

内毒素加/不加二甲基肼复制大肠腺瘤模型的比较

鲁香凤 (通讯作者) 左禧萌 王悦

北京中医药大学东直门医院

DOI:10.12238/bmtr.v7i6.17042

[摘要] 目的: 采用内毒素加/不加二甲基肼复制大肠腺瘤模型并比较其异同。方法: 14 只约 210g 雄性 Wistar 大鼠分为正常组与 3 个模型组: 单纯长期尾静脉注射内毒素 (模型 I 组)、长期尾静脉注射内毒素加腹腔注射二甲基肼 (模型 II 组)、内毒素加二甲基肼与 GW9662 (模型 III 组), 检测血清内毒素水平与炎症因子等, 实验到期后取肠管等, 肉眼及光镜下观察。结果: 模型 I、II 与 III 组血清内毒素与炎症因子均升高, 均成功复制大肠腺瘤, 模型 I 为凹陷型管状腺瘤, 瘤组织向粘膜下浸润, 模型 II 为扁平型管状腺瘤, 模型 III 为隆起型绒毛状管状腺瘤。结论: 模型 I、II 与 III 组复制的大肠腺瘤肉眼与光镜下病理分型不同, 应该与毒素种类、注射剂量及作用时间等有关。

[关键词] 内毒素; 尾静脉注射; 1, 2-二甲基肼; 腹腔注射; 大肠腺瘤

中图分类号: R574.6 文献标识码: A

Replicate the Models of Large Intestinal Adenoma by Endotoxin with/without Dimethylhydrazine and Compare their Similarities and Differences

Xiangfeng Lu (Corresponding Author), Ximeng Zuo, Yue Wang

Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine

[Abstract] Objective The large intestinal adenoma models were replicated with endotoxin with/without dimethylhydrazine (DMH) and their similarities and differences were compared. Methods Fourteen male Wistar rats, about 210g each, were divided into 1 normal group and 3 model groups which included simple long-term intravenous injection of endotoxin (Model I), long-term intravenous injection of endotoxin plus intraperitoneal injection of DMH (Model II), intravenous injection of endotoxin plus DMH and GW9662 (Model III). Detection of serum endotoxin and inflammatory factors, blood lipids, routine blood and urine tests. Take the intestinal tubes, etc. after the expiration of the experiment, and observe them macroscopically and microscopically. Results Serum endotoxin and inflammatory factors were increased and colonic adenomas were all successfully replicated in models I, II and III. A depressed tubular adenoma that the tumor tissue infiltrated into the submucosa in model I, a flat tubular adenoma in model II and a protuberant villous tubular adenoma in model III. Conclusion The pathological types of the colonic adenoma models replicated by models I 、 II and III were different macroscopically and microscopically, which should be related to the types of toxin, the doses of injection and times of action, etc.

[Key words] endotoxin (ET); tail vein injection; 1, 2-dimethylhydrazine (DMH); intraperitoneal injection; colorectal adenoma (CRA)

引言

大肠腺瘤(colorectal adenoma, CRA)是大肠腺上皮来源肿瘤性病变, 是常见大肠癌前疾病^[1], 切除后易复发, 且原因不明, 并缺乏预防措施, 课题组研究^[2]发现该类患者血清内毒素水平均明显升高, 解毒药有预防作用, 在前期^[3-4]复制急性内毒素血症模型成功基础上进一步采用大鼠尾静脉连续注射大剂量内毒素 3 月余、连续尾静脉注射内毒素加腹腔注射 1, 2-二甲基肼 (1, 2-dimethylhydrazine, DMH) 2 次、

尾静脉注射 1 次内毒素后改为腹腔注射 DMH 与尾静脉注射 GW9662 三种造模方法, 成功建立凹陷型、扁平型与隆起型大肠腺瘤模型, 现将结果汇报如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 雄性 Wistar 大鼠 14 只, 体重约 210g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2 造模试剂及使用方法:

①脂多糖(LPS): 来源于大肠杆菌 0111: B4, 购于 Sigma 公司, 储存于-4℃, 使用时将 10 毫克 LPS 溶解于 10 毫升生理盐水中, 现用现配, 工作浓度为 1 毫克/毫升。给药方法: 尾静脉或腹腔注射。②DMH: 购自麦可林公司, 用生理盐水稀释, 现用现配。给药方法: 腹腔注射。③特异性过氧化物酶增殖物激活受体-γ (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR-γ)受体拮抗剂 GW9662 (别名: 2-氯-5-硝基-N-苯基苯甲酰胺), 购自 Sigma (中国) 公司, 先用乙醇溶解, 然后再用生理盐水稀释, 现用现配; 给药方法: 尾静脉注射。④戊巴比妥钠: 使用前将 1 毫克戊巴比妥钠溶解于 100 毫升无菌水中, 储存于-4℃, 工作浓度为 1%; 给药方法: 腹腔注射。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 大鼠适应性饲养 3 天后分组如下: 正常组 3 只、模型 I (单纯长期注射内毒素) 组 5 只; 模型 II (长期注射内毒素+DMH) 组 2 只; 模型 III (注射内毒素 1 次+DMH+GW9662) 组 4 只。

1.2.2 模型复制方法

1.2.2.1 模型 I: 大鼠首次尾静脉注射 3mg/kg 内毒素并连续注射内毒素 (以 3mg/kg 为主), 定期采血检测血清内毒素及炎症因子, 每周注射 5-6 次, 持续约 3 个月, 实验到期前 2 天停止注射。正常组注射生理盐水。

1.2.2.2 模型 II: 造模方法基本同模型 I, 仅将第 19 与 20 次注射内毒素分别改为腹腔注射 DMH40mg/kg 与 33mg/kg。

1.2.2.3 模型 III: 先尾静脉注射 0.1、0.5、1 与 2mg/kg 内毒素, 第 2 天腹腔注射 DMH 120mg/kg, 2 周后颈部皮下注射 DMH 20mg/kg 加强 1 次, 第 2 天再首次尾静脉注射 0.3mg/kg GW9662, 以后每周注射 1 次 0.1mg/kg GW9662, 连续约 3 个月。

1.2.3 采血方法及采血量: 大鼠眼球采血 1ml。

1.2.4 内毒素检测方法: 内毒素鲎定量实验, 化学发光法

1.2.5 采用酶联免疫吸附法检测炎症因子: 大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 1β (IL-1β) 与 IL-6 科研试剂盒均购自江苏酶免实业有限公司, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.6 大便检测方法: 大便常规

1.2.7 取材与组织处理方法

实验到期后, 禁食不禁水 12h, 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 60mg/kg 麻醉, 腹主动脉取血后将全部肠管取出, 测量长度、壁厚度及腔直径, 并将腔剖开, 肉眼观察粘膜病变后, 常规放入 10% 中性福尔马林液中固定, 取病变区, 石蜡包埋切片, 苏木素伊红 (HE) 染色, 光镜下病理观察。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

2.1.1 首次注射内毒素后: 除 0.1mg/kg 外, 注射 0.5、1、2 与 3mg/kg 大鼠均卧倒, 精神萎靡, 饮食活动明显减少, 注射剂量越大, 大鼠站起及恢复活动越晚; 各剂量注射 15 分钟-1h 后, 体温均升高, 均出现肛门排水或大便粘腻不成形, 大便常规均阴性; 3h 后, 0.1mg/kg 大鼠体温基本恢复正常, 体温恢复正常速度与注射剂量成反比; 24h 时, 体重均明显下降。

2.1.2 模型 I 组: 随着注射内毒素次数增多, 大鼠体重增长明显缓慢, 出现扎堆、竖毛、毛泽灰暗、毛色变差、耳廓血管充血及眼球发白等, 第 8 次注射后大鼠均排粘液; 第 15 次注射后, 均出现便血; 第 18 次注射后, 1 只出现粘液便血; 第 23 次注射后均出现偏瘫; 第 27 次注射后偏瘫程度最严重, 后减少内毒素注射量, 偏瘫与便血症状消失, 再加大内毒素注射量, 偏瘫与便血再次出现。

2.1.3 模型 II 组: 注射第 1-17 次内毒素时大致情况同模型 I 组, 注射第 18 次后第 2 天大便表面有粘液与少量血丝; 第 19 次改为腹腔注射 DMH 40mg/kg, 2h 后肛门排水样便, 第 2 天排少量粘液便, 第 20 次腹腔注射 DMH 33mg/kg 后多次测肛温时均无大便, 后继续注射内毒素, 又出现大便粘腻不成形或水样便或排粘液等。

2.1.4 模型 III 组: 注射 0.1、0.5、1 与 2mg/kg 内毒素 24h 后均腹腔注射 DMH 120mg/kg 后, 先注射 0.1mg/kg 大鼠安静直立, 其余均安静卧倒, 先注射 2mg/kg 与 1mg/kg 大鼠分别于注射 DMH 第 3 天与第 5 天死亡; 剩余 2 只大鼠第 6 天肛门均排水样便, 第 7-9 天大便均粘腻, 加强与注射 GW9662 后部分大鼠大便稀粘, 此后大便间断粘腻不成形。

2.2 大鼠血清内毒素水平及炎症因子变化: 第一次尾静脉注射内毒素 (0.1-3mg/kg) 后 1h 及 24h 检测血清与尿液内毒素水平均 >500pg/ml, 血清 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 均明显升高; 造模过程中多次采血检测内毒素模型组均升高, 最高者 >500pg/ml。

2.3 肠粘膜病理变化

2.3.1 大体所见: 模型 I 与模型 II 肠粘膜可见出血点、糜烂及浅溃疡等病变, 模型 II 局部可见粘膜隆起; 模型 III 肠粘膜糜烂溃疡不明显, 可见多个结节状隆起, 最大直径为 0.3cm, 有的结节融合, 切面灰白, 质韧。

2.3.2 光镜下组织病理学变化: 模型 I 组可见凹陷型低级别管状腺瘤 (图 1), 瘤组织向粘膜下浸润; 模型 II 组为扁平型低级别管状腺瘤 (图 2), 局部粘膜隆起区粘膜内可见管状腺瘤; 模型 III 组多处为隆起型低级别绒毛状管状腺瘤 (图 3), 与文献^[5]报道近似; 另外, 三种模型均可见肛管

肛周低级别鳞状上皮内瘤变 (图 4)。

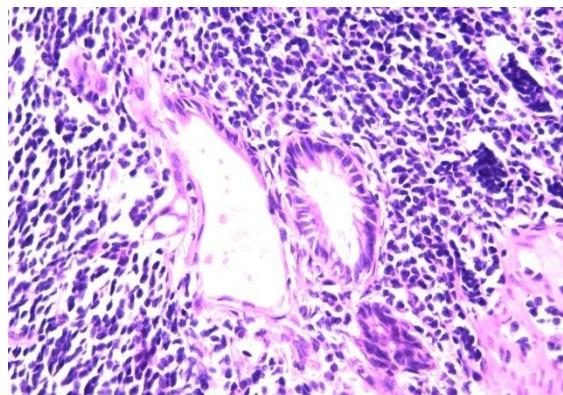


图 1 模型 I：凹陷型低级别管状腺瘤 HE×40

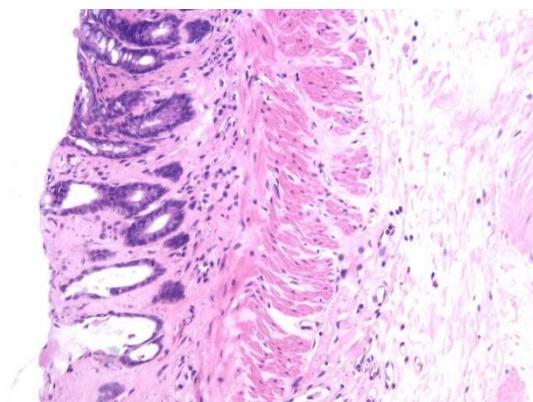


图 2 模型 II：扁平型低级别管状腺瘤 HE×40

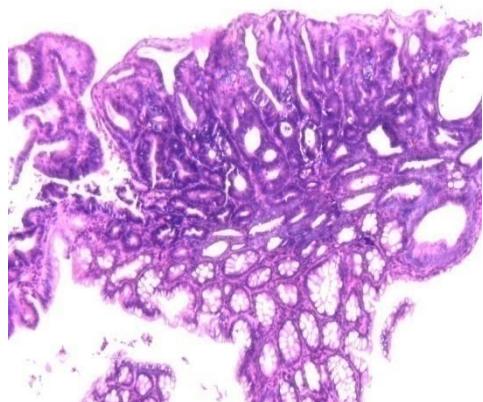


图 3 模型III：隆起型低级别绒毛状管状腺瘤 HE×4

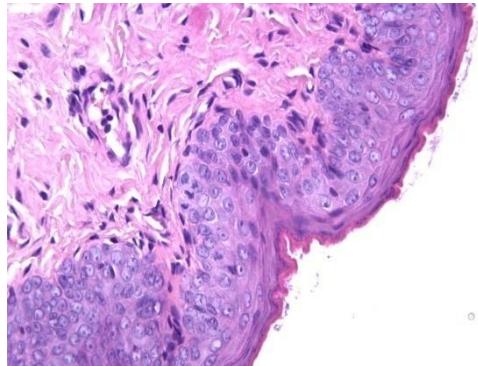


图 4 模型 II：低级别鳞状上皮内瘤变 HE×40

3 讨论

3.1 CRA 的发生机制：既往研究认为，结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)可抑制 Wnt 信号通路，只有在某些特殊条件与环境下，经过十分复杂的机制和步骤，导致 Wnt (Wingless-Int) / β -连环蛋白 (catenin) 信号通路损伤，APC 基因突变，其编码的 APC 蛋白失去正常功能，破坏复合体解体或失效， β -catenin 无法被磷酸化和降解而在细胞质中大量积累，入核激活 c-Myc 与 Cyclin D1 等促增殖基因转录，导致细胞增殖异常，不断分裂，形成一大群具有相同异常特性的子代细胞，形成 CRA，在具有绒毛状腺瘤形态的病变中，APC 突变频率明显更高；炎症微环境紊乱及免疫系统失衡使肿瘤细胞发生免疫逃逸是肿瘤发生根本原因，课题组研究发现 CRA 等疾病患者血清内毒素水平均升高，经解毒治疗后，CRA 等不再复发，因此提出内毒素等是肿瘤的主要微环境，在大肠粘膜上皮从正常→增生→非发育不良结肠隐窝→异常隐窝病灶^[6]→腺瘤的转化过程中存在着细胞、蛋白、mRNA、DNA 与基因等改变，均与血清内毒素等水平升高有关。

3.2 内毒素致病机制：内毒素是革兰氏阴性 (G-) 细菌生长繁殖时释放或死亡裂解时的细胞壁成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)，其活性中心脂质 A 是低毒物质与强致炎剂，还有强免疫原性，可激活单核巨噬细胞、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路及 Toll 样受体 (TLR) 4/NF- κ B 信号等诱发各种细胞因子基因激活，产生 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等，诱导炎症，活化中性粒细胞，形成中性粒细胞外诱捕网 (NETs)，促进血栓形成；促使巨噬细胞极化；导致细胞损伤、增殖^[7]、凋亡或焦亡^[8]、铁死亡^[9]、自噬异常^[8]、衰老、内皮屏障，及凝血功能与微循环障碍、微血管渗漏^[10]、血管炎、免疫功能紊乱、基因和/或蛋白表达变化等^[11]，可引起 CRA 等多种病症^[2]。

3.3 血清内毒素水平升高引起 CRA 的机制

(1) 血清内毒素水平升高，可进入肠上皮和全身循环系统，导致紧密连接及肠道通透性增加，通过激活核因子

(NF- κ B)诱导粘蛋白基因MUC2、4等转录,使杯状细胞大量合成和分泌,导致肠道粘液分泌增多,影响水通道蛋白(AQP)3等表达,增加肠壁通透性,使肠粘膜回吸收水分等能力下降,引起大便粘腻不成形或水样便;TNF- α 通过激活NF- κ B通路与下调上皮性钙粘附蛋白等诱导肠上皮紧密连接断裂,引起肠上皮屏障破坏。

(2) 血清内毒素等水平升高可引起凝血功能与微循环障碍等,导致大肠等缺血缺氧,缺氧可诱导代谢通路如糖酵解、乳酸转运及脂质代谢的显著改变^[12];缺氧诱导因子(HIF)家族蛋白都可以被缺氧诱导,并促进糖酵解和红细胞生成,HIF-1 α 在缺氧条件下被上调,调节血管内皮生长因子(VEGF)促进血管新生以恢复氧平衡,并和HIF-1 β 形成HIF-1复合物,随后结合到缺氧反应元件(HRE)上,从而激活相应基因包括葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)、p53、p21与Bcl-2等;在持续缺氧状态下,细胞会持续分化,HIF-1 α 可参与自分泌生长因子的作用,使后者调控细胞增殖与分化功能丢失或失去平衡,导致肿瘤有高增殖能力,增强肿瘤细胞的干性;还可选择性抗凋亡,促进肿瘤增殖;可诱导胰岛 β 细胞促因子促进胰岛素分泌,血浆中胰岛素水平高,常表现出促有丝分裂特性,促进大肠ACF生长,并通过提高类胰岛素生长因子-1(IGF-1)水平来实现其作用,IGF-1还可促进VEGF产生。

(3) 内毒素水平长期升高会导致大肠非可控性炎症,炎性细胞持续不断地产生活性氧(ROS)及活性氮,损伤DNA及其修复系统,甚至导致DNA双链断裂等,引起APC基因突变^[13];另外,内毒素也会影响P-糖蛋白(Pgp)、PTOV1与p53等基因和/或蛋白表达变化,增加GLUT家族等mRNA水平^[14];PTOV1可与 β -catenin相互结合而激活Wnt/ β -catenin信号通路,从而上调靶基因C-myc等表达^[15]。

(4) 内毒素对HMGA1基因的影响:HMGA1基因是APC基因缺失驱动结肠肿瘤发展的关键介质,结肠上皮内仅一个HMGA1等位基因的缺失会抑制由突变APC和炎症微生物群驱动的肿瘤发生和Wnt信号传导,APC基因缺失与完整的HMGA1一起导致HMGA1和核 β -catenin蛋白水平升高,在整个隐窝中延伸到管腔上皮^[16],与CRA发生位置一致。

(5) 内毒素可引起内毒素耐受,从而产生免疫抑制环境,促进恶性疾病的发展^[17]。

3.4 CRA“自上而下”与“自下而上”生长方式的机制探讨:模型I组复制的凹陷型腺瘤为自大肠干细胞区至粘膜下,说明单纯内毒素损伤的主要原因是肠道干细胞,与文献^[18]CRA的发展是通过自上而下的机制进行相符合,模型III组复制的隆起型腺瘤为自大肠上皮细胞基因突变区至周围生长;课题

组研究认为CRA“自上而下”等生长方式与血清及肠腔内毒素种类、剂量及作用时间等有关,扁平腺瘤形成机制有待于深入研究。

3.5 肠管低级别鳞状上皮内瘤变形成机制的探讨:应该也与毒素直接刺激及基因毒性等有关,临床口腔鳞癌反复复发患者经解毒治疗后鳞癌不再复发,也说明鳞癌的发生/复发与血清内毒素等水平升高有关,需深入研究。

4 结语

本文采用内毒素、内毒素加DMH、DMH加GW9662分别成功复制出凹陷型、平坦型与隆起型大肠腺瘤,前2种造模方法国内外文献未见报道,第3种模型大鼠血清内毒素水平也升高,说明内毒素是引起大肠腺瘤的重要毒素之一,应高度重视。

参考文献

- [1]Edited by WHO classification of tumors editorial board ,digestive system tumors.WHO classification of tumors,5th edition.2019:170
- [2]鲁香凤,吴金荣,秦伟娜,等.内毒素血症与多种慢性疾病与症状相关性研究.中华医学会病理学分会第二十一届全国细胞病理会议,武汉,2023年6月.
- [3]鲁香凤,姜良铎,董正平,等.甘绿解毒汤对内毒素致中毒大鼠器官组织病理学变化的影响[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2009,16(1):7-10.
- [4]董正平.解毒方对内毒素所致大鼠脏器损伤保护作用的研究[D].北京中医药大学,2007.
- [5]张耀明,吕愈敏,李军,等.结直肠散发性腺瘤模型建立的探讨[J]肿瘤防治研究 2008,35(12):837-841.
- [6]Kowalczyk M, Orowski M, Siermontowski P. Occurrence of colorectal aberrant crypt foci depending on age and dietary patterns of patients[J]. BMC Cancer.2018,18(1):213
- [7]Hu L, Li S, Li H, et al. Interferon Regulatory Factor 4(IRF4) Promotes Lipopolysaccharide-Induced Colonic Mucosal Epithelial Cell Proliferation by Regulating Macrophage Polarization[J]. Eur Surg Res. 2022; 63(4): 257-268.
- [8]Shang J, Zhao F, Cao Y, et al. HMGB1 mediates lipopolysaccharide-induced macrophage autophagy and pyroptosis[J]. BMC Mol Cell Biol.2023;24(1):2.
- [9]Xiao Y, Yuan Y, Yang Y, et al. GCH1 reduces LPS-induced alveolar macrophage polarization and inflammation by inhibition of ferroptosis[J]. Inflamm Res.2023;72(10-1):1941-1955.
- [10]Chan YH, Musa NF, Chong YJ, et al. 2,4,6-Trihydr

oxy-3-geranyl acetophenone suppresses vascular leakage and leukocyte infiltration in lipopolysaccharide-induced endotoxemic mice[J]. *Pharm Biol*. 2021;59(1): 732-740.

[11] Cao H. Bacterial endotoxin lipopolysaccharides regulate gene expression in human colon cancer cells[J]. *BMC Res Notes*. 2023;16(1):216.

[12] Tian HP, Xiao ZX, Su BW, et al. Impact of SLC16A8 on tumor microenvironment and angiogenesis in colorectal cancer: New therapeutic target insights[J]. *World J Gastrointest Oncol*. 2025;17(4):99188.

[13] Takao M, Yamaguchi T, Eguchi H, et al. Predictive modeling for the germline pathogenic variant of the APC gene in patients with adenomatous polyposis: proposing a new APC score[J]. *Surg Today*, 2025;55:229 - 237

[14] Cao H. Bacterial endotoxin lipopolysaccharides regulate gene expression in human colon cancer cells[J]. *BMC Res Notes*. 2023;16(1):216.

[15] Xie SA, Zhang W, Du F, et al. PTOV1 facilitates colorectal cancer cell proliferation through activating

AKT1 signaling pathway[J]. *Helijon*. 2024; 10(16):e36017

[16] Li Z, Luo, Jung-Hyun Kim, Iliana Herrera, et al. HMGAI acts as an epigenetic gatekeeper of ASCL2 and Wnt signaling during colon tumorigenesis[J]. *J Clin Invest*. 2025;135(3):e184442

[17] Roy K, Jdrzejewski T, Sobocińska J, et al. Divergent impact of endotoxin priming and endotoxin tolerance on macrophage responses to cancer cells[J]. *Cell Immunol*. 2025;411-412:104934.

[18] Shih IM, Wang TL, Traverso G, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5): 2640-2645.

作者简介:

鲁香凤 (1966-), 女, 汉, 河北省藁城市人, 硕士研究生学历, 北京中医药大学东直门医院病理科, 主任, 研究方向: 消化病理及内毒素相关病症。

基金项目:

课题来源: 北京中医药大学东直门医院自发课题
(No.2022DZMEC-313-02)