

实验研究

免疫复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型的探讨

常孟然 林 燕 李文静 赵程博文 王红彬

(北京中医药大学基础医学院, 北京, 100029)

摘要 目的:探讨免疫复合法和化学法建立大鼠溃疡性结肠炎模型的优劣,寻求更接近人类发病机制的溃疡性结肠炎动物模型。方法:将 Wistar 大鼠随机分成正常组、免疫复合组和化学组,免疫复合组前 3 周每周给予抗原乳化液(含异体抗原 8 mg)注射 1 次,共注射 3 次,第 4 周免疫复合组和化学组均用 100 mgTNBS/kg + 50% 乙醇灌肠。分别于造模后第 1 天、第 14 天、第 56 天取材,比较造模后各组大鼠的症状、体征、病理反应等方面的变化。结果:与正常组比较,免疫复合组与化学组在造模后第 1 天均出现稀溏便、溃疡、炎症反应等典型溃疡性结肠炎病变,但免疫复合组黏膜下层炎症反应剧烈,维持时间长达 8 周,化学组溃疡较免疫复合组深,但黏膜下层炎症反应强度不及免疫复合组,溃疡持续时间短,2 周后趋向自愈。结论:免疫复合法模型表现稳定,重复性好,病变持续时间长,发病机制更类似人类溃疡性结肠炎,是较为理想的溃疡性结肠炎模型。

关键词 免疫复合法;化学法;溃疡性结肠炎;大鼠模型

Discussion on Establishment of Experimental Rats Model with Ulcerative Colitis by Immune Complex Method

Chang Mengran, Lin Yan, Li Wenjing, Zhao Chengbowen, Wang Hongbin

(School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To screen an optimal ulcerative colitis animal model more close to the pathogenesis of human body by analysis of the strength and weakness between the immune complex method and the chemical method for establishing an experimental rat model. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into normal group, immune complex group and chemical group. Rats in immune complex group are injected with antigen emulsion (including 8 mg variant antigen) once a week in the first three weeks. In the fourth week, the rats in the immune complex group and those in the chemical group were coloclystered by TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid sol, 100 mg/kg) and 50% alcohol. Colon samples from the three groups were taken at the 1 st, 14th and 56th day respectively and symptom, sign and pathological reaction of the three groups after modeling were compared. **Results:** Compared with the normal group, rats in the immune complex group and chemical group had typical ulcerative colitis symptoms at the 1 st day, like loose stool, ulcer, inflammatory reaction, while the submucosa inflammatory reaction of rats in the immune complex group was stronger than that of the chemical group lasting for eight weeks. The ulcer in the chemical group was more severe than that of the immune complex group, but submucosa inflammatory reaction weaker, with less duration and self-cures two weeks later. **Conclusion:** The immune complex model is the optical ulcerative colitis one, for stable performance, easily repeated, and long duration and the ulcerative colitis pathogenesis in rat model is much more close to that of human body.

Key Words Immune complex method; Chemical method; Ulcerative colitis; Rats model

中图分类号:R574.62;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.041

溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC),又称慢性非特异性结肠炎,是以大肠(结肠与直肠)黏膜与黏膜下炎症反应为主要特征的病变。临床表现以反复发作的腹泻、腹痛、黏液脓血便和里急后重为主。病程呈慢性过程,发作期与缓解期交替,少数症状持续并逐渐加重,迁延难愈。UC 发病机制尚不明确,

目前认为主要与遗传、环境、免疫等因素有关^[1],其中免疫异常被认为是 UC 发病的重要因素^[2-3]。近年来 UC 发病率呈上升的趋势^[4],UC 发病机制与药物疗效的实验研究已成为医学界关注的重点,因此选择何种动物模型对 UC 的实验研究意义重大。实验表明,免疫复合法重复性好,病变更类似人类 UC,

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81202682)——基于线粒体能量代谢探讨溃疡性结肠炎脾虚为本的病理基础

作者简介:常孟然(1986.07—),男,医学硕士,研究方向:主要从事中医理论指导下消化系统疾病研究,E-mail:changmengran@126.com

通信作者:林燕(1977.02—),女,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医理论指导下的消化系统疾病的病理机制与疗效机理研究,E-mail:yanlin77211@163.com

持续时间长,是较理想的造模方法^[5]。本实验通过对免疫复合法与化学法获取的 UC 模型进行比较,试图为免疫损伤致病更能获得类似人类发病机制的 UC 动物模型寻求客观依据。

1 材料

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 66 只,雄性,SPF 级,体重约 120 g,由北京斯贝福实验动物有限公司提供。实验用家兔 9 只,雄性,体重约 2 kg,由北京兴隆动物养殖有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器 三硝基苯磺酸和完全弗氏佐剂(Sigma);BCA 蛋白浓度测定试剂(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);无水乙醇、水合氯醛、4%多聚甲醛溶液(国药集团化学试剂北京有限公司);恒温高速离心机(Eppendorf,型号 5810R);紫外分光光度计(UNICAM,型号 HE10Sα)。

2 方法

2.1 分组与造模 将 Wistar 大鼠随机分成正常组 18 只、免疫复合组 24 只和化学组 24 只。刮取家兔结肠黏膜后组织匀浆,浆液以 12 000 r/min 速度离心 15 min,取上清液与等量完全弗氏佐剂配成抗原乳化液,分别于适应性饲养后第 1 周、第 2 周、第 3 周在大鼠腹股沟皮下注射,每只每次注射 8 mg 抗原蛋白,现配现用。第 4 周,将禁食(不禁水)48 h 的大鼠用 3.5%水合氯醛按 1 mL/100 g 麻醉后,用石蜡油涂于灌胃针外,从大鼠肛门轻柔插入结肠约 5 cm 后,按 100 mgTNBS/kg + 50%乙醇剂量缓慢灌肠,倒置 1 min 后倾倒平躺放置 5 min。化学组前 3 周不注射抗原乳化液,第 4 周操作与免疫复合组相同。

2.2 取材 各组于造模后第 1 天、第 14 天、第 56 天禁食(不禁水)48 h 后麻醉取肛门上端 2 cm 处结肠 5 cm,沿肠系膜纵行切开,展开用生理盐水洗净,4%多聚甲醛溶液固定后编号,常规石蜡包埋行 HE 染色。

2.3 观察指标 1)外观体征;2)解剖开腹后肉眼观察腹腔整体状态、结肠大体形态及结肠黏膜损伤程度;3)光镜下观察病理 HE 染色切片。

2.4 统计学方法 实验数据采用(均值 ± 标准差)表示,用 SPSS 20 软件对数据作统计分析,2 组间正态分布比较采用 T 检验,偏态分布用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 免疫复合组大鼠每次注射抗原乳化液后,活动减少,毛色及光泽度较正常略浅,饮食

减少。免疫复合组和化学组在造模完成后第 1 天,均逐渐出现懒动、食少、大便次数增多、软便或稀便、大便末端有黏液,毛色逐渐变暗、光泽度差,第 3 天最为严重。免疫复合组大便溏表现时长约为 2 周,便质稀软直至第 8 周,活动减少、饮食减少、毛色泽差持续时间约为 8 周;化学组症状持续 2 周后,第 3 周活动饮食及毛色逐渐开始好转。

3.2 形态学表现 根据溃疡、炎性反应及损伤程度,每只大鼠结肠得分为 3 项得分之和,参照 CMDI 评分体系(表 1),各组结果如下(表 2)。

表 1 CMDI 评分标准

病理变化	大体形态观察	评分
溃疡	没有溃疡	0
	溃疡长度 < 3 cm	1
	溃疡长度 > 3 cm	2
炎性反应	没有炎性反应	0
	轻度炎性反应	1
	中度炎性反应	2
	严重炎性反应	3
损害深度	没有损伤	0
	损害至黏膜下层	1
	损害至肌层	2
	损害至浆膜层	3

表 2 各组不同时间 CMDI 评分比较

组别	数量	造模后第 1 天	造模后第 14 天	造模后第 56 天
正常组	6	0	0	0
复合组	8	6.25 ± 0.71 *	3.50 ± 0.53 * ◇	2.75 ± 0.46 *
化学组	8	5.75 ± 0.46	2.75 ± 0.46 ◇	0 [△]

注: * 与化学组比较 $P < 0.01$, ◇ 同组内第 1 天比较 $P < 0.05$, △ 第 56 天形态学表现无溃疡和炎性反应。

3.3 病理表现 光镜下正常组可清楚地观察到细胞形态正常,各层结构完整,上皮排列整齐,结肠腺规则,杯状细胞丰富;黏膜下层、肌层、浆膜层结构清晰,未见炎性细胞浸润。

造模后第 1 天,免疫复合组与化学组均有黏膜腺体坏死脱落,黏膜上皮细胞大片脱落、坏死,溃疡面可见渗出物,大量腺细胞萎缩,黏膜浅层结构消失、坏死;黏膜下层有充血、肿胀;肌层被破坏,部分肌纤维断裂。免疫复合组溃疡病变集中在黏膜肌层外,形成浅溃疡,溃疡边缘肠腺细胞被破坏、排列紊乱,杯状细胞明显减少;黏膜下层有大量炎细胞浸润。化学组形成明显深溃疡,溃疡深达黏膜下层,黏膜下层有炎细胞浸润,血管及淋巴管扩张。炎性反应化学组较免疫复合组轻。

造模后第 14 天,2 组均有不同程度的自愈倾向,免疫复合组黏膜上皮细胞被破坏,黏膜层局部有

缺损,部分腺细胞萎缩,仍为浅溃疡,黏膜层有炎细胞浸润,局部伴有充血,溃疡病灶处淋巴细胞聚集;黏膜下层仍有出血、肿胀,炎细胞聚集,程度较前为轻,静脉充血严重,淋巴管扩张,淋巴滤泡增多;有肉芽组织形成。化学组黏膜上皮脱落,腺细胞排列紊乱,萎缩细胞减少,纤维结缔组织和血管增生明显,黏膜下层轻度充血,有少量炎性细胞浸润。

造模后第 56 天,免疫复合组未完全自愈,黏膜层上皮细胞缺损、腺细胞缺失,腺细胞增生、扩张,形成绒毛上皮,黏膜肌层仍有损伤;黏膜下层有炎细胞聚集,肿胀,血管壁充血、扩张,淋巴管扩张,淋巴滤泡增多;黏膜肌层增厚。化学组结肠组织结构与正常无明显差异。

附 2 种造模法光镜下的病理照片,如图 1。

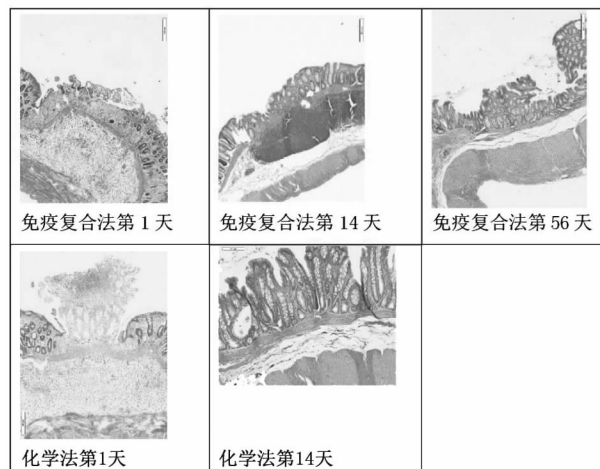


图 1 2 种造模法光镜下的病理照片

注:以上均为光镜下 100 倍图片。

4 讨论

UC 病变部位主要限于结肠黏膜与黏膜下层,以溃疡与炎细胞浸润为主,故对模型成功与否应以此病理特征为判断依据。本实验设计造模后于第 1、14、56 天 3 个时间段取材,以观察大鼠不同病程阶段的结肠病理变化。上述结果表明:在 UC 急性期化学法模型病变程度明显重于免疫复合法模型,病变累及范围较免疫复合法模型局限,仅累及黏膜层,化学法模型病变持续时间短,近 14 d 可自愈;免疫复合法模型病变范围广而深,由黏膜层到黏膜下层,可累及全结肠甚至回肠末段,病变持续时间长,可维持 8 周以上,仍可见结肠壁增厚及炎性反应,急、慢性期的病理特征明显。因此,免疫复合法造模病变持续时间长,溃疡形成与炎性反应均有体现,完整地诠释了 UC 急慢性不同时期的病理变化,更符合临床 UC 的病理要求。UC 属自身免疫性疾病,其发病

机制虽尚不明确,但目前认为其可能机制是在肠腔内抗原诱导下遗传易感患者免疫反应过度激活引起的^[6]。因此,本实验先利用家兔结肠黏膜蛋白异体抗原刺激,使实验大鼠肠道菌群失调,肠腔内致病菌和条件致病菌增多,且肠黏膜通透性增加,导致肠腔内细菌及/或细菌产物向黏膜固有层移位,引起免疫细胞的激活及炎性反应^[7],再用化学诱导, TNBS 是一种半抗原物质,乙醇作为有机溶剂溶解肠黏膜表面的黏液,破坏肠黏膜屏障,使 TNBS 与肠组织大分子组织蛋白结合后成为完全抗原,导致针对肠黏膜的免疫反应,从而诱导 UC 的发生^[8]。这种复合造模方法的原理与 UC 的发病机制是基本相符的。

其他的造模方法主要有免疫法^[9]、复合法^[10-11]、化学物质诱导法^[12]、基因修饰模型和自发性动物模型^[6]。化学刺激法操作简单,成功率高,与临床上 UC 的致病因素差异大,且模型自愈性极强,慢性期表现不如免疫复合法,与临床 UC 病程表现不太一致。现普遍运用免疫复合法建立并获取稳定 UC 模型,目前公认 TNBS 剂量在 100 mg/kg 时模型最为稳定^[13],对乙醇浓度有文献报道 50% 为最佳,故 TNBS 灌肠剂量为 100 mg/kg + 50% 乙醇。免疫法蛋白抗原剂量通常为 8 mg。本实验又在以下几个方面做了改进:1)其他免疫法造模实验中,多间隔 2 周给予兔肠黏膜制备的抗原乳化液(含抗原 8 mg)共免疫 2 次^[14]。本实验每隔 1 周注射一次抗原乳化液,共注射 3 次,抗原刺激频次加大,更加突显免疫损伤的致病作用。2)通常实验取家兔结肠黏膜制成组织匀浆为 4 ℃ 离心,速度 3500 r/min,离心时间 30 min,而本实验 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,充分离心使抗原蛋白更细小,易被吸收并引发免疫反应。3)本实验灌肠时未使用传统的硅胶管,而用灌胃针代替,灌胃针可重复使用,口径又较硅胶管小,同时质地较硬,经石蜡润滑后容易插入肛门;与注射器连接紧密,灌肠过程中溢流量小,方便灌肠操作^[15],又可以减少人为机械损伤。

因此,本实验注重免疫损伤对 UC 发病及病理的影响,在以往实验的基础上稍加技术改进,从而获取了持续而稳定的、更符合人类 UC 发病机制的理想动物模型。

参考文献

- [1] 徐阳,李伟光,刘海峰,等.三硝基苯磺酸诱导小鼠溃疡性结肠炎模型制备的技术改良[J].世界华人消化杂志,2012,20(2):106-112.
- [2] 陈治水,陈宁.溃疡性结肠炎中西医结合研究新进展[J].中国中西医结合杂志,2012,32(4):437-442.

(下接第 2093 页)

merich 在一项双盲、安慰剂对照、多中心的临床研究中,评估了百里香药草和樱草根提取物对急性支气管炎伴有咳嗽患者的疗效,结果发现该提取物安全有效^[9]。因此,从包括中草药在内的天然植物药中寻找有效的抗病毒药物,无疑是一条行之有效的途径^[6,10]。

本研究结果可以看出,外感清热解毒方在体外能够有效地抑制 H1N1、AV1 和 RSV1。该方对 H1N1 的治疗指数为 2.07,表明其具有低毒有效的特点。预防给药的研究发现在 0.01 mg/mL 时红细胞凝集实验为阴性,提示该方可能是通过事先细胞的功能来抵御外邪,从而阻断了病毒的复制。治疗给药的研究发现在 0.01 mg/mL 时红细胞凝集实验为阴性,表明药物对病毒有治疗作用。直接杀伤实验该方能够降低病毒滴度 1 个梯度。在 0.005 mg/mL 时抗 AV1 红细胞凝集实验为阴性,表明该方能够抑制 AV1。镜下观察 CPE 表明 0.01 mg/mL 以上浓度的中药能够抑制 RSV1。

中医学认识中病毒性呼吸道感染并无特定病名,根据其发病过程、临床表现应属于“外感热病”范畴,国内临床医师及研究人员多根据中医理论,采用防治“热病”的理法方药应对新发突发呼吸道传染病,取得了较好的效果^[5,6]。由于中药含有的活性成分十分复杂,杀灭病毒具有多种机制和多个靶点的特性,在杀灭病毒的同时,还具有免疫调节的作用,从而改善患者的免疫功能^[2,10]。本次研究结果说明,外感清热解毒方在体外抗呼吸道病毒方面,具有较好的疗效,为更深一步的体内实验和临床治疗

提供了参考,值得开展更广阔的研究。

参考文献

- [1] 孙婷婷,陈兰羽,吕文良,等. 800 例外感发热患者中医证候分布及与节气关系[J]. 中国中医急症,2014,23(9):1622-1623,1641.
- [2] 杨巨成,张海文. 清热解毒存阴法治疗外感发热的临床观察[J]. 中国民间疗法,2014,22(7):31-32.
- [3] Rewar S, Mirdha D, Rewar P. Treatment and Prevention of Pandemic H1N1 Influenza[J]. Ann glob Health,2015,81(5):645-653.
- [4] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002.
- [5] 孙飞,陈晓春,张立国,等. 中药抗流感 2 号治疗甲型流感样发热聚集性病例的临床观察[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(10):1068-1071.
- [6] 成扬,麦静怡,薛建华,等. 外感清热解毒方治疗急性上呼吸道感染发热临床评价[J]. 上海中医药大学学报,2016,30(4):22-25.
- [7] Glatthaar-Saalmüller B, Rauchhaus U, Rode S, et al. Antiviral activity in vitro of two preparations of the herbal medicinal product Sinupret® against viruses causing respiratory infections[J]. Phytomedicine, 2011,19(1):1-7.
- [8] Sharma M, Anderson SA, Schoop R, et al. Induction of multiple pro-inflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized Echinacea, a potent antiviral herbal extract[J]. Antiviral Res, 2009,83(2):165-170.
- [9] Kemmerich B. Evaluation of efficacy and tolerability of a fixed combination of dry extracts of thyme herb and primrose root in adults suffering from acute bronchitis with productive cough. A prospective, double-blind, placebo-controlled multicentre clinical trial[J]. Arzneimittelforschung,2007,57(9):607-615.
- [10] 王镠,董竞成. 中医药防治呼吸道病毒感染研究综述[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(5):633-636.

(2016-04-08 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 2088 页)

- [3] 周婷婷,全巧云. 溃疡性结肠炎发病机制的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2012,21(12):1163-1166.
- [4] 惠毅,闫曙光,李京涛,等. 大鼠慢性溃疡性结肠炎模型建立方法探讨[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(10):62-65.
- [5] 解春静,庄彦华,栾雨龙. 溃疡性结肠炎发病机制中免疫因素的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(8):889-892.
- [6] 罗凤燕,白爱平. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(7):607-613.
- [7] Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? [J]. World J Gastroenterol, 2011,17(5):557-566.
- [8] 范玉晶,裴风华,刘冰熔. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2013,2(6):311-313.
- [9] 毛颖,王秀珍,张喆,等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展[J]. 中

医药信息,2013,30(4):126-130.

- [10] 侯丽娟,唐方,王晓红,等. 溃疡性结肠炎模型的建立及影响因素[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(31):3242-3245.
- [11] 曹秀红,张学彦,张晓娜. 白介素在溃疡性结肠炎发病机制中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(30):3143-3148.
- [12] 王艳红,葛斌,陈佳佳,等. 溃疡性结肠炎动物模型的研究进展[J]. 中国药房,2011,22(25):2379-2382.
- [13] 徐阳,唐艳萍. 溃疡性结肠炎中西医动物模型研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志,2013,19(4):469-472.
- [14] 段征,汪维伟,姜蓉. 两种溃疡性结肠炎大鼠模型的比较[J]. 重庆医科大学学报,2008,33(1):66-68,72.
- [15] 张涛,谢建群. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2006,14(4):240-242.

(2015-12-22 收稿 责任编辑:张文婷)