

树鼩胆石模型与消化道P物质相关的研究

吕龙宝¹, 陈丽雄², 王俊斌², 刘汝文³, 陈丽玲^{4*}

(1. 中国科学院昆明动物所, 昆明 650032; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明 650118;
3. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 4. 昆明医科大学临床技能中心, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨高胆固醇饲料饲喂树鼩建立树鼩胆石模型与P物质(substance P, SP)的关系。**方法** 通过建立树鼩胆石模型, 检测消化道SP免疫组化的表达, 模型组与对照组进行比较分析。**结果** 模型组与对照组相比, 树鼩消化道SP免疫组化表达含量比对照组低($P < 0.05$), 树鼩胆石模型与SP表达水平呈负相关。**结论** 树鼩胆囊结石与消化道分泌激素调节机制有关。

【关键词】 P物质; 树鼩; 胆石模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0040-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.007

Substance P in the digestive tract of a tree shrew cholesterol-induced gallstone model

LYU Longbao¹, CHEN Lixiong², WANG Junbin², LIU Ruwen³, CHEN Liling^{4*}

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032, China. 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118. 3. Department of Experimental Animal, Kunming Medical University, Kunming 650500. 4. Clinical Skills Center, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Objective To investigate the possibility of establishing the high-cholesterol forage-feeding tree shrew as a cholesterol-induced gallstone model and to determine the association of substance P (SP) with this model. **Methods** Upon establishment of the tree shrew cholesterol-induced gallstone model, the SP expression of the digestive tract was detected with immunohistochemistry method and compared among the model groups and the control group. **Results** In the model groups, immunohistochemistry showed that gastrointestinal SP expression was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The tree shrew gallstone model was negatively correlated with SP expression level. **Conclusions** Tree shrew gallstones are associated with the regulation mechanisms of hormone secretion in the digestive tract.

【Keywords】 substance P; tree shrew; gallstone model

随着经济的发展,人们生活水平的提高、生活方式和饮食结构的改变,肉食增加导致脂肪肝、胆囊结石的发病率逐年升高,已经成为临床中的常见病、多发病。胆囊结石形成的机制尚不十分清楚^[1]。胆囊结石动物模型建立方法简单、效果确

切,可以为研究胆结石成因及其防治提供巨大方便。树鼩在众多的疾病替代模型中,很少有人用其研究胆囊结石。饮食诱导树鼩胆囊胆固醇结石形成过程中,消化道屏障功能可能存在异常,虽然树鼩食物排空比其它动物快,但成模周期相对快

【基金项目】 云南省应用基础研究面上基金资助项目(编号:2015FB020)。

【作者简介】 吕龙宝(1973—),男,教授,硕士,研究方向:兽医临床与实验动物管理。E-mail: lvlb2006@163.com

【通信作者】 陈丽玲(1974—),高级实验师,博士,研究方向:动物内科性疾病。E-mail: kmyxy18@sina.com

速。本文从消化道 P 物质(substance P, SP)的免疫组织含量分析研究树鼩胆石症的相关性及其胆石模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

据 3R 原则尽量减少动物使用量,从中国科学院昆明动物研究所动物实验中心购买 36 只普通级成年树鼩 I 级(F3 代),规格:雌:雄(1:1),体重 121~140 g[SCXK(滇)K2017-003]。分组:对照组 6 只,胆固醇低、中、高剂量组各 10 只树鼩。所有动物在实验前预适应饲养在中国科学院昆明动物研究所动物实验中心的普通环境 2 周后再进行实验;树鼩采用单笼饲养,人工光照 12 h(时间 07:00~19:00)拟黑夜、白天交叉光照,饲养房中室温控制在 $(21 \pm 3)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~60%[SYXK(滇)K2017-008],让树鼩自由饮水和采食。每天打扫清理饲养笼具一次,预饲养后正常开始实验喂养。本实验方案研究经由实验动物使用与管理委员会审批,通过中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准(批准号:KPRC-2017006)。

1.2 主要试剂与仪器

饲料及处理:基础树鼩饲料来自昆明医科大学实验动物中心,按照美国营养学会啮齿类 AIN-93 标准配方改制^[2]:含粗蛋白 23.1%,粗脂肪 6%。制石饲料为基础饲料加 10% 猪油,0.5、1.0、1.5% 胆固醇分 A、B、C 三个剂量组合成小颗粒饲料。

戊巴比妥钠(上海化学试剂公司,进口分装,批号:F20140915);Bouins 液(自制:苦味酸饱和水溶液 75 mL,甲醛 25 mL,冰醋酸 5 mL);tween-20(济宁中坚科技有限公司,批号:9005645);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(批号:1E31-20 2016923);高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(批号:3K33-21 2016923);甘油三酯(TG)(批号:7D74-21 2016423);总胆固醇(TC)(批号:7D62-21 2016423)。雅培 Ci16200 全自动生化分析仪;徕卡 RM2235 型切片机;Olympus 显微镜。

1.3 实验方法

1.3.1 指标采集

所有树鼩在造模后测量每周的空腹体重。测量时必须空腹 12 h,装入保定袋称净体重;另外,分别于造模前空腹采股静脉血 1 mL、造模中每 4 周采股静脉血 1 mL,检测空腹状态下低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三

酯(TG)及总胆固醇(TC)等生化指标。所有指标检测在云南省第一人民医院进行(雅培全自动生化分析仪 Ci16200)。

1.3.2 取材

从第 4、8 周部分树鼩采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射安乐死,然后取材按消化道从上至下各段:先用生理盐水冲洗干净,再依次切下从食管取到直肠。将所有样本用 Bouins 液改良后固定,固定液覆盖样本超出 3 cm 高,固定 24 h,用 80%、95%、100% 的乙醇脱水、用二甲苯渐续透明,浸蜡(恒温 55 $^{\circ}\text{C}$)3 h 包埋,取出蜡块放冰箱固定,修蜡块切片,按 5 μm 厚切,用毛笔挑起切片放于 43 $^{\circ}\text{C}$ 水中展片,用铬矾明胶贴在干净的载玻片上,放于温箱调于 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘片备用。取胆囊和胆汁常规病理切片检测结石情况。

1.3.3 免疫组织化学方法

常规石蜡切片脱蜡复染。先消除内源性过氧化物酶的活性,切片放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 3% H_2O_2 甲醇溶液孵育 15 min,然后滴加山羊血清封闭液,置于室温孵育 20 min,意在封闭非特异性反应区。甩去多余液体,滴上一滴一抗 50 μL (稀释倍数为 1:50 SP 抗血清),置载玻片于室温静置 1 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。如在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜需要在 37 $^{\circ}\text{C}$ 复温 45 min, PBS 液冲洗 3 次,再滴加二抗 45~50 μL (稀释倍数 1:100 羊抗兔 IgG·抗血清),静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅 1 h。滴加 0.05% tween-20。滴加显色液 DAB- H_2O_2 5~10 min,显微镜下观察染色深浅, PBS 液冲洗 3 次 10 min,用苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10~15 min,脱水、透明、封片、镜检。

1.4 统计学方法

统计学分析方法是采用 SPSS 17.0 版软件,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据资料统计后,组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组血脂测定结果

对照组与模型组树鼩不同时间段血脂指标变化见表 1。各组血脂测定结果显示:模型组与对照组比较,第 4 周和第 8 周 TC 浓度升高差异有显著性($P < 0.01$);模型组第 8 周与第 4 周比较差异无显著性($P > 0.05$),说明模型组在第 4 周时血液总胆固醇含量已处于较高水平,继续喂含高胆固醇的饲料并不能进一步增高血液总胆固醇浓度。模型组与对照组比较,第 4 周和第 8 周 TG 浓度升高差异

有显著性($P < 0.05$);模型组与对照组比较,第4周和第8周 HDL-C 降低差异有显著性($P < 0.01$), LDL-C 升高差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 树鼩成活、成石情况

比较发现饲料含 1.0% 胆固醇饲养树鼩成模较好,死亡率较低,结果见表 2。

2.3 模型组与对照组胆囊的 SP 含量比较结果

用 ABC 免疫组织化学法,根据着色深浅,区别组织中 SP 含量;胆囊组织切片中细胞胞质内出现明显的黄色颗粒,属于 SP 蛋白阳性表达,无黄色颗粒是阴性。使用计算机图像分析技术半定量检测

其阴、阳性蛋白表达的强弱,用平均光密度值大小表达强弱,密度值越大反映细胞内 SP 蛋白表达量越多;平均光密度值越低,胆囊组织 SP 蛋白表达结果越弱。结果见表 3。

2.4 树鼩胆囊胆固醇结石 4~8 周组织变化

经比较,选择较好的组织图片,如图 1 所示。组织图片显示:对照组胆囊组织 P 物质表达出现较多;4 周模型 B 组胆囊内膜结构紊乱,有絮状网形成,胆汁浑浊;8 周模型 B 组胆固醇晶体沉积,有积聚状态即可行成核团框架石头;模型 B 组胆囊组织 P 物质表达出现减少,结石形成。结果如图 1。

表 1 树鼩不同时间段血脂指标变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)
Table 1 Changes of blood lipid index in tree shrews in different time periods

指标 Indices	组别 Groups	<i>n</i>	0 周 0 week	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
甘油三酯 (mmol/L) Triglyceride (TG)	对照组 Control group	6	0.38 ± 0.16	0.54 ± 0.16	0.52 ± 0.20
	模型 A 组 Model group A	10	0.48 ± 0.26	0.89 ± 0.33 *	0.64 ± 0.19
	模型 B 组 Model group B	10	0.44 ± 0.10	0.75 ± 0.24 *	0.55 ± 0.20
	模型 C 组 Model group C	10	0.42 ± 0.21	0.69 ± 0.18	0.81 ± 0.36 *
总胆固醇 (mmol/L) Total cholesterol (TC)	对照组 Control group	6	1.90 ± 0.45	1.99 ± 0.40	2.0 ± 0.35
	模型 A 组 Model group A	10	2.15 ± 0.56	2.05 ± 0.46	2.15 ± 0.46
	模型 B 组 Model group B	10	2.10 ± 0.26	2.54 ± 0.55 *	2.20 ± 0.57
	模型 C 组 Model group C	10	1.98 ± 0.20	2.18 ± 0.18 *	2.26 ± 0.37
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) High density lipoprotein cholesterol (HDL-C)	对照组 Control group	6	1.56 ± 0.25	1.54 ± 0.33	1.49 ± 0.37
	模型 A 组 Model group A	10	1.62 ± 0.51	0.88 ± 0.21 *	0.97 ± 0.26 *
	模型 B 组 Model group B	10	1.60 ± 0.26	0.91 ± 0.36 *	1.12 ± 0.26
	模型 C 组 Model group C	10	1.57 ± 0.20	0.86 ± 0.20 *	0.94 ± 0.23 *
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)	对照组 Control group	6	1.09 ± 0.15	1.12 ± 0.18	1.08 ± 0.22
	模型 A 组 Model group A	10	1.0 ± 0.51	2.01 ± 0.43 **	1.99 ± 0.31 *
	模型 B 组 Model group B	10	1.21 ± 0.22	2.20 ± 0.29 **	2.05 ± 0.43 *
	模型 C 组 Model group C	10	1.12 ± 0.19	2.09 ± 0.19 **	2.10 ± 0.26 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 不同剂量胆固醇饲养 8 周各组动物成模率、死亡率比较

Table 2 Comparison of model success rates and mortality rates of tree shrews in each group after feeding for 8 weeks with different doses of cholesterol

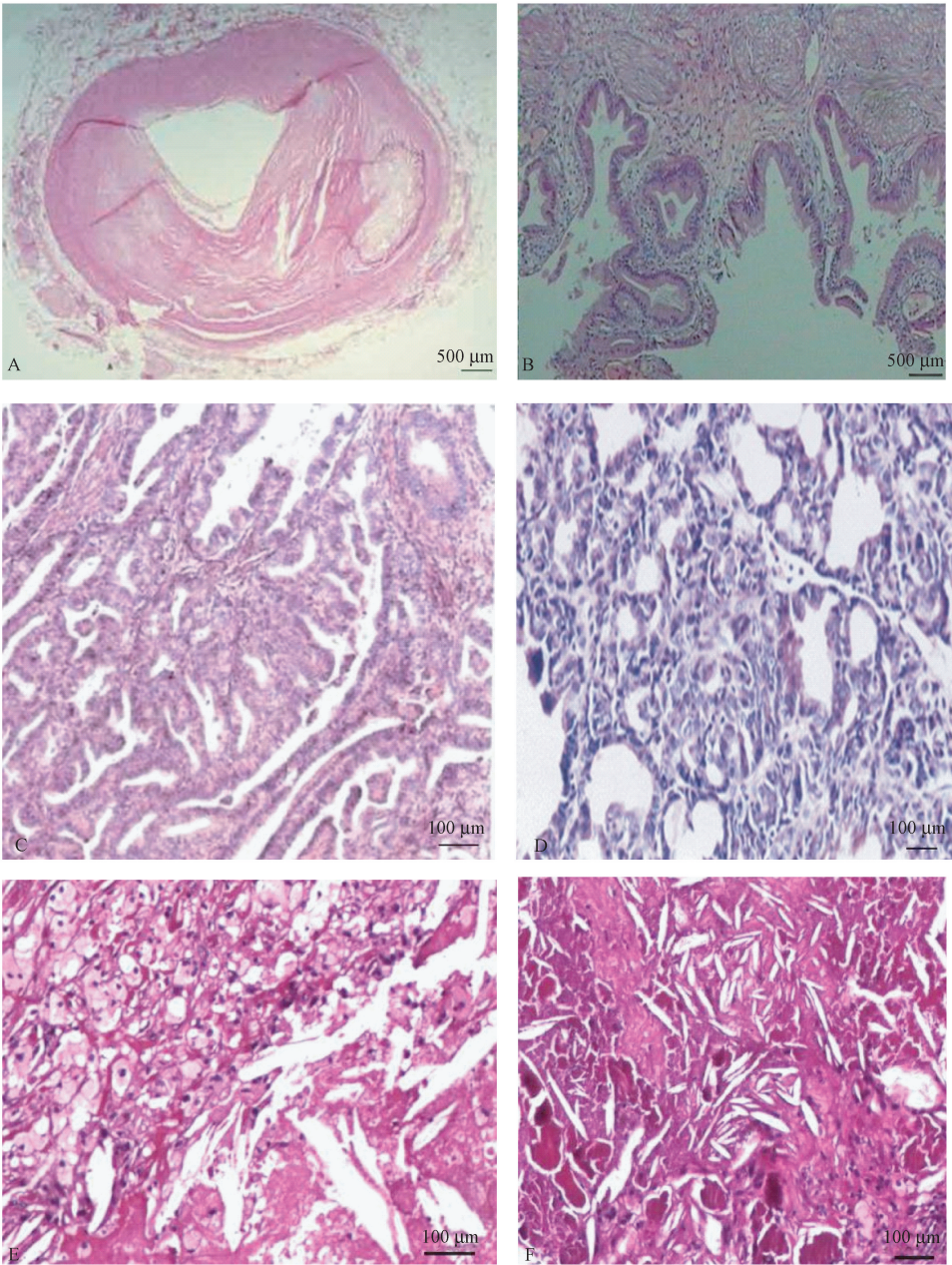
组别 Groups	总数 Total number	成模率(%) Success rate	死亡率(%) Mortality rate
对照组 Control group	6	0	0 (0.0%)
模型 A 组 Model group A	10	7 (70%)	1 (10%)
模型 B 组 Model group B	10	8 (80%)	1 (10%)
模型 C 组 Model group C	10	7 (70%)	3 (30%)

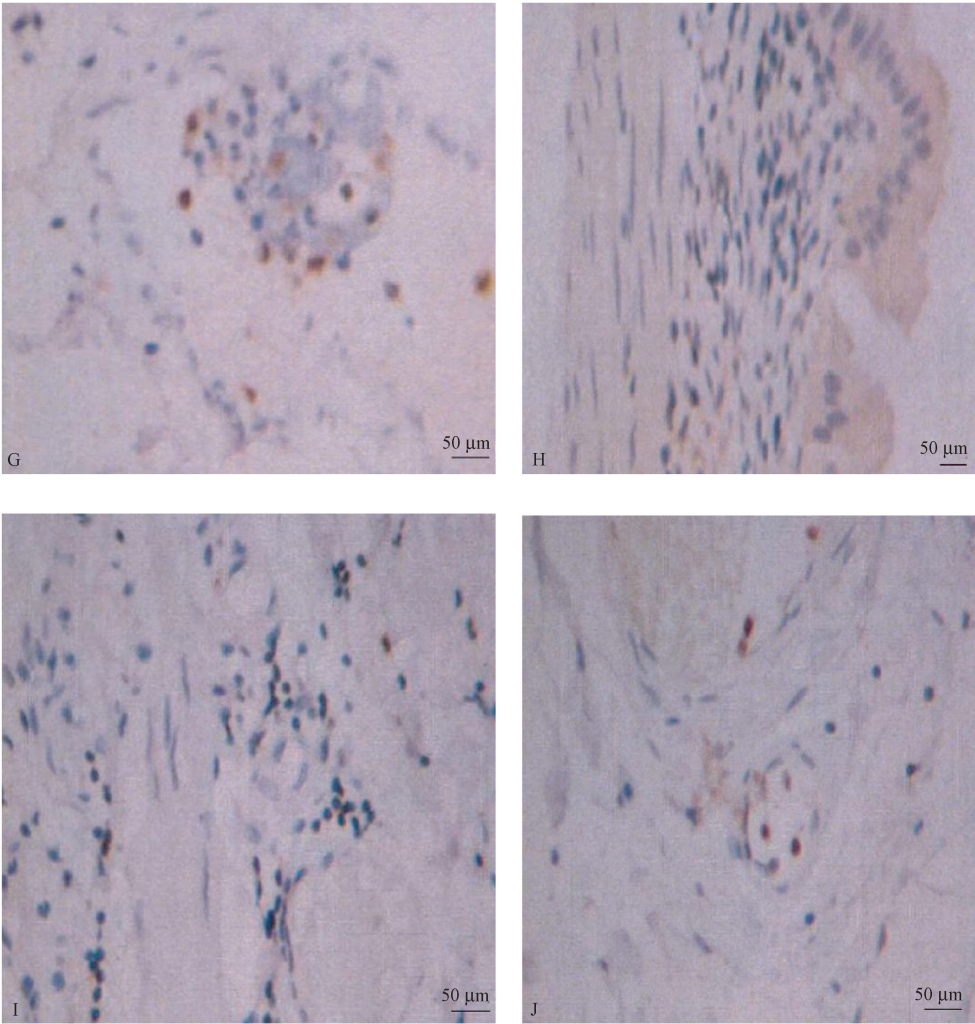
表 3 模型组与对照组胆囊的 SP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of SP content in gallbladder between model groups and control group

组别 Groups	n	平均光密度值 Average optical density	
		4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
对照组 Control group	6	0.47 ± 0.07	0.51 ± 0.10
模型 A 组 Model group A	10	0.31 ± 0.12 *	0.42 ± 0.15 *
模型 B 组 Model group B	10	0.26 ± 0.14 *	0.28 ± 0.09 **
模型 C 组 Model group C	10	0.24 ± 0.16 **	0.22 ± 0.11 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.





注:A: 4 周模型 B 组胆囊(HE 染色, × 40);B:8 周模型 B 组胆囊内膜(HE 染色, × 40);C:4 周对照组胆囊内膜(HE 染色, × 200);D:8 周模型 B 组胆囊内膜(HE 染色, × 200);E:4 周模型 B 组晶体(HE 染色, × 200);F:8 周模型 B 组晶体(HE 染色, × 200);G:4 周对照组 SP 表达;H:4 周模型 C 组 SP 表达;I:8 周对照组 SP 表达;J:8 周模型 B 组 SP 表达。

图 1 不同时间胆囊内结构变化

Note. A: Gallbladder at 4 weeks in model group B (HE staining, × 40); B: gallbladder endometrium at 8 weeks in model group B (HE staining, × 40); C: intima at 4 weeks in the control group (HE staining, × 200); D: endometrium at 8 weeks in model group B (HE staining, × 200); E: crystal at 4 weeks in model group B (HE staining, × 200); F: crystal at 8 weeks in model group B (HE staining, × 200). G: SP expression at 4 weeks in the control group; H: SP expression at 4 weeks in model group C; I: SP expression at 8 weeks in the control group; J: SP expression at 8 weeks in model group B.

Figure 1 Changes in the structure of the gallbladder at different time

3 讨论

高胆固醇饲料饲养树鼯,经称重观察树鼯体重增重并不明显(数据未显示);第 4 周血清脂肪代谢指标与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);采血后部分树鼯出现精神萎靡,快速取材发现形成脂肪肝,胆囊内已形成晶体絮状物。实验表明含 1.0% 胆固醇的饲料饲喂树鼯易制作胆石疾病模型。采

用树鼯建此模型比豚鼠、兔子与人类同源性更近,据资料通过基因组分析发现树鼯在神经及免疫系统的分子信号通路与人类具有较高的同源性,在很多方面具有可用来替代灵长类实验动物的遗传基础^[3-4]。经实验分析:树鼯肠道 P 物质随着胆固醇含量的增高出现了低表达。可能是因小肠蠕动传输速率减缓,十二指肠、空肠内 P 物质的含量明显减少^[5]。表明高胆固醇饲料对消化道平滑肌有强

烈刺激作用,P 物质的表达也随刺激而产生变化,其受体可直接作用于纵行肌、环行肌引起收缩,增强结肠袋推进性运动;P 物质表达降低时,胆囊收缩减慢,胃肠功能紊乱,胃肠运动功能障碍^[6]。消化道黏膜缺血致缺氧损伤,缺血使炎性因子黏附肠道粘膜,产生内毒素和二胺氧化酶进入血液,导致部分靶器官感染,测定肠组织 P 物质表达出现减少,继而出出现胆道感染,胆囊炎是促成脂肪肝、胆囊结石原因之一^[7]。说明 P 物质的变化与胃肠消化道动力及脂肪肝之间有一定的相关性。

P 物质是在分子水平上已测得的作用最强的内源性血管扩张肽,其消化道十二指肠表达减少,门脉高压增加,P 物质可能参与失代偿性肝硬化患者血液动力学改变的发病机制^[8]。树鼩内环境的改变是导致门静脉高压和胆囊内胆淤积、胆固醇浓缩形成结石的主要原因。树鼩采食高胆固醇食物导致磷脂、胆汁酸、胆固醇形成平衡的比例被打破,低密度脂蛋白(LDL)增多,胆固醇含量升高,胆固醇也随之增加,导致胆汁中磷脂、胆盐、胆固醇三者比例失调,中性脂肪在肝细胞内沉积,肝细胞功能受到影响,不能产生足够多的胆汁酸,促使胆囊结石形成^[6]。从而造成胆汁中的胆固醇也相应增加。正常情况下机体胆固醇能够在胆汁中“溶解”。在体内可以形成“磷脂胆固醇泡”,也叫“转运泡”,这是一种由胆固醇和磷脂一起组成的复合物^[9]。当胆固醇含量相对增多,肝脏中的磷脂合成较少时,复合物的合成平衡被打破,多余的胆固醇就形成絮状物或结晶,在胆汁中游离与“糖蛋白”凝聚在一起构建成结石的框架,结石的核心是磷酸钙、胆红素钙聚集一起形成的,这样逐渐形成胆固醇胆囊结石^[10]。

参考文献:

- [1] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study [J]. Hepatology, 2005, 42(1): 44-52.
- [2] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [3] Xu L, Chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131-137.
- [4] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.
- [5] 崔莉红. 胃肠激素对结肠运动的调节作用 [J]. 医学综述, 2008, 14(3): 380-382.
- [6] Nguyen KT, Kitisin K, Steel J, et al. Cirrhosis is not a contraindication to laparoscopic cholecystectomy: results and practical recommendations [J]. HPB (Oxford), 2011, 13(3): 192-197.
- [7] 杜立峰,展淑琴,郭新奎. P 物质、血管活性肠肽与异常胃肠通过的关系 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2003, 24(4): 63-65.
- [8] 金玲,黄惠团,刘东升,等. 脂肪肝与胆囊结石的相关性 [J]. 海军医学杂志, 2006, 27(3): 224.
- [9] 蒋兆彦,韩天权,张圣道. 从胆石成因研究谈胆石病预防的新策略 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(9): 697-700.
- [10] Smelt AH. Triglycerides and gallstone formation [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(21-22): 1625-1631.

[收稿日期]2018-01-17

勘误

王敏、陈荣昌等作者在《中国比较医学杂志》2018 年(第 28 卷)第 8 期刊登的文章《小儿热速清糖浆抗流感病毒和抗菌作用研究》一文中:第 84 页“1.3 主要试剂与仪器”部分:第一行“小儿热速清糖浆(批号:z19980095)”应为“小儿热速清糖浆(批号:C20150401)”,特此更正。