

不同浓度葡聚糖硫酸钠对小鼠炎症性肠病模型建立及其致病相关免疫因子表达的影响

李欣¹, 武文卿^{2Δ}, 张卓越¹, 俎占飞¹, 毛旭燕¹, 朱恒^{3*}, 宁守斌^{1*}

1. 中国人民解放军空军总医院消化科, 北京 100142; 2. 军事医学科学院科技部, 北京 100850;
3. 军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

【摘要】 目的 探讨饮用不同浓度的葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)对于建立小鼠炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)模型及其致病相关免疫因子表达的影响。**方法** 雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组和不同浓度的DSS饮用组(3%、5%、7%)。观察小鼠的大便性状、体重和生存时间。饮用后的第6天处死各组小鼠,观察结肠大体形态并评分;取病变处进行石蜡包埋病理切片,苏木素伊红染色并进行病理组织学评分;定量PCR检测各组脾细胞免疫因子表达情况。**结果** 饮用3%、5%、7%浓度DSS的小鼠在第6天均有不同程度溃疡形成,成模率随着DSS浓度提升而增加,但是小鼠死亡率也相应增加。定量PCR结果表明促炎因子(TNF- α 、IFN- γ 和IL-17A)的表达水平与DSS浓度成正相关,而抑炎因子(IL-4和IL-10)以及调节性T细胞相关的转录因子Foxp3的表达水平与DSS浓度成负相关关系。**结论** 给予小鼠5%浓度的DSS溶液饮用有助于高效经济地建立小鼠IBD模型,为进一步研究IBD的发病机理、生物学特性、干预因素等打下了重要基础。

【关键词】 葡聚糖硫酸钠;炎症性肠病;小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0336-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.002

Influence of different concentrations of dextran sulfate sodium on the establishment of inflammatory bowel disease model and the expression of colitis-associated immune factors in mice

LI Xin¹, WU Wen-qing², ZHANG Zhuo-chao¹, ZU Zhan-fei¹, MAO Xu-yan¹, ZHU Heng³, NING Shou-bin¹

(1. Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China;
2. Ministry of Science and Technology, 3. Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate how different concentrations of dextran sulfate sodium (DSS) influence the establishment of mouse model of inflammatory bowel disease (IBD) and the effect of DSS on the expression of colitis-associated immune factors. **Methods** The DSS solution in different concentrations (3%, 5%, 7%) were given to male C57BL/6J mice to generate mouse inflammatory bowel disease model. The IBD mice were observed by defecation characteristics, body weight, and survival time. The animals were sacrificed at 6 days after the start of DSS drinking. The general appearance of colons was observed and scored. Moreover, the pathological changes of the colon were examined and analyzed by routine histology. The expression of immune factors in the spleen was detected by real-time PCR. **Results** The mice in the 3%, 5%, 7% DSS groups developed murine colitis. In addition, the incidence of IBD

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81371945, 81101342),北京市自然科学基金项目(7132133)。

【作者简介】 李欣(1988年-),女,硕士,研究方向:炎症性肠病。E-mail: yidalixin@163.com。Δ与第一作者贡献相同。

【通讯作者】 宁守斌,博士,主任医师,从事消化系统疾病的研究,ning-shoubin@163.com;朱恒,博士,副研究员,主要从事干细胞与再生医学研究,E-mail: zhudingdingabc@163.com。

and mouse mortality rate was directly proportional to the increase of DSS concentration. Furthermore, the higher concentration of DSS induced the expression of proinflammatory factors including TNF- α , IFN- γ and IL-17A, but cause a decrease of anti-inflammatory factors such as IL-4, IL-10 and Treg-related transcription factor Foxp3. **Conclusions** Our data suggest that giving 5% DSS solution to C57BL/6J mouse is appropriate to efficiently establish a murine IBD model. This laid an important foundation for further studies of the pathogenesis of IBD, biological characteristics, and intervention factors.

【Key words】 Dextran sulfate sodium; Inflammatory bowel disease; Murine model

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一组发病原因尚不明确的慢性非特异性的炎症性疾病,主要包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC),其发生发展与遗传易感性、外部环境、感染介质、肠道共生菌及免疫系统的功能障碍等多因素相互作用有关^[1],主要临床症状为腹痛、腹泻、粘液脓血便、体重减轻,长期发展亦有癌变的风险^[2],因此 IBD 相关研究日益受到重视。采用动物模型开展研究具有受伦理学限制少,便于取材等优势。目前常用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 溶于水中给予小鼠饮用建立 IBD 模型,其病理改变与人临床病理改变接近^[3]。但是,不同研究小组建立 DSS 诱导的 IBD 模型的方法并不统一,所用小鼠周龄 (4 ~ 16 周)、小鼠品系 (KM、BALB/c、C57BL/6 和 C57BL/10 等)、DSS 浓度 (2% ~ 10%) 和自由饮水时间 (5 ~ 10 d) 等多个因素均不相同,成模率也高低不等,这些不利于利用动物模型开展炎症性肠病的研究。

我们在大量调研文献的基础上,通过采用不同浓度的 DSS 溶液自由饮用以建立炎症性肠病 C57 小鼠模型,系统探讨 DSS 浓度对 IBD 成模率和动物死亡率及致病相关免疫因子表达的影响,以期筛选出成模稳定、可操作性好、成模率高的模型,从而为 IBD 的治疗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 64 只,19 ~ 21 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK: (京) 2012-0001],动物实验场所号为 SYXK-军 2012-0065。喂养前适应性喂养 3 ~ 5 d。DSS 购自默克公司,相对分子质量为 $36 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ 白色粉末状固体,DSS 与去离子水分别配置浓度为 3%、5%、7% 的 DSS 水溶液。

1.2 动物分组

对照组 ($n = 16$): 自由饮水组; 实验-1 组 ($n =$

16); 3% -DSS 溶液组; 实验-2 组 ($n = 16$): 5% DSS 溶液; 实验-3 组 ($n = 16$): 7% DSS 溶液组。

1.3 DSS 诱导小鼠 IBD 模型制备

小鼠自由饮用 3%、5%、7% DSS 溶液,建立 IBD 模型,新鲜的 DSS 溶液每隔 1 d 更换 1 次,正常对照组小鼠饮用去离子水。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 一般指标

观察小鼠大便性状、体重改变和生存情况。

1.4.2 小鼠结肠组织大体观察及评分

DSS 诱导的 IBD 小鼠模型其结肠大体病理改变主要为结肠缩短和水肿,Egger 等研究发现 IBD 小鼠结肠的长度变化可以用来评价炎症严重程度。模型建立的第 6 天处死小鼠,取出结肠部分,观察结肠的大体形态,测量肛门至盲肠末端的长度。病理评分按照 Morris^[4] 的评分标准进行: 0 分: 基本正常; 1 分局部充血,未见溃疡; 2 分无充血,有溃疡; 3 分: 溃疡和炎症仅有 1 处; 4 分: 有两处以上的溃疡和炎症; 5 分: 溃疡长度大于 2 cm; 6 ~ 10 分: 大于 2 cm 的溃疡,每增加 1 cm 多计 1 分。

1.4.3 小鼠结肠组织学观察及评分

随机取含病变肠组织并去除肠内容物,以 4% 中性甲醛固定,石蜡包埋切片,行苏木素伊红 (HE) 染色。组织学评分按照 Scheiffele 等^[5] 的评分标准进行: 0 分: 无显著炎症; 1 分: 仅见少量淋巴细胞浸润 (高倍视野, $\leq 10\%$), 其无肠壁结构改变; 2 分: 中等数量的淋巴细胞浸润 (高倍视野, $10\% \sim 25\%$), 肠壁增厚,肠隐窝变长,但无透过黏膜层的溃疡; 3 分: 显著的淋巴细胞浸润 (高倍视野, $25\% \sim 50\%$), 肠壁增厚,血管密度增加; 4 分: 肠壁内可见大量的淋巴细胞浸润全层 (高倍视野, $\geq 50\%$), 肠隐窝变长并扭曲,有溃疡形成,肠壁全层增厚,血管密度增加。

1.4.4 小鼠脾细胞炎症因子的表达检测

建模后 6 d 处死小鼠,解剖取脾,收集脾细胞,Trizol 提取 RNA,逆转录成 cDNA,逆转录体系按照试剂盒说明配置,RT-PCR 检测促炎因子

(TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17A), 抑炎因子 (IL-4 和 IL-10) 以及调节性 T 细胞相关的转录因子 Foxp3 的表达水平。

1.5 统计学方法

数据结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 各组间的差异比较用 t 检验 (方差齐) 或者 t' 检验 (方差不齐) 分析, $P < 0.05$ 为有差异, $P < 0.01$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 各组小鼠饮水状况 (见表 1)

表 1 各组小鼠饮水量 ($n = 16$)

Tab.1 The drinking amount of the mice in each group

组别 Groups	饮水量/mL Drinking amount
对照组 Control group	850
3% DSS 组 3% DSS group	700
5% DSS 组 5% DSS group	550
7% DSS 组 7% DSS group	520

2.2 小鼠一般状况

对照组小鼠精神活跃, 大便性状正常, 毛发光泽好且顺滑。

3% DSS 组小鼠造模后精神稍差, 多为半稀便, 少许粘肛, 可见轻微的肉眼血便。

5% DSS 组小鼠造模后精神差、懒惰, 肉眼血便, 饮食减少, 部分小鼠出现竖毛、弓背现象。

7% DSS 组小鼠造模后精神倦怠, 懒惰, 拱背, 扎堆, 毛发无光泽、竖毛现象, 可见明显肉眼纯稀血便。

2.3 小鼠体重变化

各组小鼠自由饮用不同浓度的 DSS 溶液后体

表 2 炎症性肠病小鼠结肠评分 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

Tab.2 The scores of IBD colons

组别 Groups	大体评分 General scores	病理评分 Pathologic scores	成模率/% Modeling success rate
对照组 Control Group	0.0	0.0	0
3% DSS 组 3% DSS Group	3.54 $\pm$ 0.07	2.53 $\pm$ 0.38	100
5% DSS 组 5% DSS Group	4.46 $\pm$ 0.09	3.61 $\pm$ 0.08	100
7% DSS 组 7% DSS Group	6.73 $\pm$ 0.21	4.64 $\pm$ 0.06	100

2.5 组织病理学观察

组织病理学的 HE 染色结果 (如图 3) 示, 对照组小鼠肠黏膜层、肌层和肠腺体结构清晰, 组织结构完整; 3% DSS 组小鼠肠壁增厚, 有炎症细胞浸润, 黏膜层和肌层结构不清, 肠腺体结构消失; 5% DSS

重变化 (见图 1)。

对照组小鼠体重持续增加, 实验组小鼠 DSS (3%、5%、7%) 组前 3 d 体重均缓慢增加, 4 d 体重迅速下降, 且随着 DSS 浓度的增加小鼠体重下降幅度越大。第 6 天时, 3% DSS、5% DSS、7% DSS 饮用组的小鼠体重降低百分率分别为 16.26%、17.95%、20.62%。

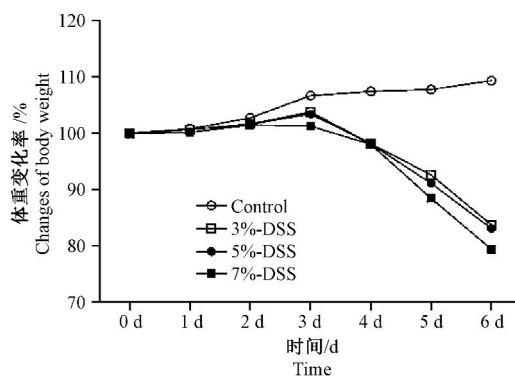


图 1 各组小鼠体重改变

Fig.1 Changes of body weight of the mice in each group

2.4 结肠大体病理学观察

各组小鼠结肠肉眼大体形态观见 (图 2) 实验组与对照组相比结肠明显缩短。进一步观察可见, 对照组小鼠结肠肠壁较薄, 颜色红润, 褶皱清晰; 3% DSS 组小鼠肠壁水肿, 褶皱变浅, 轻微充血; 5% DSS 组小鼠肠腔充血水肿, 可见溃疡, 伴有少量坏死; 7% DSS 组小鼠肠腔可见明显溃疡, 伴有大面积坏死, 局部肠壁增厚, 肠腔狭窄。

大体形态学和组织学评分结果如 (表 2) 所示, 可见随着饮用的 DSS 溶液浓度的提升, 小鼠结肠的大体病理损害逐渐加重。

组小鼠肠壁水肿增厚更加明显, 大量炎性细胞浸润; 7% DSS 组小鼠除了具有前述表现外, 可见肠黏膜坏死脱落, 炎性细胞浸润至全层。

2.6 IBD 发病相关免疫因子的表达情况

如图 4 所示, 定量 PCR 结果表明促炎因子

(TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17A) 的表达水平与 DSS 浓度成正相关,而抑炎因子(IL-4 和 IL-10)以及调节性 T

细胞相关的转录因子 Foxp3 的表达水平与 DSS 浓度成负相关关系。

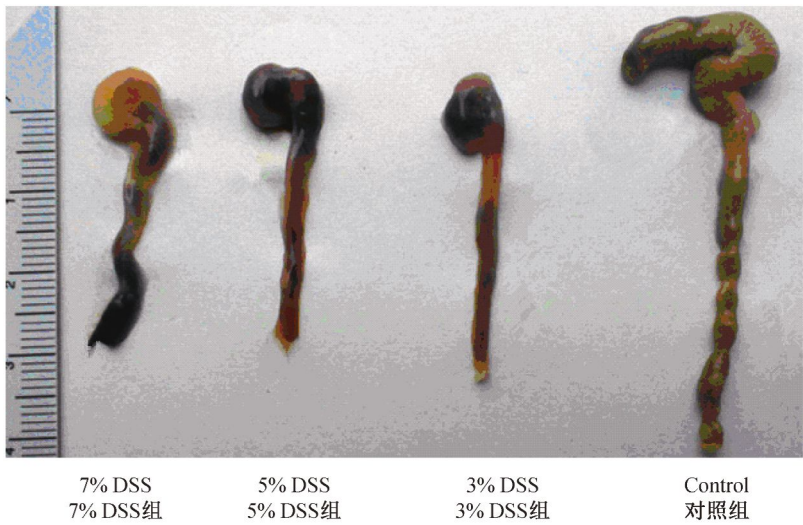


图 2 各组小鼠结肠大体形态观

Fig.2 Gross appearance of the colon in the mice

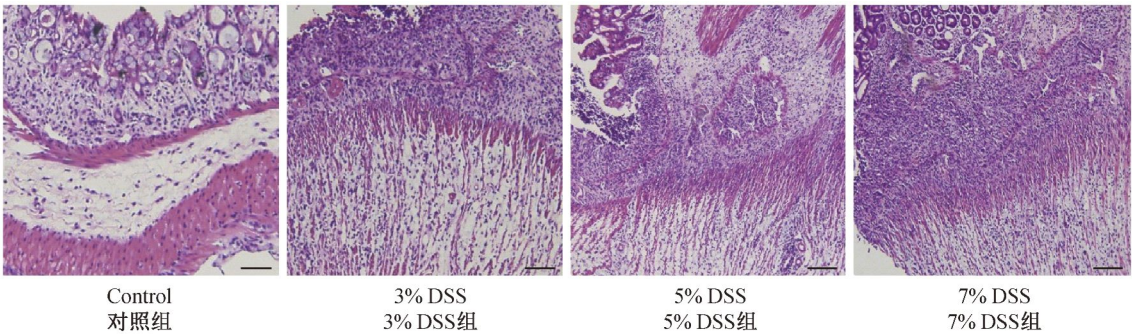


图 3 各组小鼠组织病理分析

Fig.3 Histological analysis of the colon in the mice of each groupe. Bar = 100 μ m

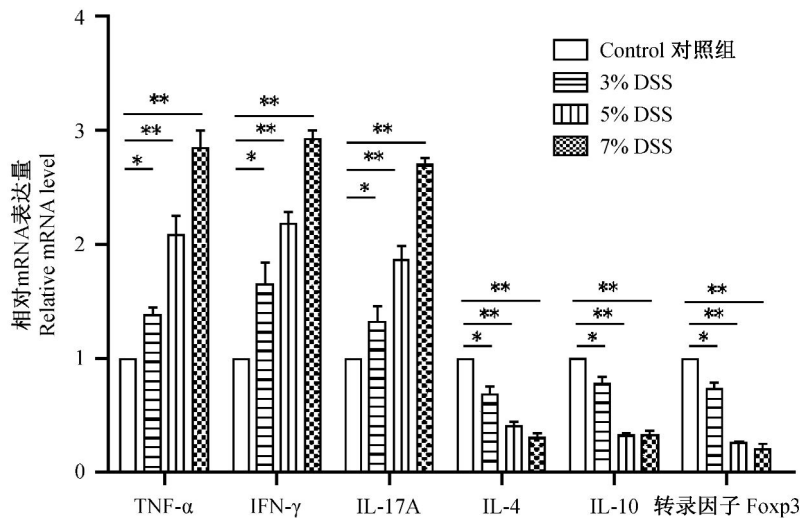


图 4 各组免疫分子 mRNA 相对表达量(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

Fig.4 The relative mRNA levels of immune factors in the mice of each group (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

2.7 各组小鼠生存率

建模第 6 天时, 饮用不同浓度 DSS 的小鼠的病理表现均表现为典型的炎性肠病损害。但是, 各组小鼠的死亡率出现差异, 分别为: 3% 组为 18.2%, 5% 组为 33.3%, 7% 组为 50%, 以 7% 组的死亡率分别和 3% 组以及 5% 组进行比较, 发现这种差别具有统计学意义 (图 5) ($P < 0.05$)。

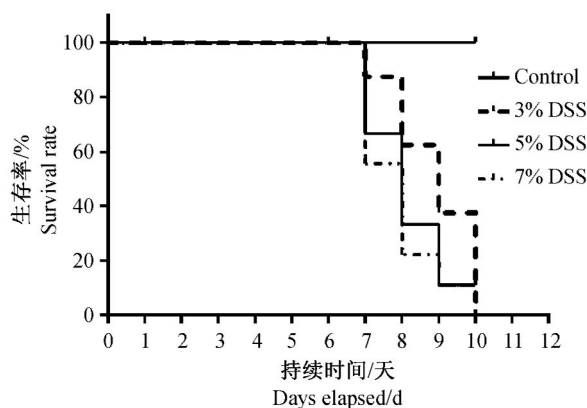


图 5 各组小鼠存活百分率

Fig. 5 Survival curves of the mice in each group

3 讨论

IBD 的发病机制至今尚无定论, 现认为可能与环境、遗传、微生物感染及免疫等多种因素有关, 其中, 免疫因素在溃疡性结肠炎发病机制中尤为重要^[6]。目前常用的模拟人类 IBD 的动物模型采用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导制备, DSS 是一种硫酸多聚糖, 由蔗糖合成而来, 其具有和肝素相似的抗凝血作用。DSS 诱导结肠炎发生的具体机制不详, 可能和其导致肠道菌群失调、DSS 对结肠上皮的毒性作用以及巨噬细胞功能失调有关, 也可能与 DSS 促进炎症细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-17A 等的表达及与嗜酸性细胞脱颗粒有关^[7]。DSS 诱导炎症性肠病模型简单易行, 成功率高, 重复性好, 其症状、结肠肉眼病变和组织学改变均与人类 IBD 相似, 且可人为地反复以 DSS 刺激, 产生与人类 IBD 急性期和缓解期相似的病理改变^[8], 是研究 IBD 发病机制和药物疗效比较合适的动物模型。

多项研究结果显示, DSS-IBD 模型的建立主要受动物种系、DSS 浓度、DSS 相对分子质量、DSS 暴露时间等因素的影响^[9]。其中 DSS 浓度对模型的成功建立起着决定性的作用。本实验开展 C57BL/6 小鼠自由饮用去离子水、3%、5%、7% 相对分子质量为 36 000 ~ 50 000 DSS 溶液造模实验, 主要目的是

探索最佳造模浓度和时间及探讨不同浓度的 DSS 对小鼠炎症因子表达的影响。通过开展本研究, 我们筛选出了既能获得典型病理改变, 又不牺牲过多实验动物的合理 DSS 给药浓度, 具有良好的经济效益和动物伦理学价值。

在 IBD 的发生和发展过程中炎症细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调起着重要的作用, 测定细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-17A、IL-4、IL-10 以及调节性 T 细胞相关的转录因子 Foxp3 的表达水平的水平可反映 IBD 的病情变化, 同时也便于开展深入的发病机制研究。以往研究表明, TNF- α 、IFN- γ 和 IL-17A 具有广泛的生物学活性, 在 IBD 中起到促进炎症发生的作用^[10]。TNF- α 主要由活化的巨噬细胞和单核细胞分泌, 在调节炎症反应过程中发挥重要作用。TNF- α 可诱导趋化因子, 促使中性粒细胞迁移到肠道的炎症区域, 也可以释放血小板活化因子, 促进一氧化氮、白三烯释放, 并促进内皮细胞表达粘附分子, 诱导血栓生成, 引发肠黏膜血液循环障碍, 进而导致肠道的黏膜组织广泛性损伤^[11]。IFN- γ 是由 NK 细胞和 T 细胞产生的一种同二聚体糖蛋白, 具有较强的免疫调节活性, 能够强有力的激活中性粒细胞和巨噬细胞, 从而引起肠道炎症反应^[12]。Th17 细胞亚群分泌的 IL-17A 可增加细胞渗透性, 促进多种趋化因子和炎症因子释放, 与其他炎症因子一起发挥协同作用, 放大其在 IBD 的致炎作用。而 IL-4、IL-10 以及 Treg 细胞起到抑制 IBD 发生的作用。Treg 细胞有预防和减轻各种炎症反应的作用, 在介导免疫耐受中发挥重要作用^[13]。IL-10 又名细胞因子合成抑制因子, 主要免疫调节作用是抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、T 细胞发挥有效功能。IL-10 是一种重要的细胞因子合成抑制因子在黏膜免疫中可抑制激活的单核细胞、巨噬细胞、T 细胞、粒细胞发挥功能从而起到稳定肠道内环境的作用^[14,15]。IL-4 则可通过抑制 Th1 细胞的增殖功能进而抑制肠道炎症的发生^[16]。在本研究中, 不同浓度的 DSS 溶液诱导的 IBD 模型小鼠, 各组炎症因子表达存在明显的剂量相关性, 随着 DSS 浓度的增加, 促炎症细胞因子表达增加而抗炎细胞因子的表达降低。本实验的结果也为探索 IBD 中免疫因子的作用提供了宝贵线索。

综上所述, 本研究经济高效地建立了 DSS 诱导的小鼠 IBD 模型, 探讨了 DSS 浓度与 IBD 致病相关免疫因子的相关性, 相关研究结果为开展 IBD 发病

机制研究以及寻找有效的 IBD 治疗策略提供了有力工具。

参 考 文 献

- [1] Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD [J]. *Gastroenterology*, 2010, 45: 571 – 583.
- [2] 孟松, 吴文溪. 炎症性肠病的免疫治疗进展 [J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(9): 972 – 976.
- [3] 张忠, 程富胜, 贾宁, 等. 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(6): 69 – 72.
- [4] Morris G P, Beck PL, Herridge M S, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology*. 1989, 96: 795 – 803
- [5] Scheiffele F, Fuss IJ. Induction of TNBS colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2001,
- [6] 洪南, 湛先保. 肠道微生态系统和肠黏膜免疫关系研究进展 [J]. *医学研究生学报* 2014. 27(4): 444 – 446.
- [7] Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(1): 256 – 270.
- [8] Oh SY, Cho KA, Kang JL, et al. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33: 333 – 340.
- [9] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*. 1993, 69(2): 238 – 249
- [10] Abdel Salam AG, Ata HM, Salman TM, et al. Potential therapeutic utility of mesenchymal stem cells in inflammatory bowel disease in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 22: 515 – 521.
- [11] 张晓文, 蒋文瑜, 于鹏丽, 等. Th17 细胞及其相关因子在活动性溃疡性结肠炎患者中的表达及意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(1): 19 – 26
- [12] 杨旭, 沈洪, 陆珮琳. Th17/Treg 及其相关细胞因子失衡与溃疡性结肠炎 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(10): 93 – 95
- [13] East L, Isacke CM. The mannose receptor family [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 157(2–3): 364 – 386.
- [14] Bamba S, Lee CY, Brittan M, et al. Bone marrow transplantation ameliorates pathology in interleukin-10 knockout colitic mice [J]. *J Pathol* 2006, 209: 265 – 273.
- [15] Kim HS, Shin TH, Lee BC, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 to COX2 [J]. *Gastroenterology*. 2013, 145(6): 1392 – 1403.
- [16] Fischbeck A, Leucht K, Frey-Wagner I, et al. Sphingomyelin induces cathepsin D-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells and increases inflammation in DSS colitis [J]. *Gut* 2011, 60: 55 – 65.