

引用: 胡锦涛, 蒋士生, 肖梅英, 徐琳本, 李勇敏. 幽门螺杆菌 ICR 小鼠脾胃湿热证动物模型的建立[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(1): 140-142.

幽门螺杆菌 ICR 小鼠脾胃湿热证动物模型的建立

胡锦涛¹, 蒋士生², 肖梅英³, 徐琳本³, 李勇敏¹

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙, 410006;

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙, 410006;

3. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙, 410013)

[摘要] 目的: 建立脾胃湿热型幽门螺杆菌(Hp)相关性胃炎小鼠模型, 评价其胃黏膜病理变化。方法: 选择 40 只 ICR 小鼠适应性饲养, 编号后随机分为空白组 10 只和造模组 30 只, 空白组正常饲养, 不予接种 Hp, 每天仅以 0.9% 氯化钠注射液灌胃。将造模组的 30 只小鼠随机分为 3 组(M0 组、M4 组、M8 组), M4、M8 组小鼠经禁食 24h 后予 50% 乙醇 0.1ml 灌注于每只小鼠胃内, 1h 后再灌注 Hp 菌株 0.5ml; 隔天 1 次, 共灌胃 5 次(灌胃前 6h 及灌胃后 30min 内禁食、禁水)。末次灌胃 2h 后, 随机抽取 2 只 ICR 小鼠进行尿素酶试验及胃黏膜细菌培养。细菌培养镜检发现 G- 弧形杆菌, 尿素酶试验阳性, 提示 Hp 相关性胃炎小鼠模型造模成功。2 组小鼠再予湿热环境 + 高脂高糖饮食多种因素综合作用, 制备成脾胃湿热型 Hp 相关性胃炎小鼠模型, 继续饲养 4 周(M4 组)、8 周(M8 组), 定期观察动物体质量、症状积分, 分别于第 4、8 周每组各处死 1/2 动物, 取鼠胃腺体组织观察胃炎程度及 Hp 感染程度。结果: 与空白组比较, 第 4、8 周模型组症状积分、病理积分均增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与空白组比较, 模型组 Hp 感染的动物数明显增加; 与 M0 组比较, M8 组小鼠胃组织 Hp 感染严重程度显著增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 通过灌胃给菌的方法可以成功将 Hp 定植于小鼠体内, 并在现有条件下成功建立脾胃湿热证 Hp 相关性胃炎小鼠模型, 其保存期有 8 周, 且 8 周模型胃炎程度及 Hp 感染程度更深。

[关键词] Hp 相关性胃炎; 脾胃湿热型; 小鼠模型; 实验研究

[中图分类号] R259.732 **[文献标识码]** A DOI: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.01.058

Establishment of an animal model of Helicobacter pylori - related gastritis with spleen - stomach damp - heat using Institute of Cancer Research mice

HU Jinyang¹, JIANG Shisheng², XIAO Meiyang³, XU Linben³, LI Yongmin¹

(1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To establish a mouse model of Helicobacter pylori (Hp) - related gastritis with spleen - stomach damp - heat, and to investigate the pathological changes of gastric mucosa. Methods: A total of 40 Institute of Cancer Research (ICR) mice were given adaptive feeding, and then they were numbered and randomly divided into blank group with 10 mice and model group with 30 mice. The mice in the blank group were given normal feeding and 0.9% sodium chloride injection by gavage without Hp inoculation. The model group was further divided into M0, M4, and M8 groups; the mice in the M4 and M8 groups were given 0.1 mL 50% alcohol by gavage after 24 - hour fasting, followed by 0.5 mL Hp strain by gavage 1 hour later, once every other day for a total of 5 times, with fasting and water deprivation at 6 hours before gavage and 30 minutes after gavage. At 2 hours after the last gavage, 2 ICR mice were randomly selected for urease test and bacterial culture of gastric mucosa. Bacterial culture and microscopy found G - campylobacter and urease test yielded positive results, suggesting that a mouse model of Hp - related gastritis was successfully established. Various factors including damp - heat environment and high - fat high - glucose diet were used to establish a mouse model of Hp - related

基金项目: 湖南省教育厅项目(12A104)

第一作者: 胡锦涛, 女, 主治医师, 研究方向: 脾胃病的中医药诊治

通讯作者: 蒋士生, 男, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 脾胃病的中医药诊治, E-mail: 664210847@qq.com

gastritis with spleen - stomach damp - heat. The mice in the M4 and M8 groups were fed for another 4 and 8 weeks, respectively. Body weight and symptom score were observed regularly. Half of the animals were sacrificed at week 4, and the other half were sacrificed at week 8; gastric gland tissue was collected to observe the severity of gastritis and Hp infection. Results: Compared with the blank group, the model group had significant increases in symptom score and pathological score at weeks 4 and 8 ($P < 0.05$). Compared with the blank group, the model group had a significant increase in the number of mice with Hp infection. Compared with the M0 group, the M8 group had a significant increase in the severity of Hp infection in gastric tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: The method of giving Hp by gavage can achieve successful colonization of Hp in mice and help to successfully establish a mouse model of Hp - related gastritis with spleen - stomach damp - heat in existing conditions. The model can be preserved for 8 weeks, and there are increases in the severity of gastritis and Hp infection at week 8.

[Key words] Helicobacter pylori - related gastritis; spleen - stomach damp - heat; mouse model; experimental study

自于人胃黏膜组织标本中成功培养出幽门螺杆菌(Hp)并发现其与消化性溃疡和慢性活动性胃炎的发病相关以来,对Hp相关性疾病的研究一直是消化系统疾病研究中的重点。学者通过建立Hp感染的动物模型来探讨Hp诱导疾病的发病机制,这对抗菌药物疗效评估具有重要意义。Hp 悉尼菌株(SS1)被广泛运用于小鼠模型,具有方便、易获得的优点,目前已成为研究Hp感染最常用的动物模型。本研究旨在通过建立不同的造模时期对模型动物体内胃组织病理进行比较评分,以期进一步优化模型。

1 实验材料

1.1 动物 ICR 小鼠, SPF 级, 40 只, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 20g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(湘)4300470000022。

1.2 菌株 Hp 菌株由湖南省中医药研究院附属医院中心实验室提供。

1.3 试剂和湿热环境试验箱 Hp 染色试剂盒(由福州迈新生物技术开发有限公司提供, 编号: MST-8027); 湿热环境试验箱为双层结构, 内层为箱体, 用于饲养动物, 外层为循环水保温层, 连接循环水恒温器, 用于维持内层空气温度。箱体是透明双层有机玻璃, 大小 50cm × 40cm × 50cm, 厚度 10mm, 上下层各放小鼠 2 笼^[1]。设置室内温度(32 ± 0.5)℃, 相对湿度(75 ± 2)%。

2 实验方法

2.1 动物分组与造模 选取 40 只 ICR 小鼠进行适应性饲养, 编号后将其随机分为空白组 10 只和造模组 30 只, 空白组正常饲养, 不予接种 Hp, 每日仅以 0.9% 氯化钠注射液灌胃。将造模组的 30 只小鼠随机分为 3 组(M0 组、M4 组、M8 组), M4、M8 组小鼠经禁食 24h 后予 50% 乙醇 0.1ml 灌注于每只小鼠胃内, 1h 后再灌注 Hp 菌株 0.5ml; 隔天 1 次, 共灌胃 5 次(灌胃前 6h 及灌胃后 30min 内禁食、禁水)。末次灌胃 2h 后, 随机抽取 2 只 ICR 小鼠进行尿素酶试验及胃黏膜细菌培养。细菌培养镜检发现 G - 弧形杆菌, 尿素酶试验阳性, 提示 Hp 相关性胃炎小鼠模型造模成功。每天置于人工湿热试验箱中 8h, 喂食高脂、高糖饲料(60% 基础饲料, 12% 猪油, 18% 蔗糖, 3% 胆固醇, 7% 蛋黄粉), 最终制作脾

胃湿热型 Hp 相关性胃炎小鼠模型。确认造模成功后再继续饲养 4 周(M4 组)和 8 周(M8 组)。

2.2 观察指标 定期测量各组小鼠体质量、饮水量、食量, 每天观察动物症状, 如精神状况、形体、舌苔、大小便的情况, 按无、轻、中、重程度分别计为 0、1、2、3 分, 记录每只小鼠症状积分, 分别于第 4、第 8 周处死 1/2 动物, 取胃组织切片并普通染色, 参照悉尼分级系统^[2]将胃黏膜病变按照炎性细胞浸润、腺体萎缩程度分为 4 级: 无炎症 0 分, 轻度炎症 1 分, 中度炎症 2 分, 重度炎症 3 分。胃组织切片按试验盒说明染色, 参照悉尼分级系统^[2]观察 Hp 分级: Hp 深红色, 背景红色。Hp: 无 Hp (< 2 个红点); Hp + : 局部少量 Hp (2 ~ 10 个红点); Hp + + : 10 ~ 50 个红点; Hp + + + : > 50 个红点。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 符合正态性和方差齐性的资料, 应用完全随机化设计的方差分析、多重比较, 不符合正态性和方差齐性, 用秩和检验 Kruskal - Wallis H 检验, 两组比较用 Wilcoxon 检验和 Mann - Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组小鼠症状积分、病理积分比较 模型组小鼠好动, 精神好, 形体消瘦, 二便无明显变化, 舌苔无明显变化。与空白组比较, 第 4、8 周模型组动物症状积分、病理积分均增加, 差异有统计学意义。(见表 1)

表 1 各组小鼠症状积分、病理积分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	只数	时间节点	症状积分	病理积分
空白组	10	第 4 周	0.24 ± 0.32	0.55 ± 0.13
		第 8 周	0.27 ± 0.53	0.81 ± 0.61
模型组	10	第 4 周	1.70 ± 0.21 ^a	1.27 ± 0.19 ^a
		第 8 周	2.83 ± 0.61 ^a	2.19 ± 0.25 ^a

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

3.2 各组小鼠胃组织 Hp 感染情况比较 与空白组比较, 模型组 Hp 感染的动物数明显增加; 与 M0 组比较, M8 小鼠胃组织 Hp 感染严重程度显著增加, 差异均有统计学意义。(见表 2)

表2 各组小鼠胃组织 Hp 感染情况比较(只)

组别	只数	Hp -	Hp +	Hp + +	Hp + + +
空白组	10	9	1	0	0
M0组	10	0	8 ^a	2 ^a	0
M4组	10	0	5 ^a	5 ^a	0
M8组	10	0	3 ^a	5 ^{ab}	2 ^{ab}

注:与空白组比较, $P < 0.01$;与M0组比较, $^b P < 0.05$ 。

4 讨论

构建良好的感染动物模型是进行 Hp 感染体内相关研究的基础。目前, Hp 感染小鼠的动物模型的应用相当广泛, 感染 Hp 的动物模型多选用非常规的(无菌、无生命、无胸腺、转基因)或常规但使用动物适应的 Hp 菌株感染的动物模型。然而, 这些非常规动物的免疫状态和 Hp 分离株在动物适应过程中可能经历的突变都引起了人 Hp 相关疾病的致病机制方面的问题^[3]。同时由于在实验中由于某些人为因素可能会破坏相对稳定的胃黏膜屏障, 为相关形态学判断带来一定的干扰, 例如如何更明确细菌致病变周期, 如何缩小模型与人体间病理变化的差距等, 这在建立更稳定的 Hp 感染模型时仍值得探讨。

现在研究认为, Hp 为致病因子导致 Hp 相关性胃炎患者多有湿热证候, 脾胃湿热又是在脾胃疾病变化过程中正邪交争最剧烈的阶段^[4]。胃黏膜呈现明显充血水肿、糜烂或溃疡上覆黄苔, 甚则黏膜下出血的活动性炎症改变。本实验以 Hp 为致病因子引起小鼠胃黏膜炎症, 以肥甘饮食损伤脾胃作为内湿的病因, 湿热环境作为外湿因素来制备既符合脾胃湿热成因, 又满足 Hp 相关性胃炎模型需要的病证

(上接第131页)和阳性组趋势一致, 表明针挑疗法可起到类似 miRNA - 126 抑制剂的作用, 提示其起效环节与下调 miRNA - 126 表达, 进而下调 TSLP 表达, 降低 Th2 型细胞因子水平, 从而缓解哮喘炎症有关。由于 miRNA - 126 作用广泛, 作用于不同靶基因或不同信号通路而表现出多方面的功能, 且 Th1 和 Th2 也有各自特异性的转录因子, 因此对于针挑疗法治疗哮喘的作用环节, 仍需进一步实验以观察其对 Th1 和 Th2 转录因子的影响。

参考文献

- [1] RAY A, COHN L. Altering the Th1/Th2 balance as a therapeutic strategy in asthmatic diseases[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2000, 1(4): 442 - 448.
- [2] RAUTAJOKI KJ, KYLANIEMI MK, RAGHAV SK, et al. An insight into molecular mechanisms of human T helper cell differentiation [J]. *Ann Med*, 2008, 40(5): 322 - 335.
- [3] MOU Z, XIA J, TAN Y, et al. Overexpression of thymic stromal lymphopoietin in allergic rhinitis[J]. *Acta Otolaryngol*, 2009, 129(3): 297 - 301.
- [4] MATTES J, COLLISON A, PLANK M, et al. Antagonism of miRNA - 126 suppresses the effector function of Th2 cells and the development of allergic airways disease[J]. *Proc Natl Acad Sci*,

结合模型。本次造模研究从小鼠饮食、二便、舌苔及精神状态、胃组织病理等结果分析, 结果显示造模方法成功。

本研究在模型成功后持续观察模型保存期 4 ~ 8 周, 发现 4, 8 周时模型小鼠的胃组织病理与空白组差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示该模型的保存期可为 8 周, 且 8 周模型胃炎程度及 Hp 感染程度更深。实验中我们可以看出脾虚湿型 Hp 感染组相比单纯 Hp 感染组而言, 胃炎程度及 Hp 感染程度更严重, 可初步估计脾虚湿证对 Hp 感染程度及胃黏膜炎症改变有一定相关性, 今后还需大量实验研究和进行合理地临床观察 Hp 定植的稳定性和出现胃黏膜炎症改变的时间及程度。本实验为建立更成熟的 Hp 感染动物模型方案提供了基础, 中医证型的指标客观化作为中医病证动物模型的核心问题是该模型方案进一步深入研究的方向之一。

参考文献

- [1] 赵远鹏, 蔡颖, 董兆君. 一种小动物湿热环境试验箱的研制[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(5): 461 - 462.
 - [2] MOORCHUNG N, SRIVASTAVA AN, GUPTA NK, et al. Gytokine gene poly - morphisms and the pathology of chronic gastritis [J]. *Singapore Med J*, 2007, 48(5): 447 - 454.
 - [3] 李弘, 颜丽萍, 梁勇, 等. 幽门螺杆菌感染动物模型最新进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(16): 79 - 81.
 - [4] 胡锦涛, 蒋士生, 肖梅英, 等. 健脾解毒活血汤对幽门螺杆菌相关性胃炎脾胃湿热证模型小鼠 IL - 1 β 、GAS 的影响[J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35(10): 144 - 146.
- (收稿日期: 2019 - 06 - 17)
- [5] 2009, 106(44): 18704 - 18709.
 - [5] LIU YJ, SOUMELIS V, WATANABE N, et al. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007(25): 193 - 219.
 - [6] LEE CM, CHANG JH, MOON DO, et al. Lycopene suppresses ovalbumin - induced airway inflammation in a murine model of asthma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(2): 248 - 252.
 - [7] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
 - [8] MEYER EH, DEKRUYFF RH, UMETSU TS, et al. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma[J]. *Annu Rev Med*, 2008(59): 281 - 292.
 - [9] 徐力, 滕琳, 刘春梅. 哮喘患者血清 TSLP、ECP 的表达水平及临床意义[J]. *潍坊医学院学报*, 2011, 33(2): 91 - 92.
 - [10] 李少君, 段建敏. miRNA - 126 与肿瘤靶基因的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(7): 1150 - 1153.
 - [11] 黄汉儒. 壮医理论体系概述[J]. *中国中医基础医学杂志*, 1996, 2(6): 3 - 7.
 - [12] 庞声航, 黄东挺, 王小平, 等. 壮医特色针挑疗法对支气管哮喘患者肺功能影响的研究[J]. *广西中医药*, 2008, 31(6): 53 - 55.
 - [13] 王小平, 蒋桂江, 黄东挺, 等. 壮医针挑治疗哮喘 120 例[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(5): 965 - 967.
 - [14] 刘硕. 针刺治疗支气管哮喘的进展[J]. *中国现代药物应用*, 2011, 5(16): 126 - 127.
- (收稿日期: 2019 - 05 - 14)