

上海中医药大学“研究生创新培养” 专项科研项目

创新类 ☐

实践类 ☒

申 请 书

项 目 名 称： 基于脾虚证小鼠结肠癌模型
探讨脾虚对结肠癌的影响作用

申 请 者： 李诗颖

学 号： 22020385

指 导 老 师： 钟薏

所在院（系、所）： 市中西医结合临床医学院

专 业： 中医内科学

申 请 日 期： 2020 年 11 月 7 日

一、项目基本情况

姓 名	李诗颖	学 号	22020385	二级学院		市中西医结合临 床医学院
专 业	中医内科学		培养层次	科学 硕士	导师	钟薏
联系方式	13229797962		电子邮箱	lishiying.lsy@foxmail.com		
课题名称	基于脾虚证小鼠结肠癌模型探讨脾虚对结肠癌的影响作用					
申请经费	26500 元		起止时间		2021.01-2022.06	
关键词	脾虚证		结肠癌		小鼠模型	

内容简介（500 字）

结肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一，近年来发病率仍在保持上升趋势。为更好地开展结肠癌的防治工作，现常利用小鼠结肠癌模型进行研究，指导临床治疗。中医讲究辨证论治，临床上中医把肠癌分为六大证型，即：脾虚气滞证、湿热蕴结证、瘀毒内阻证、脾肾阳虚证、肝肾阴虚证及气血两虚证。据研究资料显示，中医在治疗结肠癌方面有着独特的优势，而脾虚证是肠癌的主要中医证候。探索脾虚与结肠癌形成发展是否存在内在联系、脾虚是否会加速结肠癌的出现或疾病进展、结肠癌是否会加重脾虚症状表现等，对脾虚证结肠癌具有一定的实验研究及临床治疗指导意义。

目前，关于肠癌的动物模型较多，但多数只停留在西医疾病层面，与中医证候复合建模的研究较少。本项目旨在构建脾虚小鼠模型的基础上，利用西医疾病与中医证候复合建模，选取常用的化学诱导结肠癌建模方式，构建以 AOM 联合 DSS 诱导的脾虚证小鼠结肠癌模型，完整观察并记录模型建立发展的过程，对脾虚小鼠模型与化学诱导脾虚证小鼠结肠癌模型进行多方面对比，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响。

二、项目研究设计

1、本项目研究的理论意义和实践意义、国内研究现状分析（附主要参考文献目录）

1.1 项目研究的理论意义

1. 结肠癌的发病率及死亡率逐年上升，推动结肠癌研究工作刻不容缓。中医在结肠癌治疗中占据重要地位，相关研究显示，脾虚证是肠癌的主要中医证候，本项目构建脾虚证小鼠结肠癌模型，发掘脾虚与结肠癌的内在联系，不仅为结肠癌的临床治疗和实验研究提供了证型方向上的指导，同时推动了中医辨证论治理论的精确化与科学化发展。

2. 西医重视“精准医疗”，本项目构建脾虚证小鼠结肠癌模型，探讨脾虚与结肠癌的内在联系，阐明脾虚在现代医学的客观表现，有利于进一步实现西医治疗手段个体化及精准化，为中西医结合指导治疗结肠癌提供理论依据。

3. 本项目利用西医疾病与中医证候相结合，构建脾虚证联合结肠癌的动物模型，融合了中医的辨证论治体系和西医的科学技术手段，是中西医融合的重要体现，为中西医结合的可行性提供了证据支持。

4. 构建脾虚证小鼠结肠癌模型，为脾虚证结肠癌研究提供稳定的动物模型，在一定程度上为其他肿瘤疾病构建病证结合的动物实验研究提供了理论参考，有助于研究肿瘤与辨证论治的内在关系。

1.2 项目研究的实践意义

1. 本项目构建以 AOM 联合 DSS 诱导的脾虚证小鼠结肠癌模型，对脾虚小鼠模型与化学诱导脾虚证小鼠结肠癌模型进行多方面对比，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响。

2. 本项目构建脾虚证小鼠结肠癌模型，观察记录病证结合动物模型建立的全过程，深入了解中医证候与动物疾病模型之间的联系，动态演示中医证候特征下的西医疾病变化过程，直观地展现脾虚证结肠癌发展的各个阶段，为临床辨证论治脾虚证结肠癌提供模型参考。

3. 本项目构建“病证结合”的脾虚证结肠癌小鼠模型既能够体现中医辨证论治的特点，又具有西医的疾病特征，为建立肿瘤疾病的病证结合动物模型提供了实践支持。

1.3 国内研究现状分析

1.3.1 结肠癌的理论认识

结直肠癌（Colorectal cancer, CRC）是常见的消化道恶性肿瘤之一，其发病率和病死率呈逐年上升的趋势。据估计，2018 年全球范围内新发的 CRC 病例超过 180 万，死亡人数约 881000 人，死亡病例约占所有癌症的十分之一^[1]。2018 年我国癌症中心最新公布的数据显示：结直肠癌的发病率位居恶性肿瘤发病率第 3 位，病死率排在第 5 位。

中医对肠癌的认识源于古籍文献中的“肠覃”、“积聚”、“锁肛痔”、“癥瘕”等范畴，是一个全身为虚，局部为实的疾病。西医定义结肠癌为原发于结肠黏膜上皮的恶性肿瘤，早期症状不明显，随着癌肿的增大而表现出相应的临床症状，如排便习惯改变、便血、局部腹痛、腹泻、腹泻便秘交替、体重减轻、贫血等。结肠癌并非快速进展型疾病，结肠癌的发病与遗传、环境等因素有关，需要经历“上皮损伤——炎症——腺体增生——腺瘤——癌症”的过程。因此，动态观察结肠癌的发生发展是防治结肠癌的重要研究方法之一。

1.3.2 结肠癌证型的相关研究

中医目前尚未对肠癌作出明确的分型，结合临床数据及名医名家学术经验，可以认为肠癌主要分为六大证型，即：脾虚气滞证、湿热蕴结证、瘀毒内阻证、脾肾阳虚证、肝肾阴虚证及气血两虚证。李东垣在《脾胃论》中写到：“欲人知百病皆由脾胃衰而生也，毫厘之失则灾害立生。”《景岳全书·积聚》认为：“凡脾肾不足及虚弱失调之人多有积聚之病。盖脾虚则中焦不运，肾虚则下焦不化，正气不行则邪滞得以居之”，强调脾肾先虚，后有聚之患。以上都说明脾气亏虚对肠癌发生发展的重要影响。据报道，吴婷婷^[2]等收集临床 180 例大肠癌患者，经辨证后发现脾虚气滞证占比为 42.8%，位居第一。林胜友等^[3]对 780 例大肠癌病例进行回顾性分析，发现单一证型出现频率最高的是脾虚证，数量达 530 例（占 67.9%）。刘静等^[4]研究大肠癌相关文献后发现，在纳入辨证分析研究的 37 篇文献中，与脾虚证有关的报道高达 31 篇（占 83.78%），病例数量达 1172 例（占 55.23%）。结合相关资料可知，脾虚证是大肠癌发生发展中的主要证候，构建脾虚证小鼠结肠癌模型，探讨脾虚与结肠癌的内在联系，符合临床疾病的发生发展趋势。

1.3.3 结肠癌动物模型的相关研究

结肠癌动物实验研究已经历了一定的发展历程，洪卫文^[5]认为理想的动物模型应该真实地反映出人类大肠癌的发病机制、肿瘤生长过程中的生物化学变化、生物学行为和形态学特点及对实验药物治疗疗效的一致性。实验常用的结肠癌动物模型有：自发性和诱发性肿瘤模型、移植性结肠癌动物模型及转基因动物肿瘤模型。相关研究对常用结肠癌动物模型进行比较，结果表明，四种建模方式皆有其优劣之处。

自发性结肠癌动物模型是指不对动物进行任何处理，使其在自然条件下发生肿瘤的动物模型，此模型展现出与人类相似的肿瘤发生发展过程，更接近于人体肿瘤的真实状态，但自然状态下细胞癌变的概率很低，故此类动物模型较难满足实验的条件及数量要求。

转基因动物肿瘤模型是应用分子生物学手段，对实验动物基因进行改造或修饰，从而培育出相应肿瘤的动物模型，常用的方法有外源癌基因导入胚胎干细胞及细胞内抑癌基因敲除。转基因动物肿瘤模型表现出的肿瘤发展过程在理论上与人类原发肿瘤一致，但目前对癌基因及抑癌基因本身的研究有待完善，且转基因动物模型技术要求严格，成本较高，不利于广泛应用。

移植性肿瘤模型是目前应用较为广泛的动物模型，它是将外源性肿瘤细胞移植到实验动物体内生长而形成的肿瘤。按移植部位的不同，又可分为原位移植、皮下移植、腹水移植模型等，其中以原位移植模型和皮下移植模型最为常见。原位移植模型是将来自人体的肿瘤组织或细胞株移植到实验动物的相应部位，从而产生与人体肿瘤类似的生物学特征。

诱发性肿瘤模型是人为地运用各种致癌因素作用于实验动物的特定组织或器官，从而产生相应肿瘤的动物模型。在结肠癌动物模型中常用化学物质进行诱导，有二甲胂（DMH）、乙基-亚硝基尿素（ENU）、氧化偶氮甲烷（AOM）、胂的衍生物、芳香族胺等结肠癌化学诱导剂，均可通过喂食、注射、肛门放置栓剂等途径给药。诱导剂和给药途径不同，最后生成的肿瘤类型与成瘤率有差异。化学诱导性结直肠癌目前已成为模拟人类肿瘤较好的模型之一，属实验动物的原发肿瘤模型，虽其相比于原位种植模型而言，实验周期较长，但其发病机制及肿瘤生长环境接近于人体原发肿瘤，建立方法相对简单，实验重复性好，因

此目前运用较为广泛^[6-12]。

上述四种动物模型构建方法各有优劣，考虑本项目为病证结合的动物模型构建，且需要观察记录脾虚证小鼠结肠癌发生发展的全过程，因此选取 AOM 联合 DSS 诱导法构建动物肿瘤模型并进行比较，具体内容将于研究方法中阐述。

1.3.4 脾虚证的动物模型研究

病证结合动物模型是指在中医药理论、现代医学理论与实验动物学知识的有机结合下，分别（或同时）在实验动物身上模拟、复制出与人体疾病、证候相同或相近的实验动物模型，使模型动物同时具有疾病与证候的特征^[13]。黄越燕^[14]认为，病证结合的动物模型体现了中医辨证论治的特点，同时获得西医对疾病明确的病理组织器官变化和诊断评价的支持，将微观与宏观、整体与局部有效地结合起来，对探讨疾病病理生理变化与中医证候特征之间的关系具有重要的优势和价值。

脾虚证动物模型是病证结合动物模型应用的体现。1979 年北京师范大学报道首例脾虚动物模型^[15]，此后多位学者以中医脾虚相关理论以及现代医学原理和方法为支撑，顺利开展脾虚动物模型的实验研究工作。刘玉^[16]等总结脾虚病证结合动物模型研究进展，把脾虚证动物模型分为脾气虚病证结合模型、脾阳虚病证结合模型、脾阴虚病证结合模型、脾虚湿阻病证结合模型及脾不统血病证结合模型。

脾虚证动物模型构建方法总体分为两大类，即单因素造模法及多因素造模法^[17]。单因素造模包括药物因素造模法、劳倦过度法、束缚刺激法及外湿困脾法。多因素造模法则包括饮食失节加过度劳倦法、饮食失节加苦寒泻下法、束缚应激加劳倦过度加饮食失节法、苦寒泻下加饮食失节加劳倦过度法。其具体的操作方法可分为中医病因法和西医病理法。中医病因法：其一，饮食失调法，如饥饱不匀或过食肥甘厚腻；其二，劳倦耗气法，如过度游泳、疲劳仪训练跑步；其三，苦寒泻下法，如大黄、番泻叶、大小承气汤；其四，制造肝郁法，肝气过旺，克制脾土过度，耗伤脾气而致脾虚；其五，通过外部环境，如冷水湿身、久居潮湿之地等；其六，食醋灌胃法。西医病理法则有：药物或手术切除法，如利血平腹腔注射、BAT 手术切除、切除部分小肠、大肠等。

脾虚证模型构建方法多样，其诊断标准成为模型构建成功与否的判断标准

之一。脾虚证诊断标准参考文献^[18]：①泄泻严重，甚至脱肛；②食少 纳呆；③消瘦，体质量减轻；④神态萎靡，四肢不收，毛色枯槁；⑤蜷缩聚堆；⑥易疲劳。第 1、2 项为主症，第 3 ～ 6 项为兼症，具备两项主症与两项兼症时即可诊断。

1.3.5 脾虚证的结肠癌模型研究

构建病证结合的动物模型需要注意疾病与证候的关联性，确保其存在有依据的相关性。大量研究表明，结肠癌的主要证型为脾虚证，建立脾虚证的小鼠结肠癌模型符合疾病临床情况。目前，关于结肠癌的动物模型较多，但多数只停留在西医疾病层面，与中医证候复合建模的研究较少，且证型分散。陈彬^[19]等通过使用番泻叶水煎剂及注射 CT26 小鼠结肠癌细胞构建脾虚证荷瘤小鼠模型，具有一定的参考意义。张芸^[20]等研究发现，用番泻叶灌胃造模的脾虚大鼠的血清内，肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）和白细胞介素-1 β （IL-1 β ）含量均显著高于正常大鼠，且与脾虚导致的腹痛症状高度相关，与临床结肠癌患者症状有相似之处，具有一定参考价值。

结合本项目需要病证结合建模的研究要求，参考结肠癌形成的病因病机，本项目将采用番泻叶水煎剂灌胃结合间歇性禁食的方式，即饮食失节加苦寒泻下法，构建病证结合的脾虚证小鼠结肠癌模型^[21]。此前已有学者用此方法构建脾虚动物模型，如谭舒舒等^[22]采取隔日按 10 mL /kg 灌胃大黄水煎液（8.9 g /kg），喂药当日禁食，但次日喂食不限，连续 14 天，效果良好。本项目在饮食失节加苦寒泻下法基础上结合结肠癌模型，构建中西医结合的脾虚证小鼠结肠癌模型，具体方法将于研究内容中阐述。

1.3.6 脾虚证现代研究与结肠癌的内在联系

随着中西医不断交流互鉴，更多学者开始从现代医学视角下探寻脾虚证的实质，揭秘脾虚与结肠癌的关系。有学者通过建立动物模型探讨“脾虚证”与肠道菌群失调的关系，发现“脾虚证”的患者存在肠道菌群失调的情况。而肠道菌群失调在一定程度上影响结肠癌的发生发展。现代神经内分泌研究^[23]发现在“脾虚证”的患者身上或在“脾虚证”的动物模型上，存在脑肠互动的异常，即脑肠肽的分泌异常。脑肠互动是通过某些神经递质或肽类激素传递于中枢神经系统和肠神经系统间及胃肠效应细胞间实现的，此类物质可以调节胃肠运

动、分泌及吸收，一定程度上揭示了脾虚与胃肠关系。谢丽琼^[24]研究认为脾的生物学实质是线粒体，脾虚持续状态代表着机体内线粒体的广泛损伤，导致能量代谢重编程，不良代谢产物快速蓄积，由虚致痰致瘀，甚至化毒，构成肿瘤微环境，为结肠癌发生发展提供能量和物质基础。可认为脾虚在结肠癌演进过程中至关重要，属于结肠癌发生发展的病理基础并贯穿其全过程，其内在联系有待进一步探究。

综上所述，结肠癌日益威胁人类健康与生命安全，深入开展结肠癌防治工作势在必行。构建动物肿瘤模型是研究肿瘤疾病的重要手段之一，构建以病证结合为基础的动物肿瘤模型可以更好地发挥中医辨证论治与西医科技手段的优势。中医在治疗结肠癌方面有着独特的优势，而脾虚证是肠癌的主要中医证候。建立脾虚证小鼠模型和 AOM 联合 DSS 诱导的脾虚证小鼠结肠癌模型，完整观察并记录模型建立发展的过程，对两者进行多方面对比，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响，对脾虚证结肠癌具有一定的实验研究及临床治疗指导意义。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] Tingting Wu, Shiqiang Zhang, Shaowen Guo² MB, Yizhong Gu, Liping Dou, Yanying Wang⁵, Haisheng Zhang, Shengcheng Cao, Yuan Li, Yi Zhong*. Correspondence analysis between traditional Chinese medicine (TCM) syndrome differentiation and histopathology in colorectal cancer[J]. European Journal of Integrative Medicine, 2015, 7(4):342-347.
- [3] 张炜华, 林胜友, 王萧萧, 等. 肿瘤化疗对大肠癌中医证型影响的分析: 511 例大肠癌中医证型的回顾性研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, (3):278-279, 282.
- [4] 刘静, 张军, 朱琦, 等. 中医药治疗大肠癌辨证用药分析[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(9):1166-1167.
- [5] 洪卫文. 小鼠模型在大肠癌研究中的应用进展[J]. 医学综述, 2010, 16(3):3588-3590.
- [6] 周延杰. 人结肠癌实验动物模型建立的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2011, 21(1):60-62.
- [7] 戴建功, 金黑鹰, 夏建国. 裸鼠结直肠癌原位移植模型的建立和应用进展[J]. 实用临床

- 医药杂志, 2010, 14(5):117-121.
- [8] Sasaki H, Miura K, Horii A, et al. Orthopotic implantation mouse model and cDNA microarray analysis indicates several genes potentially involves in lymph node metastasis of colorectal cancer[J].Cancer, 2008,99(4):711-719.
- [9] Yu Y, Sun P, Sun LC, et al. Downregulation of MDM2 expression by RNAi inhibits LoVo human colorectal adenocarcinoma cells growth and the treatment of LoVo cells with MDM2siRNA3 enhances the sensitivity to cisplatin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,339(1):71-78.
- [10] 倪艳艳, 范跃祖. 结肠癌动物模型的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版), 2010, 31(2):110-113.
- [11] 李宇华, 刘莉, 冯娟, 等. 一种结肠炎相关的结肠癌模型的复制[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(3):234-239.
- [12] 方瑞, 刘永谦, 杜展莹, 等. 二甲胍诱导小鼠结肠癌模型的建立及病理学特征检测[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(3):371-375.
- [13] 康洁, 高碧珍. 病证结合动物模型研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11):2357-2359.
- [14] 黄越燕. 病证结合动物模型的研究现状与思考[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(10):1459-1462.
- [15] 北京师范大学生物系消化生理科研组. 脾虚证动物模型的建立及其实质的探讨[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1979, (1):113.
- [16] 刘玉, 陈慧. 脾虚病证结合动物模型研究进展[J]. 中国中医急症, 2016, 25(1):99-101.
- [17] 蒋萃, 李白雪, 袁世清, 等. 脾虚证大鼠模型的制备方法研究进展及评价[J]. 环球中医药, 2018, 11(8):1333-1336.
- [18] 邹世洁, 周永生, 樊雅莉, 等. 脾气虚证动物模型规范化的初步研究——宏观征部分[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(5):264-267.
- [19] 陈彬. 健脾解毒方对脾虚证荷瘤小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1):81-85.
- [20] 张芸. 附子粳米汤对脾阳虚模型大鼠血中白介素 1β 、肿瘤坏死因子 α 的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(3):78-79.
- [21] 吴秀, 周联, 罗霞, 等. 四君子汤多糖对脾虚小鼠肠道菌群及免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2):12-14.
- [22] 谭舒舒. 枳壳及其主要活性成分对脾虚模型大鼠血清胃泌素、血浆乙酰胆碱、胃动素、P物质和血管活性肠肽的影响[J]. 珍国医国药, 2017, 28(5):1037-1040.

[23] 马祥雪,王凤云,符俊杰,等. 从脑肠互动角度探讨脾主运化的物质基础与科学内涵 [J]. 中医杂志, 2016, 57(12) : 996.)

[24]马祥雪,王凤云,符俊杰,等. 结肠癌“脾虚”病机的生物学基础探要 [J]. 四川中医, 2020, 38(3) : 47-49.)

2、研究方案（研究目标、研究内容、研究方法及重点难点、拟解决的关键问题等）

2.1 研究目标

2.1.1 理论目标

1. 对脾虚证小鼠模型及脾虚证小鼠结肠癌模型进行比较，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响，为脾虚证结肠癌提供实验研究及临床治疗指导意义。

2. 构建脾虚证小鼠结肠癌模型，为结肠癌的临床治疗和实验研究提供证型方向上的数据参考，进一步认识中医辨证理论对结肠癌治疗的指导作用。

3. AOM 联合 DSS 诱导法构建脾虚证小鼠结肠癌模型，为脾虚证结肠癌的各阶段研究提供动物模型参考，为其他肿瘤疾病的病证结合动物模型研究提供理论参考。

2.1.2 实际目标

1. 选取化学诱导法中的 AOM 联合 DSS 诱导法动物肿瘤模型构建方法，结合脾虚证动物模型的构建方法，构建病证结合的脾虚证小鼠结肠癌模型。

2. 观察记录脾虚证小鼠结肠癌模型建立的全过程，动态演示中医证候特征下的西医疾病变化过程，直观地展现脾虚证结肠癌发展的各个阶段，探究疾病发展过程，为临床针对脾虚证结肠癌分阶段治疗研究提供模型参考。

3. 对所构建的小鼠模型进行比较，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响，为脾虚证结肠癌提供实验研究及临床治疗指导意义。

2.2 研究内容

2.2.1 构建病证结合的动物肿瘤模型

根据相关资料指导，结合脾虚证小鼠模型，利用化学诱导法中的 AOM 联合 DSS 诱导法构建脾虚证小鼠结肠癌模型。

2.2.2 动态展现脾虚证小鼠结直肠癌的发展过程

根据结肠癌的病情进展规律，在构建模型后的特定时间内分别随机抽取小鼠若干，动态观察结肠癌病程发展并记录相关数据。

2.2.3 探究脾虚与结肠癌的内在联系

构建脾虚证小鼠模型及 AOM 联合 DSS 诱导的脾虚证小鼠结肠癌模型，分析

两者的数据差异，探究脾虚在现代医学中的表现形式，发掘脾虚证与结肠癌的内在联系，指导临床治疗脾虚证型结肠癌。

2.3 研究方法及重点难点

2.3.1 研究方法

2.3.1.1 材料与动物

(1) 实验小鼠

SPF 级 BALB / c 小鼠 72 只，6 周龄，体质量 18-20g，购自中国科学院上海实验动物中心；饲养于上海中医药大学动物实验中心 SPF 级实验动物室。

(2) 主要试剂与药物

氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)、葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)、购自美国 Sigma 公司；番泻叶传统方法煎成水煎液，4℃保存备用。

2.3.1.2 分组与造模

小鼠适应环境喂养 1 周，1 周后将 72 只小鼠随机分为 A 组(正常对照组)和 B、C、D 组(实验组)，具体数量为 A 组 12 只，B 组 20 只、C 组 20 只、D 组 20 只。注意保持喂养环境 20-23℃，湿度 20%-40%，保持生活环境通风和清洁卫生。

(1) 正常对照组

A 组，小鼠 12 只，为正常对照组，保持正常喂养，持续 13 周。

(2) 脾虚证小鼠模型构建

B 组，小鼠 20 只，分别用 200%的番泻叶水煎液灌胃，剂量为 20ml/(kg • d)，隔天禁食，连续 14 天。14 天后改为正常饮食喂养，隔天用 200%的番泻叶水煎液灌胃，剂量为 20ml/(kg • d)，连续 11 周。

(3) AOM 联合 DSS 诱导法建立小鼠结肠癌模型

C 组为 AOM 联合 DSS 组，小鼠 20 只，于建模第 1 天将 20 只小鼠腹腔注射氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)，剂量为 10 mg / kg，AOM 配制成 1mg/ml，注射体积 0.1ml/10g。正常饮用蒸馏水 1 周后，饮水中给予 2%葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS) 持续 1 周，每 2 天更换新鲜配置的 DSS，然后恢复正常饮水两周，此 3 周为一个 DSS 周期，总共进行 4 个周期的 DSS 循

环。实验期间不禁食。造模中第 28，49，70，91 天为第 1 至第 4 个循环的最后一天。

(4) 结合脾虚证模型与结肠癌模型构建脾虚证小鼠结肠癌模型

D 组, 小鼠 20 只, 分别用 200%的番泻叶水煎液灌胃, 剂量为 20ml/(kg · d), 隔天禁食, 连续 14 天。根据脾虚诊断标准确定小鼠脾虚证模型复制成功后, 进入小鼠结肠癌模型构建。于建模第 1 天将 20 只小鼠腹腔注射氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM), 剂量为 10 mg / kg, AOM 配制成 1mg/ml, 注射体积 0.1ml/10g。正常饮用蒸馏水 1 周后, 饮水中给予 2%葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS) 持续 1 周, 每 2 天更换新鲜配置的 DSS, 然后恢复正常饮水两周, 此 3 周为一个 DSS 周期, 总共进行 4 个周期的 DSS 循环。实验期间不禁食, 根据脾虚证表现, 在每个循环的正常饮水周内, 有选择性地每周进行 2 次用 200%的番泻叶水煎液灌胃, 剂量为 20ml/(kg · d), 保持脾虚证表现。

2.3.1.3 动物模型的临床表现观察

实验开始后, 每天观察动物健康状况, 包括毛色、活动、粪便性状, 有无肉眼血便及脱肛等情况, 同时注意观察脾虚证候及表现, 记录相关内容, 按照 UC 活动指数 (DAI) 评分标准进行评分, 见表 1。实验第 1 周各组小鼠每天称重 1 次, 1 周后各组小鼠改为每周称重 1 次。

分值	观察指标
0 分	体质量无下降, 大便性状正常, 无出血
1 分	体质量下降<5%, 大便略松散, 有隐性出血
2 分	体质量下降<10%, 大便松散, 肉眼可见出血
3 分	体质量下降≥10%, 腹泻, 血便

表 1

2.3.1.4 动物模型的大体观察与记录

A、B、C、D 四组小鼠在每个 DSS 周期结束后 (即结肠癌造模后的第 28、49、70、91 天), 分别随机断颈处死 A 组小鼠 3 只, B、C、D 组小鼠各 5 只, 摘取小鼠肛门至回盲部连接处肠段, 量取肠道长度, 纵行切开, 4℃预冷的 PBS

冲洗，行大体观测并记录肠壁与肠黏膜的改变，肿块的大小、数量、位置。

2.3.1.5 组织学观察及病理评分

A、B、C、D 四组小鼠在每个 DSS 周期结束后（即结肠癌造模后的第 28、49、70、91 天），分别随机断颈处死 A 组小鼠 3 只，B、C、D 组小鼠各 5 只，收集小鼠的结肠及肝、肺组织，分组编号，用 10%（Φ）甲醛溶液固定，常规脱水，石蜡包埋，切片，伊红-苏木素(HE)染色，镜检。

参考相关文献，进行小鼠大肠炎症评分、息肉评分及肿瘤病理评分。

结肠炎症评分标准参考如下：当临床症状及结肠出现以下每一项时各记 1 分，如充血、出血、狭窄、溃疡、血便、黏液、腹泻和粘连，加上结肠距肛门 1 cm 处或结肠病变部位最厚处的厚度(mm) 得分。

结肠息肉评分系统是根据观察到结肠的息肉数目来进行评价，参考如下：无息肉为 0 分，1-3 个孤立息肉为 1 分，4 个或以上孤立息肉为 2 分，几个息肉融合成片或隆起呈块状为 3 分。

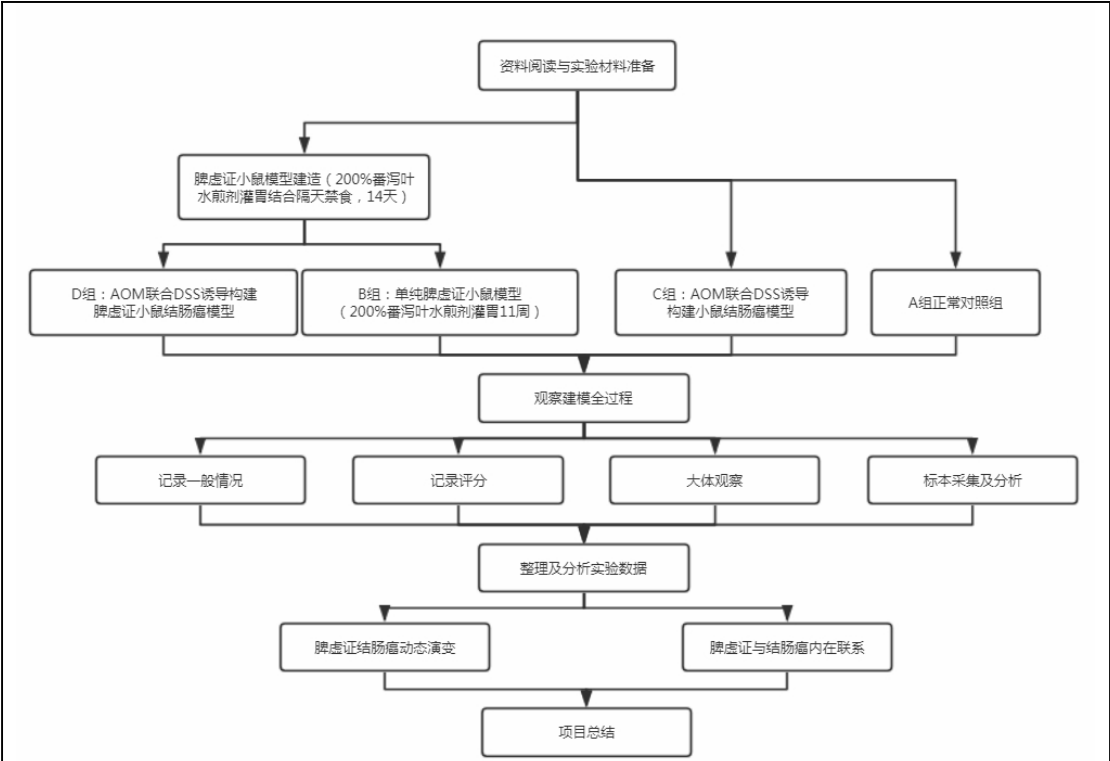
肿瘤评分标准基于 3 个方面，参考如下：隐窝(正常为 0 分，杯状细胞减少为 1 分；分支状、不规则、隐窝腔扩张为 2 分；萌芽复合体为 3 分)；上皮(正常为 0 分，过度增生或畸形隐窝病灶为 1 分，轻度不典型增生：核仁增大、轻度深染、细胞核秘籍分层现象为 2 分，高度不典型增生：细胞核分层、重度深染、多形性、核极性消失为 3 分)，黏膜下浸润(无为 0 分，有为 1 分)。

2.3.1.6 血清指标检测

A、B、C、D 四组小鼠在每个 DSS 周期结束后（即结肠癌造模后的第 28、49、70、91 天），分别随机断颈处死 A 组小鼠 3 只，B、C、D 组小鼠各 5 只，处死前从眼眶后静脉采血，采集足量的血液标本，保持标本的清洁，血液存放于 1.5mLEP 管中，4℃放置过夜。低温离心，4000r/min，离心 10min，可见淡黄色血清与血细胞完全分离，再用移液器将血清移至 EP 管中分装，并作好标记，保存于-20℃冰箱中，用于检测 IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子（TNF-α）的浓度，操作严格按照说明书要求执行。

2.3.1.7 统计学方法

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS20.0 软件分析，各组数据比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



技术路线图

2.3.2 重点难点

2.3.2.1 探究脾虚证与结肠癌内在联系

脾虚证作为结肠癌主要中医证候，在现代医学中的客观体现，从客观数据角度分析脾虚证与结肠癌的相互联系。

2.3.2.2 模型的选取与构建

目前关于脾虚证动物模型与结肠癌动物模型的构建方法多样，如何进行病证结合构建模型，减少模型之间的影响，最大程度地在模型中体现脾虚证与结肠癌的关系是本项目的重难点之一。同时因实验模型较多，合理安排建模时间也是本次项目的难点之一。

2.3.2.3 脾虚证的成功构建与维持

构建脾虚证的动物模型需要考虑动物自身的自愈能力，如何维持并监测实验过程中小鼠的脾虚症状是本项目的难点之一。

2.3.3.4 疾病发展的观察

目前针对脾虚证小鼠结肠癌模型的动态演示过程极少，观察记录疾病的发

生发展规律是本项目的重点之一。

2.4 拟解决的关键问题

2.4.1 模型构建的有机结合

单独针对脾虚证及结肠癌的实验模型与研究数据丰富，但两者结合研究的资料较少，如何更好地达到脾虚证模型与结肠癌模型的融合，减少模型间的相互影响，选择合适模型构建方法尤为重要。

2.4.2 维持脾虚证的症状表现与脾虚证的监测

因实验涉及两种不同的建模方式，必须在两种模型结合的基础上，稳定小鼠的脾虚证表现。此外，要选择具有代表性的西医数据指标结合中医脾虚证临床表现，对小鼠的脾虚症状作出客观评价。

2.4.3 探究脾虚与结肠癌的内在联系

脾虚与结肠癌有着必然的联系，把其关系内涵通过客观数据进行形象化、具体化、科学化地展示，在临床上才能进一步指导治疗脾虚证结肠癌患者。

3、创新点和可行性分析

3.1 创新点分析

1. 对所构建的小鼠模型进行比较，对结肠癌及脾虚的客观指标进行分析，探究脾虚与结肠癌发生发展的内在联系及相互影响，为脾虚证结肠癌提供临床治疗指导意义。

2. 本项目构建脾虚证小鼠结肠癌模型，观察记录病证结合动物模型建立的全过程，动态演示中医证候特征下的西医疾病变化过程，直观地展现脾虚证结肠癌发展的各个阶段，为临床针对结肠癌分阶段治疗研究提供模型参考。

3. 本项目通过构建脾虚证小鼠结肠癌模型，深入了解中医证候与动物疾病模型的内在联系，为脾虚证结肠癌研究提供稳定的动物模型，为其他临床疾病的动物模型研究提供更多参考依据，提高动物利用率及实验成功率。

4. 本项目融合了中医的辨证论治体系和西医的科学技术手段，是中西医结合的重要体现，为中西医结合的可行性提供了证据支持。

3.2 可行性分析

3.2.1 实验条件完善

上海中医药大学作为一所双一流中医药高等院校，学校实验设施完善，设有专门的动物实验中心，管理规范，是上海中医药大学科研和教学的基础性技术支撑保障体系之一，主要承担了全校教学和科研用动物的供应、动物实验的饲养管理，此外，还开展有关实验动物的科学研究，接受校内外动物实验的委托，提供动物实验技术服务。2008年2月医学实验动物室被浦东新区认定为浦东新区科技公共服务平台。

实验动物楼备有一万级屏障系统大小鼠动物实验室、普通级实验犬饲养区、实验兔、豚鼠饲养区、IVC动物实验室和质检实验室及兽医室等。SPF级大小鼠设施和普通级犬、兔和豚鼠饲养设施通过上海市实验动物管理委员会的验收，取得了相应的使用许可证。

3.2.2 实验设计合理

本课题基于病证结合的基础，构建脾虚证小鼠结肠癌模型，探究其科学内涵，为后续研究脾虚证结肠癌最优模型选择提供充分的理论及实践依据，并在模型研究基础上深入挖掘脾虚证与结肠癌的内在联系，为临床治疗脾虚证结肠

癌提供理论指导。本项目动物模型为公认的脾虚证模型及结肠癌动物模型，建模方法成熟且被广泛应用。以上为本项目合理可行的实验方案设计提供保障。 3.2.3 实验人员成熟 项目负责人为在读一年级研究生，本科期间积极参与大学城创新创业训练项目，曾主持参与 2 项课题工作，有一定的课题工作开展经验。研究生一年级期间积极参与细胞实验及鼠类动物实验，熟练基本操作。项目参与成员均顺利通过本校实验动物学课程考核，参加动物实验中心的周次培训，获得动物实验中心上岗证。项目全体人员均具有课题设计及实验操作经验，拥有扎实的理论知识与操作技能。															
4、预期成果表达（阶段性成果表达名称及形式；成果表达申请者为第一作者，上海中医药大学为第一单位，并标注创新计划项目资助） 1. 发表相关论文 1 篇（项目负责人为第一作者，上海中医药大学为第一单位，并标注创新计划项目资助） 2. 毕业研究生 1 名 3. 初步构建稳定的脾虚证小鼠结肠癌模型															
5、课题进度安排（按季度表明） <table border="1"> <thead> <tr> <th>项目时间</th> <th>工作安排</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2021.01-2021.03</td> <td>文献资料阅读与实验材料购买</td> </tr> <tr> <td>2021.04-2021.06</td> <td>建立脾虚模型及结肠癌模型</td> </tr> <tr> <td>2021.06-2021.09</td> <td>模型建立与进程观察</td> </tr> <tr> <td>2021.09-2021.12</td> <td>实验数据收集与标本收集分析</td> </tr> <tr> <td>2022.01-2022.03</td> <td>项目结题准备与论文撰写</td> </tr> <tr> <td>2022.04-2022.06</td> <td>项目结题与论文发表</td> </tr> </tbody> </table>		项目时间	工作安排	2021.01-2021.03	文献资料阅读与实验材料购买	2021.04-2021.06	建立脾虚模型及结肠癌模型	2021.06-2021.09	模型建立与进程观察	2021.09-2021.12	实验数据收集与标本收集分析	2022.01-2022.03	项目结题准备与论文撰写	2022.04-2022.06	项目结题与论文发表
项目时间	工作安排														
2021.01-2021.03	文献资料阅读与实验材料购买														
2021.04-2021.06	建立脾虚模型及结肠癌模型														
2021.06-2021.09	模型建立与进程观察														
2021.09-2021.12	实验数据收集与标本收集分析														
2022.01-2022.03	项目结题准备与论文撰写														
2022.04-2022.06	项目结题与论文发表														

三、项目成员及经费预算

课题申请人及主要参加人员的基本情况表					
姓 名	学号	专 业	部 门	项目分工	签 名
李诗颖	22020385	中医内科学	市中西医 结合临床 医学院	动物试验操作	
盛丹洁	22019384	中医内科学	市中西医 结合临床 医学院	实验数据整理	
李芸	22018351	中医内科学	市中西医 结合临床 医学院	实验结果分析	
经费组成概算（单位：元人民币）					
项目总经费			申请经费		
26500 元			26500 元		
经费预算明细					
预算项目名称	金 额	计算根据和理由			
实验动物购买	6500 元	SPF 级 BALB / c 小鼠 50 元/只*72 只=3600 元 动物饲养费 40 元*72 只=2880 元			
实验材料购买	7000 元	番泻叶 50 元 AOM 2000 元 DSS 2000 元 试剂盒 2000 元 一次性实验消耗品 950 元			
测试加工费用	7000 元	200 元/例×35 例			
论文版面费用	5000 元	1 篇×5000 元/1 篇			
差旅费用	1000 元	交通费及实验标本运输费用			

四、审核意见

申请人承诺:

我保证上述内容的真实性。如获得资助,我将严格遵守学校规定,切实保证研究工作时间,按计划认真开展研究工作,按时完成研究项目并报送有关材料。

研究生签名: 李诗颖

2020 年 11 月 07 日

导师意见:

1、课题是否由学生自主设计

☒ 是 ☐ 否

2、是否同意推荐

☒ 同意 ☐ 不同意

3、是否同意匹配经费

☒ 同意 ☐ 不同意

签 名: 钟薏

2020 年 11 月 07 日

二级学院审核:

负责人签名(盖章):

年 月 日

研究生院审核:

签 名(盖章):

年 月 日