

实验研究

基于不同精神心理应激建立 IBS-D 大鼠模型的比较研究

张北华¹ 王 微² 王凤云¹ 唐旭东¹

(1 中国中医科学院西苑医院,北京,100091; 2 北京市中西医结合医院,北京,100039)

摘要 目的:比较基于母子分离、慢性束缚等不同精神心理应激建立 IBS-D 大鼠模型的特征差异,探索建立 IBS-D 大鼠模型的理想方法。方法:将 40 只新生期 SD 大鼠随机分为母子分离组和非母子分离组,每组 20 只,母子分离组大鼠第 2~14 天每天与母鼠分离 3 h,其余大鼠不分离。第 9 周,将非母子分离组随机分为正常组(N 组)、慢性束缚组(R 组),将母子分离组随机分为单一母子分离组(S 组)和联合应激组(SR 组),每组 10 只。R 组和 SR 组大鼠采用自制束缚架进行制动束缚应激,3 h/d,连续 3 周,其余 2 组不予束缚。在束缚期的最后 1 周,N 组大鼠予生理盐水灌胃,其余 3 组大鼠均予番泻叶煎剂(0.45 g/mL)灌胃(4.5 g/kg),连续 7 d。检测评价 4 组大鼠成年期束缚应激前后内脏敏感性、大便积分、旷场行为学,以及造模后血清 5 羟色胺水平、近端结肠常规病理、肥大细胞及嗜铬细胞数量。结果:1) 内脏敏感性:束缚应激前,经历母子分离应激组(S 组、SR 组)大鼠痛觉阈值明显低于非母子分离应激组(N 组、R 组)($P < 0.05$);束缚应激后,S 组和 SR 组大鼠痛觉阈值显著低于 N 组($P < 0.05$),R 组与 N 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。2) 大便积分:S 组、R 组及 SR 组大便积分均明显高于正常组($P < 0.05$),SR 组明显高于 R 组和 S 组($P < 0.05$)。3) 旷场行为学特征:束缚应激前,S 和 SR 组大鼠旷场穿格数有低于 N 和 R 组的趋势,但站立数均明显低于 N 和 R 组($P < 0.05$);束缚应激后,R 组、S 组、R 组大鼠旷场穿格数及站立数均明显低于 N 组($P < 0.05$),SR 组穿格数明显低于 S 组($P < 0.05$)。4) 血清 5-HT 水平:S 组和 SR 组大鼠血清 5-HT 水平明显高于 N 组($P < 0.05$),R 组与 N 组差异无统计学意义,SR 组明显高于 S 组和 R 组($P < 0.05$)。5) 近端结肠病理及 MC、EC 数目:4 组大鼠结肠病理未见异常。SR 组大鼠近端结肠 MC 数目明显多于 N 组($P < 0.05$),其余各组与 N 组差异无统计学意义。S 组、R 组及 SR 组结肠嗜铬细胞数目均明显高于 N 组($P < 0.05$),SR 组与 S 组和 R 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:基于母子分离联合慢性束缚应激及番泻叶灌胃可复制 IBS-D 大鼠模型,该模型具有内脏敏感性增高、排便异常和抑郁样行为特征。

关键词 腹泻型肠易激综合征;造模方法;精神心理应激;比较研究

Comparative Study of Establishment of a Rat Model of IBS-D Based on Different Psychological Stress

Zhang Beihua¹, Wang Wei², Wang Fengyun¹, Tang Xudong¹

(1 Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2 Beijing Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing 100039, China)

Abstract Objective: To explore a reliable rat model of IBS-D by comparing the differences of different psychological stress. **Methods:** A total of 40 neonatal rats were randomly divided into 2 groups: normal group and maternal separation group. The pups in the maternal separation group were exposed to 3 h period daily maternal separation from postnatal day 2~14, and then they were randomly divided into single maternal separation group(S) and combined stress group (SR) in the 9th week. The pups in the other group were left untreated and then were randomly divided into normal group (N) and chronic restraint stress group(R) in the 9th week. The group R and SR underwent chronic restraint stress by specially designed restraint frame 3 h daily for 3 weeks. The group N and S were left untreated. In the 12th week, the group N was given normal saline by gavage, the group R, S and SR were given Senna decoction (0.45 g/mL) by gavage(4.5 g/kg) for 7 days. The visceral sensitivity was tested and the animal behavior was evaluated by open field test before and after the chronic restraint stress. The fecal scores were calculated. The level of serum 5-HT, the number of mast cells (MC) and enterochromaffin cell (EC) of the proximal colon were tested after the modeling. **Results:** 1) Visceral sensitivity: Before the restraint stress, the pain threshold of the maternal separation group(S, SR) were lower

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81403393,81173209,81373580)

作者简介:张北华(1983.09—),男,博士,主治医师,研究方向:中医药防治功能性胃肠病的基础与临床研究,E-mail:zhangbeihua888@163.com

通信作者:唐旭东(1963.03—),男,博士,博士研究生导师,主任医师,研究方向:中医药防治消化系统疾病研究,E-mail:txdy@sina.com

compared to the other group(N,R) ($P<0.05$). After the modeling, the pain threshold of the group S and SR were lower than group N ($P<0.05$), and there was no significant difference between the group R and N. 2) Fecal score;The fecal scores of group S, R, SR were significantly higher than the group N ($P<0.05$), the fecal score of group SR was significantly higher than the group S and R ($P<0.05$). 3) Open field test;Before the restraint stress, the horizontal motion of the group S and SR tend to decrease compared to the group N,R, while the vertical motion of the group S and SR were significantly lower compared to the group N,R($P<0.05$). After the modeling, the horizontal and vertical motion of the group S and SR significantly decreased compared to group N ($P<0.05$). The horizontal motion of group SR was significantly decreased compared to the group S ($P<0.05$). 4) Serum 5-HT;The level of serum 5-HT increased in the group S and SR compared to the group N ($P<0.05$). There was no significant difference between the group R and N. And the level of serum 5-HT increased in the group SR compared to the group N ($P<0.05$). 5) Pathological features, the number of MC and EC in the proximal colon;There were no obvious abnormality in the Pathological features. The number of the MC in group SR increased significantly compared to the group N ($P<0.05$),but there was no significant difference in the other groups. The number of EC in group R,S and SR increased significantly compared to group N ($P<0.05$). There were no significant difference among the group R, S and SR. **Conclusion:**The maternal separation stress, combined with chronic restraint stress and senna decoction by gavage could duplicate the IBS-D rat model, which is characterized with visceral hypersensitivity, abnormal defecation and depression.

Key Words Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Modeling methods; Psychological stress; Comparative study

中图分类号:R282;R-332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.035

肠易激综合征 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) 是一种以反复发作的腹痛,与排便相关或伴排便习惯改变的功能性肠病^[1]。根据排便习惯改变的主要表现将 IBS 分为 IBS 腹泻型 (IBS-D)、IBS 便秘型 (IBS-C)、IBS 混合型 (IBS-M) 和 IBS 不定型 (IBS-U)。我国以 IBS-D 最多见,一项多中心的调查研究显示符合罗马 III 标准的 IBS-D 患者约占 66.3%^[2]。IBS-D 的病因复杂,发病机制尚未完全阐明,大量的研究表明早期不良生活事件和精神疾病与 IBS 的发病具有密切的关系^[3-4]。母子分离和束缚应激作为 2 种不同的精神心理因素早已被用于建立 IBS 动物模型研究^[5-6],这 2 种方法均可导致实验大鼠内脏敏感性增高,排便异常。目前尚无公认的 IBS-D 动物模型,有研究采用病原体灌胃和化学物质灌肠法造模模拟 IBS-D^[7-8],也有研究基于内脏高敏感动物模型叠加致泻因素造模^[9]。本研究拟采用精神心理应激叠加致泻因素建立 IBS-D 大鼠模型,并比较分析不同精神心理应激造模方法的特征和差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级 SD 孕鼠 8 只,孕期(18±2)d,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证编号:SCXK(京)2012-0001,选用新生雄性大鼠造模,全部饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心(室温 22~25℃,相对湿度 45%~60%,光照周期 12 h/12 h,自由进食、饮水)。

1.1.2 药物 番泻叶水煎剂(0.45 g 生药/mL),由

中国中医科学院西苑医院制剂室统一制作。

1.1.3 试剂与仪器 5-HT ELISA 试剂盒,购至 Abnova 公司(货号:KA1894);肥大细胞试剂盒,购至厦门迈威生物科技有限公司(货号:MT-022);5-HT 即用型抗体,购至北京中杉金桥生物技术有限公司(货号:ZA-0231);通用型二步法免疫组化检测试剂盒,购至北京中杉金桥生物技术有限公司(货号:PV-6000)。参照文献^[10]自制直肠测压计,参照文献^[11]自制 T 型大鼠束缚架和木质旷场箱(长和宽各 100 cm、高 40 cm,每列每行各画 5 个方格,中央 9 个为中央格,外周 16 个格称外周格)。Multi-skan MK3 酶标仪由 Thermo 公司生产。BX51 光学显微镜和 BX41 图像采集系统均由日本 Olympus 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将新生期 SD 大鼠随机分为非母子分离组和母子分离组,每组 20 只。母子分离组大鼠从出生后第 2~14 天,每天与母鼠分离 3 h。非母子分离组不予分离。第 9 周,将非母子分离组随机分为正常组(N 组)和慢性束缚组(R 组),将母子分离组随机分为单一母子分离组(S 组)和联合应激组(SR 组),每组 10 只。参照文献^[11]采用自制束缚架将 R 组和 SR 组大鼠每天制动束缚 3 h,连续 3 周,其余 2 组不予束缚。在束缚期第 3 周,正常组给予生理盐水灌胃,其余各组给予番泻叶水煎剂(0.45 g/mL)灌胃(1 mL/100 g),连续 1 周。

1.2.2 内脏敏感性的评价 参照文献^[10],将 AWR 评分=3 时的压力数作为疼痛阈值,于束缚应激前

后分别采用自制直肠测压计检测 4 组大鼠的疼痛阈值,评价其内脏敏感性。

1.2.3 大便评分 参照文献^[12] 制定大便评分标准:硬便 1 分,软便 2 分,不成形便 3 分,观察造模结束后 4 组大鼠每天 6 h 内的大便情况,连续观察 5 d。

1.2.4 旷场行为学评价 在束缚应激前后采用自制木质旷场箱观察 4 组大鼠的行为学特征。实验在安静、四周无外界干扰并杜绝参照物的环境条件下进行,旷场箱上方安置摄像头,操作者轻轻将大鼠放入旷场箱的正中格内,开始同步录像,观察 5 min 内大鼠活动情况。观察总穿格数(三爪以上跨入同一格的次数)和站立次数(两前肢向上抬起离开箱底面或攀伏在侧壁上以后腿支撑使身体竖立的次数)。

1.2.5 检测指标与方法 采用水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,于 4 ℃ 2 500 r/min 离心 15 min,取上清液分装至 2 mL EP 管中, - 20 ℃ 冰箱保存备用,采用 ELISA 法检测 4 组大鼠血清中 5-HT 含量。处死大鼠后,截取距盲肠 3 cm 处的结肠组织,放入 10% 的中性甲醛溶液中固定,采用石蜡包埋切片,采用苏木精伊红(HE)染色观察 4 组结肠组织中的常规病理特征,采用甲苯胺蓝改良染色法观察肥大细胞(MC)数目,采用 5-HT 免疫组化法观察嗜铬细胞(EC)数目,每组 10 个样本,每个样本切片随机选 3 个视野观察。

1.3 统计学方法 采用 SAS 8.0 统计软件进行分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若符合正态分布且方差齐性,多组数据比较则采用参数统计的单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;若数据呈偏态分布或方差不齐,则采用非参数检验中的多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较采用 SNK-q 法进行统计处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内脏敏感性 在束缚应激前,与非母子分离应激组(N 组、R 组)比较,母子分离组(S 组、SR 组)痛觉阈值显著降低($P < 0.05$)。在束缚应激后,与 N 组比较,S 组、SR2 组痛觉阈值均显著降低($P <$

0.05);R 组痛觉阈值有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。SR 组痛觉阈值均显著低于 R 组、S 组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 大便积分 造模期间,经母子分离应激大鼠成年后大便频次和性状无明显变化,短期束缚应激可使正常大鼠和母子分离大鼠的排便频次均明显增加,束缚一周后大便频次逐渐减少至正常,但大便含水量明显增加。经番泻叶灌胃可使 4 组大鼠出现急性腹泻,出现水样便或不成形便,但随着药物作用的消失,大便逐渐成形,含水量仍有增加。造模结束后,与 N 组比较,R 组、S 组、SR 组 3 组大鼠大便积分均显著增高($P < 0.05$)。SR 组大便积分显著高于 R 组、S 组($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 旷场行为学 在束缚应激前,母子分离应激组(S 组、SR 组)的穿格数较非母子分离应激组(N 组、R 组)有减少趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);母子分离应激组(S 组、SR 组)的站立数明显低于非母子分离应激组(N、R 组)($P < 0.05$),SR 组的站立数明显低于 R 组($P < 0.05$),与 S 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。在束缚应激结束后,与 N 组比较,R 组、S 组、SR3 组的站立数及穿格数均显著降低($P < 0.05$),SR 组的穿格数明显低于 S 组($P < 0.05$),与 R 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。SR 组的站立数与 R 组、S 组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 血清 5-HT 水平 与 N 组比较,S 组及 SR 组血清 5-HT 水平显著升高($P < 0.05$),R 组与之差异无统计学意义($P > 0.05$)。SR 组与 R 组、S 组比较,血清 5-HT 水平均显著升高($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 4 组大鼠束缚应激前后的痛觉阈值(mmHg, $n = 10$)

组别	束缚应激前	束缚应激后
正常组(N 组)	34.33 ± 1.49	39.20 ± 3.31
慢性束缚组(R 组)	35.87 ± 2.78	36.60 ± 4.52
母子分离组(S 组)	29.47 ± 1.66 *	28.60 ± 1.50 *
联合应激组(SR 组)	29.40 ± 1.98 * △	25.40 ± 3.11 * △ ▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与慢性束缚组比较,△ $P < 0.05$;与母子分离组比较,▲ $P < 0.05$

表 2 4 组大鼠造模后每天 6 h 内的大便积分(分, $n = 10$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	平均大便积分
正常组(N 组)	5.7	5.5	5.8	5.7	6	5.74 ± 0.18
慢性束缚组(R 组)	7.4	7.3	6.7	6.8	6	6.84 ± 0.56 *
母子分离组(S 组)	7.2	7	6.9	6.3	6.5	6.78 ± 0.37 *
联合应激组(SR 组)	10.4	9.5	10	9.4	9.1	9.68 ± 0.52 * △ ▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与慢性束缚组比较,△ $P < 0.05$;与母子分离组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 4 组大鼠束缚应激前后旷场行为学结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	束缚应激前		束缚应激后	
	穿格数	站立数	穿格数	站立数
正常组(N 组)	92.80 ± 18.04	26.30 ± 6.15	71.90 ± 8.86	10.60 ± 1.65
慢性束缚组(R 组)	83.90 ± 12.38	24.70 ± 4.16	22.40 ± 5.54 *	2.60 ± 1.26 *
母子分离组(S 组)	76.80 ± 13.93	18.00 ± 4.88 *	30.80 ± 7.87 *	4.00 ± 2.58 *
联合应激组(SR 组)	79.00 ± 15.43	18.40 ± 7.55 * [△]	20.30 ± 3.43 * [▲]	2.50 ± 1.90 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与慢性束缚组比较,[△] $P < 0.05$;与母子分离组比较,[▲] $P < 0.05$

表 4 4 组大鼠血清 5-HT 水平 (ng/mL, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	5-HT
正常组(N 组)	88.95 ± 23.91
慢性束缚组(R 组)	111.86 ± 53.26
母子分离组(S 组)	193.47 ± 34.00 *
联合应激组(SR 组)	295.84 ± 104.27 * ^{△▲}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与慢性束缚组比较,[△] $P < 0.05$;与母子分离组比较,[▲] $P < 0.05$

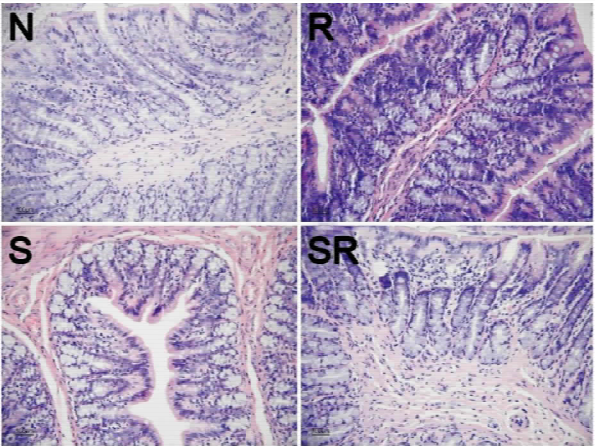


图 1 近端结肠组织病理(HE 染色,×200)

注:N 为正常组;R 为慢性束缚组;S 为母子分离组;SR 为联合应激组

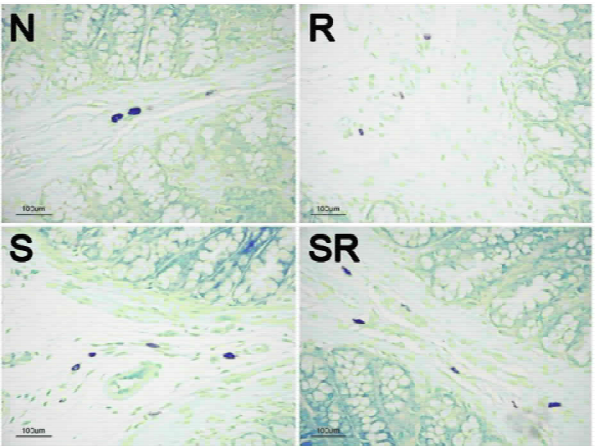


图 2 近端结肠 MC 细胞甲苯胺蓝染色(×400)

注:N 正常组;R 慢性束缚组;S 母子分离组;SR 联合应激组

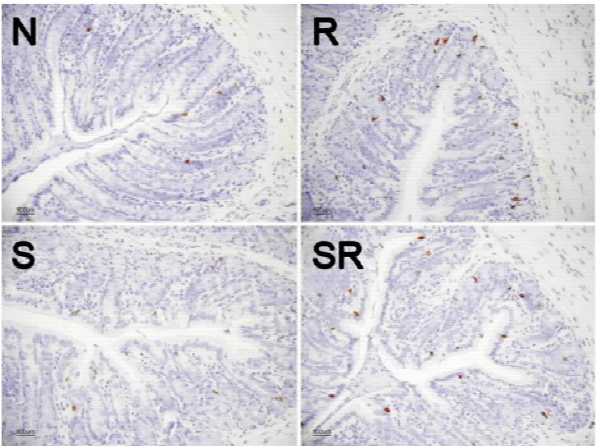


图 3 近端结肠组织 5-HT 免疫组化染色(×200)

注:N 为正常组;R 为慢性束缚组;S 为母子分离组;SR 为联合应激组

2.5 近端结肠病理及 MC、EC 计数 结肠常规病理显示: N 组结肠无异常, R 组、S 组、SR 组 3 组结肠均有轻微充血, 未见明显中性粒细胞浸润和间质水肿。见图 1。甲苯胺蓝改良染色结果显示: 光镜下 MC 胞质被染成紫红色, 胞核呈蓝色, 散布于黏膜固有层、黏膜下层。见图 2。与 N 组比较, SR 组大鼠近端结肠 MC 数目增多 ($P < 0.05$), 与 S 组比较, 差异无显著性意义。免疫组化染色显示: EC 分布于肠黏膜层, 主要分布于肠腺腔内, 细胞呈椭圆形、星状、楔形或不规则形, 细胞质着色。见图 3。与 N 组比较, R 组、S 组、SR 组 3 组近端结肠 EC 数目显著增多 ($P < 0.05$), SR 组与 R 组、S 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 4 组大鼠近端结肠肥大细胞、嗜铬细胞计数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	结肠 MC(×400)	结肠 EC(×200)
正常组(N 组)	1.00 ± 1.98	9.90 ± 9.09
慢性束缚组(R 组)	1.40 ± 1.94	15.63 ± 5.68 *
母子分离组(S 组)	1.23 ± 1.48	15.07 ± 6.34 *
联合应激组(SR 组)	1.47 ± 1.04 *	16.77 ± 5.81 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

3 讨论

罗马Ⅳ标准规定 IBS-D 除具有腹痛症状外,超过 25% 的排便为 Bristol 粪便性状 6 型或 7 型,且少于 25% 的排便 Bristol 粪便性状 1 型或 2 型。其病理生理机制主要包括内脏敏感性增高、结肠动力增强、肠上皮通透性增加、脑-肠轴功能异常等等^[13-14]。所以理想的 IBS-D 大鼠模型应具备上述病理生理特征。

本研究结果显示长期单一束缚应激(制动束缚,每天 3 h,连续 21 d)并不能提高实验大鼠的敏感性,与文献报道慢性不可预知应激(7 种刺激因素,随机安排不重复,连续 21 d)可导致成年大鼠内脏敏感性增高结果不同^[15],可能与长期单一束缚应激导致大鼠适应有关。早在 1988 年 Williams 等^[5]采用限制部分活动的急性束缚应激诱发排便异常的大鼠模型模拟 IBS,该方法可促进结肠运动,增加排便粒数,这种急性束缚应激同样可使实验大鼠内脏敏感性增高^[16]。有研究比较了急性和慢性束缚应激的差异,结果显示连续 4 d 的慢性束缚应激也可提高大鼠的内脏敏感性,但低于急性束缚应激^[17]。另有研究显示急性和慢性束缚应激对大鼠内脏敏感性的影响是暂时的,急性束缚应激短暂提高大鼠血浆促肾上腺皮质激素及皮质酮水平,而慢性束缚应激可长期提高这些激素水平^[18]。

本研究结果显示母子分离应激可显著降低实验大鼠的痛觉阈值,说明母子分离应激可提高大鼠的内脏敏感性,与既往报道一致^[6,19]。本研究发现间隔 3 周时间重复检测痛觉阈值,母子分离应激所致大鼠内脏高敏感性依然存在,说明母子分离应激所致内脏高敏感性大鼠模型持久稳定,重复性好。另有研究^[10]报道新生期大鼠给予结直肠扩张或芥末油灌肠,成年后内脏敏感性增高,较成年期给予相同的应激所致内脏敏感性增高更明显。这与临床报道早期不良事件与 IBS 发病密切相关结果一致^[3]。

本研究结果显示,新生期母子分离应激联合成年期慢性束缚应激组大鼠痛觉阈值显著降低,低于单一因素应激,说明精神心理因素联合应激可进一步提高实验大鼠的内脏敏感性,该方法尚无研究报道。

IBS-D 腹泻具有慢性、反复发作的特点,本研究采用番泻叶灌胃可使大鼠出现急性腹泻,药效消失后则大便转实,尚不能模拟理想的 IBS-D 大便特征。本研究结果显示基于不同的精神心理应激因素,采用同样剂量的番泻叶灌胃也会使大鼠出现不同程度

的腹泻,联合应激组大鼠经番泻叶灌胃后,腹泻时间延长、大便粒数增多,大便积分明显高于其他各组,考虑可能与其内脏高敏感性增高和结肠转运速度加快有关。

旷场实验是评价啮齿类实验动物运动功能和状态焦虑的经典方法,其中水平运动(穿格数)反映了动物的运动活性,垂直运动(站立数)反映了动物对新鲜环境的好奇程度^[20]。本研究结果显示:慢性束缚组、母子分离组及联合应激组大鼠旷场穿格数和站立数均有不同程度的减少,说明精神心理应激导致实验大鼠运动活性降低,对新鲜事物的好奇程度也降低,符合焦虑抑郁样行为,与文献报道基本一致^[21-22]。其中以慢性束缚应激对大鼠焦虑抑郁样行为影响最大。

从结肠病理来看,各组结肠均未出现炎性反应细胞浸润和间质水肿,符合功能性肠病的表现,说明基于精神心理应激联合番泻叶灌胃所致大鼠腹泻符合功能性肠病腹泻特征。

临床研究^[23-26]显示 5-HT 与内脏敏感性具有密切的关系,IBS-D 患者的血清和肠黏膜 5-HT 水平升高。本研究结果显示单一母子分离应激或母子分离联合束缚应激均可提高大鼠血清 5-HT 水平,与临床研究报道一致。5-HT 作为自体活性物质,约 90% 合成和分布于肠嗜铬细胞。本研究结果显示,母子分离组及联合应激组大鼠近端结肠组织中 EC 数目高于正常组,与临床研究报道一致。

多个研究^[27-30]表明 IBS-D 患者结肠组织中肥大细胞数目高于正常人,IBS 内脏敏感性增高与肥大细胞脱颗粒具有密切的关系。本研究显示慢性束缚应激、母子分离应激具有使大鼠结肠肥大细胞增加的趋势,而两者联合可显著增加结肠肥大细胞数目,与上述临床报道一致。

综上所述,新生期母子分离应激可使大鼠出现持久稳定的内脏高敏感性和抑郁样行为;慢性束缚应激对大鼠内脏敏感性无明显影响,但可使大鼠出现明显的抑郁样行为,两者联合具有协同效应。基于精神心理应激联合番泻叶灌胃可模拟 IBS-D 的部分病理生理特征,基于母子分离+慢性束缚联合应激法建立 IBS-D 大鼠模型优于单一应激法。

参考文献

- [1] Mearin F, Lacy BE, Chang L, et al. Bowel Disorders[J]. Gastroenterology, 2016, 150: 1393-1407.
- [2] Yao X, Yang YS, Cui LH, et al. Subtypes of irritable bowel syndrome on Rome III criteria: a multicenter study[J]. J Gastroenterol Hepatol,

- 2012,27(4):760-765.
- [3] Bradford K, Shih W, Videlock EJ, et al. Association between early adverse life events and irritable bowel syndrome[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2012, 10(4):385-390.
 - [4] Butt AS, Salih M, Jafri W, et al. Irritable bowel syndrome and psychiatric disorders in pakistan; a case control study[J]. Gastroenterol Res Pract, 2012; 2012:291452.
 - [5] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat; a model for irritable bowel syndrome[J]. Gastroenterology, 1988, 94(3):611-621.
 - [6] Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(2):G307-316.
 - [7] Berecik P, Wang L, Verdú EF, et al. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction[J]. Gastroenterology, 2004, 127(1):179-187.
 - [8] La JH, Kim TW, Sung TS, et al. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(12):2791-2795.
 - [9] 祝捷, 罗和生, 陈玲, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 L-型钙通道 $\alpha 1C$ 亚基及 $\alpha 1D$ 亚基的表达变化[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(38):2713-2717.
 - [10] Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5):1276-1285.
 - [11] 岳利峰, 丁杰, 陈家旭, 等. 肝郁脾虚证大鼠模型的建立与评价[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6):396-400.
 - [12] Saito T, Mizutani F, Iwanaga Y, et al. Laxative and anti-diarrheal activity of polycarbophil in mice and rats[J]. Jpn J Pharmacol, 2002, 89(2):133-141.
 - [13] Zhou Q1, Zhang B, Verne GN. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome[J]. Pain, 2009, 146(1-2):41-46.
 - [14] Coss-Adame E, Rao SS. Brain and gut interactions in irritable bowel syndrome: new paradigms and new understandings[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2014, 16(4):379.
 - [15] 吕红, 钱家鸣, 金光亮, 等. 肠易激综合征慢急性联合应激动物模型的建立及其感觉、动力和心理行为的评价[J]. 中华内科杂志, 2009, 48(12):1035-1039.
 - [16] 吕红, 王伟岸, 钱家鸣. 传统束缚应激动物模型内脏感觉的新评价[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005, 14(2):111-113.
 - [17] Bradesi S, Eutamene H, Garcia-Villar R, et al. Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats[J]. Neurogastroenterol Motil, 2002, 14(1):75-82.
 - [18] 孙燕, 柳锋霖, 宋耿青, 等. 急性和慢性束缚应激对大鼠内脏敏感性和神经内分泌的影响[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(1):38-41.
 - [19] Bian ZX, Qin HY, Tian SL, et al. Combined effect of early life stress and acute stress on colonic sensory and motor responses through serotonin pathways: differences between proximal and distal colon in rats[J]. Stress, 2011, 14(4):448-458.
 - [20] 孙世光, 王婧婧, 李自发, 等. 旷场实验: 昆明小鼠行为学评价方法的重测信度检验[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19(12):1093-1095.
 - [21] Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, et al. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 73(1):131-140.
 - [22] 李苗苗, 王丹, 毕文鹏, 等. N-棕榈酰乙醇胺对慢性束缚应激小鼠焦虑抑郁样行为的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3):435-443.
 - [23] 张川, 李定国, 王彝康, 等. 肠易激综合征患者 5-羟色胺含量的变化[J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(1):66-68.
 - [24] 詹丽杏, 许国铭, 李兆申, 等. 肠易激综合征患者活动期和缓解期血浆 5-HT、5-HIAA 的变化[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2):152-154.
 - [25] 夏崧, 刘希双, 鞠辉. 肠易激综合征患者肠黏膜 SP、SPR 和 5-HT 的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(30):3169-3173.
 - [26] 李运红, 朱晓蕾, 徐肇敏. 腹泻型肠易激综合征患者结肠粘膜 5-羟色胺和 5-羟色胺 3 受体的研究[J]. 胃肠病学, 2006, 11(8):477-480.
 - [27] O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, et al. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome[J]. Neurogastroenterol Motil, 2000, 12(5):449-457.
 - [28] Park JH, Rhee PL, Kim HS, et al. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(1 Pt 1):71-78.
 - [29] Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum[J]. Gut, 2007, 56(2):203-209.
 - [30] Goral V, Kucukoner M, Buyukbayram H. Mast cells count and serum cytokine levels in patients with irritable bowel syndrome[J]. Hepatogastroenterology, 2010, 57(101):751-754.

(2017-03-05 收稿 责任编辑: 杨觉雄)