

• 论著-实验研究 •

乳糖不耐受肝郁脾虚证模型的建立和评价*

王翼天¹ 陈婷¹ 薛红¹ 马金鑫¹ 王凤云¹ 唐旭东¹

[摘要] 目的:建立和评价乳糖不耐受并符合肝郁脾虚证证候特点的病证结合动物模型。方法:实验 1:大鼠随机分为对照(Con)组、高 FODMAPs(FOD)组、高乳糖(Lac)组、避水应激(WAS)组、高 FODMAPs+避水应激(FOD+WAS)组、高乳糖+避水应激(Lac+WAS)组。避水应激每天 2 h,连续 10 d;高 FODMAPs 同期给予 10% FODMAPs 饲料 13 d;高乳糖同期给予高剂量乳糖(5.25 g/kg)灌胃 13 d。对行为学、体重、进食等指标进行一般情况观察,并对粪便颗粒数、蔗糖水偏好、AWR 评分等进行检测,苏木精-伊红染色结肠组织,Elisa 测定结肠 5-HT、SERT、TPH1 水平。实验 2:应激因素改为束缚加夹尾应激,大鼠随机分为对照组、高 FODMAPs 组、束缚夹尾组、高 FODMAPs+束缚夹尾组。束缚每日 2 h,夹尾 20 min,休息 10 min 后,再次夹 20 min,连续 10 d,余同实验 1。观察一般情况、粪便颗粒数、蔗糖水偏好、AWR 评分。结果:与 Con 组相比,FOD 组及 WAS 组粪便颗粒数升高($P<0.05$),疼痛阈值下降($P<0.05$);FOD+WAS 组相较于 FOD、WAS 组粪便颗粒数升高($P<0.05$),疼痛阈值下降($P<0.05$);Lac 组相较于 Con 组,Lac+WAS 组相较于 WAS 组差异无统计学意义。糖水偏好率:WAS、FOD+WAS、Lac+WAS 组相较于 Con 组显著降低,余组间差异无统计学意义。Elisa:FOD+WAS 组相较于 Con 组,5-HT、TPH1 显著升高,SERT 显著降低($P<0.01$)。FOD+WAS 组相较于 FOD 组,5-HT 显著升高($P<0.05$);相较于 WAS 组,5-HT、TPH1 显著升高,SERT 显著降低($P<0.01$)。实验 2 结果与实验 1 趋势一致。结论:高 FODMAPs 饮食叠加避水应激可以成功建立乳糖不耐受肝郁脾虚证模型,叠加组存在结肠 5-HT 合成升高及再摄取障碍。

[关键词] 乳糖不耐受;肝郁脾虚证;高 FODMAPs 饮食;避水应激;病证结合模型

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2022.06.03

[中图分类号] R256.3 [文献标志码] A

Establishment and evaluation of lactose intolerance model with liver depression and spleen deficiency syndrome

WANG Yitian CHEN Ting XUE Hong MA Jinxin WANG Fengyun TANG Xudong
(Department of Gastroenterology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091, China)

Corresponding author: TANG Xudong, E-mail: txedly@sina.com.cn

Abstract Objective: To establish and evaluate lactose intolerance model with liver depression and spleen deficiency syndrome. **Methods:** Experiment 1: Rats were randomly divided into control group, high FODMAPs group (FOD group), high lactose group(Lac group), water avoidance stress group(WAS group), high FODMAPs+water avoidance stress group(FOD+WAS group), High lactose+water avoidance stress group(Lac+WAS group). Water avoidance stress was performed 2 hours a day for 10 consecutive days. High FODMAPs were given 10% FODMAPs feed for 13 days, and high lactose was given high dose of lactose(5.25 g/kg) by gavage for 13 days. Behavior, body weight, eating and other indicators were observed in general, and the number of fecal particles, sucrose water preference, and AWR score were detected, colon tissue was stained with HE, and the levels of 5-HT, SERT, and TPH1 in colon were determined by Elisa. Experiment 2: The stress factor was changed to restraint and tail clipping stress, and the rats were randomly divided into control group, high FODMAPs group, restraint-tail clip group, high FODMAPs+restraint-tail clip group. Restraining stress was performed for 2 hours; Tail clipping stress was performed for 20 minutes, and after a 10-minute rest, it was clipped again for 20 minutes for 10 consecutive days. The rest was the same as experiment one. The general condition, the number of fecal particles, the preference for sucrose water, and the AWR score were observed. **Results:** Compared with the control group, the number of fecal particles in the FOD group and the WAS group increased($P<0.05$), the pain

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81973838, No:82074420)

¹中国中医科学院西苑医院脾胃科(北京,100091)

通信作者:唐旭东, E-mail: txedly@sina.com.cn

threshold decreased ($P < 0.05$); Lac was not significantly different from the control group, and Lac+WAS group was not significantly different from the WAS group. Sucrose water preference rate: WAS, FOD+WAS, Lac+WAS groups were significantly lower than those of the control group, and there was no significant difference between the remaining groups. ELISA: Compared with the control group, FOD+WAS group significantly increased 5-HT and TPH1 and significantly decreased SERT ($P < 0.01$). Compared with the FOD group, the FOD+WAS group had a significant increase in 5-HT ($P < 0.05$). Compared with the WAS group, 5-HT and TPH1 were significantly increased, and SERT was significantly decreased ($P < 0.01$). The results of experiment 2 were consistent with the trend of experiment 1. **Conclusion:** The model of lactose intolerance with liver depression and spleen deficiency syndrome could be successfully established by high FODMAPs diet combined with water avoidance stress, and the superimposed factors induce colonic 5-HT synthesis and reuptake disorder.

Key words lactose intolerance; liver depression and spleen deficiency syndrome; high FODMAPs diet; water avoidance stress; disease-syndrome combination model

乳糖不耐受症(lactose intolerance, LI)是指乳糖吸收不良(lactose malabsorption, LM)的人群在摄入乳糖后出现的腹部及全身症状,如腹痛、腹胀和腹泻,少数患者会出现头痛、恶心等。乳糖是短链可发酵类碳水化合物(fermentable oligosaccharides disaccharides monosaccharides polyols, FODMAPs)中的一种,它们可以通过类似的机制引起症状。LI占总体食物不耐受人群的69%,居于首位,其中又有56.6%同时合并多种食物不耐受,严重影响患者的生活质量^[1]。对LI机制的研究不仅为探究饮食诱发功能性肠道症状的机制,而且为人类膳食营养以及生活方式提供科学见解。内脏高敏感是乳糖不耐受的重要病理机制,临床研究表明:LI患者存在更高的焦虑抑郁状态以及内脏高敏感,特别在服用低、中剂量(500 mL以内牛奶)的乳糖后,患者表现出的不耐受情况多因内脏高敏感所致^[2]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是调节胃肠运动及感觉的重要神经递质,乳糖在结肠中发酵产生的短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)可以诱导结肠5-HT的合成^[3],实验表明,高乳糖腹泻大鼠结肠5-HT含量升高,下游5-HT_{3R}、5-HT_{4R}表达升高^[4],表明5-HT与食物诱发的腹痛、腹泻症状密切相关。

乳糖不耐受属中医“腹痛、泄泻”范畴,其病机主要为肝郁不舒,横犯脾胃,致脾气亏虚,不能运化水谷,发而为食后腹痛、腹泻的症状,中医调和肝脾法在调理乳糖不耐受消化道症状及情志不舒方面具有独到的优势。建立并规范乳糖不耐受肝郁脾虚证模型对于阐明乳糖不耐受症状诱发机制以及调和肝脾治法的作用机制有重要意义。既往研究证实,应激叠加理化因素致泻(如醋酸、番泻叶灌胃)的方法可以建立肝郁脾虚证模型,表现为体重下降、腹泻、内脏敏感性增高、快感缺失、D-木糖吸收率降低等,但该方法存在一定毒副作用^[5]。为了更好地契合临床疾病危险因素及证候病因,本研究采用饮食及压力双因素造模法,选取高乳糖灌胃、高FODMAPs饲料模拟患者高FODMAPs饮食危

险因素,选取避水应激、束缚加夹尾应激模拟焦虑抑郁危险因素,两两组合进行比较,旨在探索一种更好模拟临床乳糖不耐受内脏高敏感及符合中医肝郁脾虚证证候特点的病证结合模型。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

动物:Wistar 雄性大鼠,体重(180±20)g, SPF级,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF级动物实验中心,实验室合格证号:SYXK(京)2015-0011。动物房内光照周期为12 h/12 h,温度22~25℃,相对湿度60%,自由饮用过滤水,动物在适应性饲养7 d后使用。所有实验经过中国中医科学院西苑医院动物管理委员会批准(No:2020XLC014)。

1.2 主要试剂与仪器

饲料基础配方和10%高FODMAPs饲料配方见表1^[6],购自北京科奥协力公司。乳糖粉由我院制剂室制备,配置溶液为动物饮用水,药物浓度为5.25 g/mL,5-HT(#J30019)、色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase 1, TPH1)(#35137)、5-羟色胺再摄取转运体(serotonin reuptake transporter, SERT)(#30022)试剂盒均购自黄石市艾恩斯生物科技有限公司。水环境站立箱(110 cm×60 cm×40 cm)箱体,箱中设置1个小平台,平台直径8 cm,高10 cm(自制),平台周边注水,水深8 cm不致淹没平台,水温保持(20±2)℃。束缚装置采用动物固定装置配合尼龙绳(自制),夹尾采用塑料长尾夹。低温高速冷冻离心机, BECKMAN; MultiSkan3 酶标仪, Thermo; DM2500 显微镜、超薄切片机, Leica; 脱水机、包埋机、冻台, 武汉俊杰电子有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 实验1:对动物进行称重后,应用SPSS 24.0进行随机分组,将60只大鼠随机分为6组,分别为对照(Con)组、高乳糖灌胃(Lac)

组、高 FODMAPs(FOD)组、避水应激(WAS)组、高乳糖灌胃+避水应激(Lac+WAS)组、高 FODMAPs+避水应激(FOD+WAS)组。实验 2:24 只大鼠随机分为 4 组,分别为对照(Con)组、高 FODMAPs(FOD)组、束缚夹尾(CRS)组、高 FODMAPs+束缚夹尾(FOD+CRS)组。

表 1 对照及高 FODMAPs 饲料配方 g

成分	AIN-93G 标准配方	高 FODMAPs 配方
酪蛋白	4.000 0	4.000 0
胱氨酸	0.060 0	0.060 0
乳糖	0	0.695 6(3.5%)
果糖	0	0.695 6(3.5%)
低聚果糖	0	0.596 2(3.0%)
玉米淀粉	7.950 0(40.0%)	5.962 5(30.0%)
麦芽糖糊精	3.040 0	3.040 0
蔗糖	2.000 0	2.000 0
纤维素	1.000 0	1.000 0
豆油	1.000 0	1.000 0
酒石酸氢胆碱	0.050 0	0.050 0
AIN 矿物质混合物	0.700 0	0.700 0
AIN 维生素混合物	0.200 0	0.200 0
BHT	0.002 8	0.002 8
合计	20.002 8	20.002 8

注:AIN 为美国营养学会(American Institute of Nutrition);BHT 为二丁基羟基甲苯;()内数字为构成比例。

1.3.2 造模方法 避水应激^[7]:在研究第 1 天开始,每日 8~14 时分 3 批进行实验。将大鼠单独放置于注水后的试验水箱中央的平台 2 h,Con 组大鼠放置在同种水箱的中央平台上,水箱中不注入水。每批实验大鼠造模结束后对水箱清洁、换水后再放入下一批大鼠,避免气味、粪便残留物等对大鼠造成干扰。造模周期 10 d。束缚+夹尾^[8]:每日 8~12 时分批进行夹尾应激,将动物每 2 只为一组放入饲养箱中,采用塑料长尾夹夹住动物尾巴中下 1/3 处,大鼠因剧烈疼痛会引起打斗,夹尾 20 min,取下夹子休息 10 min,再继续夹 20 min,夹子夹力不至于损伤鼠尾;Con 组每日放入笼中不夹尾。每日 14~18 时分批进行束缚应激,大鼠放入自制固定器中固定前上肢、胸腹部 2 h,造模周期 10 d。高乳糖灌胃:药物浓度根据人体质量换算法,临床研究中,在一次性服用 50 g 乳糖(约 1 L 牛奶中乳糖含量)后,97%的受试者出现乳糖不耐受情况^[9],可以被视为人体最大耐受量,换算至大鼠灌胃量为 5.25 g/(kg·d);Lac 组和 Lac+WAS 组在每日进入平台前进行高乳糖灌胃,其余各组灌胃等体积的饮用水。高 FODMAPs 饮食:FOD 组和 FOD+WAS 组喂食高 FODMAPs 配方纯饲料,其余各组

喂食标准配方纯饲料。在应激造模结束后再灌胃或饲料喂养 3 d,进行行为学实验并取材。

1.3.3 行为学实验 粪便颗粒数检测:在大鼠水平造模首小时、夹尾造模期间记录装置内大鼠粪便颗粒数,共计 1 h。造模结束后(第 14 天),将大鼠单独放入空饲养箱中,再统计 1 次粪便颗粒数。腹壁回撤反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分:每组选 6 只大鼠,在造模结束后,采用结直肠扩张法(colorectal distension, CRD)导致的 AWR 测定大鼠的内脏敏感性。大鼠麻醉后,将涂有甘油的球囊导管注水后插入大鼠直肠中,球囊距肛门约 1 cm 并固定,球囊另一端连接注射器,待大鼠苏醒 10~15 min 后,分别采用 0.2、0.4、0.6、0.8 mL 水柱压力进行结直肠扩张,实验操作员随机囊内快速注水(3 s 内达目标压力,维持 20 s),刺激间隔 4~5 min。为实现检测的准确性,每个压力梯度值重复测量 2 次,记录员采用 AWR 评分用于评价大鼠内脏感觉功能。评分标准:0 分:对扩张无明显反应;1 分:除开始刺激时小鼠头部摇晃外,直肠刺激过程中小鼠腹壁无明显收缩等反应;2 分:刺激过程中小鼠出现轻微腹肌收缩,但腹部未抬起;3 分:刺激过程中小鼠腹肌收缩强烈,腹部可离开平台并抬起;4 分:刺激过程中小鼠腹肌出现最强烈收缩,身体呈弓状和骨盆离开平台并且抬起。疼痛阈值:大鼠放松 5 min 后,操作者持续缓慢向球囊内注水,记录员记录观察到小鼠腹部抬起时的水柱压力值为疼痛阈值,重复进行 2 次取均值,每次间隔 4 min。

1.3.4 糖水偏好实验 大鼠实验前单笼饲养,放置 2 个水瓶,一个含有纯水,另一个含有 1%的蔗糖溶液,持续 48 h,在 24 h 时将水瓶交换位置。在测试前 6 h 取出 2 个瓶,然后让每只大鼠自由饮用纯水和蔗糖水 1 h,在 30 min 时交换瓶的位置。在测试前后称重瓶子,蔗糖偏好率为蔗糖水消耗量除以纯水和蔗糖水的总消耗量。

1.3.5 Elisa 检测 各组随机选取 5 只,截取近端结肠,将结肠组织按重量(mg):体积(μ L)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,制备成 10%的匀浆液,2500~3000 r/min,离心 10 min,取上层清液进行测定。实验操作参照试剂盒说明书进行,于波长 450 nm 的酶标仪上读取测定 OD 值;采用 Excel 进行标曲绘制及计算浓度值。每项指标重复 3 次,剔除异常值,最终结果取平均值。

1.3.6 苏木精-伊红染色 切片置于蒸馏水中洗涤 10 min,苏木精染色液染色 5 min,弱酸分化 1 min,氨水返蓝处理 2 min,伊红染液染色 5 min,95%~100%梯度酒精脱水,二甲苯透明 1 min,2 次;中性树脂封固,光学显微镜下观察。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 24.0 进行统计分析,数据符合正态分布和方差齐性的,数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,多组资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两检验采用 LSD 检验;若数据不符合正态分布或方差不齐,多组资料采用非参数检验(Kruskal-wallis 检验),2 组资料采用 Mann-Whitney U 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

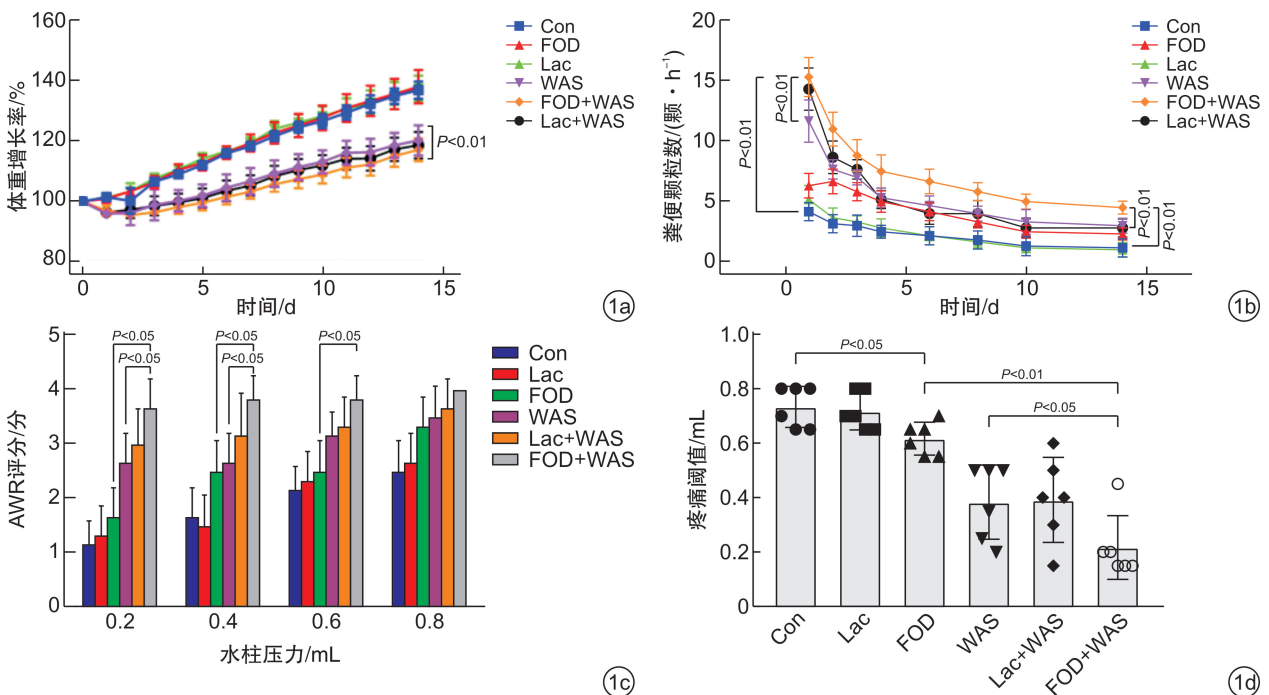
2.1 一般体征、体重、粪便颗粒数及 AWR 评分

与 Con 组相比,WAS、FOD+WAS、Lac+WAS 组出现弓背、毛发稀少、精神萎靡情况;FOD、FOD+WAS 组盲肠明显增大,进食量组间比较差异无统计学意义。组间体重比较:与 Con 组相比,WAS、FOD+WAS、Lac+WAS 组首日造模体重明显下降,之后开始升高,但与同时间 Con 组比较体重明显降低($P < 0.01$),FOD、Lac 组比较差异无统计学意义(图 1a)。

粪便颗粒数比较:在造模前统计各组大鼠 1 h 粪便颗粒数均为 0~2 颗。造模首日各组大鼠粪便颗粒均显著升高,与 Con 组比较,Lac 组差异无统计学意义,其余 4 组均显著增加($P < 0.05$),FOD

+WAS 组[(14.00±1.15)颗]显著高于 FOD 组[(6.50±0.96)颗]、WAS 组[(11.17±1.34)颗]及 Con 组[(3.83±0.69)颗]($P < 0.01$),但 Lac+WAS 组与 WAS 组差异无统计学意义(图 1b)。随着造模次数的增加,各组粪便颗粒数均呈下降趋势,Con 组大鼠回复至 0~2 颗水平,造模结束后 FOD+WAS 组[(5.00±0.82)颗]仍显著高于 FOD 组[(1.83±0.37)颗]、WAS 组[(3.50±0.50)颗]及 Con 组[(1.17±0.69)颗]($P < 0.01$)。

AWR 评分是评估大鼠内脏敏感性的指标,通过评估不同压力下的 AWR 评分及疼痛阈值,结果发现,FOD、Lac 组相较于 Con 组差异无统计学意义,FOD+WAS 组在 0.2、0.4 mL 水柱压力下评分显著高于 FOD 组和 WAS 组($P < 0.05$),在 0.6 mL 水柱压力显著高于 FOD 组($P < 0.05$);Lac+WAS 组相较于 WAS 组均差异无统计学意义(图 1c)。疼痛阈值评分结果显示,FOD 组、WAS 组及 FOD+WAS 组相较于 Con 组阈值显著降低($P < 0.05$),FOD+WAS 组阈值显著低于 FOD 组及 WAS 组($P < 0.05$);Lac 组相较于 Con 组,Lac+WAS 组相较于 WAS 组差异无统计学意义(图 1d、表 2)。



1a:造模期间大鼠体重增长率;1b:粪便颗粒数变化;1c:各压力下 AWR 评分;1d:疼痛阈值。

图 1 实验 1 各组大鼠一般体征、体重、粪便颗粒数及 AWR 评分比较

2.2 蔗糖水偏好实验

采用蔗糖水偏好实验探究大鼠快感缺失情况,结果表明,与 Con 组相比,FOD 组及 Lac 组差异无统计学意义,WAS、FOD+WAS 及 Lac+WAS 组

显著降低,但 3 组间差异无统计学意义。见图 2。鉴于高乳糖未能诱发内脏高敏感,在后续实验中我们未对其进一步检测。

表 2 疼痛阈值比较 $\bar{X} \pm S$

组别	只数	疼痛阈值/mL
Con 组	6	0.73 ± 0.08
Lac 组	6	0.72 ± 0.07
FOD 组	6	0.62 ± 0.06 ¹⁾
WAS 组	6	0.38 ± 0.01 ¹⁾
Lac+WAS 组	6	0.39 ± 0.16
FOD+WAS 组	6	0.22 ± 0.01 ¹⁾²⁾³⁾

与 Con 组比较,¹⁾ $P < 0.05$; 与 FOD 组比较,²⁾ $P < 0.05$; 与 WAS 组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

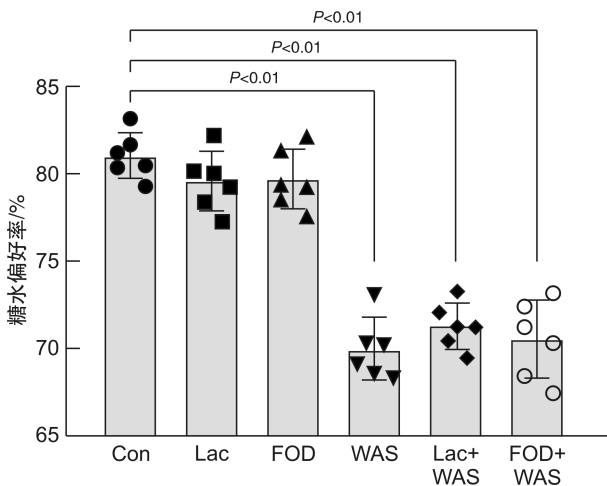


图 2 实验 1 各组大鼠蔗糖水偏好结果

2.3 苏木精-伊红染色及嗜酸性粒细胞计数

对结肠组织进行苏木精-伊红染色。10 倍和 40 倍放大结果显示, Con、FOD、WAS、FOD +

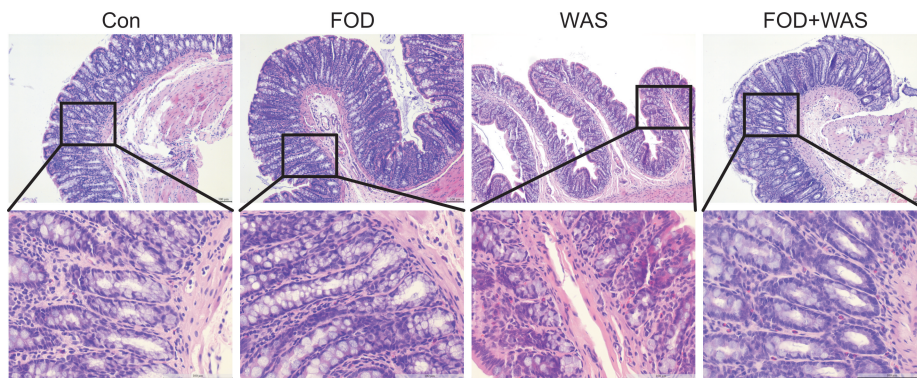


图 3 实验 1 其余 4 组大鼠结肠苏木精-伊红染色结果及嗜酸性粒细胞个数

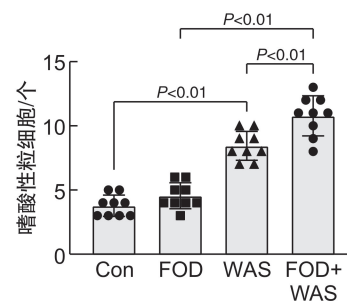


表 4 实验 1 其余 4 组大鼠 5-HT、SERT、TPH1 组间比较

组别	5-HT	SERT	TPH1
Con 组	22.97 ± 5.28	2439.23 ± 200.09	1.26 ± 0.11
FOD 组	32.20 ± 2.89 ²⁾	1881.29 ± 211.38 ²⁾	1.40 ± 0.13
WAS 组	30.77 ± 3.51 ¹⁾	2217.89 ± 257.37	1.21 ± 0.08
FOD+WAS 组	39.41 ± 5.22 ²⁾³⁾⁴⁾	1677.75 ± 341.76 ²⁾⁵⁾	1.50 ± 0.12 ²⁾⁵⁾

与 Con 组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; 与 FOD 组比较,³⁾ $P < 0.05$; 与 WAS 组比较,⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

WAS 4 个组结构完整,无明显糜烂及破溃,表明高 FODMAPs 饮食及 WAS 并未对结肠黏膜造成器质性损伤。在 WAS、FOD+WAS 组中发现嗜酸性粒细胞增多现象,每个样本选取 3 个 400 倍视野下对嗜酸性粒细胞进行计数。结果表明,WAS 组及 FOD+WAS 组相较于 Con 组嗜酸性粒细胞明显增多 ($P < 0.01$),且 FOD+WAS 组显著高于 WAS 组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 3。

2.4 5-HT、TPH1、SERT 表达

为探究模型组 5-HT 合成、再摄取的功能变化,我们检测了 5-HT、TPH1、SERT 的表达。结果表明,与 Con 组比较,FOD 组 5-HT 显著升高, SERT 显著降低 ($P < 0.01$),WAS 组 5-HT 显著升高 ($P < 0.05$),叠加组 5-HT、TPH1 显著升高, SERT 显著降低 ($P < 0.01$)。叠加组相较于 FOD 组,5-HT 显著升高 ($P < 0.05$),相较于 WAS 组,5-HT、TPH1 显著升高, SERT 显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4、图 4。

表 3 400 倍视野下嗜酸性粒细胞个数 $\bar{X} \pm S$

组别	只数	数量/个
Con 组	9	3.78 ± 0.79
FOD 组	9	4.56 ± 0.96
WAS 组	9	8.44 ± 1.07 ¹⁾
FOD+WAS 组	9	10.78 ± 1.47 ¹⁾²⁾³⁾

与 Con 组比较,¹⁾ $P < 0.01$; 与 FOD 组比较,²⁾ $P < 0.01$; 与 WAS 组比较,³⁾ $P < 0.01$ 。

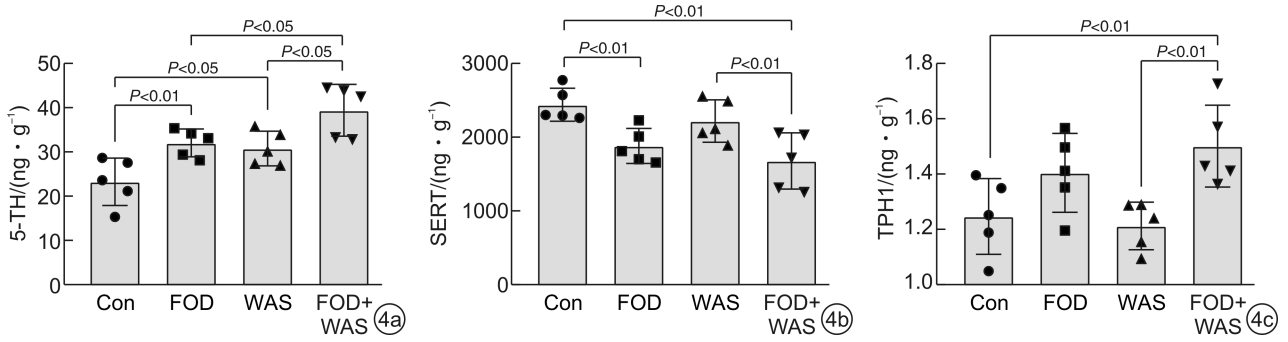


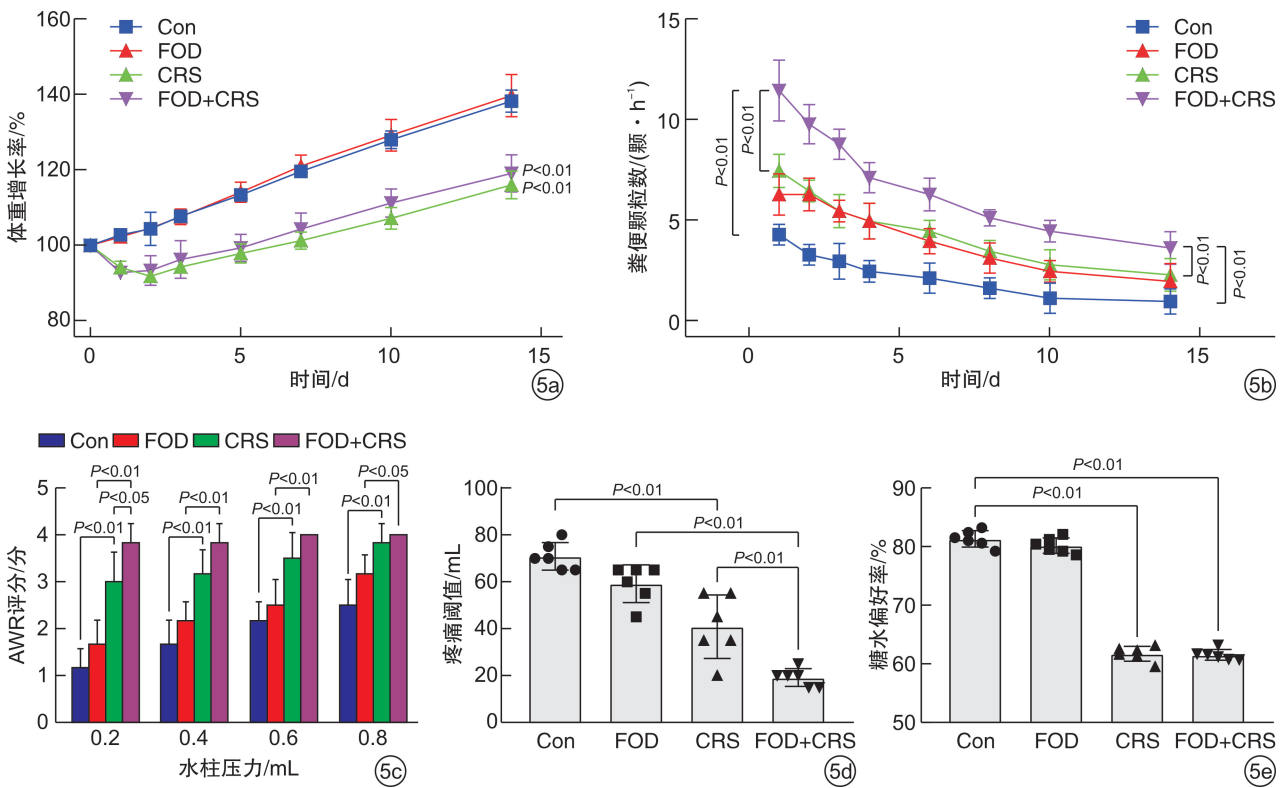
图 4 实验 1 其余 4 组大鼠 5-HT、SERT、TPH1 组间差异柱状图

2.5 验证实验结果

为对上述结论进行验证,以及比较不同应激方法的差异,我们将实验 1 中避水应激换用束缚+夹尾应激,并进行模型评价。CRS 组及 FOD+CRS 组相较于 Con 组,毛发稀疏,前期呈现易激惹状态,后期活动度下降,因夹尾时打斗出现爪甲及皮肤破损出血。体重结果显示,CRS 组及 FOD+CRS 组相较于 Con 组体重明显下降($P<0.01$),但 2 组间差异无统计学意义。粪便颗粒数结果显示,FOD+CRS 组粪便颗粒数显著高于 FOD 组及 CRS 组。AWR 评分结果显示,CRS 组在各压力下疼痛评分

均显著高于 Con 组($P<0.01$),FOD+CRS 组在 0.2 mL 水柱压力下,评分高于 CRS 组,在各压力下评分均显著高于 FOD 组;疼痛阈值结果,CRS 组显著低于 Con 组($P<0.01$),FOD+CRS 组显著低于 CRS 组及 FOD 组($P<0.01$)。蔗糖水偏好结果显示:CRS 组相较于 Con 组显著降低,FOD+CRS 相较于 CRS 组差异无统计学意义。见图 5。

以上结果表明,将应激方式换为束缚+夹尾应激后,叠加因素诱导的结肠运动亢进、内脏高敏感仍显著高于单因素组。



5a:造模期间大鼠体重;5b:每小时粪便颗粒数变化;5c:AWR 评分;5d:疼痛阈值;5e:糖水偏好实验。

图 5 实验 2 各组大鼠结果比较

3 讨论

乳糖不耐受病理机制主要包括小肠消化障碍

和结肠代谢异常。正常人乳糖酶活性随着年龄增长逐渐减弱甚至消失,这属于生理变化并非疾病,

当过量乳糖进入结肠后被菌群异常代谢刺激肠壁,则诱发乳糖不耐受症状^[2]。临床研究表明,乳糖在结肠发酵产生氢气量的升高与症状出现率呈显著正相关,但是与症状严重程度相关性并不明显,而焦虑、内脏高敏感与摄入 20 g 乳糖后腹部症状出现率及严重程度均呈正相关^[9],内脏高敏感是诱发乳糖不耐受症状的关键病理机制。啮齿类动物与人乳糖酶生理变化一致,适合作为乳糖不耐受的研究模型^[10]。既往对乳糖不耐受的模型多采用高乳糖诱发腹泻、轮状病毒感染诱发乳糖酶活性降低等方法^[11],可以模拟乳糖在小肠吸收不良的病理特点,但对焦虑抑郁的临床特点及内脏高敏感病理改变却无法体现。

本研究对压力及饮食因素进行组合建模,结果显示,各组粪便颗粒数造模首日较基线明显升高,这可能受到了灌胃操作、应激刺激及孤宠环境等因素的影响。随着造模次数的增加,整体呈下降趋势,对照组大鼠回复至基线水平,表明大鼠逐渐适应环境,应激对排便的刺激效果也逐渐减弱,这与其他研究结果^[7]相似。在造模首日及结束后叠加组粪便颗粒数仍显著高于单因素组及对照组,表明模型组大鼠结肠蠕动亢进。AWR 评分升高,疼痛阈值、蔗糖水偏好率显著降低,表明内脏敏感性升高,并伴有快感缺失。叠加因素造模更符合临床致病病因,并且模拟了 LI 患者焦虑抑郁及结肠高敏感的临床特点。在实验中,高乳糖灌胃并未诱导大鼠的内脏高敏感,高乳糖叠加避水应激与单纯应激亦差异无统计学意义,这与一项小鼠的实验结果^[12]不符,考虑可能因为大鼠对乳糖消化吸收能力不同所致。束缚夹尾应激与避水应激均可与高 FODMAPs 饮食联合加重内脏高敏感,考虑到避水应激在实验应用中更为广泛,我们最终选择避水应激进行下一步研究。

中医肝郁脾虚证模型多选用中医学病因叠加西药药理方法造模。肝郁多选用应激、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 注射致急性抑郁等方法^[5],应激刺激符合情志致病的病因特点,并可单独诱导肝郁证候,是造模肝郁证的首选方法。脾虚多选用番泻叶、大黄等药物灌肠叠加饥饱失常等方法^[13],可模拟脾虚腹泻的临床特点,但存在一定副作用。FODMAPs 类食物在小肠难以完全分解,多进入结肠发酵,产生气体及 SCFAs,过量食用加重脾胃运化负担,损伤脾胃,可诱发腹胀、腹痛、腹泻的症状,与脾虚证证候特点相合,且高 FODMAPs 饮食属于 LI 疾病危险因素。本实验选用高 FODMAPs 饮食叠加应激因素诱导,既符合临床肝郁脾虚证患病病因,同时契合了焦虑抑郁、餐后痛泻的证候特点,避免了药物诱导腹痛腹泻的副作用。

最近的研究证实,高 FODMAPs 饮食可以诱

导大鼠的内脏高敏感,与肠黏膜炎症密切相关^[6,14]。本研究发现,高 FODMAPs 饮食可以加重应激诱导的内脏高敏感,结肠苏木精-伊红染色结果显示叠加组嗜酸性粒细胞增多,提示炎症水平升高。临床研究表明,内脏高敏感患者结肠嗜酸性粒细胞数量增高,其活化参与了食物不耐受症状的发生^[15],本研究病理结果契合临床患者无器质性病变但存在低水平炎症的特点。

5-HT 作为胃肠道的重要神经递质,其表达水平的失调与内脏高敏感密切相关,既往研究表明,高 FODMAPs 饮食代谢产物 SCFAs 可以诱导 TPH1 上调,促进结肠 5-HT 合成^[3],黏膜炎症水平升高可以抑制 SERT 的合成并导致 5-HT 再摄取障碍^[16]。本研究首次探究高 FODMAPs 饮食及应激叠加因素对 5-HT 系统的影响,结果表明叠加组存在 5-HT 的合成升高及再摄取障碍,这可能与高 FODMAPs 饮食及肠道炎症水平升高相关,并直接诱发肠蠕动亢进及内脏高敏感。实验研究证实,5-HT 信号通路是肝郁脾虚证重要生物学基础,肝郁脾虚证患者血清 5-HT 升高,与“脑-肠轴”功能紊乱密切相关^[17],多种调理肝脾复方可通过调节 5-HT 水平进而缓解腹痛、腹泻症状^[18]。本研究结果显示结肠 5-HT、TPH1、SERT 水平与其他肝郁脾虚证模型^[19-20]趋势相似。

综上所述,高 FODMAPs 饮食叠加避水应激较单因素诱导的内脏高敏感症状更加明显,表现为大鼠精神萎靡、毛发稀疏、体重降低、快感缺失,肠蠕动亢进及内脏敏感性增高,提示模型符合肝郁脾虚的证候特点,同时造模条件亦符合证候病因及疾病危险因素。进一步对病理机制探究发现叠加组存在以嗜酸性粒细胞增多为特点的慢性炎症以及结肠 5-HT 合成亢进及再摄取障碍,与肝郁脾虚证生物学基础相契合。因此可以作为乳糖不耐受肝郁脾虚证病证结合的优选模型。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jansson-Knodell CL, White M, Lockett C, et al. Associations of Food Intolerance with Irritable Bowel Syndrome, Psychological Symptoms, and Quality of Life [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021.
- [2] Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, et al. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management [J]. Gut, 2019, 68 (11): 2080-2091.
- [3] Vincent AD, Wang XY, Parsons SP, et al. Abnormal absorptive colonic motor activity in germ-free mice is rectified by butyrate, an effect possibly mediated by mucosal serotonin [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2018, 315(5): G896-G907.
- [4] Zhu T, Qiu J, Wan J, et al. Expression of serotonin re-

- ceptors in the colonic tissue of chronic diarrhea rats [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2016, 22(3): 234-239.
- [5] 甄玉花, 李坤寅, 黄洁明, 等. 肝郁脾虚证动物模型构建研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(9): 121-124.
- [6] Singh P, Grabauskas G, Zhou SY, et al. High FOD-MAP diet causes barrier loss via lipopolysaccharide-mediated mast cell activation[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(22): e146529.
- [7] Zhang JD, Liu J, Zhu SW, et al. Berberine alleviates visceral hypersensitivity in rats by altering gut microbiome and suppressing spinal microglial activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(11): 1821-1833.
- [8] 李夏. 基于内质网自噬研究痛泻要方对 IBS-D 肝郁脾虚证的作用机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [9] Beyerlein L, Pohl D, Delco F, et al. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 27(8): 659-65.
- [10] Xue H, Zhang M, Ma J, et al. Lactose-Induced Chronic Diarrhea Results From Abnormal Luminal Microbial Fermentation and Disorder of Ion Transport in the Colon[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 877.
- [11] 章孝成, 丁锐, 张晓燕, 等. 轮状病毒感染 BALB/c 小鼠乳糖不耐受模型的建立[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(12): 1964-1967.
- [12] Kamphuis J, Guiard B, Leveque M, et al. Lactose and Fructo-oligosaccharides Increase Visceral Sensitivity in Mice via Glycation Processes, Increasing Mast Cell Density in Colonic Mucosa [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(3): 652-663. e6.
- [13] 蒋且英, 黄国勇, 孔小强, 等. 三种脾虚证建模方法建模效果的比较研究[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(11): 2780-2782.
- [14] Chen BR, Du LJ, He HQ, et al. Fructo-oligosaccharide intensifies visceral hypersensitivity and intestinal inflammation in a stress-induced irritable bowel syndrome mouse model[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(47): 8321-8333.
- [15] Fritscher-Ravens A, Pflaum T, Mösinger M, et al. Many Patients With Irritable Bowel Syndrome Have Atypical Food Allergies Not Associated With Immunoglobulin E[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(1): 109-118. e5.
- [16] Gao J, Xiong T, Grabauskas G, et al. Mucosal Serotonin Reuptake Transporter Expression in Irritable Bowel Syndrome Is Modulated by Gut Microbiota Via Mast Cell-Prostaglandin E2 [J]. *Gastroenterology*, 2022.
- [17] 刘伟, 刘莹莹, 高学清, 等. 益气固肠方治疗腹泻型肠易激综合症的疗效观察及对结肠组织 5-HT 和肥大细胞脱颗粒情况的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2018, 26(5): 411-415.
- [18] 刘鸿儒, 李俊, 陆明, 等. 疏肝健脾针法对肝郁脾虚证腹泻型肠易激综合征患者肠道菌群和血清 5-HT、NPY、CGRP 的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(2): 259-263.
- [19] 张婧娴, 芮俊乾, 陈逸凡, 等. 四逆散有效成分对内脏高敏感大鼠 5-HT 信号通路的多靶点协同调控[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16): 115-123.
- [20] 郑佳雯. 安肠止泻方对肝郁脾虚 IBS-D 大鼠血清及脑肠组织中 VIP、5-HT 含量影响的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.

(收稿日期: 2022-03-26)

(上接第 393 页)

- [23] 唐任斌. 肝胆管结石的微创手术治疗进展[J]. *医学理论与实践*, 2019, 32(12): 1826-1828.
- [24] 蒋鹏, 苏树英, 费凇, 等. 吡喹酮联合生长抑素预防 ERCP 术后胰腺炎[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2019, 31(4): 217-220, 232.
- [25] Sotoudehmanesh R, Ali-Asgari A, Khatibian M, et al. Pharmacological prophylaxis versus pancreatic duct stenting plus pharmacological prophylaxis for prevention of post-ERCP pancreatitis in high risk patients: a randomized trial[J]. *Endoscopy*, 2019, 51(10): 915-921.
- [26] Márta K, Gede N, Szakács Z, et al. Combined use of indomethacin and hydration is the best conservative approach for post-ERCP pancreatitis prevention: A network meta-analysis [J]. *Pancreatology*, 2021, 21(7): 1247-1255.
- [27] 周海斌, 邵杭锋, 金杭斌, 等. 内镜逆行胰胆管造影联合内镜下鼻胆管引流时限差异对 Mirizzi 综合征外科治疗的临床应用价值[J]. *中国内镜杂志*, 2021, 27(3): 1-6.
- [28] 刘海潮, 刘少朋, 苏宝威. 鼻胆管引流及引流时间对胆总管结石 ERCP 术后并发症的影响[J]. *河南医学研究*, 2020, 29(6): 1003-1005.

(收稿日期: 2022-03-26)