

小鼠便秘模型的建立

李业鹏 崔生辉 江 涛 李燕俊 李玉伟 韩春卉 刘红蕾 张 靖

(卫生部食品卫生监督检验所,北京 100021)

摘 要:为研究保健食品的润肠通便功能,针对保健食品润肠通便功能试验的要求,用 10 mg/kg BW的复方地芬诺酯建立了稳定的小鼠便秘模型,模型组与对照组在首粒黑便排便时间、6 h 内排便粒数及排便重量间均有显著性差异($P < 0.05$)。多次重复实验表明,该模型稳定可靠,建议在保健食品润肠通便功能检测中对其进行验证。

关键词:地芬诺酯;小鼠;便秘;营养保健品;润下

中图分类号:S865.1⁺3 文献标识码:A 文章编号:1004—8456(2000)01—0001—04

保健食品润肠通便功能检验中,便秘动物模型的使用应考虑不同保健食品的特性,目前公认的具有润肠通便功能的保健食品有药食同源类中药制剂、纤维素类、活菌制剂及双歧因子等产品。由于保健食品中药制剂含量不能过高,药效评价中使用的小鼠便秘模型不适合保健食品的功能检测,我们针对保健食品润肠通便功能检测的小鼠便秘模型进行了研究,提出了保健食品润肠通便功能检验中建立小鼠便秘模型的一种方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

造模型药物 复方地芬诺酯片,为止泻药,每片含复方地芬诺酯 2.5 mg,由江苏国营武进制药厂制造(苏卫药准字 82-2464-1号),人体使用剂量为一日 3~4 次,每次 1~2 片,即人体每日推荐使用剂量为 0.125~0.333 mg/Kg BW。

由于种属关系,按人体每日最大推荐量 0.333 mg/kg BW 计,小鼠每日等效作用量为 3.3 mg/kg BW。

实验动物 中国医学科学院肿瘤研究所实验动物中心提供的二级昆明种健康雄性小鼠(批准号为京动字 8910M050),体重 20~23 g。

仪器 分析天平、动物天平、秒表、手术剪、眼科镊、灌胃针及注射器、动物笼具、苦味酸。

试剂 墨汁的配制:准确称取阿拉伯树胶 100 g,加水 800 mL,煮沸至溶液透明,称取活性炭(粉状)50 g 加至上述溶液中煮沸 3 次,待溶液凉后加水定容到 1 000 mL。复方地芬诺酯混悬液的配制:取复方地芬诺酯片,用研钵研碎后加水配制成所需浓度的复方地芬诺酯混悬液。

1.2 方 法

1.2.1 复方地芬诺酯药物造模剂量的筛选 按保健食品润肠通便功能检测推荐方法进行。小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,其中 1 组为对照组,4 组为实验组。实验前 24 h 停食给水。实验组复方地芬诺酯给药量分别为:50、25、10 和 5 mg/kg BW(分别相当于复方地芬诺酯人体最大推荐使用量的 150 倍、75 倍、30 倍、15 倍),对照组小鼠用水灌胃。灌胃后动物均单笼饲养,正常饮食进水。观察小鼠首粒排便时间、12 h 内排便粒数和排便重量。

1.2.2 墨汁和不同剂量复方地芬诺酯共同使用对小鼠排便的影响 根据 1.2.1 试验结果,鉴于润肠通便保健食品的作用比较温和,设计如下试验:

取小鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为摄入复方地芬诺酯 10.5 和 3.3 mg/kg BW 组和空白对照组,实验组以相应剂量的复方地芬诺酯灌胃,对照组给水,30 min 后,各组小鼠均以墨汁灌胃(首粒粪便指示剂),从给墨汁开始记录小鼠首粒黑便的排出时间和不同时段内的排便粒数。

1.2.3 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯和墨汁建立的小鼠便秘模型排便的动态观察 根据 1.2.2 的试验结果,对摄入复方地芬诺酯 10 mg/kg BW 组小鼠进行了进一步试验。

取小鼠 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只,分别设为复方地芬诺酯 10 mg/kg BW 组和空白对照组,试验前 24 h 停食给水。试验组以复方地芬诺酯灌胃,对照组给水,30 min 后两组小鼠分别以墨汁灌胃,从给墨汁开始记录首粒黑便的排出时间、不同时间段的排便粒数。

2.4 重复实验 在上述试验的基础上对 1.2.3 试验进行了 3 次重复。

3 结果与讨论

3.1 复方地芬诺酯药物造模剂量的筛选 实验结果见表 1。

表 1 不同剂量复方地芬诺酯对小鼠排便功能的影响

	动物数量	首粒排便所需时间 min	12 h 内排便粒数	12 h 内排便重量
水对照组	10	22.0 ± 17.7	99.9 ± 21.9	0.55 ± 0.14
5 mg/kg BW 组	10	122.4 ± 24.8 ⁽²⁾	90.4 ± 21.0	0.56 ± 0.09
10 mg/kg BW 组	10	161.8 ± 26.8 ⁽²⁾	81.9 ± 15.5 ⁽¹⁾	0.57 ± 0.12
25 mg/kg BW 组	10	232.1 ± 77.4 ⁽²⁾	55.2 ± 27.6 ⁽²⁾	0.39 ± 0.16 ⁽²⁾
50 mg/kg BW 组	10	344.9 ± 109.1 ⁽²⁾	13.8 ± 4.7 ⁽²⁾	0.12 ± 0.03 ⁽²⁾

注: (1) 与空白对照比较 $P < 0.05$; (2) 与空白对照比较 $P < 0.01$ 。

从表 1 可以看出, (1) 复方地芬诺酯的给药量与药效作用间存在明显的剂量—反应关系: 随着复方地芬诺酯用量的增加, 小鼠首粒排便时间延长, 12h 内排便粒数和排便重量减少, 其相关系数分别为 0.9609、-0.9998 和 -0.9758。(2) 当复方地芬诺酯用量为 5 mg/kg BW 时, 实验组小鼠的首粒排便时间与对照组比较出现极显著性差异 ($P < 0.01$), 但 12h 内排便粒数和排便重量无显著性差异 ($P > 0.05$); 当复方地芬诺酯用量为 10 mg/kg BW 时, 实验组与对照组小鼠的首粒排便时间比较差异极显著 ($P < 0.01$), 12 h 内排便粒数也出现了显著性差异 ($P < 0.05$), 但 12 h 内排便重量仍无明显差异 ($P > 0.05$), 这说明 5 mg/kg BW 和 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯的有效药理作用不能持续 12 h。(3) 当复方地芬诺酯用量为 25 mg/kg BW 时, 实验组小鼠的首粒排便时间、12 h 排便粒数和排便重量与对照组比较均出现极显著性差异 ($P < 0.01$), 即 25 mg/kg BW 复方地芬诺酯的有效药理作用能持续 12h。(4) 粪便重量与排便粒数比为不敏感指标, 这主要是因为粪便经常与水、尿和饲料混杂在一起, 影响实验结果。

在实验中发现, 当复方地芬诺酯用量为 50 mg/kg BW 时, 个别小鼠 12 h 无粪便排出, 解剖发现其膀胱过度充盈, 从结果可以看出, 50 mg/kg BW 复方地芬诺酯模型组与对照组首粒排便时间分别是 344 min 和 22 min, 这可能是复方地芬诺酯过度抑制平滑肌的结果。通过多次试验发现, 此毒性作用发生率为 10%~20%。

由于禁食小鼠食用垫料, 使胃肠道内有残留粪便, 致使首粒排便时间难以代表便秘模型小鼠的肠蠕动情况, 考虑选用适当的首粒粪便指示物——墨汁。

3.2 墨汁和不同剂量复方地芬诺酯共同使用对小鼠排便的影响 实验结果见表 2。

由表 2 可见, (1) 小鼠的首便时间、排便粒数和排便重量与复方地芬诺酯用量间存在明显的剂量反应关系: 当复方地芬诺酯用量为 3.3 mg/kg BW 时, 首粒排便时间与对照组比较即出现极显著性差异 ($P < 0.01$), 随着复方地芬诺酯用量的增加, 首粒排便时间在不断增加。(2) 3.3 mg/kg BW 和 5 mg/kg BW 复方地芬诺酯的有效药理作用时间均不足 6 h, 超过药效作用后的一段时间内, 排便粒数将代偿性增加以使造模组与对照组的排便粒数无显著性差异。(3) 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯组的有效药理作用时间在 6 h 以上。

表2 墨汁和不同剂量的复方地芬诺酯对小鼠排便的影响

	动物数量	首粒黑便排出时间 min	5 h 内排便粒数	6 h 内排便粒数
对照组	10	77.1 ± 46.3	23.3 ± 5.5	30.2 ± 8.6
3.3 mg/kg BW 组	10	140.0 ± 50.1 ⁽²⁾	20.0 ± 6.6	27.7 ± 9.2
5 mg/kg BW 组	10	158.8 ± 50.1 ⁽²⁾	14.2 ± 9.5 ⁽²⁾	22.3 ± 10.9
10 mg/kg BW 组	10	173.2 ± 32.6 ⁽²⁾	13.6 ± 3.7 ⁽²⁾	20.4 ± 2.8 ⁽¹⁾

注: (1) 与空白对照比较 $P < 0.05$; (2) 与空白对照比较 $P < 0.01$ 。

鉴于以上因素, 为了让保健食品较温和的作用得以体现, 我们认为 25 mg/kg BW 和 50 mg/kg BW 复方地芬诺酯作为造模剂量不适于保健食品功能检测, 选择 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯作为造模剂量观察 6 h 较为适宜。

3.3 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯和墨汁建立的小鼠便秘模型排便的动态观察 实验结果见表 3。

表3 不同时段小鼠的排便情况

	动物数	首粒黑便排出时间 min	6 h 内排便粒数	7~ 12 h 排便粒数	12 h 内排便粒数
对照组	10	68.4 ± 23.1	47.9 ± 7.3	69.2 ± 10.4	117.1 ± 13.3
10 mg/kg BW 组	10	203.7 ± 41.1 ⁽²⁾	32.2 ± 8.9 ⁽²⁾	64.8 ± 13.7	97.0 ± 19.7 ⁽¹⁾

注: (1) 与空白对照比较 $P < 0.05$; (2) 与空白对照比较 $P < 0.01$ 。

由表 3 可见, (1) 模型组小鼠首粒排便时间与对照组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$)。 (2) 由图 1 可以看出, 随着观察时间的延长, 模型组与对照组小鼠每小时排便粒数不断接近。在 5~ 6 h 间模型组与对照组的排便粒数基本相等, 而在 6~ 7 h 间模型组小鼠的排便粒数略高于对照组, 在 7~ 12 h 间对照组与实验组比较, 排便粒数无显著性差异。这说明当小鼠摄入复方地芬诺酯 6 h 后, 药物已基本不起作用, 故此建议用 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯建立的小鼠便秘模型在检测保健食品时应观察 6 h。 (3) 用墨汁作指示物使首粒排便时间可以明确界定, 排除了小鼠肠道内残留粪便的干扰, 这也使得对照组小鼠的首粒排便时间较不给墨汁对照组小鼠有明显的延长。

3.4 重复实验 实验结果见表 4。

表4 小鼠便秘模型的验证结果

	组别	动物数量	首粒黑便排出时间 min	6 h 内排便粒数	6 h 内排便重量
重复	空白对照	15	74.4 ± 14.3	27.5 ± 10.2	0.30 ± 0.11
试验 1	便秘模型对照	15	201.9 ± 71.0 ⁽²⁾	12.5 ± 7.5 ⁽²⁾	0.22 ± 0.12 ⁽¹⁾
重复	空白对照	15	68.9 ± 15.2	37.3 ± 6.0	0.45 ± 0.16
试验 2	便秘模型对照	15	161.4 ± 62.8 ⁽²⁾	16.5 ± 7.1 ⁽²⁾	0.28 ± 0.11 ⁽²⁾
重复	空白对照	15	80.4 ± 25.7	35.0 ± 11.3	0.46 ± 0.14
试验 3	便秘模型对照	15	150.9 ± 35.9 ⁽²⁾	20.2 ± 6.4 ⁽²⁾	0.24 ± 0.12 ⁽²⁾

注: (1) 与空白对照比较 $P < 0.05$; (2) 与空白对照比较 $P < 0.01$ 。

4 小结 通过以上实验可以看出用 10 mg/kg BW 复方地芬诺酯和墨汁建立的小鼠便秘模型是稳定可靠的,

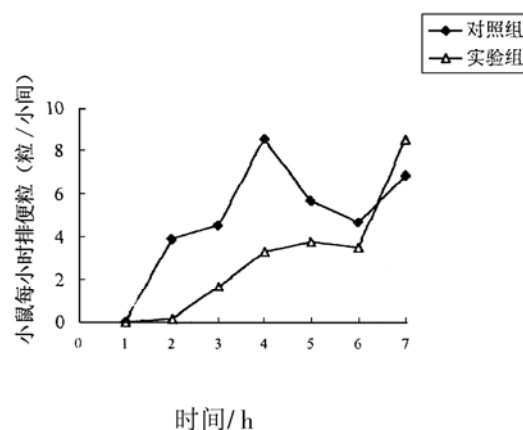


图1 10 mg/kg BW 的复方地芬诺酯对小鼠每小时排便量的影响

与 50 mg/kg BW 建立的动物模型相比,这一动物模型不仅适合保健食品润肠通便温和的作用,墨汁的引用更使模型的灵敏度、准确度有所提高,同时大大减少了试验的观察时间,建议在保健食品润肠通便功能检测中对其进行验证。

参考文献:

[1] 陈奇. 中药药理研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993, 333~ 334

Development of constipation model of mice/ Li Yepeng, Cui Shenghui, Jiang Tao, et al. // Chinese Journal of Food Hygiene. – 2000, 12(1): 1~ 4

Diphenoxylate was administrated to mice by the dose of 10 mg/kg BW for the development of constipation model for formulation of examination procedure of health foods. The time of defecation of the first black urine, quantity and weight of urine with 6 hours were statistically significant different compared with the control group. The results presented the stability and reliability of the model and it was recommended to verify in the function experiments of health foods.

Author's address Li Yepeng, Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of the Public Health of PRC, 100021 PRC.

Key words Diphenoxylate Mice Constipation Dietary Supplements LUBRICANT LAXATION

欢迎向《中国食品卫生杂志》投稿

《中国食品卫生杂志》是中华预防医学会、卫生部食品卫生监督检验所主办的全国性食品卫生学术杂志、公开刊物。其办刊方针是“普及与提高”并重。本刊设:论著、实验技术与方法、监督管理、调查报告、食物中毒、译文与综述、专栏、短讯等栏目。论著:有关食品卫生的理化、微生物工作的研究文章,食品的安全性研究,食品卫生监督管理的研究及其它与食品卫生有关的研究文章;实验技术与方法:食品卫生检验技术方面的改进及发明;监督管理:食品卫生监督管理方面的文章;调查报告:食品及与食品有关的理化、微生物调查,食品卫生监督管理方面的调查;食物中毒:报告食物中毒的文章;译文:国外食品卫生工作介绍。

来稿注意事项:

- 1 来稿一般不超过 4000 字,论著要有中英文摘要及英文题目。
- 2 图、表、文字三者择一最重要者,不要重复;图、表应有自明性、少而精;表内数字处理应符合统计学要求。
- 3 编辑部对来稿有删改权,不愿删改者请声明。文责自负。
- 4 文章格式、摘要的撰写、参考文献格式见《中国食品卫生杂志》每卷第 1 期。
- 5 文后写上作者的真实姓名、工作单位、详细通讯地址、邮编,以便联系。
- 6 来稿应附单位介绍信或在稿件上加盖公章。
- 7 本刊一概不退稿,请自备底稿。
- 8 来稿请寄:北京市朝阳区潘家园南里 7 号 卫生部食品卫生监督检验所《中国食品卫生杂志》编辑部
邮编 100021 电话 67791291

《中国食品卫生杂志》
编辑部