



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.023
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4034.shtml

· 简要论著 ·

TGF- β 1 联合 TNBS 诱导 Crohn 病肠纤维化模型

王宝偲, 陶庆松, 嵇振岭, 郑宇

(东南大学附属中大医院 普通外科, 江苏 南京 210009)

摘要

目的: 观察转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 联合 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱导大鼠 Crohn 病 (CD) 肠纤维化模型的效果。

方法: 将 SD 大鼠 30 只随机分为模型组 (20 只) 和对照组 (10 只)。模型组大鼠予距肛门 8 cm 处注入 1 mL 含有 TNBS 及 99% 乙醇, 24 h 后于距肛门 4 cm 处灌入 500 μ L 含携带 TGF- β 1 的腺病毒载体 (1×10^9 pfu/mL 滴度) 的 PBS; 对照组大鼠不做处理。观察大鼠造模后的一般情况、行活动度评分 (DAI), 造模后 12 d 处死大鼠, 取大鼠结肠组织, 行大体病理与组织病理学观察, 并评分。

结果: 模型组大鼠于造模后第 2 天, 出现腹泻、血便、脓血便等症状, 第 4 天达到高峰, 然后渐渐好转, 对照组大鼠精神状态、进食及活动如常; 模型组第 4、8、12 天的 DAI 值明显高于对照组 (均 $P < 0.05$); 模型组大鼠体质量在诱导后第 4~5 天明显下降, 此后体质量缓慢增加, 对照组大鼠的体质量则持续增加, 实验结束时模型组大鼠的体质量增幅明显小于对照组 ($P < 0.05$)。模型组结肠明显充血水肿、溃疡形成, 镜下可见明显的纤维化病变, 对照组结肠未见明显异常, 模型组的大体病理评分及组织病理评分均明显高于对照组 (均 $P < 0.05$)。

结论: TGF- β 1 联合 TNBS 制作大鼠 CD 肠纤维化模型, 方法简单、重复性好、模拟效果佳。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(9):1276-1280]

关键词

Crohn 病; 肠纤维化; 疾病模型, 动物
中图分类号: R656.7

Crohn 病 (CD) 是一种原因不明的非特异性胃肠道慢性炎症性疾病^[1]。患者的肠道透壁性慢性炎症可导致肠道产生大量细胞外基质沉积, 从而引起瘢痕收缩式狭窄^[2]。目前 CD 肠道纤维化机制尚不明确且临床尚无有效的治疗方案, 药物治疗的效果仍不理想^[3]。为了研究及发病机制及治疗方法, 适宜的动物模型不可或缺。CD 动物模型有多种建立方法, 其中以 Morris 等^[4]在 1989 年首先提出的 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS) / 乙醇法应用最为广泛。该模型具有制作简单、可重复性好和价廉的优点。但是该模型只是结肠炎症模型, 对于模

拟 CD 慢性炎症所致纤维化的现象并不典型。因此 2005 年由 Vallance 等^[5]通过 TGF- β 1 联合 TNBS 诱导制作了小鼠 CD 肠纤维化模型, 结果模拟出小鼠 CD 慢性炎症与肠纤维化的特点。本研究参照文献, 设计了类似 SD 大鼠模型, 并从病理学的角度去验证该模型是否具备 CD 的特征。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雌雄各半未育 SD 大鼠 30 只, 体质量 200~220 g, 随机分为对照组 10 只及模型组 20 只。由南京市江宁区青龙山动物实验中心提供。分笼饲养于东南大学医学院动物实验中心。

1.1.2 主要试剂与仪器 TNBS 水溶液, 购自 Sigma-Aldrich 公司。携带 TGF- β 1 的腺病毒载体 (Adeno-TGF- β 1), 购自上海卓康。其他试剂如未特殊说明均购自 Sigma 公司。自动脱水机

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81000153);
江苏省自然科学基金资助项目 (BK2010415)。

收稿日期: 2013-08-16; **修订日期:** 2014-03-26。

作者简介: 王宝偲, 东南大学附属中大医院住院医师, 主要从事胃肠外科方面的研究 (陶庆松为共同第一作者)。

通信作者: 嵇振岭, Email: zlj@vip.sina.com

(LEICA ASP300, Leica 公司); 包埋机 (LEICA EG1140H, Leica 公司); 石蜡切片机 (LEICA RM21459, Leica 公司); 染色(脱蜡)机 (LEICA AUTO STAINER XL, Leica 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 建模 所有大鼠在实验前禁食 48 h (不禁水), 2% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉。模型组大鼠注射器接塑胶管, 把塑胶管插至大鼠脾曲结肠, 顶端距肛门约 8 cm, 将 TNBS/乙醇混合液 1 mL (内含 TNBS 30 mg 与 99% 乙醇 0.4 mL) 灌入结肠内。整个灌注过程维持 5 s。拔出塑胶管后, 保持大鼠倒立位 30 s。让大鼠恢复 24 h, 然后距肛门 4 cm 处灌入 500 μL 含 1 × 10⁹ pfu/mL 滴度 Adeno-TGF-β1 的 PBS (pH7.4)。造模后自由进食和饮水。对照组大鼠不做任何处理, 自由进食和饮水。

1.2.2 模型评价 (1) 大鼠 DAI 评分: 每天观察动物的精神状态、进食、活动和排便等情况并称量体质量, 并单独对各组大鼠体质量变化情况进行测定和比较。同时测定各组大鼠大便性状和潜血(采用邻联苯胺 +H₂O₂ 法测定)情况, 根据 Murano 等^[6] 制定的标准对大鼠进行 DAI (disease activity index) 评分(表 1), DAI=(体质量下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3, 得出每组大鼠平均 DAI 得分, 以评估各组大鼠的疾病活动情况。第 12 天处死实验动物。

表 1 疾病活动评分 (DAI 评分)

评分	体质量下降 (%)	大便性状	大便潜血 / 肉眼血便
0	(-)	正常	正常 (-/-)
1	1~5	—	—
2	6~10	松散	潜血阳性 (+/-)
3	11~15	—	—
4	>15	稀便	肉眼血便 (+/+)

(2) 病理学评价: 12 d 后处死大鼠, 取材。断颈处死大鼠后, 立即剖取结肠, 肉眼观察结肠黏膜损伤程度并做大体病理评分。据 McCafferty 等^[7] 提出的评分方法(表 2), 对不同的病变程度, 各项指标对应于不同的分值, 各项分值相加即为大体病理的评分分值, 反映了大体病理病变的严重程度, 总分越高表明大体病理的病变越重。如发现病变在病变边缘处取材, 如果没有病变则在降结肠取材, 其余在横结肠和距肛门 1 cm 处各取组

织一块(约 100 mg), 对每块组织进行石蜡包埋, 切片后组织病理观察并评分, 每只大鼠有 3 块组织, 根据 Neurath 等^[8] 提出的评分标准(表 3), 通过光学显微镜观察肠黏膜炎症及纤维化的严重程度, 不同程度的炎症对应不同的分值, 进行组织病理学评分, 取其均值。

表 2 大体组织学积分

参数	分值
粘连	
无	0
轻度(结肠与周围组织易分离)	1
中度	2
重度	3
穿孔	
无	0
有	1
坏死	
无	0
轻度	1
中度	2
重度	3
严重(两处或两处以上发生坏死或坏死 >1 cm)	4
溃疡	
正常外观	0
局部充血, 无溃疡	1
溃疡无充血或肠壁增厚	2
溃疡伴一处炎症	3
溃疡伴一处以上炎症或溃疡病变 >1 cm	4
水肿	
无	0
有	1
巨结肠	
无	0
有	1

表 3 病理学评分

组织病理表现	分值
无炎症表现	0
炎症程度很低	1
低程度粒细胞原性炎症	2
高程度粒细胞原性炎症, 血管高密度分布, 肠壁增厚	3
炎症细胞透壁浸润, 杯状细胞消失, 血管高密度分布, 肠壁增厚	4

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件; 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 两组间大鼠体质量变化值分析采用团体 t 检验, 两组间 DAI 评分、大体病理、组织病理积分采用 Wilcoxon 秩和检验, 计数资料单因素分析用 χ^2 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

模型组大鼠在诱导当天即出现精神萎靡、懒动、厌食等表现。第 2 天开始出现腹泻，大便次数增多，且多为不成形稀便并有血便，可见黏液或脓点，动物毛发失去光泽，局部皮肤炎症损害。上述症状逐渐加重，约在第 4 天达到高峰，第 8 天开始好转，但仍有毛色无光泽和脱毛现象。死亡情况：第 3 天死亡 2 只，第 4、6、7 天分别死亡 1 只。实验结束时模型组剩 15 只。对照组大鼠精神状态、进食及活动如常。第 9 天死亡 1 只，实验结束时剩 9 只。

对于存活的大鼠每日记录 DAI 值，对第 4、8、12 天的 DAI 值进行统计学分析。

表 4 两组 DAI 评分比较

组别	第 4 天	第 8 天	第 12 天
模型组	2.29 ± 0.35	2.07 ± 0.60	2.08 ± 0.50
对照组	0.15 ± 0.30	0.07 ± 0.22	0.07 ± 0.22
P	0.00	0.00	0.00

2.2 体质量变化

模型组大鼠体质量在诱导后第 4~5 天下降最为明显，此后体质量缓慢增加，至第 8~9 天时恢复至诱导前体质量。对照组大鼠的体质量在整个实验过程中一直持续增加（图 1）。模型组大鼠实验

后的平均体质量增加百分比为 $(5.78 \pm 2.33)\%$ ，对照组大鼠实验后的平均体质量增加百分比为 $(13.48 \pm 3.46)\%$ 。实验结束时模型组大鼠的体质量增幅小于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

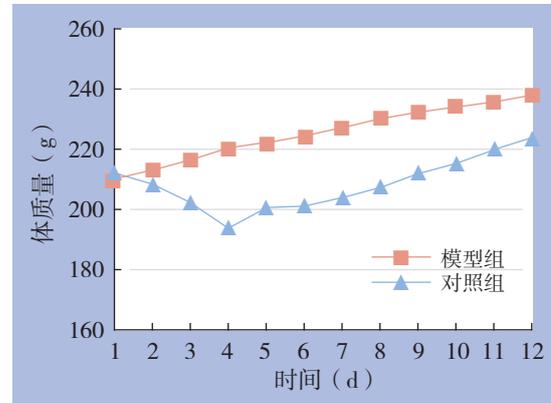


图 1 两组大鼠体质量变化曲线

2.3 结肠大体病理观察及评分

模型组大鼠结肠明显充血水肿，部分大鼠结肠扩张明显，肠壁和周围组织粘连，距肛门 8 cm 范围内有较大的溃疡病灶，病灶处有假膜样物覆盖、肠壁增厚，病变呈节段性分布。而对照组大鼠结肠的黏膜皱襞纹理清晰，未见充血水肿、糜烂及溃疡等病理改变（图 2）。模型组大鼠大体病理积分明显高于对照组大鼠 $(5.87 \pm 1.76 \text{ vs. } 0.22 \pm 0.44, P < 0.05)$ 。



图 2 结肠大体病理学观察 A: 对照组; B: 模型组

2.4 组织病理观察及评分

模型组组织病理观察可见有溃疡及不同程度灶性糜烂形成，肠道全层增厚，黏膜充血，黏膜层、黏膜下层及肌层内可见中性粒细胞、巨噬细胞及嗜酸性粒细胞浸润。结肠黏膜下和浆膜层可见胶原蛋白沉淀，溃疡边缘腺体增生或呈不典型增生，腺体破坏，腺管扭曲，杯状细胞减少。而对照

组病理切片观察见结肠结构清晰，黏膜及黏膜下层均无损伤。上皮完整，未见充血、水肿或糜烂，无溃疡形成，固有层未见明显胶原蛋白沉淀，杯状细胞丰富，腺管结构正常，无明显炎症细胞浸润（图 3）。模型组大鼠组织病理评分明显高于对照组大鼠 $(1.93 \pm 0.80 \text{ vs. } 0.22 \pm 0.44, P < 0.05)$ 。

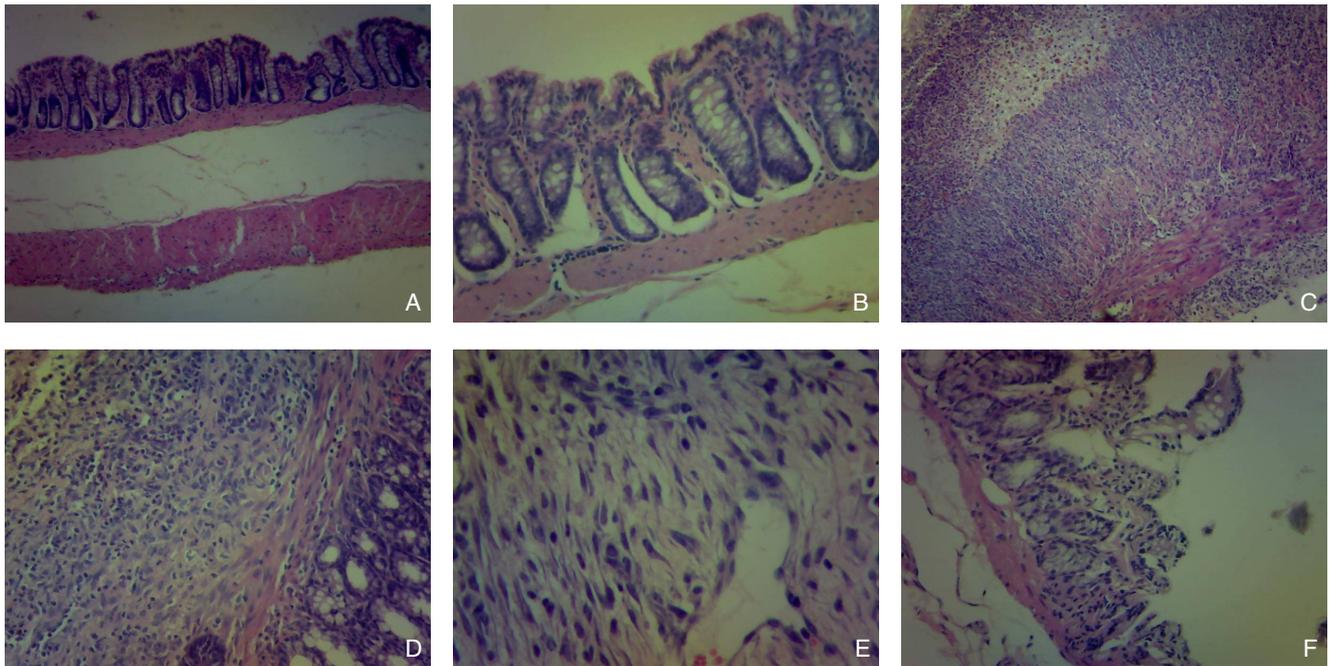


图3 结肠组织病理学观察 A: 对照组 (HE \times 40); B: 对照组 (HE \times 200); C: 模型组 (明显黏膜溃疡, HE \times 40); D: 模型组 (黏膜下纤维化形成, HE \times 100); E: 模型组 (明显肠纤维化, HE \times 200); F: 模型组 (肠黏膜上皮糜烂, HE \times 100)

3 讨论

TNBS 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 与组织蛋白的赖氨酸 τ -氨基团结合形成完全抗原, 使 T 淋巴细胞致敏, 与半抗原结合的动物自身细胞被破坏, 导致肠黏膜发生迟发性变态反应, 从而造成肠黏膜的损伤, 导致肠道炎症的发生。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, 更类似人 CD。从而近年来, TNBS/乙醇模型被广泛用于筛选治疗 CD 的新方法和临床新药的开发及研究其作用机制^[9]。TNBS 造模法操作简单、经济实用、重现性好、造模时间短、病变持续时间较长, 体现急性炎症向慢性转化的动态过程, 是一种经典的动物模型, 缺点是缺乏特征性急性期表现, 对于模拟 CD 肠纤维化的现象并不典型, 且动物死亡率高^[10]。

TGF- β 是一种多效细胞因子, 有很强的抗炎作用也促进纤维化形成。其中的 TGF- β 1 不但参与细胞周期的调控, 血管及胚胎的形成, 诱导细胞凋亡及免疫调节等过程, 同时还参与细胞外基质的分泌和发育分化等过程。在以细胞外基质异常增多和过度沉积为主要病理过程的肠纤维化疾病的进展中, TGF- β 1 起着关键调节作用^[11]。正常表达时能抑制炎症反应和细胞增殖、调节细胞的生长、

分化和免疫功能而起正面作用^[12]; 而过度表达则起推进肠纤维化进程的负作用^[13]。TGF- β 及其受体在 CD 患者肠壁组织及狭窄肠段处分离、培养的间质细胞中均过度表达, TGF- β 刺激狭窄处成纤维细胞等间质细胞过度增殖, 增强间质细胞收缩能力并增强其合成及识别胶原的能力, 诱导其表型变异, 刺激其生长活性而转化为肌成纤维母细胞^[14]。体内外实验均证实纤维化肠壁组织中 TGF- β 表达较正常肠壁组织显著增高, 其持续过度表达导致肠道中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的积聚、重塑^[15]。肠壁黏膜中的 TGF- β 不仅可以刺激黏膜层、黏膜下层、固有层间质细胞对纤维连接蛋白 (fibronectin, FN), I, III, IV, V, VI 等多型胶原的 mRNA 表达增高^[16], 而且刺激肠间质细胞过度表达黏附分子及结缔组织生长因子 (conjunctive tissue growth factor, CTGF) 等促纤维化因子^[17-18]; 还可通过抑制胶原酶和蛋白酶如 MMP 的产生, 以及促进组织抑制因子如基质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 的生成使 ECM 降解减少, 从而导致大量的 ECM 沉积于肠壁, 最终形成纤维化, 甚至狭窄^[19-20]。

通过 TGF- β 1 联合 TNBS 诱导制作出的模型, 具有的慢性肠道透壁性损害和增殖性炎症特点, 这些特点与 CD 肠纤维化病理过程极为相近, 可成功

模拟出 CD 慢性炎症与肠纤维化。

本实验中,在 TNBS/TGF- β 1 灌肠诱导当天模型组大鼠即出现精神萎靡、活动减少、厌食等表现。第 2 天开始大便次数增多,且多为不成形稀便并有血便。上述症状逐渐加重,约在第 4 天达到高峰,第 8 天开始好转。20 只模型组大鼠在实验结束时死亡 5 只。而对照组精神状态、进食及活动如常,在实验结束时死亡 1 只。对第 4、8、12 天的 DAI 值进行比较,可见模型组较对照组 DAI 评分明显升高。在体质量变化方面,模型组大鼠体质量在诱导后第 4~5 天下降最为明显,此后体质量缓慢增加,至第 8~9 天时恢复至诱导前体质量。对照组大鼠的体质量在整个实验过程中一直持续增加,至第 12 天达最大体质量。对模型组和对照组大鼠实验后的平均体质量增加百分比进行比较,可得出实验结束时模型组大鼠的体质量增幅显著小于对照组。

从大体病理上看,模型组大鼠结肠充血水肿,部分大鼠结肠扩张明显,肠壁和周围组织粘连明显,距肛门 8 cm 范围内有较大的溃疡病灶,病灶处有假膜样物覆盖、肠壁增厚,病变呈节段性分布,可见狭窄肠段。光镜下见模型组大鼠结肠黏膜下层及肌层可见纤维化明显。而对照组大鼠结肠从大体病理上看,结肠黏膜皱襞纹理清晰,未见充血水肿、糜烂及溃疡等病理改变。光镜下观察,对照组结肠结构清晰,黏膜及黏膜下层均无损伤。对两组大鼠大体病理评分及组织病理评分进行统计分析,均证实了模型成功。

综上所述,本实验采用的 TGF- β 1 联合 TNBS 成功诱导建立了 CD 肠纤维化模型。有望成为研究 CD 肠纤维化发病机制的可靠动物模型。

参考文献

- [1] 陈宁,刘玉兰. 克罗恩病肠道纤维化的发生机制和临床治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(19):2017-2019.
- [2] Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease-Current knowledge and future perspectives[J]. J Crohns Colitis, 2008, 2(4):279-290.
- [3] 杨华,肖刚. 克罗恩病的诊断治疗:附 30 例报告[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(4):379-382.
- [4] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96(3):795-803.
- [5] Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, et al. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(1):G116-G128.
- [6] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(1):51-58.
- [7] Lienele B, Stojanovic T, Fiebig T, et al. Thalidomide impairment of trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in the rat-role of endothelial cell-leukocyte interaction[J]. Br J Pharmacol, 2001, 133(8):1414-1423.
- [8] Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice[J]. J Exp Med, 1995, 182(5):1281-1290.
- [9] 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.
- [10] 徐婷婷,栗子洋,秦跃川,等. 炎症性肠病动物模型的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2012, 33(2):113-116.
- [11] 梁美兰,汤玉蓉,林琳. 细胞因子在炎症性肠病肠壁纤维化机制中的作用[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(4):286-288.
- [12] Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000, 103(2):295-309.
- [13] Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, et al. Fibrogenesis in Crohn's disease[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(2):439-448.
- [14] McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, et al. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 282(1):C172-C182.
- [15] Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, et al. Fibrogenesis in Crohn's disease[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(2):439-448.
- [16] Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Altered response of intestinal mucosal fibroblasts to profibrogenic cytokines in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2001, 7(3):226-236.
- [17] Brannigan AE, Watson RW, Beddy D, et al. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation[J]. Ann Surg, 2002, 235(4):507-511.
- [18] Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, et al. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease[J]. Br J Surg, 2004, 91(1):72-77.
- [19] von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2000, 47(1):63-73.
- [20] McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, et al. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease[J]. Am J Pathol, 2003, 162(4):1355-1360.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 王宝德,陶庆松,嵇振岭,等.TGF- β 1 联合 TNBS 诱导 Crohn 病肠纤维化模型[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(9):1276-1280. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.023
Cite this article as: WANG BC, TAO QS, JI ZL, et al. Intestinal fibrosis model of Crohn's disease induced by TNBS with TGF- β 1[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(9):1276-1280. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.09.023