

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种特发性肠道慢性炎症性疾病, 肠道黏膜免疫紊乱引起黏膜屏障的破坏是 IBD 发生的关键环节。IBD 发病与遗传因素、肠壁免疫、肠道菌群和食物结构改变等有关。IBD 的发病率在持续增长, 其包含溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。我国 UC 发病率已接近西方发达国家, CD 的发病率相对较低。临床目前还没有有效的治疗方法, 在疾病诊断后不同阶段分别试用水杨酸制剂、糖皮质激素和免疫抑制剂, 但只是缓解症状不能治愈疾病。IBD 是一种非恶性的终身疾病但严重影响患者的生活质量。UC 多发于结肠和直肠, 而 CD 多发于回肠和结肠。病理学上 CD 是肉芽肿性炎症, 而 UC 为慢性非特异性炎症。学界已对 IBD 进行了长期的探索性研究, 从临床实践到体内外实验研究, 但进步有限, 且迄今没有一个理想的动物模型来复制人类的 IBD, 因此常常临床前研究有很理想的结果, 但到临床就无法显效。本刊特组织相关研究文章辑成“炎症性肠病研究专栏”, 目的并非展示研究成果, 而是引起大家关注。希望有更多的研究者关注理想的动物模型的研究、确立正确评价实验研究效果的方法、多途径发现有效药物以至发现临床有效的综合治疗方案。当然发病机制的阐明是解决 IBD 治疗的关键, 但疾病发生是个复杂的过程, 阐明确切的机制并非易事。希望众志成城, 依靠新思路, 借助新技术, 努力攻克 IBD 这个顽疾。

[学术策划 来茂德; 专栏编辑 曹泱]

## 重视葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎模型的病理学评价

来茂德(浙江大学医学院病理学与病理生理学系, 浙江大学附属邵逸夫医院病理科, 杭州 310058)

**摘要:** 化学诱导小鼠结肠炎模型是人类炎症性肠病最常用的动物模型, 其中葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎模型应用最广。在葡聚糖硫酸钠诱导模型制备中, 不同浓度的葡聚糖硫酸钠、不同品系的小鼠, 在不同小鼠的肠段所呈现的病变严重程度不一样。因此, 取某一肠段的样本进行病理学评价是不合理的, 应该将整个大肠制成“瑞士卷”, 分上段、中段和下段结肠全面评价病理改变。肛管病变严重, 应该单独评价。全面正确评价肠道病变, 才能正确评价药物的治疗效果。

**关键词:** 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 动物模型; 葡聚糖硫酸钠; 病理学评价

doi:10.11669/cpj.2024.17.001 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)17-1553-05

### Emphasis is Placed on Pathological Evaluation of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Model

LAI Maode (Department of Pathology and Pathophysiology, and Department of Pathology of Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**ABSTRACT:** The chemically induced mouse colitis model is the most commonly used animal model for human inflammatory bowel disease, among which dextran sulfate sodium induced colitis model is the most widely used. In the preparation of a dextran sulfate induced model, different concentrations of dextran sulfate and different strains of mice showed varying degrees of lesion severity in the intestinal segments of different mice. Therefore, it is unreasonable to take a sample of a certain segment of the colon for pathological evaluation. The entire colon should be made into a “Swiss roll” and the pathological changes should be comprehensively evaluated by dividing it into upper, middle and lower segments of the colon. The anal canal lesion is severe, it should be evaluated separately. Only by comprehensively and correctly evaluating the intestinal lesion can the therapeutic effect of drugs be correctly evaluated.

**KEY WORDS:** inflammatory bowel disease; ulcerative colitis; Crohn's disease; animal model; dextran sulfate sodium; pathology evaluation

作者简介: 来茂德, 男, 博士, 教授, 博士生导师 研究方向: 肿瘤病理学 Tel: (0571) 88208200

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组原因不明的肠道慢性炎症性疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。IBD自百年前出现于西方工业化国家以来,其发病率一直在上升。近年来,我国的IBD发病率也迅速上升<sup>[1-2]</sup>。基于全国医保数据计算,2016年中国城镇IBD发病率为10.04/10万,这个发病率介于新兴工业化国家和西方国家之间<sup>[3]</sup>。我国UC发病率达8.95/10万,已与美国、澳大利亚、加拿大等一些西方国家接近,但CD发病率为0.71/10万,远低于西方国家。据估计,2025年我国IBD患者将达到150万人,成为重要的健康问题<sup>[4]</sup>。

IBD的发病涉及遗传、环境、免疫和肠道菌群等多种因素的共同作用,其病因和发病机制不清<sup>[5]</sup>,迄今没有有效缓解和治愈的药物。为了探索IBD发病机制,寻找有效的治疗药物,研究者已建立了近70种动物模型<sup>[6]</sup>。在动物模型中,以化学诱导小鼠结肠炎模型为最主要的方法,其中葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导模型应用极为广泛。由于DSS诱导结肠炎的一些特点,模型对肠道病变的病理学正确评价很重要。如果不能客观、全面评价模型的病理学改变就无法评价药物的真正疗效。笔者结合阅片的体会,提出了做好病理学评估应该注意的一些问题。

## 1 DSS模型的建立

小鼠DSS诱导结肠炎模型由Okayasu等<sup>[7]</sup>于1990年首次建立,后来广泛应用于IBD的研究。Cooper等<sup>[8]</sup>1993年对模型的病理学改变进行了详细的研究,该工作是DSS诱导结肠炎模型病理学研究的经典之作,此后陆续开展的相关研究的病理学评估均以此文评价标准为基础。Cooper组将DSS模型分为急性和慢性,急性结肠炎是5% DSS饮用1周后处死小鼠,解剖分析病变。慢性结肠炎分以下5种类型:第1种类型是7 d 5% DSS饮用后1周常规饮水;第2种是第1种重复1周期,即(7 d 5% DSS饮用+7 d 常规饮水)×2;第3种是第1种重复2周期;第4种是7 d 5% DSS饮用加14 d 常规饮水;第5种是7 d 5% DSS饮用加21 d 常规饮水。到规定时间处死小鼠,解剖进行病理学评价。不同文献DSS浓度不同,饮用时间也有调整。

小鼠DSS诱导结肠炎模型可很好建立小鼠慢性结肠炎-结直肠癌-腺癌模型。一般采用氧化偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)/DSS法建立<sup>[9-10]</sup>。该模型结合各种基因修饰,在炎症转化,结直肠癌发生机制和药物研究中具有重要价值。

## 2 IBD患者病理特征与DSS模型病理改变

人类UC可累及结肠各段,病变是直肠向上蔓延,可见于结肠。病变呈弥漫性、连续分布。典型的病变有隐窝炎和隐窝脓肿,隐窝杯状细胞减少。固有膜可见炎症细胞浸润,严重病例黏膜下及肌层可有炎症细胞浸润,继而有广泛的浅表溃疡(图1)。慢性反复发作的病例,隐

窝数量减少和萎缩,纤维组织增生、纤维化,有些肠隐窝可以增生、分支、结构扭曲。严重的病例可以出现异形增生,最终癌变。

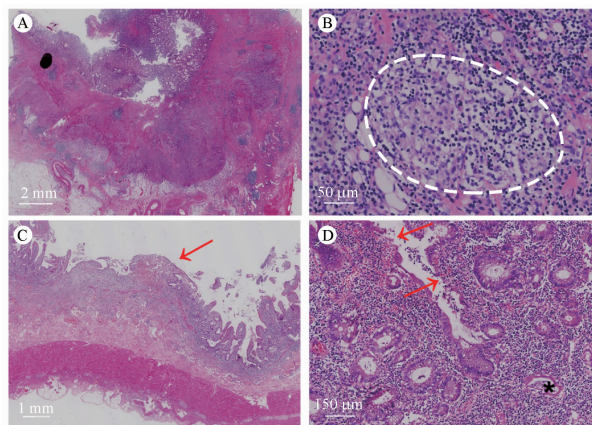


图1 人类炎症性肠病(IBD)病理特征  
A - 克罗恩病(CD)结肠壁全层炎; B - CD非干酪性肉芽肿(虚线内图为肉芽肿); C - 溃疡性结肠炎(UC)溃疡形成(↑); D - UC隐窝炎和隐窝脓肿(\*),黏膜糜烂(↑)。

图1 人类炎症性肠病(IBD)病理特征

人类CD病变以消化道病变为主,可累及消化道以外的器官。病变主要累及回肠末端,其次为结肠、近端回肠和空肠等处。肠道病变呈节段状,病变之间黏膜正常。黏膜面有纵行溃疡并发展为裂隙,重症病例可引起肠穿孔及瘘管形成。组织学上最典型的改变是非干酪性肉芽肿形成,肠壁各层有慢性炎症细胞浸润(图1)。

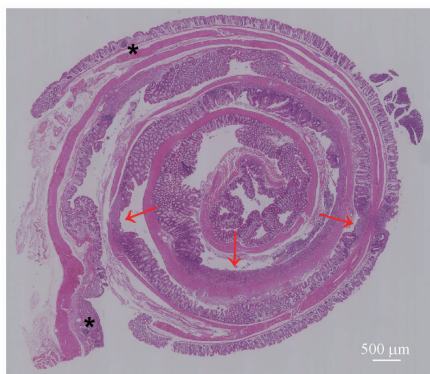
从上述描述可以看出,尽管UC和CD都归入IBD的“帽子”下,但其病理改变和发病机制不同。

小鼠DSS结肠炎模型其病理改变包括肠隐窝不同程度的上皮消失、黏膜糜烂或溃疡、炎症细胞浸润,严重的病变可累及肠壁各层(透壁性炎症)(图2),慢性病例纤维组织增生,甚至纤维化,隐窝扭曲、分支。杯状细胞减少,部分动物腺体出现不典型增生,形成腺瘤样改变(图3)。在急性结肠炎模型的少数动物中出现的这种不典型增生大多存在于炎症病灶附近。这种改变是一种修复性上皮增生,并非真正肿瘤性异形增生。在小鼠模型中,人类UC中常见典型的隐窝脓肿,没有肉芽肿样病变。肠道病变并非连续性。从病理学改变的角度,DSS诱导小鼠结肠炎模型更符合人类UC的病理变化<sup>[11-12]</sup>。

文献上对DSS诱导结肠炎模型形成的重度黏膜损伤性病变有糜烂和溃疡混用的现象<sup>[7]</sup>。在人体病理学上有严格的界定。黏膜糜烂是指黏膜上皮坏死脱落,导致浅表性缺损,其炎症性病变局限于黏膜肌以内。假如缺损较大,炎症病变累及黏膜下层,甚至肌层就称为溃疡。区别糜烂和溃疡有助于判定病变的严重程度。

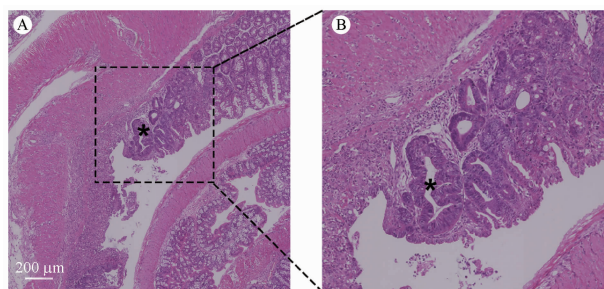
## 3 DSS模型病理学评价中应关注的问题

DSS诱导时所用DSS浓度不同、小鼠品系不同,在不同



↑ - 溃疡形成; \* - 透壁性炎, 淋巴小结形成, 上皮有不典型增生。

图2 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导结肠炎模型



A - 溃疡周边上皮明显不典型增生(\*); B - 左图放大。

图3 肠炎模型中炎症病灶周边上皮的不典型增生

肠段的病变严重程度也不一样<sup>[5]</sup>。因此动物取材仅在肠段的某一部位取1块组织进行固定、切片、苏木精-伊红(HE)染色评判病变严重程度并不能确切地反映动物病变的程度。因此,由此来评价药物治疗的效果并不合理,不同的研究者会取得不同的研究结果。同样取1个点进行病变的各种组学分析,包括单细胞测序,其结果也不能反映病变的真实情况和发生机制。在模型的病理学评估时要注意以下问题。

### 3.1 疾病活动指数

DSS诱导肠道病变可以通过病鼠体重丢失、便血和大便性状改变综合积分来评价,通常用疾病活动指数(disease activity index, DAI)来反映。文献多以 Cooper等<sup>[8]</sup>提出的计分方法来评判(表1)。只要观察仔细、认真,该计分能很好反映动物肠道病变的总体情况,其数值与病变计分的数值有很好的正相关。该法评判简单,数据稳定性好,报道的文献大多按此方法执行。

### 3.2 病理改变程度判断

**3.2.1 不同浓度 DSS 引起病变的程度不同** DSS 诱导结肠炎造模的 DSS 浓度不同,多在 1% ~ 5%。因为不同浓度引起的病变轻重不同,因此各研究团队应根据所用动物,摸索最佳的造模浓度,以取得理想的、真实的实验结果。就筛选 IBD 药物来讲,如果 DSS 浓度高,病变严重,即使最有效的药物也不能做出药物有效的结果来。严重的透壁性炎症,伴有纤维组织增生,甚至广泛的纤维化,很难有药物在动物

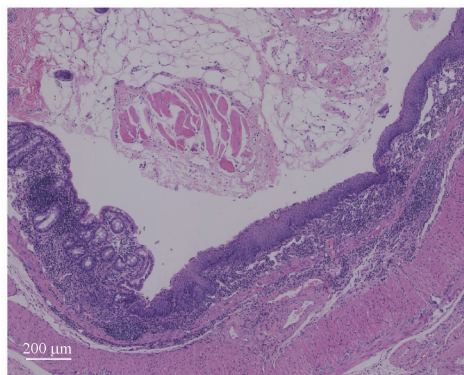
应用 1 周或稍长一点时间能产生明显的效果。笔者工作的体会是:如果比较造模成功后给药治疗与造模的同时给予相同剂量的药物,实验结果往往是造模成功后给药组作用有限,而同时给药组抑制炎症的作用比较明显。这一实验结果可以用上述现象来解释。临床所用药物对人类 UC 治疗不佳,可能的原因之一就是慢性病变,纤维化对药物没有反应。如果仔细阅读文献,就会知道该研究设计是药物的治疗作用,还是对肠炎形成的预防作用。如果同时给药可以减轻造模动物肠道的炎症,但只是对肠炎形成的预防作用。通过这种模型发现的药物疗效很难在病人身上发挥作用。

表1 IBD 的疾病活动指数(DAI)评分方法

评分	体质量丢失(减少比例)	大便性状	粪便潜血
0	无丢失	正常	阴性
1	1% ~ 5%	介于正常与稀便	+
2	6% ~ 10%	稀便	++
3	11% ~ 20%	介于稀便与腹泻	+++
4	>20%	腹泻	肉眼血便

注:表1依 Cooper等<sup>[8]</sup>方法修改而成。先将上述3项的分数相加,总分除以3即为该动物的DAI。大便性状的判断:正常动物是成形的大便,而腹泻是指液状的大便粘于肛门;稀便介于两者之间;肉眼血便说明直肠病变严重,有出血,血液黏附在粪便表面。

**3.2.2 结肠不同肠段病变程度不同** 不同种系小鼠 DSS 诱导肠道病变的严重程度不一。Okayasu等<sup>[7]</sup>采用 CBA/J 和 BALB/C 雌鼠,报道病变最重的是左侧结肠。Cooper等<sup>[8]</sup>应用 Swiss-Webster 鼠,病变最重的是中段结肠。笔者采用 C57BL/6 鼠造模,病变最重的也是中段结肠,远端结肠大多是修复性改变,但是肛管的病变非常严重,有透壁性炎症细胞浸润(图4)。因为肛管覆盖的是鳞状上皮,因此一般没有溃疡形成。



黏膜及黏膜下层有明显炎症细胞浸润,肌层和外膜也有一定数量炎症细胞浸润。

图4 结肠的肛管和直肠炎症

基于上述动物造模的真实情况,不主张随意确定某一部位取材进行病理检查,这不能正确反映整个结肠的病变情

况。因此建议结肠均分为3段,即上段、中段和下段结肠,肠段做成“瑞士卷”(Swiss-rolled-colon)(图5)<sup>[13]</sup>,全部包埋,病理阅片可以看到整个结肠的全貌。肛管可以卷在下段结肠或分离包埋,单独分析。

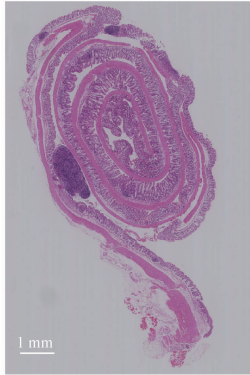
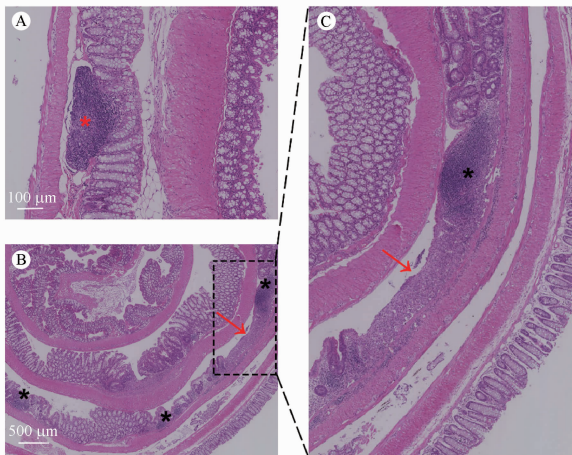


图5 整个大肠做成的“瑞士卷”

**3.2.3 结肠黏膜中的淋巴小结** 在正常结肠黏膜层(黏膜肌以内)可见少数淋巴小结(图6),即派氏斑(Peyer's patches)。派氏斑也可以出现在黏膜下层,甚至到达浆膜下,但这种情况很少。正常淋巴小结中的淋巴细胞相对稀疏,不密集,一般也没有生发中心。如果在造模动物肠道炎症处有淋巴小结,小结中淋巴细胞密集,并有中性粒细胞浸润,大多也没有生发中心。在阅片时需要正确评估淋巴小结以及数量。



A - 正常派氏斑(\*); B - 炎症肠黏膜溃疡(†),并形成多个淋巴小结(\*); C - 图6B放大。

图6 正常结肠与炎症结肠的黏膜淋巴小结

**3.2.4 肠道病变程度的评估** 目前发表的DSS诱导肠炎模型的病理改变程度评价论文大多数是应用Cooper等<sup>[8]</sup>的工作,但真正评价要比原始文献的评价方法简单。Okayasu等<sup>[7]</sup>在其原始文献中,病变严重程度采用0~3级:0代表正常;1代表灶性炎症细胞浸润;2代表腺上皮丢失,隐窝脓肿,炎症细胞浸润;3代表黏膜溃疡。而Cooper方法详

细,复杂,实际操作困难,特别是要评价很多动物时,病理人员很难有耐心去认真做好。评估隐窝上皮改变,炎症程度,隐窝扭曲和增生性改变存在等4个内容。每个又分为程度(0~4)和病变范围(0~4)。程度和范围相乘得出1个组织切面的病变程度分数,将所有切片的分数相加,除以切片数得出病变的总分数。

另外,DSS诱导肠炎模型最早的病理改变是隐窝上皮的消失,而不是炎症,炎症是继发于上皮丢失后出现的改变<sup>[8]</sup>。尽管可以依据上皮丢失的程度分为1~4级,但这些改变在饮用DSS水3d就已出现,到饮用1周或几周后处死小鼠,再去病理观察是不能见到这种改变的。因此在慢性DSS模型和人类样本中很难见到这种改变,即缺乏炎症细胞浸润的隐窝上皮消失,只有在实验开始就每天观察和处死动物,再分析样本才能见到。

为了实际可操作,依据Cooper标准,结合阅片体会,笔者建议采用表2方法评价,肛管单独评估(表3)。

表2 肠道病变的评估标准

评分	组织损伤	炎症程度	淋巴小结形成
0	无	无	正常
1	孤立性损伤	有中性粒细胞等炎细胞增加	1~2
2	黏膜糜烂	黏膜下有炎症细胞浸润	3~4
3	溃疡	肌层有炎症细胞浸润	4~6
4	广泛的溃疡性病变	透壁性炎症细胞浸润	4个以上

注:3个项目分数相加的总分除以3为该肠道病变的分数;如有隐窝脓肿,不典型增生腺体存在,出现1个病灶在原分数基础上加1分。

表3 肛管病变评价表

评分	组织损伤	炎症程度
0	没有	没有
1	上皮变性脱屑	黏膜层少量炎症细胞浸润
2	黏膜糜烂	黏膜下有大量炎症细胞密集浸润
3	溃疡	透壁性炎症细胞浸润
4	-	透壁性炎症细胞浸润伴淋巴小结形成

表2~3评分的确定以病变最重的地方为准,不再去评估占了多少面积,实际阅片时也很难去正确评价病变占整个肠段的面积。通过3个肠段和肛门分别评判,可以分别比较不同肠段病变的程度或以总分比较不同动物间病变程度的差异。

**3.2.5 动物结肠的长度变化** 造模动物解剖后比较大肠长度的变化,不论急性模型还是慢性模型大肠一般都会缩短。原因是在DSS诱导小鼠的肠壁可以看到肠壁平滑肌有不同程度的增厚<sup>[10]</sup>,平滑肌的收缩使长度缩短。在慢性病例中,炎症,特别是重度炎症的肠壁有纤维组织增生和纤维化,纤维化致肠壁缩短。因此大肠长度的缩短,某种程度上可以反映造模动物肠道病变的严重程度。

DSS诱导小鼠肠炎模型操作简单,造模易成功,也是目前研究IBD选用最多的模型。正确评价病理改变对获得正

确的结果非常重要,因此呼吁研究者高度重视。

#### 4 小结

化学诱导小鼠肠炎模型对阐释人类 IBD 的机制、发明有效的治疗方法具有很大价值,但迄今没有能够很好地复制人类 IBD 的理想模型。DSS 诱导的肠炎模型以其病理改变类似溃疡性结肠炎、造模成功率高、实验周期短等特点,成为应用最广泛的 IBD 模型。目前人们在应用该模型研究时关注其病理发展过程不够,因此会影响临床前研究结果的判断。有许多因素会影响模型的病理学发展过程,不同的 DSS 浓度、同一浓度下不同动物或同一动物不同肠段和在药物干预炎症过程时不同的给药时间等因素都会影响病理学改变及其改变程度。为了正确评价药物的疗效,应该高度重视病理学评价并规范动物试验过程,这样才能保证结果的可靠性和可比较性。从药物研发角度,建议通过多中心合作,制订 DSS 诱导肠炎模型的基础性规范,包括不同动物建模的 DSS 来源和浓度,动物肠道处理方法和病变的全面、实际可操作的评价方法,治疗方法(或药物)在造模期间干预(给药)的时间等等。只有正确的病理学评价,才会有可重复的研究结果,并得到转化。

#### REFERENCES

[ 1 ] KAPLAN G G, WINDSOR J W. The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(1):56-66.

[ 2 ] AGRAWAL M, JESS T. Implications of the changing epidemiology of inflammatory bowel disease in a changing world [J]. *United Eur Gastroenterol J*, 2022, 10(10):1113-1120.

[ 3 ] XU L, HE B, SUN Y, *et al.* Incidence of Inflammatory bowel disease in urban China: A nationwide population-based study

[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(13):3379-3386.

[ 4 ] WAN J, ZHOU J, WANG Z, *et al.* Analyze the development of inflammatory bowel disease research from 2018 to 2023 [J]. *Chin J Inflamm Bowel Dis* (中华炎性肠病杂志), 2024, 8(1):63-70.

[ 5 ] LI S, NIU J, MIU Y. Advances in animal models of inflammatory disease [J]. *Chin J Inflamm Bowel Dis* (中华炎性肠病杂志), 2019, 3(1):21-24.

[ 6 ] MIZOGUCHI A. Animal models of inflammatory bowel disease [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012, 105:263-320.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] COOPER H S, MURTHY S N, SHAH R S, *et al.* Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2):238-249.

[ 9 ] PARANG B, BARRETT C W, WILLIAMS C S. AOM/DSS model of colitis-associated cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1422:297-307.

[ 10 ] SUZUKI R, KOHNO H, SUGIE S, *et al.* Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane [J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(2):483-492.

[ 11 ] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, *et al.* Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD [J]. *J Vis Exp*, 2012, 60:e3678. DOI: 10.3791/3678.

[ 12 ] KATSANDEGWAZA B, HORSNELL W, SMITH K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16):9344.

[ 13 ] ZHANG M, LIU S, ZHANG N, *et al.* Applications of "Swiss roll" for histological studies of the mice intestine [J]. *Chin J Pathol* (中华病理学杂志), 2024, 53(4):393-397.

(收稿日期:2024-05-23)