

专题介绍

小鼠动物实验方法系列专题(四)

小鼠是生命科学研究和医学研究的重要模式生物。随着小鼠基因组测序计划的完成,国际上明显加速了在这方面研究的投入和部署。从2005年起,美国、欧盟、加拿大等批准了一系列重大科学计划,开展基因工程小鼠的大规模研制,这些项目包括美国国立卫生院的小鼠基因剔除计划(KOMP, <http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout>)、欧盟第七框架的欧洲小鼠条件性剔除计划(EuCOMM, <http://www.eucomm.org>)和加拿大的北美小鼠条件性剔除计划(NorCOMM, <http://norcomm.phenogenomics.ca/index.htm>)等。中国也在2006年由科技部立项、上海南方模式生物研究中心牵头启动了中国的小鼠条件性基因敲除计划,该计划支持了国内几十个高校和研究所150种条件性基因敲除小鼠模型的建立。随着这些研究计划的快速进展,大量基因工程小鼠模型成为科学界的共同资源,这将对功能基因组和人类疾病治疗的机制以及新药的研发产生重大而深远的影响。为帮助读者能更好地利用这些小鼠资源开展研究,我们将从本期开始以专栏形式陆续刊登介绍小鼠动物实验技术的文章,也欢迎读者能够踊跃投稿,把自己手头正在做的小鼠动物实验技术方法和心得体会介绍给大家,一起来分享实验过程中的得失和快乐。

Micro-CT辅助结肠造影在小鼠炎性肠病中的应用

王维刚^{1,2} 刘震泽² 严惠敏^{3*}¹同济大学化学系,上海 200092; ²同济大学生命科学与技术学院,上海 200092;³上海南方模式生物研究中心,上海 201203)

摘要 用DSS喂饲小鼠建立小鼠IBD模型,在建模的第0、8、13天分别用碘帕醇灌胃加腹腔注射的方法造影并micro-CT扫描降结肠壁厚度,结果第8天和第13天分别为 0.4586 ± 0.04 mm和 0.40325 ± 0.03 mm,显著($P<0.001$)大于对照组(0.28 ± 0.02 mm)。同时检测小鼠体重变化、临床评分、结肠病理切片并评分,发现结肠壁厚度变化趋势和常规指标一致。应用micro-CT辅助小鼠结肠造影方法,可以直观、动态、无创地对小鼠肠道进行影像学分析。

关键词 micro-CT; 小鼠; 炎性肠病; 结肠炎; 结肠造影

计算机X射线断层扫描(computed tomography, CT)是70年代初放射诊断的一项重大突破^[1],通过X射线对人体扫描,经电子计算机处理而获得的重建图像。在临床应用上有简便、安全、无痛、无创等优点,目前CT已经广泛应用于临床上。在现代生物医学研究中,根据替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)的“3R”原则^[2]要求研究人员尽量采用小型实验动物,并减少使用的动物数量。CT可以无创地对动物疾病模型,如肿瘤、炎症、骨骼等进行研究,因而符合这一要求。而目前医用CT因

为辐射剂量高、体积大、分辨率相对较低,不适合在实验大鼠或小鼠中应用。随着科技的发展,显微CT(micro-CT)的发明让小型实验动物CT检查成为可能^[3]。

炎性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是以

收稿日期: 2011-01-25 接受日期: 2011-03-10

国家863计划(No.2008AA02Z126)和上海市科委(No.10140901400)

资助项目

*通讯作者。Tel: 021-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com

长期慢性腹泻为特点的一种慢性局限性肠道炎症,伴不同程度的全身症状,病因复杂。IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克隆病(Crohn's disease, CD),临床上IBD具有特征性影像学变化:结肠壁增厚及特征性的“月晕征”^[4],提示粘膜水肿或脂肪沉积。在西方国家UC的发病率是0.01%~0.02%,CD发病率为0.005%~0.01%,在我国随着饮食方式的西化,发病率逐年提高,近10年来报道病例数升高3倍^[5]。IBD严重影响人类健康。在IBD治疗药物的研发中,需要以动物模型来评价药物的疗效,通常以体重降低百分比、粪便、行为等指标做临床评分,在特定时间点处死动物后,解剖取结肠及肠系膜淋巴结等标本病理切片来评价疾病严重程度^[6-8]。上述方法无法直接在活体上动态观察结肠的病理变化,有一定的局限性。micro-CT的发明及应用使动态观察活体小鼠IBD的炎症发展成为可能^[3]。

由于结肠属于软组织,与腹腔其他脏器密度接近,直接扫描在CT上无法分辨,需要造影剂辅助,本研究应用临床常用的非离子型碘造影剂碘帕醇^[9]予小鼠灌胃加腹腔注射双重对比成功进行了结肠造影。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

分子量36 000~50 000的右旋葡聚糖硫酸钠(Dextran sodium sulfate, DSS)购自MP Biomedicals公司,应用时配成3%浓度;戊巴比妥钠购自Sigma公司,使用时配成0.8%浓度;碘帕醇注射液,上海博莱科信谊药业有限责任公司;micro-CT(eXplore Locus), GE Healthcare公司。

1.2 实验动物

健康野生型C57/BL6J小鼠16只,均为雄性,8周龄,体重23~28克。小鼠饲养在恒温(21℃~22℃)房间,每隔12 h光暗循环。实验期间小鼠自由进食标准鼠粮。

1.3 IBD模型的建立

参照文献^[10]报道的方法,稍做改动,建立IBD小鼠模型:随机将小鼠分两组,每组8只:实验组以3%浓度DSS替代饮水喂饲5天,每24 h更换一次DSS,第6天实验组小鼠恢复饮水;对照组整个实验期间自由饮水。IBD模型建立后,在建模第0天、第8天及第13天分别对小鼠进行临床评分。

1.4 micro-CT辅助结肠造影方法

在实验的第0天、第8天和第13天对小鼠分别进行结肠造影,造影前无需禁食。

结肠造影方法:

- (1) 用灌胃针向小鼠胃内灌入300 μ l碘帕醇;
- (2) 以0.8%戊巴比妥钠溶液按0.1 ml/10 g体重腹腔注射麻醉小鼠,灌胃后1.5小时(对照组)和6小时(IBD实验组),通过X线透视(micro-CT附带功能)确认碘帕醇已使结肠显影;
- (3) 腹腔注射200 μ l碘帕醇,并向各方向翻动小鼠数次,以使造影剂均匀分布在腹腔内;
- (4) micro-CT扫描腹腔,扫描参数设置为80 kV peaks, 450 μ A, 0.045 mm effective pixel size, 15 min扫描总时间。扫描结束后影像按0.0449 \times 0.0449 \times 0.0449 voxels(45 μ m分辨率)进行图像重建,在CT横截面上随机取3个点,使用GEHC micro view 2.2软件测量降结肠肠壁厚度,取平均值。

1.5 结肠标本的采集及分析

建模第13天micro-CT检查结束后,记录体重,将小鼠处死,解剖取出结肠组织,用生理盐水冲洗肠内粪便,用滤纸将标本吸干。结肠有两个生理弯曲分别为结肠脾曲和结肠肝曲,将结肠分为3段:升结肠、横结肠和降结肠。截取整个降结肠,测量其全长及称重。然后将标本浸泡于中性甲醛中固定24 h,并进行切片及H&E染色。

1.6 数据的统计分析

用Origin 8.0软件(Origin Lab公司)进行统计分析,数据表示为均数 \pm 标准误,使用One way ANOVA方法统计并作图。

2 结果

2.1 炎性肠病小鼠模型的建立

实验组小鼠成功建立IBD小鼠模型,从第6天开始,实验组小鼠体重明显下降,第10天开始体重逐渐恢复;对照组小鼠在实验期间体重无下降。小鼠体重变化曲线见图1A,参照文献^[11]的临床评分标准,稍作修改,评分由粪便粘稠度、便血、体重下降三部分组成,每项最高4分,总分范围在0~12之间,分值高低与炎症正相关。分别在第0天、第8天、第13天,对小鼠进行临床评分(图1B)。

2.2 micro-CT扫描

由于结肠内和腹腔内充满造影剂,在micro-CT

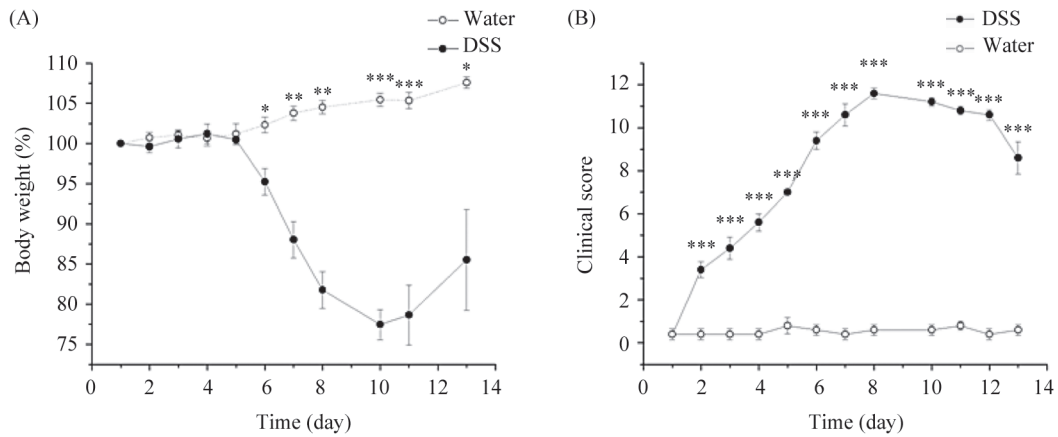


图1 DSS诱导结肠炎评价

A: 小鼠实验期间体重变化曲线; B: 实验第0、8、13天IBD临床评分。(数据表示为均值±标准误, $n=5$, $*P<0.01$, $**P<0.001$, $***P<0.0001$)。

Fig.1 Assessment of body weight and clinical score during DSS-induced colitis

A: body weight loss; B: clinical scores of colitis at day 0, day 8 and day 13. (Data expressed as means±SEM, $n=5$, $*P<0.01$, $**P<0.001$, $***P<0.0001$).

扫描时, 肠壁内外均被碘帕醇所包裹, 肠壁呈低密度造影, 可在横切面上见到清晰的环状肠壁影像(图2A~图2C红色箭头所示), 根据其周围的解剖关系推

断图中所示为降结肠肠壁。实验第0天、第8天和第13天的降结肠横截面micro-CT图分别见图2A~图2C, 可见第8天肠壁增厚水肿显著, 第13天较第8天略有

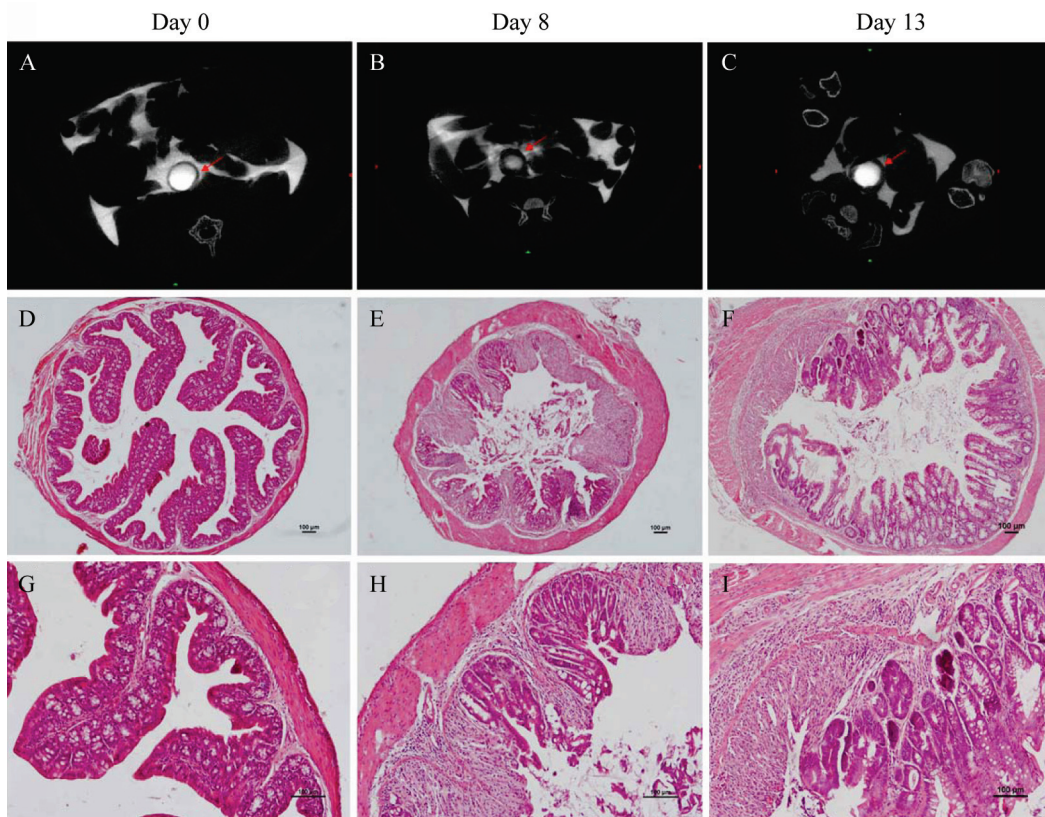


图2 小鼠降结肠肠壁造影及对应病理组织切片

A~C: 给药后第0天、第8天、第13天micro-CT检测小鼠降结肠肠壁(红色箭头所示); D~I: 典型降结肠组织切片(D~F, 4 \times ; G~I, 10 \times)。

Fig.2 Descending colon wall visualized by micro-CT and the relative histological sections

Red arrow indicates descending colon wall is depicted by micro-CT in the images at day 0 (A), day 8 (B), and day 13 (C) of colitis. Representative histological sections from the same mice are shown (D~F, 4 \times ; G~I, 10 \times).

好转。用micro-CT对降结肠肠壁厚度进行测量(图3),发现与其临床表现(图1A和图1B)趋势一致。

2.3 降结肠组织切片分析及病理评分

第13天降结肠重量长度比见图4A, DSS组降结肠单位长度重量显著高于对照组($P<0.001$),说明DSS导致结肠壁增生肥厚。病理切片可见DSS给药第8天,降结肠黏膜下水肿,降结肠腺体结构紊乱、消失,黏

膜和黏膜下炎症细胞大量浸润(图2E和图2H);第13天黏膜下水肿、被破坏的腺体出现增生修复,较第8天略有好转(图2F和图2I)。对切片结果进行双盲法病理评分,该标准参考Obermeier等^[12]报道的评分表并稍作改动,其具体评分由黏膜破坏和炎症细胞浸润两部分组成,每项最高4分,总分范围在0~8之间,分值与炎症病变正相关。病理评分结果见图4B。

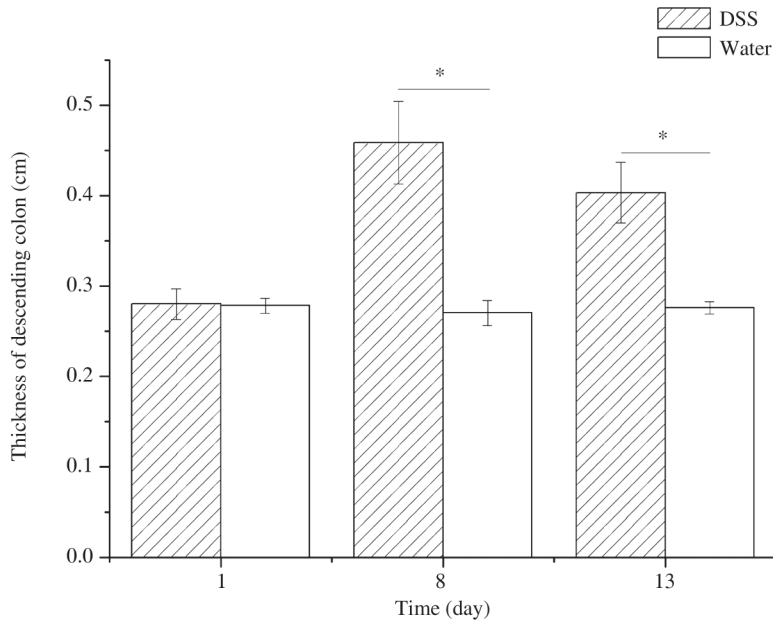


图3 Micro-CT测量降结肠厚度(mm)(数据表示为均数±标准误, $n=5$, $*P<0.01$)

Fig.3 Thickness of the descending colon wall calculated by micro-CT(mm)(data expressed as means±SEM, $n=5$, $*P<0.01$)

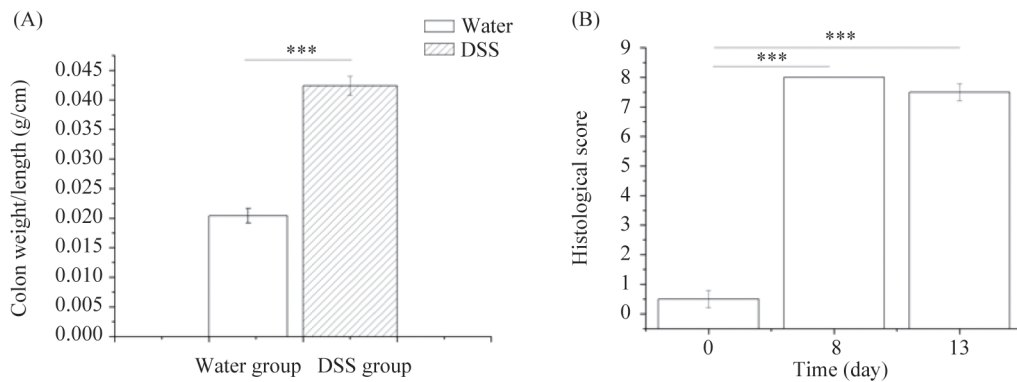


图4 降结肠重量长度比及病理评分

A: 降结肠重量长度比(g/cm); B: DSS给药后第0天、第8天、第13天病理评分。(数据表示为均数±标准误, $***P<0.0001$)。

Fig.4 Weight/length and histological score of the descending colon

A: weight/length (g/cm) of the descending colon; B: histological score of the descending colon sections at day0, day8, day13 after treated by DSS. (Data expressed as means±SEM, $***P<0.0001$).

3 讨论

IBD的发病机理尚未十分清楚,可能与肠内菌群和肠屏障的动态平衡被外界因素破坏有关^[13]。本

文中用的DSS是一种去垢剂,可以通过破坏肠上皮细胞的方式来破坏肠屏障,使肠道菌群进入黏膜下层,从而诱发肠道炎症^[14]。此模型由于较好地模拟

了人类溃疡性结肠炎(临床症状与病理),在研究中得到广泛应用^[15,16]。在小鼠表型分析研究中经常需要建立IBD疾病模型,动态地在活体上观察结肠炎症。在micro-CT发明之前一直难以做到^[17]。影响体重的因素很多,作者在实验中观察到对于体重降低百分比一致的小鼠,其结肠炎症状态经常是不同的。体重指标显然无法直接证明结肠的炎症程度。而micro-CT的应用可以直观地并相对无创地对结肠的形态学进行分析,对于结肠炎症状态更敏感。

本文用DSS加入C57/BL6J小鼠饮水中喂饲建立IBD模型,并应用micro-CT来检测了结肠壁厚度。因小鼠腹部脏器均为软组织,密度相近,直接使用micro-CT扫描,无法分辨其解剖结构,必须辅助用造影剂。在临床医学中,通常使用的胃肠造影剂是硫酸钡。国外已有研究者通过micro-CT研究小鼠结肠炎,其用的造影剂是硫酸钡(肠内)加腹腔注射静脉用造影剂^[17]。而作者在预实验中发现,硫酸钡属于重金属盐类,在micro-CT成像时会出现条纹状伪影,对成像结果有极大干扰。而临床上可以通过增加辐射剂量的方法来减少伪影。小鼠放射的致死剂量约为6 Gy^[18],micro-CT扫描一次的总辐射剂量为0.25 Gy,根据作者预实验发现无法减少金属伪影。另外辐射对结肠炎是有一定影响的,根据文献报道通过特定装置低剂量(0.1 Gy~0.3 Gy)γ射线放疗可以减轻结肠炎^[19],而高剂量(10 Gy)放疗会增加肠道氧化应激和免疫反应^[20],而micro-CT检测是利用X射线进行扫描,产生的辐射剂量较小,对肠道影响不大,本文选择3个有代表性的时间点对小鼠肠壁厚度进行监测。目前,已有商品化的小鼠专用造影剂,价格昂贵,每只小鼠造影成本在千元左右^[21],无法在实验中大规模使用。作者选用临床常用的非离子型造影剂碘帕醇注射液来进行造影。碘帕醇为第二代水溶性、非离子型、单体低渗性碘制剂,血管壁及神经组织的毒性低,局部及全身耐受性好,是一种安全有效的造影剂,被广泛应用于血管及腔内造影^[9]。静脉注射可迅速经肾脏代谢。灌胃加腹腔注射,可以使肠壁内外被造影剂包被而完全显影。前期预实验中,作者反复对实验组小鼠进行造影,与对照组比较未发现其诱发或加重结肠炎症,其结肠壁厚度与对照组无明显差异。在实验中需要注意IBD建模后小鼠胃肠动力随IBD的严重程度增加而下降。故在CT扫描之前需要先使用X光透视来确认造影剂已使结肠完

全显影,根据作者前期的实验结果发现健康小鼠组需要1.5 h左右而IBD组小鼠需要4 h~6 h不等的时间(与炎症程度正相关)。micro-CT扫描结果的分析建立在小鼠解剖学的基础上,在比较肠壁厚度时,需选取相同的结肠段,因人类溃疡性结肠炎主要发生在乙状结肠及直肠,在本文中选取的是降结肠。

在实验中,DSS组小鼠从给药的第6天开始体重下降,第10天体重最低,后开始恢复(图1A),与临床评分结果基本一致(图1B)。给药的第8天及第13天从micro-CT横截面上可见IBD组小鼠降结肠明显水肿增厚(图2A~图2C),且可以见到IBD特征性的“月晕征”(图2B),测量发现第8天实验组小鼠降结肠肠壁厚度(0.4586±0.04 mm)和第13天(0.40325±0.03 mm)显著($P<0.001$)大于对照组小鼠(0.28±0.02 mm),而第8天和第13天之间无显著性差异($P>0.05$)(图3)。组织切片见第8天,降结肠黏膜下水肿,降结肠腺体结构紊乱、消失,黏膜和黏膜下炎症细胞大量浸润(图2E和图2H);第13天较第8天略有好转(图2F和图2I)。病理评分来看实验组显著高于对照组($P<0.001$)。可见micro-CT对DSS诱导的结肠炎肠壁的动态变化具有较好的诊断能力。在用不同品系小鼠建立IBD模型时,需要对建模效果进行检测,既往研究者应用临床症状(体重、便血、腹泻等)作为指标来衡量是否成功,本文提出一个更为直观的方法来动态研究结肠炎,该方法可以有效减少使用的动物数量。文中所示结肠壁厚度与炎症的严重程度是正相关的,下一步可以建立相关数学模型来通过结肠壁厚度来评价或预测结肠炎病变的严重程度。

综上所述,本文介绍了一种检测肠壁厚度的方法,该方法具有价格低廉、无创、动态、直观等优点,可以有效观察正常小鼠和结肠炎小鼠肠壁,对IBD动物模型的评价有重要的意义,该方法在相关药物的研发中也有一定的应用价值。

参考文献(References)

- 1 Halligan S, Fenlon HM. Virtual colonoscopy. *Bmj* 1999; 319(7219): 1249-52.
- 2 Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *Altex* 2002; 19(2): 73-8.
- 3 Bentley MD, Ortiz MC, Ritman EL, Romero JC. The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(5): R1267-79.
- 4 Ahualli J. The target sign: bowel wall. *Radiology* 2005; 234(2):

- 549-50.
- 5 王玉芳, 张 虎, 欧阳钦. 炎症性肠病临床表现的东西方差异. 胃肠病学 2007; 12(2): 124-8.
- 6 Farooq SM, Stillie R, Svensson M, Svanborg C, Strieter RM, Stadnyk AW. Therapeutic effect of blocking CXCR2 on neutrophil recruitment and dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329(1): 123-9.
- 7 Dawson PA, Huxley S, Gardiner B, Tran T, McAuley JL, Grimmond S, *et al.* Reduced mucin sulfonation and impaired intestinal barrier function in the hyposulfataemic NaS1 null mouse. *Gut* 2009; 58(7): 910-9.
- 8 Shah YM, Ma X, Morimura K, Kim I, Gonzalez FJ. Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kappaB target gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292(4): G1114-22.
- 9 Aoki Y, Takemura T. Allergies correlated to adverse reactions induced by non-ionic monomeric and ionic dimeric contrast media for contrast enhanced CT examination. *Nippon Hoshasen Gijyutsu Gakkai Zasshi* 2002; 58(9): 1245-51.
- 10 van Dop WA, Marengo S, te Velde AA, Ciraolo E, Franco I, ten Kate FJ, *et al.* The absence of functional PI3Kgamma prevents leukocyte recruitment and ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Immunol Lett*; 131(1): 33-9.
- 11 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69(2): 238-49.
- 12 Obermeier, Kojouharoff, Hans, SchÖLmerich, Gross, Falk. Interferon-gamma (IFN-γ)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1999; 116(2): 238-45.
- 13 MacDonald TT. Breakdown of tolerance to the intestinal bacterial flora in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102(3): 445-7.
- 14 Aychek T, Vandoorne K, Brenner O, Jung S, Neeman M. Quantitative analysis of intravenously administered contrast media reveals changes in vascular barrier functions in a murine colitis model. *Magnetic Resonance Med* 2011; doi: 10.1002/mrm.22798.
- 15 Boismenu R, Chen Y. Insights from mouse models of colitis. *J Leukoc Biol* 2000; 67(3): 267-78.
- 16 Aharoni R, Kayhan B, Brenner O, Domev H, Labunskay G, Arnon R. Immunomodulatory therapeutic effect of glatiramer acetate on several murine models of inflammatory bowel disease. *J Pharm Exper Ther* 2006; 318(1): 68-78.
- 17 Fredin MF, Hultin L, Hyberg G, Rehnstrom E, Hultgren Hornquist E, Melgar S, *et al.* Predicting and monitoring colitis development in mice by micro-computed tomography. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14(4): 491-9.
- 18 Holdsworth DW, Thornton MM. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends Biotech* 2002; 20(8): S34-9.
- 19 Rödel F, Keilholz L, Herrmann M, Sauer R, Hildebrandt G. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Inter J Radiation Biol* 2007; 83(6): 357-66.
- 20 Christine L, Christel M, Jacques M, André P, Didier C, Denis M. Acute induction of inflammatory cytokine expression after γ-irradiation in the rat: Effect of an NF-κB inhibitor. *Inter J Radiation Biol* 2004; 58(2): 427-34.
- 21 Suckow C, Stout D. MicroCT liver contrast agent enhancement over time, dose, and mouse strain. *Mol Imag Biol* 2008; 10(2): 114-20.

Monitoring Colitis Development in Mice by Micro-CT Colonography

Wei-Gang Wang^{1,2}, Zhen-Ze Liu², Hui-Min Yan^{3*}

(¹Department of Chemistry, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract To evaluate colon wall thickness noninvasively in the dextran sodium sulfate (DSS) induced mouse model of colitis, we performed micro-CT colonography. Mice were scanned by micro-CT at day 0, day 8 and day 13 after induction of colitis and calculated the colon wall thickness. Iopamidol was used by oral and intraperitoneal injection to show the colon wall. The value of the descending colon wall thickness were 0.4586±0.04 mm (day 8) and 0.40325±0.03 mm (day 13) significantly ($P<0.001$) higher than the control group (0.28±0.02 mm). The related body weight loss, clinical score, histological section and score were consistent with the result of micro-CT. Thus, the results suggested that micro-CT can be used directly, consecutively and noninvasively in monitoring of the inflammatory response in mouse colitis in future studies.

Key words micro-CT; mouse; inflammatory bowel disease; colitis; colonography

Received: January 25, 2011 Accepted: March 10, 2011

This work was supported by the Grant 863 Program of China (No.2008AA02Z126) and Program of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (No.10140901400)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82011, E-mail: yanhuimin123@hotmail.com