

李沁媚,王玉涵,吕菲菲,等. 溃疡性结肠炎与湿热证溃疡性结肠炎大鼠模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29 (3): 354–363.

Li QM, Wang YH, Lyu FF, et al. Comparative study of rat models with ulcerative colitis and ulcerative colitis plus damp-heat syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 354–363.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.010

溃疡性结肠炎与湿热证溃疡性结肠炎大鼠模型的比较研究

李沁媚,王玉涵,吕菲菲,徐百昌,崔瑶,彭小敏,王颖,司红彬*

(广西大学动物科学技术学院,南宁 530004)

【摘要】 目的 建立适用于评价抗湿热证溃疡性结肠炎中药复方及新药研发药效的动物模型,并探讨普通溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)与湿热证 UC 的区别与联系。**方法** 随机将 24 只 SD 大鼠分为空白对照组、UC 组、UC+DH 组,每组 8 只。除空白组外,UC 组接受 5% DSS 诱导,而 UC+DH 组大鼠先后接受“高脂高糖饮食+饥饱交替+饮酒+高温高湿环境+5% DSS”诱导,为期 29 d。每日观察大鼠的一般情况,进行疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分和结肠组织病理评分(Geboes),血清生化检测各组大鼠的 TG、CHOL、HDL_C、LDL_C、GLU、ALP、LDH、ALT、AST 水平,检测血清中的 DAO 浓度和结肠中的 MPO、MDA、GSH 活性变化,ELISA 法检测血清中的皮质醇含量及结肠中的 HSPs、IL-10、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 的表达。**结果** 两种模型均出现不同程度的肠道炎症,DAI 评分和 Geboes 指数增加,肝功能均存在不同程度的损伤情况。不同之处:与 UC 组相比,上述病理改变在 UC+DH 组大鼠上更为严重,除此,UC+DH 组大鼠血清中的 TG、CHOL、LDL_C、ALP、ALT、AST、DAO、皮质醇浓度明显增加,血清中 HDL_C 的浓度显著下降($P < 0.05$);结肠中 HSPs、MPO、MDA、TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 的表达明显增加,结肠中的 GSH 和 IL-10 的水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 两种 UC 模型均存在肠黏膜损伤和肝损伤情况。不同之处在于,湿热环境会加重 DSS 诱导的 UC 大鼠肠黏膜损伤程度,其机制可能与促炎、促脂质过氧化、提高肠黏膜渗透性有关。

【关键词】 溃疡性结肠炎;湿热证溃疡性结肠炎;大鼠模型;抗炎;抗氧化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0354-10

Comparative study of rat models with ulcerative colitis and ulcerative colitis plus damp-heat syndrome

LI Qinmei, WANG Yuhan, LYU Feifei, XU Baichang, CUI Yao, PENG Xiaomin, WANG Ying, SI Hongbin*

(School of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Corresponding author: SI Hongbin. E-mail: 342162690@qq.com

【Abstract】 Objective To establish an animal model suitable for evaluating the efficacy of an anti-damp-heat (DH) ulcerative colitis compound in Chinese medicine and for new drug development, and to explore the difference and connection between ordinary ulcerative colitis (UC) and UC with DH syndrome. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into the blank control group, UC group and UC+DH group. Rats in the UC group were induced by 5% dextran sodium sulfate (DSS), and the UC+DH group was induced by “high-fat and high-sugar diet + alcohol + hunger

[基金项目] 广西重点研发计划项目(桂科 AB19245037),南宁市重点研发计划(20202088),北海市科学研究与技术开发(北科合 202082037),广西研究生教育创新计划项目(YCSW2020007),南宁市兴宁区重大研发项目(2020A14)。

Funded by the Guangxi key R & D Program (Guike AB19245037), Nanning key R & D Program (20202088), Beihai Scientific Research and Technology Development (Beikehe 202082037), Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2020007), Xingning District Major R & D Project (2020A14).

[作者简介] 李沁媚(1994—),女,硕士,研究方向:中医药防治湿热证与炎性肠病。Email:983383543@qq.com

[通信作者] 司红彬(1977—),男,博士,教授,研究方向:现代中药及药物剂型研究与中西医结合。Email:342162690@qq.com

and satiety alternately + high temperature and humidity environment + 5% DSS” for 29 d. The general condition of rats was observed every day for the disease activity index (DAI) and Geboes colonic histopathological scores. Serum levels of ALP, ALT, AST, CHOL, GLU, HDL-C, LDL-C, LDH and TG, and colonic activity of GSH, MDA and MPO were detected. Serum cortisol and colon expression of HSPs, IL-10, MIP-1 α , MIP-1 β and TNF- α were detected by ELISA. **Results** The two models exhibited different degrees of intestinal inflammation, increased DAI and Geboes scores, and different degrees of damage to liver function. Compared with the UC group, pathological changes were more severe in the UC+DH group. In addition, serum levels of TG, LDL-C, ALP, ALT, AST, CHOL, cortisol, DAO, HSPs, MDA, MPO, MIP-1 α , MIP-1 β and TNF- α , and colonic levels of GSH and IL-10 were significantly increased in the UC+DH group, whereas the serum concentration of HDL-C was significantly decreased. **Conclusions** Intestinal mucosal injury and liver injury were found in both rat UC models. However, the hot and humid environment aggravated the degree of intestinal mucosal injury induced by DSS in UC rats, and its mechanism may be related to promoting inflammation, lipid peroxidation, and intestinal mucosal permeability.

【Keywords】 ulcerative colitis; ulcerative colitis with damp-heat syndrome; rat model; anti-inflammation; antioxidation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 属于炎性肠病之一, 主要病理变化为乙状结肠和直肠黏膜及黏膜下层的炎性损伤。UC 在欧洲和北美的平均患病率超过 0.3%, 其中挪威的发病率高达 0.5%^[1]。值得注意的是, 亚洲国家的炎性肠病发生率和患病率较欧美地区偏低, 然而 90 年代成为亚、非等国的炎性肠病发病率的转折点, 尤其是韩国和中国香港等亚洲地区的发病率明显增加^[2-3]。UC 已经发展成为一种全球性疾病, 因其反复发作和长期治疗的特性被称为“绿色癌症”, 因此受到了越来越多的关注。

湿热证 (damp-heat syndrome, DH) 是中医常见证候, 多因感受湿热外邪、喜食肥甘厚腻、嗜酒、饮食不节等因素引起机体内酿湿生热、湿热交蒸。2017 年《溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见》中指出活动期 UC 多属实证, 主要病机为湿热蕴肠^[4], 大肠湿热证是 UC 活动期最重要的证型^[5]。尽管目前有少量关于湿热病因所致 UC 的免疫标识物的报道^[6], 然而湿热因素在 UC 疾病发展进程中的影响及机制尚不完全清晰。

目前国际较为认可的造模方法是葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS), 其诱导的结肠炎模型因其简单性和与人类溃疡性结肠炎的许多相似性而被广泛使用^[7-9], 前期总结了近年来中药防治湿热证的药效作用及机制研究^[10], 为进一步研究 UC 发病机制及中药疗效机理, 选择使用“DSS”和“DSS+复合因素”分别构建普通 UC 大鼠模型和湿热证 UC 大鼠模型, 通过对比这两种模型, 试图说明普通 UC 与湿热证 UC 的区别与联系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 7 ~ 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄对半, 体重 200 ~ 220 g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供【SCXK(湘)2019-0014】。饲养于广西植物研究所生物技术中心屏障环境动物室【SYXK(桂)2020-0002】。饲养环境保持 12 h 的明暗循环, 温度 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对恒定的湿度 (50% $\pm$ 10%)。大鼠维持饲料购自北京科澳协力饲料有限公司, 常规标准喂养, 自由饮水。所有操作均遵守广西大学实验动物管理和伦理委员会准则 (审批号: 2019-084)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DSS (MP Biomedicals, Q8378), 冠生园蜂蜜 (上海冠生园, SC12731012000317), 牛栏山二锅头 (北京顺鑫, 56% vol), 猪油购自南宁大康惠超市, 二甲苯 (国药集团, 10023418), 中性树胶 (国药集团, 10004160), HE 染液 (上海照华, G1005), 分化液 (上海照华, G1005-3), 返蓝液 (上海照华, G1005-4), 大便隐血检测试剂盒、二胺氧化酶 (DAO)、髓过氧化物酶 (MPO) 测试盒、还原型谷胱甘肽 (GSH) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒均购自南京建成生物公司 (C027-1-1, A088-1-1, A044-1-1, A006-2-1, A003-1-2), 大鼠皮质醇 (Cortisol)、大鼠热应激蛋白 (HSPs)、总蛋白定量测定、大鼠白细胞介素 10 (IL-10)、大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、大鼠巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)、大鼠巨噬细胞炎性蛋白 1 β (MIP-1 β) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司 (MM-0574R1, MM-

0686R1, MM-2002577, MM-0195R1, MM-0104R1, MM-0180R1, MM-2002577)。

高速组织研磨仪(塞维尔, KZ-II, 武汉), 酶标仪(赛默飞世尔, Multiskan FC, 上海), 洗板机(Thermo Labsystems, AC8, 芬兰), 离心机(Eppendorf AG, 810R, 德国), 分析天平(菁海, FA1004, 上海), 恒温水浴锅(金坛市医疗, HH-S4, 金坛), 正置光学显微镜(尼康, Nikon Eclipse E100, 日本), 紫外分光光度计(津岛制作所, UVmini-1240, 日本), 恒温生化培养箱(精宏, BPH-9162, 上海), 智能恒温恒湿培养箱(生元, LHS-250, 郑州), 全自动动物生化分析仪(优利特, URIT-8021Vet, 桂林)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模

24 只 SD 大鼠, 在 1 周适应期结束后, 随机分为空白对照组、UC 组、UC+DH 组, 每组 8 只。实验周期 29 d, 各组造模方式(图 1)如下:

(1)空白组自由采食与饮水, 饲养环境的温湿度和明暗度与适应期一致, 直至试验期结束。

(2)UC 组大鼠在实验周期前 22 d 与空白组一致, 第 23 天起自由饮用 5% DSS 溶液。

(3)UC+DH 组大鼠在前 14 d 里, 自由饮用蜂蜜水, 单号管饲 4 mL 猪油, 给与充足饲料, 双号禁食不禁饮, 经受饥饱交替; 第 15 ~ 22 天, 自由饮用蜂蜜水, 自由采食普通饲料, 每日管饲 2 mL 二锅头, 每日需进入恒温恒湿箱中 33℃ ~ 35℃, 湿度为 (95 ± 3)% 6 h; 第 23 天开始, 自由饮用 5% DSS 溶液, 自由采食高糖饲料, 每日需进入恒温恒湿箱中 33℃ ~ 35℃, 湿度为 (95 ± 3)% 6 h。

1.2.2 一般情况观察

大鼠适应性喂养 1 周后, 进行造模。注意饮用 DSS 期间的体重变化, 饮用 DSS 前 1 d 给大鼠称体

重, 将其作为原始体重, 每日早上 10:00 测体重, 尤其记录体重增长率, 观察每日的粪便性状、血便情况、腹泻程度, 进行疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分^[11]。

1.2.3 样本采集及处理

戊巴比妥 (40 mg/kg, BW) 麻醉大鼠后, 用无菌 EP 管收集血液, 室温下静置 0.5 h 后放入 4℃ 冰箱, 冷藏 1 h 后经 2000 r/min 转速离心取淡黄色澄清上清液, 备用。采用二氧化碳窒息法处死大鼠, 用手术刀剪剖开腹腔, 完整取出盲结肠段, 记录结肠长度, 收集结肠样品, 经液氮冷冻后, 转移至 -80℃ 冰箱中保存。

1.2.4 结肠病理组织学检测

模型组大鼠结肠组织病变明显处取 1.5 cm 环状肠腔, 其余组取该组大鼠结肠对应位置, 选材部位尽量保持一致, 然后置于 10% 中性福尔马林缓冲液中, 24 h 后进行脱水、浸蜡、包埋、石蜡切片、脱蜡、苏木素染色、伊红染色、脱水封片、镜检集图。病理生物学切片采用盲法评估, 根据既往研究依据以下参数进行评分: 仅结构改变、炎症、固有层中性粒细胞、上皮中性粒细胞、隐窝破坏、糜烂或溃疡。通过病理切片观察肠道黏膜损伤程度, 进行 Geboes 标准分级评分^[12]。

1.2.5 血清生化检测

用 1000 μL 移液枪从上述血清, 抽取 400 μL 放入生化检测杯中, 将血清样品放入全自动生化检测仪检测血清中的甘油三脂 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、血糖 (GLU)、胆固醇 (CHOL)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、碱性磷酸酶 (ALP) 含量。

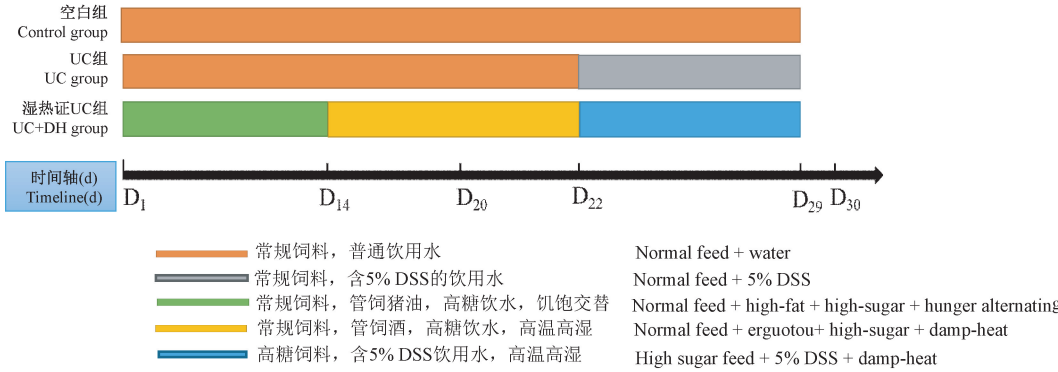


图 1 造模方式

Figure 1 Modeling method

1.2.6 ELISA 法检测皮质醇和热应激蛋白的表达

根据酶免试剂盒说明书检测血清中的皮质醇和结肠 HSPs 的含量。

1.2.7 血清 DAO 含量的测定

采用南京建成试剂盒说明书方法,检测血清中的 DAO 含量。

1.2.8 结肠 MPO、MDA、GSH 的测定

4℃ 冷藏的 0.86% 生理盐水与结肠组织按 9:1 比例混合,经研磨仪研磨后,低温离心机转速 2000 r/min,在离心 15 min 后取匀浆上清,制备成不同浓度的结肠上清液,采用南京建成试剂盒说明书方法,检测结肠中 MPO、MDA、GSH 含量。

1.2.9 ELISA 法检测结肠细胞因子变化

称取 1 g 结肠组织,加入 9 mL 的 pH = 7.2 ~ 7.4 的 PBS,用研磨仪将标本匀浆充分。离心 20 min 左右(2000 ~ 3000 r/min),仔细收集上清。根据组织总蛋白定量测定试剂盒说明书提取蛋白样品,采用 BCA 法对蛋白样品进行定量,按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠 IL-10、TNF-α、MIP-1α、MIP-1β。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 21.0 和 Graph Pad Prism 8 软件处理,数据满足正态分布,方差齐性的情况下,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行两两比较,假定方差齐性使用 LSD 法分析,假定方差不齐使用 Dunnett's T3 法分析,结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

造模前,所有大鼠精神良好、毛色整洁光亮、饮食量饮水量俱佳、粪便干燥、无腹泻及肉眼血便情

况,取新鲜粪便经南京建成大便隐血检测试剂盒检测均呈阴性,无隐血便可能。造模开始后,前 22 d,正常环境下的大鼠,食欲良好,体重持续增加,湿热环境下的大鼠食欲由起初良好转为不佳,体重持续增长,但体重增长幅度由大转小。第 23 ~ 30 天,UC 组与 UC+DH 组开始饮用 5% DSS,饮用 DSS 初期,体重均有所增长(图 2A),随着 DSS 刺激机体肠道产生炎症,粪便性状改变,出现腹泻血便等症状。与空白对照组相比,两类模型组大鼠体重增长幅度呈现不同程度的改变甚至下降,DAI 指数显著升高;与 UC 组相比,UC+DH 组的体重降低程度更为严重,DAI 指数进一步显著升高(图 2B)。

2.2 结肠长度

与空白对照组比较,两组模型大鼠结肠的长度显著缩短,具有显著性差异($P < 0.05$)(见图 3A);与 UC 组比较,UC+DH 组结肠的长度显著性缩短(见图 3B)。

2.3 结肠组织病理学改变

正常大鼠结肠黏膜由柱状上皮、黏膜下层、黏膜肌层及外膜组成,如图 4A 所示,空白对照组大鼠结肠形态完整,肠腺排列规则,固有层内杯状细胞丰富,黏膜下层未见充血水肿、溃疡,未见炎症细胞浸润。与 DAI 评分和临床症状发现一致,DSS 引起明显的炎症并破坏了结肠隐窝结构,UC 组大鼠出现的结肠肠腺大面积消失,腺体变形,杯状细胞丢失,黏液减少,炎细胞浸润,造成严重的肠上皮损伤。与 UC 大鼠相比,UC+DH 组大鼠结肠的肠腺几乎消失殆尽,肠上皮空泡随处可见,由此可知湿热环境与 DSS 能够协同加剧肠上皮结构的破坏。UC 组与 UC+DH 组大鼠的 Geboes 指数显著高于空白组大鼠($P < 0.001$),说明单纯饮用 DSS 溶液与湿热环境下饮用 DSS 溶液造成了

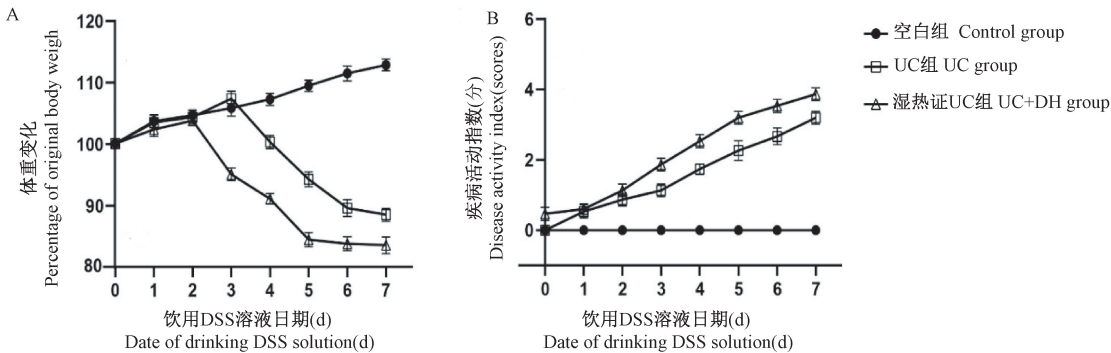


图 2 饮用 DSS 期间的体重改变和疾病活动指数

Figure 2 Weight change and disease activity index during DSS consumption

大鼠结肠黏膜的严重损伤。与 UC 大鼠相比,UC+DH 组大鼠的 Geboes 指数显著增加($P < 0.05$) (图 4B)。

2.4 血脂水平的变化

与空白组相比,UC 组大鼠血清中的 TG、CHOL、HDL_C、LDL_C、GLU 浓度无显著性差异($P > 0.05$)。与空白组和 UC 大鼠相比,UC+DH 组大鼠 TG、CHOL、LDL_C 显著增加($P < 0.001$),GLU 含量有所增加($P < 0.05$),HDL_C 含量显著降低($P < 0.001$) (图 5)。

2.5 肝功能的变化

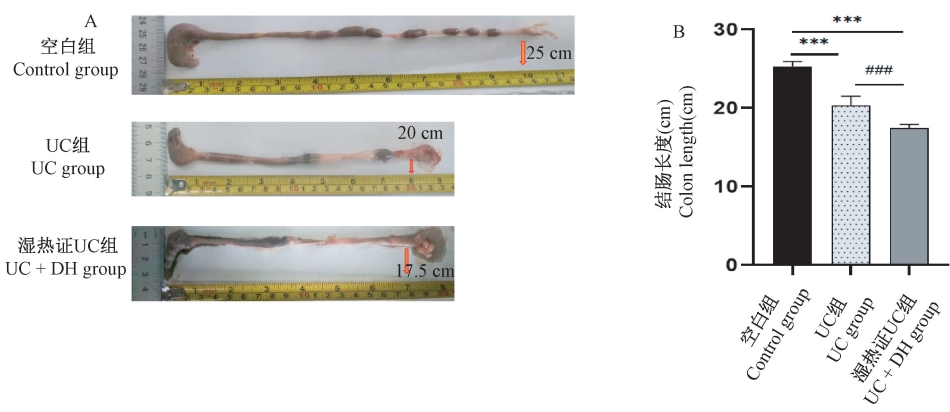
与空白组相比,UC 组大鼠的 ALP、LDH、ALT、AST 显著增加($P < 0.05$),UC+DH 组 ALP、LDH、

ALT、AST 浓度显著提升($P < 0.05$)。与 UC 组大鼠相比,UC+DH 组的 ALP、ALT、AST 含量进一步显著升高($P < 0.01$) (见图 6)。

2.6 皮质醇、热应激蛋白和 DAO 的变化

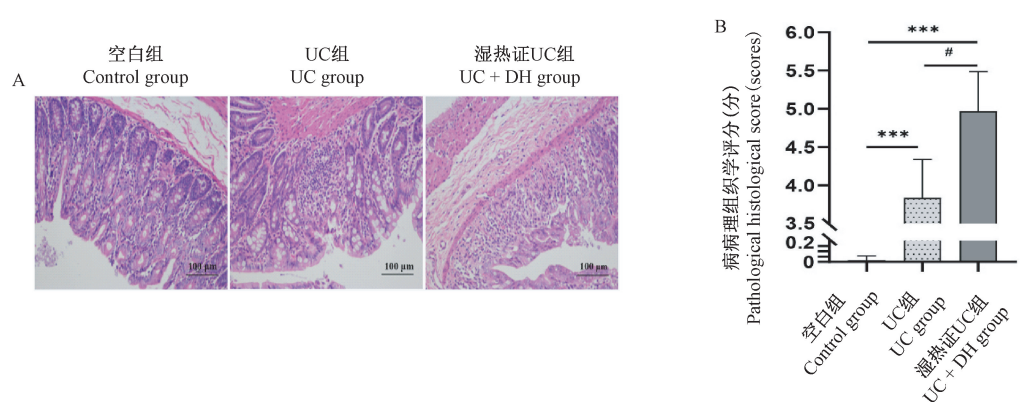
与空白组相比,UC 组和 UC+DH 组大鼠血清中的皮质醇含量显著增加($P < 0.001$),说明 DSS 能显著增加大鼠血清中皮质醇含量。其中,与 UC 组大鼠相比,UC+DH 组的皮质醇含量进一步增加($P < 0.001$) (图 7A),说明湿热证能进一步增加血清皮质醇含量。

与空白组相比,UC 组大鼠结肠中的 HSPs 含量无显著性差异($P > 0.05$),说明 DSS 对 HSPs 的表达没有明显的影响。与空白组和 UC 组大鼠相比,UC

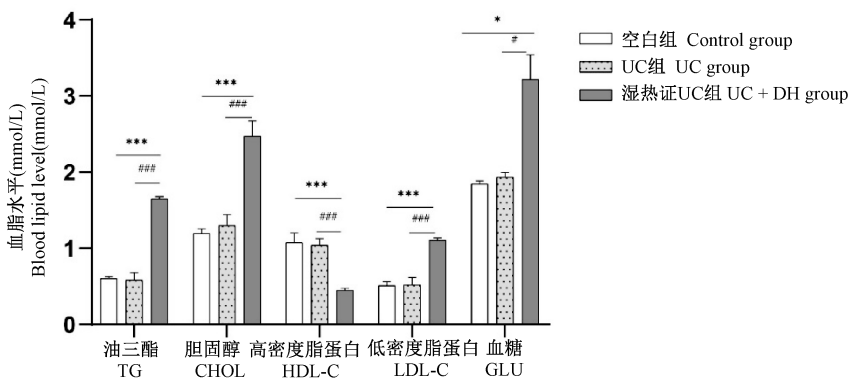


注:A:图中所示结肠长度数值已去除直肠肛门部分;B:与空白组相比,*** $P < 0.001$;与 UC 组相比,### $P < 0.001$ 。
图 3 各组结肠长度变化
Note. A. Length of the colon shown here has been removed from the anus. B. Compared with control group, *** $P < 0.001$. Compared with UC group, ### $P < 0.001$.

Figure 3 Changes in colonic length in each group



注:与空白组相比,*** $P < 0.001$;与 UC 组相比,# $P < 0.05$ 。
图 4 各组结肠黏膜病理变化及评分
Note. Compared with control group, *** $P < 0.001$. Compared with UC group, # $P < 0.05$.
Figure 4 Pathological changes and Geboes score of colonic mucosa in each group

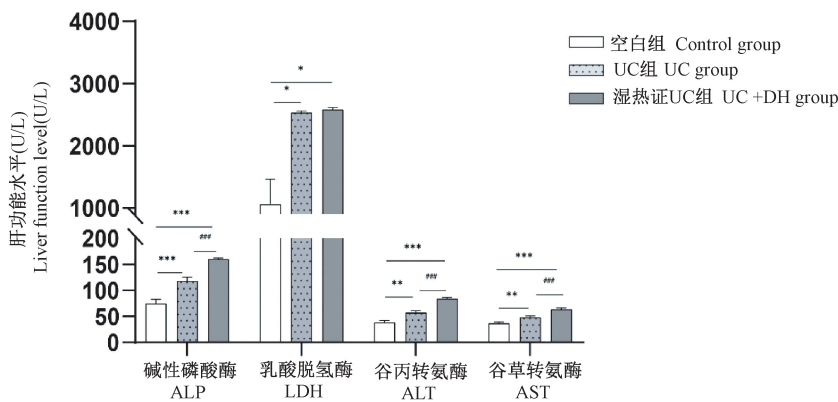


注:与空白组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 UC 组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

图 5 血脂水平变化结果

Note. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with UC group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$.

Figure 5 Changes in lipid levels in each group



注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 UC 组相比, ### $P < 0.001$ (下图同)

图 6 肝功能变化结果

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with UC group, ### $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 6 Results of liver function changes

+DH 组大鼠结肠中的 HSPs 含量显著增加 ($P < 0.001$) (图 7B), 说明湿热因素能显著增加大鼠血清中皮质醇含量。

与空白组相比, UC 组和 UC+DH 组大鼠血清中的 DAO 含量显著增加 ($P < 0.001$), 说明 DSS 能显著增加大鼠血清中 DAO 含量。其中, 与 UC 组大鼠相比, UC + DH 组的 DAO 含量进一步增加 ($P < 0.001$) (图 7C), 说明湿热因素能协同 DSS 进一步增加血清 DAO 含量。

2.7 结肠氧化应激反应及抗氧化能力结果

经 DSS 诱导后, 与空白组相比, UC 组和 UC + DH 组大鼠的 MPO、MDA 含量显著升高 ($P < 0.001$), 结肠中的 GSH 含量显著降低 ($P < 0.001$), 说明 DSS 能导致机体的脂质过氧化, 降低大鼠抗氧

化能力; 与 UC 组大鼠相比, UC + DH 组的 MPO、MDA 含量进一步增加 ($P < 0.001$) (图 8A、B), 结肠中的 GSH 含量进一步降低 ($P < 0.01$) (图 8C), 说明湿热因素能协同 DSS 过度激活氧化应激反应, 抑制机体抗氧化能力。

2.8 结肠炎症细胞因子的水平

与空白组相比, UC 组和 UC + DH 组大鼠的 TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 表达显著升高 ($P < 0.001$), 结肠中的 IL-10 含量显著降低 ($P < 0.001$), 说明 DSS 具有促炎作用; 与 UC 组大鼠相比, UC+DH 组的 TNF- α 、MIP-1 α 、MIP-1 β 浓度进一步增加 ($P < 0.01$) (图 9A、B、C), 结肠中的 IL-10 含量进一步降低 ($P < 0.001$) (图 9D), 说明湿热因素能协同 DSS 加重肠道炎症程度。

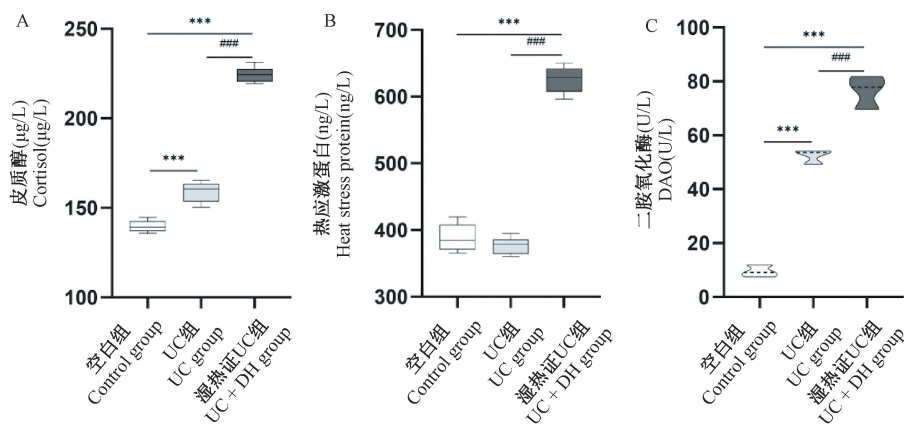


图 7 大鼠血清皮质醇、DAO 浓度和结肠热应激蛋白表达情况

Figure 7 Serum cortisol and diamine oxidase concentrations and colonic heat stress protein expression in rats

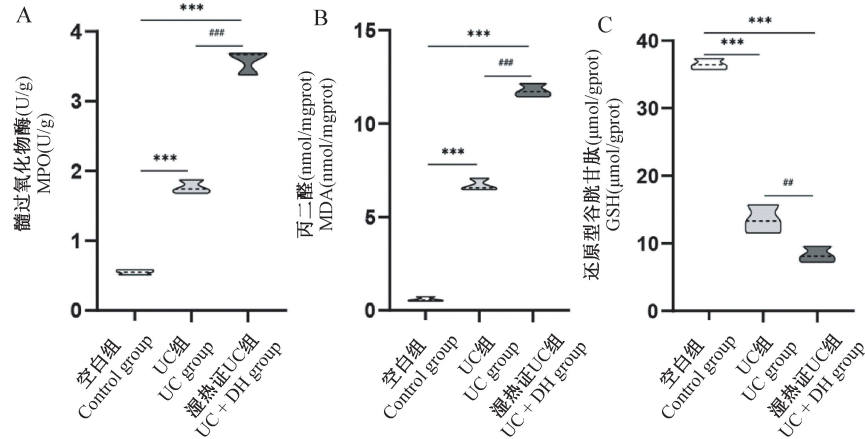


图 8 各组大鼠氧化应激反应及抗氧化能力

Figure 8 Oxidative stress reaction and antioxidant capacity of rats in each group

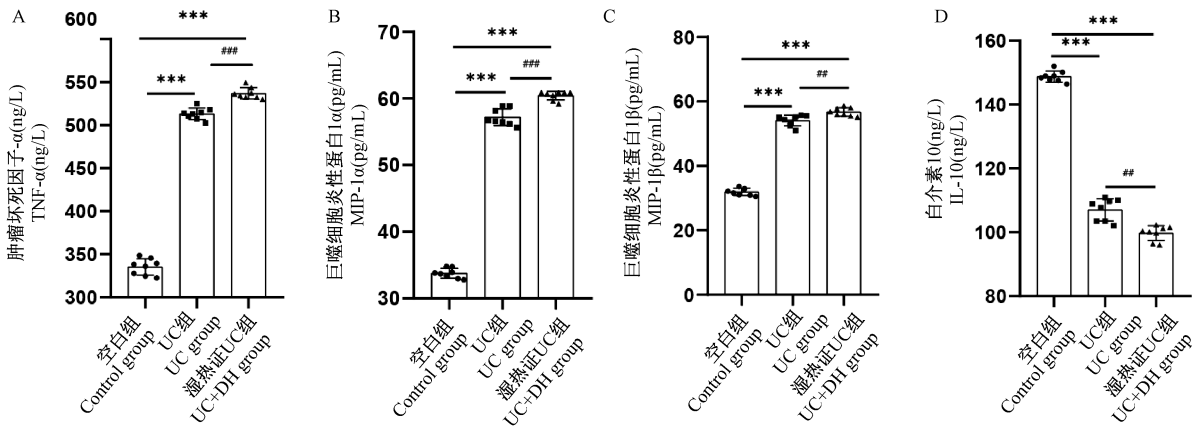


图 9 大鼠细胞因子的表达情况

Figure 9 Expression of cytokines in rats

3 讨论

中医将溃疡性结肠炎归属于“痢疾”“久痢”和“肠癖”等病范畴^[4,13]。UC 表现为血性腹泻、腹痛、黏液性脓便、里急后重、体重减轻等,这些症状可导致患者身体状况和心理的衰弱,并加重全球经济负担^[14]。伴随 UC 确诊而来的是患结直肠癌及手术切除、术后并发症和 UC 肠外并发症(肝胆疾病、骨质疏松、关节炎、皮肤病等)的风险,数据表明,DSS 与 DSS 协同湿热因素可引起不同程度的肝功能损伤和肠黏膜损伤,其中 DSS 协同湿热因素给机体造成的损伤尤为严重。

DAO 是一种催化二胺氧化的细胞内酶,位于肠黏膜上层绒毛膜上皮细胞的胞质中,与肠黏膜内的核酸和蛋白质合成密切相关。DAO 大部分来源于肠黏膜,正常状态下血清中的含量极少,当肠上皮细胞破损时,肠黏膜中的 DAO 经受损部位入血,因此血清 DAO 水平可作为肠黏膜损伤的理想指标,可作为 IBD 的主要诊断指标^[15-16]。本研究两种模型大鼠的血清 DAO 含量升高的结果也支持了这一理论。热应激引起肉鸡肠道屏障功能紊乱并提高肠道通透性,导致血清 DAO 水平升高^[17]。在本研究中,湿热证 UC 大鼠的血清 DAO 远高于 UC 大鼠的水平,可能与湿热证 UC 大鼠受到的湿热刺激有关,说明湿热应激和 UC 在促炎和损伤肠屏障方面可能具有协同作用,具体机制需要进一步的研究证明。

在本研究中,发现 UC 模型大鼠与湿热证 UC 模型大鼠最明显的区别在于血脂和热应激蛋白的表达水平差异。通过复合因素“高脂高糖饮食+饮酒+饥饱交替+高温高湿环境+5% DSS”构建的湿热证 UC 大鼠表现出高脂血症和热应激反应。与前人报道一致^[18],本研究中湿热证 UC 大鼠血清中的 TG、CHOL、LDL_C、GLU 水平显著高于普通环境下的 UC 大鼠($P < 0.05$),且血清中的 HDL_C 低于普通环境饲养的 UC 大鼠($P < 0.05$),说明实验周期内的高脂高糖酗酒的饮食习惯配合高温高湿的生活环境,能成功打造高脂血症症状的大鼠,高脂血症可能是湿热证潜在的生物基础之一。热休克蛋白(HSPs)的诱导被称为热休克反应(HSR)。HSR 在细胞防御系统中起着关键作用,在该系统中,HSP 充当蛋白质伴侣,觉察到氧化损伤并修复未折叠或折叠错误的蛋白质,保护细胞免受应激诱导的伤害,有助于

提高预处理刺激后产生的细胞存活率^[19]。HSPs 是细胞内高度保守的蛋白,在应激条件下可以存在于细胞外液中。实验数据也表明湿热应激能增加大鼠结肠组织中的 HSPs 表达。HSP 参与了多种信号传导途径,包括氧化应激途径^[20]。Dangi 等^[21]认为 HSPs 的高峰表达是山羊长期热应激期间的一种适应机制,抗氧化剂可能会通过降低氧化应激而减弱 HSPs 表达。因此检测了结肠中的 MPO、MDA、GSH 浓度的变化。

既往研究表明,肠道黏膜损伤的关键因素之一是氧化-抗氧化失衡^[22]。氧化应激反应过度激活可以抑制抗氧化酶,促进结肠细胞中活性氧增多,活性氧本身具有细胞毒性,引起蛋白质变性和酶激素失活。同时活性氧可使不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成生物膜损伤。MPO 是一种存在于中性粒细胞中的酶,活性大小与炎症区域中的中性粒细胞浓度成正比,MPO 活性增加是嗜中性粒细胞浸润和炎症的指标^[23]。因此,MPO 活性的测量被认为是急性肠道炎症的定量和灵敏测定法。MDA 可以通过蛋白质变性交联作用影响膜蛋白,使其无法用作受体或酶,它是脂质过氧化的标志物^[24-25],本研究中 MPO、MDA 活性的增加与结肠肠上皮层的大量丧失、浆膜炎性细胞浸润、黏膜下层水肿、出血、坏死性溃疡的出现有关。ROS 的清除主要依靠体内的抗氧化酶完成,数据表明湿热因素协同 DSS 共同抑制了结肠组织中的 GSH 活性,导致过量的 ROS 堆积,生物氧化失衡,从而加重湿热证 UC 的氧化应激反应。

目前普遍认为,UC 机体存在肠黏膜炎症免疫耐受紊乱,肠黏膜免疫反应异常激活是 UC 发生、发展的重要因素。1988 年 Wolpe 等^[26]采用脂多糖刺激小鼠后,从小鼠巨噬细胞中分化得到炎症蛋白 MIP-1。这种趋化性细胞因子在内毒素血症、氧化应激反应、炎症反应中具有广泛的生物学活性,能触发中性粒细胞产生过氧化氢,协同其他活性氧,过度激活氧化应激反应;同时 MIP-1 α 可特异性地趋化单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞增殖并向炎症部位迁移,诱导其释放 TNF- α 、IL-6、IL-1 等炎症因子^[27],具有潜在的促炎作用。有学者发现在严重发炎的肠粘膜中,表达 MIP-1 α 和 MIP-1 β 的细胞频率明显高于对照组^[28]。在 IBD 中,抗原呈递给抗原呈递细胞(APC)以及 APC 与 T 辅助细胞的相互作用导致巨噬细胞的活化。活化的巨噬细胞

产生广泛活性的炎性细胞因子的混合物,包括 TNF- α 、IL-1 β ,它们通过 NF- κ B 途径进一步增强炎症反应,从而导致各种白介素以及细胞因子和趋化因子的上调^[29-30]。在本研究中,推测 DSS 协同湿热因素通过 TNF- α 将循环血中炎症细胞募集至局部组织,诱导肠黏膜循环障碍,与 MIP-1 α 和 MIP-1 β 协同放大炎症效应,破坏肠上皮固有层,诱导肠黏膜局部溃疡,可导致 UC 的发生。

肠道中 IL-10 的主要来源是调节性 T (Treg) 细胞,IL-10 可控制肠道中微生物和食物抗原的慢性刺激并保持免疫系统平衡^[31]。因此被认为是人类最重要的抗炎细胞因子之一,IL-10 可以限制促炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-12 的分泌,防止对肠内稳态重要的 Th1/Th17 致病反应^[32-33]。近日的一项研究表明,IBD 中的抗 TNF 治疗通过巨噬细胞 IL-10 信号传导发挥治疗作用^[34]。反之,IL-10 或其信号通路中降低或消除其抗炎特性的突变被认为参与了高炎症性疾病的发病机制,如炎症性肠病^[35]。本研究中发现两种环境下的 UC 大鼠结肠中的 IL-10 活性下降,与前述研究一致。Kühn 等^[36]在 1993 年开发 IL-10 缺陷 (IL-10^{-/-}) 小鼠模型,显示出与人 IBD 相似的组织学、生理学和生化特征。在 IL-10^{-/-} 的情况下,幼稚 T 细胞分化为 Th1 或 Th17 以及增加引起自发性结肠炎的炎性细胞因子的产生^[37],另一项研究评估了 IL-10^{-/-} BALBC 小鼠 12 周龄时自发性结肠炎的预期发生率约为 69%^[38]。上述研究提供了可能的推理,湿热环境协同 DSS 干预 IL-10 的信号传导,加重肠道炎症。

综上所述,UC 与湿热 UC 模型既有区别又存在联系,区别在于仅湿热证 UC 模型存在高脂血症与热应激反应;联系在于湿热证 UC 模型的脏器损伤 (肝、肠) 严重程度高于 UC 模型,尤其是肠黏膜损伤。湿热能加重 UC 的肠黏膜损伤,可能与湿热促炎、促进脂质过氧化、抑制抗氧化、提高肠黏膜渗透性有关。相比经 DSS 诱导的普通 UC 大鼠模型,本研究通过复合因素构建的湿热证 UC 模型更切合岭南地区湿热证 UC 患者实际,一定程度上为湿热体质人群的 UC 辨证与防治提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. *Lancet*, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [2] Yang SK, Yun S, Kim JH, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005; a KASID study [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008, 14(4): 542-549.
- [3] Lok KH, Hung HG, Ng CH, et al. Epidemiology and clinical characteristics of ulcerative colitis in Chinese population: experience from a single center in Hong Kong [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(3): 406-410.
- [4] 张声生, 沈洪, 郑凯, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [5] Zhang SS, Shen H, Zheng K, et al. Consensus of TCM experts in diagnosis and treatment of ulcerative colitis (2017) [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(8): 3585-3589.
- [6] 王志愿, 张宁怡, 吴珊珊, 等. 基于因子分析与聚类分析对溃疡性结肠炎中医证候的研究 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16(30): 163-167.
- [7] Wang ZY, Zhang NY, Wu SS, et al. Study on traditional Chinese medicine syndromes of ulcerative colitis based on factor analysis and cluster analysis [J]. *Chin Med Herald*, 2019, 16(30): 163-167.
- [8] 朱宇珍, 钟宇, 叶华, 等. 湿热对溃疡性结肠炎大鼠模型影响的实验研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(1): 168-173.
- [9] Zhu YZ, Zhong Y, Ye H, et al. Experimental study on the effect of damp-heat on rat model of ulcerative colitis [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2019, 46(1): 168-173.
- [10] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15-25.
- [11] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142-146.
- [12] Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142-146.
- [13] 鲁香凤, 张书信, 傅丽元, 等. 人溃疡性结肠炎与大鼠模型的组织病理学变化比较及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 597-602.
- [14] Lu XF, Zhang SX, Fu LY, et al. Comparison of histopathological changes in large intestinal mucosa between human ulcerative colitis and a induced rat model by sodium dextran sulfate [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(5): 597-602.
- [15] 李沁媚, 李铮, 司红彬. 中药防治湿热证的药效作用及机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(14): 208-216.
- [16] Li QM, Li Z, Si HB. Research progress on the efficacy and mechanism of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of damp-heat syndrome [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(14): 208-216.
- [17] 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.
- [18] Geboes K, Riddell R, Ost A, et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2000, 47(3): 404-409.

- [13] 张声生, 李乾构, 沈洪, 等. 溃疡性结肠炎中医诊疗共识 (2009) [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 527-532. Zhang SS, Li QG, Shen H, et al. Consensus on TCM diagnosis and treatment of ulcerative colitis (2009) [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2010, 30(5): 527-532.
- [14] Jairath V, Feagan BG. Global burden of inflammatory bowel disease [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(1): 2-3.
- [15] Song WB, Lv YH, Zhang ZS, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1, D-lactate and diamine oxidase in patients with inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(31): 3916-3919.
- [16] Sun T, Gao GZ, Li RF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice [J]. Am J Transl Res, 2015, 7(5): 891-901.
- [17] Song J, Xiao K, Ke YL, et al. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress [J]. Poult Sci, 2014, 93(3): 581-588.
- [18] Yang S, Liu L, Meng L, et al. Capsaicin is beneficial to hyperlipidemia, oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis in Guinea pigs fed on a high-fat diet [J]. Chem Biol Interact, 2019, 297: 1-7.
- [19] Dai C. The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer: from proteomic stability to oncogenesis [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2018, 373(1738): 20160525.
- [20] Cong X, Zhang Q, Li H, et al. Puerarin ameliorates heat stress-induced oxidative damage and apoptosis in bovine Sertoli cells by suppressing ROS production and upregulating Hsp72 expression [J]. Theriogenology, 2017, 88: 215-227.
- [21] Dangi SS, Gupta M, Dangi SK, et al. Expression of HSPs: an adaptive mechanism during long-term heat stress in goats (*Capra hircus*) [J]. Int J Biometeorol, 2015, 59(8): 1095-1106.
- [22] Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 4535194.
- [23] Bastaki SM, Adeghate E, Amir N, et al. Menthol inhibits oxidative stress and inflammation in acetic acid-induced colitis in rat colonic mucosa [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(12): 4210-4222.
- [24] Dudzińska E, Gryzinska M, Ognik K, et al. Oxidative stress and effect of treatment on the oxidation product decomposition processes in IBD [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7918261.
- [25] Qiao C, Wan J, Zhang L, et al. Astragaloside II alleviates the symptoms of experimental ulcerative colitis *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(11): 7074-7083.
- [26] Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, et al. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties [J]. J Exp Med, 1988, 167(2): 570-581.
- [27] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 α induces significant recruitment of neutrophils and monocytes [J]. J Immunol, 2000, 164(6): 3392-3401.
- [28] Grimm MC, Doe WF. Chemokines in inflammatory bowel disease mucosa: expression of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , and γ -interferon-inducible protein-10 by macrophages, lymphocytes, endothelial cells, and granulomas [J]. Inflamm Bowel Dis, 1996, 2(2): 88-96.
- [29] Zhou M, Xu W, Wang J, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy via upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- κ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury [J]. EBioMedicine, 2018, 35: 345-360.
- [30] Greuter T, Vavricka SR. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 13(4): 307-317.
- [31] Glocker EO, Kotlarz D, Klein C, et al. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1246: 102-107.
- [32] Fang D, Zhu J. Molecular switches for regulating the differentiation of inflammatory and IL-10-producing anti-inflammatory T-helper cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(2): 289-303.
- [33] Hurtubise R, Audiger C, Dominguez-Punaro MC, et al. Induced and spontaneous colitis mouse models reveal complex interactions between IL-10 and IL-12/IL-23 pathways [J]. Cytokine, 2019, 121: 154738.
- [34] Koelink PJ, Bloemendaal FM, Li B, et al. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through macrophage IL-10 signalling [J]. Gut, 2020, 69(6): 1053-1063.
- [35] Zhu L, Shi T, Zhong C, et al. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology Res, 2017, 10(2): 65-69.
- [36] Kühn R, Löhler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis [J]. Cell, 1993, 75(2): 263-274.
- [37] Liu B, Tonkonogy SL, Sartor RB. Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice [J]. Gastroenterology, 2011, 141(2): 653-662.
- [38] Berg DJ, Davidson N, Kühn R, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses [J]. J Clin Invest, 1996, 98(4): 1010-1020.