

· 基础研究 ·

溃疡性结肠炎湿热证动物模型的建立与评价

张泽丹¹ 王凤云² 张佳琪² 许琳¹ 马金鑫^{2,3} 唐旭东⁴

摘要 目的 建立并评价病证结合溃疡性结肠炎(UC)湿热证小鼠模型。**方法** 84只c57bl/6j雄性小鼠,随机分为正常组、疾病模型组、双因素造模组、多因素造模组,每组21只。正常组采用普通饲料喂养,自由饮水;疾病模型组采用3%葡聚糖硫酸钠溶液(DSS)自由饮用7天,普通饲料喂养;双因素造模组在疾病模型组基础上叠加14天高脂饲料喂养;多因素造模组在双因素造模组基础上叠加每日8h的气候箱放置,共14天。在造模期间,每日观察小鼠的证候学评价指标(一般情况、体重、饮水量、腹泻评分),在DSS溶液饮用第3、5、7天观察各组小鼠疾病评价指标[疾病活动指数评分(DAI)、结肠长度、重量、脾重],并分别用酶联免疫法(ELISA)、酶联免疫组织化学染色法、HE染色方法观察炎症性指标[白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血清钙卫蛋白(SC)、C反应蛋白(CRP)]、黏膜屏障指标[咬合蛋白(Occludin)、闭锁小带蛋白(ZO-1)、 β -连环蛋白(β -catenin)、钙黏附蛋白(E-cadherin)]和组织病理学变化,进行病证结合的模型评价。**结果** DSS溶液自由饮用叠加高脂饮食和气候箱5天后,多因素造模组与正常组和疾病模型组比较,一般情况较差,饮水量增加,腹泻评分升高、DAI评分升高、结肠长度缩短、结肠重量减轻、脾重增加,IL-6升高、IL-10下降、SC升高、CRP升高, β -catenin表达水平降低(均 $P<0.05$)。HE染色可见结肠黏膜上皮破损,腺体排列紊乱甚至消失,杯状细胞明显减少,固有层中有大量炎性细胞浸润。双因素造模组存活率为85.71%,多因素造模组存活率为90.47%。**结论** DSS溶液自由饮用叠加高脂饮食和气候箱可构建病证结合UC湿热证小鼠模型,DSS溶液自由饮用叠加高脂饮食和气候箱5天为构建该模型较理想的方法。

关键词 溃疡性结肠炎;湿热证;溃疡性结肠炎湿热证;动物模型;葡聚糖硫酸钠;

Establishment and Evaluation of Animal Model of Ulcerative Colitis with Damp Heat Syndrome ZHANG Ze-dan¹, WANG Feng-yun², ZHANG Jia-qi², XU Lin¹, MA Jin-xin^{2,3}, and TANG Xu-dong⁴ 1 Graduate School, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700); 2 Department of Gastroenterology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 3 Peking University Traditional Chinese Medicine Clinical Medical School, Beijing (100091); 4 China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700)

ABSTRACT Objective To establish and evaluate the mouse model of ulcerative colitis (UC) with damp-heat syndrome. **Methods** Totally 84 c57bl/6j male mice were randomly divided into normal group, disease model group, two-factor model group, multi-factor model group, 21 in each group. Mice in the normal group were fed with common forage and free to drink water. Mice in the disease model group were fed with 3% dextran sulfate sodium salt (DSS) solution freely and fed with common forage for 7 successive days. Mice in the two-factor model group were fed with high-fat forage for 14 days on the basis of the disease model group. Mice in the multi-factor model group were put in a daily 8-h artificial climate box on the basis of the two-factor model group for 14 successive days. During the modeling period, the syndrome evaluation indices (general state, body

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81830118)

作者单位:1. 中国中医科学院研究生院(北京 100700); 2. 中国中医科学院西苑医院脾胃科(北京 100091); 3. 北京大学中医临床医学院(北京 100091); 4. 中国中医科学院(北京 100700)

通讯作者:唐旭东, Tel: 010-62882389, E-mail: txdl@sina.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210721.186

weight, drinking water, diarrhea score) were observed every day. The disease evaluation indices [disease activity index (DAI), colon length, weight, spleen weight] were observed at day 3, 5, and 7 after taking DSS solution. Inflammatory indices [IL-6, IL-10, tumor necrosis factor α (TNF- α), serum calprotectin (SC), C reactive protein (CRP)], mucosal barrier indices (Occludin, ZO-1, β -catenin, E-cadherin), and histopathological changes were observed by ELISA, enzyme-linked immunohistochemical staining, and HE staining, respectively. The disease syndrome combined model evaluation was performed. **Results** After 5 days of free drinking of DSS solution combined with high-fat diet and climate box, as compared with the normal group and the disease model group, the general condition became worse, water intake increased, diarrhea score increased, DAI score increased, colon length was shortened, colon weight decreased, spleen weight increased, IL-6 increased, IL-10 decreased, SC increased, CRP increased, β -catenin decreased in the multi-factor model group (all $P < 0.05$). HE staining showed that the epithelium of the colonic mucosa was damaged, the glands were disorderly arranged or even disappeared, the goblet cells were significantly reduced, and a large number of inflammatory cells infiltrated in the lamina propria. The survival rate was 85.71% in the two-factor model group and 90.47% in the multi-factor model group. **Conclusions** Free drinking of DSS solution combined with high-fat diet and climate box constructed a mouse model of UC with damp-heat syndrome. Five days of free drinking of DSS solution combined with high-fat diet and climate box was the ideal method to construct this model.

KEYWORDS ulcerative colitis; damp-heat syndrome; ulcerative colitis damp-heat syndrome; animal model; dextran sodium sulfate;

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种具体发病机制尚不明确的慢性炎症性疾病, 临床表现明显, 治疗难度大, 为终身性疾病^[1], 临床上活动期常见 UC 湿热证患者^[2,3]。为深入探究湿热证 UC 的发病机制及中医药治疗的作用机制, 成熟的动物模型必不可少, 但国内外目前针对 UC 湿热证的动物模型研究较少, 并且尚无统一的建立标准与评价体系。本研究拟从病证结合角度研究 UC 湿热证, 以临床表现为基础, 结合证候特征复制 UC 湿热证, 建立 UC 湿热证动物模型, 并从病证结合角度对模型进行评价, 为 UC 湿热证动物模型的建立与评价提供实验依据。

材料与方法

1 动物 c57bl/6j 雄性小鼠 84 只, 体重 (20 ± 2) g, 鼠龄 6~8 周, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (京) 2019-0010, 合格证号: 110324201102701983。于中国中医科学院西苑医院 SPF 级动物实验中心饲养, 室温 22~25℃, 光照周期为 12 h/12 h, 相对湿度为 50%~60%, 颗粒饲料喂养, 自由饮水。本实验经中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会审批 (No.2019XLC003-2)。

2 饲料 使用由北京科奥协力饲料有限公司提供的普通饲料和高脂饲料 (D12492 高脂饲料配比: 60% 脂肪热量, 5.24 kCal/g, 含豆油、猪油、酪蛋白、

玉米淀粉、麦芽糊精、蔗糖、复合维生素等)。

3 主要试剂及仪器 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium salt, DSS) (MP, Biomedicals, 美国, 货号: 0216011080)。人尿粪隐血测试盒 (联苯胺法) (南京建成, 货号: C027-1-1)。小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (Biotech, 货号: EIA-3634)。小鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (Biotech, 货号: EIA-3418)。小鼠白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒 (Abcam, 货号: Ab270216)。小鼠 C 反应蛋白 (c-reaction protein, CRP) ELISA 试剂盒 (BIOSH, 货号: 20051)。小鼠血清钙卫蛋白 (serum calprotectin, SC) ELISA 试剂盒 (BIOSH, 货号: 21326)。闭锁小带蛋白 (ZO-1) 免疫组化试剂盒 (Servicebio, 货号: GB111981)。咬合蛋白 (occludin) 免疫组化试剂盒 (Proteintech, 货号: 27260-1-AP)。钙黏附蛋白 (E-cadherin) 免疫组化试剂盒 (Servicebio, 货号: EM0502)。 β -连环蛋白 (β -catenin) 免疫组化试剂盒 (Servicebio, 货号: ET1601-5)。自制湿热气候箱: 温度为 (32 ± 2) ℃, 相对湿度为 95%。高速冷冻离心机 (大龙, 型号: D3024R), 电子天平 (Gilson, 型号: Cubis® MSA224S-000-DA), 电子秤 (上海浦春, 型号:

JE3001), 酶标仪 (BioTeK, 型号: Epoch)。

4 动物分组与造模方法 适应性喂养 7 天后, 于第 8 天进行称重, 借助 SPSS 软件根据小鼠体重进行随机分组, 共分为: 正常组、疾病模型组、双因素造模组、多因素造模组, 每组各 21 只。各组小鼠体重比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

UC 湿热证病证结合小鼠模型的建立主要分为两个步骤: 证候模型建立和疾病模型建立, 共计 14 天。

步骤一: 证候模型的建立。双因素造模组和多因素造模组小鼠通过内因湿热或内外因湿热相结合方式进行干预。具体方法为: 双因素造模组和多因素造模组小鼠采用特殊高脂饲料饲养, 共 14 天; 多因素造模组小鼠在高脂饲料喂养同时每天放入温度为 (32 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 95% 的人工气候造模箱中 8 h, 放置时间为 8: 00-12: 00 和 14: 00-18: 00, 共 14 天。

步骤二: 疾病模型的建立。疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组采用 DSS 自由饮用的方式进行造模, 参照文献 [5]。具体方法为: 疾病模型组小鼠自由饮用 3% 的 DSS 溶液, 共 7 天, 期间以普通饲料饲养; 双因素造模组和多因素造模组在使用高脂饲料喂养 7 天后, 将正常饮水换为 3% 的 DSS 溶液, 共 7 天。

正常组采用普通饲料饲养, 正常饮水。

5 检测指标及方法

5.1 证候学评价指标

5.1.1 一般情况 造模期间, 每日观察小鼠的外观、毛发整洁度和光亮度、精神状态及活动状态等。

5.1.2 体重测定 用电子秤测量小鼠体重, 于造模开始后的每天上午 9: 00 进行。

5.1.3 饮水量测定 每日上午 8: 30 用量筒测量给予小鼠一定量的水, 并于隔日同时间测量剩余水量, 两者差值与小鼠数量相比得出每只小鼠的日平均饮水量。

5.1.4 腹泻评分计算 每日观察小鼠的大便情况并进行评分, 评分标准为: 正常 0 分, 松散 1 分, 腹泻 3 分。

5.2 疾病评价指标

5.2.1 DAI 评分计算 每日在观察小鼠的大便性状后, 利用邻联甲苯胺法测定小鼠便潜血情况, 并结合体重变化进行小鼠疾病活动指数评分 (disease activity index, DAI), 评分标准见表 1^[4]。

5.2.2 结肠长度、重量及脾重测量 在 DSS 溶液饮用第 3、5、7 天后分批次取材, 摘眼球取血后,

表 1 DAI 评分

症状	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
体重下降分数 (%)	0	1~5	5~10	10~15	>15
大便性状	正常	松散	-	腹泻	-
便隐血	便血阴性	便血阳性	-	肉眼血便	-

注: 正常为成型大便; 松散为不黏附于肛门的半成形大便; 腹泻为可黏附于肛门的稀水样大便

使用颈椎脱臼法处死小鼠, 立即取胃至肛门段肠组织, 清理附着组织后, 测量结肠长度, 在测量完成后, 去除胃部, 将剩余肠组织在生理盐水中反复清洗至洁净, 放置于滤纸上吸干多余水分, 测量结肠重量。另取脾脏进行称重。

5.3 炎症性指标 取血后将血液静置 2 h 再进行离心, 取上层血清分装于 EP 管, 迅速置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。样本检测使用 ELISA 法进行, 测定小鼠血清中 SC、CRP 表达水平和结肠组织中 IL-6、IL-10、TNF- α 表达水平, 具体操作按照小鼠 IL-6 ELISA Kit、IL-10 ELISA Kit、TNF- α ELISA Kit、SC ELISA Kit、CRP ELISA Kit 说明书进行。

5.4 HE 染色 将结肠组织固定在倍于标本体积 10 倍以上的 4% 的多聚甲醛固定液中, 继而进行石蜡包埋切块, 染色后, 用高倍显微镜进行图像采集, 每张切片随机对 3 个视野 ($\times 200$) 拍照, 观察组织病理学改变。

5.5 黏膜屏障指标 采用酶联免疫组织化学染色法测定小鼠结肠组织中 Occludin、ZO-1、 β -catenin、E-cadherin 表达量。使用石蜡包埋标本, 连续切片厚度, 随后严格按照小鼠 Occludin、ZO-1、 β -catenin、E-cadherin 免疫组化试剂盒说明书进行操作。染色后用高倍显微镜进行图像采集, 每张切片随即对 3 个视野 ($\times 200$) 拍照, 利用 Image J 软件分析阳性区域平均光密度值。

6 统计学方法 采用 SPSS 26.0 统计软件对实验结果及数据进行分析。对各组数据进行正态性检验和方差齐性分析, 若数据符合正态分布, 则采用多样本单因素方差分析, 用 LSD 模型进行两两比较, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 若数据呈非正态分布且不足方差齐性的条件, 即采用 k 个独立样本的非参数检验, 数据以 $M (IQR)$ 表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 证候评价指标

1.1 各组小鼠一般情况比较 正常组小鼠一般

情况良好,皮毛洁净光泽,行动灵敏,大小便正常,无明显气味。疾病模型组、双因素造模组、多因素造模组小鼠存在不同程度反应迟钝,蜷卧懒动,喜贴边或扎堆聚集,肛门污秽;双因素造模组、多因素造模组小鼠同时伴有毛发油亮,尿色深黄,大便臭秽。多因素造模组小鼠在第 3 天开始出现黏液血便,第 5 天全部出现脓血便,疾病模型组则在第 5 天开始出现血便。非预期死亡小鼠共 5 只,其中双因素造模组 3 只,存活率 85.71%;多因素造模组 2 只,存活率 90.47%。

1.2 各组小鼠体重比较(表 2) 在造模期间,正常组小鼠体重呈逐渐增加的趋势,疾病模型组、双因素造模组、多因素造模组小鼠体重则呈现先增加后降低的趋势。在 DSS 溶液饮用第 6 天开始,双因素造模组和多因素造模组小鼠体重较正常组显著降低($P<0.05$),且多因素造模组小鼠体重显著低于疾病模型组($P<0.05$)。

1.3 各组小鼠饮水量比较(表 3) 双因素造模组和多因素造模组在 DSS 溶液饮用第 1~4 天,饮水量显著高于正常组($P<0.05$)和疾病模型组($P<0.05$, $P<0.01$),且多因素造模组饮水量明显高于双因素造模组($P<0.01$);至第 6 天,疾病模型组和双因素造

模组饮水量显著低于正常组($P<0.05$);第 7 天时,多因素造模组饮水量显著低于正常组($P<0.01$)。

1.4 各组小鼠腹泻评分比较(表 4) 疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组腹泻评分均呈逐渐升高的趋势。在第 3 天开始,双因素造模组和多因素造模组腹泻评分显著高于正常组($P<0.01$);至第 4 天,多因素造模组腹泻评分显著高于疾病模型组($P<0.01$);至第 5 天,双因素造模组腹泻评分高于疾病模型组($P<0.05$);至第 7 天,疾病模型组腹泻评分开始高于正常组($P<0.01$)。

2 疾病评价指标

2.1 各组小鼠 DAI 评分比较(表 5) 疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组 DAI 评分均呈逐渐升高的趋势。至第 5 天,双因素造模组和多因素造模组 DAI 评分高于正常组与疾病模型组($P<0.01$, $P<0.05$);至第 7 天,疾病模型组 DAI 评分始高于正常组($P<0.01$)。

2.2 各组小鼠结肠长度、重量及脾重比较(表 6) 疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组结肠长度均呈逐渐降低的趋势。第 3 天开始,其余三组结肠长度明显短于正常组($P<0.01$);且双因素造模组和多因素造模组结肠长度明显短于疾病模型组

表 2 各组小鼠体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	初始体重	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	20.08 ± 0.55	22.06 ± 1.14	21.79 ± 1.12	22.07 ± 1.10	22.27 ± 1.17	22.45 ± 1.27	22.16 ± 1.25	22.86 ± 2.05
疾病模型	19.94 ± 0.59	22.50 ± 0.87	22.63 ± 0.82	22.90 ± 0.95	22.72 ± 0.93	22.26 ± 0.89	22.02 ± 0.96	21.47 ± 0.93
双因素造模	19.90 ± 0.65	23.38 ± 1.42	23.50 ± 2.66	22.78 ± 1.44	22.36 ± 1.71	21.24 ± 2.54	20.45 ± 1.52 *	19.16 ± 1.57 *
多因素造模	19.97 ± 0.59	22.53 ± 1.06	22.95 ± 2.32	22.50 ± 1.21	22.50 ± 1.30	21.79 ± 1.48	20.29 ± 1.86 *△	19.03 ± 1.85 *△

注:与正常组比较, * $P<0.05$;与疾病模型组比较, △ $P<0.05$;第 1~3 天各组动物数均为 21 只,第 4~5 天各组动物数均为 14 只,第 6~7 天正常组、疾病模型组为 7 只,双因素造模组为 4 只,多因素造模组为 5 只(表 3~5 同)

表 3 各组小鼠饮水量比较 (mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	3.56 ± 0.49	3.62 ± 0.25	3.57 ± 0.37	3.50 ± 0.39	3.67 ± 0.30	4.30 ± 0.36	4.30 ± 0.43
疾病模型	3.28 ± 0.27	3.45 ± 0.56	3.82 ± 0.27	3.45 ± 0.27	3.45 ± 0.50	3.23 ± 0.63 *	2.87 ± 0.17 **
双因素造模	5.27 ± 0.32 **△△	5.27 ± 0.45 **△△	5.00 ± 0.00 **△△	4.62 ± 0.32 *△	3.87 ± 0.12	2.91 ± 0.58 **	2.26 ± 0.32 **
多因素造模	7.31 ± 1.10 **△△△	7.35 ± 0.85 **△△△	7.45 ± 0.92 **△△△	6.87 ± 0.57 **△△△	6.32 ± 0.78 **△△△	4.77 ± 0.86 △△△	2.94 ± 0.38 **

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与疾病模型组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$;与双因素造模组比较, ▲ $P<0.01$

表 4 各组小鼠腹泻评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
疾病模型	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.16	0.11 ± 0.33	0.36 ± 0.50	0.86 ± 0.88	1.50 ± 1.35 *
双因素造模	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.69	1.00 ± 1.02 *	1.48 ± 1.30 *	1.95 ± 1.43 *△	2.52 ± 0.94 *△△	3.00 ± 0.00 *
多因素造模	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.14	1.11 ± 1.24 *	2.17 ± 1.26 *△△	2.50 ± 1.09 *△△	2.82 ± 0.55 *△△	3.00 ± 0.00 *

注:与正常组比较, * $P<0.01$;与疾病模型组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

表 5 各组小鼠 DAI 评分 [$M(IQR)$]

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
正常	0	0	0	0	0	0	0
疾病模型	0.17 (0.00)	0.00 (0.00)	0.33 (0.00)	0.67 (0.00)	0.67 (1.00)	1.00 (1.00)	2.00 (2.00)*
双因素造模	0.17 (0.00)	0.33 (0.00)	0.33 (1.00)	1.00 (1.00)	2.00 (2.00)* [△]	2.33 (1.00)* [△]	2.50 (1.00)*
多因素造模	0.00 (0.00)	0.33 (0.00)	0.33 (1.00)	1.33 (1.00)	2.67 (1.00)* [△]	2.67 (1.00)* [△]	2.67 (0.00)*

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与疾病模型组比较,[△] $P<0.05$

($P<0.05$, $P<0.01$)。疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组结肠重量均呈逐渐降低的趋势。在第 3 天开始,双因素造模组和多因素造模组结肠重量低于正常组和疾病模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。在第 5 天开始,疾病模型组结肠重量低于正常组($P<0.01$)。疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组脾重均呈逐渐增高的趋势。在第 3 天起,双因素造模组脾重

高于正常组和疾病模型组($P<0.05$, $P<0.01$);至第 5 天起,多因素造模组脾重高于正常组和疾病模型组($P<0.01$)。

3 各组炎症性指标比较(表 7) 疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组 IL-6 表达水平均呈逐渐增高的趋势。至第 5 天,疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组 IL-6 水平高于正常组($P<0.05$),且双因素造模组、多因素造模组 IL-6 水平高于疾病模型组($P<0.01$);至第 7 天,其余三组 IL-6 水平仍高于正常组($P<0.01$)。

疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组 IL-10 表达水平均呈逐渐下降的趋势。在第 5 天,双因素造模组、多因素造模组 IL-10 水平低于正常组和疾病模型组(均 $P<0.05$);至第 7 天,疾病模型组 IL-10 水平低于正常组($P<0.05$),且多因素造模组 IL-10 水平明显低于疾病模型组($P<0.05$)。

在第 3 天,疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组血清中 SC、CRP 含量高于正常组($P<0.01$),且疾病模型组 SC、CRP 含量高于多因素造模组($P<0.05$),同时 CRP 含量显著高于双因素造模组($P<0.05$);在第 5 天开始,疾病模型组 SC 含量高于双因素造模组($P<0.01$),且双因素造模组

表 6 各组小鼠结肠长度、重量及脾重比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	结肠长度 (cm)	结肠重量 (g)	脾重 (g)
正常	第 3 天	7	7.76 ± 0.20	0.14 ± 0.03	0.05 ± 0.01
	第 5 天	7	7.56 ± 0.37	0.17 ± 0.01	0.04 ± 0.005
	第 7 天	7	7.58 ± 0.42	0.19 ± 0.03	0.06 ± 0.01
疾病模型	第 3 天	7	6.43 ± 0.69**	0.14 ± 0.01	0.05 ± 0.008
	第 5 天	7	5.83 ± 0.53**	0.14 ± 0.02**	0.05 ± 0.01
	第 7 天	7	5.74 ± 0.76**	0.13 ± 0.01**	0.06 ± 0.02
双因素造模	第 3 天	7	5.65 ± 0.48** [△]	0.10 ± 0.02** ^{△△}	0.08 ± 0.02* [△]
	第 5 天	7	4.98 ± 0.51** ^{△△}	0.08 ± 0.01** ^{△△}	0.09 ± 0.01** ^{△△}
	第 7 天	4	4.92 ± 0.40** ^{△△}	0.08 ± 0.01** ^{△△}	0.09 ± 0.01* [△]
多因素造模	第 3 天	7	5.76 ± 0.68** [△]	0.11 ± 0.01* ^{△△}	0.06 ± 0.01
	第 5 天	7	4.80 ± 0.36** ^{△△}	0.09 ± 0.01** ^{△△}	0.1 ± 0.04** ^{△△}
	第 7 天	5	4.76 ± 0.35** ^{△△}	0.08 ± 0.00** ^{△△}	0.1 ± 0.03** ^{△△}

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与疾病模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

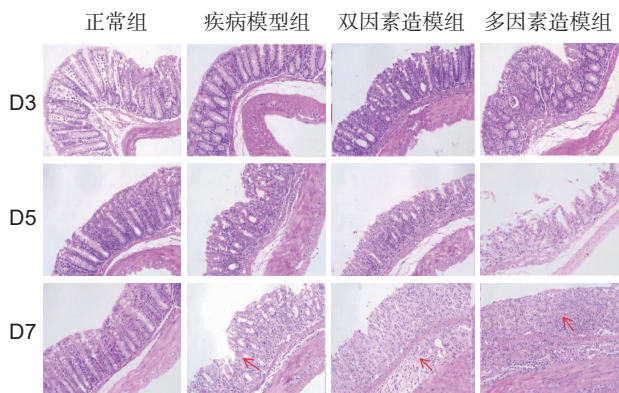
表 7 各组小鼠 IL-6、IL-10、TNF- α 、SC、CRP 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	SC (ng/mL)	CRP (ng/mL)
正常	第 3 天	5	2.18 ± 2.03	94.27 ± 17.21	7.46 ± 0.67	163.41 ± 22.13	90.53 ± 18.68
	第 5 天	5	2.47 ± 1.98	97.31 ± 11.32	8.01 ± 4.65	152.41 ± 31.69	89.54 ± 19.74
	第 7 天	5	2.55 ± 1.58	96.27 ± 16.63	7.99 ± 5.86	157.16 ± 18.67	81.64 ± 19.22
疾病模型	第 3 天	5	2.68 ± 2.35	91.23 ± 14.84	10.14 ± 5.85	272.23 ± 19.81**	173.36 ± 6.58**
	第 5 天	5	43.42 ± 27.89*	91.84 ± 5.76	16.00 ± 10.04	335.72 ± 20.43**	220.64 ± 14.79**
	第 7 天	5	121.76 ± 32.68**	82.11 ± 4.28*	21.22 ± 7.48*	339.22 ± 26.86**	225.95 ± 12.28**
双因素造模	第 3 天	5	25.26 ± 9.80	85.06 ± 13.06	10.37 ± 6.01	254.31 ± 31.86**	148.89 ± 19.22** ^{△△}
	第 5 天	5	106.29 ± 39.60** [△]	82.46 ± 7.55* [△]	11.72 ± 10.27	247.39 ± 29.46** ^{△△}	143.91 ± 14.46** ^{△△}
	第 7 天	4	135.29 ± 63.91**	80.87 ± 2.66*	20.64 ± 17.57*	224.40 ± 40.72** ^{△△}	145.63 ± 10.72** ^{△△}
多因素造模	第 3 天	5	26.43 ± 10.15	86.11 ± 10.29	14.75 ± 3.44	222.39 ± 37.82** ^{△△}	147.76 ± 13.55** ^{△△}
	第 5 天	5	127.33 ± 28.91** [△]	85.47 ± 4.58* [△]	17.88 ± 8.04*	199.40 ± 28.91* ^{△△}	148.97 ± 7.36** ^{△△}
	第 7 天	5	145.44 ± 53.22**	75.41 ± 4.75* [△]	20.84 ± 4.32*	161.29 ± 24.33 ^{△△}	151.25 ± 11.67** ^{△△}

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与疾病模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与双因素造模组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$

SC 含量高于多因素造模组 ($P<0.05$); 多因素造模组 TNF- α 表达水平高于正常组 ($P<0.05$); 至第 7 天, 疾病模型组和双因素造模组 TNF- α 表达水平高于正常组 ($P<0.05$)。

4 各组小鼠远端结肠组织病理结果 (图 1) 正常组小鼠结肠组织肉眼可见结肠表面光滑, 血管纹理清晰, 肠腔内无脓血样分泌物, 结肠黏膜上皮完整, 无充血、水肿。HE 染色下黏膜结构完好, 腺体和杯状细胞排列整齐, 无变性、脱落坏死。疾病模型组、双因素造模组和多因素造模组肠内胀气, 肠壁薄而质脆易破裂, 局部质地变硬, 有瘢痕形成, 肠腔狭窄内有脓血样便, 黏膜上散在糜烂、溃疡。HE 染色可见结肠黏膜上皮破损, 腺体排列紊乱甚至消失, 杯状细胞明显减少, 固有层中有大量炎性细胞浸润。



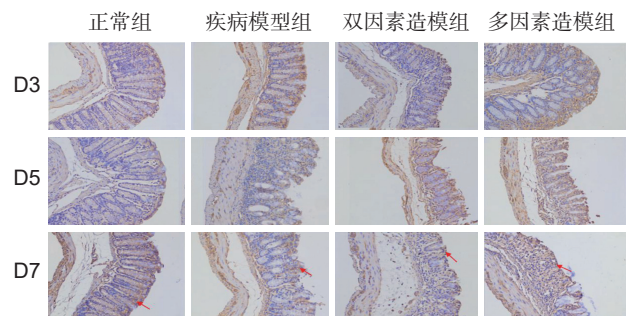
注: 箭头指示黏膜糜烂、炎性细胞浸润

图 1 各组小鼠远端结肠组织病理结果 (HE, $\times 200$, bar=50 μm)

5 各组黏膜屏障指标比较

5.1 各组小鼠 Occludin 表达水平比较 (图 2, 表 8) 在第 5 天开始, 双因素造模组、多因素

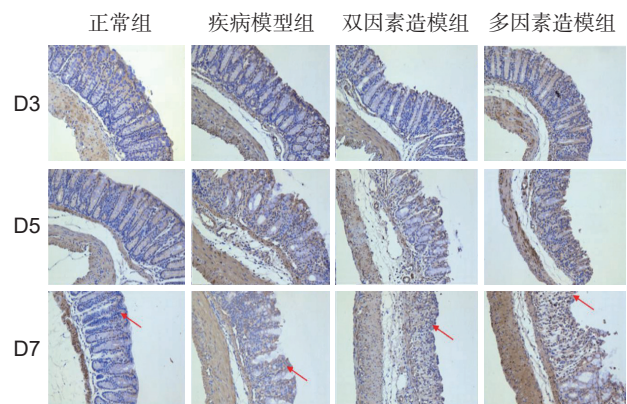
造模组的 Occludin 表达量低于正常组 ($P<0.05$, $P<0.01$); 至第 7 天, 疾病模型组 Occludin 表达量低于正常组 ($P<0.05$), 并且多因素造模组 Occludin 低于疾病模型组 ($P<0.05$)。



注: 箭头指示为 Occludin 阳性表达

图 2 各组小鼠远端结肠 Occludin 免疫组化结果 ($\times 200$)

5.2 各组小鼠 ZO-1 表达水平比较 (图 3, 表 8) 在第 5 天开始, 双因素造模组、多因素造模组 ZO-1 表达量低于正常组 ($P<0.05$, $P<0.01$); 至第 7 天, 疾病模型组 Occludin 表达量低于正常组 ($P<0.05$)。



注: 箭头指示为 ZO-1 阳性表达

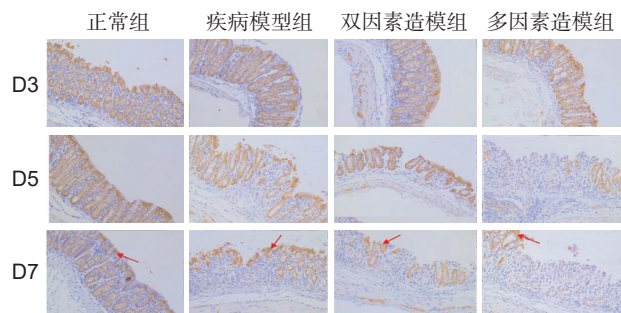
图 3 各组小鼠远端结肠 ZO-1 免疫组化结果 ($\times 200$)

表 8 各组小鼠 Occludin、ZO-1、 β -catenin、E-cadherin 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	Occludin	ZO-1	β -catenin	E-cadherin
正常	第 3 天	5	0.37 $\pm$ 0.00	0.31 $\pm$ 0.00	0.19 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00
	第 5 天	5	0.37 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.00
	第 7 天	5	0.37 $\pm$ 0.00	0.29 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.00	0.19 $\pm$ 0.00
疾病模型	第 3 天	5	0.37 $\pm$ 0.00	0.29 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.00
	第 5 天	5	0.35 $\pm$ 0.00	0.28 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.01
	第 7 天	5	0.33 $\pm$ 0.00*	0.26 $\pm$ 0.00*	0.17 $\pm$ 0.01*	0.16 $\pm$ 0.01*
双因素造模	第 3 天	5	0.36 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.00*	0.19 $\pm$ 0.00
	第 5 天	5	0.34 $\pm$ 0.00*	0.27 $\pm$ 0.01*	0.16 $\pm$ 0.01** Δ	0.16 $\pm$ 0.02**
	第 7 天	4	0.29 $\pm$ 0.00**	0.25 $\pm$ 0.01**	0.15 $\pm$ 0.00** Δ	0.15 $\pm$ 0.00**
多因素造模	第 3 天	5	0.35 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
	第 5 天	5	0.31 $\pm$ 0.00**	0.26 $\pm$ 0.00**	0.16 $\pm$ 0.01** Δ	0.16 $\pm$ 0.00**
	第 7 天	5	0.28 $\pm$ 0.00** Δ	0.24 $\pm$ 0.00**	0.16 $\pm$ 0.00**	0.15 $\pm$ 0.00**

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与疾病模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

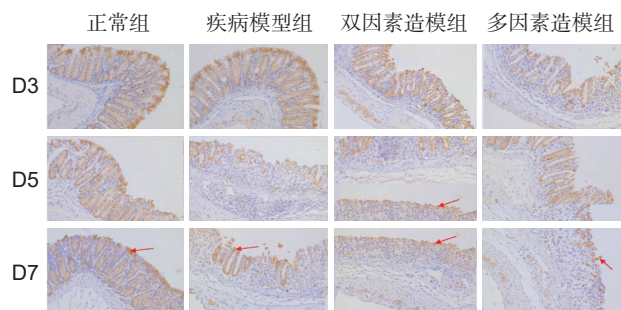
5.3 各组小鼠 β -catenin 表达水平比较 (图 4, 表 8) 在第 3 天, 双因素造模组 β -catenin 表达量低于正常组 ($P<0.05$); 至第 5 天, 多因素造模组 β -catenin 表达量低于正常组 ($P<0.01$), 且双因素造模组、多因素造模组 β -catenin 表达均低于疾病模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$); 至第 7 天, 疾病模型组 β -catenin 表达量低于正常组 ($P<0.05$)。



注: 箭头指示为 β -catenin 阳性表达

图 4 各组小鼠远端结肠 β -catenin 免疫组化结果 ($\times 200$)

5.4 各组小鼠 E-cadherin 表达水平比较 (图 5, 表 8) 在第 5 天开始, 双因素造模组、多因素造模组 E-cadherin 表达量低于正常组 ($P<0.01$); 至第 7 天, 疾病模型组 E-cadherin 表达量低于正常组 ($P<0.05$)。



注: 箭头指示为 E-cadherin 阳性表达

图 5 各组小鼠远端结肠 E-cadherin 免疫组化结果 ($\times 200$)

讨 论

DSS 模型是由 Okayasu I^[5] 在 1990 年所提出, 为 UC 造模中最常用的方法^[6,7]。采用分子量为 5 kD、浓度为 3% 的 DSS 溶液, 饮用 7 天, 即可成功诱导 UC 急性期模型^[8]。湿热证动物模型多依据内外湿相结合的原则进行造模, 而具体的造模要素和评价标准尚未统一。中医学认为湿邪内外相引, 脾胃内伤可致水湿泛滥, 复感外在湿热之邪, 便会造成湿热。本研究前期查阅了大量有关 UC 动物模型建立的文献, 最终选用 c57bl/6j 小鼠, 按照 3% DSS 自由饮用加高脂饮食及气候箱复合法建立湿热型 UC 小鼠模型, 以使中医证型和西医疾病有机结合。

在模型评价方法上, 针对证候学评价, 本研究从小鼠外观、精神状态、体重、饮水量、腹泻评分等方面进行观察, 发现多因素造模组小鼠反应迟钝, 蜷卧懒动, 尿色深黄, 大便臭秽, 3 天即可出现黏液脓血便, 而体重和饮水量则呈现先升高后下降的趋势, 表明高脂饮食和气候箱前期可以导致湿热发生, 造成湿热证候。

在疾病评价方面, 从结肠长度、结肠重量、脾重、DAI 评分、结肠组织外观及病理学表现进行评估, 实验结果显示, 多因素造模组小鼠结肠长度明显缩短, 重量减轻, 脾重增加, DAI 评分升高。有研究证明, 相较于健康人群, UC 患者结肠缩短^[9]。脾脏是人体重要的免疫器官之一, 脾肿大是免疫系统异常激活的一个重要标志。HE 染色可见各模型组结肠黏膜上皮破损, 腺体排列紊乱甚至消失, 杯状细胞明显减少, 固有层中有大量炎性细胞浸润, 以多因素造模组最为明显, 表明疾病造模成功。

本研究选取 IL-6、IL-10、TNF- α 、SC 和 CRP 作为炎症评价指标。IL-6 是由免疫细胞在急、慢性炎症中分泌的一种中枢细胞因子^[10], 能够促进 Th17 细胞分化, 抑制 Treg 细胞, 导致 Th17/Treg 细胞比例失衡^[11]。IL-10 主要由 Th2 细胞释放, 可以抑制炎症趋化因子的释放^[12], 也可抑制抗原呈递, 减轻黏膜炎症, 在肠道免疫中具有关键作用^[13]。相关研究证明, UC 患者血清中 IL-10 表达明显减少^[14]。TNF- α 是一种具有重要生物活性的炎症物质, 可与肿瘤坏死因子受体 -1 结合, 促进炎症因子产生, 诱发机体的炎症反应^[15-17]。SC 是一种与钙、锌相结合的蛋白, 在机体内广泛分布^[18]。炎症和感染时 SC 含量升高, 因此通过测定血液中 SC 的浓度可以判断炎症的存在, 并能在一定程度上反映疾病的严重程度^[19]。CRP 是临床检测炎症的常用指标, 可以准确地反映组织损伤以及炎症程度^[20], 用来判断 UC 的肠道炎症活动度。在湿热证 UC 患者中, CRP 的升高明显高于其他证型的 UC 患者, 因此, CRP 可以作为特异性强、敏感度高并且与湿热证候相关的客观量化指标^[21,22]。本研究发现多因素造模组在造模第 5 天后, IL-6、TNF- α 、CRP 表达水平升高, 同时 IL-10 表达水平降低, 表明 DSS 自由饮用叠加高脂饮食和气候箱可以成功复制 UC 湿热证模型。

肠道屏障具有特异选择性, 可以阻止外源性抗原对机体的损害, 维持机体内环境稳定。上皮屏障是肠黏膜屏障最重要的防线^[23-25]。跨膜蛋白 Occludin 可以借助外环结构封闭相邻细胞旁间隙, 有效维持肠道

黏膜屏障的完整性,并且,对紧密连接(tight junction, TJ)的形成具有一定的信号介导作用^[26, 27]。胞质附着蛋白 ZO-1 作为一种关键的 TJ,可以与 Occludin 结合而形成稳定的连接结构^[28, 29]。E-cadherin 在钙离子参与下可以介导同种亲和性细胞间的黏附,维持肠黏膜屏障^[30, 31]。 β -catenin 是一种多效性胞浆蛋白,能增加同型细胞间黏附功能,是重要的细胞骨架成分^[32]。在本研究中,疾病模型组、双因素造模组、多因素造模组 Occludin、ZO-1、 β -catenin、E-cadherin 表达水平逐渐下降,多因素造模组、双因素造模组于第 5 天显示出统计学差异,疾病模型组则在第 7 天显示出差异。各组指标表达水平变化表明 DSS 溶液自由饮用可导致细胞间紧密连接降低,叠加高脂饮食和气候箱后可加重 Occludin、ZO-1、 β -catenin、E-cadherin 表达的减少。

综上所述,本研究通过 3% DSS 溶液自由饮用叠加内外湿因素建立了 UC 湿热证小鼠模型,从证候学指标、疾病评价指标、炎症性指标和黏膜屏障指标 4 个方面进行评估,证实 DSS 溶液叠加高脂饮食和气候箱的病证结合动物模型符合 UC 湿热证的病因病机和临床特点,并且造模方式简洁易于复制,为较理想的病证结合模型制备方法。对“病证结合”相关理论的阐释和中药研究具有积极意义,也有利于指导临床实践。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] European Crohn's and Colitis Organization. Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: Current management[J]. J Crohn's Colitis, 2017, 11 (7): 769-784.
- [2] 范一宏,何尧儿,陈芳,等.粪钙卫蛋白在不同中医证型溃疡性结肠炎中的临床意义[J].中国中西医结合杂志,2018,38(12):1435-1439.
- [3] 李毅,樊新荣,刘力,等.基于因子分析与聚类分析对溃疡性结肠炎中医证候规律的研究[J].中国中西医结合杂志,2017,37(10):1191-1195.
- [4] Sasaki S, Hirata I, Maemura K, et al. Prostaglandin E_2 inhibits lesion formation in dextran sodium sulphate-induced colitis in rats and reduces the levels of mucosal inflammatory cytokines[J]. Scand J Immunol, 2000, 51(1): 23-28.
- [5] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990, 98(3): 694-702.
- [6] Randhawa PK, Singh K, Singh N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents[J]. Kor J Physiol Pharmacol, 2014, 18(4): 279-288.
- [7] Wang S, Lin Y, Yuan X, et al. REV-ERB α integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- κ B/NLRP3 axis[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 42-46.
- [8] 孔鹏飞,赵兵,覃勤,等.葡萄糖硫酸钠致大鼠急性溃疡性结肠炎模型建立与评价[J].中华结直肠疾病电子杂志,2015,4(6):617-619.
- [9] 安阿玥主编.肛肠病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2005:341.
- [10] Wine E, Mack DR, Hyams J, et al. Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis[J]. J Crohn's Colitis, 2013, 7: 916-922.
- [11] Lee SH, Kwon JE, Cho ML. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Intest Res, 2018, 16(1): 26-42.
- [12] Rebecca GB, Matthew SH, Sankar G, et al. NF- κ B inflammation and metabolic disease[J]. Cell Metab, 2011, 13(1): 11-22.
- [13] Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(3): 831-848.
- [14] 岳文杰,刘懿,徐薇,等.溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜中 IL-2、IL-4、IL-7 和 IL-10 表达特点及其与疾病活动度的关系[J].复旦学报(医学版),2012,39(5):454-459,488.
- [15] 童霞,骆成俊,许晓梅,等.美沙拉嗪联合双歧三联活菌对溃疡性结肠炎患者 TNF- α 、IL-8 及 IL-10 水平的影响[J].现代生物医学进展,2015,15(23):4534-4536.
- [16] Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(2): 83-89.

- [17] Liu G, Jin S, Jiang Q. Interleukin-6 receptor and inflammatory bowel disease: a mendelian randomization study [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (3): 823–824.
- [18] Ogata H. Diagnostic principles of colonoscopy in ulcerative colitis[J]. *Jap J Clin Med*, 2005, 63 (5): 787–793.
- [19] 王利民, 沈利洪, 马闪珊, 等. 血清钙卫蛋白在炎症性肠病诊断中的应用价值 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30 (18): 2211–2214, 2217.
- [20] 刘丹, 周磊. 溃疡性结肠炎患者血小板、C 反应蛋白、血沉的临床意义 [J]. *中国现代药物应用*, 2015, 9 (18): 13–15.
- [21] 于治恒. 溃疡性结肠炎中医证候与客观检查的相关性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [22] 张天涵. 溃疡性结肠炎湿热证与炎症指标 (ESR、CRP、FC) 相关性分析及清肠化湿方干预的疗效观察 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [23] Gao X, Miao R, Tao Y, et al. Effect of Montmorillonite Powder on intestinal mucosal barrier in children with abdominal Henoch-Schonlein purpura: a randomized controlled study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97 (39): e12577
- [24] Zhu R, Ma XC. Role of metabolic changes of mucosal layer in the intestinal barrier dysfunction following trauma/hemorrhagic shock[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214 (11): 1879–1884.
- [25] Maria-Ferreira D, Nascimento AM, Cipriani TR, et al. Rhamnogalacturonan, a chemically-defined polysaccharide, improves intestinal barrier function in DSS-induced colitis in mice and human Caco-2 cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 12261.
- [26] 谭悦, 郑长清. 紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 在溃疡性结肠炎中的表达及其临床意义 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33 (7): 1803–1808.
- [27] Kuo WT, Shen L, Zuo L, et al. Inflammation-induced occluding downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157 (5): 1323–1337.
- [28] Ugalde-Silva P, Gonzalez-Lugo O, Navarro-Garcia F. Tight junction disruption induced by type 3 secretion system effectors injected by enteropathogenic and enterohemorrhagic escherichia coli[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 87.
- [29] Buckley A, Turner JR. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (1): a029314.
- [30] 顾嫣, 冉志华. 骨髓干细胞治疗炎症性肠病的研究进展 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2009, 18 (10): 889–892.
- [31] Grabowska MM, Day ML. Soluble E-cadherin: more than a symptom of disease[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17: 1948–1964.
- [32] Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin[J]. *Curr Opin Genet Develop*, 2006, 16 (1): 51–59.
- (收稿: 2021–05–07 在线: 2021–11–18)
- 责任编辑: 李焕荣
- 英文责编: 张晶晶