

[文章编号] 1007-0893(2005)05-0268-03

葡聚糖硫酸钠致小鼠结肠炎模型的建立与评价

张永锋 陈如山 吴正治 杨 敏

(深圳市中西医结合临床研究所, 广东 深圳 518035)

[摘要] 目的 探讨右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导小鼠形成溃疡性结肠炎的建立方法。方法 小鼠自由饮用3%DSS 7d产生急性炎症模型,此后继续饮用自来水14d产生慢性炎症模型。结果 急、慢性炎症模型小鼠的大体观察及组织学病理改变与人类溃疡性结肠炎类似。结论 单次使用DSS诱发的小鼠结肠炎模型可用于相关的实验研究。

[关键词] 右旋葡聚糖硫酸钠; 溃疡性结肠炎; 小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因和发病机制尚不清楚的慢性肠道炎症性疾病,建立适当的结肠炎动物模型对于研究UC的病因、发病机制以及新的治疗方法具有重要意义。人们制作了多种动物模型对其进行研究,其中化学物诱导的结肠炎模型价格相对低廉、易制作,广泛用于筛选治疗炎症性肠病(IBD)的新方法和临床前新药物的开发,也用于研究IBD的发病机制。文献报道右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)小鼠结肠炎模型的肠道病变与人类UC相似^[1],因此,我们探讨采用单次使用DSS建立急、慢性小鼠结肠炎模型的方法^[2,3]。

1 材料与方 法

1.1 DSS 小鼠结肠炎模型的建立

1.1.1 BALB/C 小鼠 30 只, 8~10 周龄, 体重 18~22 g, 雌性, 随机分为急性结肠炎组、慢性结肠炎组和对照组, 每组 10 只。

1.1.2 实验试剂 葡聚糖硫酸钠(DSS), Fluka 公司产品, 分子量 5 000, 硫磺含量为 15.0%~20.0%, 应用时配成 3% 浓度。

1.1.3 模型的建立 ①将分子量为 5 000 的 DSS 溶于饮用水, 配成 3% DSS 溶液, 让 BALB/C 小鼠自由饮用 7 d, 建立小鼠急性结肠炎模型; ②让 BALB/C 小鼠自由饮用 3% DSS 溶液 7 d, 然后饮用不含 DSS 蒸馏水 14 d, 建立小鼠慢性结肠炎模型; ③模型建立成功的标志为饮用 3% DSS 7 d 后出现半稀便、腹泻、大便隐血(+)和肉眼血便中的任一症状。

1.2 损伤和炎症程度的评估

1.2.1 疾病活动指数(DAI)的评估 每日观察小鼠的体重、大便性状和隐血情况, 按表 1 进行评分^[4]。将体重下降、大便性状和隐血情况的评分相加, 得出每只小鼠的DAI, 以评估疾病活动情况。

1.2.2 组织学损伤的评估 用颈椎脱臼法处死小鼠, 剖腹, 取肛门至回盲部的结肠, 沿肠系膜边缘纵行剖开, 在解剖镜下观察结肠大体形态。每只小鼠于有严重炎症或溃疡处取组织标本(2 mm×10 mm), 常规石蜡包埋、切片(4 μm), HE 染色, 观察组织学改变并按表 2 评分^[5]。组织学损伤程度用炎症、病变深度、陷窝破坏评分与病变

[收稿日期] 2005-07-20

[基金项目] 广东省中医药局资助项目(102134)

[作者简介] 张永锋(1965-), 男, 广东省揭西县人, 主任医师, 医学博士, 主要从事中西医结合脾胃病的研究。

范围评分的乘积表示。

表1 DAI评分标准

体重下降(%)	大便性状*	大便隐血/肉眼血便	计分
0	正常	正常	0
1~5	松散	隐血阳性	1
6~10			2
11~15	稀便	肉眼血便	3
>16			4

*正常大便：成形大便；松散大便：不黏附于肛门的糊状、半成形大便；稀便：可黏附于肛门的稀水样便。

表2 组织学损伤评分标准

项目	计分
炎症：	
无	0
轻度	1
重度	2
病变深度：	
无	0
黏膜下层	1
肌层	2
浆膜层	3
隐窝破坏：	
无	0
基底1/3隐窝被破坏	1
基底2/3隐窝被破坏	2
仅有完整表面上皮	3
全部隐窝和上皮被破坏	4
病变范围(%)：	
1~25	1
26~50	2
51~75	3
76~100	4

1.3 统计学处理

所有数据经 SPSS 10.0 统计软件处理，各组资料用($\bar{x} \pm s$)表示，采用非参数统计方法 Wilcoxon 秩和检验比较各组资料间的差异， $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 DSS 结肠炎小鼠的大体实验观察

采用 DSS 制模诱发小鼠 UC，急性期表现：饮用 DSS 后均在第 4 或第 5 天出现腹泻，隐血试验阳性，第 5~7 天均出现不同程度的肉眼血便。停用 DSS 后第 1、2 天仍可见隐血试验阳性。饮用 DSS 1

周后处死小鼠，打开腹腔，可见结肠肠壁肿胀、充血；肠黏膜广泛充血、水肿，局部有糜烂、出血，并可找到明显的溃疡灶。慢性期表现：停止饮用 DSS 溶液 14 d，全部小鼠腹泻、血便症状均消失，大便隐血试验均阴性，体重恢复至饮用 DSS 之前的水平或略有增加，体毛恢复光泽，活动正常。处死小鼠可见肠壁变厚，肠腔狭窄，肉眼未见明显溃疡、糜烂。

2.2 DSS 结肠炎小鼠的组织病理学改变

小鼠饮用 DSS 1 周后，可见黏膜呈明显的急性炎症反应，表现为部分表面上皮脱落，炎症细胞浸润，主要以中性粒细胞、淋巴细胞为主。小鼠停止饮用 DSS 溶液 14 d 后，可见隐窝部分或全部被破坏，但灶性小溃疡比急性期局限，边缘伴上皮再生、修复和腺体增生，炎症细胞主要累及黏膜和黏膜下层，偶可至肌层，浸润的炎症细胞以淋巴细胞、单核细胞为主，此外，在一些区域尚可观察到黏膜组织完全正常。

3 讨论

由于 UC 的病因和发病机制不明，尚未发现特异的致病因子，因此很难制作出理想的动物模型。迄今为止所制作出的模型只能说是其肠道病理变化类似于人类 UC 的病理改变。DSS 是由蔗糖合成的一种硫酸多糖体，诱导动物溃疡性结肠炎的机制目前尚不十分清楚^[7, 8]，可能与 DSS 影响 DNA 合成，抑制上皮细胞增生，破坏肠黏膜屏障有关。肠黏膜屏障功能破坏后，肠腔内抗原进入黏膜和黏膜下层，引起继发性炎症反应，而肠道吞噬细胞清除细菌毒素产物的功能被削弱则使肠道炎症持续。肠道菌群可能与 DSS 小鼠急性期炎症有关，而 T 细胞介导的免疫紊乱则可能与慢性期肠道病损有关。DSS 动物 UC 模型的优点主要有：①日本学者于 1985 年首次应用 DSS 制备了鼠 UC 模型，发现此模型的病理改变与人类 UC 最相似；②此模型既可以应用于 UC 急性期又可应用于慢性期的研究，使实验能够完整地进行；③制作简便、经济、易于复制。

已有研究表明，不同分子量的 DSS 所诱导的病变特征不同，如用 5 000、40 000 和 500 000 的 DSS 喂养小鼠，结果典型病变只出现于 5 000 组和 40 000

组, 5 000 组的病变主要见于盲肠和上段结肠, 此外, DSS 结肠炎的严重度并不依赖于 DSS 摄入量, 而是由 DSS 浓度决定, 小鼠饮用的 DSS 量差别较小时不影响诱导出的结肠炎严重度^[9, 10]。

本研究将 Fluka 公司生产的 DSS (分子量 5 000) 制成 3% DSS 溶液, 让 BALB/C 小鼠自由饮用以诱发结肠炎。BALB/C 小鼠饮用 3% DSS 溶液 7 d 后, 主要表现为腹泻、血便、体重下降、懒动等; 而光镜下组织病理学改变主要为结肠多灶性小溃疡、隐窝破坏和继发黏膜、黏膜下炎症, 少数病灶炎症可侵及浆膜层, 浸润的炎症细胞以中性粒细胞为主、伴少量淋巴细胞和单核细胞。这些急性结肠炎改变与 Okayasu 和 Cooper 等观察到的病变相似^[11, 12]。

停止饮用 3% DSS 溶液 14 d 后, 小鼠的腹泻、血便均停止, 体重基本恢复至饮用 DSS 前水平, 反映疾病活动情况的 DAI 恢复正常。但是, 光镜下结肠组织却呈慢性炎症的组织病理改变, 如小溃疡伴周围上皮不完全再生、修复, 隐窝扭曲变形, 黏膜、黏膜下较多淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞等慢性炎症细胞浸润, 而中性粒细胞却较少。此期的病理变化与 Cooper 等单次使用 DSS 7 d 后停药 14 d 诱发的慢性炎症性病理改变相似, 而且与以往多次使用 DSS 诱导小鼠产生的慢性结肠炎炎症病变也类似, 它们均与人类慢性 UC 有相似之处, 只是单次使用 DSS 建立的小鼠慢性结肠炎模型未见明显结肠缩短和重度肠上皮异型增生。本研究建立的这种慢性结肠炎动物模型耗时较以往多次循环使用 DSS 诱发慢性结肠炎明显缩短, 因此该模型对于研究 UC 的发病机制和药物治疗不失为一种理想的选择。

但此种模型制作方法仍然缺乏自发和复发的特点, 即缺乏人类 UC 缓解和复发交替出现的特点。在以后的模型研究中, 应着重考虑以下 3 点问题: 第 1 是 UC 动物模型维持时间的问题, 由于小鼠肠道修复能力较强, 故维持多久才能符合人类 UC; 第 2 是如何解决临床缓解和复发的问题, 对于 UC 模型, 能否做到给药则使病变缓解, 停药后炎症又出现是我们今后需要进行探索和研究的內容。第 3 是有必要将

UC 与中医证的研究相结合, 寻找符合中医临床特点的 UC 模型^[12, 13]。

(参考文献)

- (1) Okaysau I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice (J). *Gastroenterology*, 1990, 98:694-702
- (2) 胡仁伟, 欧阳钦, 陈代云. 右旋葡聚糖硫酸钠小鼠结肠炎动物模型建立方法探讨 (J). *胃肠病学*, 2002, 7(6):331-334
- (3) 王群英, 陈村龙, 王继德, 等. 葡聚糖硫酸钠致溃疡性结肠炎小鼠模型的建立 (J). *第一军医大学学报*, 2002, 22(7):608-610
- (4) Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis (J). *Clin Exp Immunol*, 2000, 120:51-58
- (5) Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines (J). *Clin Exp Immunol*, 1998, 114: 385-391
- (6) 牛凤丽, 郑萍, 刘文忠, 等. 葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎发病机制的研究 (J). *胃肠病学*, 2003, 8(5):283-286
- (7) 胡仁伟, 欧阳钦, 罗锋, 等. T 辅助细胞在右旋葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎中的作用 (J). *中华消化杂志*, 2003, 23(8):458-460
- (8) 郑萍, 牛凤丽, 刘文忠, 等. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究 (J). *中华消化杂志*, 2003, 23(4):207-210
- (9) 李岩, 王江滨. 炎症性肠病动物模型分类及其与发病机制关系的研究进展 (J). *国外医学消化系疾病分册*, 2003, 23(5):267-269
- (10) 牛凤丽, 郑萍, 刘文忠. 化学性结肠炎动物模型的研究进展 (J). *国外医学消化疾病分册*, 2002, 22(1):31-33
- (11) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis (J). *Lab Invest*, 1993, 69:238-249
- (12) 宫健伟, 苑述刚, 阮时宝. 对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨 (J). *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(2):70-71
- (13) 张雪燕, 韩涛. 溃疡性结肠炎动物模型制作的研究进展 (J). *甘肃中医*, 2004, 17(6):2-6