

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2014.10.04

沙利度胺对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 MMP-9、COX-2、IL-8 水平的影响

段春兰, 宁宝森, 唐 莉

(内蒙古包头医学院第一附属医院 消化科, 内蒙古 包头 014010)

摘要:[目的]探讨沙利度胺治疗溃疡性结肠炎大鼠的疗效及对结肠组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、环氧合酶-2(COX-2)、白介素-8(IL-8)表达水平的影响。[方法]将 40 只 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、模型组、柳氮磺胺吡啶(SASP)组、沙利度胺组,每组 10 只。应用 2,4,6 三硝基苯磺酸与乙醇的混合物复制溃疡性结肠炎大鼠模型,除空白对照组和模型组正常饲养不进行药物治疗外,柳氮磺胺吡啶组给予 SASP 混悬液 100 mg/(kg·d)灌胃,沙利度胺组给予沙利度胺片混悬液 200 mg/(kg·d)灌胃。14 d 后处死全部大鼠,观察大鼠结肠组织大体形态、结肠炎症活动指数(DAI)评分和病理学的改变,并采用免疫组织化学法检测结肠组织中 MMP-9、COX-2、IL-8 的表达水平。[结果]沙利度胺能显著降低溃疡性结肠炎大鼠 DAI 评分和结肠组织中 MMP-9、COX-2、IL-8 的表达水平,并对损伤黏膜有较好的修复作用。[结论]沙利度胺对溃疡性结肠炎大鼠有较好的疗效,主要表现在促进黏膜愈合、降低组织中 MMP-9、COX-2、IL-8 的表达水平等方面。

关键词:沙利度胺;溃疡性结肠炎;基质金属蛋白酶-9;环氧合酶-2;白介素-8

中图分类号:R574.62

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2014)10-0577-05

Effect of thalidomide on the expression of MMP-9, COX-2 and IL-8 in rat model of ulcerative colitis

DUAN Chun-lan, NING Bao-sen, TANG Li

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia Baotou 014010, China)

Corresponding author: DUAN Chun-lan, E-mail: dcl135@163.com

Abstract:[Objective]To explore the efficacy of thalidomide in rat model of ulcerative colitis and the expression of MMP-9, COX-2 and IL-8 in colon mucosa. [Methods]Forty Wistar rats were randomly divided into control group, model group, sulfasalazine group and thalidomide group, every group containing 10 rats. TNBS and alcohol mixture were used to build the model of ulcerative colitis. Rats of sulfasalazine group were given orally 100 mg/(kg·d). Rats of thalidomide group were given orally 200 mg/(kg·d). The rats of control group and model group were fed with normal feeding without any drug. All rats were killed after 14 days. The general morphology of colon tissue, DAI score and pathology changes were observed. The expression of MMP-9, COX-2 and IL-8 in colon mucosa was detected by immunohistochemistry. [Results]Thalidomide significantly reduced the DAI score and the expression of MMP-9, COX-2 and IL-8 in colon mucosa. Simultaneously, it played a role in repairing mucosal injury. [Conclusion]Thalidomide has a good effect on rat model of ulcerative colitis, mainly in promoting mucosal healing and reducing the expression of MMP-9, COX-2 and IL-8 in colon mucosa.

Key words:thalidomide; ulcerative colitis; MMP-9; COX-2; IL-8

收稿日期:2014-07-02

基金项目:内蒙古包头市卫生基金项目(No:Wsjj2013081)

作者简介:段春兰,女,副主任医师、副教授,主要从事消化系统疾病的诊断及治疗研究

通讯作者:段春兰, E-mail: dcl135@163.com

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种肠道非特异炎症性疾病,近年来随着我国的经济发展,人们饮食结构与生活方式的改变,电子内镜技术在临床的普遍应用,UC的发病率和患病率正在不断地增加^[1]。UC的典型临床表现主要为腹痛、腹泻和黏液脓血便,病情常伴有发作与缓解反复交替出现,轻重不等^[2]。该病主要侵及直肠和结肠的黏膜层和黏膜下层,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和溃疡的形成成为主要病理特点,溃疡的发生是处于动态平衡的ECM降解和合成被打破的结果^[3]。目前认为,在黏膜的降解过程中起重要作用的为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),此外,多种细胞因子也参与了UC的发生与发展。本实验采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)与50%乙醇溶液的混合物诱导UC的大鼠模型,探究沙利度胺对UC大鼠基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)的影响,并与传统治疗药物柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine, SASP)进行疗效的对比,以期深入了解沙利度胺治疗UC的作用机制,为今后沙利度胺应用于临床、治疗人类的UC提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性Wistar大鼠,体重220~260 g,由内蒙古大学生命科学学院实验动物中心SPF级(specific pathogen free)实验室提供,动物合格证号SCXK(蒙)2002-001,普通饲料喂养。动物房温度控制在18~20℃,相对湿度为50%~60%。

1.1.2 主要药物及试剂 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS),购自美国Sigma公司;柳氮磺胺吡啶片,上海信宜嘉华药业有限公司生产,批号22130607,0.25 g/片;沙利度胺片,常州制药厂有限公司生产,批号13080631,25 mg/片;牛血清白蛋白(BSA),购自美国Sigma公司;链霉亲和素-生物素复合物(SABC),购自武汉博士德生物工程有限公司;二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒,购自德国Roche公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型制备 将40只雄性Wistar大鼠适应性喂养1周后,对其进行编号,利用随机数字表将40只大鼠分为4组,分别是空白对照组、模型组、柳氮磺胺吡啶组和沙利度胺组,每组10只。采用Morris模型制作方法^[4],除空白对照组外,其余组大鼠禁食不禁水48 h,经腹腔注入10%

水合氯醛0.3 mg/100 g进行麻醉,待达到麻醉深度后将直径为6 F的新生儿吸痰管用石蜡润滑后,从肛门处缓慢轻柔地向内插入,插入深度约8 cm,将100 mg/kg TNBS与50%乙醇溶液0.3 ml的混合液经肛门缓慢注入,注入后将大鼠尾部提起,倒置2~3 min,以防止药物流出。空白对照组给予等量0.9%氯化钠溶液灌肠,造模后将大鼠放回鼠笼,待其自然苏醒后进行常规饲养。

1.2.2 药物干预 造模后第2天,观察各组大鼠一般情况,将造模成功的大鼠纳入后续实验,每天同一时段给予药物干预。柳氮磺胺吡啶组给予SASP混悬液100 mg/(kg·d)灌胃(给药剂量为人体中等治疗剂量);沙利度胺组给予沙利度胺片混悬液200 mg/(kg·d)灌胃(给药剂量参考了国内外相关的文献报道^[5-6]);模型组和空白对照组给予生理盐水10 ml/(kg·d)灌胃。连续给药2周,每日1次。

1.2.3 取材及标本处理 给药2周后,将大鼠采用头颈分离的方法处死,沿着腹正中线切开腹壁,找到并分离出结肠,截取距肛门2~10 cm部分的结肠组织,沿肠系膜纵向剪开肠腔,用4℃生理盐水冲洗掉肠内容物,取距肛门8 cm处的部分结肠置于10%甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,备用。

1.2.4 免疫组织化学 步骤:①石蜡切片脱蜡至水。②3% H₂O₂室温处理10 min,蒸馏水洗涤3次,每次5 min。③热修复抗原:0.01 M枸橼酸缓冲液微波修复2次,每次5 min。④PBS洗涤3次,每次2 min。⑤滴加封闭液,室温30 min,吸取多余液体。⑥滴加适当稀释的一抗MMP-9(COX-2),4℃过夜。⑦PBS洗涤3次,每次5 min。⑧滴加相应的羊抗小鼠-IgG二抗,37℃、30 min。PBS洗涤3次,每次5 min。⑨滴加SABC,37℃、30 min, PBS洗涤3次,每次5 min。⑩DAB显色,充分水洗。⑪苏木精-伊红复染,充分水洗。⑫脱水透明,中性树脂封片。结果判定:DAB染色后,细胞质着色呈黄褐色或棕黄色为阳性,利用图像分析系统(Image-pro 6.0)对阳性细胞行光密度测定,在高倍视野下每张切片连续5个有代表性的不重叠的视野,测定阳性部位累积光密度值(integrated optical density, IOD)和总面积值,该比值越大,表示表达水平越高。

1.3 观察指标

①一般情况:每日对大鼠的精神状态、毛色、活动情况、进食量、体重变化、大便性状和存活情况进行观察。②结肠炎症活动指数(DAI)评分:根据DAI评分标准^[7],主要对体重下降的百分比、大便性状和血便情况进行统计,并将3项得分的平均数作为最后得分。③光镜下观察结肠组织病理形态学

变化:取部分病变结肠组织用多聚甲醛进行固定,石蜡包埋后切片行苏木精-伊红染色,中性树脂封闭后,在光镜下观察病理形态。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组别间的数值比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠一般情况

空白对照组大鼠精神状态、进食量、大便性状没有变化,毛色光亮、活泼好动、体重有所增长。其余

3 组在大鼠造模后第 1 天即出现精神萎靡、进食量减少、粪便呈稀便并伴有血便、毛色暗淡、运动减少,体重逐渐下降。模型组造模后第 3 天平均 DAI 评分达到高峰,在造模后 10 d 内无明显改善,而柳氮磺胺吡啶组、沙利度胺组平均 7 d 后肉眼血便消失,8 d 后精神正常、进食量多于模型组、毛色较光亮、体重随症状的好转回升,10 d 后腹泻停止。模型组平均 DAI 评分明显高于空白对照组 ($P < 0.05$),而柳氮磺胺吡啶组、沙利度胺组明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 DAI 评分

$\bar{x} \pm s$

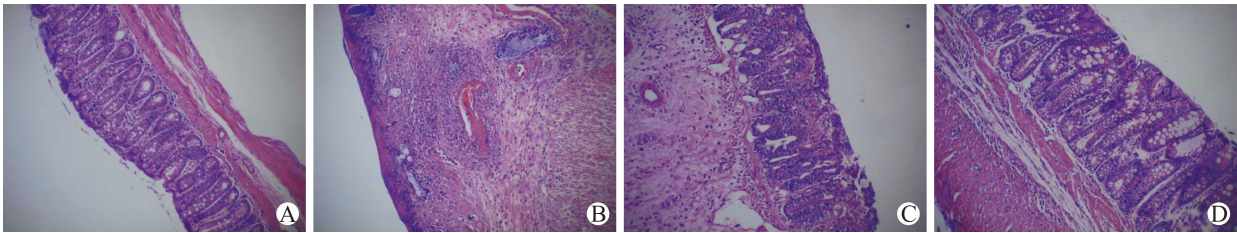
组别	第 3 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
空白对照组	0.08±0.13	0.05±0.09	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	3.98±0.22 ¹⁾	3.89±0.17 ¹⁾	3.39±0.19 ¹⁾	2.95±0.25 ¹⁾
柳氮磺胺吡啶组	3.72±0.25	3.39±0.22 ²⁾	2.46±0.12 ²⁾	2.16±0.19 ²⁾
沙利度胺组	3.68±0.19	3.31±0.11 ²⁾	2.41±0.28 ²⁾	1.39±0.11 ²⁾³⁾

与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$;与柳氮磺胺吡啶组比较,³⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 光镜下结肠组织病理形态学变化

空白对照组:组织病理学提示结肠黏膜上皮完整,各层间组织结构清晰,腺体排列整齐,黏膜层、黏膜下层未见炎性细胞或仅见少量炎性细胞浸润,未见充血、水肿以及溃疡的发生(图 1A)。模型组:各层组织结构消失,细胞间隙增宽,可见溃疡灶,有的可以侵及深度达固有层,大量中性粒细胞浸润,隐窝

内可见脓肿,并伴有杯状细胞丢失(图 1B)。柳氮磺胺吡啶组:各层结构基本清晰,可见中性粒细胞浸润,炎性细胞浸润减轻,可见散在溃疡存在(图 1C)。沙利度胺组:结肠黏膜上皮基本完整,各层次结构较清晰,可见散在中性粒细胞和炎性细胞浸润,虽然尚有溃疡存在,但深度普遍较柳氮磺胺吡啶组浅(图 1D)。



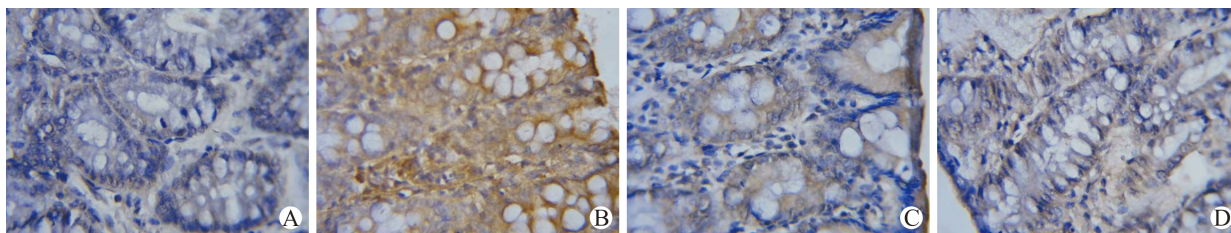
A:空白对照组;B:模型组;C:柳氮磺胺吡啶组;D:沙利度胺组。

图 1 光镜下各组大鼠结肠组织病理形态学变化(苏木精-伊红染色,×100)

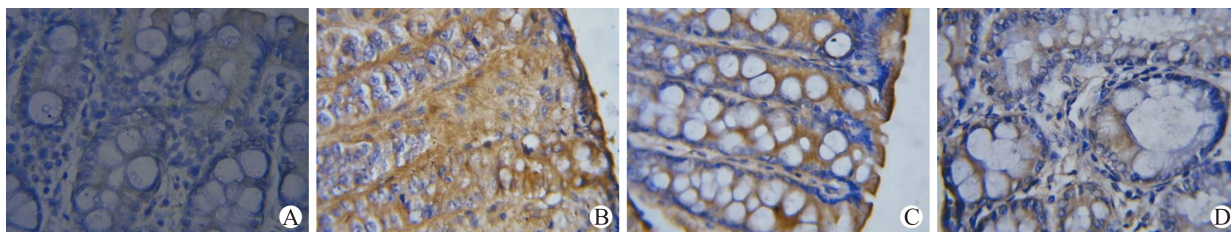
2.3 免疫组织化学结果

MMP-9、COX-2、IL-8 在空白对照组大鼠结肠组织中表达较弱,在模型组肠上皮细胞、血管内皮细胞及其间质细胞呈明显棕色强表达,而在柳氮磺胺吡啶组、沙利度胺组中表达明显减弱,呈散在分布(见图 2、图 3、图 4)。

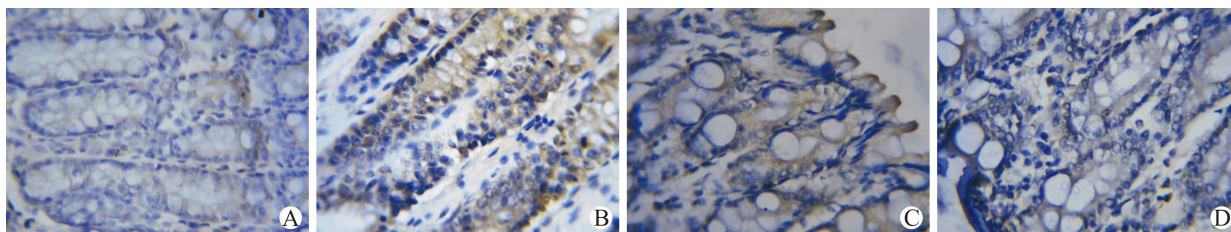
MMP-9、COX-2、IL-8 的表达量:模型组明显高于空白对照组 ($P < 0.05$),柳氮磺胺吡啶组、沙利度胺组明显低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而两治疗组间相比,沙利度胺组又明显低于柳氮磺胺吡啶组 ($P < 0.05$)。见表 2。



A: 空白对照组; B: 模型组; C: 柳氮磺胺吡啶组; D: 沙利度胺组。

图 2 MMP-9 在各组大鼠结肠组织中的表达($\times 400$)

A: 空白对照组; B: 模型组; C: 柳氮磺胺吡啶组; D: 沙利度胺组。

图 3 COX-2 在各组大鼠结肠组织中的表达($\times 400$)

A: 空白对照组; B: 模型组; C: 柳氮磺胺吡啶组; D: 沙利度胺组。

图 4 IL-8 在各组大鼠结肠组织中的表达($\times 400$)

表 2 各组大鼠 MMP-9、COX-2、IL-8 的表达水平

 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	MMP-9	COX-2	IL-8
空白对照组	10	0.1778 $\pm$ 0.0043	0.2073 $\pm$ 0.0100	0.1830 $\pm$ 0.0111
模型组	10	0.3724 $\pm$ 0.0070 ¹⁾	0.4258 $\pm$ 0.0059 ¹⁾	0.4295 $\pm$ 0.0135 ¹⁾
柳氮磺胺吡啶组	10	0.2865 $\pm$ 0.0098 ²⁾	0.3632 $\pm$ 0.0111 ²⁾	0.3765 $\pm$ 0.0582 ²⁾
沙利度胺组	10	0.1950 $\pm$ 0.0080 ²⁾	0.2816 $\pm$ 0.0140 ²⁾	0.2539 $\pm$ 0.0612 ²⁾

与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)目前病因尚未明确,认为是一种与遗传、环境、免疫、精神心理等多因素相关的慢性非特异性炎症性疾病^[8]。其主要发病人群是青壮年,对社会发展及个人的生活质量造成了严重影响,极大地增加了患者的心理负担。传统治疗并不能根治 UC,治疗目的包括控制炎症、缓解症状、维持缓解时间、提高生活质量以及预防复发、防治并发症等。常用治疗药物包括氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂和一些辅助治疗药物如抗菌药物、肠道的微生态制剂等,其中 SASP 是治疗 UC 的基本药物,糖皮质激素对急性发作期疗效较好,适用于 SASP 疗效不佳的轻中型、重型活动

期、爆发型 UC 等,因此类药物无维持治疗的效果,症状缓解后逐渐减量,长期使用还会发生很多不良反应,是 UC 治疗面临的最大挑战。免疫抑制剂适用于使用激素后效果仍然不满意的患者,较适用于激素依赖的慢性持续型病例,但因为免疫抑制剂的不良反应较多,限制了其在临床的广泛应用。

基质金属蛋白酶是一类高度保守的酶,因其具有锌离子的依赖性而得名,是细胞外基质(ECM)降解过程中不可缺少的^[9]。MMPs 主要由中性粒细胞、结缔组织细胞、淋巴细胞、肿瘤细胞等合成并进行分泌,在人体正常组织中仅有极少量的表达,但在炎症性肠病、类风湿关节炎、骨关节疾病及肿瘤的发生、发展中表达水平显著增高。COX-2 是一种与炎

症密切相关的诱导型环氧化酶,可将花生四稀酸代谢成各种前列腺素产物,参与机体炎症反应。Paio-tti 等^[10]研究发现,UC 患者的结肠组织炎性细胞中 COX-2 表达水平显著升高,且活动期患者明显高于非活动期的患者,与内镜下炎症活动度分级相吻合,提示 COX-2 在 UC 的发生发展中起重要作用。IL-8 是一种强有力的活化因子和中性粒细胞趋化因子,其主要作用是激活和趋化激活嗜中性粒细胞,并参与内皮细胞与嗜中性粒细胞粘附过程的调节,还可介导其他促炎细胞因子直接释放,是 UC 发生过程中重要的炎症递质。我们采用了免疫组织化学方法对大鼠结肠组织 MMP-9、COX-2、IL-8 的表达水平进行检测,发现模型组表达水平明显高于空白对照组,经过药物治疗后,表达水平比模型组有显著下降,而沙利度胺与传统药物柳氮磺胺吡啶相比,下调相关指标表达水平作用更加明显,说明沙利度胺有调节 UC 大鼠免疫功能的作用,进而达到治疗的目的。

结肠炎症活动指数(DAI)评分,因其操作简单,重复性好,比较适宜在实验进行中对大鼠病情的严重程度进行评估,本实验于用药后第3天、第7天、第10天和第14天(即处死大鼠当天)分别对大鼠进行评估。第3天时,所有经过造模的大鼠均属于病变急性期,因此空白对照组的 DAI 评分要明显低于模型组、柳氮磺胺吡啶组和沙利度胺组,且治疗药物起效需要一定的时间,在第3天时,经过药物治疗的柳氮磺胺吡啶组和沙利度胺组的评分并未见与未接受药物治疗的模型组有差别。第7天和第10天时,治疗药物的效果开始显现,此时虽然经过造模的3组评分依然显著高于空白对照组,但模型组与经过药物治疗的柳氮磺胺吡啶组和沙利度胺组的评分差异已有统计学意义,而此时沙利度胺组和柳氮磺胺吡啶组的疗效未见统计学差异。第14天时,随着药效的加强,沙利度胺的治疗作用逐渐显现,此时4组间两两比较差异均有统计学意义,提示沙利度胺的

疗效要优于传统治疗药物柳氮磺胺吡啶。

总之,本实验证实了沙利度胺和柳氮磺胺吡啶均能通过抑制 MMP-9、COX-2、IL-8 表达,对 UC 的免疫失衡、炎症反应起调节作用,且实验证实沙利度胺治疗作用优于传统药物 SASP。对于传统治疗无效的 UC 患者而言,沙利度胺可能是一种新的选择,但对其安全性还有待进一步的临床观察和验证。

参考文献

- [1] 王玉芳,欧阳钦,胡仁伟,等.炎症性肠病流行病学研究进展[J].胃肠病学,2013,18(1):48—51.
- [2] 陈曦,田耀州,夏军权.溃疡性结肠炎治疗研究进展[J].南京中医药大学学报,2013,29(3):293—296.
- [3] 张伟,王建莉.炎症性肠病的致病机理和治疗研究进展[J].国际免疫学杂志,2009,32(2):121—126.
- [4] 鲁兵,余万桂,吴国栋.溃疡性结肠炎模型建立的研究进展[J].长江大学学报(自科版)医学卷,2013,10(2):102—105.
- [5] 郑秀霞.沙利度胺对葡聚糖硫酸钠诱导的大鼠溃疡性结肠炎疗效观察[D].福建:福建医科大学,2011.
- [6] 王烜,欧阳钦.沙利度胺对炎症性肠病疗效的实验研究[J].四川大学学报(医学版),2005,36(4):548—551.
- [7] MURANO M, MAEMURA K, HIRATA I, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B(p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 120(1):51—58.
- [8] 李敏丽,瞿勇,缪应雷.炎症性肠病与精神心理因素相关性研究[J].昆明医科大学学报,2013,34(2):32—38.
- [9] 刘青梅,韩辅.肠康颗粒对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 MMP-3、MMP-9 水平的影响[J].中国老年学杂志,2012,32(9):1886—1887.
- [10] PAIOTTI A P, ARTIGIANI NETO R, FORONES N M, et al. Immunoexpression of cyclooxygenase-1 and-2 in ulcerative colitis[J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(7):911—918.