

# 脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型的建立

吴玉泓<sup>1,2</sup>, 许雅清<sup>1</sup>, 李海龙<sup>1,2</sup>, 程小丽<sup>1</sup>, 明海霞<sup>1</sup>, 张磊<sup>1</sup>, 刘峰林<sup>1</sup>, 王瑞群<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室;  
甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

**【摘要】** 目的 建立脾肾阳虚型溃疡性结肠炎大鼠模型。方法 通过灌服大黄水煎液、肌肉注射氢化可的松并结合 TNBS(2,4,6-三硝基苯磺酸)混合乙醇灌肠建立脾肾阳虚型 UC 动物模型。将 60 只大鼠随机分为空白组、脾肾阳虚型 UC 模型 7、14 d 及 21 d 组,采用酶联免疫法检测各组大鼠血清中 FT3、FT4、T 的含量。结果 与空白组比较,脾肾阳虚型 UC 模型 7、14 d 及 21 d 组大鼠血清中 FT3、FT4、T 的含量均有降低( $P < 0.05$ );尤以模型 21 d 组差异显著。结论 FT3、FT4、T 是脾肾阳虚的敏感指标,检测血清 FT3、FT4、T 可以更好地佐证脾肾阳虚;证明了脾肾阳虚型 UC 动物模型复建成功。

**【关键词】** 溃疡性结肠炎;脾肾阳虚;酶联免疫法;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016) 02-0116-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.02.002

## Preparation of a rat model of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency

WU Yu-hong<sup>1,2</sup>, XU Ya-qing<sup>1</sup>, LI Hai-long<sup>1,2</sup>, CHENG Xiao-li<sup>1</sup>,  
MING Hai-xia<sup>1</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup>, LIU Feng-lin<sup>1</sup>, WANG Rui-qun<sup>1</sup>

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Province Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Translation; New products of Gansu Province Chinese Medicine Engineering Laboratory, Lanzhou 730000)

**【Abstract】 Objective** To establish a rat model of ulcerative colitis (UC) with spleen and kidney Yang deficiency. **Methods** The rat model of ulcerative colitis with spleen and kidney Yang deficiency was established by oral administration of Rhubarb decoction, intramuscular injection of hydrocortisone, and combined with ethanol enema of TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid). Sixty Wistar rats (body weight  $180 \pm 20$  g, male:female = 1:1) were randomly divided into blank control group and groups of UC models with spleen kidney Yang deficiency for 7 days, 14 days and 21 days. The serum levels of FT3, FT4, and T of the rats were detected by ELISA assay. **Results** Compared with the blank control group, the serum levels of FT3, FT4, and T in the groups of UC rat models with spleen kidney Yang deficiency for 7 days, 14 days and 21 days were decreased to a different extent ( $P < 0.05$ ), especially, decreased dramatically in the model group for 21 days. **Conclusions** FT3, FT4, and T are sensitive indexes with spleen and kidney Yang deficiency. The detection of serum levels of FT3, FT4, and T can better verify the spleen and kidney Yang deficiency in the rats, and prove that the spleen and kidney Yang deficiency type UC animal model is successfully prepared.

**【Key words】** Ulcerative colitis; Spleen and kidney Yang deficiency; Enzyme linked immunosorbent assay; Rats  
Corresponding author: WU Yu-hong, E-mail: 172924249@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260520)。

[作者简介] 吴玉泓(1967-),男,博士,硕士生导师。研究方向:中医病证结合动物模型及治则治法研究。Email: 172924249@qq.com。

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是慢性非特异性的炎症肠道性疾病, 临床以腹痛、腹泻、黏液脓血便及里急后重为主, 表现为以大肠黏膜和黏膜下层形成炎症和溃疡为特点, 属于当代极难治疗的疾病之一<sup>[1]</sup>。目前国内外针对 UC 的发病原因及发病机制仍未阐明, 可能是遗传、环境和免疫等多因素共同作用的结果, 其中又以免疫学因素最为重要。临床上一般将 UC 分为急性发作期和缓解期, 急性发作期多是由湿热等邪气停积于大肠引发炎症所致, 而缓解期多是由于久病及肾, 伤及肾阳, 最终导致脾肾阳虚。总结分析各类文献报道也可以发现 UC 始终存在脾失健运的情况, 脾虚是 UC 发病之本, 而情志因素则为主要诱因, 久病久泻伤及肾脏则脾肾阳虚<sup>[2]</sup>。为了能更加直观的研究脾肾阳虚型 UC, 我们选择在大鼠身上先复制该模型, 以方便未来更加深入的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只, 体重 (180 ± 20) g, 雌雄各半, 来源于甘肃中医药大学实验动物中心【SCXK(甘)2011-0001】, 整个实验过程在甘肃中医药大学实验中心的 SPF 级实验室内进行【SYXK(甘)2011-0001】, 购置大鼠后适应性喂养一周。

### 1.2 药品、试剂

三硝基苯磺酸 (2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS, 购自 Sigma 公司, 批号 111M5001V); 氢化可的松注射液 (批号 13060211); FT3、FT4、T Elisa 试剂盒: 购自南京建成生物工程研究所, 批号 20140301A。

大黄水煎液制备: 大黄中药材 (购自甘肃中医药大学附属医院中药房), 常规水煎后, 按 13.5 g (生药)/kg 体重计量浓缩到浓度为 1.35 g/mL。

### 1.3 主要仪器

水浴锅: DZKW-4 型。连续波长酶标仪 (Benchmark Plus): Bio-Rad 公司, 产自美国。高速冷冻离心机 (Biofuge-Stratos): 上海天美生化仪器设备工程有限公司, 型号为 CT14RD。显微镜: 日本 Olympus, CX21 型。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 分组与造模

将 60 只 Wistar 大鼠按照体重及性别, 根据随机数字表法将其分为 4 组, 即空白组、模型 7 d 组、模

型 14 d 组、模型 21 d 组。

脾肾阳虚型 UC 大鼠模型的制备采用病证结合法建立, 参考文献方法<sup>[3-4]</sup>。第一阶段复制“脾虚”模型: 给空白组大鼠灌以蒸馏水每只 2 mL/d, 模型组各组大鼠上午大黄水煎液灌胃, 每只 2 mL/d, 下午蒸馏水灌胃, 每只 2 mL/d, 连续 14 d 后空白组体重 (200 ± 20) g、模型组体重 (190 ± 20) g; 第二阶段复制“脾肾阳虚”模型: 第 15 天在模型组大鼠左右肢臀部交替注射氢化可的松 25 mg/(kg·d), 并给予蒸馏水灌胃每只 2 mL/d, 连续 10 d, 第 25 天禁食不禁水, 第 26 天用 100 mg/kg TNBS 加 50% 乙醇 0.25 mL 混合试剂灌肠, 空白组用等体积蒸馏水灌肠, 进而建立脾肾阳虚型 UC 大鼠模型, 其体重为空白组 (230 ± 20) g、模型组 (200 ± 20) g。

#### 1.4.2 标本采集及处理

空白组、模型 21 d 组于造模 21 d 末, 模型 7、14 d 组于造模 7 d 末、14 d 末禁食不禁水 24 h, 用 10% 的水合氯醛麻醉, 将大鼠固定于手术台, 在股动脉处取血, 室内放置 10 min 后 3000 r/min 离心 10 min, 取血清置 4℃ 冰箱保管, ELISA 法检测血清 FT3、FT4、T 的含量具体操作参照试剂盒说明书。后脱颈处死大鼠剖腹剪取整个结肠组织并纵轴剪开, 生理盐水清洗干净, 截取病变结肠中的一部分, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 等待常规 HE 染色制作病理切片。

#### 1.4.3 病理切片制备

常规石蜡包埋, 制作病理切片, 进行 HE 染色。具体步骤: ① 石蜡切片。② 脱蜡至水 (进行此步骤前先将烤片, 60℃ 2 h): 二甲苯 I、II 液各 15 min, 100% 无水乙醇 I、II 液各 5 min, 95% 乙醇 I、II 液各 5 min, 85% 乙醇 3 min, 80% 乙醇 2 min, 70% 乙醇 2 min, 蒸馏水清洗 1 min × 3 次。③ 苏木素染色 5 min, 自来水冲洗, 盐酸乙醇分化 5 s, 自来水浸泡 15 min, 返蓝。④ 伊红染色 2 min, 蒸馏水洗净。⑤ 常规脱水: 70% 乙醇 1 min, 80% 乙醇 1 min, 85% 乙醇 3 min, 95% 乙醇 I、II 液各 3 min, 100% 乙醇 I、II 液各 5 min, 二甲苯 I、II 液各 10 min。⑥ 选用中性树脂胶封片。

#### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据, 方差齐性分析用 F 检验, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较选用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 各组大鼠一般生存状况

空白组大鼠始终表现为反应敏捷,饮食量正常,活动情况无异常,毛发浓密柔顺伴有光泽,粪便为棕褐色颗粒。脾肾阳虚型 UC 大鼠模型组则多数在第 4 天后开始出现蜷卧、眯眼等部分症状,第 9 天后症状开始明显,大鼠蜷卧扎堆,食量减少,体重开始减轻,便形质软,部分动物眯眼弓背,游泳耐力下降。往后动物症状逐渐加重,体形消瘦(模型组动物相比空白组体重偏轻 20~30 g),便形稀溏,肛周污秽,少食怠动,畏寒,成群蜷缩或弓背,毛发失去光泽而枯槁疏散等脾肾阳虚症状(模型 7 d 组死亡 2 只,模型 14 d 组死亡 1 只,模型 21 d 组死亡 2 只)。

### 2.2 镜下观察病理组织切片结果

#### 2.2.1 空白组

该组大鼠组织切片可见结构清楚,无水肿、溃疡形成(图 1A)。

#### 2.2.2 模型 7 d 组

切片显示肠腔表面有炎性渗出物,黏膜腺体消失,基层、浆膜层有多个浸润的淋巴细胞,纤维组织增生,局部可见淋巴滤泡形成(图 1B)。

#### 2.2.3 模型 14 d 组

切片显示结肠整个黏膜脱落消失,黏膜腺体消失,黏膜层、黏膜下层有明显炎性细胞浸润,伴纤维增生(图 1C)。

#### 2.2.4 模型 21 d 组

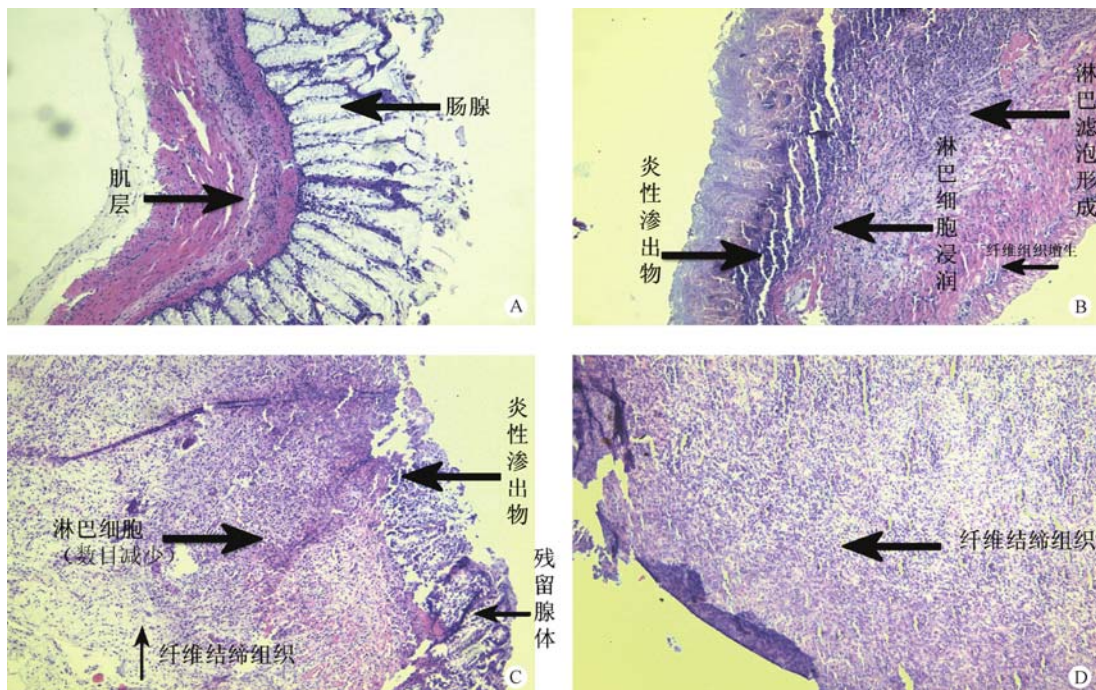
切片显示黏膜层、黏膜下层炎性细胞减少,毛细血管减少,胶样组织纤维增生,肉芽组织向瘢痕过渡(图 1D)。

### 2.3 ELISA 法检测大鼠血清中 FT3、FT4、T 的含量变化

与空白组比较,模型组各组大鼠血清中 FT3、FT4、T 的含量都有所降低,差异有显著性( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),尤以模型 21 d 组最为显著(见表 1)。

## 3 讨论

本课题根据“病证结合”方法选用中药混合西药,取中药和西药的长处来共同制备脾肾阳虚型 UC 动物模型。利用苦寒泻下的中药大黄和对机体尤其针对肾脏有毒副作用的西药氢化可的松注射液,先后制备脾阳虚和肾阳虚模型。而研究中所选用的 TNBS 诱导建立的 UC 大鼠模型是研究结肠黏膜免疫和炎症反应的重要模型,目前已经被普遍采用。



注:A. 空白组;B. 模型 7 d 组;C. 模型 14 d 组;D. 模型 21 d 组。

图 1 大鼠结肠组织病理切片(HE 染色, ×100)

Note. A. Blank group 0 d. B. Model group 7 d. C. Model group 14 d. D. Model group 21 d.

Fig. 1 Pathological changes of the rat colonic tissue

表 1 各组大鼠血清中 FT3、FT4、T 的含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The levels of FT3, FT4, and T in in serum of every groups

组别 Groups	n	FT3/pmol/L	FT4/pmol/L	T/ng/mL
空白组 0 d 组 Blank (0 d)	15	3.653 ± 0.250	10.871 ± 1.025	146.040 ± 11.708
模型 7 d 组 Model (7 d)	10	3.255 ± 0.440	10.184 ± 0.985	142.750 ± 7.114 <sup>△</sup>
模型 14 d 组 Model (14 d)	10	2.970 ± 0.227 <sup>△</sup>	9.516 ± 1.085 <sup>△</sup>	140.292 ± 10.702 <sup>△</sup>
模型 21 d 组 Model (21 d)	10	2.551 ± 0.165 <sup>△△</sup>	8.061 ± 0.647 <sup>△</sup>	134.165 ± 9.745 <sup>△△</sup>

注:与空白组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

该模型最初被成功复制是在 1984 年,由 Sharon 等<sup>[5]</sup>在大鼠身上成功复制,至此之后便在国外被广泛应用和改进,而最近几年也逐渐出现在国内,关于该模型报道也越来越多。此模型在大、小鼠身上均被复制。首先 TNBS 是体内一种半抗原的物质,可以与结肠里的大分子蛋白相互结合,进而产生一种完全抗原,诱导机体免疫反应,引起 UC 发病。建立该模型,方法简便,经济实惠,炎症持续时间长,效果好,与人类 UC 相似。

采用苦寒之药大黄泻下和糖皮质激素类药物氢化可的松共同制备脾肾阳虚型大鼠模型,造模后观察大鼠一般生活情况,发现大鼠逐渐出现精神萎靡不振、反应明显迟钝、活动减少、畏寒喜蜷卧扎堆、皮毛枯槁疏散、饮食饮水减少、大便质软或稀溏、游泳耐力减少等现象,类似于中医的脾肾阳虚证症状。在此基础上选用 TNBS 混合乙醇灌肠制备溃疡性结肠炎模型,大鼠普遍出现大便质软稀溏现象,HE 染色病理切片镜下观察到模型组大鼠结肠组织明显充血、水肿,有溃疡和糜烂形成。

作为“下丘脑-垂体-靶腺轴”终端产物,FT3、FT4、T 分别反映甲状腺轴功能和性腺轴,在肾阳虚的病机学中甲减起很重要的作用,气血亏虚、脾阳虚,相当于甲状腺功能减退的中期;肾阳虚衰、水湿内停,相当于甲状腺功能减退的后期<sup>[6]</sup>。游离 T3、T4 生物活性很强,不会被血液中的甲状腺素结合球蛋白改变,影响 FT3 和 FT4 的测定对评价甲状腺功能很有意义,故可以由此来判定肾阳虚。而睾酮

(T)的变化是脾阳虚的敏感指标,检测血清 FT3、FT4、T 可以更好的佐证脾肾阳虚<sup>[7]</sup>。脾肾阳虚型 UC 模型组大鼠血清中 FT3、FT4、T 的明显降低,提示这些激素参与了体温变化,同时也证明了脾肾阳虚型 UC 动物模型复建成功。此造模方法从时间动态上观察溃疡性结肠炎动物模型制备的具体情况,方法简单,易操作,周期短,成功率高,可作为溃疡性结肠炎发病机制和相关药物作用研究的理想模型。

#### 参 考 文 献

- [1] 中华医学会消化病学分会. 溃疡性结肠炎 [J]. 新医学, 2005, 36(2): 110.
- [2] 沈建法, 刘庆宪. 溃疡性结肠炎发生的藏象学基础 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2206-2208.
- [3] 陈贤坤, 王立峰, 赵慧, 等. 强肌健力方对脾肾两虚大鼠细胞因子水平的影响 [J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(3): 282-283.
- [4] 赵海梅, 刘端勇, 汤菲, 等. 四神丸对小鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜修复的保护机制研究 [J]. 中成药, 2009, 31(12): 1935-1937.
- [5] Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of eukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology, 1984, 86(3): 453-460.
- [6] 叶涵婷, 陈超, 朱曙东. 白术水煎液对溃疡性结肠炎大鼠模型及血清 IL-6, IL-17 的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(1): 69-71.
- [7] 谢梦洲, 何军锋, 屈娅婷, 等. 脾肾阳虚慢性咳嗽大鼠模型的研制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 9(30): 30-33.

[收稿日期] 2015-09-17