

● 实验研究 ●

腹泻高热大鼠模型的实验研究

尹 丽,张序晴,田雪飞,李 赛,王志琪,刘文锋,周志华,段 幸

(湖南中医药大学,湖南 长沙,410208)

[摘要] 目的:探索运用中医“下法”结合腹腔注射大肠杆菌内毒素(lipopolysaccharides, LPS)复制腹泻高热大鼠模型的可行性。方法:以SD雄性成年大鼠为研究对象,分为灌胃0、1、3、5、7d组,采用序贯给药法,分别灌胃给予大黄芒硝水煎液0、1、3、5、7d,于末次灌胃后经腹腔注射给予LPS。观察并记录造模大鼠粪便硬度与体温变化情况,考察灌胃大黄芒硝所致的腹泻及天数对经LPS诱导大鼠体温的影响。结果:大鼠灌胃大黄芒硝水煎液后,整体状态变差,粪便硬度下降,粪便含水量增加。仅灌胃大黄芒硝对大鼠体温无明显影响。大鼠腹腔注射LPS后体温均明显升高。其中灌胃大黄芒硝5d的大鼠注射LPS后体温升高所需时间短,且峰值最高。结论:大鼠经灌胃大黄芒硝水煎液后再腹腔注射LPS可成功建立高热模型,大黄芒硝水煎液的灌胃天数对大鼠的发热潜伏期、发热持续时间和体温峰值均有影响。

[关键词] 腹泻发热模型;SD大鼠;大黄芒硝水煎液;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.01.055

An experimental study of the rat model of diarrhea and severe fever

YIN Li, ZHANG Xuqing, TIAN Xuefei, LI Sai, WANG Zhiqi, LIU Wenfeng, ZHOU Zhihua, DUAN Xing

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the feasibility of the traditional Chinese medicine (TCM) purgation method combined with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin of Escherichia coli, in establishing a rat model of diarrhea and severe fever. Methods: Adult male Sprague – Dawley rats were selected and divided into 0-, 1-, 3-, 5-, and 7-day gavage groups. The drugs were administered sequentially; water decoction of Rheum officinale and mirabilite was given by gavage for 0, 1, 3, 5, and 7 days, and intraperitoneal injection of LPS was performed after the last time of administration by gavage. The changes in stool consistency and body temperature were observed and recorded, and the influence of diarrhea due to Rheum officinale and mirabilite given by gavage and its duration on the body temperature of rats treated by LPS was analyzed. Results: After being treated with the water decoction of Rheum officinale and mirabilite by gavage, the rats had poor conditions, with a reduction in stool consistency and an increase in fecal water content. Rheum officinale and mirabilite given by gavage alone had no significant influence on body temperature. There was a significant increase in body temperature in rats after intraperitoneal injection of LPS, and the rats treated with Rheum officinale and mirabilite by gavage for 5 days had the shortest time to the increase in body temperature after LPS injection and the highest peak value of body temperature. Conclusion: Water decoction of Rheum officinale and mirabilite by gavage followed by intraperitoneal injection of LPS can successfully establish a rat model of diarrhea and severe fever, and the number of days of treatment with water decoction of Rheum officinale and mirabilite by gavage may affect the latency, duration, and peak body temperature of fever.

[Key words] diarrhea – fever model; Sprague – Dawley rat; water decoction of Rheum officinale and mirabilite; experimental study

高热动物模型在解热实验研究中应用较为广泛,常用的实验动物以健康 SPF 级的大鼠或健康新西兰家兔等为主^[1],常用的模型多由经炎性物质和内毒素(LPS)等感染形成^[2],或灌胃热性中药建立里热证动物模型^[3]等,但津液亏损所致的高热动物模型报道比较少见。中医学认为

伤津而致体虚的主要方法有“汗”“吐”“下”三法^[4],其中“下”法指运用具有泻下作用的药物,通泻大便,逐邪外出的治法,又称泻法。本实验拟将中医“下”法与腹腔注射LPS相结合,探索制备腹泻高热大鼠模型的可行性,为进一步深入研究人参白虎汤的解热作用提供实验基础。

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81473617,81503492);湖南省教育厅教改项目(湘教通[2016]400-321);湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(湘教通[2018]255-414);湖南中医药大学教改项目(编号:2018-JG021)

第一作者:尹丽,女,中药学专业本科生

通讯作者:王志琪,女,副教授,硕士研究生导师,研究方向:中药药理学, E-mail: wzqx2004@126.com

1 实验材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,25只,SPF级,体质量(200 ± 20)g [由天勤动物公司提供,动物合格证号:43006700014546,许可证号为SCXK(湘)2014-011]。本实验的环境与设施条件符合中国国家标准《实验动物环境及设施》,动物实验单位的许可证编号为SYXK(湘)2013-0005。

1.2 药物 大黄(饮片,湖南横岳中药饮片有限公司,批号:17101203);芒硝(饮片,湖南省宏华中药饮片有限公司,批号:170402);LPS(上海北诺生物科技有限公司,批号:Sigma L-2880)。饲养温度为 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。大黄芒硝水煎液制备:参照大承气汤的配方及临床用量^[5],将大黄、芒硝按照4:3的比例配伍,通过体表面积换算法得出大鼠灌胃大黄芒硝水煎液的剂量为 $1.30\text{g}/100\text{g}$ 。根据相关文献^[6]中方法,首先称取适量大黄置于圆底烧瓶中,加入10倍量的超纯水,浸泡30min,用电热套加热煮沸后回流15min。将所得提取液用纱布趁热过滤,取滤液,趁热加入事先称好的相应比例的芒硝,震荡使其充分溶解,于减压旋转蒸发仪中浓缩,最后定容,使得每1mL含生药1.30g的水煎液,装瓶备用。LPS溶液:参照相关文献^[7]中方法,用0.9%氯化钠注射液稀释大肠杆菌内毒素,配置成 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的大肠杆菌内毒素溶液。所有实验用的药液均现配现用。

2 实验方法

2.1 动物分组与给药 大鼠适应性饲养3d后进行正式实验。实验动物根据体质量和大黄芒硝水煎服的灌胃天数分为5组,分别为灌胃0d组、灌胃1d组、灌胃3d组、灌胃5d组、灌胃7d组,每组5只。

各组动物于正式实验第1天起,每天2次,定时(早上8时和晚上6时按照 $1\text{mL}/100\text{g}$ 的给药体积进行灌胃操作。

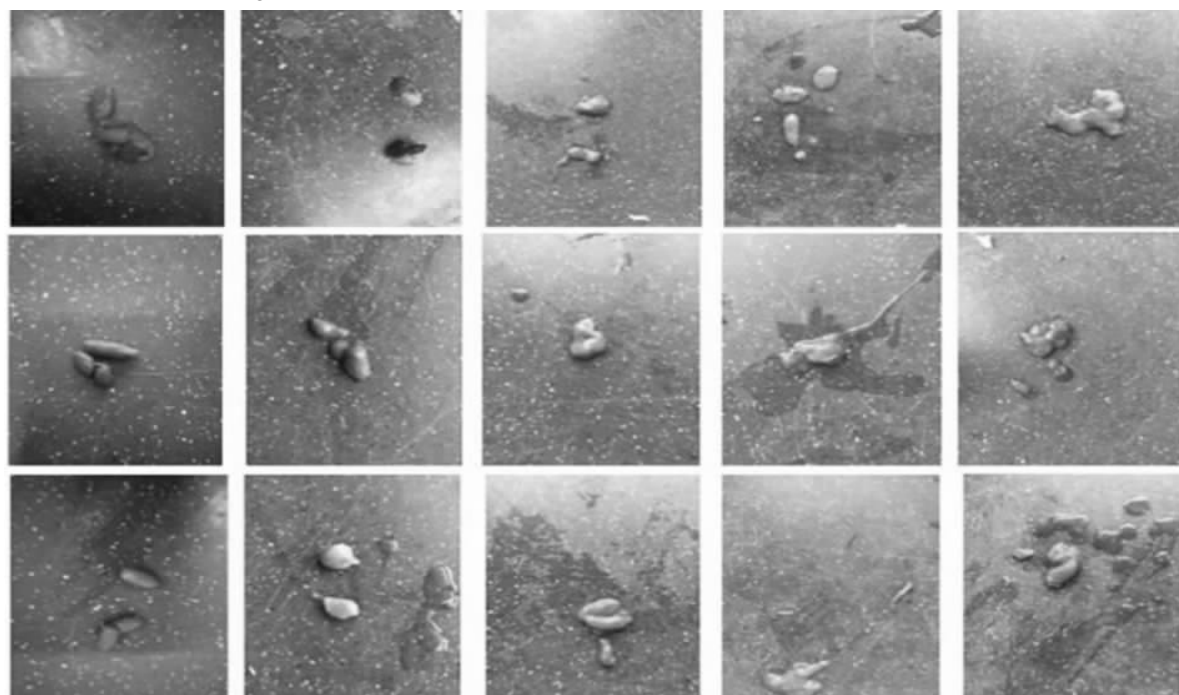
连续7d。灌胃0d组连续7d按上述方法灌胃给予超纯水;灌胃1d组按上述方法连续6d灌胃给予超纯水,第7天灌胃大黄芒硝水煎液;其余各组以此类推进行灌胃操作。实验动物于正式实验第7天、末次灌胃后5h腹腔注射配制好的LPS溶液,给药剂量为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2 指标采集与检测 大鼠行为学记录:观察灌胃给药后各组大鼠的活动、精神状态、呼吸、粪便等情况。大鼠体温检测:将电子测温计(欧姆龙电子测温计)插入大鼠肛门约2cm处,并标记,每次插入相同深度,至读数稳定,记录体温。灌胃前后的体温:实验当日灌胃前测量3次体温(每30min 1次),取平均值,作为灌胃前的基础体温。完成灌胃且当大鼠出现腹泻时,每隔半小时测1次体温,测3次,取平均值作为各组灌胃后的体温。每组大鼠进行灌胃前后的自身体温对照。注射LPS前后的体温检测:上述步骤中检测的灌胃后的体温作为注射LPS前的基础体温。各组注射LPS后,每隔1h记录1次体温,连续测温10h。将各组大鼠注射LPS后的体温与其注射前的基础体温进行比较,差异有统计学意义即视为发热。

2.3 统计学方法 采用SPSS 21.0统计软件分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较采用单因素方差分析和多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般状态 造模前,各组大鼠一般状况和排便无明显差异。开始大黄芒硝水煎液灌胃后,大鼠大便硬度明显下降,精神状态不佳。此后,每次灌胃药物后,大便硬度均出现不同程度下降,含水量增加,且伴有饮水量增加,其中灌胃5d组的大鼠与灌胃7d组的大鼠腹泻最严重,均成溏便样。各组大鼠粪便形状如图1所示。



灌胃0d组

灌胃1d组

灌胃3d组

灌胃5d组

灌胃7d组

图1 各组大鼠的典型粪便状态

3.2 大鼠体温变化 如表 1 所示,大鼠灌胃前后体温无明显变化,该实验结果提示大黄芒硝所致的泻下作用对大鼠体温无明显影响($P>0.05$)。如表 2 所示,注射 LPS 前大鼠的基础体温与文献结果^[3-4]基本一致。注射 LPS 后,各组大鼠的体温呈现出不同程度的升高,即腹腔给予一定量的 LPS 可复制发热大鼠模型。其中灌胃 0d 组和灌胃 1d 组大鼠在注射 LPS 后的 5h 开始体温显著升高,在第 7 小时体温达到峰值,发热时长为 4h;灌胃 3d 组在注射 LPS 后的 5h 开始有明显的发热,在第 7 小时体温达到峰值,发热时长为 5h;灌胃 5d 组在第 3 小时开始体温显著升高,在第 5 小时达到峰值,发热时长为 6h;灌胃 7d 组在第 4 小时开始明显发热,在第 5 小时达到峰值,发热时长为 4h。其中灌胃 5d 组

的大鼠发热最早,峰值超过 39℃且发热的时间最长;灌胃 0、1、3d 组相比其他 3 组较慢达到发热高峰,最高体温在 38℃左右。

表 1 腹泻后各组大鼠的体温比较($\bar{x} \pm s, ^\circ\text{C}$)

组别	只数	基础体温	0.5h	1h	1.5h
灌胃 0d 组	5	37.1±0.21	36.9±0.04 ^a	36.8±0.23 ^a	37.0±0.09 ^a
灌胃 1d 组	5	37.1±0.05	37.0±0.11 ^a	37.0±0.14 ^a	36.8±0.12 ^a
灌胃 3d 组	5	37.2±0.08	37.0±0.22 ^a	36.9±0.19 ^a	37.0±0.14 ^a
灌胃 5d 组	5	37.2±0.06	36.9±0.19 ^a	36.9±0.13 ^a	37.0±0.10 ^a
灌胃 7d 组	5	37.3±0.22	36.8±0.04 ^a	36.9±0.07 ^a	37.1±0.04 ^a

注:与本组基础体温比较,^a $P>0.05$ 。

表 2 注射 LPS 后 1~10h 各组大鼠体温比较($\bar{x} \pm s, ^\circ\text{C}$)

组别	只数	基础体温	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
灌胃 0d 组	5	37.2±0.08	37.1±0.14	37.3±0.30	37.7±0.22	37.7±0.31	38.0±0.47 ^a	38.0±0.51 ^a	38.3±0.36 ^a	38.1±0.25 ^a	37.9±0.26 ^a	37.5±0.15
灌胃 1d 组	5	37.2±0.07	37.1±0.11	37.0±0.44	37.7±0.29	37.7±0.19	38.1±0.39 ^a	38.2±0.19 ^a	38.1±0.19 ^a	38.0±0.07 ^a	38.0±0.09 ^a	37.5±0.16
灌胃 3d 组	5	37.2±0.08	37.1±0.12	37.3±0.26	37.5±0.35	37.6±0.30	38.0±0.34 ^a	38.1±0.42 ^a	38.3±0.60 ^a	38.0±0.33 ^a	37.9±0.42 ^a	37.8±0.38 ^b
灌胃 5d 组	5	37.2±0.06	37.2±0.17	37.5±0.46	38.3±0.43 ^a	38.3±0.33 ^a	39.1±0.18 ^a	38.7±0.23 ^a	38.5±0.15 ^a	38.2±0.37 ^a	38.1±0.17 ^a	37.6±0.27
灌胃 7d 组	5	37.3±0.18	37.3±0.14	37.4±0.22	37.5±0.25	38.1±0.43 ^a	38.4±0.67 ^a	38.2±0.46 ^a	38.2±0.43 ^a	38.1±0.47 ^a	37.4±0.44	37.3±0.27

注:与本组基础体温比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

4 讨 论

张仲景在其使用下法的方剂中往往将大黄和芒硝配伍使用。其中,生大黄有泻下攻积、清泄湿热的功效;芒硝的主要功效是泻热通便、软坚散结^[8]。两药相须配伍,泻下作用更强^[6,9]。本研究从中医基本理论出发,先用大黄芒硝水煎液致大鼠泻下,再通过经典的腹腔注射 LPS 致热,以此制备一种腹泻发热模型。

本动物实验结果发现:灌胃大黄芒硝后大鼠饮水量增多,精神萎靡,活动减少,大便不成形,含水量增多,呈粥样便;注射 LPS 后,其体温上升明显。上述症状与《伤寒论》中对人参白虎汤证患者的临床表现描述基本一致。连续灌胃大黄芒硝水煎液 5d 和 7d 的大鼠大便不成形,呈粥样便;灌胃 1d 和 3d 的大便不成形状态均不如灌胃 5d 和 7d;大鼠腹泻后的体温与腹泻前相比无明显变化,说明大鼠灌胃大黄芒硝水煎液不引起发热。大鼠注射 LPS 后,体温均出现明显上升的趋势。其中灌胃 5d 组体温升高所需时间最短,发热持续时间最长,且体温峰值最高,与灌胃 0d 组和灌胃 1d 组相比,差异有统计学意义,提示腹泻 5d 后注射 LPS 复制的腹泻发热模型可能更符合人参白虎汤证的气分热状态。其原因可能是由于腹泻 1d 或 3d,大鼠伤津不明显,而腹泻 7d 的大鼠伤津过度,产生自身修复而体内炎症因子含量较少^[10-11]。下法过分或误用可致精神不振,若药食伤于脾胃,使脾胃受到损害,汗腺功能失常,进而可造成气血津液亏损而致体虚^[12]。

综上所述,采取腹泻合并腹腔注射 LPS 可建立高热大鼠模型,腹泻天数对模型动物的发热潜伏期、体温高峰值和达到体温高峰所需时间、发热持续时间均有影响,且该造模方法对动物的免疫功能有影响。本研究不仅为进一步研究人参白虎汤解热作用机制奠定了实验基础,所制备的腹

泻发热大鼠模型也是复制方证动物模型的一次成功探索。

参考文献

[1] 刘微艳,陈创,张涤,等. 发热动物模型的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2017,33(8):214-216.

[2] 左泽平,王志斌,郭玉东,等. 常用大鼠发热模型研究[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(2):52-57.

[3] 叶耀辉,张博文,郑红梅,等. 大鼠虚热证模型的建立与评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):134-139.

[4] 梁昀. 滋阴活血方治疗原发性干燥综合征的临床观察[D]. 武汉:湖北中医学院,2009.

[5] 李冀. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:44-46.

[6] 李飞艳,张斌,李卫先. 大黄炮制前后及大黄配伍芒硝对小鼠胃肠运动的影响[J]. 中医药导报,2008,14(10):72.

[7] 刘思思,李琦,孙立东,等. 参莲提取物对 LPS 诱导的巨噬细胞炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):85-91.

[8] 钟赣生. 常用中药功用鉴别泻下药[J]. 中国临床医生杂志,1999,27(3):56-57.

[9] 姜景平. 重用中药泻下法在中度重症急性胰腺炎中的疗效观察[J]. 江西医药,2017,52(2):140-141.

[10] Yang XL, Guo TK, Wang YH, et al. Ginsenoside Rd attenuates the inflammatory response via modulating p38 and JNK signaling pathways in rats with TNBS-induced relapsing colitis [J]. International Immunopharmacology, 2012, 12(2):408-414.

[11] Sang ML. Anti-inflammatory Effects of Ginsenosides Rg 5, Rz 1, and Rk 1: Inhibition of TNF- α -induced NF- κ B, COX-2, and iNOS transcriptional expression [J]. Phytotherapy Research, 2014, 28(12):1893-1896.

[12] 田丽楠. 基于《金匮要略》下法的理论研究[D]. 北京:中医药大学,2015.

(收稿日期:2018-12-01)