

两种溃疡性结肠炎小鼠模型的构建 及其炎症反应机制比较

苗 政, 钱家鸣, 李景南, 唐晓艳, 杨晓鸥

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院消化内科, 北京 100730

通信作者: 李景南 电话: 010-65295262, E-mail: lijn2008@gmail.com

【摘要】目的 构建葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 以及恶唑酮 (oxazolone, OXZ) 诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型, 比较两种模型中炎症因子水平的变化, 评价两种模型。**方法** 12 只 C57BL 小鼠, 随机分为两组, DSS 模型组 ($n=8$) 予 3% DSS 自由饮用 5 d, DSS 对照组 ($n=4$) 饮用蒸馏水 5 d, 第 6 天处死两组小鼠。8 只 BALB/C 小鼠, 随机分为两组, OXZ 模型组 ($n=4$) 予皮肤涂抹 3% OXZ (100% 乙醇溶剂) 0.2 ml 2 d, 5 d 后以 0.8% OXZ (50% 乙醇溶剂) 0.15 ml 灌肠; OXZ 对照组予皮肤涂抹 100% 乙醇 0.2 ml 2 d, 5 d 后以 50% 乙醇 0.15 ml 灌肠, 灌肠后第 3 天处死两组小鼠。观察各组小鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI)、结肠组织大体评分和病理评分, 并检测小鼠结肠组织中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、白细胞介素-4 (interleukin 4, IL-4)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核因子 κ B (nuclear factor-Kappa B, NF- κ B) 的水平。**结果** 两种模型组小鼠 DAI、组织大体评分和病理评分均较对照组有明显改变; DSS 结肠炎、OXZ 结肠炎均可导致 MPO、TNF- α 、NF- κ B 明显上升, DSS 结肠炎 IFN- γ 明显上升, OXZ 结肠炎 IL-4 明显上升。**结论** DSS 及 OXZ 均能诱导出小鼠溃疡性结肠炎模型, 其中 OXZ 诱导的小鼠溃疡性结肠炎是 Th2 型炎症反应, 更接近人类溃疡性结肠炎。

【关键词】 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 恶唑酮; 白细胞介素-4; 干扰素- γ ; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子 κ B

【中图分类号】 R574; R392-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2010)02-0145-05

Establishment of Two Murine Models of Ulcerative Colitis and Comparison of the Mechanism of Colitis-related Inflammatory Reactions

MIAO Zheng, QIAN Jia-ming, LI Jing-nan, TANG Xiao-yan, YANG Xiao-ou

Department of Gastroenterology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy
of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Jing-nan Tel: 010-65295262, E-mail: lijn2008@gmail.com

【Abstract】 Objective To establish two murine models of ulcerative colitis (UC) and explore the mechanism of colitis-related inflammatory reactions. **Methods** Totally 12 C57BL mice were randomly divided into two groups: dextran sulfate sodium (DSS) model group ($n=8$, allowed to drink 3% DSS for 5 days) and DSS control group ($n=4$, allowed to drink water for 5 days). In addition, 8 BALB/C mice were randomly divided into oxazolone (OXZ) model group ($n=4$, mice were skin-sensitized with 3% OXZ 0.2 ml in 100% ethanol for 2 days followed by intrarectal administration of 0.8% OXZ 0.15 ml in 50% ethanol 5 days later) and OXZ control group ($n=4$, mice were skin-sensitized with 100% ethanol for 2 days followed by intrarectal administration of 50% ethanol 0.15 ml 5 days later). The disease activity index (DAI), tissular general score, and histological score were calculated. The levels of myeloperoxidase (MPO), interleukin 4 (IL-4), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and nuclear factor-Kappa B (NF- κ B) in the colon tissue were

determined. **Results** DAI, tissular general score, and histological score were significantly different in either DSS or OXZ model group when compared with their control groups. MPO, TNF- α , and NF- κ B significantly increased in DSS and OXZ model groups. In addition, INF- γ significantly increased in DSS model group and IL-4 significantly increased in OXZ model group. **Conclusions** Both DSS and OXZ can induce ulcerative colitis in mice. OXZ-induced murine colitis is highly associated with T helper cell type 2 (Th2), which is more similar to human UC.

【Key words】 ulcerative colitis; dextranulfatesodium; oxazolone; interleukin 4; interferon- γ ; tumor necrosis factor- α ; nuclear factor-Kappa B

Med J PUMCH, 2010, 1(2):145-149

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种慢性非特异性胃肠道炎症性疾病, 包括克罗恩病 (Crohn disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)。近年来, 我国 UC 的发病率呈快速上升趋势。UC 的发病机制目前尚不清楚, 大部分学者认为, 其发病是由多因素相互作用所致, 主要包括免疫、环境、遗传易感性以及肠道微生物等^[1]; 临床治疗以激素、水杨酸制剂和免疫抑制剂为主, 但疗效不够满意, 且长期应用有较多的不良反应。因此, 建立理想的动物模型, 对阐明 UC 的病因、发病机制及评价药物疗效具有重要的意义。本实验分别以葡聚糖硫酸钠 (dextranulfatesodium, DSS) 及恶唑酮 (oxazolone, OXZ) 诱导构建小鼠溃疡性结肠炎模型, 分析两种动物模型的疾病活动指数 (disease activity index, DAI)、结肠组织大体评分及病理评分, 并检测两种模型结肠组织中的髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)、白细胞介素 4 (interleukin 4, IL-4)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核因子 κ B (nuclear factor-Kappa B, NF- κ B) 等重要炎性因子的表达, 评价两种建模方式。

材料和方法

材料

选用 C57BL、BALB/C 雄性小鼠, 均为 7 周龄, 体重 18~23 g, SPF 级, 由中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心饲养。DSS 购自 MP Biomedicals 公司, OXZ 购自 Sigma 公司。ELISA 试剂盒购自北京盛科博源生物有限公司。

DSS 小鼠结肠炎模型的建立

参考 Melgar 等^[2]方法, 选取 12 只 C57BL 小鼠, 随机分为两组, DSS 模型组 ($n=8$) 予 3% DSS 自

由饮用 5 d, DSS 对照组 ($n=4$) 饮用蒸馏水 5 d, 第 6 天处死两组小鼠。

OXZ 小鼠结肠炎模型的建立

参考 Heller 等^[3]方法, 选取 8 只 BALB/C 小鼠, 随机分为两组, OXZ 模型组 ($n=4$) 暴露腹部皮肤后涂抹 3% OXZ (100% 乙醇溶剂) 0.2 ml, 第 2 天重复 1 次, 5 d 后经小鼠肛门缓慢注入 0.8% OXZ (50% 乙醇溶剂) 0.15 ml; OXZ 对照组 ($n=4$) 仅于腹部涂抹 100% 乙醇溶液和 50% 乙醇溶液 0.15 ml 灌肠, 灌肠后第 3 天处死两组小鼠。

观察指标

小鼠自实验开始即每天记录一般情况, 按 Oka-yasu 等^[4]标准进行 DAI 评分 (表 1)。处死小鼠后观察肠黏膜外观, 参照 Luk 等^[5]标准进行结肠组织大体评分 (表 2), 取近肛门端结肠组织及有溃疡部位结肠组织进行固定、HE 染色, 参照 Ekstrom 等^[6]标准进行结肠组织病理评分 (表 3)。

表 1 疾病活动指数评分表

计分	体重下降 (%)	大便性状	隐血/肉眼血便
0	0	正常	—
1	1~5	半稀便	—
2	5~10	—	—
3	10~15	稀便	肉眼血便
4	>15	—	—

表 2 结肠组织大体评分表

项目	评分
无损伤	0
黏膜充血但没有溃疡	1
充血而且肠壁变厚但没有溃疡	2
有一处溃疡但没有肠壁增厚	3
有两处或两处以上溃疡/炎症	4
有两处或两处以上大溃疡或有一处溃疡/炎症	5
沿结肠纵轴超过 1 cm	
沿结肠纵轴损伤超过 2 cm, 每超过 1 cm 加 1 分	6~10

表 3 结肠组织病理评分表

项目	评分			
	0	1	2	3
上皮损伤和溃疡形成	无	糜烂	溃疡	—
溃疡深度	—	黏膜下层	肌层	浆膜层
水肿	无	轻度	中度	重度
淋巴、单核、浆细胞浸润	无	轻度	中度	重度
浸润深度	—	黏膜下层	肌层	浆膜层
中性粒细胞浸润	无	轻度	中度	重度
浸润深度	—	黏膜下层	肌层	浆膜层
嗜酸性粒细胞浸润	无	轻度	中度	重度
浸润深度	—	黏膜下层	肌层	浆膜层

结肠组织 MPO、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、NF- κ B 含量测定

将结肠组织匀浆充分后,于 4000 r/min、4℃ 离心 20 min,取上清。使用 100 μ l 上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,酶标仪 450 nm 检测标本的吸光值,并根据标准品不同浓度的吸光值绘制标准曲线,通过标本的吸光值在标准曲线上查出 MPO、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、NF- κ B 的相应浓度。

统计学处理

采用 SPSS 17.0 中文版统计软件。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,对各组数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著统计学意义。

结 果

不同小鼠模型的 DAI 评分

DSS 模型组小鼠饮用 DSS 第 3 天时出现相应症状,第 4 天时全部出现稀便,第 6 天时 4 只小鼠出现血便 (4/8);DSS 对照组小鼠未出现异常情况。OXZ 模型组小鼠灌肠后 24 h 出现体重下降和腹泻,第 3 天时 3 只小鼠出现肉眼血便 (3/4);OXZ 对照组小鼠灌肠后症状较轻且无血便。DSS 组第 6 天及 OXZ 组第 3 天的 DAI 评分见表 4。

不同小鼠模型结肠组织大体评分

DSS 模型组与对照组小鼠比较,结肠组织可见明显水肿、充血,有糜烂及小的溃疡。OXZ 模型组小鼠结肠组织水肿、充血明显,可见多处或长段溃疡;OXZ 对照组小鼠结肠组织水肿、略充血,肠壁无明显增厚,仅 1 只小鼠结肠组织可见小溃疡 (表 4)。

不同小鼠模型结肠组织病理评分

DSS 模型组与对照组小鼠比较,结肠组织切片可见上皮细胞紊乱、部分隐窝消失,黏膜下层、肌层中性粒细胞浸润严重。OXZ 模型组小鼠结肠组织切片可见结肠黏膜腺体大范围破坏、隐窝消失、上皮细胞脱落、形成浅溃疡、黏膜有出血;固有层间质呈弥漫性炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主;黏膜下层水肿明显、多种炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主;OXZ 对照组小鼠结肠组织切片可见黏膜层少量中性粒细胞浸润 (表 4)。

不同小鼠模型结肠组织 MPO、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、NF- κ B 含量

饮用 DSS 后 5 d,DSS 模型组结肠组织 MPO、IFN- γ 、TNF- α 、NF- κ B 明显上升,IL-4 无明显变化。灌肠后第 3 天,OXZ 模型组结肠组织 MPO、IL-4、TNF- α 、NF- κ B 值较 OXZ 对照组明显上升,IFN- γ 无明显变化 (表 5)。

表 4 不同小鼠模型疾病活动指数、结肠组织大体评分及病理评分

组别	n	DAI	结肠组织评分	
			大体评分	病理评分
DSS 对照组	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.38 $\pm$ 0.52
模型组	8	2.46 $\pm$ 0.35 **	5.25 $\pm$ 1.28 **	8.31 $\pm$ 0.95 **
OXZ 对照组	4	0.29 $\pm$ 0.21	1.50 $\pm$ 0.58	2.25 $\pm$ 0.71
模型组	4	2.88 $\pm$ 0.62 **	6.75 $\pm$ 0.96 **	10.88 $\pm$ 1.13 **

DAI: 疾病活动指数;与相应对照组比较, ** $P < 0.01$

表 5 不同小鼠模型结肠组织 MPO、IL-4、IFN- γ 、TNF- α 、NF- κ B 含量

组别	n	MPO (U/L)	IL-4 (pg/ml)	IFN- γ (ng/L)	TNF- α (ng/L)	NF- κ B (ng/L)
DSS 对照组	4	19.75 $\pm$ 6.59	66.36 $\pm$ 8.69	275.44 $\pm$ 41.24	40.41 $\pm$ 9.12	145.61 $\pm$ 20.44
模型组	8	93.93 $\pm$ 22.53 **	83.70 $\pm$ 32.72	1530.82 $\pm$ 274.33 **	366.04 $\pm$ 109.75 **	805.21 $\pm$ 139.46 **
OXZ 对照组	4	37.49 $\pm$ 8.51	85.91 $\pm$ 9.55	266.01 $\pm$ 24.90	47.18 $\pm$ 8.55	217.40 $\pm$ 56.41
模型组	4	122.19 $\pm$ 19.57 **	178.57 $\pm$ 18.95 **	217.37 $\pm$ 35.59	201.34 $\pm$ 35.17 **	1144.35 $\pm$ 235.44 **

MPO: 髓过氧化物酶; IL-4: 白细胞介素-4; IFN- γ : 干扰素- γ ; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α ; NF- κ B: 核因子 κ B
与相应对照组比较, ** $P < 0.01$

讨 论

IBD 的许多研究成果来源于 IBD 动物模型, 因而构建理想的动物模型对于阐明该病的病因、发病机制及观察药物疗效有着重要的意义。目前, 建立 IBD 动物模型的方法主要有自发性动物模型、基因型动物模型、细胞移植型动物模型和化学药物诱导型动物模型, 其中以化学药物诱导的方法应用最为广泛。近年来, 应用较多的诱导 IBD 动物模型的化学物质有三硝基苯磺酸 (trinitro picrylsulfonic acid, TNBS)、DSS、OXZ 等。

DSS 是由蔗糖合成的一种硫酸多糖, 具有和肝素一样的抗止血和抗凝血作用, 其诱导的动物模型被广泛应用于实验性 IBD 研究。本实验用 3% DSS 溶液给小鼠饮用 5 d, 出现结肠急性炎症, 其临床表现、结肠大体评分及病理表现与 UC 相似。OXZ 是一种半抗原, 经 OXZ 皮肤接触致敏的动物, 在皮肤再次接触该物质时可发生迟发型过敏反应, 而胃肠道黏膜再次接触 OXZ 所引起的炎症免疫反应较重且持续时间长。本实验先用 3% OXZ (100% 乙醇溶剂) 两次经皮肤使小鼠致敏, 再用 0.8% OXZ (50% 乙醇溶剂) 灌肠, 小鼠迅速发病, 临床表现、结肠组织大体评分、病理表现均与 UC 相似。提示 DSS 和 OXZ 均可以成功构建小鼠溃疡性结肠炎模型, 但从炎症因子的改变水平上看, 两种模型还存在一定的差异。两种小鼠溃疡性结肠炎均可导致 MPO、TNF- α 、NF- κ B 明显上升, 不同的是 DSS 结肠炎 IFN- γ 明显上升, 而 OXZ 结肠炎 IL-4 明显上升。

目前的大量证据表明, IBD 发病可能与 Th1 细胞和 Th2 细胞的平衡失调相关。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2; Th2 细胞主要分泌 IL-4 和 IL-5。Th1 细胞、Th2 细胞通过分泌细胞因子, 相互调节对方的生长与分化, 从而维持 Th1 细胞、Th2 细胞间的平衡, 而此平衡的破坏与 IBD 发病密切相关^[7]。IFN- γ 是一种强有力的促炎因子; 而 IL-4 是 Th2 细胞产生的一种抑制炎

症的细胞因子。本实验结果显示, DSS 结肠炎 IFN- γ 明显上升, 但 IL-4 也有上升趋势 [(83.70 $\pm$ 32.72) pg/m, 对照组为 (66.36 $\pm$ 8.69) pg/m, $P = 0.332$], 提示在 DSS 结肠炎中 Th1 细胞和 Th2 细胞可能都发挥着重要作用。也有文献报道 DSS 结肠炎 IL-4 明显上升^[8-9], 据此推测 DSS 诱导的结肠炎是一种非典型 Th1 细胞和 Th2 细胞炎症反应。OXZ 结肠炎模型的 IL-4 明显升高, 表明 OXZ 结肠炎与 IL-4 水平紊乱有关。众多文献显示, IL-4 水平在 OXZ 结肠炎明显升高, 且处于中心作用^[10]。文献还报道, 另外一种抑制炎症的细胞因子 IL-13, 也与 OXZ 结肠炎有关^[3,11]。本实验发现, OXZ 诱导的结肠炎促炎细胞因子 IFN- γ 无明显变化, 进一步证实了 OXZ 结肠炎是一种主要由 Th2 细胞介导的炎症, 其免疫机制可能是 Th2/Th1 间的免疫网络失衡所致。但这两种化学物质所致结肠炎的具体作用机制仍需进一步研究。

目前普遍认为人类 UC 是一种 Th2 细胞介导的炎症性肠病^[12]。现已明确为 Th2 型炎症的结肠炎模型仅有两种, 即 OXZ 结肠炎模型和 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) - α 缺陷小鼠的自发性结肠炎模型^[13]。因此, 可以认为 OXZ 较其他方法诱导的结肠炎更接近人类 UC 的发生机制, 在研究 UC 发病机制、筛选药物等方面有一定的优势。

参 考 文 献

- [1] Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease [J]. New Engl J Med, 2009, 361:2066-2078.
- [2] Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulphate sodium progresses into chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice-correlation between symptoms and inflammation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288:G1328-G1338.
- [3] Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is me-

- diated by IL-13 -producing NK-T cells [J]. Immunity, 2002, 17:629-638.
- [4] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice [J]. Gastroenterology, 1990, 98:694-702.
- [5] Luk HH, Ko JK, Fung HS, et al. Delineation of the protective action of zinc sulfate on ulcerative colitis in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 443:197-204.
- [6] Ekstrom GM. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid [J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33:174-179.
- [7] Fausto SM, Aaron DL, Jesus KY. Role of cytokines in inflammatory bowel disease [J]. World Gastroenterol, 2008, 14:4280-4288.
- [8] Forbes E, Murase T, Yang M, et al. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase [J]. J Immunol, 2004, 172:5664-5675.
- [9] Choi SY, Hur SJ, An CS, et al. Anti-inflammatory effects of Inonotus obliquus in colitis induced by dextran sodium sulfate [J]. Biomed Biotechnol, 2010-03-10 [Epub ahead of print]. <http://www.hindawi.com/journals/jbb/>.
- [10] Ryotaro K, Satoko K, Tomiko O, et al. Oxazolone-induced Colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative Colitis [J]. Pharmacol Sci, 2004, 96:307-313.
- [11] Dharmani P, Chadee K. Biologic therapies against inflammatory bowel disease: a dysregulated immune system and the cross talk with gastrointestinal mucosa hold the key [J]. Curr Mol Pharmacol, 2008, 1:195-212.
- [12] David QS, Stephan RT. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14:390-400.
- [13] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity [J]. Nat Med, 2002, 8:567-573.

(收稿日期: 2010-07-30)

• 医学新闻 •

邱贵兴院士荣获香港骨科医学院荣誉院士称号

2010年5月,北京协和医院邱贵兴院士在香港出席了香港骨科医学院授予其荣誉院士称号的颁授典礼。

在颁授典礼上,香港骨科医学院前院长梁国穗教授首先介绍了邱贵兴院士多年来的学术成就,及其对中国骨科事业迅猛发展所做出的杰出贡献;香港骨科医学院院长熊良俭教授向邱贵兴院士颁发了香港骨科医学院“荣誉院士”证书。邱贵兴院士代表中华医学会骨科学分会做了题为“中国骨科事业的过去、现在和未来”的学术报告;并指出目前骨科界存在“重手术,轻保守;重临床,轻科教;重模仿,轻创新;重治疗,轻随访;重

操作,轻总结”的问题,引起了香港骨科同道的共鸣。梁国穗教授特别将邱贵兴院士总结的“五重五轻”制成牌匾悬挂于香港中文大学骨科学系的办公室,以警示骨科医师避免出现类似错误。

香港骨科医学院是香港骨科专业的法定机构,负责香港骨科医生的专业培训、专业课程设计及执行、颁发学分和组织专业考试等工作。香港骨科医学院“荣誉院士”是该院最高的荣誉称号,仅授予在骨科学界有杰出成就的专家学者。

(北京协和医院骨科 于 斌 赵 宇)