

• 方法探讨 •

对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨

宫健伟, 苑述刚, 阮时宝

(福建中医学院, 福建福州 350003)

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0070-02

溃疡性结肠炎(UC)又称非特异性溃疡性结肠炎,是一种病因不明的大肠粘膜的慢性炎症和溃疡性病变。临床以腹痛、腹泻、粘液便、血便等为主要表现。过去认为该病欧美多见,亚非较少,但据《世界华人消化杂志》对 1978 年以来几次重要的全国性消化会议的资料统计,该病发病率和患病率在我国有明显增加趋势^[1]。由于本病原因不明,治疗棘手,因此被世界卫生组织列为现代难治病之一。近年来,各地医家在中医药理论指导下,通过现代化科研方法研究中医药治疗本病的作用机制,取得了较大进展。这方面的研究以该病的动物模型为研究难点,模型的成功与否直接影响到科研的进度和结果。本文结合该病目前较公认的发病机制——免疫异常,对采用免疫方法制作 UC 动物模型作一评价。

1 溃疡性结肠炎与免疫异常

目前认为本病是由多因素相互作用所致,主要包括免疫、环境以及遗传等因素,其中免疫因素在溃疡性结肠炎的病因中发挥着重要作用。UC 患者常表现出免疫异常,如肠粘膜免疫细胞数量增多,肠局部体液或细胞免疫活性增强;糖皮质激素及免疫抑制剂治疗有效等。对免疫易感人群而言,诸多免疫因素可能触发一个连续的慢性免疫过程,参与此过程的细胞成分有中性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞、T 和 B 淋巴细胞、自然杀伤细胞等,这些效应细胞释出的抗体、细胞因子及炎症介质引起组织破坏与炎性病变。因此,肠粘膜免疫功能的异常可用来解释溃疡性结肠炎的临床和病理表现。中医认为“正气存内,邪不可干”。人体免疫功能正常可使机体内环境稳定,抗御病邪的侵入;反之则使内环境失衡,疾病乃生。因此免疫异常是引发溃疡性结肠炎的重要因素。

2 对 UC 动物模型的实践

采用免疫方法制备溃疡性结肠炎动物模型,在发病机制上更加接近本病的发病原理,且模型维持时间长,因而更多地被实验研究者所采用。目前此领域较常用的造模方法是免疫复合物/福尔马林模型和三硝基苯磺酸/乙醇模型。

2.1 免疫复合物/福尔马林模型 其制作原理是提供抗原的主动免疫,方法是:动物先被某种抗原全身致敏,然后局部滴

注该抗原产生损害。笔者参照徐叔云等^[2]稍作改进并加局部刺激造模。具体方法如下:取家兔新鲜结肠粘膜组织,用玻璃匀浆器制成匀浆, - 20℃ 下冷冻 24h,冻融后以 4000r/min 速度低温离心 30min,取上清液用双缩脲法测其蛋白含量,置入冰箱备用。使用时加入等量 Freund 完全佐剂,制成抗原乳化剂。各组造模大鼠均于第 1d 于大鼠左足跖注射抗原乳化剂 0.4mL(含抗原 4mg),于第 10、17、24、31d 分别于右足跖、腹股沟、腹腔、背部注射抗原乳化剂 0.8mL(含抗原 8mg,末次注射不加佐剂)。确定大鼠体内产生抗结肠抗体后,将大鼠用氯胺酮麻醉(100mg/kg),用 1.5% 的福尔马林 2mL 灌肠,留置 1h,用生理盐水洗净排出,再用抗原液 2mL(含抗原 8mg),不加佐剂灌肠,留置 2h,然后洗净排出。于上述处理第二天,大鼠出现软便、稀便,甚则脓血便,精神萎靡,呈拱背状。取 4 只大鼠处死取其结肠,病理显示粘膜表面部分糜烂,固有层存在少量慢性炎症细胞,但未见溃疡,可能与取材部位不当有关。笔者认为此种造模方法虽合乎 UC 发病机制,且达到全身免疫异常和局部炎症病变的结合,但模型制作过程较繁琐,周期较长,动物死亡率高,且重现性不理想,其肠道病理变化的程度与人类 UC 的病变过程不太符合,达不到科研实验的要求。

2.2 三硝基苯磺酸/乙醇模型 此模型是 1989 年由 Morris 等^[3]建立的细胞免疫法动物模型,目前在国内外应用较多。其方法是三硝基苯磺酸(TNBS)按一定剂量(100mg/kg)与一定浓度的乙醇混合制成 30% 乙醇灌肠液^[4],给大鼠灌肠后, TNBS 作为一种半抗原物质,与大分子组织蛋白结合后成为一种抗原物质,使 T 淋巴细胞致敏,溶解了与半抗原结合的动物自身细胞,从而导致肠道炎症的发生;TNBS 被代谢而产生 O_2^- 和 H_2O_2 ,这些活性氧及过氧化物对组织上皮细胞产生毒性而损伤肠壁。动物给予 TNBS 后其病理特点是组织呈一种慢性炎症反应,各种炎症介质也发生明显变化。该模型虽然有操作简便、重现性好、造模时间短、成功率高^[5]等特点,但笔者认为此种方法仅仅是 T 细胞介导的细胞免疫反应,不完全符合 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞混合浸润所致 UC 的要求;同时由于大鼠对局部免疫损伤有较强的修复能力,用此法制作的 UC 模型其病变维持时间不够长,据朱峰等^[6]报道,该模型只造成了 1 周左右的急性炎症和 3 周的慢性炎症。可见单纯的 TNBS/乙醇方法亦不容易达到理想 UC 动物模型的要求。

2.3 新 UC 动物模型的建立 由于 UC 为一慢性非特异性结

收稿日期: 2004-03-31

基金项目: 福建省自然科学基金课题(NO. C0210018)

通讯作者: 宫健伟, Tel: (0591) 3570981,

E-mail: jwgongfzh@ 163. com

肠炎,短暂的局部刺激不足以产生与人类 UC 接近的病变过程。因此,在目前尚无理想 UC 动物模型的情况下,笔者将以上两种造模方法结合,试以探讨建立新的 UC 动物模型。据报道,用荧光免疫法可显示溃疡粘膜内有 IgG、IgM、补体与纤维蛋白原沉积的免疫复合物^[7];同时 UC 患者的致敏淋巴细胞具有对结肠上皮细胞的细胞毒作用^[8]。可见,溃结的组织学改变是 B 细胞介导的体液免疫反应和 T 细胞介导的细胞免疫反应共同作用的结果,单纯的体液或细胞免疫反应异常不足以反映人类 UC 的病变过程,因此在模型制作时,应该将二者统一起来,这样即符合人类 UC 发病机制,又克服了上述两种方法的不足之处。其方法如下,先于大鼠足跖、腹股沟注射两次上述抗原乳化剂(每次含抗原 8mg),间隔时间为 2 周,在大鼠全身致敏、发生免疫异常的前提下,再用 TNBS(购于 Sigma 公司)与无水乙醇等体积配比的混合液按 100mg/kg 剂量局部灌肠,使大鼠肠道发生局部炎症变化。此方法既达到全身免疫异常与局部炎症病变的共存,又可产生与人类 UC 较为接近的临床症状及肠道病变情况。在局部灌肠后的第 5d,大鼠大便次数增多,且为稀便或粘液便,动物精神萎靡,体重减轻明显,瘦弱懒动,呈拱背状。分别于局部灌肠后第 3、6、9 周各取 4 只大鼠结肠组织,观察均可见粘膜充血、水肿,肠壁增厚,镜下表现为病变累及肠壁深层,溃疡明显,并有中性粒细胞浸润等炎症变化;大部分大鼠可见稀便或粘液便、精神萎靡等症状。第 12 周取 4 只大鼠结肠组织,观察仍可见肠壁增厚、狭窄,镜下见到肠壁纤维组织形成,部分仍有溃疡、中性粒细胞浸润等炎症变化。该模型方法重现性好、死亡率低、维持时间长,并且符合人类 UC 病变机制,既避免了免疫复合物/福尔马林模型繁琐、重现性差、死亡率高等缺点,又避免了三硝基苯磺酸/乙醇模型的单纯细胞免疫反应、维持时间短等缺点,取得了较为理想的人类 UC 的动物模型。

3 对 UC 动物模型的体会

胃肠道内有大量的抗原物质存在,如致病菌、正常菌群、细菌毒素、病毒、代谢的化学物质以及饮料与食物等。因此,肠免疫系统具有两个方面的功能,既要保护肠粘膜,抵御致病因子入侵;又要吸取营养物质,耐受正常的肠道菌群。所有这些肠内容物均可能是潜在的免疫源,但在机体具有正常调节能力时,不会发生炎症。肠上皮细胞粘膜屏障的破坏为大量摄取肠抗原创造了条件,无节制的免疫反应以及免疫调节失衡是溃疡性结肠炎的免疫学特征^[9]。上述造模方法中体现了这个发病过程中的重要环节,即乙醇是始发因素,起

破坏肠粘膜屏障的作用,使灌入的 TNBS 作为半抗原引发肠道局部的免疫损伤反应,结合大鼠全身免疫调节失衡,使炎症过程逐级放大,最后造成组织损伤以及结肠炎的病理变化和临床表现。

但此种模型制作方法仍然缺乏自发和复发的特点,即缺乏人类 UC 缓解和复发交替出现的特点。在以后的模型研究中,笔者认为应该着重考虑以下两点问题:第一是 UC 动物模型维持时间的问题,免疫方法制作 UC 动物模型虽然可以使结肠病变维持较长时间,但由于大鼠的肠道修复能力较强,故维持多久才能符合人类 UC 是今后应重点考虑的问题;第二是如何解决临床缓解和复发的问題,对于 UC 模型,能否做到给药则使病变缓解,停药后炎症又出现是我们今后需要进行探索和研究的内容。相信随着诸多研究者在此领域不断的努力和创新,更加理想的 UC 动物模型一定会逐渐符合人类 UC 的病变过程,为溃疡性结肠炎的药物治疗开辟更加广阔的新天地。

参考文献:

- [1] 江学良,权启镇,王志奎. 溃疡性结肠炎的诊断和治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2000, 8(3): 332-342.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1161.
- [3] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96: 795-811.
- [4] 郑礼,高振强,王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(4): 370-372.
- [5] 王少华,钟鸣,陈锦先,等. 丹参与溃疡性结肠炎鼠结肠粘膜 SOD 活性和 MDA 含量影响的实验研究[J]. 中国肛肠病杂志, 2000, 20(7): 3-5.
- [6] 朱峰,钱家鸣,潘国宗. 细胞免疫反应性炎症性肠病动物模型的建立[J]. 中国医学科学院学报, 1998, 20(4): 271-277.
- [7] 池肇春. 实用临床胃肠病学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001. 964-965.
- [8] 于皆平,沈志祥,罗和生. 实用消化病学[M]. 北京: 科学出版社, 1997. 720.
- [9] 余保平,王伟岸. 消化系疾病免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 190.