

维医异常胆液质载体UC病证大鼠模型的建立以及结肠组织中炎症相关因子iNOS、eNOS的变化

阿地拉·阿不都艾尼, 麦日排提·阿卜杜拉, 卡思木江·阿西木江, 张景萍, 黄静静, 布威阿依谢姆·依迪斯, 哈力旦·阿布都, 库热西·玉努斯

■背景资料

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以慢性炎症和溃疡形成为主要病理特点的消化系统疾病。根据维吾尔医学传统理论, 对于不同疾病的诊断和治疗主要是依据不同体液的不同状态来进行的。免疫系统是具有多层次、网络化、反馈性调节模式的大网络, 任何一个部分遭到破坏都会引起免疫平衡失调。近十年来, 有关细胞因子参与结肠黏膜炎症反应的研究有了很多成果, 并为更进一步研究UC的发病机制提供了新的思路。

阿地拉·阿不都艾尼, 麦日排提·阿卜杜拉, 卡思木江·阿西木江, 张景萍, 黄静静, 布威阿依谢姆·依迪斯, 哈力旦·阿布都, 库热西·玉努斯, 新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

阿地拉·阿不都艾尼, 在读硕士, 主要从事维吾尔医药与分子生物学的研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, No. 81260564.

作者贡献分布: 此课题由库热西·玉努斯设计; 研究过程由阿地拉·阿不都艾尼、麦日排提·阿卜杜拉、卡思木江·阿西木江、布威阿依谢姆·依迪斯及哈力旦·阿布都等操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由库热西·玉努斯、张景萍及黄静静提供; 数据分析与论文写作由阿地拉·阿不都艾尼完成。

通讯作者: 库热西·玉努斯, 教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新医路393号, 新疆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室. kurax8824@sina.com

收稿日期: 2016-10-21
修回日期: 2016-11-04
接受日期: 2016-11-14
在线出版日期: 2016-12-28

Establishment of a rat model of ulcerative colitis with abnormal sapra syndrome of traditional Uyghur medicine and detection of changes in inflammation related factors in colon tissue of this model

Adila·Abuduaini, Mairipaiti·Abudula, Kasimujiang·Aximujiang, Jing-Ping Zhang, Jing-Jing Huang, Buweiayixiemu·Yidisi, Halidan·Abudu, Kurexi·Yunusi

Adila·Abuduaini, Mairipaiti·Abudula, Kasimujiang·Aximujiang, Jing-Ping Zhang, Jing-Jing Huang,

Buweiayixiemu·Yidisi, Halidan·Abudu, Kurexi·Yunusi, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260564.

Correspondence to: Kurexi·Yunusi, Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, 393 Xinyi Road, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. kurax8824@sina.com

Received: 2016-10-21
Revised: 2016-11-04
Accepted: 2016-11-14
Published online: 2016-12-28

Abstract

AIM

To develop a rat model of ulcerative colitis (UC) with abnormal sapra syndrome and detect the changes in inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) hnRNA and mRNA expression in colon tissues of this model.

METHODS

Based on a rat model of abnormal sapra syndrome, trinitrobenzene sulfonic acid/ethanol was used to induce UC in rats with abnormal sapra syndrome. Rats were randomly divided into two groups: normal group and UC with abnormal sapra syndrome model group. Quantitative RT-PCR was used to detect the differences in iNOS and eNOS hnRNA and mRNA expression in colon tissues of rats in the two groups.

□同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院; 危安, 主任医师, 硕士生导师, 湖南省人民医院超声科

RESULTS

UC with abnormal sapra syndrome was successfully induced as evidenced by the presence of anticipated signs, symptoms and colonic mucosa damage. Compared with the normal group, the expression of iNOS hnRNA in colon tissue was significantly upregulated in the model group ($P < 0.05$), but the expression of eNOS hnRNA in colon tissue showed no statistical difference between the two groups ($P > 0.05$). The expression of iNOS and eNOS mRNA was significantly upregulated in the model group compared with the normal group ($P < 0.05$).

CONCLUSION

The inflammatory factors iNOS and eNOS are involved in the development of UC in rats with abnormal sapra syndrome, and changes in inflammation related factors are mediated by a post-transcriptional regulatory mechanism.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Abnormal sapra syndrome; Ulcerative colitis; iNOS; eNOS; qRT-PCR

Adila·Abuduaini, Mairipaiti·Abudula, Kasimujiang·Aximujiang, Zhang JP, Huang JJ, Buweiayixiemu·Yidisi, Halidan·Abudu, Kurexi·Yunusi. Establishment of a rat model of ulcerative colitis with abnormal sapra syndrome of traditional Uyghur medicine and detection of changes in inflammation related factors in colon tissue of this model. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2016; 24(36): 4794-4804 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i36/4794.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i36.4794>

摘要

目的

建立异常胆液质载体溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)病证大鼠模型, 检测大鼠结肠组织中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)两种炎症相关因子, 探讨他们在UC发生过程中的作用。

方法

将动物分为正常组和异常胆液质载体UC病证模型组, 根据维医体液论, 采用2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇法构建异常胆液质载体UC病证大鼠模型, 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase

chain reaction, qRT-PCR)方法检测两组大鼠结肠组织中iNOS、eNOS的hnRNA与mRNA表达水平。

结果

(1)异常胆液质载体UC病证模型组大鼠体征、症状、结肠黏膜损伤等均符合异常胆液质载体UC病证模型的判定标准; (2)qRT-PCR结果显示, 与正常组比较, 异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织中iNOS的hnRNA表达水平上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而eNOS的hnRNA表达水平无统计学意义($P > 0.05$); 异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织中iNOS、eNOS的mRNA表达水平均上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论

(1)炎症相关因子iNOS、eNOS都参与了UC的发病过程; (2)异常胆液质载体UC病证大鼠结肠组织中炎症相关因子表达水平的调控存在mRNA的稳定性相关的转录后调控机制。

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 异常胆液质; 溃疡性结肠炎; 诱导型一氧化氮合酶; 内皮型一氧化氮合酶; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应

核心提要: 本研究在维吾尔医学理论的指导下建立异常胆液质载体溃疡性结肠炎病证大鼠模型, 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应, 检测大鼠结肠组织中炎症相关因子诱导型一氧化氮合酶、内皮型一氧化氮合酶的hnRNA、mRNA表达水平; 分析候选基因表达水平变化在异常胆液质载体溃疡性结肠炎病证发生、发展过程中的作用。从而探讨异常胆液质载体UC病证发生、发展的分子机制。

阿地拉·阿不都艾尼, 麦日排提·阿卜杜拉, 卡思木江·阿西木江, 张景萍, 黄静静, 布威阿依谢姆·依迪斯, 哈力旦·阿布都, 库热西·玉努斯. 维医异常胆液质载体UC病证大鼠模型的建立以及结肠组织中炎症相关因子iNOS、eNOS的变化. 世界华人消化杂志 2016; 24(36): 4794-4804 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i36/4794.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i36.4794>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种以

研究前沿

UC被世界卫生组织列为疑难疾病之一。根据最近报道, UC的发病率在全球逐年地增长。UC发展的分子病因涉及到免疫、遗传、微生物、环境和其他未知因素, 其免疫学机制越来越受到研究者的关注。大量研究证实, 结肠黏膜促炎和抗炎细胞因子的平衡对正常的肠道动态平衡是至关重要的, 各种细胞因子的功能、数量的异常或两类因子之间的平衡失调, 均可导致UC的发生。因此, 探讨细胞因子在UC发病过程中的表达调控机制对于从根本上防治UC具有十分重要的意义, 并为更进一步研究UC的发病机制提供了新的思路。

□ 相关报道

在UC早期, NO通过增加靶细胞内5-环磷酸鸟苷浓度及抑制P-选择素基因表达, 维持微循环的完整性, 抑制血小板、白细胞在皮内细胞表面的黏附、积聚、防止血栓形成和内皮细胞和中性粒细胞、单核细胞的相互作用; 另一方面, 在UC的中晚期, 随着NO产生增多和积聚, NO通过细胞内铁的释放、阻断线粒体的功能和阻碍DNA的合成等, 导致黏膜细胞的损伤。

慢性炎症和溃疡形成为主要病理特点的消化系统疾病。本病病因未明, 治愈难度大, 复发率和癌变率较高, 被世界卫生组织列为现代难治病之一^[1-3]。目前已确定, UC的发病机制涉及环境、肠道菌群、免疫系统及遗传4个基本要素^[4-6]。其中免疫系统方面的研究广泛地受到关注。UC作为一种全身性疾病, 有许多细胞因子参与结肠黏膜的炎症免疫反应, 氧化应激和炎症因子过表达是UC的主要发病机制^[7,8], 尤其促炎因子和抗炎因子平衡失调在其发生、发展中发挥了重要作用。维吾尔医学作为中国传统医学, 在UC等疾病的认识和治疗方面拥有独特的理论。维医认为人体由胆液质、血液质、黏液质和黑胆质等4种不同的体液构成。任何体液结构上的失衡、或数量、质量的异常变化均可导致疾病的发生^[9]。维医认为不同类型异常体液可导致各种疾病, 异常胆液质型体会引起胃肠炎、胃肠溃疡、结石、胆囊炎、胰腺炎、肝硬化、肝炎、阑尾炎、心肌炎、肿瘤等。本研究在维吾尔医学理论的指导下建立异常胆液质载体溃疡性结肠炎病证大鼠模型, 应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR), 检测大鼠结肠组织中炎症相关因子诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的hnRNA、mRNA表达水平; 分析候选基因表达水平变化在异常胆液质载体溃疡性结肠炎病证发生、发展过程中的作用。从而探讨异常胆液质载体UC病证发生、发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器 健康的SPF级(无特定病原体)♂、体质量200 g±30 g之间的Wistar大鼠。2,4,6-三硝基苯磺酸(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)(sigma, 美国, 批号: #SLB 6263V), 水合氯醛、无水乙醇、液体石蜡、乙醚、生理盐水均为国产分析纯。黑胡椒、干姜、西红花(由新疆维吾尔自治区维吾尔医院提供)。干热属性饮水的配置: 1 g西红花浸泡于400 mL的双蒸水约6 h后再给予饮用。干热属性灌胃药的配置: 30 g黑胡椒、30 g干姜和0.3 g西红花使其浸泡于400 mL的双蒸水12 h, 其中黑胡椒和干姜打成粉末。FLI-2999HT型人工气

候箱, 电击笼, qRT-PCR仪(美国Thermo公司); 电泳仪电源(北京市六一仪器厂); 超微量分光光度计(美国Thermo公司); 制冰机(意大利Scotsman公司), 冷藏冷冻箱(4℃-20℃)(Haier BCD-539WT), 定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)数据分析软件: 7500 Software v2.0版本。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组: 20只大鼠适应性喂养1 wk以后, 应用统计学上完全随机的方法随机分为正常组(10只), 异常胆液质载体UC病证组(10只), 每笼5只。

1.2.2 处理: (1)正常组室内温度(温度22℃-25℃, 相对湿度60%-80%)下用普通鼠饲料(每日每笼给予200 g, 300 mL双蒸水)饲养, 每日每笼随机饮食水, 不受任何刺激也不作任何处理; (2)异常胆液质载体UC病证模型组: a.异常胆液质证的建立: 按照文献^[10-12]及以往研究方法适当调节, 采用人工气候箱, 将实验动物置于干热的饲养环境^[13-16](相对湿度26℃-28℃, 相对湿度36%-40%, 10 h/d), 每日每笼给予200 g普通饲料, 300 mL干热属性饮水^[17,18], 每日每只大鼠2 mL/100 g剂量灌胃1次干热属性灌胃药^[16-18]和慢性刺激如间断的足底电刺激^[19,20](输出电压20-40 V, 不定时改变电压, 间隔2-5 min, 每天30 min)、夹尾^[21](用书夹夹住大鼠的尾巴尖端内2-3 cm处, 让其相互撕咬、打斗, 每日处理1次, 每次5 min)、噪音^[22,23]用100 dB的快节奏音乐播放, 每天持续2 h)等多因素复合作用下, 10-13 d之内建立维吾尔医学异常胆液质证模型; b.异常胆液质载体UC病证模型组的构建: 异常胆液质证建立成功后, 在此基础上建造溃疡性结肠炎模型。造模前1 d禁食; 大鼠以10%水合氯醛0.3 mL/100 g的剂量腹腔注射麻醉后, 在液体石蜡的润滑下, 用输液导管(直径3 mm, 长度约8 cm)经肛门轻柔插入大鼠结肠内约8 cm处, 注入70 mg/kg TNBS加入等体积50%乙醇的灌肠液, 然后注入空气约0.5 mL, 将大鼠头倾斜45°放置1 min, 然后保持平躺自然清醒。

1.2.3 观察指标: 由专人进行指标观察和记录, 包括定性指标(皮肤毛色、舌象舌苔、兴奋程度、粪便、尿液)和定量指标(体质量、尿量)。

1.2.4 标本的收集: 大鼠成模后24 h处死动物, 先乙醚麻醉, 从腹主动脉取血; 取距肛门5-8 cm的结肠组织, 用生理盐水轻轻洗去肠管内容物,

表 1 结肠黏膜肉眼与镜下判定评分标准

分值	肉眼观察结肠黏膜损伤程度	镜下组织病理学观察 ¹		
		上皮细胞	炎细胞	黏膜
0	肠壁无损伤	形态正常	没有炎细胞浸润	
1	肠壁轻度充血、水肿, 表面光滑, 无糜烂或溃疡	有杯状细胞	炎细胞浸润至黏膜基底层	黏膜正常或基本正常, 形成肉芽组织伴纤维化
2	肠壁充血水肿, 黏膜粗糙呈颗粒感, 有糜烂或肠黏连	杯状细胞大面积丢失	炎细胞浸润至黏膜肌层, 有大量慢性炎性细胞浸润	有溃疡形成, 伴随黏膜增厚和明显水肿
3	肠壁黏膜充血水肿, 表面有坏死及溃疡形成, 最大纵径<1 cm, 肠壁增厚或表面有坏死及炎症	杯、柱状细胞丢失	浸润深入到黏膜下层, 有大量中性粒细胞浸润	
4	肠壁高度充血水肿, 黏膜坏死及溃疡形成, 溃疡最大纵径≥1 cm, 或全壁结肠坏死、中毒性巨结肠导致死亡; 病变范围每增加1 cm, 计分加1分	杯、柱状细胞大面积丢失	浸润到达黏膜下层	

¹每只大鼠镜下观察总评分 = 上皮细胞评分+炎细胞浸润+黏膜评分.

表 2 qRT-PCR引物列表(针对mRNA)

基因	引物序列	扩增产物长度(bp)	退火温度(°C)
iNOS	上游: CCACATCTGGCAGGATGAGAA	416	63.5
	下游: AGGCACAGAACTGAGGGTACA		
eNOS	上游: ATGTTTGTCTGCGGTGAT	142	60
	下游: CCTCGTGGTAGCGTTG		
β -actin	上游: AGCCATGTACGTAGCCATCC	115	57
	下游: ACCCTCATAGATGGGCACAG		

qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶.

黏膜表面朝上, 进行肉眼观察结肠黏膜损伤, 按评分标准评分(表1); 剪取病灶部位取材, 一部分约0.5×0.5立即置于40 g/L甲醛溶液固定24 h, 第2天换甲醛溶液, 石蜡包埋切片, HE染色, 进行病理组织学观察, 按文献[24]所述评分标准进行评分(表2)组织切片由专业人员盲法阅片; 结肠组织装在冻存管后均置于-80 °C冰箱保存, 备用.

1.2.5 结肠组织总RNA的提取及鉴定: (1)将组织在液氮中磨成粉末后, 再以每50-100 mg组织加入1 mL TRIzol液研磨, 样品总体积不能超过所用TRIzol总体积的10%; (2)研磨液室温放置5 min, 4 °C 12000 r/min离心5 min, 弃沉淀, 然后以每1 mL TRIzol液加入0.2 mL的比例加入氯仿, 盖紧离心管, 用手剧烈震荡离心管15 s, 室温放置2 min, 4 °C 12000 r/min离心15 min; (3)去上层水相于一新的离心管, 按

每毫升TRIzol液加0.5 mL异丙醇的比例加入异丙醇, 室温放置10 min, 4 °C 12000 r/min离心10 min; (4)弃去上清液, 按每毫升TRIzol液加1 mL的比例加入75%乙醇, 涡旋混匀, 4 °C 7500 r/min离心5 min; (5)小心弃去上清液, 然后室温或真空干燥5-10 min, 不要干燥过分, 否则会降低RNA的溶解度. 然后将RNA溶于水中, 必要时可55 °C-60 °C水浴10 min. RNA保存于-80 °C. RNA的鉴定: (1)在含核酸染料的1%琼脂糖凝胶上进行RNA电泳鉴定. 如果来源于真核细胞的总RNA在跑完胶后可清晰看到18s和28srRNA的条带, 可认为RNA是完整的. 28srRNA的条带亮度约为18srRNA的2倍; (2)检测浓度及纯度: 应用NanoDrop超微量分光光度计测定RNA样品浓度以及 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值(比值>1.8), 即纯度.

1.2.6 qRT-PCR: (1)将以下成分加入到一个无

创新盘点

UC发展的分子病因涉及到免疫、遗传、微生物、环境和其他未知因素, 其免疫学机制越来越受到研究者的关注. UC作为一种全身性疾病, 有许多细胞因子参与结肠黏膜的炎症免疫反应, 而且与UC的发病及严重程度密切相关. 目前已从形态学、基因水平等方面对UC的发病机制进行了一定的阐述, 但有关异常胆液质载体UC病证的免疫炎症相关因子尚未见报道. 因此分析基因表达水平变化在异常胆液质载体UC病证发生、发展过程中的作用具有重大意义.

应用要点

UC的发病机制涉及环境、肠道菌群、免疫系统及遗传4个基本要素。维医理论强调机体是一个统一的整体,他认为体液的异常变化是疾病发生的土壤,由于环境、饮食、遗传因素等多种内外因素相互共同作用引起人体气质、体液失去平衡和支配器官功能失调,从而诱发疾病的发生。可看出UC的发病机制与维吾尔医学的观点相符。因此以维吾尔医学为指导,探讨UC的发病机制具有一定的科学性和合理性。

表 3 qRT-PCR引物列表(针对hnRNA)

基因	引物序列	扩增产物长(bp)	退火温度(℃)
iNOS	上游: AGCTGAGTTCCTAACGGAACCCCTC	211	57
	下游: TGGAGCACGCTGAACACC		
eNOS	上游: TCTTTCGGAAGGCGTTTG	142	57
	下游: TGAGACAGGGTCCTATGC		

qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶。

表 4 异常胆液质载体UC病证模型组与正常组一般状态的比较

	异常胆液质载体UC病证模型组	正常组
舌象舌苔	舌苔黄, 干	淡红舌, 薄白苔
皮肤毛发	毛色白, 光泽较暗淡	毛色白, 有光泽
兴奋程度	对刺激敏感强	对刺激敏感
尿色性质	黄色或深黄色	浅黄色
大便状态	成形, 颗粒状, 略硬, 干	成形, 颗粒状, 略软

UC: 溃疡性结肠炎。

RNA酶的管子中: RNA 1 μg, 10×反应缓冲液(含有MgCl₂)1 μL, DNA酶 I (无RNA酶)1 μL, 无核酸酶的高纯度水加到10 μL; (2)37 ℃孵育30 min; (3)加入1 μL 50 mM EDTA, 65 ℃孵育10 min; (4)使用准备好的RNA为模板进行逆转录反应。

1.2.7 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR): PCR反应程序的设置: 预变性94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s+退火温度30 s+72 ℃ 30 s, 循环38次, 总延伸72 ℃ 7 min, 4 ℃终止反应。引物的设计: 由于分别对于基因的mRNA和hnRNA表达水平进行检测, 所以针对于mRNA和hnRNA分别设计引物。对于mRNA, 首先从基因组数据库(NCBI, GenBank)找出基因mRNA序列(只含外显子), 用引物设计软件Primer5设计引物。而hnRNA是mRNA的未成熟前体。因此, 对于hnRNA, 从基因组数据库(NCBI, GenBank)找出既含外显子又含内含子的相应基因的序列, 对此序列用引物设计软件Primer5设计引物, 如表3。

1.2.8 qPCR反应体系及反应程序: qPCR反应体系: 2×SYBR-Green Reaction Mix 10 μL, primer F 1 μL, primer R 1 μL, ddH₂O 7 μL, 模板cDNA 1 μL。qPCR反应程序的设置: 预变性95 ℃ 10 min, 95 ℃ 15 s+退火温度1 min, 循环40次。随着温度的升高, DNA双链断裂; 接着温度降低, 到

达退火温度的时候, DNA双链复性, 荧光分子绑定在DNA双链上, 所以荧光信号值到达最高点。接着DNA双链分子由退火温度约60 ℃, 继续升温, 双链断开, DNA分子溶解。应注意溶解曲线的纵坐标, 表示单位时间内荧光信号的变化量。当扩增产物特异, 是单一产物的时候, 这个纵坐标峰值所对应的横坐标应该是一致的, 即呈现单一的溶解峰, 这个时候, 在同样的温度下, 可以认为是产物相同; 如果溶解峰不单一, 就意味有非特异性扩增。

统计学处理 采用SPSS17.0统计分析软件, 计量资料各指标数据以mean±SD表示, 采用t检验比较两组指标间的差异, 等级资料用秩和检验, 检验水准α = 0.05, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异常胆液质型UC病证组与正常组的比较
异常胆液质载体UC病证组成功构建后, 与正常组相比, 异常胆液质载体UC病证组大鼠活动明显减少, 体质量减轻, 精神萎靡, 喜欢蜷缩, 毛色暗淡无光泽, 可出现稀便、黏液便、脓液便以及血便(表4)。此外, 建模后的体质量、体质量差异和体质量增长率与正常组相比, 均趋于下降, 并有统计学意义(P<0.05, 表5)。

表 5 正常组与异常胆液质载体UC病证组大鼠异常胆液质证建立前后体质量比较 (mean±SD)

分组	第1天	第11天	体质量差异	体质量增长率
正常组	245.80±19.31	284.96±39.45	39.16±17.81	1.25±1.18
异常胆液质载体UC病证组	242.48±25.02	234.45±15.18 ^a	-8.03±18.76 ^a	-3.39±7.89 ^a

^a*P*<0.05 vs 正常组. UC: 溃疡性结肠炎.

表 6 正常组和异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠肉眼评分等级

分组	评分等级								统计学意义	
	0级	1级	2级	3级	4级	5级	6级		Z值	P值
正常组	6	0	0	0	0	0	0		-3.207	0.001 ^a
异常胆液质载体UC病证组	0	0	0	0	0	5	1			

^a*P*<0.05 vs 正常组. UC: 溃疡性结肠炎.

表 7 正常组和异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织病理学评分分级

分组	评分等级										统计学意义	
	0级	1级	2级	3级	4级	5级	6级	7级	8级		Z值	P值
正常组	6	0	0	0	0	0	0	0	0		-3.083	0.002 ^a
异常胆液质载体UC病证模型组	0	0	0	0	1	1	2	1	1			

^a*P*<0.05 vs 正常组. UC: 溃疡性结肠炎.



图 1 正常组大鼠和异常胆液质载体UC病证模型组结肠组织观察. A: 正常组; B: 异常胆液质载体UC病证模型组. UC: 溃疡性结肠炎.

2.2 结肠黏膜的损伤情况 结肠黏膜肉眼观察(图1)以及评分等级来看, 正常组大鼠结肠黏膜光滑、无黏连、无充血、无水肿、无溃疡形成; 异常胆液质型UC模型组大鼠结肠黏膜明显有充血水肿情况, 肠黏连、溃疡形成, 严重者溃疡最长径介于1-2 cm之间, 黏膜坏死以及肠壁增厚, 甚至死亡. 各组大鼠结肠肉眼评

分等级如表6所示, 正常组均为0级, 异常胆液质载体UC病证模型组都为5、6级, 评分等级越高, 表明结肠黏膜损伤程度越严重; 两组之间存在统计学差异(*P*<0.05). 病理切片结果显示: 正常组大鼠结肠黏膜上皮完整、连续, 腺体排列规则、结构清楚, 无溃疡、无糜烂点及淋巴细胞浸润, 黏膜下固有层内血管纤维内质正常, 肌层无异常; 异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠黏膜上皮细胞坏死脱落, 腺体脱落, 隐窝细胞丢失, 炎细胞浸润深入达到黏膜肌层, 伴有黏膜增厚和明显水肿, 中性粒细胞浸润, 脱落处部分区域淋巴滤泡增生, 溃疡形成(图2); 如表7所示, 正常组与异常胆液质载体UC病证模型组病理学评分分级有统计学差异(*P*<0.05).

2.3 qRT-PCR结果

2.3.1 组织RNA的提取: (1)RNA电泳图谱: 电泳图谱(图3)所示, 18S、28S条带清楚, 说明总RNA没有降解; (2)总RNA浓度及纯度的鉴定:

■名词解释

溃疡性结肠炎(UC): 又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种以慢性炎症和溃疡形成为主要病理特点的消化系统疾病, 主要侵犯大肠黏膜与黏膜下层, 临床上主要表现为黏液脓血便、腹泻、腹痛及里急后重等. 本病病因未明, 治愈难度大, 复发率高, 具有较高的癌变率, 与结肠癌的发病关系密切, 为结肠癌癌前病变.

同行评价

本文题目新颖, 整体设计严谨, 作者以模型分析了相关基因与蛋白的变化, 试验每一步都交代清楚, 统计方法正确, 结果分析条理清楚, 讨论紧扣结果, 结论可信, 能够在临床工作中对UC的诊疗提供较大的帮助。

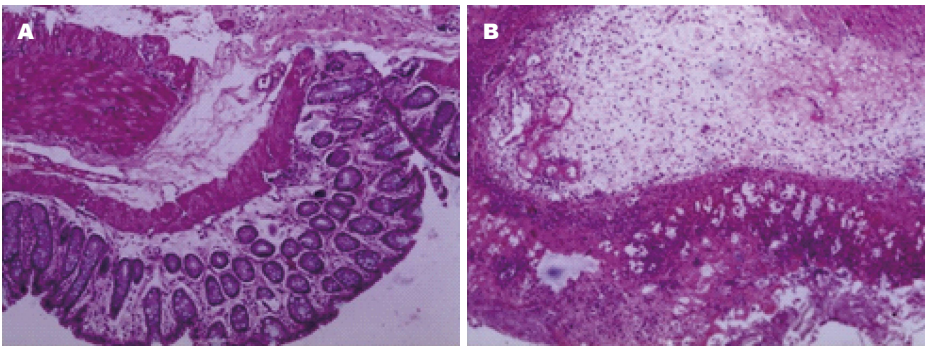


图 2 正常组大鼠和异常胆液质载体UC病证模型组结肠组织HE染色. A: 正常组; B: 异常胆液质载体UC病证模型组. UC: 溃疡性结肠炎.

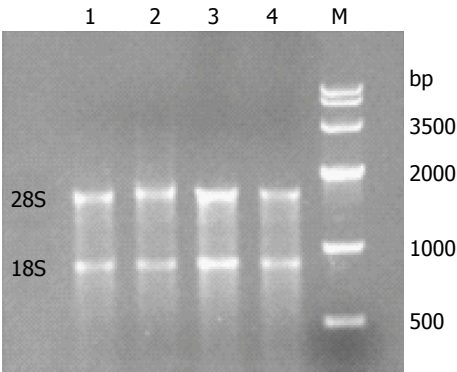


图 3 组织RNA电泳结果图谱. M: marker; 1, 2, 3, 4: 组织RNA.

从正常组和异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织中提取的总RNA浓度、纯度及相关参数如表8所示, $A_{260/280}$ (及纯度) >1.90 .

2.3.2 候选基因hnRNA表达水平检测: 如表9所示, 异常胆液质载体UC病证组大鼠结肠组织中iNOS的hnRNA表达水平上调, 与正常组相比差异有统计学意义(1674.53 ± 1125.81 vs 0.67 ± 0.23 , $P < 0.05$), 而eNOS的hnRNA表达与正常组之间差异无统计学意义(5.60 ± 2.43 vs 1.60 ± 0.75 , $P > 0.05$). 如图4, 5显示, 扩增曲线平滑、起峰时间正常, 溶解曲线呈现单峰、溶解温度均一、峰的宽度较小, 溶解温度在 80°C - 85°C .

2.3.3 候选基因mRNA表达水平检测: 异常胆液质载体UC病证组大鼠结肠组织中iNOS、eNOS的mRNA表达水平均上调, 并与正常组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但eNOS的mRNA表达量比其他因子少. 图5显示, 扩增曲线平滑、起峰时间正常, 溶解曲线呈现单峰、溶解温度均一、峰的宽度较小, 溶解温度在 80°C - 85°C . 在异常胆液质载体UC病证组大鼠结肠组织中iNOS、eNOS的mRNA表达水平均

表 8 正常组和异常胆液质载体UC病证模型组总RNA浓度、纯度及相关参数表

分组	浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A_{260}/A_{280}
正常组		
1	1.082	1.96
2	0.545	1.94
3	0.741	1.96
4	0.535	1.94
5	1.341	1.99
6	1.608	1.99
异常胆液质载体UC病证模型组		
1	1.203	1.99
2	0.564	1.95
3	0.723	1.96
4	1.816	1.91
5	1.311	1.94
6	0.995	1.95

高于hnRNA表达水平(1674.53 ± 1125.81 vs 4.82 ± 1.98 、 5.60 ± 2.43 vs 0.52 ± 0.08), 并有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

维医体液论是维医理论的核心, 是维医认识人体正常生理功能和异常病理变化的主要理论依据. 胆液质体液是一种色绿、略黄、味极苦的液体, 属性干热. 维医认为UC的病变产生是由于浅黄色胆液质所致^[25], 其机制为正常胆液质中混入大量异常黏液质体液或水时, 胆液质体液被稀释, 产生异常胆液质体质即浅黄色胆液质, 而正常胆液质体液的助消化、免疫系统功能减弱, 另一方面黏液质体液里面过度的湿性会使组织器官松弛, 血管壁的通透性增加, 导致胆液质被大量水分混合, 从而进一步稀释胆液质. 若流入结肠组织细胞之中, 日久不愈

表 9 正常组与异常胆液质载体UC病证模型组结肠组织2个基因的hnRNA表达差异 (mean±SD)

分组	iNOS	eNOS
正常组	1.34±0.34	0.69±0.19
异常胆液质载体UC病证模型组	4.81±1.98 ^a	0.52±0.08

^a*P*<0.05 vs 正常组. UC: 溃疡性结肠炎; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶.

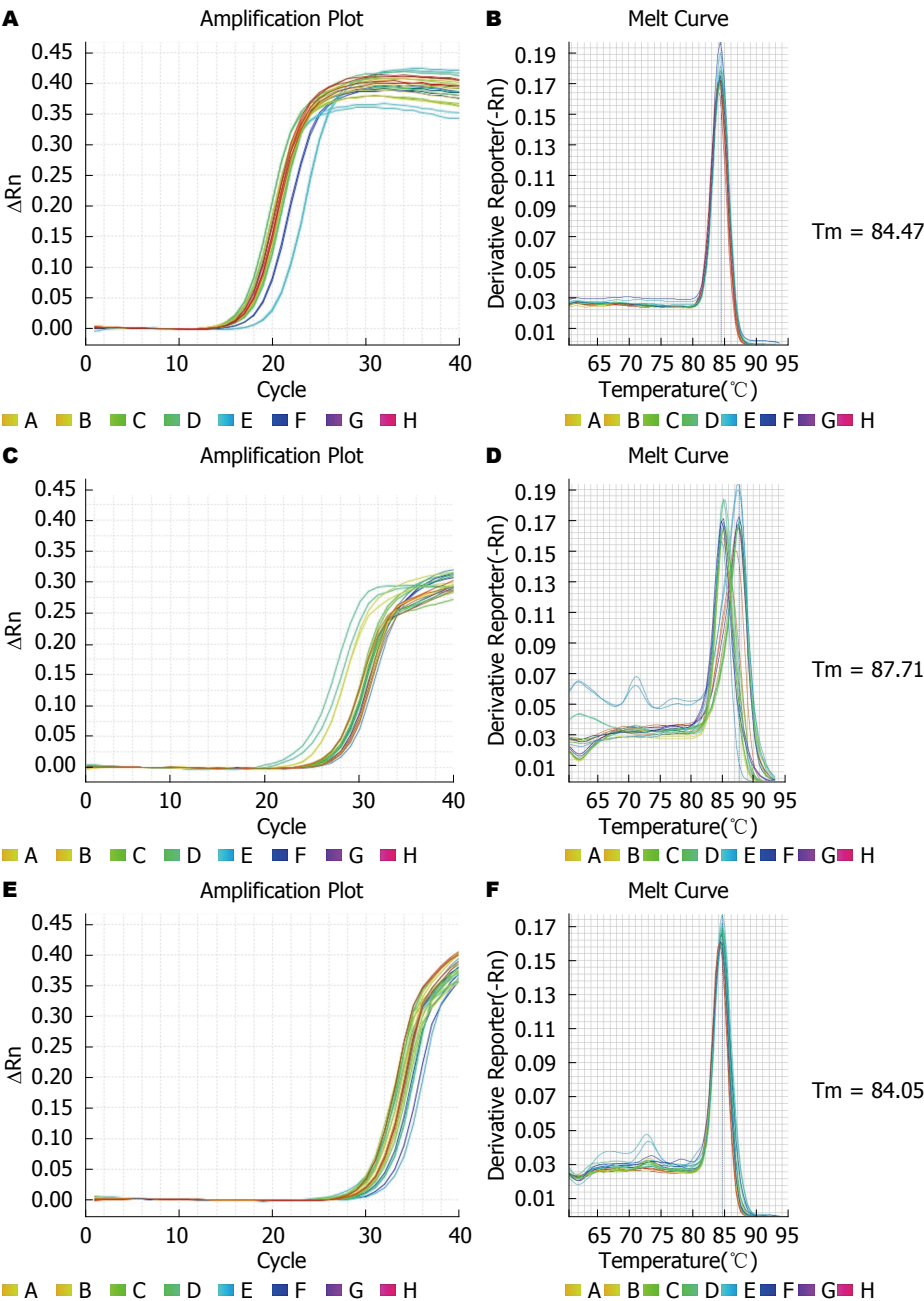


图 4 正常组与异常胆液质载体UC病证模型组iNOS、eNOS hnRNA检测qRT-PCR扩增曲线和熔解曲线. A, B: β -actin扩增曲线和熔解曲线; C, D: iNOS扩增曲线和熔解曲线; E, F: eNOS扩增曲线和熔解曲线. UC: 溃疡性结肠炎; qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶.

就会引起炎症性病变. 因此, 异常胆液质载体 UC病证大鼠模型的构建, 对深入研究UC发病 机制、诊断、预防和治疗方面具有非常重要 的意义.

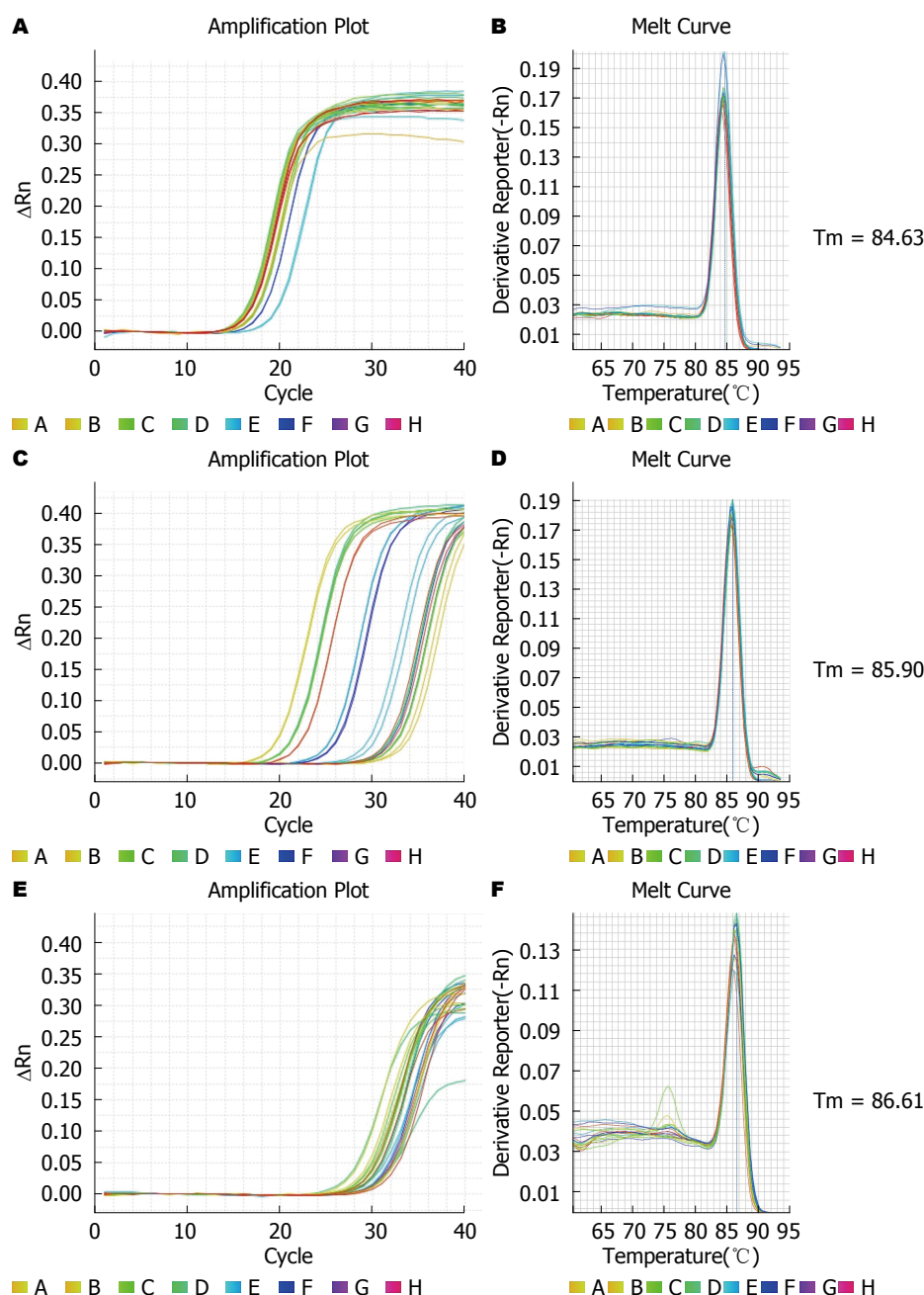


图 5 正常组与异常胆液质载体UC病证模型组iNOS、eNOS mRNA检测qRT-PCR扩增曲线和熔解曲线. A, B: β -actin扩增曲线和熔解曲线; C, D: iNOS扩增曲线和熔解曲线; E, F: eNOS扩增曲线和熔解曲线. UC: 溃疡性结肠炎; qRT-PCR: 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 内皮型一氧化氮合酶.

本课题将异常胆液质载体UC病证大鼠作为研究对象, 在干热环境下, 给予干热的饲料(黑胡椒、干姜和红花)灌胃、饮用干热性水(红花水), 同时给予电刺激、夹尾巴、噪音等慢性刺激, 在大鼠体内形成异常胆液质. 在异常胆液质证的基础上采用TNBS联合乙醇的方法建立UC模型. 异常胆液质载体UC病证模型建立后, 与正常组相比, 大鼠活动明显减少, 体质量减轻, 精神萎靡, 喜欢蜷缩, 毛色暗淡无光泽, 可出现稀便、黏液便、脓液便、甚至血便,

这些特征与UC患者的一般症状与体征相符合.

大量研究证明, 细胞因子及各种炎症介质的失衡激起人体的细胞和体液的免疫反应, 使炎症反应链不断的增强, 最终造成肠道上皮细胞受损、细胞间的紧密连接结构破坏、杯状细胞减少、黏液蛋白分泌减少, 使肠黏膜的受到各种致病因子的破坏, 加重肠黏膜的损害^[26]. 本研究选取了iNOS和eNOS作为候选因子, 检测异常胆液质载体UC病证组大鼠结肠组织中iNOS和eNOS的转录和转录后表达水平变化.

NO在机体内起着重要的生物信使分子和效应分子的作用, 研究表明NO除具有扩张血管, 降低血压, 松弛平滑肌等活性外, 尚具有信号传递, 酶活性调节, 免疫调节, 抑制血管平滑肌增殖, 抑制血小板黏附, 聚集及抗氧化损伤^[27]等生物活性. 正常情况下, NO的产生和降解处于动态平衡, 以保证机体持续释放一定浓度的NO而维持生理功能. 无论合成还是降解环节出现问题, 都会影响体内NO的水平. NO合成的限速酶NOS是一种同工酶, 其有3种亚型: 神经元型一氧化氮合酶、eNOS、iNOS. eNOS于正常情况下存在, 生成少量NO, 为皮摩尔(pmol)水平, 维持机体正常生理功能; 而iNOS是激活细胞产生, 生成纳摩尔(nmol)水平NO, 是eNOS生成NO量的100倍. NO可引诱炎性细胞的侵袭性, 维持结肠组织中血管扩张, 增加血管通透性, 从而促进炎症的生成, 并且使更多的营养物质渗出血管到达炎性细胞, 为其分裂增殖、浸润提供充足的物质基础. 有研究^[28]表明, iNOS与eNOS的作用不同可能与其生成的NO量的多少及各自在发挥功能过程中的作用不同有关. 在免疫反应过程中, 内毒素和某些细胞因子如白介素-1、肿瘤坏死因子- α 、干扰素等可诱导iNOS催化L-精氨酸产生大量NO, 对肠黏膜具有杀伤毒性和促炎作用. 研究发现在UC患者活动期肠黏膜组织、血清中NO含量均有增加, 且活动期UC患者病变黏膜的炎症程度与iNOS和NOR度有关, 在重度UC病变黏膜iNOS和NO的浓度比轻度UC者明显增高. 一方面, 在UC早期, NO通过增加靶细胞内5-环磷酸鸟苷浓度及抑制P-选择素基因表达, 维持微循环的完整性, 抑制血小板、白细胞在皮内细胞表面的黏附、积聚、防止血栓形成和内皮细胞和中性粒细胞、单核细胞的相互作用; 另一方面, 在UC中晚期, 随着NO产生增多和积聚, NO通过细胞内铁的释放、阻断线粒体的功能和阻碍DNA的合成, 导致黏膜细胞的损伤^[29,30]. 在异常胆液质载体UC病证中, 高浓度的NO可增加血管通透性和蛋白溢出造成结肠组织局部炎症反应, 导致结肠组织出现炎性细胞浸润、结肠黏膜水肿、充血、出血等一系列病理变化, 加重结肠组织损伤. 本研究结果显示, 在异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织中eNOS的mRNA的表达水平低于iNOS的mRNA表达水平. 总之, iNOS的表达与

异常胆液质载体UC病证的发生、发展紧密联系. 说明异常胆液质载体UC病证组大鼠结肠组织中候选基因iNOS调控序列上, 增强其转录活性, 促进候选基因hnRNA表达, 从而促使候选基因的mRNA表达; 但异常胆液质载体UC病证模型组大鼠结肠组织中iNOS的mRNA表达水平高于hnRNA表达水平, 提示异常胆液质载体UC病证大鼠结肠组织中炎症相关因子表达水平的调控存在mRNA的稳定性相关的转录后调控机制.

4 参考文献

- 1 Sidoroff M, Karikoski R, Raivio T, Savilahti E, Kolho KL. High-sensitivity C-reactive protein in paediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2901-2906 [PMID: 20556836 DOI: 10.3748/wjg.v16.i23.2901]
- 2 Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, Hiraoka S, Kuwaki K, Yamamoto K. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1245-1251 [PMID: 20222169 DOI: 10.3748/wjg.v16.i10.1245]
- 3 Yamaguchi N, Isomoto H, Shikuwa S, Ohnita K, Mizuta Y, Ito M, Kohno S, Nakao K. Proximal extension of backwash ileitis in ulcerative-colitis - associated colon cancer. *Med Sci Monit* 2010; 16: CS87-CS91 [PMID: 20581781]
- 4 Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407 [PMID: 16819502 DOI: 10.1038/ncpgasthep0528]
- 5 Fiocchi C. Future of IBD pathogenesis: how much work is left to do? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2: S145-S147 [PMID: 18816721 DOI: 10.1002/ibd.20659]
- 6 Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573-621 [PMID: 20192811 DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101225]
- 7 姚君, 王立生, 王建尧, 李迎雪, 荀安营, 冯聚玲, 魏晓霞. 双歧杆菌抑制溃疡性结肠炎小鼠结肠氧化应激和NADPH氧化酶表达. *实用医学杂志* 2010; 26: 2491-2493
- 8 Rodríguez-Perálvarez ML, García-Sánchez V, Villar-Pastor CM, González R, Iglesias-Flores E, Muntane J, Gómez-Camacho F. Role of serum cytokine profile in ulcerative colitis assessment. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 1864-1871 [PMID: 22238172 DOI: 10.1002/ibd.22865]
- 9 穆巴拉克, 派祖拉, 亚尔买买提. 维吾尔医学中关于体液的探索. *中国民族民间医药杂志* 2002; 11: 69-70
- 10 阿地力江·伊明, 潘建春, 哈木拉提·吾甫尔, 麦尔耶姆古丽·麦麦提, 伊利亚斯·米吉提. 几种不同方法建立维医异常胆液质阳痿病证模型的研究. *新疆医科大学学报* 2010; 33: 1279-1280
- 11 哈木拉提·吾甫尔, 阿依努尔·买提斯迪克, 努尔买买提·艾买提, 阿迪力·阿布力米提. 异常黑胆质载体动物模型的建立及其自然恢复反证. *新疆医科大学学报* 2006; 29: 910-914
- 12 王禄增, 李华, 王捷, 尚昌连. 通风、温度、湿度对实验动物福利的影响及控制. *中国比较医学杂志*

- 2004; 8: 234-236
- 13 刘宏雁, 赵虹, 吕国蔚, 王维忠. 性别和环境温度对小鼠急性缺氧耐受性的影响. 白求恩大学学报 2000; 26: 123-125
- 14 李超英, 赵文阁, 元新华. 温度、湿度、饲养密度、噪音对实验动物福利的影响. 河南科技学院学报(自然科学版) 2006; 34: 24-25
- 15 Aamodt G, Bengtson MB, Vatn MH. Can temperature explain the latitudinal gradient of ulcerative colitis? Cohort of Norway. *BMC Public Health* 2013; 13: 530 [PMID: 23724802 DOI: 10.1186/1471-2458-13-530]
- 16 再努勒·艾塔尔. 拜地依药书(维吾尔文). 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2010
- 17 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 维吾尔药卷. 上海: 上海科学技术出版社, 2005
- 18 自治区维吾尔医研究所. 中华医药学会维吾尔医药. 长春: 维吾尔医药杂志社, 2013
- 19 Shi Y, Li S, Wu HG, Yao Y, Zhao C, Shi Z, Gong YJ. Interventional effect of electro acupuncture combined with medicine on monoamine neurotransmitters in hypothalamus of rats with ulcerative colitis. *Neural Regen Res* 2007; 2: 536-539 [DOI: 10.1016/S1673-5374(07)60107-8]
- 20 Kellett J, Kokkinidis L. Extinction deficit and fear reinstatement after electrical stimulation of the amygdala: implications for kindling-associated fear and anxiety. *Neuroscience* 2004; 127: 277-287 [PMID: 15262319 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.011]
- 21 韩秋燕. 肝郁脾虚证动物模型的建立. 贵阳中医学院学报 2001; 23: 59-61
- 22 邹建芳, 江虹, 郭会越, 李鹏, 徐孝华, 李鲁生. 噪声对心理及血浆垂体血管加压素、促肾上腺皮质激素、催产素水平的影响. 中国行为医学科学 2007; 16: 135-139
- 23 李楠, 王雪明, 稽杨, 张林, 张虹, 宋晶莹, 石玉玲. 免疫应激溃疡性结肠炎模型的建立与评价. 临床医学杂志 2008; 36: 496-498
- 24 Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Herfarth H, Schölmerich J, Falk W. Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 217-224 [PMID: 14616780 DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02288.x]
- 25 哈木拉提·吾甫尔. 维吾尔医气质, 体液论及其现代研究. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003: 1-8
- 26 Shen L, Su L, Turner JR. Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis* 2009; 27: 443-449 [PMID: 19897958 DOI: 10.1159/000233282]
- 27 Wink DA, Cook JA, Krishna MC, Hanbauer I, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. Nitric oxide protects against alkyl peroxide-mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319: 402-407 [PMID: 7786021 DOI: 10.1006/abbi.1995.1310]
- 28 王广义, 王旭. 人胃癌VEGF和NOS的表达与肿瘤血管生成的关系. 中国普外基础与临床杂志 2004; 11: 55-57
- 29 Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624 [PMID: 2154753 DOI: 10.1073/pnas.87.4.1620]
- 30 葛贺, 孙红. 氧自由基和一氧化氮在溃疡性结肠炎发病机制中的作用. 北华大学学报(自然科学版) 2003; 4: 411-412

编辑: 闫晋利 电编: 胡珊





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

