

◇技术与方法◇

不同浓度乙醇对 TNBS 诱导小鼠克罗恩病模型的影响

刘智娟¹, 宋莎莎¹, 王佳佳², 方海明¹, 章礼久¹

摘要 建立 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 小鼠克罗恩病 (CD) 模型,通过观察小鼠每日表现、存活率、疾病活动指数 (DAI)、结肠肉眼观和组织学变化及肠道纤维化情况,筛选出造模所需最佳乙醇浓度。各模型组小鼠均不同程度出现 CD 的一般表现。随着乙醇浓度增加,小鼠 DAI 评分、肠道病理及纤维化评分逐渐增高,以 TNBS/50% 乙醇组最为显著,最类似人类 CD 病理改变。50% 为造模所需最佳乙醇浓度,其配比 2.0 mg TNBS 诱导的模型成模率高且小鼠生存率适中,较适宜用作 CD 发病机制研究和靶点的探索。

关键词 乙醇; 2,4,6-三硝基苯磺酸; 小鼠; 克罗恩病; 肠纤维化

中图分类号 R 574.622

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0112-04

克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 是一种主要由免疫反应失调引起的胃肠道慢性肉芽肿性炎症性疾病。目前在我国,其发病率呈逐年升高趋势^[1]。肠道的慢性炎症及损伤可导致肠纤维化乃至肠梗阻等严重并发症的发生。因此,对 CD 肠纤维化发病机制的研究成为热门方向。目前诱导慢性结肠炎动物模型最常用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS) 和乙醇混合液^[2]。尽管 TNBS/乙醇诱导的慢性结肠炎模型已被广泛应用,但各文献所报道的 TNBS 剂量及乙醇浓度不尽相同。目前关于 TNBS 剂量对造模影响方面的研究较多。鉴于此,该研究拟定 2.0 mg TNBS 作为灌肠液,同时设定 20%、40%、50% 3 个乙醇浓度组,着重探讨不同浓度乙醇对实验小鼠造模的影响,以筛选出

造模所需最佳乙醇浓度,建立符合实验要求的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,18~22 g,购于安徽医科大学实验动物中心。

1.2 药物与试剂 TNBS (美国 Sigma 公司),批号: p2297; 无水乙醇 (合肥吉之畅公司),批号: 2C1312302。

1.3 仪器 BM-II 型病理组织包埋机 (安徽电子科学研究所); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); E-CLIPSE 80i 光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.4 动物模型的制备及取材 BALB/c 小鼠随机分为正常组、TNBS/20% 乙醇组、TNBS/40% 乙醇组、TNBS/50% 乙醇组,每组 12 只。小鼠禁食、不禁饮 24 h 后,3% 水合氯醛腹腔注射轻度麻醉。模型组小鼠使用 3.5 F 导管自肛门插入肠道深约 3.5 cm 处,头朝下呈倒立位,将各组造模用灌肠液缓慢注入结肠,停留 30 s 后轻轻拔出导管,小鼠再倒悬 60 s 左右,期间堵住小鼠肛门口,防止药液流出,后放回笼中,待其自然苏醒。正常组以同体积生理盐水灌肠。灌肠 6 周,后正常饲养。所有小鼠于第 7 周处死。分离结肠,沿肠系膜缘剪开肠腔,生理盐水冲洗粪便,取距肛门 3 cm 以上及结肠病变最明显部分,经 10% 甲醛保存。

1.5 疾病模型的评价

1.5.1 一般指标 观察小鼠的大便性状、精神状态、进食饮水、一般活动及死亡情况。

1.5.2 小鼠疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评估 每日观察小鼠体重变化及大便性状,化验大便常规及进行大便潜血实验。根据 Ganta et al^[3] 制定的标准进行 DAI 评估,由体重减失率分数和大便隐血程度分数相加而得,分值在 0~8,体重减失率 (%) = (实验前体重 - 造模后体重) / 实验前体重 × 100%。见表 1。

1.5.3 结肠肉眼观和病理组织学评分 先肉眼观

2014-09-25 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1408085MH178); 安徽省教育厅自然科学基金项目 (编号: KJ2011Z191)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院消化内科,合肥 230601

²安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介: 刘智娟,女,硕士研究生;

方海明,男,博士,副教授,责任作者, E-mail: haimingfang@163.com;

章礼久,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhanglijiu6336@163.com

察结肠黏膜变化。结肠标本经 10% 甲醛固定后,由石蜡包埋切片,行 HE 染色,并根据 Videla et al^[4] 制定的标准进行病理组织学评分。

表 1 小鼠 DAI 评分

体重减失率(%)	大便性状	大便潜血/肉眼血便	计分
0	正常	正常(-/-)	0
1~4	松散	潜血阳性(+/-)	1
5~9	松散	潜血阳性(+/-)	2
10~14	稀便	肉眼血便(++)	3
≥15	稀便	肉眼血便(++)	4

1.5.4 VG 染色观察小鼠肠道纤维化情况 根据 Lawrance et al^[5] 制定的半定量标准来判断: 0: 无明显胶原纤维增生、无明显固有肌层增厚; 1: 胶原纤维稍增多、固有肌层稍增厚; 2: 胶原纤维明显增多、固有肌层明显增厚; 3: 胶原纤维明显增多、组织结构明显改变、固有肌层明显增厚。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 Student's *t* 检验。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 正常组小鼠精神佳,进食饮水量正常,排黄色成形软便。TNBS/20%、40% 乙醇组小鼠灌肠 24 h 后精神状态一般,食欲下降,部分出现解稀水样黏液血便,第 2、3 天最明显,此后有所缓解,但第 3~4 周上述症状又有所加重。TNBS/50% 乙醇组小鼠造模 24 h 后出现精神差、懒动、厌食、消瘦、扎堆、蜷缩,部分小鼠排黏液脓血便。各组小鼠生存率分别为 91.7%、83.3%、83.3%、75.0%。

2.2 小鼠 DAI 评分 正常组小鼠自灌肠第 3 天出现体重轻度下降,1 周后开始恢复,后期基本维持平稳,排黄色软便,大便潜血(-)。TNBS/20%、40% 乙醇组小鼠造模后体重明显下降,后期逐渐稳定,间断解黄褐色稀水样便,大便潜血实验(-~++)。TNBS/50% 乙醇组小鼠自灌肠后第 1 天起出现体重下降,第 3 周达到顶峰,随后的 4~6 周,存活小鼠体重稍有波动,逐渐恢复造模前体重,部分小鼠解黏液脓血便,肛周可见血痂附着,大便潜血实验(+~+++)

DAI 评分结果显示,与正常组比较,各模型组小鼠各时间点 DAI 评分均显著增高,且随着乙醇浓度增加,DAI 评分逐渐增加,以 TNBS/50% 乙醇组最高

($P < 0.01$)。见图 1。

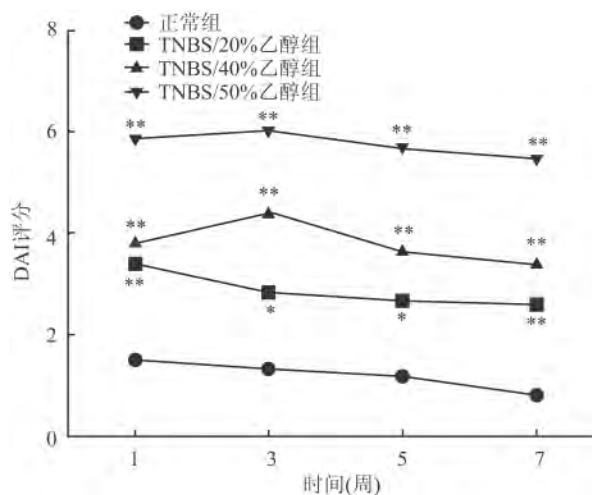


图 1 DAI 评分

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 小鼠结肠大体形态 正常组小鼠结肠形态正常、黏膜光滑; TNBS/20%、40% 乙醇组小鼠结肠稍扭曲、连续性水肿; TNBS/50% 乙醇组小鼠结肠某些节段发红、扭曲、变形、僵硬,部分肠段可见狭窄,肠腔内有多量脓性粘液生成。见图 2。

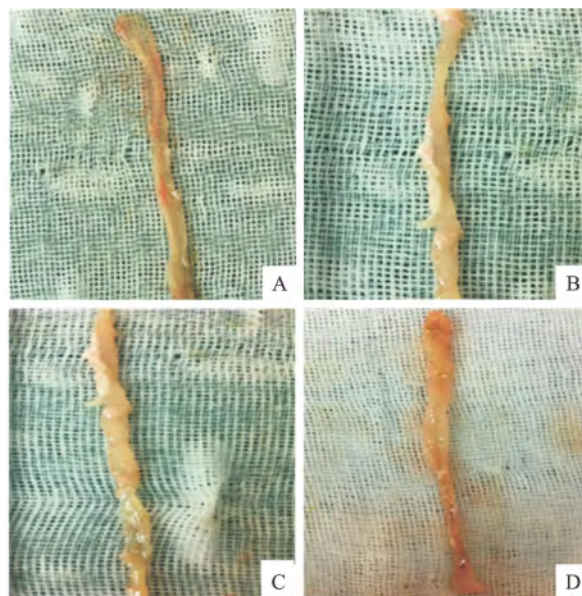


图 2 肠道炎症肉眼观

A: 正常组; B: TNBS/20% 乙醇组; C: TNBS/40% 乙醇组; D: TNBS/50% 乙醇组

2.4 小鼠肠道病理特征及评分 正常组小鼠结肠黏膜上皮完整、结构清晰; TNBS/20%、40% 乙醇组肠黏膜弥漫性充血红肿,黏膜下层有少量淋巴细胞

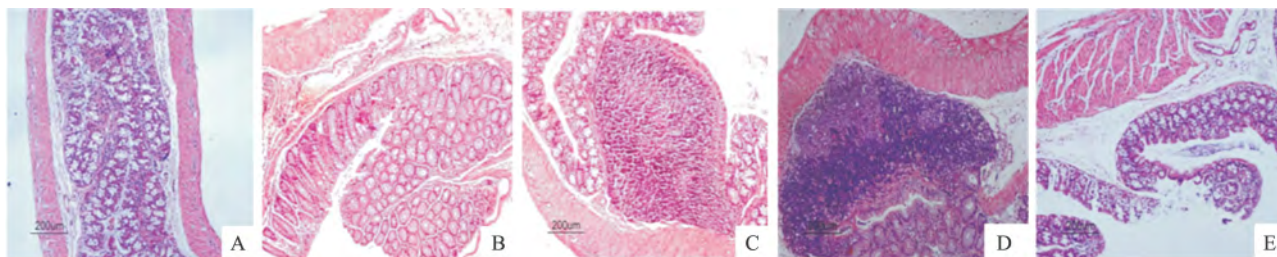


图3 小鼠肠道病理特征 HE × 100

A: 正常组; B: TNBS/20% 乙醇组; C: TNBS/40% 乙醇组; D: TNBS/50% 乙醇组(肌层增厚); E: TNBS/50% 乙醇组(肠上皮细胞脱落、溃疡形成)

浸润,固有层中性粒细胞浸润,部分肠上皮细胞脱落坏死,肌层增厚;TNBS/50% 乙醇组结肠黏膜弥漫性充血、出血,杯状细胞消失,固有层中性粒细胞、淋巴细胞浸润,黏膜层至肌层可见非局限性透壁性坏死,黏膜上皮糜烂、溃疡,部分肠上皮细胞再生,肌层增厚。见图3。病理评分结果显示,与正常组比较,各模型组病理学评分均显著增加,且随着乙醇浓度的增加而增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表2。

表2 病理学评分(分 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	病理评分
正常	11	0.36 ± 0.505
TNBS/20% 乙醇	10	1.40 ± 0.516*
TNBS/40% 乙醇	10	2.00 ± 0.670**
TNBS/50% 乙醇	9	3.22 ± 0.667***▲▲

与正常组比较: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与 TNBS/20% 乙醇组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 TNBS/40% 乙醇组比较: ▲▲ $P < 0.01$

2.5 小鼠肠道纤维化情况 正常组小鼠肠黏膜未见明显胶原蛋白沉积;TNBS/20% 乙醇组肠黏膜下层少量胶原蛋白,固有基层正常厚度;TNBS/40% 乙醇组肠黏膜下层胶原蛋白沉积,固有基层稍增厚;TNBS/50% 乙醇组小鼠近端结肠黏膜下层及浆膜层大量胶原蛋白沉淀,固有基层明显增厚,偶可见纤维分隔形成,见图4。

纤维化评分结果显示,与正常组比较,各模型组纤维化评分均显著增加($P < 0.01$)。且与 TNBS/20% 乙醇组比较,TNBS/50% 乙醇组纤维化评分显著增加($P < 0.01$)。见表3。

表3 肠道纤维化评分(分 $\bar{x} \pm s$)

组别	n	纤维化评分
正常	11	0.09 ± 0.30
TNBS/20% 乙醇	10	1.30 ± 0.48**
TNBS/40% 乙醇	10	1.80 ± 0.79**
TNBS/50% 乙醇	9	2.33 ± 0.71***

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 TNBS/20% 乙醇组比较: ## $P < 0.01$

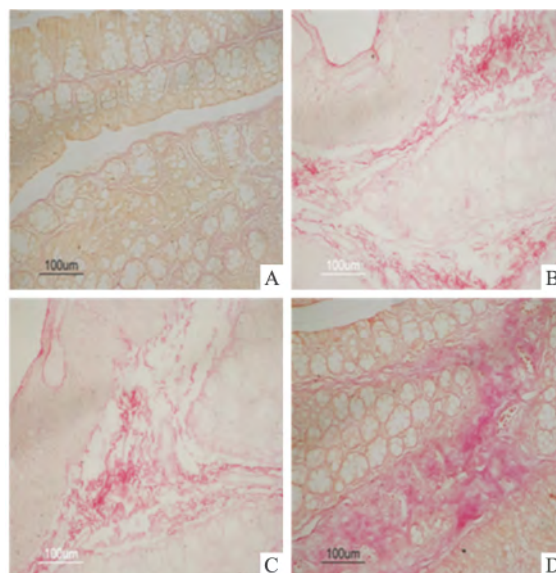


图4 小鼠肠纤维化镜下表现 VG × 200

A: 正常组; B: TNBS/20% 乙醇组; C: TNBS/40% 乙醇组; D: TNBS/50% 乙醇组

3 讨论

CD 的许多研究成果来源于 CD 动物模型研究,因而构建合适的 CD 动物模型对 CD 的进一步研究非常重要。目前建立 CD 动物模型常用的方法有4种:化学诱导法、免疫诱导法、基因诱导法、自发性模型。本研究中,探讨的是免疫诱导法,即使用 TNBS/乙醇混合液灌肠诱导肠道免疫炎症反应。目前普遍认为,TNBS/乙醇诱导小鼠 CD 的发病机制是乙醇作为有机溶剂破坏肠黏膜屏障后,TNBS 作为一种半抗原物质,与结肠组织中大分子组织蛋白结合后成为一种抗原物质,引起机体免疫反应而诱导肠道炎症的发生。

TNBS 诱导的结肠炎模型最早是由 Morris et al^[6]采用大鼠制备。但通过文献调研发现各学者相关研究往往在实验动物的品系、周龄、基因遗传背景、TNBS 给药剂量等方面均有所不同,这将为进一步深入研究慢性结肠炎带来不便。研究^[7]表明,

BALB/c 小鼠是对 TNBS 最为敏感的品系, 2 mg 为 TNBS 最常采用的造模剂量。te Velde et al^[8] 在实验研究中采用 35%、45% 和 50% 浓度乙醇与 TNBS 配成灌肠液诱导 6 周龄 SJL/J 小鼠慢性结肠模型。Terai et al^[9] 用 TNBS 溶于 40% 乙醇作为灌肠剂诱导 C57BL/6J 小鼠结肠炎模型。基于此报道, 此次实验设定 20%、40%、50% 3 个乙醇浓度组配比 2.0 mg TNBS 制成混合灌肠液, 构建 BALB/c 小鼠 CD 肠纤维化模型, 结合小鼠死亡率、DAI 评分及病理改变、纤维化程度等综合评估, 筛选出造模所需最佳乙醇浓度。结果表明, TNBS/20%、40% 乙醇组小鼠镜下观察虽有部分 CD 病理改变, 但 VG 染色提示其黏膜下层少量胶原蛋白沉淀, 未见明显纤维分隔形成, 未能成功制备出模型; TNBS/50% 乙醇组小鼠虽较前两组死亡率(25%) 略高, 但结合其一般表现和 DAI 评分; 结肠大体形态特征—结肠扭曲、变形、僵硬, 部分肠段可见狭窄, 肠腔内有多量脓性黏液生成; 肠道病理改变—黏膜充血, 固有层大量淋巴细胞浸润, 黏膜上皮糜烂、线性溃疡形成; 肠纤维化情况—大量胶原蛋白沉淀, 明显纤维分隔形成, 提示 TNBS/50% 乙醇组小鼠最接近人类 CD 肠纤维化临床病理表现。

参考文献

- [1] Latella G, Sferra R, Vetusch A, et al. Prevention of colonic fibrosis by Boswellia and Scutellaria extracts in rats with colitis induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid [J]. *Eur J Clin Invest*, 2008, 38(6): 410–20.
- [2] Martínez-Moya P, Romero-Calvo I, Requena P, et al. Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(2): 372–80.
- [3] Ganta V C, Cromer W, Mills G L, et al. Angiopoietin-2 in experimental colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2010, 16(6): 1029–39.
- [4] Videla S, Vilaseca J, Medina C, et al. Selective inhibition of phosphodiesterase-4 ameliorates chronic colitis and prevents intestinal fibrosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 316(2): 940–5.
- [5] Lawrance I C, Wu F, Leite A Z, et al. A murine model of chronic inflammation induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF- κ B [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1750–61.
- [6] Morris G P, Beck P L, Herridge M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(3): 795–803.
- [7] Krener B, Mariman R, van Erk M, et al. Temporal colonic gene expression profiling in the recurrent colitis model identifies early and chronic inflammatory processes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e50388.
- [8] te Velde A A, Verstege M I, Hommes D W. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12(10): 995–9.
- [9] Terai T, Osawa S, Tani S, et al. Induction of murine TNBS colitis is strictly controlled by a modified method using continuous inhalation anesthesia with sevoflurane [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(7): 1415–27.

The effect of different concentrations of ethanol on mice Crohn's disease model induced by TNBS

Liu Zhijuan¹, Song Shasha¹, Wang Jiajia², et al

(¹Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Crohn's disease (CD) mice model was induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The daily performance, survival rate, disease activity index (DAI), colon morphologic and histologic changes and intestinal fibrosis degree of mice were observed in order to investigate the optimal ethanol concentration. Mice in model groups all performed general symptoms of CD in different degrees. The grades of mice DAI, histology and intestinal fibrosis increased gradually with the increase of ethanol concentrations, and the TNBS/50% ethanol group was most significant which was most similar to human CD pathological changes. An ethanol concentration of 50% for mice was chosen for an optimal experimental concentration since the group had the highest success rate of modeling when matched with 2.0 mg TNBS and showed appropriate survival rate, which was more suitable for the investigation of pathogenesis and new therapeutic targets of CD.

Key words ethanol; 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid; mice; Crohn's disease; intestinal fibrosis