

结肠传输颗粒诊断慢传输型便秘大鼠的实验研究

庄茜, 张彩云, 程昱, 刘茂柏* (福建医科大学附属协和医院药学部, 福州 350001)

摘要: 目的 应用洛哌丁胺建立一种大鼠慢传输型便秘模型, 并观察结肠传输颗粒在此模型中的传输情况。方法 30 只健康 SD 大鼠随机分为实验组和对照组($n=15$)。实验组连续腹腔注射洛哌丁胺 21 d, 对照组腹腔注射等剂量灭菌注射用水。对比 2 组大鼠的体质量、24 h 排便粒数、粪便湿重、干重、含水率以及口-肛传输时间。造模结束后, 将结肠传输颗粒灌胃进入大鼠体内, 通过不同时间段拍摄大鼠腹部 X 片, 观察其在大鼠体内的传输情况。结果 2 组大鼠在进食量与饮水量上差异无统计学意义; 造模结束后, 2 组大鼠在体质量上差异无统计学意义; 与对照组相比, 实验组大鼠 24 h 粪便粒数明显减少($P<0.01$), 粪便湿重($P<0.01$)、干重($P<0.05$)、含水率($P<0.01$)较对照组均显著降低, 口-肛传输时间明显延长($P<0.05$), 差异具有统计学意义; 实验组大鼠 6, 12 h 的标志物排出率均显著小于对照组。结论 通过使用洛哌丁胺成功建立了慢传输型便秘大鼠模型, 并验证了结肠传输颗粒有利于大鼠慢传输型便秘的诊断。

关键词: 结肠传输试验; 动物模型; 洛哌丁胺; 慢传输型便秘

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)12-1675-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.007

引用本文: 庄茜, 张彩云, 程昱, 等. 结肠传输颗粒诊断慢传输型便秘大鼠的实验研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1675-1678.

Experimental Study on the Diagnosis of Slow Transit Constipation Rats with Colon Transport Particles

ZHUANG Qian, ZHANG Caiyun, CHENG Yu, LIU Maobo* (Department of Pharmacy, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rat model of slow transit constipation by using loperamide, and to observe the transmission of colonic transit particle in this model. **METHODS** Thirty healthy SD rats were randomly divided into experimental group and control group. In the experimental group, loperamide was injected intraperitoneally for 21 d, and the control group was given the same amount of sterile water for injection. Body weight, the number of 24 h defecation, wet weight, dry weight, water content of faeces, and intestinal transit time were compared among two groups. At the end of the modeling, the colonic transit particles were infused into the rats, then observe its transmission in rats through performing the abdominal X-ray of rats at different times. **RESULTS** There was no significant difference in the food intake and drinking water between two groups. At the end of modeling, there was no significant difference in body weight between two groups. The number of 24 h defecation in experimental group was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$), and the difference in the wet weight ($P<0.01$), the dry weight ($P<0.05$) and water content($P<0.01$) of faeces in experimental group were significantly lower than those in control group. The gastrointestinal transit time of the experimental group was significantly longer than that of the control group($P<0.05$). The rate of discharge of colonic transit particles in experimental group in 6 h and 12 h was significantly smaller than that in control group ($P<0.05$). **CONCLUSION** The model of rat constipation is established successfully. It was proved that the colonic transit particle is beneficial to diagnose slow transit constipation in rats.

KEY WORDS: colonic transit test; animal model; loperamide; slow transit constipation

结肠传输试验是临床上最常用的诊断慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)的手段之一^[1-2], 该方法简易、廉价、安全。目前, 国内外通常使用大鼠、小鼠制备 STC 动物模型, 但各有其优缺点, 而国内尚无在 STC 大鼠模型中对结肠传输颗粒的研究。本研究旨在利用自制的结肠传输颗粒建立一种简单、可重复性强、符合 STC 临床特点的动物模型进行药效学试验, 探讨结肠传输颗粒

是否可用于大鼠 STC 的诊断。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 30 只, 由福建医科大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: SCXK(闽)2016-0002, ♀♂各 15 只, 体质量 130~150 g, 安静、通风, 20 ℃恒温、恒湿, 自由进食、饮水, 光照与黑暗 12 h 交替环境饲养。

基金项目: 福建省卫计委青年项目(2014-1-45)

作者简介: 庄茜, 女, 硕士, 主管药师 Tel:13799302883
导师 Tel: 13365910816 E-mail: liumb0591@sina.com

E-mail: zhuangqian_1983@163.com

*通信作者: 刘茂柏, 男, 主任药师,

1.2 仪器

AL01C II X 线机(美国 GEHealthcare); BSA623S-CW 分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司,分度值:0.0001 g); ACS-S 电子天平(分度值:0.5 g), KQ218 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 20 号灌胃针(益新中国有限公司)。

1.3 药品与试剂

结肠传输颗粒(福建医科大学附属协和医院药学部自制); 盐酸洛哌丁胺(美国 Sigma, 批号: SLBG7320V); 丙二醇(江西益生药业有限公司, 批号: 20151203); 硫酸钡(II 型)干混悬剂(青岛东风化工有限公司, 批号: 3150948); 灭菌注射用水(广东艾希德药业有限公司, 批号: 170116701)。

2 方法

2.1 模型建立^[3]

按随机化原则分为 2 组, 分别为实验组和对照组, 每组各 15 只, 其中实验组大鼠♂ 8 只、♀ 7 只, 对照组♂ 7 只、♀ 8 只, 单笼饲养。将洛哌丁胺粉末按 10 mg:1 mL 比例加入至丙二醇中, 在超声波清洗器中进行超声溶解后, 再加入灭菌注射用水, 配制成 0.8 mg·mL⁻¹ 的溶液。大鼠适应 1 周后, 按大鼠体质量 0.25 mL·kg⁻¹, 每天 2 次, 分别为 9:00 和 17:00, 连续腹腔注射洛哌丁胺 21 d, 对照组腹腔注射等量灭菌注射用水。

2.2 判断结肠传输颗粒是否可用于大鼠 STC 的诊断

造模结束测定完口-肛传输时间后, 大鼠正常进食, 于第 2 日上午 8:00 将自制结肠传输颗粒按每只 20 粒同生理盐水一起通过 20 号灌胃针给予大鼠灌胃后(记录灌胃完毕时间), 在大鼠轻度麻醉状态下(将大鼠关入标本缸, 加入 2 mL 乙醚, 约 1~1.5 min 后, 大鼠出现软瘫, 将其取出), 分别于灌胃后 6, 12, 24 h 拍摄腹部 X 线片一张, 若 24 h 时大部分标志物颗粒在乙状结肠以上, 可在 36 h 时再摄片一张, 直至观察到所有标志物颗粒排出。根据标志物颗粒的分布, 计算结肠传输时间和排出率^[4]。比较 2 组大鼠在不同时间段标志物颗粒的分布情况、排出率, 以此验证该结肠传输颗粒是否可用于大鼠 STC 的诊断。

2.3 检测指标^[5]

2.3.1 一般状态 ①表观状态观察: 每天 2 次观察 2 组大鼠活跃程度、毛色情况、精神状态等。②体质量: 每天早上 8:30 开始称量每只大鼠的体

质量, 并比较 2 组大鼠在体质量上的差值有无统计学意义。③饮水、进食量的测定: 利用饮水量、进食量差值法进行测定。每天早上同一时间用天平称取每组动物的食物和水的质量并记录, 饮水量(进食量)用前一天初始的质量减去后一天剩余的质量。

2.3.2 粪便参数 每天上午 9:00 腹腔注射给药后, 将每笼垫料换新(注垫料量不可过多), 并收集大鼠 24 h 粪便数量, 用电子天平称其质量(湿重), 自然风干 4 d 后称其干重, 计算含水率, 含水率=(湿重-干重)/湿重×100%。

2.3.3 口-肛传输时间 在连续腹腔注射给药 21 d 后, 大鼠禁食过夜, 于次日 8:00 给予 2 组大鼠 200%硫酸钡糊状液每只 2 mL 灌胃, 灌胃后记录时间, 当第 1 粒白色粪便排出时记录排出时间, 以此计算出口-肛传输时间。

2.3.4 排出率 排出率按以下公式计算: 排出率=(20-残量数)/20×100%。

2.4 统计学处理

将所有数据输入 SPSS 17.0 统计软件包及 Excel 软件进行处理, 计量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计数据多组间比较采用单因素方差分析。2 组间差异比较采用 *t* 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 2 组大鼠一般情况比较

腹腔注射洛哌丁胺 21 d 后, 与对照组相比, 实验组大鼠活动量减少, 毛色暗淡, 没有光泽, 且后期精神状态不佳, 易醒。在造模过程中, 偶有稀便现象。粪便较为短小、干结, 有的近似圆球状, 同一时间段排出量减少。2 组大鼠在进食量与饮水量上差异无统计学意义; 造模结束后, 2 组大鼠在体质量上差异无统计学意义; 与对照组相比, 实验组大鼠 24 h 粪便粒数明显减少($P<0.01$), 大鼠粪便湿重($P<0.01$)、干重($P<0.05$)、含水率($P<0.01$)均显著降低, 差异具有统计学意义, 结果见表 1。

3.2 口-肛传输时间

对照组口-肛传输时间为(8.3±0.6)h, 实验组口-肛传输时间延长至(10.4±2.6)h, 2 组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 拍片结果对比

2 组大鼠灌胃给予不透 X 线标志物颗粒后, 不同时间段拍摄大鼠腹部 X 片, 结果见图 1。

表 1 2 组大鼠一般情况比较($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of general condition of two groups ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体质量/g	进食量/g	饮水量/mL	粪便粒数/个	粪便湿重/g	粪便干重/g	粪便含水率/%
对照组	275.7±14.5	24.5±5.0	31.3±5.4	52.0±6.5	11.5±2.2	6.3±1.8	53.6±0.08
实验组	259.3±13.9	25.5±5.0	32.7±5.6	37.0±6.7 ¹⁾	8.3±1.5 ¹⁾	3.9±0.9 ²⁾	43.2±0.04 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$.

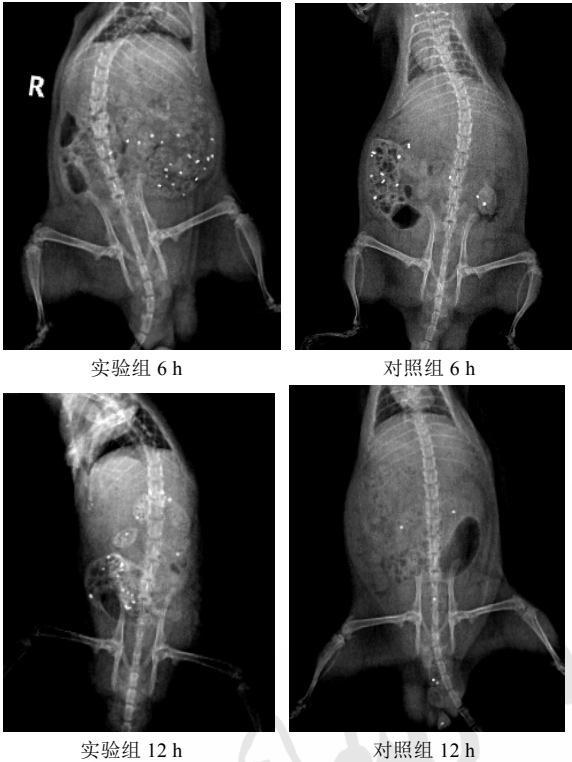


图 1 大鼠腹部 X 片

Fig. 1 X film in the abdomen of rats

3.4 排出率

与对照组相比, 实验组大鼠 6, 12 h 的排出率均显著降低, 2 组差异具有统计学意义($P<0.01$); 灌胃 24 h 后 2 组大鼠体内的结肠传输颗粒均全部排出, 结果见表 2。

表 2 两组大鼠各时间段标志物排出率($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The rate of discharge of colonic transit particles in two groups at different times($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	标志物排出率/%		
	6 h	12 h	24 h
对照组	49±22.1	80±6.8	100
实验组	10±9.3 ¹⁾	30±10.4 ¹⁾	100

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

4 讨论

STC 是一类以结肠动力下降、结肠传输延缓为主要特点的顽固性便秘。根据国内外研究现状,

利用结肠传输标志物来测定结肠传输时间, 可用于评估便秘的结肠功能并区分便秘类型^[6-8]。该方法简单易行、价廉, 同时适用于患者治疗后复查。因此, 本研究在前期研究基础上, 尝试建立一种稳定性高、操作性强、基本符合 STC 临床特点的动物模型, 利用自制的结肠传输颗粒来进行动物药效学试验。目前国内的文献报道无任何涉及结肠传输颗粒的动物实验研究, 大多研究者认为制备颗粒的药物均为医用药物, 可以确保安全, 直接运用于人。此观点忽略了药物剂型、相互作用等因素可能对人体造成的影响。本研究成功建立了慢传输型大鼠模型, 并利用自制的结肠传输颗粒进行便秘诊断, 今后也可将该颗粒制备的胶囊推广应用到整个胃肠道功能的诊断, 涉及更多的患者。此外, 还有助于相关药物的后续研究, 如止泻药、便秘药、胃肠动力药、肿瘤药等。

目前 STC 便秘模型的制作有许多方法, 包括药物(泻剂、吗啡、复方地芬诺酯、复方苯乙哌啶、硫糖铝)和非药物(冷水灌胃、低水纤维饮食、卧床)所致的便秘模型, 但缺乏统一的标准, 每种方法都有其各自缺点。①冷水灌胃法^[9]: 该模型具有很好的稳定性, 但冰水刺激让动物应急状态, 可能导致抑郁、体质量下降以及胃肠功能紊乱, 且模型不稳定。②泻剂结肠法^[10]: 为 STC 发病机制的研究提供了一种简单、可靠、可复性强的动物模型。但泻剂造模剂量在不同文献中差异较大, 不易掌握, 造模周期长。而且长期腹泻可导致动物水电解质紊乱, 营养不良, 甚至死亡。③吗啡造模法^[11]: 该模型适合研究与阿片受体和肠道 Cajal 细胞相关的 STC 的发生机制。但该法造模时间较长, 且药物不易获取。④限水造模法^[12]: 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, 但该法违背了大鼠正常的生理活动规律, 动物死亡率高。⑤药物依赖性造模法^[13]: 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, 但该法造模时间

长。⑥复方苯乙哌啶造模法^[14]：该模型简单经济，可重复性强，但造模时间较长。⑦洛哌丁胺造模法^[15]：通过连续给大鼠皮下注射洛哌丁胺的方法造模。方法快速简便，造模周期短，但洛哌丁胺为强碱性不溶药物，皮下注射的方法容易刺激皮下组织，导致注射部位脱毛、脓肿、坏死，甚至老鼠死亡。本研究通过增加洛哌丁胺溶解度及改变给药方式的方法，减少洛哌丁胺的强刺激性。造模完成后多数采用活性炭灌胃法^[15]，记录首粒黑便排出时间或计算炭末推进长度，检测结肠通过时间。但因大鼠大便及炭末均为黑色，易造成测量误差，因此改用硫酸钡法^[16]检测。

通过腹腔注射洛哌丁胺 21 d 后，大鼠 24 h 粪便粒数减少，粪便重量及含水率减少，口-肛传输时间延长，2 组间数据具有统计学差异，可初步鉴定为建立 STC 模型成功。与对照组相比，实验组大鼠在 6, 12 h 的标志物排出率均显著降低，可初步鉴定为该自制结肠传输颗粒可用于大鼠 STC 的诊断。

REFERENCES

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 中国慢性便秘诊治指南[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(5): 291-297.
- [2] JACOBS T, PAMIES R. Adult constipation a review and clinical guide [J]. J Natl Med Assoc, 2001, 93(1): 22-30.
- [3] HUANG Z H. Effects and mechanism of sacral nerve stimulation on slow transit constipation [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [4] 罗金燕, 王学勤, 戴菲, 等. 慢传输型便秘结肠动力学研究 [J]. 中华消化杂志, 2002, 22(2): 49-51.
- [5] HUANG X L, CHEN L, CHEN C. Comparison of three kinds of type constipation model [J]. Sichuan J Zool(四川动物), 2015, 34(1): 111-116.
- [6] XU H M, HAN J G, NA Y. Colonic transit time in patient with slow-transit constipation: comparison of radiopaque markers and barium suspension method [J]. Eur J Radiol, 2011, 79(2): 211-213.
- [7] ZHAO S, LIU B H, FU T. Application of colonic transit test in diagnosis of slow transit constipation [J]. J Third Mil Med Univ(第三军医大学学报), 2013, 21(35): 2289-2291.
- [8] YASER A, KONG H, XIE X P. Role of radioopaque markers method in the evaluation of colonic transit function [J]. Chin J Gastroenterol(胃肠病学), 2011, 6(16): 337-340.
- [9] ZHU J, ZHAO K, LI Z F. Establishment of rat model constipation-predominant bowel dysfunction by intragastric perfusion of ice water [J]. Chin J Gastroenterol(胃肠病学), 2010, 15(12): 738-740.
- [10] ZHANG L Y, GAO F, TONG W D. Establishment of a cathartic colon rat model [J]. World Chin J Digestol(华人消化杂志), 1998, 6(10): 40-42.
- [11] XV H C, LIN L, ZHANG H J. Establishment of an animal model of slow transit constipation and the investigation of its mechanism [J]. J Med Postgraduates(医学研究生学报), 2004, 17(6): 502-504, 592.
- [12] 王朝晖, 赵延红, 肖美芳. 大鼠便秘模型制作的初步实验研究[J]. 现代中医药, 2004, 35(3): 53-54.
- [13] WU Q S, WU S G, ZHAO J H. Development of drug-dependent constipation in rats [J]. Lab Anim Sci(实验动物科学), 2007, 24(4): 70-72.
- [14] LIU H F, HE J T, WANG X W. Changes of colonic myoelectric activity in a rat model of slow transit constipation [J]. Med J Chin People's Armed Police Forces(武警医学), 2004, 15(12): 887-891.
- [15] AKIRA S, SHINICHI M, TADASHI. Decreased colonic mucin rats with loperamide-induced constipation [J]. Comp Biochem Physiol Part A, 2000, 126(2): 203-212.
- [16] QIAN N, WU Q S, ZHAO J H. A new examining method of intestinal transmission function of mice [J]. Lab Anim Sci(实验动物科学), 2007, 24(3): 60-62.

收稿日期: 2017-08-11

(本文责编: 蔡珊珊)