

# 兔直肠黏膜内脱垂模型的建立

柯敏辉<sup>1</sup> 叶 玲<sup>1</sup> 陈立武<sup>1</sup> 吴华嵩<sup>2</sup> 魏 霖<sup>1</sup> 郑鸣霄<sup>1</sup>

(1 福建中医药大学附属第二人民医院,福州,350003; 2 福建省中医药研究院,福州,350003)

**摘要** 目的:研制 IRP 兔模型。方法:取新西兰兔 30 只,随机分成正常组与造模组。造模组采用大黄和番泻叶灌胃、无水乙醇肛周注射与站立三种方法联合造 IRP 兔模型。比较正常组与造模组肛镜下直肠黏膜脱垂情况及直肠壁显微结构情况。结果:与正常组相比,造模组直肠黏膜内脱垂明显,直肠壁病理征象符合 IRP 的标准。结论:复合方法造 IRP 兔模型,方法可靠。

**关键词** 直肠黏膜内脱垂;兔;动物模型

## The Animal Model of Internal Rectal Prolapse in Rabbits

Ke Minhui<sup>1</sup>, Ye Ling<sup>1</sup>, Chen Liwu<sup>1</sup>, Wu Huasong<sup>2</sup>, Wei Lin<sup>1</sup>, Zheng Mingxiao<sup>1</sup>

(1 The Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350003, China;

2 Fujian Academy of TCM and Pharmacy, Fuzhou 350003, China)

**Abstract Objective:** To develop IRP rabbit model. **Methods:** Thirty New Zealand rabbits were randomly divided into normal group and model group. Three methods were conducted to make the rabbit models. The three methods contain rhubarb and senna gavage, perianal injection of anhydrous alcohol and stand. The prolapse of rectal mucosa under the anus mirror and the microscopic structure of rectum between the normal group and the model group were compared. **Results:** Compared with the normal group, internal rectal prolapse were significantly different in the model group. Pathological findings were in accordance with IRP standards. **Conclusion:** Composite method of IRP rabbit model is reliable.

**Key Words** Internal rectal prolapse; Rabbit; Animal Model

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.024

直肠黏膜内脱垂(Internal Rectal Prolapse, IRP)是指直肠黏膜层套叠入远端直肠腔或肛管内而未脱出肛门的一种功能性疾病,是常见出口梗阻型便秘的原因之一,以中老年女性较为多见<sup>[1]</sup>,其发病率为外脱垂的 3~10 倍<sup>[2]</sup>。本文旨在建立 IRP 兔模型,为 IRP 的治疗和基础研究提供工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物及分组 30 只健康新西兰兔,1 月龄,雌雄各半,体重 0.7~0.8 kg,由上海松联实验动物养殖场提供,许可证号:scxk(沪)2007-0011。将 30 只兔按性别分层,按随机数字表随机分为正常组 6 只、造模组 24 只。正常组饲养方法如下:每只兔单笼饲养,照明 12 h 控制,温度 22~25 ℃ 及相对湿度 40%~70%,予 150~180 g/d 足量颗粒饲料饲养,自由饮水,适应性驯养 1 周后实验。造模组在正常组饲养方法基础上,加入造模方法。兔由福建省中医药研究院动物房统一饲养,对兔的处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[3]</sup>。

1.1.2 药物及试剂 1)生大黄液的制备。生大黄购自福建中医药大学附属第二人民医院。制备:生大黄 1 000 g,4 000 mL 自来水浸泡 30 min。第 1 次水煎,沸后 20 min 倒出。第 2、3 次各加 80 ℃ 水 2 000 mL,沸后 5 min 即可倒出。混合 3 次煎液,纱布过滤浓缩至 1 000 mL,配成 100% 生大黄水煎液。4 ℃ 冰箱存贮,临用温育。

2)番泻叶液的制备。番泻叶购自福建中医药大学附属第二人民医院。制备:200 g 番泻叶浸入 100 ℃ 1 000 mL 自来水,充分搅拌 30 min 后用纱布过滤出约 600 mL。4 ℃ 冰箱存贮,临用温育。

3)无水乙醇。购自上海南翔试剂有限公司。

1.2 造模方法 采用大黄和番泻叶灌胃、无水乙醇肛周局部注射与站立三种方法联合造 IRP 兔模型,造模时间 2 个月。

1.2.1 中药灌胃 根据国家卫生部《中药新药临床研究指导原则》(1993)<sup>[4]</sup>和兔的生物学特性,由中药大黄与番泻叶联合灌胃致兔缓泻,缓泻粪便质地以 1 分至 3 分之间为度(以下兔粪便质地评分标准参见表

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173272);福建省中医临床研究基地重点专科(专病)项目(编号:zlcgc04)

通信作者:叶玲(1957—),女,福州,主任医师,学士,主要从事肛门直肠疾病的临床研究,E-mail:yeling0223@163.com

第一作者:柯敏辉(1981—),男,福州,主治医师,中西医结合临床硕士,主要从事肛门直肠疾病的临床研究,E-mail:48330132@qq.com

1)。起始每日生大黄液按 20 mL/kg 灌胃 1 次。若连续 2 日出现 3 分以上粪便,则生大黄液的灌胃量在之前基础按 5 mL/kg 减量。若出现 1 日 0 分粪便,则生大黄液的灌胃量在之前基础上按 5 mL/kg 追加,追加直至每日 30 mL/kg。此后若排 1 日 0 分粪便,则在生大黄液灌胃 30 mL/kg 的基础上加用番泻叶液 5 mL/kg 灌胃。若继续排 1 日 0 分粪便,番泻叶液灌胃量在之前基础上按 5 mL/kg 追加。若连续 2 日出现 3 分以上粪便,则番泻叶液在之前基础上按 5 mL/kg 减量。连续每日灌胃 2 个月。

表 1 兔粪便质地评分标准

| 粪便质地                  | 分值  |
|-----------------------|-----|
| 正常便(质硬成形)             | 0 分 |
| 约 3/4 正常便,约 1/4 质软不成形 | 1 分 |
| 约 1/4 正常便,约 3/4 质软不成形 | 2 分 |
| 约 1/4 稀便,约 3/4 软便和正常便 | 3 分 |
| 约 3/4 稀便,约 1/4 软便和正常便 | 4 分 |
| 全部稀便                  | 5 分 |

1.2.2 无水乙醇肛周注射 在中药灌胃前 1 d,将兔固定,碘伏消毒兔肛周组织,以 1 mL 注射器于截石位 3、5、6、7、9 点肛门边缘分别柱状注射无水乙醇 0.3 ~ 0.4 mL。注射时需回抽,勿将药液注入血液,注射深度以 1 cm 为宜。若注射时兔发出惊叫等异常声响立即停止进针,避免惊吓死亡。若注射时兔后肢突然蹬腿,考虑刺入坐骨神经,即时退针。造模期间注射无水乙醇 1 次。

1.2.3 兔站立 将兔置于兔固定架中,将固定架直立,兔后肢末端需接触地面,站立 5 h。连续每日站立 2 个月。

### 1.3 诊断标准及观察方法

1.3.1 IRP 兔模型诊断标准 根据兔的生物学特性,参照 2002 年中华中医药学会肛肠分会制定的直肠脱垂诊断标准<sup>[5]</sup>和武忠弼<sup>[6]</sup>等在《中华外科病理学》中描述的直肠脱垂病理征象,确定 IRP 兔模型诊断标准如下:1)肛镜检查见松弛的直肠黏膜遮挡肛镜视野范围在 3/4 以上;2)排便时兔直肠黏膜未脱出肛外;3)直肠壁 HE 染色镜下见固有层腺体组织增生,血管扩张充血,间质炎细胞浸润聚集,间质水肿、疏松。

1.3.2 观察方法 1)症状与体征。实验前后观察兔的神志、饮食、体重、二便、背部及下腹部皮毛情况;观察兔排便时是否直肠黏膜脱出肛外;肛门镜下观察兔直肠黏膜脱垂情况。

2)病理形态学观察。实验 2 个月后解剖两组兔直肠,取材距肛管 1 cm 的直肠组织固定于 4% 多聚甲醛

缓冲液中。常规石蜡包埋、切片、HE 染色行病理学检查。

## 2 结果

### 2.1 症状与体征

2.1.1 实验前 30 只兔均反应敏捷,呼吸、饮食、体重正常,排质硬成形粪便,排尿正常,兔背毛色光泽,下腹部未见脱毛。肛镜下兔直肠黏膜未见隆起(参见图 1)。排便时未见兔直肠黏膜脱出。实验两组具有可比性。

2.1.2 实验 2 个月后正常组 兔存活 6 只。存活兔均反应敏捷,呼吸、饮食、体重正常,排质硬成形粪便,排尿正常,兔背毛色光泽,下腹部未见脱毛。肛镜下见 1 只兔直肠黏膜稍隆起(参见图 2),余 5 只兔直肠黏膜未见隆起(参见图 1)。排便时均未见直肠黏膜脱出肛外。

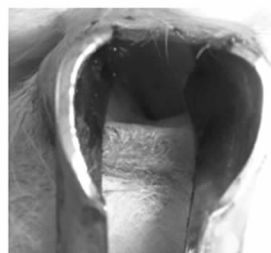


图1 正常直肠黏膜



图2 直肠黏膜稍隆起



图3 直肠黏膜隆起、套叠

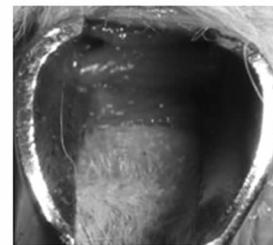


图4 直肠黏膜隆起、套叠



图5 倦怠、消瘦,背毛枯槁不荣



图6 下腹部脱毛,皮毛脏乱

2.1.3 实验 2 个月后造模组 兔存活 17 只(其中因连续几日急性腹泻、拒食死亡 4 只,因注射无水乙醇后肢偏瘫、拒食死亡 1 只,因注射无水乙醇肛周皮下组织坏死、拒食死亡 1 只,不明原因腹胀、拒食死亡 1 只)。存活兔嗜卧倦怠,反应欠敏捷,食欲下降,体重下降、消瘦,背毛脏乱、枯槁不荣(参见图 5),下腹部不同程度的脱毛(参见图 6),排尿正常,排质软、不成形为主粪

便。肛镜下均可见直肠黏膜隆起、套叠,遮挡肛镜视野范围在3/4以上(参见图3、图4)。排便时均无直肠黏膜脱出肛外。

## 2.2 病理形态学观察

2.2.1 正常组兔直肠壁 HE 染色镜下示 黏膜上皮有序排列,固有层腺体排列齐整,腺上皮细胞分化良好,黏膜肌层至浆膜层比例正常,间质未见充血、水肿(参见图7)。

2.2.2 造模组兔直肠壁 HE 染色镜下示 固有层腺体组织增生,血管扩张充血,间质炎细胞浸润聚集,间质水肿、疏松(参见图8-图12)。

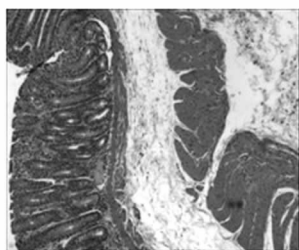


图7 兔直肠正常结构 4X10

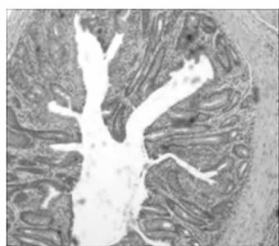


图8 腺体增生,呈绒毛状隆起,见腔隙样结构 10X10

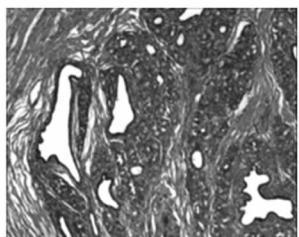


图9 血管扩张增生 4X10

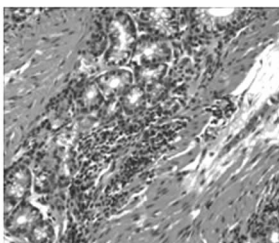


图10 间质见炎细胞浸润聚集 4X10

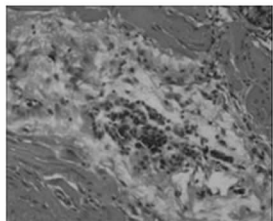


图11 间质水肿、疏松 4X10

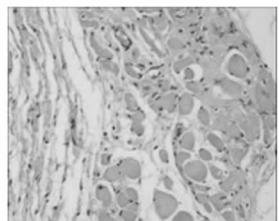


图12 间质血管扩张,纤维结缔组织肿胀 10X10

## 3 讨论

《五十二病方》最先记载脱肛病,《神农本草经》首见该病名<sup>[7]</sup>。《难经》云:“病之虚实,入者为实,出者为虚,肛门脱出,非虚而何?”中医认为脱肛是由气虚运化失调,不能游溢精气,中气不足,气虚不固,内脏下脱,年久失治则脱出不纳<sup>[8]</sup>。参照此病机,研究以脾虚气陷为造 IRP 兔模型的理论依据。刘晓玲<sup>[9]</sup>认为大黄、番泻叶是制作脾虚气陷证动物模型的经典用药,故选用大黄、番泻叶灌胃2个月,久泄伤脾,脾气虚衰,升

举无力,内脏失于举托致脱肛。兔平素喜四肢着地活动,偶尔站立。久立属中医“五劳”之一,久立将伤骨劳肾,劳累过度易致中气下陷,故纳入久立作为造模方法之一。西医认为附着直肠周围的组织松弛可导致 IRP 的发生<sup>[10]</sup>。肛周局部注射坏死剂无水乙醇,导致末梢神经发生变性,出现传导功能阻滞<sup>[11]</sup>,使该神经的效应肌发生功能障碍,达到肛门括约肌张力减弱,肛管松弛引起直肠黏膜下脱。结合中西医理论,本研究采用大黄和番泻叶灌胃、无水乙醇肛周局部注射与站立三种方法联合造 IRP 兔模型。

课题选用1月龄兔为研究对象,因1月龄兔刚离乳,相当于人婴幼儿期,婴幼儿气血未旺、中气不足易发生 IRP。前期参考相关文献,运用大黄、番泻叶灌胃致急性泻下制作 IRP 兔模型,结果失败。失败的启示如下:1)连续排稀便数日易致幼兔死亡,解剖死亡兔发现直肠壁以水肿、瘀血为主要表现,未见黏膜脱垂;2)兔与人不同,平素喜排硬便,泻下粪便应以便质软、不成形为主,不可以稀便为主;3)兔对泻下中药易耐受,需逐步加量方可泻下;4)部分兔易感染而腹泻死亡,应注意环境清洁;5)避免幼兔受突然的惊吓(如噪音等)。此后改进中药灌胃方案,减少中药灌胃量并延长灌胃时间,运用缓泻的方法造模。前期运用兔在跑笼中跑步、站立等方法让兔疲劳造模,因兔不能适应跑笼中跑步等各种原因,经预实验确定兔站立5h为造模方法之一。前期运用无水乙醇肛周注射发现:若无水乙醇注入过深,可能刺入坐骨神经引起兔后肢瘫痪或刺入腹腔导致兔死亡;若注射过浅在皮下,可能无水乙醇沿皮下浸润至下腹、骶尾、背部等处,导致浸润处组织坏死;若注射量多,无水乙醇易浸润至肛门周皮下,引起组织坏死;若注射量少,可能达不到神经阻滞的效果。经预实验确定无水乙醇肛周注射进针约1cm、量约2mL为造模方法之一。运用解剖、病理等方法对不同造模时间段的兔进行比对,发现两个月为制作 IRP 兔模型适宜时间段。

在造模标准的制定上,兔的肛镜检查标准参照王贵祥<sup>[12]</sup>、石章铁<sup>[13]</sup>等临床诊断 IRP 的标准制定,从宏观角度反映直肠黏膜的变化。病理标准参照武忠弼<sup>[6]</sup>、李鹤文<sup>[14]</sup>、王振军<sup>[15]</sup>等的描述,结合前期对 IRP 兔的直肠壁病理分析制定,从腺体、血管、间质等显微角度反映直肠壁结构的改变。运用宏观与微观两种手段来评价 IRP 兔模型具有可行性。但本研究存在不足之处:1)提高兔的存活率。需要从避免急性腹泻的发生、提高无水乙醇的注射技术(避免注入肛周皮下间隙

(下接第1464页)

0.326) 比较, 增液汤组 AQP1 (灰度值  $4.227 \pm 1.032$ ) 表达明显增强 ( $P < 0.01$ ); AQP8 增液汤组与模型组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

增液汤在《温病条辨》中治疗温病后期, 津亏肠燥证。基于中医理论思考分析, 温病首先犯肺, 肺为水之上源, 通调水道, 输布水液, 且肺与大肠相表里, 所以温病发热会导致肺运转水液功能下降, 进而导致肠道津液亏竭。本项目主要探索增液汤对干燥综合征模型水通道蛋白的调节规律, 进而证明增液汤对干燥综合征患者的整体治疗作用。结合本方主治证及脏腑表里关联性, 对肺及结肠组织中水通道蛋白 AQP1 及 AQP8 进行研究。研究结果显示, 增液汤干预下 AQP1 在肺泡毛细血管间及肠上皮细胞表达, 与模型组比较表达明显增强 ( $P < 0.01$ )。AQP8 在肺及结肠组织的表达明显, 分布均匀, 但各组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), western blot 结果与免疫组化趋同。Towne 等<sup>[2]</sup>发现, 小鼠急性肺部腺病毒感染后 7~14 d, 肺组织中 AQP1 的表达均显著减少, 说明 AQP1 与肺组织水液运转具有相关性。在近 20 年的研究中陆续发现了水通道家族 (aquaporins, AQPs) 中的 13 种亚型 (AQP0 - AQP12)<sup>[3]</sup>。AQP1 是在人体分布最广泛的水通道蛋

白, 在机体的各个组织广泛表达, 提示其在维持体内水平衡过程中起重要作用<sup>[4]</sup>。如果 AQP1 是增液汤的靶点, 说明增液汤“增水行舟”非独润肠, 可同时参与全身多组织的津液调节<sup>[5]</sup>。同时, 肺与结肠组织中 AQP1 的相关性, 是否为“肺与大肠相表里”的联接靶点之一, 尚需进一步通过研究验证。我们的研究明确了养阴中药作用于机体的靶点, 并深入阐释了“增水行舟”的内涵。

### 参考文献

- [1] Steinfeld S, Cogan E, King LS, et al. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients [J]. Lab Invest, 2001, 81(2): 143-148.
- [2] Towne JE, Harrod KS, Krane CM, et al. Decreased Expression of aquaporin AQP1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22: 34-44.
- [3] Castle NA. Aquaporins as targets for drug discovery [J]. Drug Discovery Today, 2005, 10(7): 485.
- [4] 谭美芸. 水通道 AQP1 的研究进展 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(9): 241-243.
- [5] 吴晓丹, 孙丽英, 马伯艳. 《温病条辨》增液汤功效探析 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(6): 351-352.

(2013-07-17 收稿)

(上接第 1460 页)

或刺入坐骨神经) 等方面入手。2) 模型的稳定性, IRP 兔外因去除后是否存在自愈的可能需进一步研究。

综上, 本研究运用联合方法造模, 可重复性强, 为 IRP 的进一步探讨和研究提供了良好的模型和实验依据。

### 参考文献

- [1] 纪宗正, 吴涛. 直肠内脱垂的外科治疗 [J]. 临床外科杂志, 2011, 19(4): 219-220.
- [2] 何永恒, 凌光烈. 中医肛肠科学 [M]. 北京: 清化大学出版社, 2011: 181, 190.
- [3] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [S]. 2006-09-30.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 [S]. 1993. 91.
- [5] 中华中医药学会肛肠分会. 痔、肛瘘、肛裂、直肠脱垂的诊断标准 (试行草案) [S]. 2002-11.
- [6] 武忠弼, 杨光华. 中华外科病理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 765.
- [7] 陈凌燕. 健脾固脱汤配合针灸疗法治疗小儿直肠脱垂 13 例疗效观察

[J]. 世界最新医学信息文摘, 2012, 12(12): 233.

- [8] 朱佑旺, 胡红明. 消痔灵加补中益气汤治疗脱肛 86 例体会 [J]. 武警医学院学报, 2011, 20(7): 568-569.
- [9] 刘晓玲. 补中益气汤对脾虚大鼠胃黏膜 TFFI 表达及 MEK/ERK 通路的影响 [M]. 广州中医药大学, 2011: 11.
- [10] 刘佃温, 范培. 中药联合 PPH 技术治疗直肠内脱垂 43 例 [J]. 光明中医, 2012, 27(3): 535-536.
- [11] McLeod NM, Patton DW. Peripheral alcohol injections in the management of trigeminal neuralgia [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 104(1): 12-17.
- [12] 王贵祥. 不同方法治疗混合痔合并直肠黏膜内脱垂 156 例 [J]. 陕西医学杂志, 2012, 41(7): 808-810.
- [13] 石章铁, 汪毓敏, 曾庆阳, 等. 混合痔合并直肠黏膜内脱垂的治疗 [J]. 医学信息, 2011, 24(12): 67.
- [14] 李鹤文. 直肠黏膜内脱垂和 3-4 度痔的微创治疗 [J]. 中国医药指南, 2007, 9: 19-20.
- [15] 王振军, 汤秀英, 王东, 等. 内痔的病理形态改变特征及其意义 [J]. 中华外科杂志, 2006, 44(3): 177-180.

(2013-06-17 收稿)