

慢性胃肠黏膜损伤树鼯模型建立的探索

叶尤松¹, 高家红¹, 赵汝², 李哲丽¹, 王陈芸¹, 马开利^{1*}, 唐东红^{1*}

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118; 2. 云南农业大学动物医学院, 昆明 650201)

【摘要】 目的 探索建立树鼯慢性胃肠黏膜损伤动物模型的可行性。**方法** 将12只成年雄性树鼯随机分成3组, 实验1、2组分别按2 mg/(kg·d)、1 mg/(kg·d)的1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)的剂量, 对照组予同等体积的生理盐水, 连续腹腔注射实验树鼯56 d, 观察树鼯体重变化, 检测脑脊液多巴胺含量, 观察镜下胃肠形态和组织病理改变情况。**结果** 模型组体重和脑脊液多巴胺含量明显下降, 胃窦、胃体、十二指肠均有不同程度的病理变化, 但2 mg/kg、1 mg/kg剂量组之间无明显区别, 对照组未见明显改变。**结论** 采用长期, 小剂量腹腔注射MPTP方式, 是一种可行的慢性胃肠黏膜损害树鼯模型的造模方法, 最理想注射剂量为2 mg/(kg·d)。

【关键词】 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; 慢性胃肠黏膜损伤; 树鼯

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0043-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 03. 008

Exploration of establishing a tree shrew model of chronic gastrointestinal mucosal injury

YE Yousong¹, GAO Jiahong¹, ZHAO Ru², LI Zheli¹, WANG Chenyun¹,
MA Kaili^{1*}, TANG Donghong^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China. 2. School of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of establishing a tree shrew model of chronic gastrointestinal mucosal injury. **Methods** A total of 12 adult male tree shrews were randomly divided into 3 groups. The experimental groups 1 and 2 were administered with intraperitoneal injection of 2 mg/(kg·d) and 1 mg/(kg·d) of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) once every day for 56 days, respectively. The control group was given the same volume of sterile saline at the corresponding time points. Changes in the body weight of the tree shrews were observed. The contents of dopamine in the cerebrospinal fluid were detected. Gastrointestinal morphology was observed by stereoscope and histopathological changes of the gastrointestinal mucosa were examined by HE staining. **Results** The body weight and the contents of dopamine in the cerebrospinal fluid of the tree shrews in the model group were significantly decreased ($P < 0.05$ for both). Pathological changes to some extent of the gastric antrum, the gastric body and the duodenum were observed, without obvious differences between the 2 mg/kg group and the 1 mg/kg group. No obvious changes were found in the control group. **Conclusions** Long-term intraperitoneal injection with a low dose of MPTP is a feasible method for the establishment of a tree shrew model of chronic gastrointestinal mucosal injury. The optimal dose is 2 mg/(kg·d) every day for 56 days.

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(编号:2016-I2M-2-006); 国家自然科学基金(编号:81571254, 81570749)。

【作者简介】 叶尤松(1974—), 男, 副主任技师, 研究方向: 实验动物学, E-mail: yys@imbcams.com.cn

【通信作者】 唐东红(1966—), 女, 主任技师, 研究方向: 实验动物学, E-mail: tldh@imbcams.com.cn;

马开利(1982—), 男, 副研究员, 研究方向: 药理学, E-mail: mkl@imbcams.com.cn。* 共同通信作者

[Key words] 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP; chronic gastrointestinal mucosal injury;
Tupaia belangeri

胃肠黏膜损伤导致的胃肠疾病是一种临床上常见的急、慢性消化系统疾病,常反复发作,给患者的身心健康带来极大的危害,建立理想的胃肠黏膜损伤性消化道动物模型,对探索该病的病因、发病机制、病变发展规律,明确治疗方法及研发新药均有积极意义。目前报道的胃肠黏膜损伤动物模型造模方法主要有:应激性造模、药物造模、乙酸或乙醇致胃溃疡模型等。早期有研究者采用能选择性破坏中脑黑质多巴胺能神经元的毒性物质 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP),腹腔注射大鼠后导致其胃、十二指肠黏膜损伤和溃疡^[1-2]。用于胃肠溃疡动物模型研究的实验动物,主要有大、小鼠等啮齿类动物,由于啮齿类与人类神经系统差别较大,建立一种费用相对低廉,能更好模拟人类神经精神因素影响所致胃肠黏膜损伤的发生、愈合及复发的动物模型,为研究胃肠病神经机制提供更理想的动物模型很有意义。树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)的遗传学研究表明其在生物学上比啮齿类动物更接近灵长类动物,有着明显大于大鼠的大脑和更高级的神经系统,应用树鼩进行神经系统疾病研究有良好的前景^[3]。与灵长类动物相比,树鼩又具有体型小、繁殖能力强的特点,在实验操作上也更为简便,但目前尚无利用树鼩成功制作胃肠疾病模型的报道。因此,本实验选择长期低剂量腹腔注射 MPTP 的方法,尝试用树鼩制作胃肠黏膜损伤模型,探索其可行性,为探索树鼩神经精神因素导致的消化系统疾病模型的开发和利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12 只滇西亚种普通级雄性树鼩,体重(153 ± 6) g, 12~18 月龄,实验所用树鼩均由昆明医科大学提供[SCXK(滇)K2013-0002],实验在中国医学科学院生物医学研究所完成[SYXK(滇)K2014-0007],并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

甲醛、苦味酸和冰醋酸(重庆川东化工有限公司化学试剂厂);Bouin 液由苦味酸饱和液 75 mL、福尔马林 25 mL 和冰醋酸 5 mL 配制而成;戊巴比妥钠,用时配制成 1% 的水溶液,每只树鼩按 100 g 体重 0.2 mL 剂量进行腹腔注射;MPTP(购自美国 Sigma 公司),用时用生理盐水配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液;三氯乙酸(购自上海沪震实业有限公司)。Nikon SMZ1500 尼康高级体视显微镜,日本 Hitachi

Himac CT15RE 高速离心机,美国安捷伦高效液相色谱仪 Agilent 1100,日本岛津 AY220 电子分析天平,德国徕卡病理系统(Leica Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与模型诱导

选取成年健康雄性树鼩 12 只,随机分为 3 组,每组 4 只,分别为 2 mg/kg 剂量组、1 mg/kg 剂量组和对照组。早餐后,2 mg/kg 剂量组腹腔注射 MPTP 2 mg/(kg·d),1 mg/kg 剂量组腹腔注射 MPTP 1 mg/(kg·d),对照组腹腔注射等体积生理盐水,连续 56 d。

1.3.2 一般情况观察

实验过程中每天观察各组动物精神状况、活动、饮食、粪便、毛色以及体重等情况并做相应记录,每周称量体重一次。

1.3.3 测定指标

56 d 后,采用 1% 戊巴比妥钠溶液按每 100 g 体重 0.2 mL 剂量对树鼩腹腔注射麻醉,待树鼩麻醉后采集脑脊液,用高效液相色谱仪测量脑脊液中多巴胺(dopamine)含量。

1.3.4 病理学检查

脑脊液采集完成后,脱臼处死树鼩,剖腹,从幽门和贲门部截取整个胃,从幽门后 1 cm 处截取十二指肠,用双面刀片沿胃大弯剖开胃,纵向剖开十二指肠,用注射器吸取 Bouin 液冲洗胃和十二指肠内壁,擦去内容物,用体视显微镜观察胃前壁内侧面、胃窦与肠内壁,并拍照做记录,之后分别取胃体、胃窦、十二指肠三部分继续置于 Bouin 液中固定,常规石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,观察胃肠组织形态学变化。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,数值用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况的观察结果

2 mg/kg 剂量组腹腔注射 MPTP [2 mg/(kg·d)] 后,其中有 2 只树鼩先后出现了一过性、暂时性的急性帕金森综合征症状(如:行动缓慢,反映迟钝,四肢无力,步态不稳,不能站立),2 只树鼩之间表现强弱略有细微差异,均在每天给药后持续约 5 min 左右,之后恢复正常。但上述帕金森症状是只有在腹

腔注射 MPTP 之后才会出现的急性症状,而且此症状持续一周之后就不再出现。其它指标和其它树鼩相同,即腹腔注射后至第 3 周末,精神状态、毛色、排粪尿正常,但食欲下降,活动量减少,第 4 周开始对照组逐渐恢复正常,模型组依旧活动量少,食欲明显下降,毛皮蓬松没有光泽,排粪时好时坏,部分

树鼩粪便呈黑色。

2.2 树鼩体重变化情况

每周称量体重一次发现,1 mg/kg 剂量组和 2 mg/kg 剂量组从开始至第 8 周体重均出现逐渐下降趋势;对照组从实验开始到第 4 周出现体重下降,第 4 开始逐渐上升直至恢复,如图 1 所示。

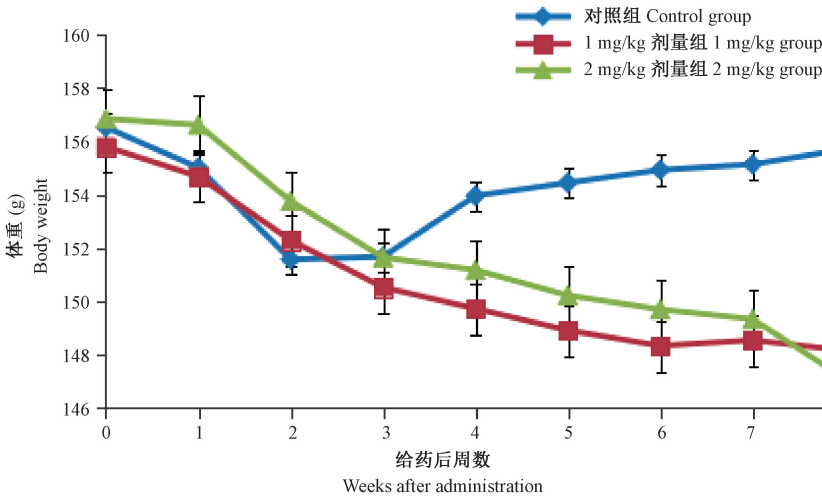


图 1 树鼩体重变化情况
Fig.1 Changes in body weight of the tree shrews

2.3 树鼩脑脊液中多巴胺含量检测结果

多巴胺含量检测结果显示(见表 1),模型组树鼩脑脊液多巴胺含量均比对照组树鼩的多巴胺含量明显减少($P < 0.05$);1 mg/kg 剂量组和 2 mg/kg 剂量组比较差异无显著性($P > 0.05$)。提示注射 MPTP 能选择性破坏树鼩中脑黑质多巴胺能神经元,使树鼩脑脊液中多巴胺含量明显降低。

表 1 树鼩脑脊液中多巴胺的含量($\bar{x} \pm s, n = 12, \text{ng/mL}$)
Tab.1 Dopamine contents in cerebrospinal fluid of the tree shrews

组别 Groups	多巴胺含量 Dopamine contents
对照组 Control group	334.66 ± 33.43
1 mg/kg 剂量组 1 mg/kg group	228.57 ± 34.06 ^Δ
2 mg/kg 剂量组 2 mg/kg group	253.43 ± 52.58 ^Δ

注:与对照组比较,^Δ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^Δ $P < 0.05$.

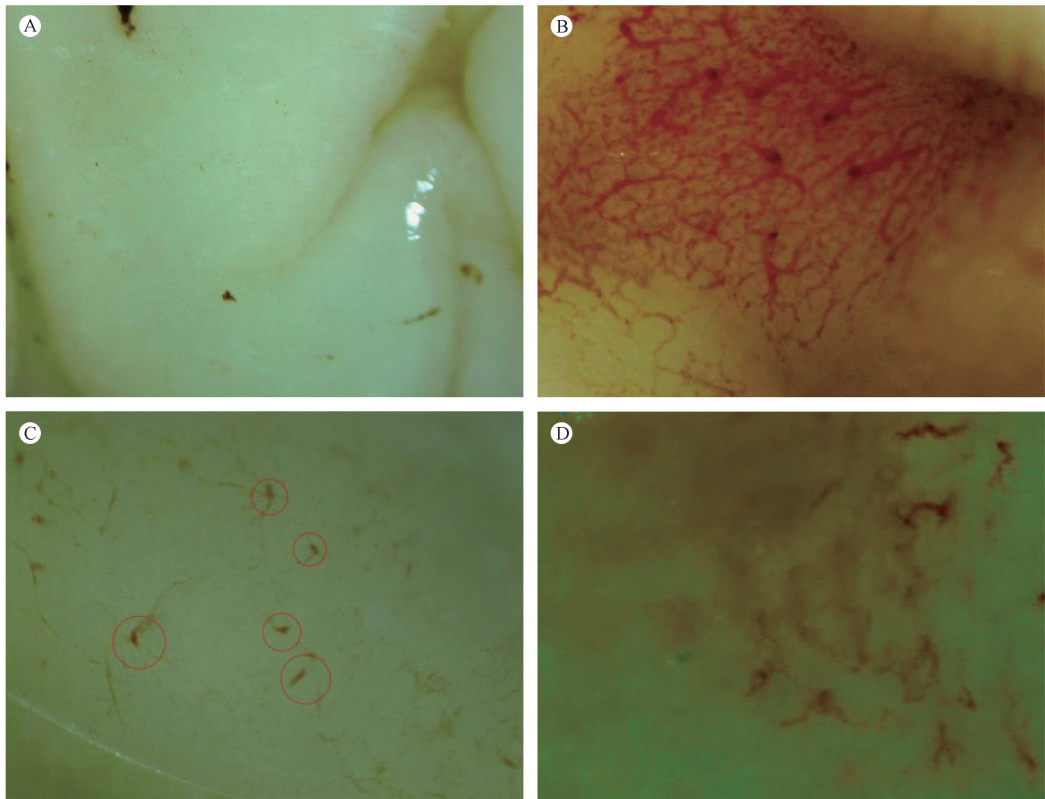
2.4 形态学观察结果

2 mg/kg、1 mg/kg 剂量组肉眼均可见树鼩胃肠外形大小、颜色正常;也可观察到胃肠道表面布满淤血,内容物呈黑色。体视镜下两组均有不同程度的胃肠黏膜损伤,具体表现为,胃黏膜局部充血或有弥漫性出血点,内壁上多处红肿出血,覆盖白色

苔状物(如图 2B),或胃黏膜部分轻微脱落,多处呈异样粉红色,内壁上有零星散在轻微出血点(如图 2C),胃窦与十二指肠则表现为正常无异样状况;也有十二指肠黏膜颜色略微加深,覆盖白色苔状物,壁上多处红肿出血,或有散在出血点(如图 2D)。但两组在胃肠黏膜损伤程度上没有明显区别;对照组肉眼和体视镜下观察,4 只树鼩胃、十二指肠均无异常表现,胃内容物少,胃肠黏膜完整清洁,结构完整,大小、形态、颜色均正常。结果见图 2。

2.5 HE 染色结果

2 mg/kg 和 1 mg/kg 剂量组大部分树鼩镜下见正常胃壁黏膜;胃体黏膜可见少许淋巴细胞及浆细胞浸润,部分表层黏膜脱落,少部分树鼩可见胃黏膜损伤明显,突出表现为黏膜下细胞水肿,部分胃黏膜结构紊乱,伴随有出血、脱落的坏死黏膜,或有粘膜上皮脱落,固有层充血,并有炎性细胞浸润,杯状细胞增多,粘膜下层充血水肿并有炎性细胞渗出,肌纤维间有大量炎性细胞浸润(如图 3B);胃窦部胃小凹粘膜上皮脱离,固有层出血,并有炎性细胞浸润,胃腺杯状细胞增多,少许树鼩肠腺上皮细胞发生化生,粘膜下层充血,有炎性细胞渗出,肌层细胞发生变性坏死(如图 3C);十二指肠粘膜上皮脱落,固有层充血,粘膜的杯状细胞增多,部分区域出现了炎细胞的慢性炎症改变,少许树鼩有固有层



注:A:对照组胃内壁;B、C:实验组胃内壁;D:实验组十二指肠。

图 2 体视镜下树鼩胃肠形态学变化(×40)

Note. A: Inner wall of the stomach in the control group. B, C: Inner wall of the stomach in the experimental groups. D: Duodenum in the experimental group.

Fig. 2 Morphological changes of gastrointestinal tract of the tree shrews observed by stereoscopy

和粘膜下层的结缔组织增生,有多量淋巴细胞浸润(如图 3D),两组比较无明显区别。对照组树鼩胃肠主细胞、壁细胞形态正常,胃壁浆膜层、肌层、黏膜下层、黏膜层四层结构清晰完整,黏膜层腺体排列整齐。见图 3。

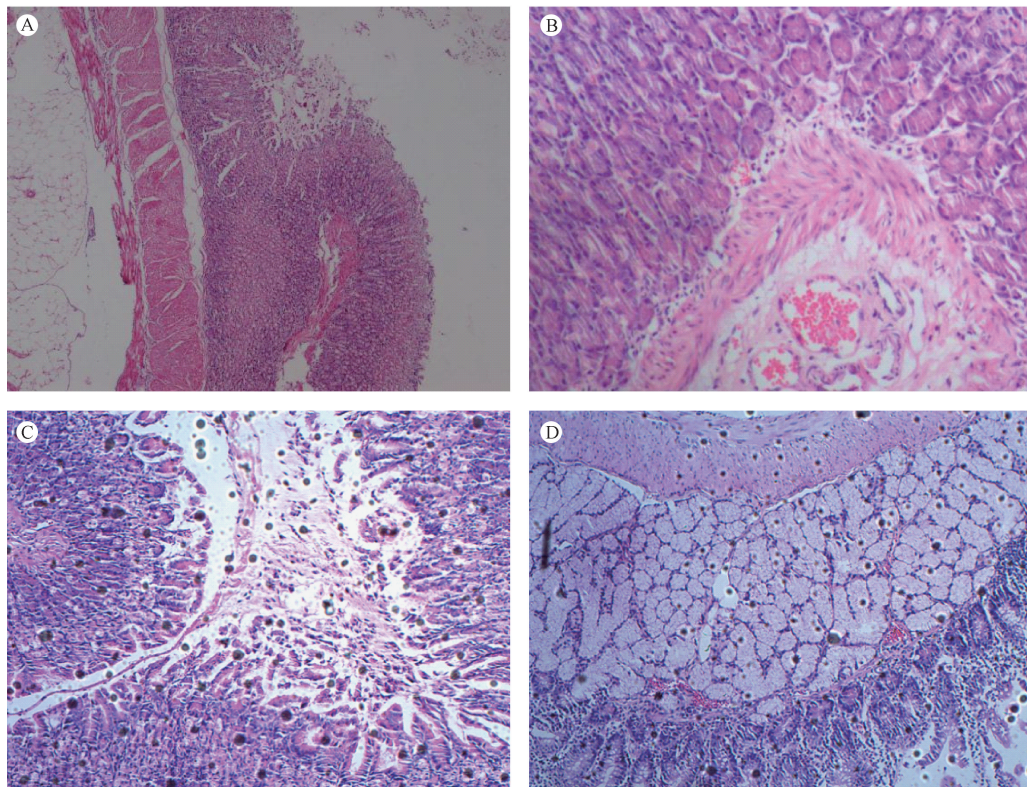
3 讨论

胃肠道疾病是常见、多发病,常见黏膜损伤为其主要病变,心理因素及不良生活习惯均可诱发。随着生活节奏加快,不良生活习惯,以及社会、工作、家庭、心理负担加重,该病的发病率有逐年上升趋势^[4-5]。建立一种理想而稳定的动物模型,模拟人类神经精神因素引起的胃肠疾病患者的病理病程、生理改变等特点,对人类胃肠病的研究很有必要。

MPTP 是一种神经毒素,能选择性破坏中脑黑质多巴胺能神经元致动物体内分泌的多巴胺含量减少。多巴胺是一种源于酪氨酸的重要胃肠神经递质,参与人的情绪(感情、欲望)等调节,通过与胃肠道多巴胺受体(dopamine receptors, DR)结合参与胃肠道消化性溃疡的发生。因此,MPTP 已经被认

为是致实验动物溃疡病的毒性物质,大鼠腹腔注射后可导致胃、十二指肠黏膜损伤和溃疡^[2,6-9]。本实验动物模型的建立,除了选择公认的试剂 MPTP 外,还选取了在生物学上比啮齿类动物更接近灵长类动物,有着比大、小鼠更高级的神经系统,又具有体型小、繁殖能力强,在实验操作上更为简便等特点的新型实验动物——树鼩作为模型动物^[10-11];采用小剂量、长期腹腔注射 MPTP 造模后,对照组和模型组树鼩给药后 3 周均出现活动减少、食欲下降、体重减轻情况,第 4 周后对照组树鼩体重、食欲和精神状况逐渐恢复正常,模型组从开始至第 8 周体重均呈逐渐下降趋势。结果表明,注射 MPTP 后,体内分泌的多巴胺含量变化,导致胃肠生理功能,包括胃肠运动和营养物质的吸收等出现紊乱。

造模后一般观察结果及树鼩脑脊液多巴胺检测结果表明,MPTP 能在中枢和周围神经系统选择性地作用于多巴胺能神经元,引起这些神经元破坏,多巴胺含量减少,导致迷走神经功能紊乱和出现类似于帕金森病的症状,结果和已报道的观点相一致^[12-13]。结果显示,帕金森症状只在高剂量组



注:A:对照组胃体;B:实验组胃体;C:实验组胃窦;D:实验组十二指肠。

图3 树鼩胃肠病理变化(HE 染色, $\times 400$)

Note. A: Gastric body, control group. B: Gastric body, experimental group. C: Gastric antrum, experimental group. D: Duodenum, experimental group.

Fig. 3 Pathological changes of gastrointestinal mucosa of the tree shrews. HE staining

[2 mg/(kg·d)] 动物一过性出现,提示 2 mg/kg 剂量可能是树鼩 MPTP 给药的临界点。

本实验模拟了人用胃镜形态学观察原理,体视镜下观察树鼩胃肠形态学变化,并综合一般观察、树鼩脑脊液多巴胺检测及树鼩胃肠病理组织学观察,结果表明:通过小剂量[1~2 mg/(kg·d)]长期腹腔注射(8 周)神经毒物质 MPTP,致树鼩胃肠黏膜损伤模型,在很大程度上能模拟人因精神因素而导致的胃肠黏膜损伤慢性发病进程,造模方法可行,理想给药剂量为 2 mg/(kg·d)。由于种属特异性的原因,树鼩胃泌素、胃动激素等激素的检测尚无公认的检测方法,相关数据的观察有待进一步研究和探讨。

参考文献:

- [1] 高蓉, 苟炜. 胃溃疡动物模型研究进展及评价[J]. 基层医学论坛, 2015, 19(26): 3690-3691.
- [2] 邓小英, 郑芝田. 多巴胺能神经元破坏导致消化性溃疡的动物模型[J]. 中华内科杂志, 1994, 33(5): 313-316.
- [3] 许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 树鼩进化分类地位的分子证据[J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 70-76.
- [4] 刘厚钰, 徐富星, 周岱云, 等. 消化性溃疡季节发病的观察

- [J]. 临床消化病杂志, 1989, 1(4): 167-168.
- [5] 江绍基, 陆汉明. 临床胃肠病学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1981: 252-256.
- [6] Strang RR. The association of gastro-doudenal ulceration and Parkinson's disease[J]. Med J Aust, 1965, 1(23): 842-843.
- [7] Szabo S, Brown A, Pihan G, et al. Duodenal ulcer induced by MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1985, 180(3): 567-571.
- [8] 周俊, 段丽萍, 杨雪玲, 等. 多巴胺 D₄ 受体在 MPTP 诱导的大鼠胃肠黏膜损害中的作用[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(18): 1611-1614.
- [9] 邓小英, 叶嗣懋, 郑芝田. 多巴胺、肾上腺素及胆碱能神经在实验性溃疡病中的相互作用[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 1995, 4(4): 250-253.
- [10] 徐林, 张云, 梁斌, 等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 59-69.
- [11] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望[J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 109-114.
- [12] Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice[J]. Science, 1984, 224(4656): 1451-1453.
- [13] Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons[J]. Neurotoxicology, 1984, 5(1): 77-82.