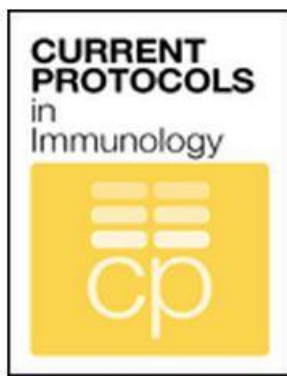




Curr Protoc Immunol.; 104 Unit-15.25 (Published in final edited form)



Benoit Chassaing¹, Jesse D. Aitken¹, Madhu Malleshappa¹,
Matam Vijay-Kumar^{2,3}

[요약]

염증성 장질환, Inflammatory bowel diseases(IBD)는 궤양성 대장염 (Ulcerative Colitis)과 크론병 (Crohn's Disease)가 주를 이루고 있으며, 정확한 원인이 규명되지 않은 복잡하고 다인성의 질환이다.

지난 20 여년동안, 사람의 염증성 장질환 (IBD)의 기작을 연구하기 위해 다양한 colitis murine models 이 개발되어져 왔으며, 이런 모델들은 다양한 치료제 개발 뿐 아니라 IBD pathogenesis 의 근본적인 메커니즘을 밝혀내는데, 필수적인 툴로 활용되어져 왔다.

다양한 Chemical 에 의해 유도된 colitis model 들 중, DSS 에 의해 유도 되어진 colitis 모델이, 간단하고 사람의 궤양성 대장염 (Ulcerative Colitis)과 가장 유사하여, 널리 사용되어지고 있다. 물론 이 모델도 장점과 단점이 있을수 있으므로, 적용시 이런 부분은 고려되어 져야 한다. 이 논문에서는 DSS 에 의해 유도되어진 colitis 에 대해, 상세 프로토콜와 영향을 미치는 factor 들에 대해 기술하는 것을 목표로 한다.

[Introduction]

포유동물의 위장관은 식품유래 및 환경유래의 독소들뿐 아니라 다양한 세균에 지속적으로 노출 되어지고 있으며, 따라서, 질병에 아주 취약하다. 두 대표적인 염증성 장질환인 궤양성 대장염과 크론병의 경우 다양한 원인에 의한 심각한 만성 장 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Xavier and Podolsky, 2007). 지난 몇십년동안 IBD pathogenesis 의 복잡성과 근본적인 분자학적 메커니즘 규명 및 잠재 치료제 개발을 위해 다양한 동물모델들이 개발되어져 왔다 (Chasseing and Darfeuille-Michaud, 2011)

Mouse Colitis 모델을 만들기 위해 가장 광범위하게 사용되어 온 방법은, anticoagulant 성질을 가진 chemical colitogen 인 dextran sodium sulfate (DSS) 일 것이다. DSS 는 물에 쉽게 용해되며 (water-soluble), 5-1400kDa 사이의 다양한 분자량을 가진 negative charge 를 띄는 sulfated polysaccharide 이다. 사람의 궤양성 대장염과 가장 유사한, 가장 심각한 murine colitis 는 40-50kDa 의 DSS 를 사용했을 때인 것으로 확인 되었다(Okayasu et al., 1990).

DSS 가 대장염을 일으키는 메커니즘에 대해서는 정확하게 밝혀져 있진 않지만, 대장안의 epithelial monolayer 의 damage 가 proinflammatory intestinal contents (예, 세균과 그 부산물 등) 를 아래에 있는 조직으로 퍼져나가게 하는 것 같다. DSS colitis 모델은 그 속도와, 간편성, 재연성과 컨트롤 할수 있는 특징 때문에, IBD 연구에 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. 심각한, 만성, 재발성 장염 모델은 DSS 투여농도의 변화나 투여빈도를 조절함으로써 가능하다

DSS Colitis 의 적용에 있어 알아두어야 할 중요한 사항은, 사람의 경우와는 달리, T 와 B cell 이 관여되지 않지만, 이런 한계는 colitis 연구를 SCID 와 RAG-KO mice (adaptive immunity 결핍) 에서 가능하게 해준다. 따라서, DSS colitis 모델은 특히 장염을 유발하는 innate immune system 의 contribution 을 연구할 때 유용하다. 또한, 장내 세균은 robust colitis 를 유도하는데 필수적이다. Basic protocol 에서 DSS colitis 유도하는 방법 뿐 아니라 disease activity 모니터링, RNA, fecal, serum 샘플의 준비과정, epithelial barrier function, cell proliferation 과 migration 등의 측정에 관해 논의되어져 있다.

BASIC PROTOCOL

Mice 에서 DSS colitis 의 유도 및 확인

여기에서 설명되어져 있는 방법은 mice 에 DSS 의 투여를 통하여 colitis 를 유도하는 방법이다. 이 모델에서 미생물군의 필요성(역할)을 고려하여, 모든 mice 그룹은 common origin (strain, vendor, colony)로 진행하였다. Wild type 과 유전적으로 겹핍 또는 transgenic mice 에서 colitis susceptibility 를 연구할 경우, littermates (한배 새끼쥐)를 사용할것을 강하게 권장한다.

DSS 를 식수에 첨가하여 줄 경우, mice 는 body weight 와 분변내 혈액의 존재여부를 매일 체크해야 한다. 초기에는(3~4 일 정도) DSS 의 양과 mouse strain 에 따라 body weight 가 약간 증가할 수도 있다. Mouse colitis 모델에 익숙하지 않은 경우, 염증에 대한 non-invasive fecal marker 를 이용해 disease 의 시작을 모니터링하는게 도움이 될 수 있다. 일반적으로, 그리고 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 권고사항에 따라, 초기 몸무게의 25-30% 감소의 경우 사망으로 간주하고, 가이드라인에 따라 안락사를 고려해야 한다. 질병의 심각도나 사망률 다르기 때문에, 충분한 수의 동물을 사용해야 하며, treatment 그룹별 5-10 마리 정도가 적당하다. DSS 가 첨가되지 않는 water 를 먹이는 control 도 필요하다.

Materials

- 1) Dextran Sulfate Sodium (DSS) Salt, Reagent grade (MP Biomedicals (formerly ICN Biochemicals) M.W 36-50kDa, Ref =160110), 2-5% in autoclaved drinking water
- 2) Male 또는 female mice. 8 weeks old 정도가 적합. C57BL/6J 와 BALB/C background mice 를 권장 (현 논문들에서 많이 사용되어지는 모델임)

Note : 제조사나 생산 lot 에 따라 DSS 를 유발하는 colitogenic potential 이 다르기 때문에, DSS 를 bulk (500g)으로 구매하고, 선택한 mouse strain 에서 약 7 일정도 이상의 기간내에 강력한 colitis 를 유도할 수 있는 최적의 농도를 결정해야 한다. 처음에는 BL6d 의 경우 1.5%-3.0% 정도, BALB/C mice 의 경우 2.5-5.0% 정도의 양을 적용하여, colitis 의 발생정도를 몸무게, 잠혈, 분변내 gut inflammation biomarker 등을 이용해 모니터링 하는 것을 권장한다. 이런 초기 실험은 나중 연구에서 consistency 와



reproducibility 를 확신하기 위해, 어떤 농도에서 천천히 그리고 일정하게 colitis 를 유도시킬 수 있을지에 대한 농도선택을 가능하게 해준다.

3) Fecal occult blood : Hemocccult Dispensapak Plus from Beckman Coulter

4) Serum separator tubes : BD Microtainer tubes

5) 4 and 40Kda FITC-dextran to measure epithelial barrier permeability : Sigma

6) Brominated deoxyuridine (BrdU: Invitrogen) to ascertain epithelial cell proliferation and migration.

Preparation of mice for DSS Treatment

이부분은 너무 양이 많고, 그냥 실험절차라서 원문을 링크합니다. (page 3)

[\[Full test 보기\]](#)

DSS 선택 및 준비과정의 중요성

DSS 는 highly water-soluble compound 로 물에 녹였을 때 투명한 용액이 만들어 진다. DSS 의 colitis 를 유도할 수 있는 능력은 그 분자량에 따라 다르다. 일반적으로 36-50kDa 의 분자량이 colitis 의 유도의 목적으로 사용되어 진다. 낮은 분자량 (5Kda)의 DSS 의 경우 colitis 를 유발하는 정도가 약하며, 높은 분자량 (500Kda)의 DSS 의 경우 colonic injury 를 유도하지 못한다(Kitajima et al., 2000).

DSS 파우더의 경우 실온에서 비교적 안정하지만, 투여하는 당일 제조하는 것이 가장 좋다. DSS water 는 마그네틱 stir 를 이용하여 잘 섞어주어서, 투여전 완전히 용해되었는지를 확인하여야 한다. 완전히 용해되지 않은 salt 가 있을 경우 bottle 의 입구를 막거나 water 섭취에 영향을 주어, 잘못된 결과를 야기할 수도 있다. 만약 water 가 탁해졌다면, 미생물의 성장을 의심할 수 있기 때문에 자주 탁도를 체크해 줘서, 새롭게 제조된 DSS 가 포함된 새로운 bottle 을 공급해야 한다. 따라서 DSS water 의 준비는 autoclaved water 사용하는것이 좋으며, control group 에도 같은 water 를 주도록 한다.