

专题介绍

小鼠动物实验方法系列专题(三)

小鼠是生命科学研究和医学研究的重要模式生物。随着小鼠基因组测序计划的完成,国际上明显加速了在这方面研究的投入和部署。从2005年起,美国、欧盟、加拿大等批准了一系列重大科学计划,开展基因工程小鼠的大规模研制,这些项目包括美国国立卫生院的小鼠基因剔除计划(KOMP, <http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout>)、欧盟第七框架的欧洲小鼠条件性剔除计划(EuCOMM, <http://www.eucomm.org>)和加拿大的北美小鼠条件性剔除计划(NorCOMM, <http://norcomm.phenogenomics.ca/index.htm>)等。中国也在2006年由科技部立项、上海南方模式生物研究中心牵头启动了中国的小鼠条件性基因敲除计划,该计划支持了国内几十个高校和研究所150种条件性基因敲除小鼠模型的建立。随着这些研究计划的快速进展,大量基因工程小鼠模型成为科学界的共同资源,这将对功能基因组和人类疾病治疗的机制以及新药的研发产生重大而深远的影响。为帮助读者能更好地利用这些小鼠资源开展研究,我们将从本期开始以专栏形式陆续刊登介绍小鼠动物实验技术的文章,也欢迎读者能够踊跃投稿,把自己手头正在做的小鼠动物实验技术方法和心得体会介绍给大家,一起来分享实验过程中的得失和快乐。

三硝基苯磺酸诱导的C57/BL6小鼠结肠炎模型的建立方法

刘震泽¹ 严惠敏² 王维刚^{1*}

(¹同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心,上海 201210)

摘要 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的小鼠结肠炎模型是研究人类炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的主要手段之一,但在实际应用中,常用的C57/BL品系小鼠却对TNBS有较高耐受性,不易建模。本文主要介绍一种可以有效诱导C57/BL6小鼠TNBS结肠炎的方法,并对疾病评价指标进行了具体的描述。对基因工程小鼠IBD模型的研究具有重要意义。

关键词 炎症性肠病;三硝基苯磺酸;动物模型;C57/BL6

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类严重影响人们生活质量的慢性疾病,根据其病理特征可分为克罗恩氏病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)^[1]。目前对IBD的病理机制尚不完全清楚,但通过对实验诱导的动物结肠炎模型的研究,研究者发现,IBD可能与肠道共生菌群^[2]、炎症因子^[3]、环境以及遗传有关。肠道内菌群分布的改变以及黏膜免疫系统对其识别作用的变化,都可能是IBD发病的原因^[4,5]。免疫学分析显示:

多种免疫细胞^[6,7]及其分泌的细胞因子^[8,9]参与调控IBD,而NF- κ B^[10,11]可能是这种调控的上游通路,这为新药研发提供了潜在靶点^[12]。此外心理压力和焦虑也会加重IBD的症状^[13]。

三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎模型,是研

收稿日期:2010-11-23 接受日期:2011-01-26

国家高新技术研究发展计划(863计划, No.2008AA02Z126)和上海市科委(No.1014 0901400)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-65986853, E-mail: weagonwong@gmail.com

究IBD最常用的鼠类模型之一。模型最早由Morris等^[14]于1989年在大鼠上建立,而后又于1995年在小鼠^[15]上成功诱导。模型以直肠给药的方式,将TNBS与酒精的混合物灌入动物结肠中诱导炎症。其中酒精用来破坏肠黏膜屏障,从而使TNBS能够进入肠壁,并与肠道细菌和机体自身蛋白作用形成抗原,诱导免疫致敏反应。模型建立后,实验动物会出现精神萎靡、体重减轻、腹泻、便血、肠壁增厚等症状。其免疫反应以TH1型反应为主,表现为细胞因子如肿瘤抑制因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白介素12 (IL-12)等分泌水平上调^[16]。

TNBS诱导的结肠炎模型是一种急性的炎症模型,具有操作简单、造模快、成本低、重建性好等优点。然而该模型对小鼠品系要求较高,已知BALB/c和SJL/J小鼠的模型的敏感性较好,而C57/BL品系则对TNBS耐受^[16,17],不易建模。由于目前多数研究用基因工程小鼠是C57/BL背景,因此建立一套能在C57/BL6小鼠中有效诱导TNBS结肠炎的方法,对IBD研究具有重要意义。以下介绍一种可以有效诱导C57/BL6小鼠产生结肠炎表型的建模方法,并对模型临床评分和病理评分标准进行具体描述。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

TNBS致敏液:浓度为1 mol/L的TNBS (Sigma公司)水溶液、水、无水乙醇按体积比3.5: 11.5: 15混合,制成含3.5%TNBS的50%酒精溶液;麻醉剂:戊巴比妥钠(Sigma公司)按照质量体积比配成1%溶液;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS);10%中性甲醛固定液;便隐血检测试纸(珠海贝索生物技术有限公司);小鼠灌肠(胃)针头及100 μ l微量注射器(上海玻利鸽工贸有限公司)。

1.2 实验动物

9周龄健康雄性C57/BL6小鼠12只,体重20~26 g,随机分成两组,每组6只。小鼠饲养在恒温(21~22 $^{\circ}$ C)房间,12 h光暗循环。

1.3 模型建立及评价

1.3.1 动物准备 实验动物在诱导模型前,先适应饲养环境一周。

1.3.2 肠炎诱导 戊巴比妥钠按照体重0.01 ml/g,腹腔注射麻醉小鼠。用连有灌肠针的微量注射器抽取TNBS致敏液60 μ l,小心的将针头探入小鼠肛门内,深至3~4 cm,过程中避免碰伤肠壁,缓缓推入药液。对照组给予相同体积的50%酒精溶液,灌肠完毕后缓慢拔出针头。为确保致敏液与肠道充分作用,将小鼠头朝下,固定在一个45 $^{\circ}$ 角倾斜的平面上,静置30 min。间隔1 h后,再进行一次同样的给药操作。小鼠苏醒后,将小鼠放回笼中。

1.3.3 临床观察 每天记录小鼠体重两次,取平均值。并采集小鼠新鲜粪便,按照表1标准,对小鼠进行双盲法临床评分。该标准参考并适当改进了Cooper等^[18]所采用的评分方法。具体评分由粪便粘稠度、便血、体重下降三部分组成,每项最高4分,总分范围在0~12之间。

1.3.4 炎症标本采集及分析 建模后第4天,将小鼠颈椎脱臼处死,取结肠组织,用PBS将肠内容物冲洗干净。记录结肠长度及重量。截取横结肠中段1 cm,浸泡于中性甲醛固定24 h,并进行切片及H&E染色。结肠及周围组织结构见图1。

对切片结果按照表2标准进行双盲法病理评分。该标准参考并适当改进了Obermeier等^[19]的评分方法,其具体评分由黏膜破坏和炎症细胞浸润两部分组成,每项最高4分,总分范围在0~8之间。

以下通过一组实例解释模型的组织学评分方

表1 临床评分标准

Table 1 Clinical scoring standard

粪便粘稠度	便血	体重下降
Stool consistency	Fecal blood	Body weight loss
0: Normal	0: No bleeding	0: None
1: Wet stools		1: 0~5% weight loss
2: Soft stools with sticking surface	2: Slight bleeding	2: 5%~10% weight loss
3: Loose stools	3: Moderate bleeding	3: 10%~15% weight loss
4: Watery diarrhea	4: Severe bleeding	4: More than 15% weight loss

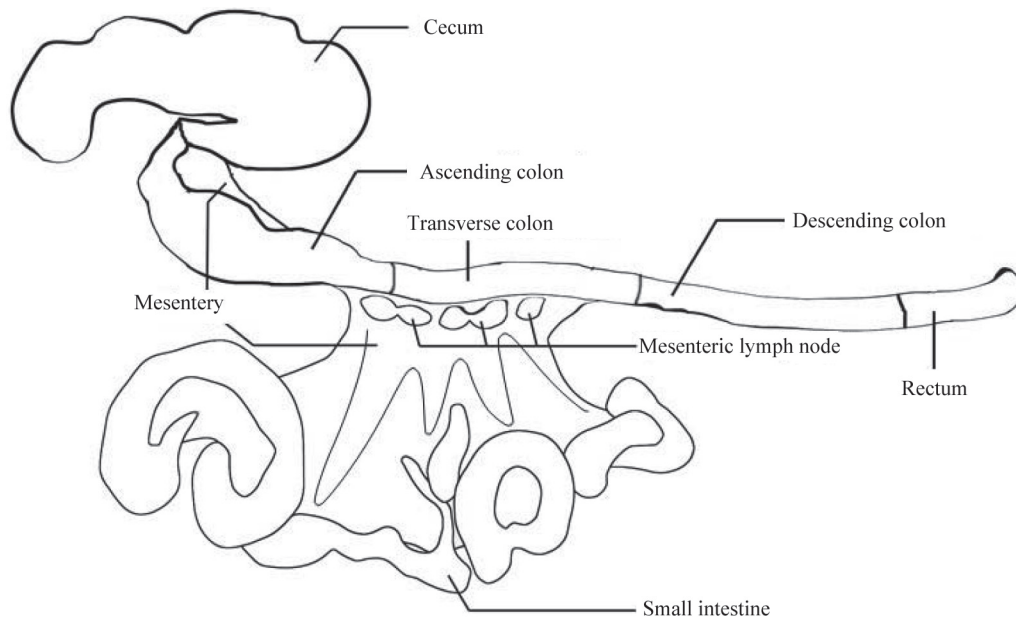


图1 结肠周围组织示意图

Fig.1 Schematic diagram of the organizations surrounding colon

表2 组织病理学评分标准

Table 2 Histopathology scoring standard

粘膜层损伤	炎症细胞浸润
Mucous membrane damage	Infiltration of inflammatory cells
0: None	0: None
1: Minimal loss of goblet cells	1: Infiltration around crypt bases
2: Extensive loss of goblet cells	2: Moderate Infiltration to lamina propria and crypt bases
3: Minimal loss of crypts and extensive loss of goblet cells	3: Infiltration in muscularis mucosa with slight edema
4: Extensive loss of crypts and goblet cells	4: Extensive infiltration of submucosa with severe edema

法。结肠切片的组织学结构(图2J)分为黏膜层(mucous layer)、黏膜固有层(lamina propria)、黏膜下层(submucosa)和黏膜肌层(muscularis mucosa)。其中黏膜层由很多管状的隐窝(crypts)结构组成, 隐窝内又含有大量分泌粘液的杯状细胞(goblet cells)。隐窝和杯状细胞结构的完整性对黏膜功能的维持具有重要作用。正常的结肠组织(图2A~图2C), 其隐窝结构完整, 杯状细胞未见破坏, 少量炎性细胞位于隐窝周围; 而中度炎症(图2D~图2F)则表现为大量炎症细胞浸润到隐窝和黏膜固有层, 并伴有明显的杯状细胞破坏消失; 当炎症发展到重度(图2G~图2I)时, 其隐窝和杯状细胞结构已基本消失, 大量炎症细胞浸润, 黏膜下层出现严重的水肿。

2 结果

TNBS给药后, C57/BL6小鼠出现了持续的体重下降, 这与文献报道一致, 而酒精对照组小鼠, 只在灌肠后第1天体重略有下降, 之后便很快恢复到正常水平(图3A)。临床观察显示, TNBS组小鼠给药后出现精神萎靡、虚弱消瘦、活动性降低、毛发杂乱等表现; 并伴有粪便稀稠症状, 便隐血检测结果为阳性。实验组与对照组整体临床评分在第4天差异达到最大(图3B)。建模后第4天断颈处死小鼠, 观察结肠组织表观形态: 酒精对照组小鼠结肠形态正常、有弹性; TNBS组肠壁则有明显的僵硬、增厚、充血等现象, 严重者局部肠道出现溃疡糜烂等症状。结肠称重结果表明: 实验组小鼠单位长度结肠重量大

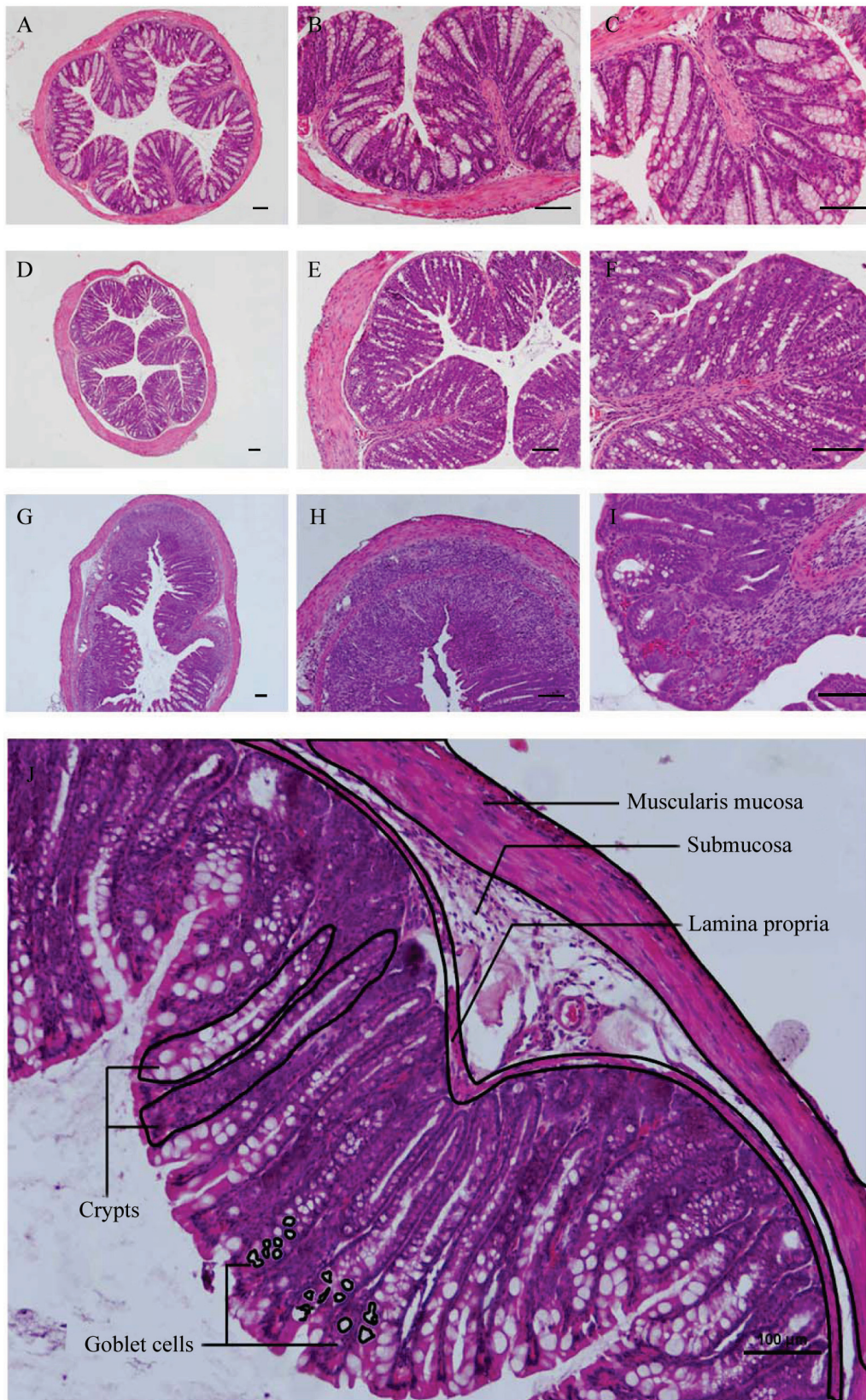


图2 组织学评分实例

轻度(A、B、C)、中度(D、E、F)、重度(G、H、I)IBD小鼠结肠组织H&E染色结果以及肠切片组织病理学结构示意图。标尺=100 μm。

Fig.2 Examples for histological scoring

H&E strained colon sections of slight (A, B, C), moderate (D, E, F), severe (G, H, I) colitis and the schematic diagram of the histopathology structure of colon slice. Bar=100 μm.

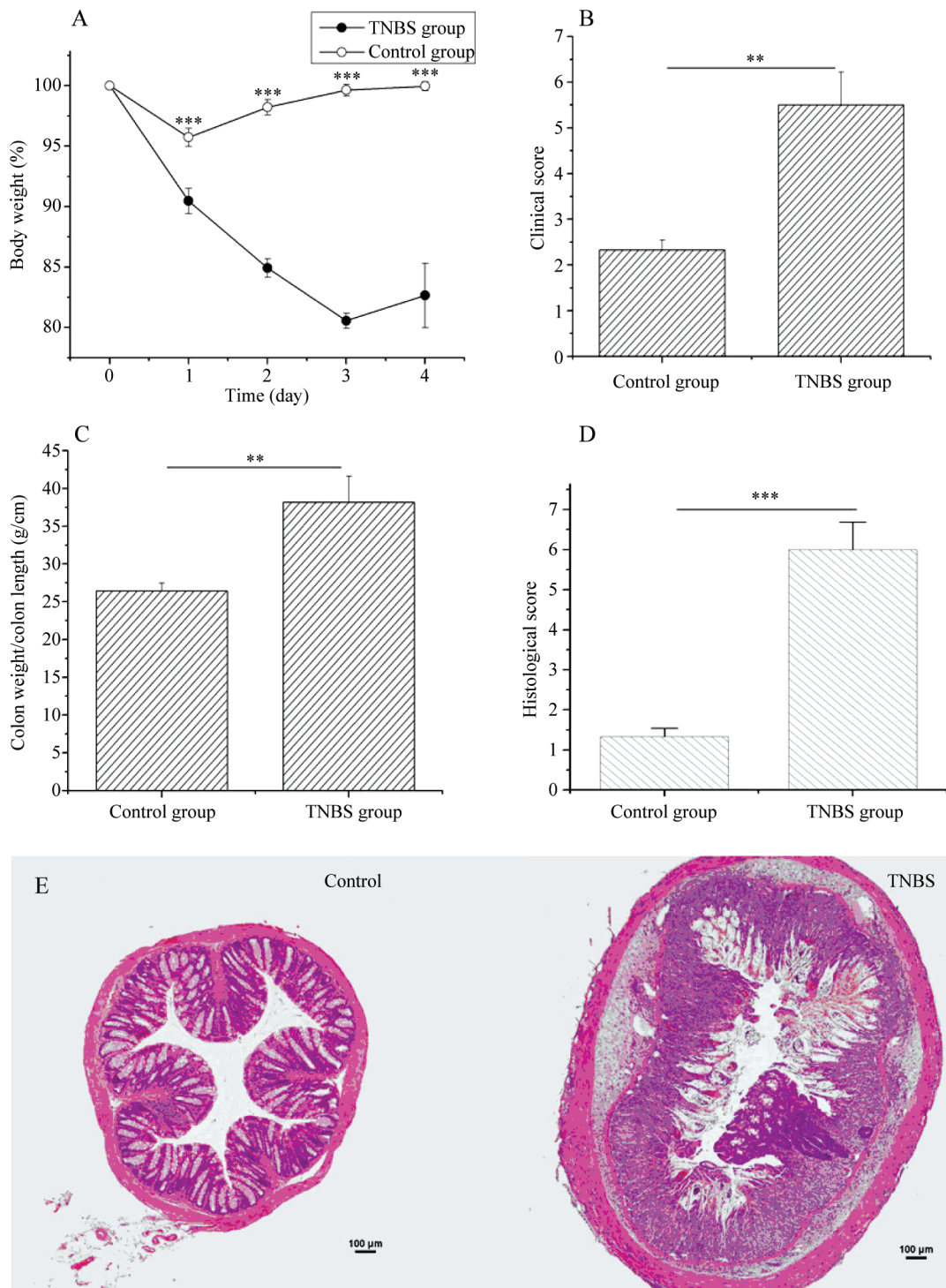


图3 TNBS 给药诱导C57/BL6小鼠产生结肠炎

3.5% TNBS(溶于50%酒精)通过直肠给药的方式诱导C57/BL6小鼠结肠炎, 对照组只给50%酒精, 模型诱导后观察小鼠体重变化(A)及临床评分(B), 第4天处死小鼠, 取结肠组织, 测量其重量和长度, 计算出单位长度的重量(C)。对结肠进行H&E染色(E), 并对切片结果进行病理学评分(D)。数据以mean \pm SEM表示, $n=5$, * $P<0.01$, ** $P<0.005$, *** $P<0.0001$ 。

Fig. 3 Administration of TNBS induced colitis in C57/BL6 mice

Colitis in C57/BL6 mice was induced by rectally administration of 3.5% TNBS in 50% ethanol, and mice treated with 50% ethanol were used as controls. Body weight changes (A) and clinical scores (B) were recorded daily. Mice were sacrificed at the 4th day after TNBS administration. Colons were collected to measure the weight and length, which were used to calculate the weight of unit length of colon (C). Colon was stained with H&E (E), on which histological scoring (D) was performed. Data are mean \pm SEM, $n=5$, * $P<0.01$, ** $P<0.005$, *** $P<0.0001$.

于对照组小鼠,说明建模后,小鼠肠壁出现水肿增厚(图3C)。对两组小鼠横结肠切片H&E染色结果分析显示:对照组小鼠隐窝结构完整,杯状细胞形态和数目正常,少量炎性细胞位于黏膜固有层和隐窝基部;实验组小鼠肠壁增厚明显,隐窝结构大面积破坏,同时大量炎症细胞浸润到黏膜层和黏膜下层,造成杯状细胞破坏、消失和肠壁水肿(图3E),对应的病理评分结果也表明两组之间存在统计学差异。

统计学分析采用双样品 t 检验法,各组数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示,当 $P < 0.01$ 时,认为两组样品之间有统计意义的差异。

3 讨论

TNBS诱导的小鼠结肠炎模型是研究人类IBD的重要手段,被广泛地应用于IBD致病机理的研究、细胞因子间相互作用、抗炎药物开发^[20,21]等领域。然而由于TNBS耐受的原因,该模型在以C57/BL为背景的基因工程小鼠中的应用受到很大限制。因此,建立一套可以在C57/BL品系下实现TNBS诱导小鼠结肠炎模型的方法,对于研究基因与IBD的关系具有重要的应用意义。

传统的TNBS诱导结肠炎模型主要应用于BALB/c和SJL/J小鼠中,建模方法采用2.5% TNBS溶于50%酒精,通过直肠给药方式注入小鼠肠道,给药后倒悬小鼠1 min左右以确保药液和小鼠肠道充分接触。诱导结肠炎后的小鼠会出现持续的消瘦、精神萎靡、腹泻并伴有便血等症状,病理分析表现为黏膜结构破坏、炎症细胞浸润、肠壁增厚水肿等现象。相对于BALB/c和SJL/J品系,C57/BL6小鼠对TNBS更加耐受,笔者预实验发现,传统的方法并不能有效的诱导C57/BL6小鼠产生结肠炎。小鼠造模期间未出现体重持续下降以及腹泻等现象,病理切片分析也未发现有明显炎症表现。

本实验方法通过提高TNBS的给药浓度并延长其与肠道的作用时间,有效诱导C57/BL6小鼠产生结肠炎。实验结果表明:小鼠出现了体重持续下降、腹泻、便隐血等症状;H&E病理切片结果也显示出隐窝结构破坏、炎症细胞浸润及肠壁水肿增厚,这与文献报道的模型表型一致。为提高模型成功率,以下几点需要注意:(1)本实验采用TNBS浓度为3.5%,但在具体实验中,小鼠在年龄、性别、基因(基因工程小鼠)上存在差异,导致TNBS最佳诱导浓

度可能不同,因此实验前应先进行预实验,确定合适的浓度条件。(2)常规的模型诱导方法采用的是一次给药的方式,但在灌肠给药过程中,小鼠受刺激排便导致大量药液随粪便流出,这对实验效果影响较大。采用两次给药的方式,先排空肠道内粪便,第二次给药TNBS与肠道的作用时间就更长,模型诱导成功率更高。(3)灌肠时动作要轻缓,不要扎破肠壁,以免造成不必要的死亡,影响实验数据准确性。(4)小鼠麻醉期间要控制好实验环境温度,最好准备一块37℃热板,帮助保持小鼠体温,防止小鼠因体温下降导致死亡。

综上所述,本文介绍了有效诱导C57/BL6小鼠TNBS结肠炎模型的方法,该方法对基因工程小鼠IBD模型的研究具有重要意义。

参考文献(References)

- Poxton IR, Brown R, Sawyerr A, Ferguson A. Mucosa-associated bacterial flora of the human colon. *J Med Microbiol* 1997; 46(1): 85-91.
- Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(9): 503-14.
- Fichtner-Feigl S, Strober W, Geissler EK, Schlitt HJ. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S24-7.
- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453(7195): 620-5.
- Boirivant M, Amendola A, Butera A. Intestinal microflora and immunoregulation. *Mucosal Immunol* 2008; 1 (Suppl 1): S47-9.
- Middendorp S, Nieuwenhuis EE. NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2009; 2 (5): 393-402.
- Monteleone I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-23 and Th17 cells in the control of gut inflammation. *Mediators Inflamm* 2009; 2009: 297645.
- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, *et al.* Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(3): 341-52.
- Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 2000; 30(5): 1486-95.
- Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, *et al.* Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* 2001; 121(6): 1372-9.
- Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A. Treat-

- ment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 2005; 115 (11): 3057-71.
- 12 Joh EH, Lee IA, Han SJ, Chae S, Kim DH. Lancemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF-kappaB activation in TNBS-induced colitis mice. *Int J Colorectal Dis*; 25(5): 545-51.
- 13 Xu Y, Hunt NH, Bao S. The effect of restraint stress on experimental colitis is IFN-gamma independent. *J Neuroimmunol* 2008; 200(1-2): 53-61.
- 14 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 795-803.
- 15 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182(5): 1281-90.
- 16 te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(10): 995-9.
- 17 Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(11): 1073-83.
- 18 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2): 238-49.
- 19 Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Scholmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116(2): 238-45.
- 20 Gonzalez-Rey E, Varela N, Sheibanie AF, Chorny A, Ganea D, Delgado M. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(11): 4228-33.
- 21 Cetinel S, Hancioglu S, Sener E, Uner C, Kilic M, Sener G, *et al.* Oxytocin treatment alleviates stress-aggravated colitis by a receptor-dependent mechanism. *Regul Pept*; 160(1-3): 146-52.

A modified Method to Induce Colitis Model by TNBS in C57/BL6 Mice Strain

Zhen-Ze Liu¹, Hui-Min Yan², Wei-Gang Wang^{1*}

¹*School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;*

²*Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)*

Abstract Mice colitis model induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid is one of the most common method used for human IBD (inflammatory bowel disease) research. However, it is difficult to induce colitis in C57/BL mice strain for its tolerance to TNBS. In this article, we introduced an effective method for inducing colitis model in C57/BL6 mice, and described the details of evaluation index for IBD degree. The establishment of the method for inducing colitis model by TNBS in C57/BL6 mice will make a significant contribution to research in IBD with genetic engineering mouse.

Key words IBD; TNBS; animal model; C57/BL6

Received: November 23, 2010 Accepted: January 26, 2011

This work was supported by the National Natural High-tech R&D Program of China (No.2008AA02Z126) and Program of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (No.10140901400)

*Corresponding author. Tel: 86-21-65986853, E-mail: weagongwong@gmail.com