

便秘动物模型的研究进展

刘井如^{1,2}, 季宇彬¹, 陈明苍^{2*}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所博士后科研工作站, 哈尔滨 150076;
2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

[摘要] 对便秘动物模型的造模方法进行全面分析和归纳。以便秘、动物模型等关键词,检索了中国学术期刊网络出版总库、Springer 期刊数据库,得到相关文献 86 篇,通过甄别、遴选,采纳 24 篇为参考文献。总结了小鼠、大鼠、家兔、猕猴、雪貂便秘模型的造模方法及每种方法的特点和适用范围。便秘动物的造模方法多样,但便秘模型的制作和观测指标缺乏深度,有待充分利用现代生化、分子、细胞等检测技术深入探寻便秘机制,使便秘模型的设计思路与临床便秘的病机相符,力求找到评价特定便秘模型成功标准,以利于便秘动物模型的创新性研究和通便药物的研发。

[关键词] 便秘; 动物模型; 药理学

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0353-04

Advances of Pharmacological Researches in Constipation Animal Model

LIU Jing-ru^{1,2}, JI Yu-bin¹, CHEN Ming-cang^{2*}

(1. Research Center of Life Science and Environmental Science, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai 201203, China)

[Abstract] The methods of building constipation models were analyzed and summarized completely. With constipation, animal models as key words, China Academic Journal Network Publishing Database and Springer Link were retrieved. Relevant 86 references were get. 24 articles for reference were adopted through screening. This paper reviewed the methods of building constipation models in the rats, mice, monkeys, rabbit and ferret, and summed up the characteristics and applicable range of each method. The making methods of constipation model were various, but that methods and observation index of constipation models were not in - depth. Detection technology of modern biochemical, molecular and cellular should be used for exploring constipation mechanism. The design thoughts of the models should conform to clinical constipation pathogenesis, and then the evaluation standards of specific constipation model should be found, that can provide convenience for the innovative research of constipation models and research and development of treating constipation medicines.

[Key words] constipation; animal model; pharmacology

便秘是大便秘结不通,排便时间延长,或欲大便而艰涩不畅的一种病证。便秘虽然不会直接致命,但它是引起很多疾病的间接原因,是身体提早衰老的一种表现。长期的便秘,会因为体内产生的有害物质不能排除而引起腹胀、口臭、食欲减退和易怒等自体中毒症状。便秘有时是诱发心肌

梗死、脑出血等严重病症的潜在原因,慢性便秘也是结肠癌的危险诱因,其防治不容忽视。然而国内便秘模型或抗便秘药物研究力量相对弱小,模型制作与观测指标研究缺乏深度,从而影响了抗便秘药物的研发。作者对动物便秘模型的研究方法进行整理,以期对便秘动物模型的进一步研究提供参考。

1 小鼠便秘模型的造模方法

1.1 失水燥结型便秘模型 该模型的造模方法^[1-2]是选用健康小鼠,禁水不禁食 72 h。造模成功后小鼠外观干瘪瘦小,稍有竖毛,活动少,尿色深黄,体重下降 3 g 以上。大便干结成圆珠状,含水量由正常平均值 60% ~ 70% 下降为 30% ~ 40%。解剖见粪粒积结在结肠,呈圆珠状或串珠状,

[收稿日期] 20120517(015)

[基金项目] 国家科技重大专项(2009ZX09301-001)

[第一作者] 刘井如,研究生,从事中药药理研究, Tel: 14782993869, E-mail: ljru689@126.com

[通讯作者] * 陈明苍,从事中药药理研究, E-mail: baidulyac@126.com

空肠、回肠内内容物少。该模型制备简单,成功率高。但禁水不禁食 72 h 违反实验动物伦理要求,值得商榷。

1.2 甲状腺素 + 利血平 + ^{60}Co 照射便秘模型 甲状腺素可使机体代谢加快,利血平抑制肾上腺素能神经功能,耗竭耗竭周围交感神经末梢的肾上腺素,交感神经的功能受到遏制,副交感神经的功能相对占优势,两者并用可加速机体阴虚。 ^{60}Co 照射可损害血液系统致血流滞缓。蔡光先等^[3] 每天给每只小鼠灌胃 3 mg 甲状腺素和 0.02 mg 利血平,连续 7 d。第 6 天子 ^{60}Co 放疗机以 100 RAD 对小鼠进行照射致微循环障碍,微血管渗出性和出血性改变,并禁水 1 d。第 7 天,各造模组小鼠表现出体重下降、心率增快、躁动不安、饮水增加、唇舌暗紫、粪便干结量少等便秘症状。

1.3 脾虚型便秘模型

1.3.1 食醋 + 活性炭冰水法 王岚等^[4] 根据“味过于酸,肝气以津,脾气乃绝”的中医理论,通过喂饲山西白醋和 0℃ 活性炭冰水复制小鼠阳虚便秘模型,具体方法:首剂量按 0.3 mL/只灌胃给醋,第二天起按 0.01 mL·g⁻¹ 剂量给醋,连续 9 d;自第 7 天起,给醋的同时按 0.04 mL·g⁻¹ 给予 10% 的 0℃ 活性炭冰水,连续 3 d。结果模型小鼠的首粒排黑便时间延迟、3 h 内排黑便粒数减少、肠推进率降低,与临床阳虚便秘的某些症状相似。该模型复制简便,但模型复制过程中小鼠的死亡率较高,造模时应适当增加样本量。

1.3.2 饥饱失常 + 过度疲劳 + 失水燥结法 郑学宝等^[5] 对小鼠先采用隔天进食致饥饱失常,并每天游泳 2 次,每次 5 min 致过度疲劳,连续 12 d,造成实验小鼠的脾虚状态,然后从第 13 天开始禁水仅以大米喂养,连续 3 d 以造成失水燥结,结果小鼠出现了皮松毛竖、缺乏光泽、活动减少、消瘦、小便不黄等脾虚和大便干结的表现,具有脾虚便秘的特征。

1.3.3 番泻叶泄泻 + 饥饱失常 + 限制饮水法 第 1~7 天用番泻叶按 0.8 mL·d⁻¹ 给小鼠灌胃,正常饮食饮水,造成脾虚状态。第 8 天起停用番泻叶,隔天喂低纤维饲料生大米 4~8 g,自由饮水 1 次,每次 0.5 h,造模时间共 15 d。造模成功后,小鼠外观干瘦、瘦小、竖毛、拱背、活动减少,体重减轻,大便干结、数量减少、颗粒细小;解剖见大便集结在结肠,呈球状或串珠状,空肠、回肠无明显粪便残留;肠道推进率和血清 D-木糖水平降低^[6]。

1.4 药物型便秘模型

1.4.1 硫糖铝法 硫糖铝广泛用于治疗胃、十二指肠溃疡及胃炎,但其致便秘的副作用也颇受重视。陈芳等^[7] 利用这一性质,按 2.08 g·kg⁻¹ 给小鼠灌胃,每天 1 次,连续 3 d,结果小鼠首次排便时间延迟、排便粒数明显较少,肠道推进运动减弱,水分吸收增加。该模型操作简便,有助于深入研究便秘的发生机制。

1.4.2 复方地芬诺酯法 复方地芬诺酯(DC)能加强肠张力,抑制肠蠕动,使肠内容物通过延迟,肠内水分吸收增加,造成动物排便减少。万锦州等^[8] 将小鼠禁食 12 h 后,按 50 mg·kg⁻¹ 一次灌胃给予 DC,结果模型小鼠排便粒数显著减少。该模型极易操作,有利于快速筛选具有潜在通便作用

的药效物质。

1.4.3 吗啡法 许海尘等^[9] 按 2.5 mg·kg⁻¹ 的剂量每日给小鼠皮下注射盐酸吗啡 1 次,连续 45 d,结果小鼠每天平均粪便质量减轻,肠道推进率减低,c-kit 阳性细胞面积比减少,该模型适合研究与阿片受体和肠道 Cajal 细胞相关的慢传输型便秘(STC)的发生机制。

2 大鼠便秘模型的造模方法

2.1 限水型便秘模型 王朝晖等^[10] 连续 5 d 测每只大鼠的日饮水量及大便量,取大鼠正常每日饮水量均数,于第 1,2 天分别给前 5 d 平均水量的 1/6,第 3~6 日给 1/3,取整数值。给水时间为上午 8:00 和晚上 10:00,结果模型大鼠出现粪便干燥如豌豆样圆珠状便秘表现。该模型适用于功能性便秘的发生机制和通便药物的治疗作用研究。

2.2 冰水型便秘模型 朱军等^[11] 以 2 mL/只的量给大鼠灌胃冰水(0~4℃,生理盐水),1 次/d,共 14 d,正常饲食、饮水。结果显示:经 2 周的冰水灌胃刺激,模型大鼠 24 h 粪便粒数减少,质量减轻,小肠墨汁推进率显著低于正常对照组。冰水灌胃组大鼠的肠功能紊乱表现可保持至灌胃结束后 2 周,表明反复冰水灌胃对肠道运动、分泌和转运时间的影响持续时间较长,该模型具有很好的稳定性。

2.3 食醋 + 活性炭冰水型便秘模型 大鼠每天上午 8:00 灌胃给予山西白醋,首剂量 5 mL/只,第 2 天起即按 3 mL/200 g 体重给醋,给醋 2 h 后,每鼠按 5 mL/200 g 体重灌胃给予 16.67 mol·L⁻¹ 0℃ 活性炭冰水,连续 9 d。结果模型动物的首粒排便时间明显延迟,6 h 内排便粒数明显减少,结肠收缩频率明显降低、结肠收缩幅度减弱,胃肠激素、肠神经递质分泌紊乱。该模型具有重复性好,复制简单、实用、经济、自然恢复较慢等优点^[12]。

2.4 低纤维饮食便秘模型 用低纤维饲料(41.5% 的玉米淀粉,24.5% 的牛奶酪蛋白,10.0% 蔗糖,10.0% 糊精,7.0% 的矿物质,6.0% 的玉米油,1.0% 维生素)连续饲喂大鼠 5 周,结果模型组的粪便质量、粪便含水量相对于正常饮食组显著降低,此便秘模型的造模方法简单,易于操作,可用于与结肠功能失调相关的致便秘机制研究^[13]。

2.5 出口梗阻性便秘动物模型 吴先哲等^[14] 采用直肠部分缩窄法造模,将大鼠麻醉后,开腹暴露直肠,10 号丝线经腹壁从距肛门 1~1.5 cm 处“8”字形从直肠下绕过再经腹壁引出,丝线引入点和引出点在腹壁相距约 0.5 cm。在引出的丝线内套入直径为 0.5 cm 的铁丝打结,退出铁丝后,直肠被部分缩窄并悬吊于腹壁,但肠壁血运正常。关闭腹腔,大鼠苏醒后予正常饮食。造模后大鼠无排便,直肠结扎线以上密集地存积坚硬的粪便,肠管明显扩张充血。大鼠血浆内皮素(ET)水平和血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量较正常组显著升高,与临床出口梗阻性便秘患者的某些症状相似。

2.6 药物型便秘模型

2.6.1 洛哌丁胺法 洛哌丁胺作用于肠壁的阿片受体,阻止乙酰胆碱和前列腺素的释放,从而抑制肠蠕动,延长肠内容物的滞留时间致便秘。于每日 9:00 和 18:00 给大鼠皮下

注射洛哌丁胺($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)2次,连续5 d。造模后,大鼠的摄食量、粪便排出量显著降低,肠内粪便量约是对照组的2倍,盲肠和结肠的粪便量重于对照组,粪便含水量较对照组少5%~10%。腺上皮细胞含黏液与黏膜表面黏液均较少,粪便表面的黏液层较薄,表明洛哌丁胺引起便秘使腺上皮细胞黏液的产生减少,该模型的研究有助于探讨抗便秘药物的作用机制^[15]。

2.6.2 复方苯乙哌啶法 复方苯乙哌啶直接作用于肠道平滑肌使肠道蠕动减慢致便秘,刘海峰等^[16]用含复方苯乙哌啶的饲料饲喂大鼠,给药剂量为 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,连续喂养120 d。结果模型大鼠首粒黑便排出时间显著延长,结肠慢波出现双向改变,部分大鼠结肠慢波频率明显减慢,振幅增加,波形仍表现为不规则的近似正弦波样曲线;部分大鼠结肠慢波频率出现快速性改变,振幅强弱不等,波形较不稳定,且出现基线位移,与便秘患者具有相似的临床症状和病理生理改变。该模型简单经济,可重复性强,但造模时间较长。

2.6.3 小檗碱诱导便秘模型 小檗碱属异喹啉类生物碱,是一种抗菌消炎的常用药,临床治疗发现,长期服用小檗碱有致便秘的现象。我们以 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量连续给大鼠灌胃盐酸小檗碱14 d后,与空白组比较,大鼠的首次排黑便时间延长、6 h内排便粒数减少、粪便含水量降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),便秘模型建立。该模型造模时间较短,原料易得,操作简单,可用于肠管炎症引起的器质性便秘的研究^[17-18]。

2.6.4 药物依赖性便秘模型 具体方法为:不禁食,限水,致大鼠形成便秘;然后用大黄、酚酞灌胃给予治疗,起始剂量为每天 $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,按每天 $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 递增,至约半数以上动物出现稀便时,再维持此剂量不变,使大鼠对药物产生依赖,再逐渐停止限水,大黄最终用量 $3.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,酚酞最终用量 $4.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,再以此剂量饲养3个月,结果与正常对照组比较,各模型组小肠推动率减慢,首例大便排出时间延长,排便量少,大便内酚红含量减少,模型建立成功,该模型可重复性强,有助于研究临床上由于长期服用泻药引起的药物依赖性便秘^[19]。

3 家兔便秘模型的造模方法

3.1 吗啡法便秘模型 家兔喂饲料前以 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 皮下注射吗啡,以抑制摄食后2.5 h内自然排便湿重增加。喂饲料后即灌服实验药物,收集食后2.5 h内粪便,计算粪便含水量。吗啡 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 显著抑制摄食后2.5 h内粪便湿重为对照组的37.5%,粪便含水量无变化,红霉素A衍生物(GM-611) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌服2.5 h内抑制吗啡便秘模型的粪便湿重减少,所有粪便成形或软便,无动物出现腹泻,不增加粪便含水量。证明吗啡便秘模型有很好的适用性^[20]。

3.2 顽固性便秘模型 模型组家兔麻醉成功后,四肢分别固定在兔子解剖台上,完全暴露家兔肛门部。用小三角针在“模具”(自行制作)的敞开端分别缝上4根“4”号线,距离边缘约0.2 cm,4根线拉直后呈“十”字形,应仔细检查4根线避免之间有交叉。用4针分别固定于直肠正中线2侧,

左右各两针,使模具圆锥形的封闭端固定于直肠前壁上。上2针距离肛门缘约2 cm,下2针距离肛门缘约0.8 cm(至少0.5 cm),均在肛门括约肌以上。仔细打结固定,检查模具的位置,一定使封闭端顶在直肠前壁上。1个月后形成直肠前突后取出,再饲养2个月。结果模型组家兔大便粒数及大便质量明显减少,结直肠总长度变长,胃肠传输时间增加,与对照组比较差别有显著的统计学意义。该实验模型简单可靠,重复性强,符合便秘的发病过程^[21]。

4 猕猴便秘模型的造模方法

三环类抗抑郁药阿米替林通过抑制去甲肾上腺素与5-羟色胺(5-HT)再摄取,下调去甲肾上腺素与5-HT受体产生抗胆碱作用而引起猕猴便秘。其方法是:雄性猴上午9时经鼻胃管饲5%阿拉伯胶阿米替林混悬液($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),给药1 h后喂饲料150 g,观察症状。猕猴给药后4 h出现蹲伏位,至24 h后恢复正常,无排便,而对对照猴频繁排便。该便秘模型适用于评价泻药的抗便秘作用^[22]。

5 雪貂便秘模型的造模方法

正常雄性雪貂的排便类型为摄食后3~5 h自然排便频率增加,溴莫尼定和吗啡均可抑制胃肠转运致便秘。雪貂摄食后1.5 h后,皮下注射吗啡 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,或溴莫尼定 $3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以抑制摄食后排便频率增加,摄食后3 h口服实验药物观察排便频率和收集2 h粪便,以干湿粪便质量差估计含水量。结果显示,摄食后1.5 h给溴莫尼定剂量依赖地抑制摄食后3~5 h内排便量,而粪便中含水量无显著改变,吗啡剂量依赖地降低排便频率和粪便含水量^[23]。该模型有助于研究肠道平滑肌功能紊乱引起的便秘。

6 展望

众所周知,动物模型的作用在于模拟临床病证特点,其与临床病证的相似程度往往决定其模型作用的价值。若要充分发挥动物模型的作用,必须使造模的病因病机设计与医学理论和临床实践密切参照。便秘有功能性便秘、急性器质性便秘、顽固性便秘等不同类型^[24]。便秘模型的设计思路力求与临床便秘的病机相符,完善和创新造模方法,并将特定便秘类型的临床症状与造模动物的症状进行相关性比较,力求找到评价特定便秘模型成功的标准。便秘模型造模成功后,应充分利用现代生化、分子、细胞等检测技术进一步探寻便秘机制,为临床研究和新药研发提供理论基础。

[参考文献]

- [1] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1334.
- [2] ZENG Qun, ZHAO Guoyi. Experiment research of shutong capsule on defecating function with coprostitis type of dry stagnation in stomach and intestines[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 16(18): 139.
- [3] CAI Guangxian, ZHOU Bing, YU Zhengke, et al. Experimental study of bianketong tablet on intestinal

- kinetics of mice with functional constipation of yin deficiency and blood stagnation[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2004, 12(3): 149.
- [4] WANG Lan, PENG Cheng, GUO Li. Experimental study on compatibility of radiet rhizoma rhei and radix aconiti lateralis praeparata in mice or rats with constipation of yang-deficiency type[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2006, 14(2): 82.
- [5] ZOU Ying, ZHENG Xuebao, DAI Shixue. Effect of Zhi Zhu Decoction on Substance P and Vasoactive Intestine Peptide Expression in the Colon of Spleen-Deficiency Constipation Mice [J]. Journal of New Chinese Medicine, 2011, 43(1): 128.
- [6] ZHOU Ying, ZHENG Xuebao, DAI Shixue, et al. Spleen asthenia caused the constipation model in mice [J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 28(1): 60.
- [7] Fang, Shi Miyang. Study on mechanism of action by constipation caused sucralfate [J]. China Pharmacist, 2004, 7(8): 601.
- [8] WAN Jinzhou, MA Jinxing, LIU Hui. A kind of simple and easy constipation model in mice[J]. Chin Pharm Bull, 1994, 10 (1): 71.
- [9] XU Haichen, LIN Lin, ZHANG Hongjie, et al. Establishment of animal model of slow transit constipation and the investigation of its mechanism[J]. J med postgraduates, 2004, 17(6): 502.
- [10] WANG Chaohui, ZHAO Tinghong, XIAO Meifang, et al. Preliminary experiment research about making constipation model in rats [J]. Modern Traditional Chinese Medicine, 2004(3): 53.
- [11] ZHU Jun, ZHAO Ke, LI Zhifu, et al. Establishment of Rat Model with Constipation-predominant Bowel Dysfunction by Intra-gastric Perfusion of Ice[J]. Chin J Gastroenterol, 2010, 15(12): 738.
- [12] PENG Cheng, WANG Lan, ZHAO XIAO Mei. Establish and evaluation on SD rats model with yang-deficiency and constipation [J]. Chi Pharma Bull, 2007, 23(3): 407.
- [13] Mamoru Kakino, Shigemi Tazawa, Hiroe Maruyama, et al. Laxative effects of agarwood on low-fiberdiet-induced constipation in rats [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010, 10: 68.
- [14] Wu Xianzhe. To construct the animal model of outlet obstructive constipation by partly coarctating the rect of rats [J]. J Colorectal Anal Surgery, 2008, 14 (4): 223.
- [15] Akira Shimotoyodome, Shinichi Meguro, Tadashi Hase, et al. Decreased colonicmucusin rats with loperamide-induced constipation[J]. Com Biochem Physiol Part A, 2000, 126: 203.
- [16] LIU Haifeng, HE Juntang, WANG Xingwei, et al. Changes of colonic myoelectric activity in a rat model of slow transit constipation[J]. Medical Journal of Chinese People's Armed police Forces, 2004, 15(12): 887.
- [17] WU Di, FAN Mingsong, LI Zhixiong, et al. The preliminary research on the rats model of constipation induced by Berberine [J]. China Medical Herald, 2011, 8(36): 62.
- [18] WANG Mingwei, WANG Xueli, XING Dongming, et al. Pharmacokinetics of Berberine in Rat Intestinal and Bile Following Intravenous Administration of Coptidis Rhizoma Extract [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16(1): 46.
- [19] WU Quansheng, WU Shuguang, ZHAO Juhua, et al. Development of Drug-Dependent Constipation in Rats [J]. Labor Ani Sci, 2007, 24(4): 70.
- [20] Sudo H, Ozald K, Muramatsu H. et al. Mitemdnal (GM-611), all orally active motilin agonist, facilitates ddecaction in rabbits and dogs without causing loose stools[J]. Neurogastrocenterol Motil, 2007, 19: 318.
- [21] Xu Aizhong, Peng Hongyun, Fang Lu, et al. Establishment of rabbit model for refractory constipation [J]. J Colorectal Anal Surgery, 2007,13(2): 65.
- [22] Tsusumik, Kishimoto S, Koshitani O, et al. Amitriptyline-induced constipation in cynomolgus monkeys is beneficial for the evaluation of laxative efficacy[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23: 657.
- [23] Ito H, Kiso T, Yuki H, et al. Investigation of the effects of YM-31636, a novel 5-HT₃ receptor agonist, on defecation in normal and constipated ferrets[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 424: 151.
- [24] LI Yan, MAO Xuming, ZHOU A'gao, et al. A Meta Analysis for Randomized Controlled Trails of Constipation Patients Treated with Traditional Chinese Medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16 (3): 207.

[责任编辑 邹晓翠]