

沙利度胺治疗葡聚糖硫酸钠诱导小鼠炎症性肠病及其机制研究

刘秀书¹, 杜倩¹, 尹世强^{2*}

1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

2. 国药控股天津有限公司, 天津 300040

摘要:目的 考察沙利度胺对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠炎症性肠病的治疗作用,并探讨其可能的作用机制。方法 60只 Balb/c 小鼠按体质量随机分为对照组、模型组、柳氮磺吡啶(200 mg/kg)组以及沙利度胺 30、60、120 mg/kg 剂量组,每组 10 只。试验当天为第 1 天,试验期间葡聚糖硫酸钠诱导组饮用 2.5%葡聚糖硫酸钠饮用水,对照组则饮用纯净水。从试验第 5 天开始,各给药组开始 ig 给予相应药物,给药容积 10 mL/kg,1 次/d,对照组和模型组则给予相应体积的 0.5% MC,直至第 12 天结束试验。试验期间,每天记录各动物体质量变化。试验结束后,测量各动物结肠长度,观察各组结肠组织病理学改变和评分,ELISA 法检测结肠组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。结果 沙利度胺在 120 mg/kg 剂量下改善葡聚糖硫酸钠诱导小鼠体质量下降症状,改善小鼠的结肠缩短,降低结肠组织 TNF- α 含量,减少炎症细胞对结肠组织的浸润。结论 沙利度胺对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠炎症性肠病呈现较好治疗作用,该作用可能与沙利度胺对 TNF- α 的调节作用有关。

关键词: 沙利度胺; 炎症性肠病; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)04-0370-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.04.005

Therapeutic of thalidomide on dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease in mice and its mechanism

LIU Xiu-shu¹, DU Qian¹, YIN Shi-qiang²

1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

2. Sinopharm Group Tianjin Co., Ltd. Branch, Tianjin 300040, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of thalidomide on dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease in mice and explore its possible mechanism. **Methods** According to body weights, Balb/c mice (60) were randomly divided into control, model, sulfasalazine (200 mg/kg), and thalidomide (30, 60 and 120 mg/kg) groups, and each group had 10 mice. Mice were received 2.5% Dextran sulfate sodium solution for 12 d to induce inflammatory bowel disease except those administered pure water in control group. From fifth day, mice were ig administered thalidomide 30, 60, and 120 mg/kg and sulfasalazine 200 mg/kg with 10 mL/kg and once daily for 7 d, and mice in control and model groups were ig administered corresponding volume of 0.5% MC. During the experiment, body weights were monitored and recorded daily. At the end of experiment, colonic length, pathologic scores, histopathology were evaluated, and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were determined by ELISA. **Results** Thalidomide at dose of 120 mg/kg could improve loss of body weight in mice of dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease, improve colon shortening, significantly decrease TNF- α levels in colonic tissue, and reduce colon injury of inflammatory cell. **Conclusion** Thalidomide has therapeutic effect on dextran sodium sulfate-induced inflammatory bowel disease in mice, and the mechanism may be related to regulation of TNF- α levels.

Key words: thalidomide; inflammatory bowel disease; TNF- α

炎症性肠病主要包括克罗恩病和溃疡性结肠炎,是一种反复发作的肠道慢性非特异性的炎症性疾病,近年来在我国发病率呈逐年增加的趋势,已成为我国常见的消化系统疾病。至今克罗恩病和溃

收稿日期: 2014-12-05

作者简介: 刘秀书(1964—),女,副主任药师,从事临床药学工作。Tel: (022) 60335452 E-mail: liuxiushu2006@163.com

*通信作者 尹世强,男,国药控股天津有限公司副总经理。

疡性结肠炎的发病机制仍未明确。研究表明,黏膜屏障与炎症性肠病的关系密切,肠道黏膜免疫反应异常可能是炎症性肠病发病的主要原因^[1]。大量研究显示炎症性肠病患者血液和组织中存在免疫细胞的大量聚集,这些免疫细胞受到刺激后迅速表达和分泌细胞因子,参与炎症性肠病结肠黏膜炎症反应,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等^[2]。

沙利度胺商品名为反应停,1956年作为镇静药广泛应用于失眠、妊娠反应的治疗,因其导致新生儿的严重致畸而撤出市场。近年更多研究发现沙利度胺除了对神经系统具有镇静作用,其还具有免疫调节和抗血管生成作用,并已被批准用于治疗麻风结节性红斑和多发性骨髓瘤^[3]。近年来,陆续开展的小规模临床研究均呈现沙利度胺可能对炎症性肠病有治疗作用^[4]。但是对于沙利度胺治疗炎症性肠病的作用机制目前尚不明确。本实验通过小鼠饮用葡聚糖硫酸钠建立炎症性肠病动物模型^[5-6],评价沙利度胺对该模型的治疗作用,并观察动物模型结肠组织 TNF- α 的变化,进一步验证沙利度胺治疗炎症性肠病的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雌性 SPF 级 Balb/C 小鼠 60 只,体质量 (18 \pm 1.5 g),由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2014-0004,饲养条件:SPF 级屏障环境,室内温度 20~24 $^{\circ}$ C,相对湿度 45%~70%,自由摄取饮水食物,试验前适应性饲养 6 d。

1.2 用药与试剂

沙利度胺片购自常州制药厂有限公司(批号 120302631);柳氮磺吡啶肠溶片购自上海信谊天平药业有限公司(批号 130802)。葡聚糖硫酸钠(相对分子质量为 36 000~50 000)购自 MP Biomedicals 公司;甲基纤维素钠(MC)购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 模型制作及处理

将 60 只 Balb/c 小鼠按体质量随机分为 6 组,对照组、模型组、柳氮磺吡啶(200 mg/kg)组,以及沙利度胺低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg)组,每组 10 只。试验当天为第 1 天,试验期间葡聚糖硫酸钠诱导组饮用 2.5%葡聚糖硫酸钠饮用水,对照组则饮用纯净水。从试验第 5 天开始,各给药组

开始 ig 给予相应药物,给药容积 10 mL/kg,1 次/d,对照组和模型组则给予相应体积的 0.5% MC,直至第 12 天结束试验。试验期间,每天记录各动物体质量变化。

试验结束后,处理动物,取结肠组织,测量长度后,清除结肠内粪便,取远端结肠组织 1 cm 置于 10%福尔马林溶液中,用于病理观察;其余组织-20 $^{\circ}$ C 冻存,用于检测结肠组织 TNF- α 含量。

2.2 细胞因子 TNF- α 的测定

取已冻存的结肠组织,按 1 mL:100 mg 组织比例加入相应体积的含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟和 0.1%聚山梨酯 20 的磷酸盐缓冲液,匀浆后离心,取上清液,采用 ELISA 法检测各样品组织 TNF- α 含量。

2.3 病理学观察

结肠组织病理学观察,采用 HE 染色并在光学显微镜下观察各组动物结肠组织病理学变化,根据镜下观察到的炎症细胞浸润数量和炎症累及深度程度进行等级评分^[7]。

2.4 统计分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 13.0 统计软件包,组间比较用单因素方差分析法(One-way ANOVA)进行统计分析,首先进行方差齐性检验,若数据方差齐,用 LSD 法比较分析,若方差不齐,则用 Dunnett's T3 法比较分析。

3 结果

3.1 对炎症性肠病小鼠体质量的影响

对照组动物体质量稳定增长;模型组动物饮用 2.5%葡聚糖硫酸钠饮用水 4 d 后开始出现体质量下降趋势,并持续至实验结束;沙利度胺 30 mg/kg 剂量组动物体质量变化趋势基本与模型组相当,沙利度胺 60 mg/kg 剂量在一定程度上可减小模型动物体质量下降的趋势;沙利度胺 120 mg/kg 剂量组动物体质量下降症状有显著的改善,体质量趋于正常,与柳氮磺吡啶相当。结果见表 1。

3.2 对炎症性肠病小鼠结肠长度的影响

对照组动物结肠细长,而模型组动物结肠变粗,其结肠长度显著低于对照组。与模型组比较,柳氮磺吡啶组和沙利度胺 120 mg/kg 剂量组动物结肠缩短有显著的改善,其中沙利度胺 120 mg/kg 剂量组动物结肠长度与对照组动物基本相当。结果见表 2。

表1 小鼠体质量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 1 Body weight changes of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g					
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天
对照	—	18.3±0.3	18.5±0.5	18.4±0.5	18.9±0.3	19.2±0.2	19.3±0.4
模型	—	18.3±0.2	18.1±0.3	18.3±0.3	18.4±0.4	18.3±0.3	18.2±0.6
柳氮磺吡啶	200	18.2±0.3	18.4±0.4	18.5±0.4	18.2±0.5	18.3±0.4	18.0±0.6
沙利度胺	30	18.3±0.3	18.5±0.4	18.3±0.3	18.1±0.5	18.4±0.6	18.0±0.5
	60	18.3±0.4	18.3±0.3	18.2±0.3	18.4±0.5	18.2±0.3	18.2±0.6
	120	18.4±0.2	18.2±0.3	18.2±0.4	18.5±0.6	18.2±0.4	18.5±0.6

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g					
		第7天	第8天	第9天	第10天	第11天	第12天
对照	—	19.0±0.5	19.1±0.5	18.9±0.3	19.2±0.4	19.4±0.3	19.6±0.4
模型	—	17.9±0.8*	17.7±0.8	17.4±0.7**	17.2±0.9**	16.5±1.2**	16.2±1.4**
柳氮磺吡啶	200	17.9±0.6	18.1±0.5	18.0±0.6 ^Δ	18.2±0.8 ^Δ	18.0±0.6 ^{ΔΔ}	18.1±0.7 ^{ΔΔ}
沙利度胺	30	17.8±0.9	17.5±0.6	17.3±0.8	17.0±0.9	16.9±1.3	16.5±1.6
	60	18.2±0.6	18.1±0.5	18.3±0.7 ^Δ	18.1±0.8 ^Δ	17.9±0.6 ^Δ	17.5±0.8 ^{ΔΔ}
	120	18.4±0.5	18.3±0.3 ^Δ	18.4±0.6 ^{ΔΔ}	18.5±0.5 ^{ΔΔ}	18.2±0.7 ^{ΔΔ}	18.3±0.6 ^{ΔΔ}

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与模型组比较: ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01
P*<0.05 *P*<0.01 vs control group; ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01 vs model group

表2 对小鼠结肠长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 2 Effect on colonic length of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	结肠长度/cm
对照	—	8.4±0.5
模型	—	6.2±1.4**
柳氮磺吡啶	200	7.7±0.6 ^Δ
沙利度胺	30	6.4±1.5
	60	7.1±1.2
	120	8.0±1.1 ^{ΔΔ}

与对照组比较: ***P*<0.01; 与模型组比较: ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01
***P*<0.01 vs control group; ^Δ*P*<0.05 ^{ΔΔ}*P*<0.01 vs model group

3.3 对炎症性肠病小鼠结肠组织 TNF-α 的影响

经 2.5%葡聚糖硫酸钠诱导后,模型动物结肠组织 TNF-α 含量显著升高,沙利度胺则可降低结肠组织 TNF-α 含量,并且呈现一定的剂量效应。其中沙利度胺 120 mg/kg 剂量组 TNF-α 含量降低,差异具有显著统计学。结果见表 3。

3.4 对炎症性肠病小鼠结肠组织学的影响

对照组动物结肠组织隐窝结构正常,仅有散在的炎症细胞浸润。模型组动物结肠出现肠壁增厚、肠腔狭窄、与周围组织粘连等。镜下可见模型组动

表3 对小鼠结肠组织 TNF-α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 3 Effect on TNF-α level of colonic tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF-α 含量/(pg·mg ⁻¹)
对照	—	89.5±15.8
模型	—	314.2±21.8**
柳氮磺吡啶	200	210.4±33.2
沙利度胺	30	342.1±37.3
	60	185.1±24.1
	120	148.2±20.6 ^Δ

与对照组比较: ***P*<0.01; 与模型组比较: ^Δ*P*<0.05
***P*<0.01 vs control group; ^Δ*P*<0.05 vs model group

物结肠隐窝结构基本破坏,黏膜层有大量的炎症细胞浸润,甚至已浸润至黏膜肌层。与对照组比较,模型组病理评分显著升高 (*P*<0.01)。与模型组比较,柳氮磺吡啶组结肠组织病理改变有所好转,炎症细胞浸润有所降低,病理评分有显著降低 (*P*<0.05)。沙利度胺 30 mg/kg 剂量组结肠组织学改变与模型组相当,60、120 mg/kg 剂量组动物则有明显好转,炎症细胞浸润减少,隐窝结构较为清晰,已接近正常结构,病理评分有显著降低 (*P*<0.05、0.01)。结果见图 1。病理学评分结果见表 4。

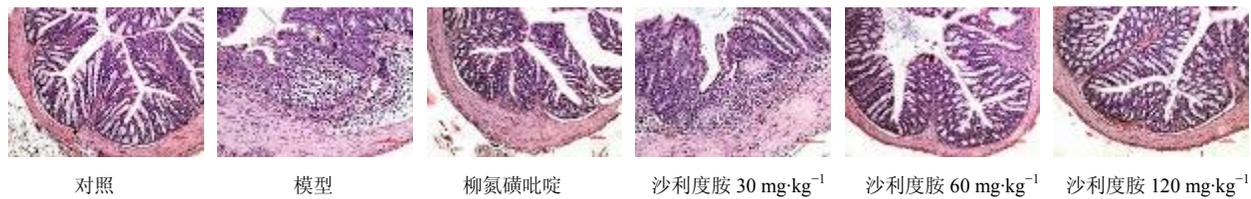


图1 小鼠结肠组织病理变化

Fig. 1 Histological features of representative colonic sections

表4 对小鼠结肠组织病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 4 Effect on pathologic scores of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	病理评分/分
对照	—	0.3±0.4
模型	—	3.5±1.2**
柳氮磺吡啶	200	1.9±1.3 ^Δ
沙利度胺	30	3.0±2.3
	60	1.8±1.5 ^Δ
	120	1.1±1.2 ^{ΔΔ}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs control group; ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

在欧美国家中,炎症性肠病是一种较为常见的肠道疾病。近来随着医疗诊断水平的提升、生活节奏加快和生活压力过大,我国炎症性肠病患者数量呈逐年上升趋势^[8]。炎症性肠病目前缺乏能彻底治愈的药物,传统的临床用药主要包括氨基水杨酸类药物、糖皮质激素和免疫调节药物^[9],这些药物需要长期服用维持治疗,而且治疗效果一般,长期使用容易出现毒副作用。随着炎症性肠病药物研究的不断进步,目前,新型生物制剂如 TNF- α 单抗药物在临床上对炎症性肠病的治疗有显著疗效^[10],但由于该类药物价格过于昂贵,大部分病人因经济负担过重而无法接受相应的治疗。

沙利度胺具有广泛的药理作用,其免疫调节作用也越来越受到重视,如对 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的调节作用。小规模的临床研究和动物实验均显示沙利度胺对炎症性肠病有潜在的治疗作用,近期有一定规模的临床研究结果表明沙利度胺对儿童和青少年时期发病的难治性克罗恩病有临床缓解,而且在延续阶段的随访结果证明沙利度胺对患儿的有效持续应答超过 1 年^[11],但是沙利度胺治疗炎症性肠病的具体作用机制还尚不明确。

实验结果显示,沙利度胺可改善葡聚糖硫酸钠

诱导小鼠出现体质量下降症状,而且对模型动物结肠缩短也起到显著缓解作用,可能与沙利度胺可调节细胞因子的激活和细胞介导的免疫反应等有关。沙利度胺可能通过下调炎症细胞因子的表达,从而减轻结肠炎症反应,降低结肠组织损伤,缓解结肠缩短和改善模型动物肠道菌群紊乱等,最终体质量下降症状得以改善。同时,结肠组织学病理观察显示沙利度胺可减少炎症细胞对结肠组织的浸润和保护结肠隐窝结构,进一步表明沙利度胺可能通过调节免疫细胞的激活,减少炎症细胞如中性粒细胞、巨噬细胞等在结肠黏膜层的聚集,减轻炎症反应。

研究显示,沙利度胺可以通过多条途径对 TNF- α 起到调节作用,其表现为抑制 NF- κ B 活性、降解 TNF- α mRNA 等^[12],从而下调 TNF- α 的表达。实验结果显示,模型动物经葡聚糖硫酸钠诱导后,结肠组织 TNF- α 含量显著升高,而沙利度胺可降低模型动物结肠组织 TNF- α 含量,表明沙利度胺可能通过降低 TNF- α mRNA 水平,下调 TNF- α 的表达,从而对模型动物起到治疗作用,进一步确定沙利度胺对炎症性肠病可能存在潜在治疗作用。

综上所述,沙利度胺对炎症性肠病呈现较好治疗作用,该作用可能与沙利度胺对 TNF- α 的调节作用有关。当然,沙利度胺改善炎症性肠病的作用机制确定还有待更大规模临床研究和动物模型研究,以便为临床炎症性肠病患者提供更为安全、经济和有效的药物,为炎症性肠病治疗的新思路。

参考文献

- [1] Geremia A, Biancheri P, Allan P. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease [J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(1): 3-10.
- [2] Neurath M F. Cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5): 329-342.
- [3] 乔静,陈秀华.沙利度胺的研究及临床应用新进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2008, 35 (4): 256-266.
- [4] Bariol C, Meagher A P. Early studies on the safety and

- efficacy of thalidomide for symptomatic inflammatory bowel disease [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(2): 135-139.
- [5] Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 718617.
- [6] Sha T, Igaki K, Yamasaki M, *et al.* Establishment and validation of a new semi-chronic dextran sulfate sodium-induced model of colitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 15(1): 23-29.
- [7] Dieleman L A, Palmen M J. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114(3): 385-391.
- [8] Lakatos L, Lakatos P L. Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases [J]. *Orv Hetil*, 2007, 148(5): 223-228.
- [9] Kuenzig M E, Rezaie A, Seow C H. Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 8: CD002913.
- [10] Armuzzi A, Lionetti P, Blandizzi C. Anti-TNF agents as therapeutic choice in immune-mediated inflammatory diseases: focus on adalimumab [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2014, 27(1 Suppl): 11-32.