

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2017.11.09

壳聚糖对葡聚糖硫酸钠诱导急性结肠炎小鼠的疗效研究

张 跃, 周中银, 陈 璐, 罗和生
(武汉大学人民医院 消化内科,湖北 武汉 430060)

摘要:[目的]本研究旨在探讨壳聚糖对葡聚糖硫酸钠(Dextran sulfate sodium,DSS)诱导急性结肠炎小鼠的疗效和可能机制。[方法]选取 Balb/c 小鼠 40 只,随机分为正常对照组、DSS 组、美沙拉嗪组及壳聚糖组,除正常组自由饮食外,其余组连续饮用 3%DSS 溶液 7 d 诱发急性结肠炎,建立溃疡性结肠炎模型,同时分别给予相应药物灌胃治疗,治疗期间每天观察小鼠的体重、粪便性状和血便情况,造模结束后检测结肠组织中性粒细胞髓过氧化物酶活力(myeloperoxidase,MPO)。[结果]DSS 成功诱发急性结肠炎,小鼠有明显腹泻,粘液脓血便,体重减轻等。壳聚糖能有效改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎症状,降低结肠 MPO 活性($6.108\pm1.893\text{ U/g}$; $3.502\pm0.529\text{ U/g}$, $P<0.01$);增加结肠长度,且 HE 染色的炎症程度和疾病活动指数均有明显改善。[结论]壳聚糖能有效治疗 DSS 诱发的急性结肠炎,主要通过诱导特异性免疫应答,降低炎症反应,增强机体免疫反应。未来有望成为治疗溃疡性结肠炎的潜在药物。

关键词:壳聚糖;免疫调节;DSS 诱导的溃疡性结肠炎;治疗
中图分类号:R574 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2017)11-0837-05

Effect of chitosan on dextran sulfate sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice

ZHANG Yue,ZHOU Zhong-yin,CHEN Lu,LUO He-sheng

(Department of Gastroenterology,Renmin Hospital of Wuhan University,Wuhan 430060,China)
Corresponding author:ZHOU Zhong-yin,E-mail:zhouhu0425@163.com

Abstract:[Objective]To investigate the effect of chitosan on acute inflammatory response in mice dextran sulfate sodium-induced colitis,and the potential mechanism. [Methods]Forty Balb/c mice were divided into four groups,including normal control,DSS,Chitosan and 5-ASA,randomly. The mice in DSS,5-ASA and Chitosan groups were orally administered with 3% DSS solution for 7 days to induce acute colitis,constructing ulcerative colitis model. During the experimental period,the mice were given corresponding drug lavage treatment. Clinical signs,body weight,stool consistency and fecal blood were observed every day. At the end of the experiment,the colonic myeloperoxidase(MPO)activity were measured. [Results]3%DSS successfully induced acute colitis associated with diarrhea,mucopurulent bloody stool,and body weight decreasing. Chitosan effectively improved the symptoms of UC induced by DSS,and reduced MPO activity in colonic tissue($6.108\pm1.893\text{ U/g}$ vs $3.502\pm0.529\text{ U/g}$, $P<0.01$),increased the colon length. And the HE staining of the degree of inflammation and disease activity index were significantly improved. [Conclusion]Chitosan can effectively treat DSS-induced acute colitis through the induction of specific immune response, reducing the inflammatory response and enhancing the immune response. The Chitosan is expected to be a potential drug for the treatment of ulcerative colitis.

Key words:immunomodulation;DSS-induced ulcerative colitis;treatment

溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性炎症性肠病,病变主要限于乙状结肠、直肠的黏膜与黏膜下层,病情轻重不等,多呈反复发作的慢性病程。由于 UC 病因不清,病情反复发作、迁延不愈,且伴随癌变倾向和多种肠外症状^[1],所以世界卫生组织将其确定为现代难治病之一。目前其发病机制未明确阐明,普遍认为是遗传、环境、感染、菌群失调等多因素相互作用形成的^[2-3],但大多数学者表示 UC 的发病机制与免疫紊乱存在直接关联,免疫紊乱在 UC 的发生、发展及转归过程中始终发挥重要作用^[4]。大量实验研究表明,UC 患者肠道内有明显慢性炎症^[5],促炎因子(如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)增加,抗炎因子 IL-10 减少,而免疫调节失衡的持久性是促使炎症慢性化的主要原因。因此,调节免疫紊乱可提高患者治愈率、缩短病程、减少并发症等,将成为治疗的新方向。

壳聚糖(Chitosan)是天然多糖类阳离子高分子材料,是甲壳素的脱乙酰化产物,具有良好的生物学特性及组织相容性,且无毒、无刺激,现已广泛应用制药中。国外有较多文献研究报道壳聚糖作为免疫佐剂,能有效促进黏膜免疫反应,增强抗原传递系统作用。Chadwick 等研究发现^[6],壳聚糖能提高巨噬细胞及多形有核细胞的聚集能力和活性,增强迟发型变态反应和细胞毒性反应,从而增强免疫应答发挥。也有文献阐述了壳聚糖有明显的抗炎作用^[7]。由于 IMQ 是否能改善 UC 患者中免疫的紊乱尚未被阐明,因而研究 IMQ 对 UC 的疗效及机制,将壳聚糖作为连接 UC 与免疫系统紊乱间的桥梁,将成为 UC 治疗的创新性途径。本研究通过建立动物模型进行探讨壳聚糖对 UC 的疗效及可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型 SPF 级的 8 周龄雄性 Balb/c 小鼠 40 只,体重在 20~25 g,购买于南京大学实验动物研究中心,均饲养于武汉大学 SPF 级动物房,保持室温 20℃~23℃,人工光照 12 h/d,相对湿度 40%~60%,实验开始前适应性喂养 1 周,自由饮食。

1.2 试剂

葡聚糖硫酸钠(DSS, MW: 36000-5000, 美国 MP 生物医学公司);壳聚糖(Chitosan, 上海其胜生物制品有限公司);美沙拉嗪又名 5-氨基水杨酸(5-ASA, 玛雅试剂有限公司);羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 国药集团化学试剂有限公司);乙酸(谷歌有限公司);大便潜血试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司);髓过氧化物酶(MPO)活力测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 药品制备

5-ASA 混悬液的制备:5-氨基水杨酸加入 0.5%羧甲基纤维素钠溶液中,漩涡震荡器震荡混匀制成 20 mg/ml 混悬液后备用,每次灌胃前混匀。壳聚糖溶液制备:将 88.5%脱乙酰度壳聚糖与生理盐水配成 10 mg/ml 的溶液后经超声处理 2 次,再离心收集沉淀物,即壳聚糖小颗粒,然后按 3%的比例溶解于 0.8%乙酸盐水中,即壳聚糖溶液^[8]。

1.4 小鼠分组及造模

将小鼠随机分为 4 组,10 只/组,除正常组不做处理外,其余各组连续饮用 3% DSS 7 d 诱发急性结肠炎,建立溃疡性结肠炎模型,同时分别给予相应药物治疗:DSS 组(无菌 PBS 液 1 ml,灌胃);壳聚糖组(壳聚糖溶液 1 ml,10 mg/ml,灌胃);5-ASA 组(5-氨基水杨酸混悬液 1 ml,20 mg/ml,灌胃)。所有药品每天现配现用,连续治疗 7 d。实验第 8 天,麻醉后脱颈椎处死小鼠,剖开腹腔,分离结肠,并测量结肠长度。纵向剪开肠腔,用冰 PBS 液冲洗干净后,留取每只小鼠相同部位的结肠组织,分别用来做 HE 染色和 MPO 活力测定。其中用作 HE 染色的组织经 4%多聚甲醛固定,其余组织迅速置液氮中,速冻后转-80℃冰箱保存。

1.4 评估疾病活动指数(disease activity index, DAI)和组织病理学评分

每日观察小鼠进食、活动、毛发等一般情况及体重变化、粪便性状、粪便潜血情况,计算 DAI 总分。根据 Cooper 的 DAI 评分标准^[9]:体重未降计 0 分;下降 1%-5%计 1 分;下降 6%-10%计 2 分;下降 11%-15%计 3 分;下降>15%计 4 分。粪便正常(成型大便)计 0 分;大便松散(不黏附于肛门的糊状、半成型软便)计 2 分;稀便(黏附于肛门的稀水样便)计 4 分。未见大便潜血或肉眼血便计 0 分;大便潜血阳性计 2 分;肉眼血便计 4 分。根据以上 3 项综合评分的总分除以 3 即为 DAI。取各小鼠结肠下段相同位置的 0.5 cm 组织,经 4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋切片,HE 染色后显微镜下观察。参照文献的评分标准^[10],以隐窝结构破坏、病变深度及范围、炎症细胞浸润三者评得的总分作为组织病理学损伤评分。

1.5 结肠组织 MPO 活力测定

称取结肠组织重量,加入适量的匀浆介质,用匀浆机在冰上将组织充分匀浆,制成 5%匀浆液,其余步骤按试剂盒说明操作,最后获取各组样本 MPO 活力。结果以 U/克组织湿重为单位。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件分析。多组数据间的

比较采用单因素方差分析(ANOVA),多组间多重比较采用 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。图表用 GraphPad 6.0 软件制作。所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示

2 结果

2.1 各组结肠长度

DSS 组、壳聚糖组、5-ASA 组小鼠结肠长度均缩短,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.01$),如图 1;壳聚糖组和 5-ASA 组结肠长度大于 DSS 组,差异均有统计学意义($7.750\pm 0.538\text{ cm}$ vs $4.240\pm 0.548\text{ cm}$ 、 $7.430\pm 0.579\text{ cm}$; $4.240\pm 0.548\text{ cm}$, $P<0.01$);壳聚糖组和 5-ASA 组差异无统计意义($P>0.05$),如图 2。

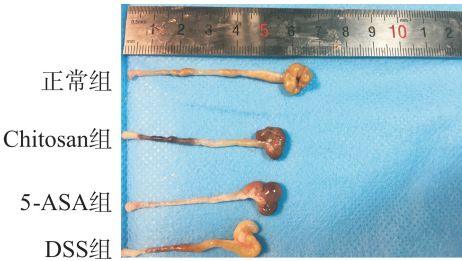


图 1 各组小鼠结肠长度比较

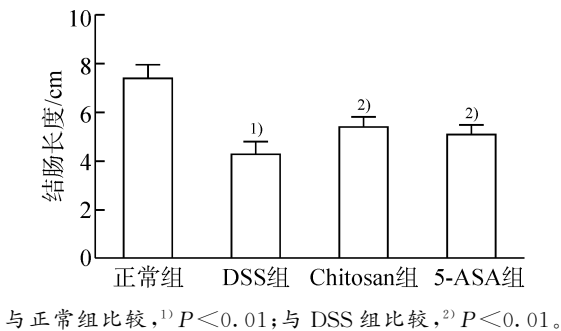


图 2 各组小鼠结肠长度变化

2.2 各组小鼠体重变化

实验前各组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$),实验结束后,除正常组体重稳定增加外,其余组小鼠体重均减轻。各组小鼠体重总减少值(即实验前后体重差值)差异有统计学意义($P<0.01$);另外 DSS 组和壳聚糖组比较,壳聚糖组小鼠体重下降

值较轻,差异有统计学意义($-3.78\pm 0.996\text{ g}$ vs $-2.480\pm 0.526\text{ g}$, $P<0.05$);壳聚糖组与 5-ASA 组差异无统计学意义($P>0.05$),如图 3。

2.3 小鼠 DAI 评分

实验过程中,DSS 组、壳聚糖组、5-ASA 组小鼠均出现饮食减少、体重下降、腹泻及血便等症状,且与正常组相比 DAI 评分均有不同程度的增高,差异有统计学意义($P<0.01$)。其中 DSS 组 DAI 评分比壳聚糖组评分高,差异有统计学意义($P<0.05$);5-ASA 组 DAI 评分与壳聚糖组评分差异无统计意义($P>0.05$),见图 4。

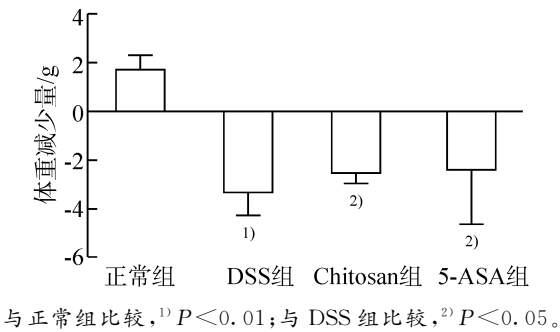


图 3 各组小鼠体重减少量

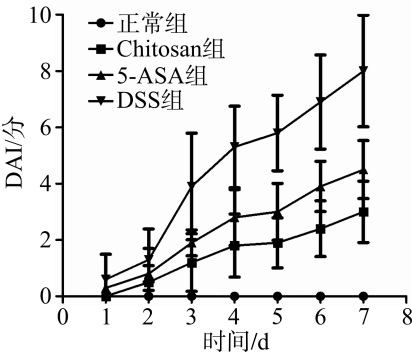
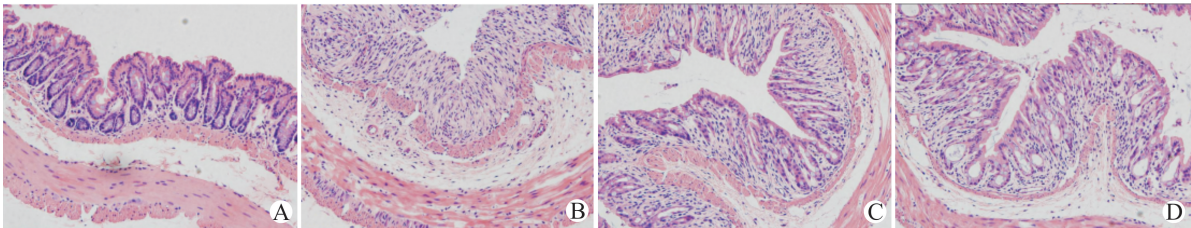


图 4 各组小鼠 DAI 评分

2.4 小鼠组织学损伤评价

镜下正常组小鼠结肠黏膜完整,腺体排列整齐,无炎性细胞浸润;DSS 组结肠黏膜脱落明显,大多腺体不完整,排列紊乱,病变重者腺体消失,隐窝破坏,大量炎性细胞浸润;壳聚糖组和 5-ASA 组黏膜缺损较轻,少数腺体破坏,炎性细胞较少。如图 5 所示。

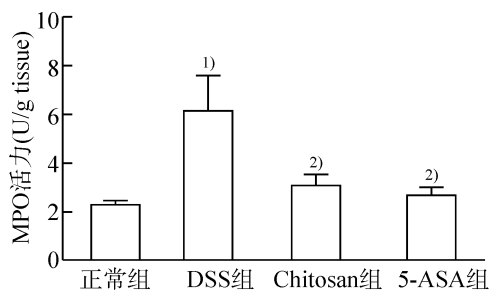


A: 正常组;B:DSS 组;C:壳聚糖组;D:5-ASA 组。

图 5 各组结肠组织 HE 染色情况($\times 10$)

2.5 结肠 MPO 活力

DSS 组、壳聚糖组、5-ASA 组 MPO 活力均较正常组增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);DSS 组与壳聚糖组比较差异有统计学意义(6.108 ± 1.893 U/g、 3.502 ± 0.529 U/g, $P < 0.01$);壳聚糖组与 5-ASA 组差异无统计学意义。如图 6。



与正常组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与 DSS 组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

图 6 结肠 MPO 活力

3 讨论

我们首次研究了壳聚糖对 DSS 诱导的 UC 模型的疗效,让小鼠连续饮用 3% DSS 7 天诱导急性结肠炎,建立 UC 急性模型。并在实验后期,可观察到小鼠出现典型 UC 症状,如体重减轻,粘液脓血便,结肠缩短等。HE 染色显示结肠黏膜明显缺损,腺体不完整,排列紊乱,隐窝破坏,大量炎性细胞浸润。而壳聚糖能改善 DSS 诱导后小鼠的一般情况,增加结肠长度,降低结肠组织 MPO 活力,表明壳聚糖有降低炎症反应的作用。因此我们大胆猜测壳聚糖在 UC 发病机制中的免疫方面存在一定影响,进一步说明壳聚糖对 UC 的炎症活动可能有一定治疗作用。

壳聚糖作为新型免疫反应调节剂主要有抗菌,抗氧化,抗肿瘤及增强免疫力等作用^[11]。近几年研究发现其可充当免疫佐剂角色,通过调节免疫机制,延长物质释放来发挥增强机体免疫机能和免疫保护效应。壳聚糖作为细菌多糖的类似物,能刺激巨噬细胞活化,从而诱导巨噬细胞非特异性的吞噬外来抗原物,并其抗原呈递作用,介导机体的细胞免疫及体液免疫应答,调节 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞,使之在免疫应答中产生协同效应,发挥增强保护性免疫力的作用。大量学者报道其抗炎作用,Yoon 等研究发现壳聚糖能从 mRNA 水平降低降低 TNF- α 和 IL-6 的表达^[12],并且下调 NO 的分泌,因此发挥抗炎效应。有研究表明壳聚糖能刺激小鼠脾淋巴细胞增殖转化^[13],提高迟发型变态反应水平,促进抗体生成,改善吞噬系统能力,对小鼠的细胞免疫、体液免疫和吞噬系统功能都有明显促进作用。Li 等发表了壳聚糖能减轻内皮细胞炎症的相关机制^[14],

认为壳聚糖能激活 B 细胞(特别是 NF- κ B)依赖的炎症基因表达,激活 NF- κ B 途径,减少 NF- κ B 核内迁移,从而减轻内皮细胞的炎症反应。另外 Chen 等研究发现壳聚糖能抑制细胞增殖^[15],减少 S 相细胞的百分比,降低细胞内 DNA 合成,有重要的抗肿瘤作用。

另一方面,DSS 诱导的 UC 发病机制中,免疫调节紊乱占极其重要的地位。Yousef 等报道^[16],IBD 患者的结肠上皮细胞受脂多糖及 TNF- α 刺激调节,壳聚糖能阻止患者由脂多糖连接细胞所导致的 NF- κ B 激活,TNF- α 和 IL-6 水平的增加,上皮细胞屏障的完整性丧失及细胞凋亡。而且他们还发现壳聚糖能降低急性结肠炎小鼠的死亡率及肠道炎症。这些结果表明壳聚糖可能通过抑制 NK-B 信号通路及结肠上皮细胞凋亡来治疗 IBD。故我们认为壳聚糖能调节 UC 发病机制中的免疫紊乱,对治疗有一定作用。

在我们的实验中,壳聚糖对 DSS 诱导的 UC 有一定疗效,目前机制并未弄清,具体有待进一步研究探索。

4 结论

总之,我们的实验研究表明壳聚糖能有效的降低 DSS 诱导小鼠 UC 模型的临床症状,抑制炎症反应。从机体自身免疫方面阻止 UC 的发生发展,提高患者生活质量,这可对以后治疗能产生深远意义。因此壳聚糖有望成为一种潜在治疗 UC 的药物。

参考文献

- [1] Adams S M, Bornemann P H. Ulcerative colitis[J]. Am Fam Physician, 2013, 87(10):699-705.
- [2] Xavier R J, Podolsky D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Nature, 2007, 448(7152):427-434.
- [3] Actis G C, Pellicano R, Rosina F. Inflammatory bowel disease: Traditional knowledge holds the seeds for the future[J]. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2015, 6(2):10-16.
- [4] Becker C, Watson A J, Neurath M F. Complex roles of caspases in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Gastroenterology, 2013, 144(2):283-293.
- [5] MacDonald T T, Biancheri P, Sarra M, et al. What's the next best cytokine target in IBD? [J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(11):2180-2189.
- [6] Chadwick S, Krieger C, Amiji M. Nanotechnology solutions for mucosal immunization[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(4-5):394-407.
- [7] Azuma K, Osaki T, Minami S, et al. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oli-

gosaccharides[J]. J Funct Biomater, 2015, 6(1):33—49.

[8] Westerink M A, Smithson S L, Srivastava N, et al. ProJuvant(Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid[J]. Vaccine, 2001, 20(5—6):711—723.

[9] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, et al. Clinico-pathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2):238—249.

[10] Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, et al. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule exerts an anti-inflammatory effect on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(6):1663—1671.

[11] Jarmila V, Vavrikova E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities—a review[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(32):3596—3607.

[12] Yoon H J, Moon M E, Park H S, et al. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(3):954—959.

[13] 彭亮, 赵鹏, 李彬, 等.壳聚糖对小鼠免疫调节作用的实验研究[J]. 实用预防医学, 2014(9):1126—1128.

[14] Li Y, Liu H, Xu Q S, et al. Chitosan oligosaccharides block LPS-induced O-GlcNAcylation of NF-kappaB and endothelial inflammatory response[J]. Carbohydr Polym, 2014, 99:568—578.

[15] Chen Y L, Wang C Y, Yang F Y, et al. Synergistic effects of glycated chitosan with high-intensity focused ultrasound on suppression of metastases in a syngeneic breast tumor model[J]. Cell Death Dis, 2014, 5(4):e1178.

[16] Yousef M, Pichyangkura R, Soodvilai S, et al. Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action[J]. Pharmacol Res, 2012, 66(1):66—79.

《中国中西医结合消化杂志》编辑部严正声明

近日,本刊编辑部频繁接到作者举报,有机构冒充本刊采编部的名义进行论文代写及快速发表业务。严重侵犯本刊的合法权益,损害本刊的名誉。本刊特严正声明如下:

1. 本刊严格遵守和执行新闻出版的有关法律、法规和管理规定,从未在全国任何地方设立过分支机构、分部和代办点;从未委托任何人或组织进行组稿、征稿、代发论文及快速发表活动。
2. 中国标准连续出版物号 CN 42-1612/R,国际标准连续出版物号 ISSN 1671-038X 为本刊出版物和编辑部设在湖北武汉的特定登记号,凡在湖北武汉以外出现的 CN 42-1612/R 刊号的出版物和编辑出版机构都是非法冒充的。
3. 本刊唯一联系地址:湖北省武汉市解放大道 1277 号 协和医院杂志社,邮编:430022;官方网站:www.whuhzss.com;联系电话:027-85726342-8011;E-mail: zxyjhxhzz@qq.com。
4. 敬请广大作者、读者务必认准本刊刊号和编辑部地址及电话,谨防上当受骗。

《中国中西医结合消化杂志》编辑部