

溃疡性结肠炎模型的建立及影响因素

侯丽娟, 唐方, 王晓红, 孙晓萍

■背景资料

迄今为止, 国内外已经报道了多种对溃疡性结肠炎模型的建立方法, 其中应用50 mL/L TNBS与乙醇混合液建立大鼠溃疡性结肠炎模型优势最多, 简单易行、重复性好、价廉, 且组织学与人类溃疡性结肠炎相似。

侯丽娟, 唐方, 王晓红, 孙晓萍, 天津医科大学总医院中医科 天津市 300052

作者贡献分布: 侯丽娟与唐方对此文所作贡献均等; 此课题由侯丽娟、唐方、王晓红及孙晓萍设计; 研究过程由侯丽娟、唐方、王晓红及孙晓萍操作完成; 研究所有试剂由唐方提供; 数据分析由侯丽娟与唐方完成; 本文写作由侯丽娟与唐方完成。

通讯作者: 唐方, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院中医科. zhongyi3599@sina.com

电话: 022-60363599

收稿日期: 2011-09-16 修回日期: 2011-10-18

接受日期: 2011-11-04 在线出版日期: 2011-11-08

Establishment of a rat model of ulcerative colitis and analysis of factors influencing the development of this model

Li-Juan Hou, Fang Tang, Xiao-Hong Wang, Xiao-Ping Sun

Li-Juan Hou, Fang Tang, Xiao-Hong Wang, Xiao-Ping Sun, Department of TCM, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Fang Tang, Professor, Department of TCM, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Tianjin 300052, China. zhongyi3599@sina.com

Received: 2011-09-16 Revised: 2011-10-18

Accepted: 2011-11-04 Published online: 2011-11-08

Abstract

AIM: To investigate the optimal concentration of ethanol and animal house environment for the development of a rat model of trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)/ethanol-induced ulcerative colitis.

METHODS: Forty-five Wistar rats were divided randomly and equally into five groups: normal group, model groups 1, 2, 3 and 4. The normal group, model groups 1, 2 and 3 were fed in conventional grade animal house, while the model group 4 was fed in SPF grade animal house. The normal group, model groups 1, 2, 3 and 4 were given 9 g/L NaCl, TNBS/ethanol, TNBS/600 mL/L ethanol, TNBS/500 mL/L ethanol, and TNBS/500 mL/L ethanol, respectively. After treatment, disease activity index (DAI) was monitored. At the end of the experiment, all rats were killed to evaluate colon mucosa damage index (CMDI) and histological changes.

RESULTS: There was no significant difference in

mortality between the model groups 1 and 2. DAI and CMDI significantly increased in the model group 3 compared to the model group 4 (both $P < 0.05$). Histological changes also differed significantly between the model groups 3 and 4.

CONCLUSION: The development of a rat model of TNBS-induced ulcerative colitis should be done with 500 mL/L ethanol in conventional grade animal house.

Key Words: Trinitrobenzenesulfonic acid; Ulcerative colitis; Model; Ethanol concentration; Animal house environment

Hou LJ, Tang F, Wang XH, Sun XP. Establishment of a rat model of ulcerative colitis and analysis of factors influencing the development of this model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(31): 3242-3245

摘要

目的: 探讨TNBS/乙醇法制备溃疡性结肠炎模型时乙醇最佳浓度及最宜动物室环境。

方法: Wistar大鼠45只, 随机分为正常组、模型1组、模型2组、模型3组、模型4组(9只/组), 其中将正常组、模型1、2、3组放入清洁环境饲养, 模型4组放入SPF级动物实验室饲养。分别用9 g/L NaCl、TNBS/无水乙醇、TNBS/600 mL/L 乙醇、TNBS/500 mL/L 乙醇灌肠, 其中模型3、4组均用TNBS/500 mL/L 乙醇灌肠, 造模后观察各组模型疾病活动指数, 实验终点期处死后观察结肠黏膜损伤指数及病理组织学改变。

结果: 模型1、2组灌肠后大量死亡, 无实践意义; 将模型3、4组DAI及CMDI评分比较, 模型3组均高于模型4组, 且差异具有显著性($P < 0.05$)。组织学观察比较模型3、4组, 具有明显差异。

结论: 应用TNBS建立UC模型应首选500 mL/L 乙醇作为溶剂, 并需在清洁级动物室进行, 环境是提高模型成功率的关键因素。

关键词: 三硝基苯磺酸; 溃疡性结肠炎; 模型; 乙醇浓度

■同行评议者

许玲, 副教授, 第二军医大学长征医院中医科

侯丽娟, 唐方, 王晓红, 孙晓萍. 溃疡性结肠炎模型的建立及影响因素. 世界华人消化杂志 2011; 19(31): 3242-3245
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3242.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)属炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种, 是一种病因不明的直肠和结肠炎性病变, 临床表现为腹痛腹泻、里急后重、黏液脓血便及不同程度的全身症状. 其病程长, 病变程度轻重各异, 目前已被列为世界难治性疾病之一. 近10年来, UC的发病率在我国呈上升趋势, 故溃疡模型的优化选择具有重大意义. 目前, 国内外已经报道了多种对溃疡模型的建立方法, 其中应用50 mL/L 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)与乙醇混合液建立大鼠溃疡模型优势最多, 并公认TNBS剂量在100 mg/kg时模型最为稳定. 但是对乙醇浓度说法不一, 且对动物实验室的环境也没有明确的记录. 对此笔者展开实验研究, 以明确TNBS建立UC模型的方法及其重要影响因素.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级Wistar大鼠($n = 45$), ♀ 23只, ♂ 22只, 体质量180-220 g, 由中国医学科学院提供. 随机抽取大鼠($n = 9$)作为正常组, 剩下的随机分成4组, 分别是: 模型1组, 模型2组, 模型3组, 模型4组, 9只/组. 将正常组、模型1组、模型2组及模型3组放入普通环境实验室, 模型4组放入屏障环境实验室, 均适应性饲养3 d. 8号导尿管, 1 mL注射器, 50 mL/L TNBS为美国Sigma公司产品, 由天津润泰科技发展有限公司提供; 无水乙醇(色谱纯)由天津市江天化工技术有限公司提供; 便潜血(OB)试剂为珠海贝索生物技术有限公司产品, 由天津市诺凡工贸有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 配置实验用药: 将50 mL/L TNBS分别与无水乙醇、600 mL/L乙醇、500 mL/L乙醇按体积1:1配成3种混合液, 分别记作A、B、C.

1.2.2 灌肠: 各组大鼠造模前1 d均禁食不禁水24 h, 称质量后用水合氯醛(0.03 mL/kg)腹腔注射麻醉. 麻醉状态下, 将8号导尿管插入肛门上端8 cm, 按0.04 mL/kg(相当于TNBS剂量100 mg/kg)一次性分别注入混合液, 顺序如下: 正常组: 9 g/L NaCl; 模型1组: 混合液A; 模型2组: 混合液B; 模型3组: 混合液C; 模型4组: 混合液C. 灌肠后注入0.5 mL空气, 倒立5 min, 仰卧归笼, 自然苏醒, 自由饮食.

1.2.3 观察指标: (1)疾病活动指数(DAI): 自造模后的第1天起, 每日观察大鼠精神活动、皮毛、体质量、大便形状及隐血状况, 按表1进行评分^[1,2]; (2)结肠黏膜损伤指数(CMDI): 实验终点处死大鼠, 分离肛门至盲肠末端的结肠段, 修剪掉肠系膜及粘连组织, 沿肠系膜纵轴剪开, 冰生理盐水冲洗干净, 拭干, 平铺于滤纸上, 按照表2^[3,4]立即进行肉眼大体损伤评分; (3)病理组织学观察: 取各组大鼠结肠病变最明显处组织一小部分, 用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片、HE染色、光镜观察^[5].

统计学处理 应用统计软件SPSS17.0处理数据, 采用单因素方差分析及独立样本 t 检验, 比较各组资料间的差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义(实验过程中死亡的大鼠不计入统计分析).

2 结果

2.1 DAI 各组大鼠在造模24 h后, 即出现肉眼血便或黏液便, 体质量也有不同程度的下降(由于造模前空腹24 h, 故造模后第1天体质量轻微增长, 故不计算第1天的DAI分数), 并伴有神萎、蜷卧、少动、毛耸, 进食减少等症状. 由于模型1组、2组灌肠后大量死亡, 无实践意义, 故将模型3组、4组的DAI评分进行统计. 造模后, 第2-3天DAI评分相对较高, 自第4天开始出现DAI下降趋势, 实验终点时均有好转. 但是模型3组DAI评分始终高于模型4组. 可见, 模型3组疾病活动情况重于模型4组. 且在第2-10天, 模型3、4组与正常组比较及模型3、4组间比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$, 表3).

2.2 CMDI 模型1、2、3组存活大鼠处死后均可见结肠与周围组织不同程度粘连伴近端肠腔扩张, 纵行剖开后可见溃疡; 而模型4组, 无肠粘连及肠腔扩张, 纵行剖开后可见局部充血水肿, 肠皱襞纹理变浅. 将模型3、4组CMDI评分进行统计分析, 模型3、4组与正常组比较(6.17 ± 1.33 , 2.17 ± 1.33 vs 0, $P < 0.01$, $P < 0.05$)及模型3、4组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$).

2.3 组织学观察 正常组黏膜上皮完整, 细胞形态正常, 杯状细胞可见, 腺体排列整齐, 黏膜下层、肌层、浆膜层结构清晰, 未见炎性细胞浸润; 模型3组黏膜上皮坏死脱落, 大面积溃疡形成, 溃疡周边腺体扩张, 腺上皮细胞增生, 黏膜层、黏膜下层充血水肿, 肠壁各层均可见大量炎细胞浸润; 模型4组黏膜层杯状细胞可见, 黏膜下层轻度充血水肿, 并可见少量炎性细胞浸

■ 研发前沿

在目前相关文献中, 有关乙醇浓度描述不一, 对动物室环境、温度与成模率的相关性也无明确记载.

■ 相关报道

张涛等报道应用不同剂量的TNBS/乙醇建立UC模型, TNBS剂量为100 mg/kg时, 其溃疡的病理特点与人类UC最为类似. 得出结论: TN-BS最佳造模剂量为100 mg/kg.

■创新亮点

本文通过研究乙醇溶剂浓度、动物室环境与UC模型成功率的关系探讨TNBS诱导UC模型最佳条件,为该模型规范化制备标准提供依据。

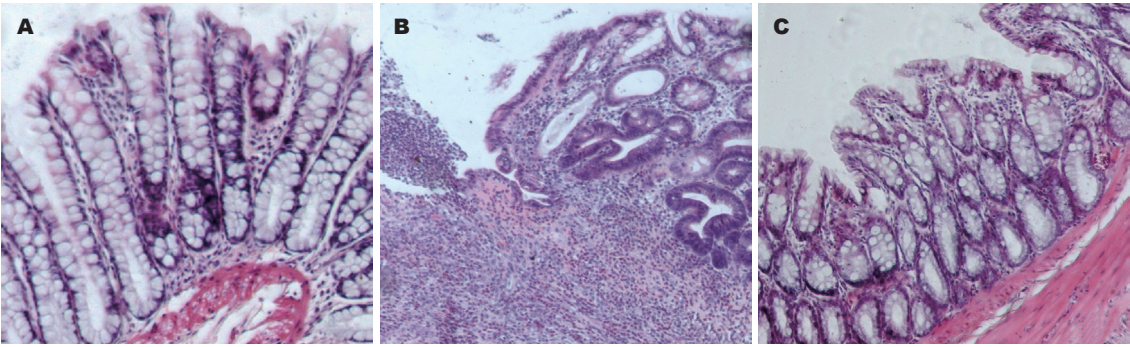


图 1 各组黏膜HE染色(×100). A: 正常组; B: 模型3组; C: 模型4组.

表 1 DAI评分表					
观察指标	DAI计算				
	0分	1分	2分	3分	4分
体质量下降	不下降	下降1%–5%	下降5%–10%	下降10%–15%	大于15%
大便形状	正常		松散但不粘肛周		腹泻
大便隐血	阴性		阳性		肉眼血便
DAI	以上三项得分的平均值				

表 2 CMDI评分表	
大体形态表现	评分
粘连	
无	0
轻度(结肠与其他组织剥离较易)	1
重度	2
溃疡形成及炎症	
无	0
局部充血, 无溃疡	1
1处溃疡不伴充血或肠壁增厚	2
1处溃疡伴炎症	3
>2处溃疡伴炎症	4
>2处溃疡和/或炎症>1 cm	5
溃疡和/或炎症>2 cm, 病变范围每增加1 cm, 计分加1	6–8

表 3 正常组、模型3组与模型4组DAI评分 (mean ± SD)			
时间	正常组	模型3组	模型4组
第2天	0	2.39 ± 0.39 ^b	1.50 ± 0.59 ^{bc}
第3天	0	2.39 ± 0.44 ^b	1.44 ± 0.66 ^{bc}
第4天	0	2.33 ± 0.70 ^b	1.11 ± 0.81 ^{ac}
第5天	0	2.06 ± 0.61 ^b	0.77 ± 0.27 ^{bd}
第6天	0	1.44 ± 0.50 ^b	0.44 ± 0.34 ^{ad}
第7天	0	1.50 ± 0.59 ^b	0.56 ± 0.27 ^{bd}
第8天	0	1.50 ± 0.51 ^b	0.44 ± 0.34 ^{ad}
第9天	0	1.33 ± 0.60 ^b	0.44 ± 0.34 ^{ac}
第10天	0	1.22 ± 0.50 ^b	0.44 ± 0.34 ^{ac}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型3组.

润, 未见明显溃疡(图1).

3 结论

目前国内外已报道多种建立溃结模型的方法, 传统的有免疫法、化学法如乙酸法、角叉菜胶法、葡聚糖硫酸钠法、恶唑酮法等, 以及较新研究的基因敲除法如IL-10/iNOS双基因缺陷模型^[6]、转基因法如IL-7转基因模型^[7]等, 但由于造价昂贵, 应用较少. 1984年, Morris^[8]首次成功地制造出TNBS动物模型, 该模型建立之初用于反映克罗恩病的病理变化及药物疗效的研究, 后来被广泛应用于建立溃疡性结肠炎模型. 多

数学者认为TNBS/乙醇造模法具有简单易行、重复性好、价廉、组织学与人类UC相似等多种优势. 但是, 在目前相关文献中, 有关乙醇浓度描述不一, 动物室环境、温度与成模率的相关性无也无明确记载. 模型制备方法由于缺乏规范化的统一标准, 直接影响试验药物药效学评价. 为此, 笔者拟自溶媒浓度、动物室环境与UC模型成功率的关系探讨TNBS诱导UC模型最佳条件, 为该模型规范化制备标准提供依据.

目前认为, TNBS/乙醇制备UC模型原理在于, 以乙醇作为有机溶剂, 通过溶解肠黏膜表面的黏液, 破坏肠黏膜屏障, 致使TNBS进入局部组织, 与肠组织蛋白结合形成抗原, 引发肠黏膜

■应用要点

采用TNBS/500 mL/L乙醇灌肠, 并在清洁级动物室环境中饲养, 规范化的建立溃疡性结肠炎, 对于进一步更准确地研究人类溃结发病机制、病理过程及新药的研究具有重大意义.

免疫系统针对抗原的迟发性变态反应, 进而导致肠道炎症的发生. 笔者采用不同浓度乙醇制备TNBS混合液, 复制急性期UC动物模型. 结果显示: TNBS分别与无水乙醇、600 mL/L乙醇混合液灌肠后, 大量死亡, 无实践意义. 并对模型1、2组死亡样本进行解剖后发现, 距肛门1-8 cm部位多见大面积肠坏死, 肠壁呈褐色、质硬. 提示, 作为混合液溶媒的乙醇浓度 $\geq 60\%$ 时, 肠黏膜由于容易发生过度灼伤, 使实验动物个体差异凸显, 导致肠坏死发生率增高, 是实验大鼠死亡的主要原因. 我们的实验证实, 模型3组大鼠给予500 mL/L乙醇为溶媒的TNBS混合液, 由于乙醇浓度设定合理, 样本死亡例数显著下降. 因此可以认为, 以500 mL/L乙醇作为制备TNBS最佳浓度, 可有效降低UC模型死亡率, 是提高实验大鼠UC发病的稳定性、可重复性的关键因素之一.

由DAI评分及CMDI评分可见, 给药相同的3、4组大鼠, 在不同饲养环境下, UC发病指数呈显著性差异. 在SPF级环境内制备UC模型, 其疾病活动指数及结肠黏膜损伤变化均较清洁级环境下UC模型明显减轻. 组织学比较, 屏障环境内UC大鼠由于该生存空间微生物菌群数量少, 结肠黏膜层可见大量杯状细胞, 黏膜下层轻度充血水肿, 少量炎性细胞浸润, 但少见溃疡发生. 与之相对, 在相同时间内给予相同药物, 生存在清洁级环境下的模型3组大鼠, 结肠黏膜上皮普遍出现坏死脱落, 大面积溃疡形成; 溃疡面周边腺体扩张, 腺上皮细胞增生; 黏膜层、黏膜下层充血水肿; 肠壁各层均可见大量炎细胞浸润. 由

此说明, 免疫反应异常是UC模型制备的必要因素, 但在UC多因素, 多环节相互作用中, 感染因素可能是诱导UC发生, 参与结肠黏膜炎症免疫反应的启动因子.

总之, 采用TNBS/500 mL/L乙醇灌肠, 并在清洁级动物室环境中饲养, 所建立的模型发病症状及结肠组织病理变化与人类溃结病变相似, 对于进一步更准确地研究人类溃结发病机制、病理过程及新药的研究具有重大意义.

4 参考文献

- 1 Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355
- 2 陈迟, 冉志华, 萧树东. 普伐他汀对乙酸诱导大鼠结肠炎的治疗作用及其机制的研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 1284-1288
- 3 Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut* 1996; 38: 568-573
- 4 王皓, 欧阳钦, 胡仁伟. 三硝基苯磺酸结肠炎动物模型的建立. *胃肠病学* 2001; 6: 7-10
- 5 郑礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究. *中国药理学通报* 1998; 14: 370-372
- 6 Zhang R, Ma A, Urbanski SJ, McCafferty DM. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1122-1130
- 7 Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol* 2007; 178: 4737-4748
- 8 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利

■同行评价

UC是目前临床常见疾病, 建立能反映临床特点的动物模型对该疾病的研究有重要意义. 课题组在文献报道的基础上开展乙醇最佳浓度及最适宜动物室环境的研究, 选题合理有意义.

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力. WJG在PubMed Central (PMC)统计, 单月独立IP地址访问58 257次, 全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次, 全文PDF下载59 694次. 另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种, 总被引频次排名, WJG位于第174名. (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)