成分,明显低于正常维持饲料,符合疾病的发生规律。在临床上,小儿食积是一个长期且复杂的过程,除饮食因素外,尚包括儿童脾胃功能、每日活动量等影响因素,因此有待在此基础上进一步研究。

4.2 模型的评价

包括病因、病性、病位等内在的证态,会在体表表现出来,即“有诸内必形诸外”。成功的中医证候模型必须满足两个条件:一是拟定的干预因素应是所造证候的主要影响因子,二是采用的拟定干预因素所致的病理变化应当是所造的证候^[1]。而实验用大鼠存在着与人类类似的个体差异、证候及其演变^[2]。所以应在中医病因造模方法下,根据临床中医证候诊断标准,结合大鼠的生理、病理特点,尽量选择客观、准确的体征作为动物模型疾病、证型的诊断要素。

小儿食积以不思乳食、食而不化、脘腹胀满、暖气酸腐、大便溏泄或便秘等为临床特征,可伴有烦躁不安,夜间哭闹等症状。经过造模后,观察大鼠一般情况、测定体质量、饮食饮水量、排便情况,发现模型组大鼠第2日起出现体态消瘦、体质量增加缓慢、舌红、攻击性较强、饮食量降低、排便时间延长、排便量降低,与小儿食积临床诊断要点具有一定符合度,符合食积胃肠积热成模标准。病理及免疫组化显示,模型动物肠道病理出现一定炎症性改变,其程度较炎症性肠病低^[13-14],符合儿童食积胃肠积热形成过程隐匿、临床表现不重的特点。

综上所述,本研究在前期临床流行病学调查的基础上,未叠加其他证候造模因素的条件下,采用“中医单因素病因+西医病理验证”方法造模,利用高热量饲料建立大鼠幼鼠食积模型胃肠积热。该模型在病因及症状上与小儿食积临床特点具有一定相似性,此法对于相关疾病的研究具有一定的参考性。

值得注意的是,此研究着眼于与临床相符的食积饲料对动物的影响,遂只设立了空白组和模型组,后期需进一步对不同成分高热量饲料的对比、药物反证、不同动物性别等进行进一步探索,同时以经典方剂进行药物反证,完善多角度、多层次、多方位、多指标相结合的检测证明^[15],使该模型发挥更大的价值。

参考文献:

- [1] 汪受传.中医儿科学[M].北京:中国中医药出版社,2010:15,110.
- [2] 李晓娟,白晓辉,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.
- [3] 毕可恩,刘爱华,朱富华,等.食积动物模型建立及中药治疗观察[J].山东中医学院学报,1990,14(2):71-72.
- [4] 方肇勤.大鼠/小鼠辨证论治实验方法学[M].北京:科学技术出版社,2009:100.
- [5] 于河.肺热证与阳明热证的相关性研究[D].北京:北京中医药大学,2006.
- [6] 彭岳,苗维纳,赵铁建,等.中医证结合肝纤维化动物模型的研究概况[J].世界华人消化杂志,2014,22(27):4053-4059.
- [7] 董斐.胃肠积热与小儿肺炎喘嗽的相关性研究[D].北京:北京中医药大学,2016.
- [8] 张望,于河,刘铁钢,等.银莱汤对食积复合流感病毒感染小鼠免疫功能的影响[J].北京中医药大学学报,2014,37(8):543-547.
- [9] 李晓菲,王云辉,甄建华,等.银莱汤对食积复合FM1流感病毒感染小鼠黏膜免疫的影响[J].吉林中医药,2017,37(06):596-600.
- [10] 王云辉,李晓菲,甄建华,等.银莱汤对食积复合FM1流感病毒感染小鼠血清免疫球蛋白及细胞因子含量的影响[J].环球中医药,2016,9(10):1180-1184.
- [11] 时文远,施斌,袁朵,等.建立中医动物模型的思考[J].中医学报,2015,30(1):65-67.
- [12] 方肇勤.辨证论治实验方法学-实验小鼠诊法与辨证[M].上海:上海科学技术出版社,2006:4.
- [13] 范恒.溃疡性结肠炎大鼠实验模型的建立与评价[J].中医学刊,2004,22(5):865-866.
- [14] 刘一品,李延青.核因子- κ B的表达在溃疡性结肠炎发病机制中的意义[J].胃肠病学,2006,11(2):103-106.
- [15] 卢竹林,胡志希,李琳,等.“以方测证”法在动物模型研究中的运用[J].湖南中医药大学学报,2017,37(5):570-573.

(本文编辑 杨 瑛)