维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0066-03

两种溃疡性结肠炎大鼠模型的比较

段 征,汪维伟,姜 蓉

(重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:比较 2,4,6- 三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)与免疫复合法介导的溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)动物模型的效果。方法:SD 大鼠随机分为免疫复合法(Ⅰ组)、TNBS/乙醇(Ⅱ组)、乙醇对照(Ⅲ组)和生理盐水对照(Ⅳ组)。Ⅰ组先间隔 2 周给予兔肠黏膜制备的抗原乳化液(含抗原 8 mg)免疫 2 次。4 组均于禁食 24h 后用 0.65ml 不同液体灌肠:Ⅰ、Ⅱ组均为 100mg TNBS/kg+50%乙醇;Ⅲ组为 50%乙醇;Ⅳ组为生理盐水。造模后第 1、21d,第 8 周、12 周处死大鼠,观察大体病灶及光镜下组织形态学改变。结果:Ⅰ、Ⅱ组均出现糜烂、溃疡等典型 UC 结肠病变,Ⅰ组还伴有末段回肠病变;Ⅰ组的病变可维持 8 周,Ⅱ组病变 3 周后趋向愈合。Ⅲ组病变仅黏膜充血水肿和少量糜烂或浅表溃疡,第 21d 痊愈。Ⅳ组未见组织损伤。结论:免疫复合法重复性好,病变更类似人 UC,持续时间长,是较理想的造模方法。

【关键词】溃疡性结肠炎;模型;大鼠

【中国图书法分类法分类号】R574.1;R-332 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-09

Comparison of two experimental ulcerative colitis models in rat

DUAN Zheng,et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the rat models of ulcerative colitis induced by 2,4,6-trinitro-benzene-sulfonic acid(TNBS) and immune-comb method. *Methods*: SD rats were randomly distributed into group Ⅰ (immune-comb method), group Ⅱ (TNBS/ethanol), group Ⅲ (50% ethanol) and group Ⅳ (control). The rats in group Ⅰ were sensitized 2 times by antigen made of rabbit colon mucosa in 2-week intervals. After abrosia for 24 hours, each rat in four groups received enema of 0.65 ml different fluids, which were: TNBS 100mg/kg +50% ethanol for group Ⅰ and Ⅱ, 50% ethanol for group Ⅲ, and normal sodium for control group. Rats were sacrificed on day 1, 21 and week 8, 12 after enema to observe the macroscopical focus of infection in bowels and the microscopical changes. *Results*: The typical erosion and ulcer changes appeared in group Ⅰ and Ⅱ, and there was accompanying pathological changes in the end piece of ileum in group Ⅰ. The pathological changes for group Ⅰ could keep for 8 weeks, while those for group Ⅱ trended to heal 3 weeks later. The pathological changes in group Ⅲ only were hyperemia, oedema and a few anabrosis or superficial ulcer, keeped for 21days. There was no tissue damage in group Ⅳ. *Conclusion*: Immune-comb method is comparatively the ideal method to establish the model, , because it has a good reproducibility, a long persistence time, and the pathological changes resemble more to those of man..

【Key words】 Ulcerative colitis; Model; Rat

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)为一种慢性结肠、直肠炎性疾病,可发生于各年龄层,难治愈,被世界卫生组织列为现代难治病之一。建立与人 UC 有共同的病理生理变化的动物实验模型对于探索 UC 的发病机制、新的治疗途径都有着重要意义,模型的质量直接影响研究结果。UC 的实验动物模型有多种,如化学诱导模型、免疫致敏模型、细胞移植模型和基因敲除模型等[1-5],这些模型各有优缺点。本文比较了 TNBS 诱导及免疫复合法 2 种 UC 大鼠模型,为 UC 的研究提供恰当的实验动物模型。

作者介绍:段 征(1978-),女,硕士,主要研究方向:干细胞分化。

通讯作者:汪维伟,女,教授,E-mail:wwwpzn@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠,雌雄兼用,体重 200g 左右,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 GL-20A 型高速冷冻离心机(湖南

维普资讯 http://www.cqvip.com

仪器仪表厂);UV-260 型可见紫外分光光度计(日本岛津公司)。TNBS 和完全佛式佐剂(Sigma 公司);双缩脲试剂盒与蛋白标准液(南京建成公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药方法 大鼠随机分为Ⅰ、Ⅱ组各 24 只,Ⅲ组 18 只,Ⅳ组 4 只。取家兔结肠黏膜制成组织匀浆,以 3000r/min 速度离心 30min,取上清液提纯,双缩脲法检测蛋白含量,与等量完全佛式佐剂配成抗原乳化液。Ⅰ组(免疫复合法)相隔 14d 在大鼠腹股沟、足跖处注射抗原乳化液(含抗原 8mg)2 次。4 组大鼠均在禁食(不禁水)24h 后造模。300mg/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉,将直径 2mm 长 15cm 的硅胶管由肛门轻缓插入 8cm,分别推入液体各 0.65ml:Ⅰ、Ⅱ组为 100mgTNBS/kg+50%乙醇;Ⅲ组为 50%乙醇;Ⅳ组为生理盐水。

1.2.2 体症观察与标本制备 建模后每天观察大鼠活动、耗食量、体重及大便性状。于造模后第 1、21d,第 8 周、12 周处死大鼠,剖取回肠末段及全结肠,纵切后,生理盐水迅速冲净,放大镜下观察结肠大体形态、结肠黏膜损伤。标本经 10%福尔马林固定 24h,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察。

2 结 果

2.1 一般情况

Ⅰ、Ⅱ组大鼠造模 1d 后,开始逐渐出现懒动、拱背、厌食、大便次数增多、软便或稀便、大便末端有黏液血或脓点等表现。3d 后症状达到高峰,大鼠毛色无华、变脆,嗜卧扎堆,大便完全为稀便。Ⅰ组黏液血便持续约 2 周,懒动厌食、软便或稀便、毛色无华持续约 8 周;Ⅱ组症状持续 2 周后开始逐渐好转,第 3 周后基本活动如常;Ⅲ组在灌肠 1d 后出现稀便、懒动,7d 后完全恢复正常;Ⅳ组灌肠后未见明显症状。

2.2 回、结肠大体病变观察结果

灌肠后第 1d,Ⅰ、Ⅱ组结肠黏膜皆出现充血水肿、糜烂以及多发性溃疡(图 1);Ⅰ组回肠末端 3~5cm 处可见水肿、糜烂,其余组回肠均未见病变。Ⅲ组大部分结肠黏膜有充血水肿,仅少量糜烂和浅表溃疡;Ⅳ组未见组织损伤。第 21d,Ⅰ组回、结肠病变同前(图 2);Ⅱ组有所好转,仅见少量充血水肿及糜烂;Ⅲ组肠黏膜完全恢复正常。第 8 周Ⅰ组仍可见结肠肠壁增厚、狭窄,可见糜烂及溃疡,但溃疡趋向愈合,回肠仍可见水肿糜烂(图 3、4);Ⅱ组基本恢复正常。造模第 12 周,Ⅰ组仅见结肠壁增厚,未见明显溃疡。



图 1 Ⅰ组造模后第 1d,结肠黏膜可见充血水肿、糜烂以及溃疡(↑)



图 2 Ⅰ组造模后第 21d,仍可见充血水肿、糜烂以及溃疡(↑)



图 3 Ⅰ组建模后第 8 周,仍可见结肠壁增厚、狭窄,糜烂及溃疡,但溃疡趋向愈合(↑)



图 4 Ⅰ组建模后第 8 周,回肠末端仍可见水肿、糜烂(↑)

2.3 回、结肠病变光镜观察结果

Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组第 1d 结肠黏膜充血水肿、上皮脱落、坏死、溃疡形成、黏膜下层有大量的炎性细胞浸润(图 5)。Ⅰ、Ⅱ组某些溃疡可深达肌层;Ⅳ组只见少量炎性细胞浸润。Ⅰ组回肠充血水肿、上皮脱落、坏死及炎性细胞浸润。第 21d Ⅰ组回、结肠光镜所见无明显改变,Ⅳ组恢复正常;Ⅱ组仍可见上皮脱落、炎性细胞浸润,部分溃疡已愈合,纤维结缔组织和血管增生明显;Ⅲ组除见少量炎性细胞浸润外,基本恢复正常。第 8 周Ⅰ组回、结肠仍可见水肿、上皮脱落坏死以及炎性细胞浸润(图 6),结肠部分溃疡趋向愈合;Ⅱ组基本恢复正常。第 12 周,Ⅰ组回、结肠可见上皮脱落、坏死以及炎性细胞浸润,结肠纤维结缔组织增生明显,未见明显溃疡。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 Ⅰ组建模后第 1d 的结肠黏膜层溃疡。(HE 染色,×20)

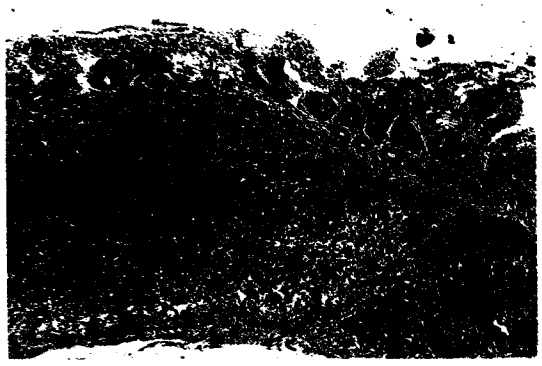


图 6 Ⅰ组建模第 8 周,回肠表面上皮脱落,黏膜下层淋巴组织增生。(HE 染色,×20)

到目前为止,用于 UC 研究的动物模型有多种,各种动物模型均存在着各自的优缺点:(1)乙酸、葡萄糖硫酸钠(DSS)常用于化学诱导模型。乙酸诱导模型的造模的机制可能是通过激活环氧合酶和脂氧合酶途径启动了炎症的发生,其炎症介质和人类急性肠炎的炎症介质相似[6],可造成 3~6 周病变,是目前应用最广泛的实验 UC 模型。但乙酸直接刺激主要造成结肠末端肠黏膜及血管损伤,与临床致病因素有较大差异,不能反映人 UC 变化。DSS 模型的致病机制可能与巨噬细胞功能失调、肠道菌群失调,以及 DSS 对结肠上皮的毒性作用有关。大鼠饮用 DSS 1 周后,出现典型 UC 急性期病理表现,6 周后呈慢性期改变并可见到淋巴滤泡。该模型能较好复制人 UC 复发缓解的特点,但结肠黏膜病变主要位于左侧,并可导致结肠上皮萎缩、发育不良,从而增加癌症的发生率[7]。(2)TNBS 或二硝基苯环酸(DNBS)诱导模型,属于免疫致敏模型,其机制是乙醇破坏肠黏膜屏障后,TNBS 或 DNBS 与肠组织蛋白结合形成完全抗原,导致肠黏膜发生迟发性变态反应,从而造成肠黏膜的损伤。此模型伴有 INF-γ 和 IL-2 明显增高,表明属于 Th-1 型免疫反应[8],更类似人 Crohn's 病。(3)免疫复合法模型的致病机制是在全身致敏的基础上给 TNBS,导致迟发性变态反应造成肠黏膜的损伤,达到全身免疫异常与局部炎症病变的结合,但制作方法稍复杂。(4)CD_4+T 细胞移植、基因敲除和转基因等方法可以制作出较为理想的 UC 动物模型,但动物价格昂贵,技术难度大,要求条件高。

本实验中,模型制备完成后 21d 内 TNBS 诱导法与免疫复合法模型所致结肠病变较乙醇和生理盐水组严重得多。溃疡病变主要限于结肠黏膜和黏膜下层,毛细血管扩张、充血、水肿,有大量的淋巴细胞、浆细胞、单核细胞和中性白细胞浸润,并可见数量不等的嗜酸性粒细胞及点状出血点。其病理特点是组织逐渐呈一种慢性炎症变化,病程较长。21d 后,由于大鼠结肠自愈性强,TNBS/ 乙醇模型的 UC 病变趋向愈合,8 周时基本恢复正常,与文献报道一致[9]。免疫复合法模型病变累及全结肠以及末段回肠,溃疡病变可维持 8 周以上,12 周后有愈合倾向,但仍可见结肠壁增厚及炎性细胞浸润。

综上所述,免疫复合法模型体现了肠黏膜屏障损害与免疫调节失衡这 2 个 UC 病变最主要的致病因素,其症状、病理特征与人 UC 相似度高,病程迁延不愈。模型制备较简单、重复性好,克服了 TNBS 诱导法模型维持时间较短的缺点,是一种理想的造模方法,更有利于溃疡性结肠炎的实验研究。

参 考 文 献

[1] Hanan HH,Azza EM,Eman EE,et al. Ameliorative effect of pyrrolidinedithiocar-bamate on acetic acid-induced colitis in rats[J]. European Journal of Pharmacolo-gy,2007;554(1):69-77.

[2] Silvia M,Marketa D,Erika R,et al. Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute,chronic and recovery phase of murine experimental colitis[J]. Cytokine,2006;35(5-6):275-283.

[3] Elena T,Susana SF,Juan RC,et al.Galanin in the trinitroben-zene sulfonic acid rat model of experimental colitis[J]. International Immunopharmacology,2006;6:1 404-1 412.

[4] 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.

[5] Elson CO,Cong Y,Lorenz R, et al. New developments in ex-perimental models of inflammatory bowel disease[J]. Current opinion

(下转第 72 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

养法培养的脂肪细胞数量较大,油红 O 染色鉴定,脂肪细胞形态好,生存时间长。与天花板培养法比较,改良天花板培养法去除了混杂的其他种类细胞,培养结果更加稳定,得到的细胞不仅数量多,且更加纯正;相对于天花板培养法需要将培养瓶充满所需要的培养基量(25cm² 培养瓶需 50ml 培养基),改良天花板培养法只要每孔 2ml 培养基即可(6 孔板需 12ml 培养基),节约了大量培养基,而且培养后可直接在盖玻片进行如染色、免疫组化的操作,更简便直接。与器官培养法比较,改良天花板培养法培养虽然步骤较多,但其培养所得的细胞均一,形态一致,细胞存活率高,而器官培养法培养所得的细胞,除脂肪细胞外,还混杂有前脂肪细胞、内皮细胞等其他细胞。天花板培养法与器官培养法比较,器官培养法的操作虽然简便,无胶原酶消化的步骤,但由于脂肪细胞主要由脂滴构成,密度小于水,脂肪细胞悬浮于培养基表面,这样培养出的细胞仅有少量为脂肪细胞。这 3 种方法比较,器官培养法步骤最少,操作最简便,但培养的细胞数量最少,天花板培养法与改良天花板培养法操作步骤相似,但天花板培养法混杂其他种类细胞,所需培养基较多,且不便于后续操作。因此,我们认为改良天花板培养法是一种行之有效的成熟脂肪细胞体外培养方法。

在本实验中,为了探索最合适的胶原酶Ⅰ消化时间,分别将脂肪组织在相同条件下用胶原酶Ⅰ消化了 1、3.5、7、15h 后再进行培养,结果证实消化 1h 为最适宜消化时间,所得的脂肪细胞长期培养结果最好。随着胶原酶消化时间的增加,从脂肪组织中分离出的细胞数量也有所增长,但能够长期存活的细胞数量却相对减少,当用胶原酶Ⅰ消化 15h 后,分离出的脂肪细胞的数量最多,而培养 24h 后,大部分细胞死亡,分析其为细胞被胶原酶过度作用,造成严重损伤,使细胞粘附能力和散播能力下降所致。

本研究成功建立了一种长期稳定的大鼠成熟脂肪细胞培养方法,获得了形态均一、生长稳定的大鼠成熟脂肪细胞,为进一步研究肥胖症的发病机制、脂肪组织的内分泌功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective[J]. Endocr Rev,2006;27(7):750-761.

[2] 司徒镇强, 吴军正.细胞培养[M]. 第 2 版.西安:世界图书出版社,2005.155-156.

[3] Rodbell M. Metabolism of isolated adipocyte. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis[J]. J Biol Chem,1964;239(2):375-380.

[4] Sugihara H,Yonemitsu N,Miyabara S,et al. Primary cultures of unilocular fat cells:Characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties[J]. Differentiation,1986;31(1):42-49.

[5] Zhang HH,Humar S,Barnett AH,et al. Ceiling culture of mature human adipocytes:use in studies of adipocyte functions[J]. J Endocrinol,2000;164(2):119-128.

[6] Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. Obesity (Silver Spring),2006;14(5):244S-249S.

[7] Calabro P,Yeh ET. Obesity,imflammation,and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ[J]. Subcell Biochem,2007;42(1):63-91.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 68 页)

in gastroenterology,2004;20(4):360-367.

[6] Mirshafiey A,Khodadadi A,Rehm BH,et al. Sodium Alginate as a Novel Therapeutic Option in Experimental Colitis[J]. Scandinavian Journal of Immunology,2005;61(4):316—321.

[7] Seril DN,Liao J,West AB,et al. High-Iron Diet:Foe or Feat in Ulcerative Colitis and Ulcerativecolitis-associated Carcinogenesis [J]. Journal of Clinical Gastroenterology,2006;40(5):391-397.

[8] Hawkins JV,Emmel EL,Feuer JJ,et al. Protease Activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats[J]. Digestive Diseases and Sciences,1997;42(9):1 969-1 980.

[9] 郑 礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J].中国药理学通报,2001;16(2):88-95.

(责任编辑:关蕴良)