



中国科技论文统计源期刊
中文核心期刊要目总览(北大图书馆)

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

2019 **11**

邮发代号: 82-917

第29卷(第11期) Vol.29 No.11

ISSN 1671-7856



9 771671 785145

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响* 田苗苗,田祖宏,张慧霞,张莹,宁思明,聂勇战,胡思隽(1)
- 中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱建立及应用* 王晓堂,肖兰飞,高继萍,梁宇翔,轩瑞晶,闫晓如,高莉,宋国华(7)
- 微泡介导超声空化联合自然杀伤细胞对兔肝 VX2 肿瘤热消融的增效作用* 韩璐,郭凯,郑瑜,赵洁,王晓武,郑静,刘红岗(16)
- 小鼠原发性肝癌模型的建立与优化* 孙振宇,武鸿彪,刘宁,徐胤淇,周健,陈雪健,王伟,徐力善,袁旦平(22)
- 长链非编码 RNA LINC00152 对人脑胶质瘤裸鼠移植瘤生长的影响及机制探讨* 金亮,金爱,赵立智(28)
- 人参皂苷 Rg3 通过 TGF- β 1/ERK 信号通路调控原位荷瘤人肺癌裸鼠的淋巴管生成的机制* 陶涛,汪国文,李其才,黎传奎(34)
- 毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤 张弋宁,靳晓飞,唐敬龙,赵艳萌,周晓红,高维娟(41)
- 亚致死剂量 γ -射线全身照射对小鼠造血免疫功能远期影响 管博文,卢廷华,苏路路,李程程,荆学双,董银萍,王月英,李德冠,孟爱民(50)
- 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对尾悬吊诱导小鼠骨丢失的作用 范新昊,田发明,王婧瑶,张楠,迟博婧,张国彬,郭志斌(58)
- 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态及认知能力的影响 卜兰兰,金剑,李思迪,刘新民(65)
- Uox* 基因敲除自发高尿酸血症对小鼠体重、血压及血液生理生化的影响 潘明子,贺玉伟,李海龙,梁楠,李长贵(71)
- 基于荧光素酶双报告基因系统体外验证长爪沙鼠 *Cip4* 基因受 RXR 及 T4 调控 王志远,刘月环(78)

技术方法

- 小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法的建立 蔡方舟,陈倩,佟巍,李丹,王卫(85)

经验交流

- BALB/c 小鼠、SD 大鼠及食蟹猴淋巴细胞亚群参考值的建立 姜华,文海若,刘丽,王亚楠,李路路,刘晓萌,李伟,王欣,周晓冰,王三龙,霍艳(91)

研究进展

免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用* 郭文文,乔天运,张彩勤,赵菊梅,师长宏(98)

环氧二十碳三烯酸通过线粒体途径保护缺血/再灌注损伤机制的研究进展 叶永才,陈哲璇,李想,谭伟江,杨丰华,张良清(105)

非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展 张元慧,蒋建东,孔维佳(111)

实验动物与人类年龄相关性研究进展 陈玥,苏丹,贵文娟,孙效容(116)

兔脑出血模型研究进展 齐俊芳,包龙(123)

Animal Models and Experimental Medicine 稿约 (128)

广告信息 (内插1,内插2,封二,封三,封底)

* “肿瘤模型的制备及评价应用研究”专题

主 管	广告发布登记
中国科学技术协会	京朝工商广登字 20170142 号
主 办	照 排
中国实验动物学会	同方知网(北京)技术有限公司
中国医学科学院医学实验动物研究所	印 刷
主 编	北京博海升彩色印刷有限公司
秦 川	邮发代号
编辑部主任	82-917
李继平	定 价
编 辑	每期 50.00 元,全年 600 元
《中国比较医学杂志》编辑部	中国标准连续出版物号
出 版	ISSN 1671-7856
《中国比较医学杂志》编辑部	CN 11-4822/R
发 行	2019 年版权归中国实验动物学会所有
《中国比较医学杂志》编辑部	
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号	
电话:010-67779337	本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子
传真:010-67770690	杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网
E-mail: bjb@cnilas.org	和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己
http://zgsydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx	论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述
本期执行主编 张晓晔 付建华	网站著作权使用费。本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅
本期专题组织 师长宏	读网:www.183read.com
本期责任编辑 崔 韶 董令赢	

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 29, Number 11, November 30, 2019

CONTENTS

Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice	
<i>TIAN Miaomiao, TIAN Zuhong, ZHANG Huixia, ZHANG Ying, NING Siming, NIE Yongzhan, HU Sijun</i> (1)	
Establishment and application of differential expression profiles of long non-coding RNA associated with oral squamous cell carcinoma in Chinese hamster	<i>WANG Xiaotang,</i>
<i>XIAO Lanfei, GAO Jiping, LIANG Yuxiang, XUAN Ruijing, YAN Xiaoru, GAO Li, SONG Guohua</i> (7)	
Microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with natural killer cells augmented microwave ablation of rabbit liver VX2 tumors	
..... <i>HAN Lu, GUO Kai, ZHENG Yu, ZHAO Jie, WANG Xiaowu, ZHENG Jing, LIU Honggang</i> (16)	
Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer	<i>SUN Zhenyu,</i>
<i>WU Hongbiao, LIU Ning, XU Yinqi, ZHOU Jian, CHEN Xuejian, WANG Wei, XU Lishan, YUAN Danping</i> (22)	
Effect of long noncoding RNA LINC00152 on the growth of human glioma xenografts in nude mice and its mechanism	<i>JIN Liang, JIN Ai, ZHAO Lizhi</i> (28)
Mechanism of ginsenoside Rg3 regulation of lymphangiogenesis in nude mice bearing human lung cancer by the TGF- β 1/ERK signaling pathway	<i>TAO Tao, WANG Guowen, LI Qicai, LI Chuankui</i> (34)
Effect of calycosin on PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation	
..... <i>ZHANG Xuening, JIN Xiaofei, TANG Jinglong, ZHAO Yanmeng, ZHOU Xiaohong, GAO Weijuan</i> (41)	
Long-term effects of a sublethal γ -ray total body irradiation on the long-term hematopoietic immune function in mice	<i>GUAN Bowen, LU Yanhua,</i>
<i>SU Lulu, LI Chengcheng, JING Xueshuang, DONG Yinping, WANG Yueying, LI Deguan, MENG Aimin</i> (50)	
Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on tail suspension-induced bone loss in mice	
<i>FAN Xinhao, TIAN Faming, WANG Jingyao, ZHANG Nan, CHI bojing, ZHANG Guobin, GUO Zhibin</i> (58)	
Effects of sleep interruption on gait performance and cognitive ability of SD rats	
..... <i>BU Lanlan, JIN Jian, LI Sidi, LIU Xinmin</i> (65)	
Effects of <i>Uox</i> gene knockout-induced spontaneous hyperuricemia on body weight, blood pressure, and blood physiological and biochemical parameters of mice	
..... <i>PAN Mingzi, HE Yuwei, LI Hailong, LIANG Nan, LI Changgui</i> (71)	
<i>In vitro</i> verification of <i>Cip4</i> gene regulation by RXR and T4 in Mongolian gerbils using luciferase double-reporter	

gene system WANG Zhiyuan, LIU Yuehuan(78)

Establishment of an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody of rabies virus
..... CAI Fangzhou, CHEN Qian, TONG Wei, LI Dan, WANG Wei(85)

Establishment of reference ranges for lymphocyte subsets in BALB/c mice, SD rats and cynomolgus monkeys ...
..... JIANG Hua, WEN Hairuo, LIU Li,
WANG Yanan, LI Lulu, LIU Xiaomeng, LI Wei, WANG Xin, ZHOU Xiaobing, WANG Sanlong, HUO Yan(91)

Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy ...
..... GUO Wenwen, QIAO Tianyun, ZHANG Caiqin, ZHAO Jumei, SHI Changhong(98)

Advances in understanding the mechanism by which epoxyeicosatrienoic acids protect against ischemia/reperfusion
injury through the mitochondrial pathway
... YE Yongcai, CHEN Zhexuan, LI Xiang, TAN Weijiang, YANG Fenghua, ZHANG Liangqing(105)

Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies
..... ZHANG Yuanhui, JIANG Jiandong, KONG Weijia(111)

Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans
..... CHEN Yue, SU Dan, GUI Wenjuan, SUN Xiaorong(116)

Research progress on rabbit model of cerebral hemorrhage QI Junfang, BAO Long(123)

Responsible Institution China Association for Science and Technology	Distributor Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine 5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021 Tel: 010 – 67779337 Fax: 010 – 67770690 E-mail: bjb@cnilas.org http://zggydw.cnjournals.com/zgbjyxzz/ch/index.aspx
Sponsor Chinese Association for Laboratory Animal Sciences Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences	CSSN <u>ISSN 1671–7856</u> <u>CN 11–4822/R</u>
Editor-in-Chief QIN Chuan(秦川)	Copyright 2019 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Managing Editor Li Jiping(李继平)	
Editing Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine	
Publishing Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine	

田苗苗,田祖宏,张慧霞,等. Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 1-6.
Tian MM, Tian ZH, Zhang HX, et al. Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 1-6.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 001

Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响

田苗苗,田祖宏,张慧霞,张莹,宁思明,聂勇战,胡思隽*

(第四军医大学西京消化病医院/空军军医大学第一附属医院 肿瘤生物学国家重点实验室,西安 710032)

【摘要】 目的 初步探讨 Axl 高表达对裸鼠胃癌细胞皮下成瘤的影响。**方法** 通过胃癌手术病理染色分析 Axl 与胃癌间的关系;通过转染慢病毒构建高表达 Axl 的胃癌细胞;通过对皮下注射胃癌细胞建立裸鼠胃癌细胞皮下成瘤模型;通过小动物活体成像在体评估皮下肿瘤大小。**结果** 胃癌手术病人切除组织免疫组化结果显示, Axl 在胃癌组织中表达量显著升高;所构建 Axl 高表达胃癌细胞中 Axl 表达量升高 2.4 倍。利用 Axl 高表达胃癌细胞建立裸鼠皮下成瘤模型,小动物活体成像显示皮下注射细胞 2 周后,高表达 Axl 细胞所形成的皮下瘤明显大于对照组,4 周后,差异更加显著 ($P<0.01$)。最后,高表达 Axl 胃癌细胞所形成的皮下瘤的体积和重量均显著大于对照组。**结论** 胃癌组织高表达 Axl, Axl 高表达能够增强胃癌细胞 SGC-7901 的皮下成瘤能力。

【关键词】 Axl;胃癌;小动物活体成像;皮下成瘤;裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0001-06

Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice

TIAN Miaomiao, TIAN Zuhong, ZHANG Huixia, ZHANG Ying, NING Siming, NIE Yongzhan, HU Sijun*
(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University/the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of Axl overexpression on subcutaneous tumorigenesis of gastric cancer cell lines in nude mice. **Methods** The relationship between Axl and gastric cancer was analyzed by immunohistochemical staining. Axl-overexpressing gastric cancer cells were constructed through lentivirus transfection. The nude mouse model was established by subcutaneous injection of gastric cancer cells, and tumor sizes were evaluated by imaging of live animals. **Results** Immunohistochemical result revealed significantly higher Axl expression in gastric cancer tissues compared with adjacent tissues. Axl expression in the Axl-overexpression gastric cancer cell line was increased by 2.4-fold. Live imaging of model mice revealed that after subcutaneous injection of cell lines for 2 weeks, tumors constructed with the Axl-overexpression cell line were significantly larger than that of the control group, and this difference was more significant after 4 weeks ($P < 0.01$). Finally, the volume and weight of subcutaneous tumors formed by gastric cancer cells with high Axl expression were significantly increased compared with the control group. **Conclusions** Axl overexpression can enhance the subcutaneous tumorigenicity of SGC-7901 cells.

【Keywords】 Axl; gastric carcinoma; living imaging of small animals; subcutaneous tumorigenesis; nude mouse

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672702);空军军医大学西京医院学科助推项目(XJZT18MJ84)。
[作者简介] 田苗苗(1987—),女,助理研究员,硕士研究生,研究方向:蛋白质组学,肿瘤多药耐药。E-mail: 393511506@qq.com
[通信作者] 胡思隽(1982—),女,副研究员,博士研究生,研究方向:蛋白质组学,肿瘤。E-mail: husijun211@aliyun.com

胃癌是世界第四大肿瘤,全球胃癌致死率位居所有肿瘤第二位,是我国死亡人数最多的恶性肿瘤之一,对人类健康具有很大的威胁^[1]。尽管针对胃癌的发生发展已经取得了诸多进展,但是由于胃癌患者的早诊率低和多重耐药等限制,预后仍然较差^[2]。胃癌主要治疗措施包括手术治疗及化疗。胃癌化疗治疗方案中,一类重要的靶点是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)。

RTKs 是一个跨膜激酶蛋白家族,可以通过和配体结合及磷酸化等模式激活下游信号通路进而激活一系列生化反应,参与多种生命活动,包括组织修复和凋亡清除、免疫调控等^[3-4]。Axl (Anexelekto) 是 RTKs 的一种,其在不同类型癌症中均有较高表达,参与调控肿瘤细胞的增殖侵袭和转移,并且与癌症的不良预后相关^[5-9]。Axl 可介导肺癌、乳腺癌、头颈和食管鳞状上皮细胞癌等肿瘤的增殖、迁移、转移及耐药等^[10-12]。Axl 信号通路在胃癌组织和细胞系中高表达,可能通过 Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖,然而具体调控机制仍不明确^[13]。为了进一步探讨 Axl 与胃癌发生发展之间的关系,本研究着眼于 Axl 表达量与胃癌之间的关系及 Axl 高表达对裸鼠胃癌系皮下成瘤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠(5 ~ 6 周龄,约 20 g)购自北京维通利华有限公司[SCXK(京)2016-0011];饲养于空军军医大学实验动物中心[SYXK(陕)2014-001],12 h 昼夜交替,温度保持在 23℃ ~ 25℃,相对湿度恒定在 40% ~ 60%,自由饮食。实验分为两组,每组 8 只。实验动物设计符合福利伦理要求,实验动物福利伦理审批号:20190214,本实验符合动物实验的 3R 原则。

1.1.2 组织样本

收集第四军医大学西京消化病医院(空军军医大学第一附属医院)2008 年至 2010 年间经病理检查的胃癌和癌旁组织 101 例,交由上海芯超生物科技有限公司制备为胃癌和癌旁芯片。实验所用组织均经病人本人和家属同意,并签署知情同意书,且经过医学伦理委员会审批,伦理委员会批件号:KY20192088-F-1。

1.1.3 细胞系

人胃癌细胞 SGC-7901 细胞购自上海吉凯生物公司。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自四季青公司;1640 培养基和胰酶购自美国 Gibco 公司;过表达慢病毒购自上海吉凯生物公司;抗 Axl 抗体购自美国 CST 公司;免疫组化用山羊抗兔 IgG 和 DAB 显色试剂盒均购自中杉金桥公司;总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。激光共聚焦扫描显微镜(FLUOVIEW FV10I)购自美国 Olympus 公司;小动物活体成像仪(Lumina2)购自美国 PE 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 高表达 Axl 细胞的构建

SGC-7901 细胞以 2×10^6 个/孔密度铺于六孔板中,过夜贴壁后加入适量具有绿色荧光蛋白(GFP)编码基因的慢病毒(过表达慢病毒 Let-Axl 或对照慢病毒 Let-Null),共培养 24 h 后更换培养基。72 h 后加入嘌呤霉素筛选已转染细胞,荧光显微镜观察同时进行 Western blot 和定量 PCR 检测确定转染效率。转染成功可进行细胞传代和后续研究。

1.3.2 裸鼠皮下成瘤及小动物活体成像

BALB/c 裸鼠(6 周)16 只用于成瘤实验,将胃癌细胞 SGC-7901/Let-Axl 和 SGC-7901/Let-Null 消化后,PBS 清洗两次,去除残留培养基,将 1×10^6 个细胞接种于裸鼠的右侧背部皮下,每周观察裸鼠的状态、肿瘤的生长状况^[14]。于第二和四周时,对裸鼠进行麻醉后,利用小动物活体成像仪进行荷瘤裸鼠活体成像并拍照(生物发光,激发波长 488 nm,发射波长 507 nm)^[15]。

1.3.3 定量 PCR

采用总 RNA 提取试剂盒对细胞总 RNA 进行提取,逆转录试剂盒进行逆转录,定量 PCR 试剂盒进行定量。内参为 GAPDH,引物序列 GAPDH-F(5' → 3'): GCACCGTCAAGGCTGAGAAC; GAPDH-R(5' → 3'): TGGTGAA-GACGCCAGTGGA; Axl 引物序列为 Axl-F(5' → 3'): CCGGGTTCATCAACATCAA; Axl-R(5' → 3'): CTGACATTCTCGAGATCGA。

1.3.4 Western blot 检测

用 RIPA 裂解液将细胞裂解并用细胞刮收集,测定总蛋白浓度后,每孔上样 40 μg 蛋白,150 V 恒压电泳 40 min,100 V 恒压转 PVDF 膜 1 h。5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜后,相应二抗室温孵育 2 h,通过 ECL 试剂盒发光检测。

1.3.5 免疫组化

组织切片于 60℃ 烤箱烘烤 2 h。常规脱蜡(依次为):二甲苯、二甲苯、无水乙醇、无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇,其中二甲苯浸泡 10 min,

乙醇浸泡 5 min。抗原修复:在清水中漂洗两次,再加入柠檬酸缓冲液,放入微波炉中煮沸 3 min(中火),待高压锅中煮沸后将组织片置于其中高压修复 2 min,冷却至室温。灭活内源性过氧化氢酶:在清水中冲洗一段时间,加入 3% H₂O₂ 浸泡 10 min。血清封闭:将载玻片置于 PBS 中 5 min,清洗 2 次,山羊血清封室温下封闭 30 min。加一抗:加入 Axl 抗体(稀释浓度 1:300),以 PBS 作为作为阴性对照组,4℃ 孵育过夜。加二抗:PBS 中洗 3 次,每次 5 min,加二抗,然后置于 37℃ 温箱中 30 min。显色:PBS 中洗 3 次,每次 5 min,擦干组织周围的 PBS 后加 DAB 显色剂。镜下观察组织染色情况至合适深浅。将显色后的片子用清水冲洗 15 min 后,浸泡于苏木精中染色 1 min。脱水:水中冲洗 5 min 后,依次将载玻片放入 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇、二甲苯、二甲苯。每个试剂中放置 2 min,最后浸泡在二甲苯中,通风柜中用中性树脂封片晾干。

1.3.6 表达分级判断标准

免疫组化表达分级通过两方面打分评判:(1)阴性为 0;阳性占 0%~33%的记作 1;34%~66%的记作 2;67%~100%的记作 3。(2)染色强度:分别将未显色、浅黄、棕黄和棕色记为 0、1、2、3 四个等级。将两个评分相乘并分为 0、1、2 和 3 四个表达强度等级。

1.3.7 细胞免疫荧光染色

多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗 3 次后山羊血清封闭 1 h。一抗 4℃ 孵育过夜后,用相应荧光二抗室温孵育 2 h,DAPI 室温染色 10 min,加入抗淬灭剂封

片保存。

1.4 统计学方法

实验数据,采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计分析,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验进行组间差异性检验,表达分级采用卡方检验,以 *P*<0.05 为差异有显著性。

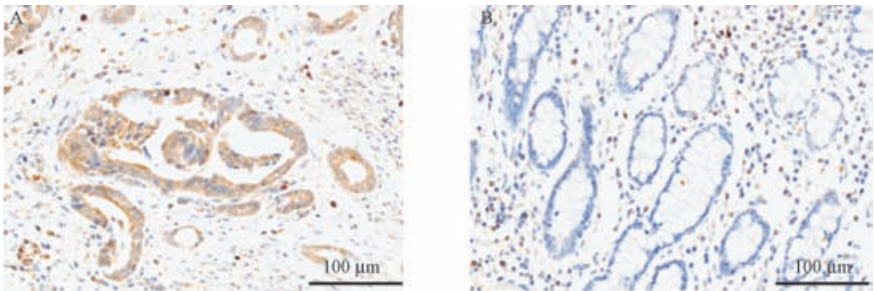
2 结果

2.1 胃癌组织中 Axl 高表达

为了观察胃癌组织中 Axl 的表达情况,我们收集了本院消化外科胃癌手术病人手术切除组织并制作胃癌组织芯片。经过免疫组化染色,Axl 在胃癌组织中的表达量显著高于癌旁组织(图 1)。101 例免疫组化统计结果见表 1。胃癌组织中,强度为中性(++)和强阳性(+++)分别有 34 例和 7 例,而在癌旁组织中,强度为中性(++)和强阳性(+++)分别只有 5 例和 0 例。胃癌组织中 Axl 表达量显著高于癌旁组织(*P*<0.001)。

2.2 Axl 高表达细胞构建

为了深入研究 Axl 高表达与胃癌发生发展之间的关系,我们首先构建了高表达 Axl 的 SGC-7901 细胞。经过慢病毒 Let-Axl 的转染,通过定量 PCR 技术检测表明,SGC-7901/Let-Axl 中 Axl mRNA 的含量显著高于 SGC-7901/Let-Null 组(*P*<0.001,图 2A)。进一步检测发现,SGC-7901/Let-Axl 中 Axl 蛋白含量显著高于 SGC-7901/Let-Null(图 2B)。免疫荧光染色也表明 SGC-7901/Let-Axl 细胞中 Axl 含量明显升高(图 2C)。



注:A:胃癌组织;B:癌旁组织。
图 1 免疫组化检测组织中 Axl 表达

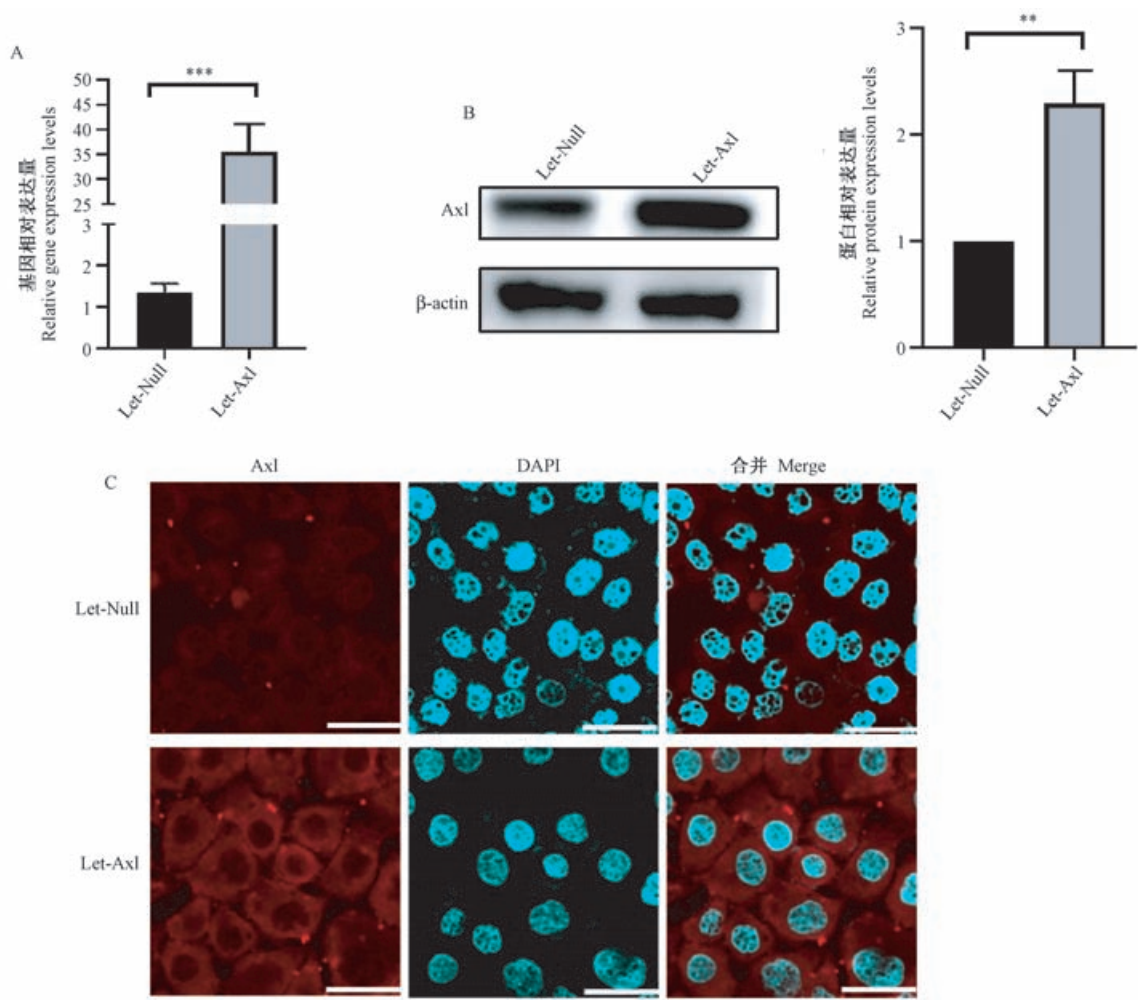
Note. A, Gastric cancer tissue. B, Paracancer tissue.

Figure 1 Axl expression in tissues. Immunohistochemistry stain

表 1 胃癌组织与癌旁组织 Axl 蛋白表达水平

Table 1 Axl expression levels in gastric cancer tissues and adjacent tissues

组别 Groups	表达分级 Rank				<i>n</i>	<i>P</i>
	-	+	++	+++		
胃癌组织 Gastric cancer tissues	30	30	34	7	100	<0.001
癌旁组织 Adjacent tissues	69	27	5	0	101	



注:A:定量 PCR 结果;B:Western blot 检测 Axl 表达量;C:免疫组化结果。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。比例尺为 20 μm 。

图 2 Axl 高表达细胞鉴定

Note. A, Results of quantitative PCR. B, Quantification of Axl by Western blot. C, Results of immunofluorescence. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Scales indicate 20 μm .

Figure 2 Identification of Axl-overexpression cells

2.3 小动物活体成像检测 Axl 对胃癌肿瘤的影响

为了进一步研究 Axl 高表达对胃癌的影响,我们进行了裸鼠皮下胃癌细胞成瘤实验。在分别注射 Axl 高表达细胞 SGC-7901/Let-Axl 及其对照细胞 SGC-7901/Let-Null 两周后,通过小动物活体成像可以看出,高表达 Axl 的 SGC-7901 细胞所成皮下瘤荧光强度大于对照组,在注射肿瘤细胞 4 周后,再次进行小动物活体成像,结果显示,SGC-7901/Let-Axl 所成皮下瘤荧光强度显著大于对照组(图 3A)。荧光强度分析结果显示,注射 SGC-7901/Let-Axl 所形成肿瘤在小动物活体成像下荧光强度显著高于 SGC-7901/Let-Null($P<0.01$,图 3B)。以上结果显示,SGC-7901/Let-Axl 成瘤能力显著高于 SGC-7901/Let-Null,Axl 高表达可以增强胃癌细胞 SGC-7901 的

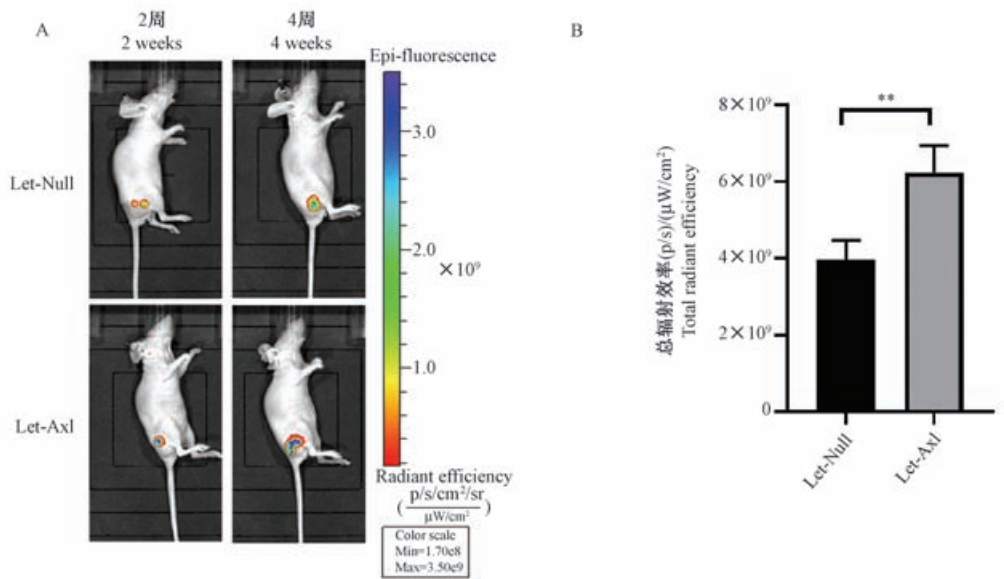
皮下成瘤能力。

2.4 高表达 Axl 增强胃癌细胞皮下成瘤能力

裸鼠皮下接种胃癌细胞 4 周后,SGC-7901/Let-Axl 所形成的肿瘤明显大于 SGC-7901/Let-Null 组(图 4A、4B)。处死裸鼠后,取出皮下瘤,对其体积和重量进行测量。相对于对照组 SGC-7901/Let-Null,高表达 Axl 细胞 SGC-7901/Let-Axl 所形成的皮下瘤的体积显著增大($P<0.01$,图 4C),质量也显著增大($P<0.01$,图 4D)。这些结果表明,Axl 高表达能够增强胃癌细胞皮下成瘤能力。

3 讨论

胃癌是我国第二大恶性肿瘤,致死率亦位居第二^[1]。尽管胃癌的诊断和治疗技术有了很大改进,



注:A:小动物活体成像结果;B:小动物活体成像荧光强度统计(皮下注射肿瘤细胞 4 周后)。** $P<0.01$ 。

图 3 小动物活体成像检测皮下瘤大小

Note. A, Live animal imaging. B, Total radiant efficiency of live animal imaging (4 weeks after subcutaneous injection of cancer cells). ** $P<0.01$.

Figure 3 Size of subcutaneous tumors detected by live animal imaging

但胃癌患者的 5 年总生存率仍然不能令人满意^[2]。癌症化疗治疗方案中,RTKs 是一类极其重要的靶点。进一步深入研究 RTKs 与胃癌的关系,具有重要的临床意义。

Axl 是 RTKs 家族中重要的一员,在多种肿瘤中有过表达或异位表达,可以激活相关通路参与肿瘤的增殖、迁移、转移、凋亡抑制和耐药性^[16]。研究表明,急性白血病细胞可以诱导骨髓间质细胞分泌 Gas6,从而介导表达 Axl 的急性白血病细胞进行增殖、存活和耐药性。在食管鳞状细胞癌中,Axl 高表达且与生存期呈负相关^[17]。在胰腺癌中,Axl 与淋巴结转移呈现正相关,与生存期呈现负相关^[18]。在肝癌中,Axl 可以促进原发性肝癌的细胞增殖和侵袭能力^[19]。

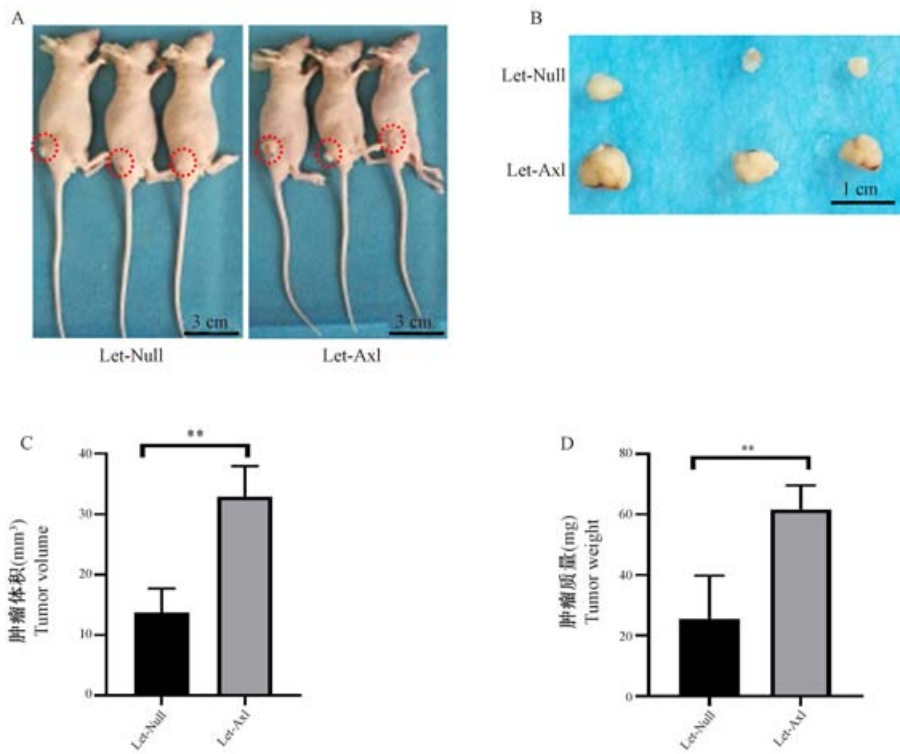
在本研究中,我们检测了进行胃癌外科手术患者的胃癌及癌旁组织中的 Axl 的表达量,结果显示,胃癌组织相比与癌旁组织,Axl 表达量显著升高,这提示 Axl 与胃癌的发生发展可能具有密切的关系。为了确定 Axl 参与胃癌发生发展,我们构建 Axl 高表达胃癌细胞,在裸鼠体内进行皮下成瘤,通过小动物活体成像检测证实,Axl 高表达能够显著提高胃癌细胞的皮下成瘤能力,处死动物后,取瘤组织测量体积和重量,确认了与活体成像结果的一致性。本研究一系列结果提示,Axl 与胃癌的发生和

发展可能具有密切的关系。

Axl 已成为多种肿瘤的治疗靶点和潜在的生物标志物,多种针对 Axl 的小分子抑制剂也已面市。我们通过本研究证实,Axl 与胃癌的发生和发展可能具有密切的关系,可能可以作为胃癌预防、早诊及治疗的关键分子。基于本研究结果,经过后续深入研究探索,有望开发出以 Axl 为靶点治疗胃癌的新型有效的抗肿瘤药物和以 Axl 为胃癌标志物的诊断试剂盒。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Zhang D, Fan D. New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives [J]. Future Oncol, 2010, 6(4): 527-537.
- [3] Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases [J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62: 453-481.
- [4] Yu J, Rupasinghe C, Wilson JL, et al. Targeting receptor tyrosine kinases and their downstream signaling with cell-penetrating peptides in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells [J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 85(5): 586-597.
- [5] Dunne PD, McArt DG, Blayney JK, et al. AXL is a key regulator of inherent and chemotherapy-induced invasion and predicts a poor clinical outcome in early-stage colon cancer [J].



注:A:裸鼠皮下瘤生长情况;B:Axl 高表达及对照组所形成的皮下瘤;C:皮下瘤体积;D:皮下瘤质量。** $P < 0.01$ 。红色圆圈所示为裸鼠皮下瘤。

图 4 Axl 高表达对皮下瘤形成的影响

Note. A, Subcutaneous tumor growth in nude mice. B, Subcutaneous tumor formed by Axl overexpression and control groups. C, Tumor volume. D, Tumor weight. ** $P < 0.01$. Red circles show the subcutaneous tumors in nude mice.

Figure 4 Effect of Axl overexpression on subcutaneous tumor formation

Clin Cancer Res, 2014, 20(1): 164-175.

[6] Avilla E, Guarino V, Visciano C, et al. Activation of TYRO3/AXL tyrosine kinase receptors in thyroid cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(5): 1792-1804.

[7] Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(7): 618-626.

[8] Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, et al. Gas6/Axl pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(4): 769-775.

[9] Sayan AE, Stanford R, Vickery R, et al. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL [J]. Oncogene, 2012, 31(12): 1493-1503.

[10] Wu Z, Bai F, Fan L, et al. Coexpression of receptor tyrosine kinase AXL and EGFR in human primary lung adenocarcinomas [J]. Hum Pathol, 2015, 46(12): 1935-1944.

[11] Boichuk S, Galebikova A, Dunaev P, et al. A novel receptor tyrosine kinase switch promotes gastrointestinal stromal tumor drug resistance [J]. Molecules, 2017, 22(12): E2152.

[12] Vouri M, Hafizi S. TAM receptor tyrosine kinases in cancer drug resistance [J]. Cancer Res, 2017, 77(11): 2775-2778.

[13] Sawabu T, Seno H, Kawashima T, et al. Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway [J]. Mol Carcinog, 2007, 46(2): 155-164.

[14] 田树红, 王日超, 肖敏, 等. 裸小鼠胃癌原位移植模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 21-24.

[15] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 7-12.

[16] Reichl P, Dengler M, van Zijl F, et al. Axl activates autocrine transforming growth factor-beta signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2015, 61(3): 930-941.

[17] Paccez JD, Duncan K, Vava A, et al. Inactivation of GSK3 β and activation of NF- κ B pathway via Axl represents an important mediator of tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Mol Biol Cell, 2015, 26(5): 821-831.

[18] Hector A, Montgomery EA, Karikari C, et al. The Axl receptor tyrosine kinase is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(10): 1009-1018.

[19] He L, Zhang J, Jiang L, et al. Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(10): 882-891.

[收稿日期] 2019-09-18

王晓堂,肖兰飞,高继萍,等. 中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱建立及应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 7-15.

Wang XT, Xiao LF, Gao JP, et al. Establishment and application of differential expression profiles of long non-coding RNA associated with oral squamous cell carcinoma in Chinese hamster [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 7-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 002

中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱建立及应用

王晓堂,肖兰飞,高继萍,梁宇翔,轩瑞晶,闫晓如,高 莉,宋国华*

(山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

【摘要】 目的 筛选中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本中具有差异表达的长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA),预测其靶基因,探究靶基因的生物学功能及富集的信号通路。**方法** 采用二甲苯并蒽涂抹法建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌模型,高通量测序技术构建 LncRNA 差异表达谱,生物信息学技术筛选差异表达的 LncRNA 并进行靶基因预测,GO 与 KEGG 富集分析分别预测靶基因的生物学功能及富集的信号通路。**结果** 与正常组织样本相比,口腔鳞状细胞癌组织样本中筛选出 54 个显著差异表达 LncRNA(31 个上调,23 个下调)。功能性分析表明:与口腔癌相关的 GO 条目 73 条;KEGG 富集的信号通路 25 条。**结论** 中国地鼠口腔鳞状细胞癌样本中差异表达的 LncRNA 可能通过靶向调控其靶基因参与调控多种生物学功能及口腔癌相关的信号通路,在口腔鳞状细胞癌形成过程中可能发挥重要作用。

【关键词】 中国地鼠;口腔鳞状细胞癌;长链非编码 RNA

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0007-09

Establishment and application of differential expression profiles of long non-coding RNA associated with oral squamous cell carcinoma in Chinese hamster

WANG Xiaotang, XIAO Lanfei, GAO Jiping, LIANG Yuxiang, XUAN Ruijing, YAN Xiaoru, GAO Li, SONG Guohua*
(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Models, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Objective To screen for differentially expressed long non-coding RNA (LncRNA) in oral squamous cell carcinoma tissue samples from Chinese hamsters and predict their target genes, and explore the biological functions and enrichment signaling pathways of these target genes. **Methods** The squamous cell carcinoma model was established in Chinese hamsters by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene smear method. The profile of differentially expressed LncRNA was constructed by high-throughput sequencing technology. Differentially expressed LncRNAs were screened by biosignal technology and target genes were predicted. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were used to predict the biological function of differentially expressed genes and enriched signaling pathways, respectively. **Results** Compared with normal tissue samples, 54 differentially expressed LncRNAs were

【基金项目】国家自然科学基金(31772551,31970513);山西医科大学博士后基金(3C572018001)。

【作者简介】王晓堂(1997—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 2432137746@qq.com

【通信作者】宋国华(1973—),女,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

screened from squamous cell carcinoma tissue samples, of which 31 were upregulated and 23 were downregulated. Functional analysis identified 73 GO entries associated with oral cancer, and 25 enriched KEGG signaling pathways.

Conclusions Differentially expressed lncRNA in Chinese hamster oral squamous cell carcinoma samples likely play a role in regulating various biological functions and oral cancer-related signaling pathways by targeting numerous genes, and may play an important role in the development of oral squamous cell carcinoma.

【Keywords】 Chinese hamster; oral squamous cell carcinoma; long non-coding RNA (lncRNA)

口腔癌作为近年来频发的肿瘤,在全身恶性肿瘤中约占 3%~5%,是全球范围内常见的第 11 位癌症,具有转移性高、手术切除难度大、术后易复发等特点^[1]。口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)的发病率约占口腔恶性肿瘤的 90%,且发病率较高、恶化程度极强,患者 5 年存活率在 50%左右^[2]。已有证据指出,口腔鳞状细胞癌的形成与患者的多种不良生活习惯有关。此外,遗传因素、慢性炎症及病毒感染也是该病的诱因^[3]。世界卫生组织预计,未来几十年口腔癌的发病率将持续上升,成为一种严重的世界公共卫生问题^[4]。因此,需进一步研究口腔鳞状细胞癌发病进程中的相关机制,以便更好地进行癌前诊断与预后治疗。

近年来,大量研究表明长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 在多层次调控生物体的基因表达,参与生物体内多种重要的生物学过程^[5]。最新研究指出, lncRNA 具有复杂的生物学功能与作用调控机制,通过介导基因表达、转录、翻译以及组织分化等途径调控基因表达,引起细胞功能紊乱、代谢失调,导致多种疾病和癌症的形成^[6-7]。目前,有研究指出 lncRNA 在多种肿瘤发生过程中异常表达,参与调控肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭与凋亡过程,在肿瘤发生发展中发挥致癌或抑癌作用,是肿瘤发生的重要因素之一^[8-10]。但是, lncRNA 在口腔鳞状细胞癌中作用机制的研究相对较少,局限于未能获得足够的临床样本。因此,建立与人类口腔鳞状细胞癌相似的疾病动物模型模拟 OSCC 的发生发展过程,深入研究其发病机制至关重要。

中国地鼠(*Cricetulus barabensis griseus*)具有独特的颊囊组织结构,口腔黏膜与人类的相似性较高,可用其构建口腔癌实验动物模型,模拟人类口腔癌癌变过程^[11-13]。本课题组在前期研究中已成功建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌动物模型,本文将高通量 lncRNA 测序技术与生物信息学技术相结合,筛选中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本中显著差异表达的 lncRNA,对其进行靶

基因预测,并对靶基因进行 GO 功能分析与 KEGG 信号通路分析,预测差异表达的 lncRNA 可能具有的功能,深入探讨其对中国地鼠口腔鳞状细胞癌发生发展的调控机制,为口腔鳞状细胞癌的临床研究提供数据与理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级中国地鼠 60 只,雄性,8~10 周龄,体重(20 ± 2) g,购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2015-0001]。中国地鼠饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(晋)2015-0001],温度 25℃,湿度 40%~70%,光暗循环 12 h/12 h)。严格按照山西医科大学实验动物管理委员会的要求进行全部动物实验[IACUC 号:2017016],所有实验均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司),普通 PCR 与荧光定量 PCR 相关试剂(日本 Takara 公司),Nanodrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司),Qubit 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher 公司),Agilent 2100 生物芯片分析系统(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织样本中 RNA 提取

本课题组前期采用二甲基苯并葱涂抹的方式成功制备口腔鳞状细胞癌动物模型^[12-15]。在课题组前期制备的中国地鼠口腔鳞状细胞癌模型组与正常组中分别随机选取 3 只动物,取适量的颊囊组织样本用液氮充分研磨,采用 RNA 提取试剂盒提取不同组织中的总 RNA。

1.3.2 高通量 lncRNA 测序

RNA 提取完成后,对其进行质检。首先,采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性、降解程度以及是否被污染。RNA 纯度采用 Nanodrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)进行检测,浓度采用 Qubit 荧光定量仪(美国 Thermo Fisher 公司)进行精

确定量。采用 Agilent 2100 生物芯片分析系统(美国 Thermo Fisher 公司)精确检测 RNA 的纯度与完整性。完成质检后,对质检合格的 RNA 进行片段化、反转录成 cDNA、末端修复、加接头、PCR 扩增等一系列操作后完成 cDNA 文库构建^[16-17]。筛选片段大小为 200 bp 左右的 cDNA 文库,按有效浓度及目标上机数据量的需求进行 Illumina 测序^[17]。

1.3.3 测序数据处理

测序获得的原始序列中存在低质量数据,本研究采用 FASTQC 软件^[18]处理原始数据并进行质量控制后得到高质量数据。质控完成后,使用 RSEM 比对软件^[19]将高质量数据比对到中国地鼠参考基因组上进行序列联配。RSEM 比对软件使用自身脚本对联配的结果进行表达量提取,生成基因的读数、FPKM 和 TPM 表达矩阵^[20-21]。最后,筛掉低表达量的基因(平均数值>5),分离 mRNA 和 LncRNA 对应的基因。

1.3.4 差异表达 LncRNA 筛选及靶基因预测

首先,将 RSEM 估算得到的各个 LncRNA 的读数作为输入数据输入到 DESeq2 软件^[20-21]进行差异鉴定,软件通过自行标准化与模型拟合,通过 Wald 检验^[22-23]鉴定两组样本间基因的差异显著性。其次,采用生物统计学与生物信息学相结合的方法筛选与 OSCC 密切相关的显著差异表达的 LncRNA,以 $\log_2(\text{差异倍数}) \geq 1$ ($|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$), $P < 0.05$ 为筛选条件。本研究通过表达量相关性分析的方法预测差异表达 LncRNA 的反式作用靶基因,选取 $P < 0.05$ 的基因作为反式作用候选基因。

1.3.5 GO 功能富集分析与 KEGG 信号通路分析

差异表达 LncRNA 的靶基因富集分析包括 GO 功能(Gene Ontology)分析与 KEGG 信号通路(Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes pathway)分析^[24]。本研究采用 GO 功能注释对中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本中差异表达的 LncRNA 的靶基因进行功能分析,使用生物统计学方法筛选差异表达基因富集的生物学功能,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义的功能条目。采用 KEGG 信号通路富集分析,以达到对差异表达 LncRNA 的靶基因生物通路注释的目的,筛选出与 OSCC 相关的信号调控网络,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义的信号通路条目。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 22.0 软件分析,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

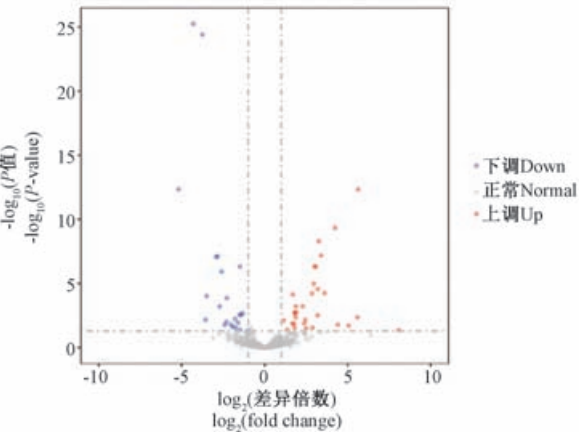
2 结果

2.1 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达基因

采用高通量 LncRNA 测序技术对组织样本进行测序分析,结果表明与中国地鼠正常颊囊组织样本相比口腔鳞状细胞癌组织样本中共筛选出 54 个显著差异表达的 LncRNA($P < 0.05$, $|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$),31 个基因表达上调,23 个基因表达下调,并绘制了显著差异表达的 LncRNA 的火山图(图 1)。进一步采用 t 检验分析实验数据,筛选出 10 个差异具有极显著统计学意义的 LncRNA($P < 0.01$, $|\log_2(\text{差异倍数})| > 3$),分别为 LOC100754872、LOC103160606、LOC107978163、LOC103163417、LOC103162225、LOC103161306、LOC107979530、LOC103161117、LOC103164378、LOC103161380。其中 7 个基因表达上调,3 个基因表达下调(表 1)。

表 1 两组组织样本中显著差异表达前十的 LncRNA

Table 1 Top ten LncRNAs expressed in normal and squamous cell carcinoma tissue samples with significant differences						
基因序列号 Gene ID	基因名称 Gene name	平均读数 Mean count	$\log_2(\text{差异倍数})$ $\log_2(\text{fold change})$	P 值 P -value	上调/下调 Up/Down	
100754872	LOC100754872	14. 018248	8. 082393121	0. 0036	上调 Up	
103160606	LOC103160606	49. 86007826	5. 632877073	0. 0000	上调 Up	
107978163	LOC107978163	4. 842724695	5. 59249855	0. 0002	上调 Up	
103163417	LOC103163417	63. 35730283	-5. 192842783	0. 0000	下调 Down	
103162225	LOC103162225	27. 95139454	5. 060953151	0. 0013	上调 Up	
103161306	LOC103161306	6. 533238171	4. 410781992	0. 0010	上调 Up	
107979530	LOC107979530	134. 7442638	-4. 303270636	0. 0000	下调 Down	
103161117	LOC103161117	56. 58531583	4. 236843984	0. 0000	上调 Up	
103164378	LOC103164378	241. 3621748	-3. 75770965	0. 0000	下调 Down	
103161380	LOC103161380	27. 80938113	3. 608525397	0. 0000	上调 Up	



注:X 轴代表差异表达倍数的 $\log_2$ 值,纵坐标代表各个基因的经过标准化后的 P 值。显著上调的基因 ($|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$) 为红色标识,显著下调的基因为蓝色标识,表达量没有变化的基因为灰色标识。

图 1 正常组与鳞癌组中差异表达 LncRNA 火山图
Note. X-axis represents $\log_2$ value of differential expression multiple, while the ordinate represents the normalized P -value of each gene. Significantly upregulated genes ($|\log_2(\text{fold change})| > 1$) are indicated in red, significantly downregulated genes are indicated in blue, and genes with no change in expression are indicated in gray.

Figure 1 Volcano maps of differentially expressed LncRNA in normal and squamous cell carcinoma groups

2.2 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达的 LncRNA 靶基因预测

采用靶基因预测软件预测显著差异表达的 54 个 LncRNA 反式作用靶基因。本研究对极显著差异表达 ($P < 0.01$) 的 10 个 LncRNA 预测的靶基因数目进行统计,不同 LncRNA 位于染色体上不同位置,发挥不同生物学功能,因此预测的靶基因数目不同(表 2)。进一步使用生物统计学方法分别统计了极显著差异表达的 LncRNA 相关性最高的前 5 个靶基

因(表 2)(相关性 $> 0.85, P < 0.01$)。推测组织样本中极显著差异表达的 LncRNA 可能通过与其靶基因之间相互调控发挥作用,从而调控口腔鳞状细胞癌的发生进程。

2.3 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达 LncRNA 的靶基因 GO 分析

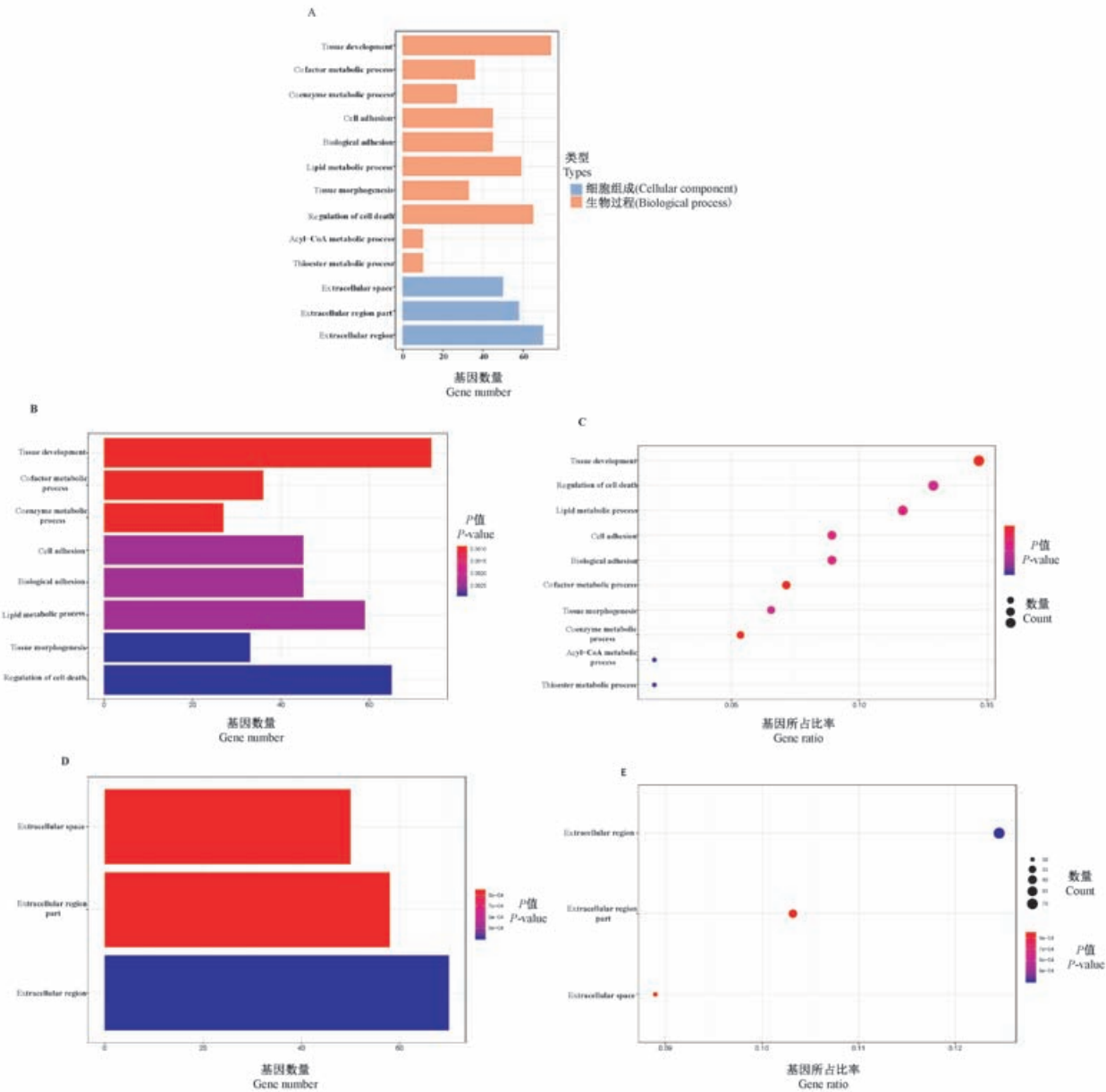
采用 GO 功能注释方法分析 54 个显著差异表达的 LncRNA 的靶基因富集的生物学功能。GO 注释结果中共获得 73 个条目,70 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关,未发现与分子功能相关的条目。采用生物统计学方法筛选显著富集的 GO 条目 ($P < 0.05$),其中 10 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关,该结果表明差异表达基因的靶基因主要分布在细胞外区域,参与调控硫酸酯、酰基辅酶 A、辅酶、辅因子、脂质代谢过程,调节细胞死亡、细胞黏附、组织发育及组织形态发生等过程(图 2A)。以 $P < 0.01$ 为筛选条件,筛选出极显著富集的 GO 条目,8 条与生物过程相关(图 2B、2C),3 条与细胞位置相关(图 2D、2E)。推测以上生物学功能的紊乱或异常可能引起口腔鳞状细胞癌的恶化。

2.4 中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常组织样本差异表达 LncRNA 的靶基因 KEGG 分析

KEGG 通路富集分析结果表明,差异表达的 LncRNA 的靶基因共富集了 25 条信号通路 ($P < 0.05$)。采用生物统计学方法,筛选极显著富集的信号通路 ($P < 0.01$),共筛出 12 条极显著的信号通路(图 3A、3B,表 3)。主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路(cge04060)、粘着力信号通路(cge04510)、轴突指导信号通路(cge04360)、钙信号通路(cge04020)与 TNF 信号通路(cge04668),这些通路多与肿瘤的发生发展密切相关。此外,差异表达的 LncRNA 的靶基因还参与调控 ARVC 信号通

表 2 显著差异表达 LncRNA 靶基因预测结果统计
Table 2 Significant differentially expressed LncRNA target gene-prediction results and statistics

基因名称 Gene name	预测的靶基因数量 Numbers of predicted targets	差异表达的靶基因名称 Differentially expressed target genes name
LOC100754872	2954	Odam; Kif26b; Clstn2; Vill; Wdr86
LOC103160606	3533	Tlpi2; Gprc5a; Orl1; Gpr68; Tnn
LOC107978163	3472	Fam19a2; Stra6; Cxcl3; Scg2; Mmp10
LOC103163417	1431	Tcp11l2; Cldn1; Cln8; Mboat2; Il18
LOC103162225	1454	Pou2af1; Pik3ap1; Galnt3; Rpn1; Aldh8a1
LOC103161306	2435	Wdr86; Odam; Csn3; Adgre3; Pcdh10
LOC107979530	3302	Ptk6; Acox2; Dgat2; Adgrf2; Ppp1r3a
LOC103161117	3489	Stra6; Fam19a2; Cxcl3; Scg2; Mmp10
LOC103164378	2216	Ndufv2; Smco1; Cln2; Ca11; Coq3
LOC103161380	3853	Gpr176; Gpr176; Cx3er1; Sle2a3; Gpr68



注:A:GO 分类所有条目柱状图,横坐标为富集的基因数量,纵坐标为 GO 条目,不同的颜色代表不同的 GO 分类。B:生物过程相关的 GO 条目的柱状图。C:生物过程相关的 GO 条目的气泡图。D:细胞组成相关的 GO 条目的柱状图。E:细胞组成相关的 GO 条目的气泡图。

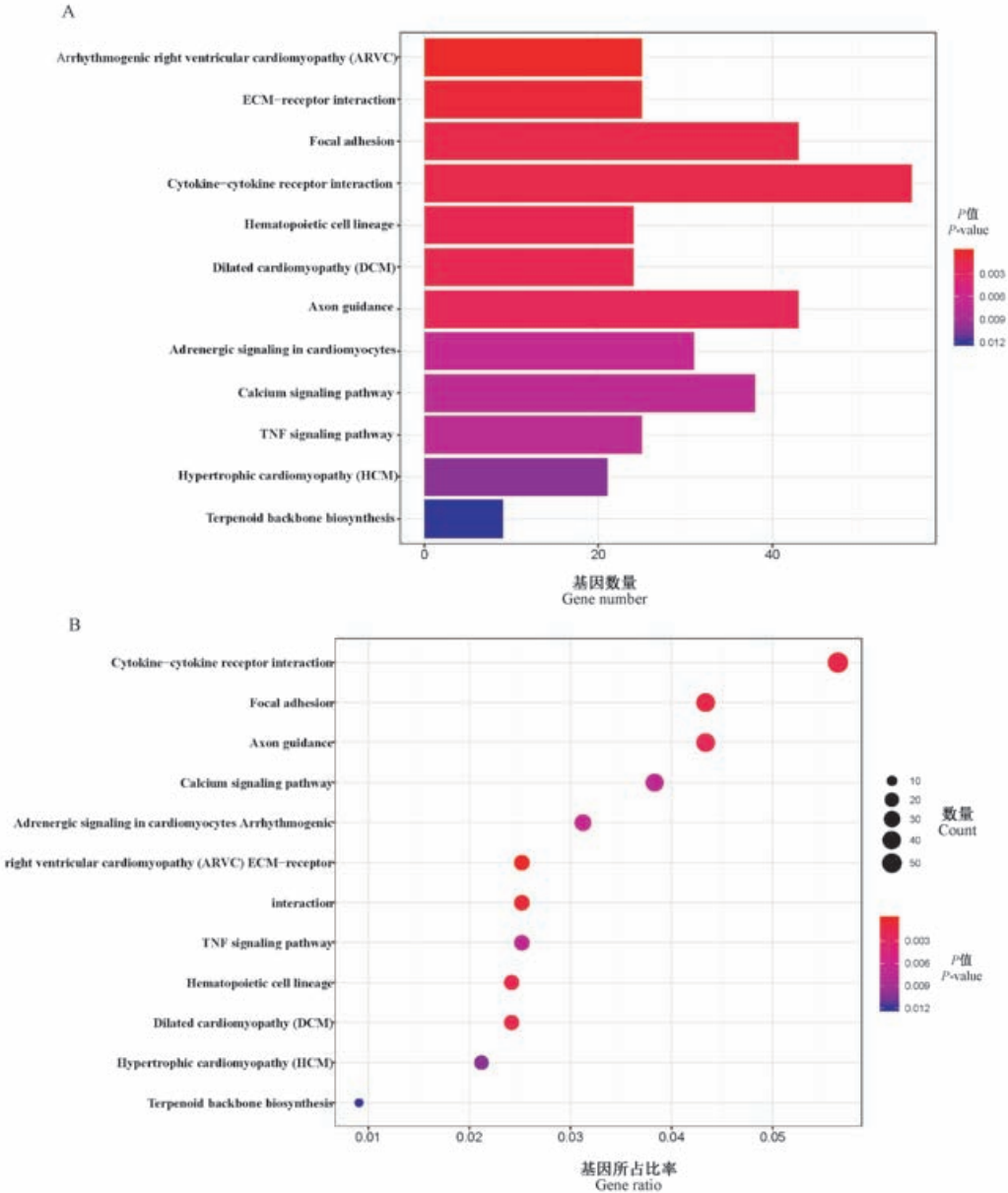
图 2 正常组与鳞癌组中显著差异表达 LncRNA 的靶基因富集的总 GO 条目、生物过程与细胞组成条目

Note. A, GO classification histograms of all entries where the abscissa is the number of enriched genes, the ordinate is the GO entry, and different colors represent different GO classifications. B, Histogram of biological process-related GO entries. C, Bubble chart of biological process-related GO entries. D, Histogram of cellular component-related GO entries. E, Bubble chart of cellular component-related GO entries.

Figure 2 Total GO entries, and biological process and cellular component entries for significant differentially expressed LncRNA target genes in normal and squamous cell carcinoma groups

路(cge05412)、DCM 信号通路(cge05414)、HCM 信号通路(cge05410)、心肌细胞的肾上腺素信号传导通路(cge04261)、造血细胞谱系信号通路(cge04640)、蒺类骨架的生物合成(cge00900)及

ECM-受体相互作用通路(cge04512),这些通路大多与心脏疾病密切相关。推测在口腔鳞状细胞癌中这些信号通路在不同程度上发挥调控作用,影响口腔鳞状细胞癌的发生发展。



注:A:KEGG 信号通路柱状图。B:KEGG 信号通路气泡图。

图3 正常组与鳞癌组中显著差异表达 LncRNA 的靶基因 KEGG 信号通路富集图
Note. A, KEGG signal path histogram. B, Bubble map of KEGG signal path.

Figure 3 Enrichment of KEGG signaling pathways in target genes with significant differential expression of LncRNA in normal and squamous cell carcinoma groups

3 讨论

口腔癌是经过一系列组织病理学发展进程演变而来,病损因轻到重,最后发展为原位癌或口腔鳞状细胞癌^[25-26]。近年来,口腔鳞状细胞癌的发病者趋于年轻化,发病率不断上升^[27]。由于缺少针对性的早期筛查方法,就诊患者大多为晚期病人。因

此,寻找口腔鳞状细胞癌早期筛查与诊断预后的生物标记物成为近年来临床研究热点。长链非编码 RNA 是长度大于 200 bp 的非编码 RNA,不编码蛋白质,在生物体生长发育、生殖分化过程中发挥重要作用,是目前生物学与医学的热点研究领域^[28-29]。大量研究报道,LncRNA 在表观遗传与基因表达过程中扮演重要角色,参与细胞增殖、分化、

表 3 极显著差异 KEGG pathway 统计表
Table 3 KEGG pathway statistics of significant differences

KEGG 信号通路序列号 KEGG pathway ID	KEGG 信号通路名称 KEGG pathway name	P 值 P-value	靶基因富集数目 Target gene enrichment count
cge05412	ARVC 信号通路 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	0. 0000	25
cge04512	ECM-受体相互作用通路 ECM-receptor interaction	0. 0000	25
cge04510	粘着力信号通路 Focal adhesion	0. 0000	43
cge04060	细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路 Cytokine-cytokine receptor interaction	0. 0000	56
cge04640	造血细胞谱系信号通路 Hematopoietic cell lineage	0. 0000	24
cge05414	DCM 信号通路 Dilated cardiomyopathy (DCM)	0. 0000	24
cge04360	轴突指导信号通路 Axon guidance	0. 0000	43
cge04261	心肌细胞的肾上腺素信号传导通路 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0. 0002	31
cge04020	钙信号通路 Calcium signaling pathway	0. 0003	38
cge04668	TNF 信号通路 TNF signaling pathway	0. 0003	25
cge05410	HCM 信号通路 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0. 0005	21
cge00900	萜类骨架的生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	0. 0006	9

凋亡进程^[30-32]。LncRNA 与其靶 mRNA 的 3' 非翻译区部分序列通过互补配对的方式结合,调控靶 mRNA 的表达,导致多种肿瘤的发生,在一定程度上影响肿瘤细胞增殖,参与调控细胞病变与癌症恶化过程,在肿瘤增生及患者生存期不同的病理生理特点中发挥作用,表明 LncRNA 可能作为潜在的癌症诊断标记物^[33-34]。高通量 LncRNA 测序技术能在较短的时间内对大量 LncRNA 基因组信息进行分析,预测其可能具有的生物学功能,有利于加速新的肿瘤标记物的产生,推动肿瘤的临床研究与治疗。

大量临床数据表明,口腔癌患者体内异常表达的 LncRNA 参与调控肿瘤的发生发展^[35-36]。有研究者对人类第一个口腔黏膜及其癌前病变的 LncRNA 表达谱进行研究,结果表明在癌组织中超过 60% 的异常表达的 LncRNA 与口腔癌相关^[37]。孔祥盼等^[38] 研究指出 LncRNA *FOXCUT* 在口腔癌组织及鳞癌细胞中呈高表达状态,其表达下调后会抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、克隆与迁移。付丛等^[39] 研究表明,LncRNA *AFAP1-AS1* 在口腔鳞癌组织中相对表达水平是正常组织的 5.16 倍,并与肿瘤临床分期、分化与转移相关。刘速等^[40] 研究指出 LncRNA *MALAT1* 敲低表达后抑制癌细胞的迁移、侵

袭能力。Tang 等^[41] 检测了口腔鳞状细胞癌中 6 种常见的 LncRNA 的表达情况,结果表明癌组织与正常组织相比 *MALAT-1*、*HOTAIR*、*NEAT-1*、*HULC*、*UCA1* 的表达显著升高,*MEG-3* 表达水平显著降低。基于已有研究,推测 LncRNA 在口腔鳞状细胞癌的病变过程中发挥重要作用。因此,阐明新发现的 LncRNA 与已知的 LncRNA 在肿瘤形成过程中具有的生物学功能,将有助于癌症的早期诊断和预后治疗。目前,口腔鳞状细胞癌患者的组织样本较难获取,且耗时很长,严重阻碍了对其发病机制的研究。基于以上原因,本课题组在前期研究中采用化学诱导法成功建立中国地鼠口腔鳞状细胞癌动物模型,模拟人类口腔鳞状细胞癌发生的病变过程^[12-15]。该动物模型的建立可以在较短的时间内获得实验所需的口腔鳞状细胞癌组织样本,以弥补临床样本的不足。大量临床研究采用基因芯片技术对肿瘤组织样本中差异表达基因进行筛选,本研究则选用高通量 LncRNA 测序技术进行研究。与基因芯片技术相比,采用高通量测序技术筛选模型动物组织样本中 LncRNA 差异表达谱可发现一些新的 LncRNA,为揭示更多新发现的 LncRNA 在疾病中的作用调控机制提供数据基础。

本实验采用高通量 LncRNA 测序技术对中国地鼠口腔鳞状细胞癌组织样本与正常样本进行测序分析,揭示了 LncRNA 在两种组织样本中的差异表达,成功建立了中国地鼠口腔鳞状细胞癌相关的长链非编码 RNA 差异表达谱。采用聚类分析的方法对实验组与对照组差异表达基因进行研究,共筛选出 54 个显著差异表达的 LncRNA ($P < 0.05$)。对显著差异表达 LncRNA 的靶基因进行功能性分析发现,OSCC 相关的 GO 条目有 73 条,以 $P < 0.01$ 为条件,筛选出极显著富集的 GO 条目,8 条与生物过程相关,3 条与细胞位置相关。GO 功能分析表明,差异表达 LncRNA 的靶基因主要位于细胞外区域,参与调控参与调控硫酸酯、酰基辅酶 A、辅酶、辅因子、脂质代谢过程,调节细胞死亡、细胞黏附、组织发育及组织形态发生过程。此结果与先前的研究报道一致^[42-44]。KEGG 信号通路富集分析结果指出,差异表达 LncRNA 的靶基因主要参与调控 25 条信号通路 ($P < 0.05$),其中极显著富集的信号通路 12 条 ($P < 0.01$)。主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用信号通路、粘着力信号通路、轴突指导信号通路、钙信号通路和 TNF 信号通路。这些信号通路在其他癌症发生发展中的作用机制已有报道,但其在口腔鳞状细胞癌中的报道相对较少^[45-47]。因此,深入研究口腔鳞状细胞癌发生进程中的生物学功能变化与相关信号通路的作用机制,有利于更好的揭示口腔鳞状细胞癌的发病机制。

综上所述,本研究以中国地鼠为实验动物,利用其独特优势成功构建成功构建了符合口腔鳞状细胞癌病理生理过程的中国地鼠模型,实验操作简单,造模成功率高。应用此模型对口腔鳞状细胞癌进行基础研究,可为其临床治疗提供新思路。此外,本实验主要基于生物信息学技术对动物模型中差异表达 LncRNA 进行筛选,对其靶基因的功能进行预测,并未进行大量的实验验证,在接下来的研究中还有许多问题有待解决。因此,在下一步的研究中,将深入探讨测序结果筛选出的极显著差异表达 LncRNA 参与调控口腔鳞状细胞癌发生发展的具体调控机制,阐明其与靶基因的相互关系以及在口腔鳞状细胞癌相关的信号通路中发挥的作用,以期能为口腔鳞状细胞癌的癌前诊断与预后治疗提供新的肿瘤标记物。

注:中国地鼠 (*Cricetulus barabensis griseus*) 是仓鼠科仓鼠亚科动物,在公开出版物中使用仓鼠作为名称更为科学。

但鉴于目前我国实验动物国家标准中提到的动物的种类都是地鼠,作为专业人员能够清楚该物种在动物分类中地位,并不妨碍科学研究的成果和使用。中文名称后面的拉丁文不会对该研究的主体产生歧义,故本文在发表时仍沿用“中国地鼠”,待国标修订后再统一命名为“仓鼠”。

参考文献:

- [1] Zhang SK, Zheng R, Chen Q, et al. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 44-51.
- [2] Jornet PL, Garcia FG, Berdugo ML, et al. Mouth self-examination in a population at risk of oral cancer [J]. Aust Dent J, 2015, 60(1): 59-64.
- [3] Mortazavi H, Baharvand M, Mehdipour M. Oral Potentially Malignant Disorders: An Overview of More than 20 Entities [J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2014, 8(1): 6-14.
- [4] Adami GR, Adami AJ. Looking in the mouth for noninvasive gene expression-based methods to detect oral, oropharyngeal, and systemic cancer [J]. ISRN Oncol., 2013, 2012(7): 931301.
- [5] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159.
- [6] Clark MB, Mattick JS. Long noncoding RNAs in cell biology [J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(4): 366-376.
- [7] Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world [J]. Genes Dev, 2009, 23(13): 1494-1504.
- [8] Thomson DW, Dinger ME. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy [J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(5): 272-287.
- [9] 杨倩, 黄宏斌, 龚朝建, 等. lncRNAs 参与基因表达调控机制的研究进展 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(1): 91-95.
- [10] 李琪儿, 叶国梁, 郭俊明. LncRNA: 肿瘤分子诊断中的一颗新星 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(3): 233-240.
- [11] 薄家璐. 近交系中国地鼠的建立及应用 [J]. 医学研究通讯, 1994, 23(11): 20-21.
- [12] 皇甫冰, 庞文彪, 张锐虎, 等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察 [J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(1): 56-59, 65.
- [13] 皇甫冰. 基于高通量测序的中国地鼠颊囊鳞癌转录组差异表达研究 [D]. 山西医科大学, 2016.
- [14] 李莉红. 中国地鼠口腔颊囊癌中 microRNA 差异表达谱建立及其调控网络研究 [D]. 山西医科大学, 2018.
- [15] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊囊癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(02): 158-164.
- [16] 黄鑫, 古文鹏, 黎晓慧, 等. 基于 16S rRNA 测序对树鼩肠道菌群特征与高级别肉瘤的相关性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 11-16.
- [17] 徐锡文. 基于高通量测序的玉米基因组组装和水稻长非编码

- RNA 识别与分析 [D]. 华中农业大学, 2017.
- [18] Shizuka U. High-Throughput Methods to Detect Long Non-Coding RNAs [J]. High Throughput, 2017, 6(3): 12.
- [19] Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. BMC bioinformatics, 2011, 12(1): 323.
- [20] Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, et al. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor [J]. Nat Protoc, 2013, 8(9): 1765–1786.
- [21] Marconi M, Rodriguez-Romero J, Sesma A, et al. Bioinformatics Tools for Next-Generation RNA Sequencing Analysis [M]. Fungal RNA Biology, 2014, 371–391.
- [22] 张伟伟, 吴志强. 校正肿瘤纯度影响的差异表达基因分析 [J]. 东华理工大学学报(自然科学版), 2018, 41(03): 297–301.
- [23] Lee S, Suh Y. Lord's Wald Test for Detecting DIF in Multidimensional IRT Models: A Comparison of Two Estimation Approaches [J]. J Educ Meas, 2018, 55(2): 328–353.
- [24] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284–287.
- [25] Messadi DV. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions [J]. Int J Oral Sci, 2013, 5(2): 59–65.
- [26] Wang X, Li F, Zhou X. miR-204-5p regulates cell proliferation and metastasis through inhibiting CXCR4 expression in OSCC [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82: 202–207.
- [27] 王倩, 侯大为. 口腔鳞状细胞癌发病及转移机制研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2018, 34(11): 21–24.
- [28] Yin Q, Wu A, Liu M. Plasma Long Non-Coding RNA (lncRNA) GAS5 is a New Biomarker for Coronary Artery Disease [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 6042–6048.
- [29] 谭楠, 李莉红, 白璐, 等. 非小细胞肺癌血清中 Lnc RNA HOTAIR 的表达及临床意义 [J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(6): 402–406.
- [30] 胡洪林, 杨兰, 邓颖, 等. 非小细胞肺癌组织 LncRNA RP11-164P12.4 表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(16): 1148–1152.
- [31] 曾丽, 杨濡溪, 王佳, 等. 小细胞肺癌组织中 LncRNA EXOC7 的表达及其与预后的关系 [J]. 肿瘤, 2017, 37(03): 269–274.
- [32] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription [J]. Science, 2007, 316(5830): 1484–1488.
- [33] Nishiyama K, Maruyama R, Niinuma T, et al. Screening for long noncoding RNAs associated with oral squamous cell carcinoma reveals the potentially oncogenic actions of DLEU1 [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(8): 826.
- [34] 谢兆辉. 长非编码 RNA 在基因表达调节中的作用 [J]. 生命的化学, 2010, 30(3): 345–349.
- [35] 陈新, 徐文华, 周健, 等. 口腔鳞状细胞癌现状 [J]. 口腔医学, 2017, 37(5): 462–465.
- [36] King M, Chatelain K, Farris D, et al. Oral squamous cell carcinoma proliferative phenotype is modulated by proanthocyanidins: a potential prevention and treatment alternative for oral cancer [J]. BMC Complement Altern Med, 2007, 19(7): 22.
- [37] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Functional demarcation of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60770 full-length cDNAs [J]. Nature, 2002, 420(6915): 563–567.
- [38] 孔祥盼, 韩正学, 李华, 等. LncRNA FOXCUT 在口腔鳞状细胞癌中的表达及功能研究 [J]. 北京口腔医学, 2016, 24(5): 246–249.
- [39] 付丛, 张行炜. 长链非编码 RNA-AFAP1-AS1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 口腔医学研究, 2016, 32(9): 983–986.
- [40] 刘速, 周旋, 王晓非, 等. 长链非编码 RNA MALAT1 影响口腔鳞状细胞癌侵袭的实验研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(9): 460–465.
- [41] Tang H, Wu Z, Zhang J, et al. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3): 761–766.
- [42] 姜朋涛, 胡志芳, 高兴春, 等. p53 在调控 DNA 损伤所致 MDA-MB-231 细胞死亡中的作用及其机制 [J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(05): 349–353.
- [43] 俞殷珏, 赵林丰, 李荣. 中链酰基辅酶 A 脱氢酶增强乳腺癌细胞的侵袭和转移能力 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(06): 650–656.
- [44] 邵胜利, 杨熹, 徐丰. PIK3R3 通过 PPARA 调节肝癌细胞脂质代谢及增殖 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(02): 129–136.
- [45] 张筱茵. 胃癌病人体内肿瘤-机体免疫系统相互作用的实验研究-肿瘤局部细胞因子表达及 T 细胞受体池分析 [D]. 第四军医大学, 2001.
- [46] Stafman LL, Williams AP, Marayati R, et al. Focal Adhesion Kinase Inhibition Contributes to Tumor Cell Survival and Motility in Neuroblastoma Patient-Derived Xenografts [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13259.
- [47] Li X, Darby J, Lyons AB, et al. TNF May Negatively Regulate Phagocytosis of Devil Facial Tumour Disease Cells by Activated Macrophages [J]. Immunol Invest, 2019, 48(7): 1–13.

[收稿日期] 2019-09-17

韩璐,郭凯,郑瑜,等. 微泡介导超声空化联合自然杀伤细胞对兔肝 VX2 肿瘤热消融的增效作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 16-21.

Han L, Guo K, Zheng Y, et al. Microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with natural killer cells augmented microwave ablation of rabbit liver VX2 tumors [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 16-21.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 003

微泡介导超声空化联合自然杀伤细胞对兔肝 VX2 肿瘤热消融的增效作用

韩璐¹, 郭凯^{2,3*}, 郑瑜¹, 赵洁¹, 王晓武⁴, 郑静¹, 刘红岗³

(1. 西安市中心医院超声诊断科, 西安 710003; 2. 陕西省人民医院胸外科, 西安 710068; 3. 空军军医大学唐都医院胸腔外科, 西安 710038; 4. 空军军医大学西京医院心脏外科, 西安 710032)

【摘要】 目的 观察微泡介导超声空化联合自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞对兔肝 VX2 肿瘤热消融的增效研究。**方法** 40 只 VX2 肝移植瘤的荷瘤兔随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别给予不同干预: 微波热辐照消融组 (microwave ablation, MW), 超声空化辐照组 (cavitation, CA), NK 细胞注射组 (NK), 微波消融联合超声空化及 NK 细胞注射组 (MW+CA+NK) 和无辐照无注射空白对照组 (blank controll, BL)。分别给予不同干预: 微波热辐照、超声空化辐照、NK 细胞注射、微波热辐照联合超声空化辐照及 NK 细胞注射、无辐照无注射。并在治疗后 10 d, 分别行二维灰超声、超声造影评价术后各组肿瘤体积和最大径的变化, 超声造影评价术后各组血流变化。**结果** MW+CA+NK 组术后肿瘤体积及最大径明显小于其余各组 ($P<0.05$); 超声造影显示 MW+CA+NK 组术后血流明显减低 ($P<0.05$)。**结论** 微泡介导超声空化联合 NK 细胞可增强兔肝 VX2 肿瘤微波热消融效果。

【关键词】 NK 细胞; 微波消融; 空化效应; 肝肿瘤; 超声造影; 兔
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0016-06

Microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with natural killer cells augmented microwave ablation of rabbit liver VX2 tumors

HAN Lu¹, GUO Kai^{2,3,*}, ZHENG Yu¹, ZHAO Jie¹, WANG Xiaowu⁴, ZHENG Jing¹, LIU Honggang³
(1. Department of Ultrasound, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China. 2. Department of Thoracic Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068. 3. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038. 4. Department of Cardiac Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Objective To observe the exact effect of microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with natural killer (NK) cells on microwave ablation of rabbit liver VX2 tumors. **Methods** Forty rabbits with VX2 liver tumors were randomly divided into five groups (eight animals per group): microwave ablation (MW), ultrasonic cavitation (CA), NK cell injection (NK), microwave ablation plus ultrasonic cavitation and NK cell injection (MW+CA+NK), and

[基金项目] 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2019JQ-552)。
[作者简介] 韩璐 (1988—), 女, 硕士, 研究方向: 肝肿瘤超声造影及热消融技术。E-mail: 328424290@qq.com
[通信作者] 郭凯 (1988—), 男, 硕士, 研究方向: 肿瘤的微创与靶向治疗。E-mail: 543032475@qq.com

blank control (BL). Each group was administered their respective treatment intervention. Two-dimensional and contrast-enhanced ultrasound imaging techniques were used to evaluate changes in tumor volume and maximum diameter 10 days after treatment. Tumor blood flow was evaluated by contrast-enhanced ultrasound imaging after treatment. **Results** Tumor volume and maximum diameter of the MW+CA+NK group were both significantly reduced compared with other groups 10 days after treatment ($P < 0.05$). In addition, blood flow of the MW+CA+NK group was significantly decreased compared with the other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Microbubble-enhanced ultrasound cavitation combined with NK cell could significantly enhance the effects of microwave thermal ablation of rabbit liver VX2 tumors.

【Keywords】 natural killer (NK) cell; microwave ablation; cavitation effect; VX2 tumor; contrast-enhanced ultrasound imaging; rabbit

近年来,超声引导热消融技术在肝肿瘤的治疗中取得了良好的效果。它使肿瘤组织通过热效应产生凝固性坏死^[1]。但由于非均匀温场的出现,使局部治疗温度降低,造成局部肿瘤细胞存活^[2]。残留肿瘤细胞可在肿瘤内新生血管及炎性微环境的共同支持下重新增殖,成为热消融术后肝肿瘤复发的一个重要原因。因此,抑制热消融术后肿瘤炎性微环境及阻断肿瘤新生血管,对减少术后肿瘤细胞残余,降低肿瘤复发具有重要意义。

肿瘤组织的新生血管具有管壁薄弱等特点,对微泡介导的超声空化效应尤为敏感。空化效应不仅可以阻断微血管血供,而且可以减少肿瘤血管对热消融造成的“热沉降效应”^[3]。与此同时,NK细胞在抑制肿瘤炎性微环境中发挥着积极作用,同时可诱导肿瘤细胞的凋亡。而在原发性肝癌的发生、发展过程中普遍存在NK细胞数量减低、功能缺陷,亚型变化等改变^[4-5]。因此,本研究建立兔肝VX2肿瘤模型,旨在通过微波热消融、微泡介导超声空化联合NK细胞,提高热效应的同时,抑制肿瘤炎性微环境,达到减少肿瘤残余的目的。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级2~4月龄健康的新西兰大白兔40只,普通级3月龄VX2肿瘤的荷瘤兔1只(肿瘤已种植于兔腿部),均购自空军军医大学实验动物中心[SCXK(军)2017-0022],体重1.5~2.5 kg,雄性。实验兔饲养于空军军医大学实验动物中心普通环境[SYXK(陕)2017-0043],温度为20℃~25℃,相对湿度为60%~70%。本实验经过西安交通大学附属市中心医院医学伦理委员会的批准,批准号为2019XAKY-013。并根据3R原则对实验动物的使用和饲养给予人道关怀。将实验兔随机分为:微波

热辐照消融组(MW),超声空化辐照组(CA),NK细胞注射组(NK),微波消融联合超声空化及NK细胞注射组(MW+CA+NK)和无辐照无注射空白对照组(BL),每组8只。

1.2 主要试剂与仪器

CZ-960 A型高声压超声无创治疗仪(四川绵阳索尼克电子有限责任公司),治疗探头频率831KH,平均声强1.5 W/cm²,峰值负压4.6 MPa,占空比0.22%,采取交替治疗模式:工作6 s、间歇6 s。微波治疗仪ECO-100C(南京亿高微波系统工程有 限公司),工作频率为2430~2470 MHz,输出功率0~150 W可调节,采用A型治疗针头,针头长度为3 mm。超声成像仪器采用Mylab90(ESAOTE, Italy),L522探头,频率5~12 MHz。

超声造影剂采用SonVue(Bracco, Italy)微泡平均直径为2.5 μm。T75、T175细胞培养瓶,离心管,巴氏滴管及CO₂细胞培养箱、离心机均为美国赛默飞公司产品;倒置显微镜及Cell Counter model R1自动细胞计数仪均为日本Olympus公司产品;兔原代NK细胞、原代NK细胞基础培养基及原代NK细胞培养添加剂均购自上海通蔚生物科技有限公司。胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司,青霉素/链霉素购自美国Hyclone公司。

戊巴比妥钠(长春军需畜牧研究所),注射用青霉素钾(山东鲁抗医药股份有限公司),吸收性明胶海绵(金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔VX2肝肿瘤模型建立

在超声引导下,将2~3块3~5 mm³来自荷瘤兔的VX2肿瘤组织通过16G穿刺针种入兔肝内^[6]。采用二维超声于14 d后进行检测,兔肝内出现类圆形稍低回声区,为种植成功。

1.3.2 NK细胞扩增培养及细胞计数

兔原代NK细胞使用含10%胎牛血清,NK细胞

培养添加剂及青霉素/链霉素双抗的完全培养基,常规培养于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱。培养过程中每天对 NK 细胞观察,当细胞密度在 80%~90% 时进行传代,传代次数不超过 5 代。将细胞培养产物 1000 r/min 离心 5 min 去上清并用 PBS 重悬,使用 Cell Counter model R1 自动细胞计数,调整终浓度为 2.5×10⁶ 个/mL。

1.3.3 各组动物 VX2 肿瘤干预方法

将荷瘤兔经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠 (1 mL/kg) 麻醉固定后: MW 组: 超声引导下将微波针穿刺入肿瘤内实质区, 治疗功率 30 W, 采取治疗 1 min, 间歇 1 min, 同时使用超声治疗探头无空化辐照治疗 10 min; CA 组: 经兔耳缘持续泵入 8 mL, SonVue 0.8 mL/min, 同时使用超声治疗探头进行空化辐照治疗 10 min (Flash 模式, 功率 100%); NK 组: 经兔耳缘持续泵入 8 mL, NK 细胞悬液 0.8 mL/min, 同时使用超声治疗探头无空化辐照治疗 10 min; MW+CA+NK 组: 超声引导下将微波针穿刺入肿瘤实质区, 治疗功率 30 W, 采取治疗 1 min, 间歇 1 min; 经兔耳缘持续泵入 8 mL, SonVue 0.8 mL/min, 同时使用超声治疗探头进行空化辐照治疗 10 min (Flash 模式, 功率 100%); 生理盐水冲管后, 经兔耳缘持续泵入 8 mL, NK 细胞 0.8 mL/min, 同时使用超声治疗探头假空化辐照治疗 10 min。空白组: 不予任何处理。各实验组治疗后均肌注青霉素 2 mL。分别于术后 10 d 处死动物。

1.3.4 疗效评价

(1) 二维灰阶超声: 治疗前后, 观察肿瘤形态、位置, 分别测量左右径、上下径、前后径, 计算肿瘤体积 = $\pi/6 \times \text{左右径} \times \text{上下径} \times \text{前后径}$ 。

(2) 彩色多普勒血流成像 (Color Doppler Flow Imaging, CDFI) 和超声造影 (Contrast Enhanced Ultrasonography, CEUS): 治疗前后, 采用 CDFI 评价肿瘤内部血流分布, 分级: 0 级: 未见明显血流信号; I 级: 可见点状血流信号; II 级: 短棒状血流信号; III 级: 环状血流信号。CEUS 成像: 选取肿瘤最大切面, 固定探头, 经兔耳缘静脉以团注法注射 SonVue (0.2 mL/kg), 随之注射 2 mL 生理盐水冲管, 同时储存动态造影图像。采用 CEUS 评价治疗前后各组肿瘤内血流分布, 分级: 0 级: 无血流灌注; I 级: 内部点状血流灌注; II 级: 内部条状血流灌注; III 级: 内部片状血流灌注。观察各组术后造影图像, 截取肿瘤最大平面, 测量肿瘤最大径。

1.4 统计学方法

定量数据运用 SPSS 22.0 软件, 计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验前后肿瘤体积及最大径比较采用单因素方差分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验 (Chi-square), 以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔肝 VX2 肿瘤生长变化

2.1.1 二维灰阶超声观察结果

术前, 兔 VX2 肝癌表现为低回声结节 (图 2 A)。术前各组肿瘤体积无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 10 d 后 MW+CA+NK 组与其他组相比较, 肿瘤体积明显缩小 ($P < 0.05$, 图 1A)。MW 组、NK 组术后肿瘤体积均小于 BL 组 ($P < 0.05$, 图 1A)。CA 组与 BL 组术后体积无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.1.2 CEUS 测量结果

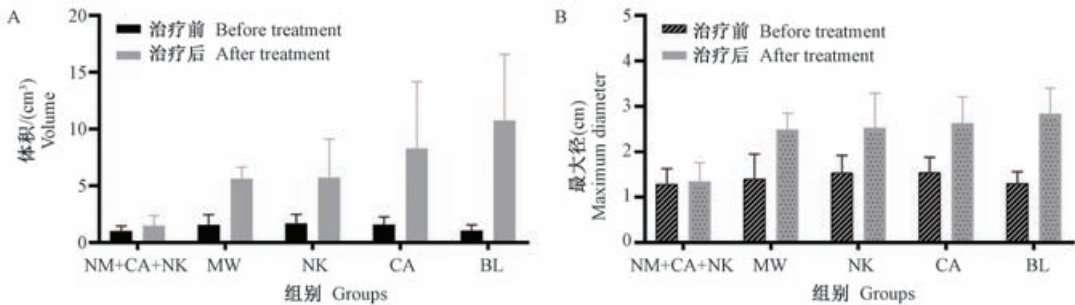
各组术前最大径分别为 MW+CA+NK 组 (1.29 ± 0.34) cm, MW 组 (1.41 ± 0.54) cm; NK 组 (1.54 ± 0.38) cm, CA 组 (1.55 ± 0.33) cm, BL 组 (1.31 ± 0.25) cm。术前各组最大径无统计学差异 ($P > 0.05$); 术后最大径分别为 MW+CA+NK 组 (1.35 ± 0.41) cm, MW 组 (2.49 ± 0.36) cm, NK 组 (2.53 ± 0.76) cm, CA 组 (2.63 ± 0.58) cm, BL 组 (2.84 ± 0.56) cm。MW+CA+NK 组术后最大径小于其他各组 ($P < 0.05$, 图 1B)。

2.2 CDFI 评价治疗后肿瘤血流

兔肝 VX2 肿瘤治疗超声图像如图 2 所示。采用 CDFI 观测治疗前各组肿瘤血流灌注, 均可见丰富的血流信号 (图 2C), 治疗前 CDFI 评估各组肿瘤血流灌注差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, MW+CA+NK 组 6 例肿瘤治疗区未见明显彩色血流信号, 2 例肿瘤在治疗区边缘发现点状残存血流 (图 2D); 经统计分析可见 MW+CA+NK 组术后血流明显减低, 具有显著统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 CEUS 评价治疗后肿瘤血流灌注

治疗前 CEUS 示各组兔肝肿瘤, 血流信号丰富, 成高灌注状态, 并且表现为肝肿瘤典型的“快进快出”征象。治疗前 CEUS 评估 5 组肿瘤血流灌注无统计学差异 ($P > 0.05$)。治疗后, 各组造影所示血流灌注分布 (表 1, 图 3), 经统计分析可见 MW+CA+NK 组术后血流明显减低, 具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。

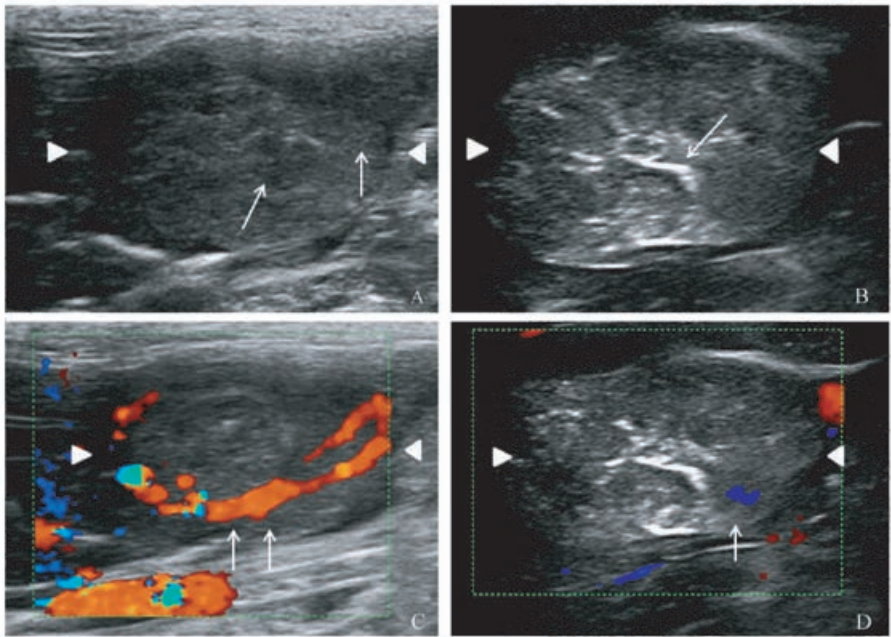


注:A:肿瘤体积;B:肿瘤最大径。

图 1 二维灰阶超声及 CEUS 测量兔 VX2 肝肿瘤术前及术后体积及最大径变化

Note. A, Tumor volume. B, Maximum tumor diameter.

Figure 1 Changes in volume and maximum diameter of rabbit VX2 liver tumors before and after treatment as measured by two-dimensional ultrasound and CEUS imaging techniques



注:A:治疗前,灰阶超声示肿瘤呈不均质低回声(箭头);B:治疗后,灰阶超声示消融区内片状分布粗大点状强回声(箭头);C:治疗前,CDFI 示肿瘤内环状血流信号(箭头);D:治疗后,CDFI 示消融区内血流信号消失,边缘可见残留点状血流信号(箭头)。

图 2 MW+CA+NK 组兔肝 VX2 肿瘤治疗超声图像

Note. A, Heterogeneous and hypoechoic echoes of tumors before treatment revealed by two-dimensional ultrasound (arrow). B, Rough punctate strong echoes in the ablation zone after treatment revealed by two-dimensional ultrasound (arrow). C, Annular blood flow signal in tumor before treatment as indicated by CDFI (arrow). D, Blood flow signal disappeared in the ablation zone, but residual points of blood flow signal were visible at the edge of the tumor after treatment as indicated by CDFI (arrow).

Figure 2 Ultrasound images of rabbit liver VX2 tumors in the MW+CA+NK group

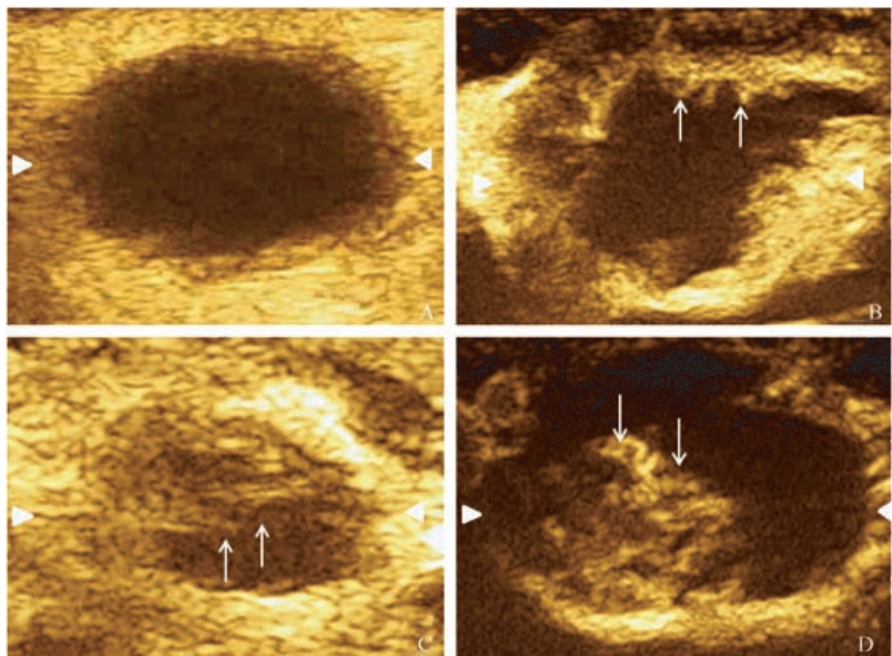
表 1 CDFI 及 CEUS 观察各组治疗后 VX2 肝肿瘤内血流分布特征

Table 1 Distribution of blood flow in VX2 liver tumors after treatment as assessed by CDFI and CEUS

组别 Groups	CDFI				CEUS			
	0 级	I 级	II 级	III 级	0 级	I 级	II 级	III 级
	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III	Grade 0	Grade I	Grade II	Grade III
MW+CA+NK	6	2	0	0	7	1	0	0
MW *	0	1	4	3	0	1	5	2
NK *	0	1	2	5	0	0	3	5
CA *	0	0	4	4	0	0	5	3
BL *	0	0	1	7	0	0	0	8

注:结果以肿瘤个数表示。与同一时间段 MW+CA+NK 组相比, * $P<0.05$ 。

Note. Results are expressed as the number of tumors. Compared with the MW+CA+NK group in the same time period, * $P<0.05$.



注:A;MW+CA+NK 组治疗区域无明显血流灌注;B;MW 组治疗区域周边可见少许“点状”血流灌注(箭头);C;NK 组治疗区域可见肿瘤中心部位有“条状”血流灌注(箭头);D;BL 组治疗区域可见肿瘤内部有“片状”血流灌注(箭头)。

图 3 CEUS 评价治疗前后肿瘤治疗区域血流灌注图

Note. A, No obvious blood perfusion was observed in the treatment area of the MW+CA+NK group. B, A few “dot-like” signals indicating blood perfusion in treatment areas (arrow) of the MW group; C, “Stripe-like” blood perfusion (arrow) in the center of the tumor treatment area in the NK group. D, “Slice-like” blood perfusion was observed in the tumor treatment area (arrow) of the BL group.

Figure 3 Tumor blood perfusion before and after treatment as evaluated by CEUS

3 讨论

目前超声引导下热消融治疗已被临床广泛认可,但受肿瘤大小、位置等因素影响,常导致消融不彻底、肿瘤易复发等不良后果。残留肿瘤细胞必须在其赖以生存的“土壤”-肿瘤微环境支持下生长发展。其中,由炎性细胞和促炎因子网络组成的炎性微环境发挥着重要作用。肿瘤微环境是一个由多种异形细胞相互作用而形成的复杂综合系统,对肿瘤发生发展起到了诱导,转化,支持和促进作用。巨噬细胞广泛参与机体炎症反应,与炎性微环境和肿瘤发生发展都有密切关系,通过分泌表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、血小板衍生因子和 TGF-β 等细胞因子促进肿瘤细胞增殖和存活,并能提供促血管生成微环境^[7]。Granot 研究证实^[8]:肿瘤微环境活化的 NK 细胞能刺激巨噬细胞的 MHC-Ⅱ(major histocompatibility complex class Ⅱ)表达,促使肿瘤相关巨噬细胞 M2 型向 M1 型转化,增加抗肿瘤相关巨噬细胞 M1 型的数量。同时,活化

的 NK 细胞分泌 IFN-γ(interferon-γ),IFN-γ 进一步诱导巨噬细胞 MHC-Ⅱ 表达,逆转肿瘤微环境的免疫抑制情况^[9-10]。在原发性肝癌疾病中 NK 细胞的数量减少,亚型也发生变化,提示 NK 细胞的功能缺陷与肝癌的进展密切相关^[11-12]。超声造影剂进入血液后在超声脉冲作用下可成为有效的空化核,诱导超声空化,引起邻近细胞及组织的损伤,同时微泡爆破能够使局部毛细血管和细胞膜通透性增高^[13]。本研究通过建立兔 VX2 肝肿瘤模型,微波消融肝肿瘤同时通过超声靶向辐照微泡爆破增加血管内皮系统通透性,并阻断肿瘤组织的新生血管^[14]。将 NK 细胞输送至肝,提高肝组织局部 NK 细胞数量,改善 NK 细胞亚型的比例失衡;并采用局部超声空化,使 NK 细胞能够更快进入癌巢中心,通过调节肝内炎性微环境,逆转肿瘤微环境的免疫抑制,最终减少消融后残留。国内研究发现,微波消融可增强原发性肝癌患者的细胞免疫功能,促使患者外周血 NK 细胞,IFN-γ、TNF-α 等水平较治疗前显著提高^[15]。黄庆生等提出 NK 细胞在抗病毒、抗

肿瘤上扮演着重要的角色,因其作用不需初次免疫活化,因而在过继免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)上有其独特的应用前景。但由于不能获得数量大、纯度高的 NK 细胞,使 NK 细胞在免疫治疗中的应用受到了限制^[16-17]。本研究结果发现治疗后 NK 组体积较 BL 组减小 1.9 倍,CA 组体积较 BL 组减小 1.3 倍,MW+CA+NK 组体积较 BL 组明显减小 7.2 倍。说明通过 ACI 疗法增加 NK 细胞数量及纯度可抑制肿瘤增长;而单纯的微泡介导的空化效应可以阻断肿瘤新生血管,局部形成微血栓等功效限制肿瘤的生长;而将微波消融联合微泡介导的空化效,同时给予 NK 细胞 ACI 治疗后,达到了热效应、生物效应与免疫效应多重治疗方法联合作用于肝肿瘤,发挥各自优势,有效抑制肿瘤生长。

本研究采用 CEUS 测量的肿瘤最大径与灰阶超声测量肿瘤体积结果相同,MW+CA+NK 组体积及最大径较其他各组减低。超声造影剂走形于血管腔内,不进入组织细胞间隙^[18-19],可对坏死组织与正常组织明显分界,使结果更为精确,两种评估模式均证实 MW+CA+NK 组可有效抑制肿瘤生长。

通过 CEUS 评价治疗后各组血流灌注结果,可见 MW+CA+NK 组较各实验组血流明显减低。其余各组在治疗后均出现了 3 例以上的“条状”、“片状”血流灌注;MW+CA+NK 组在治疗后仅出现 1 例“点状”血流灌注,其余 7 例均无明显血流灌注。说明 MW+CA+NK 组可有效减少了肿瘤的残余。在显示血流灌注方面,CDFI 和 CEUS 均可显示残余肿瘤内部的血流状况,但热消融治疗后存在气化现象,并且受肿瘤位置及血流速的影响,CDFI 对检测术后残余肿瘤组织的血流灌注敏感性较低^[20]。CEUS 对血流灌注较为敏感,可显示热消融治疗后残余肿瘤组织中血流灌注程度及位置,因此 CEUS 对于术后评估残余肿瘤更为准确。

综上所述,本研究建立兔肝 VX2 肿瘤模型,采用微波消融、微泡介导超声空化联合 NK 细胞的治疗方式,有效抑制兔 VX2 肿瘤生长,减少肿瘤残余。并对肿瘤生长微环境实施干预,为减少热消融后肿瘤残留提供新策略,为提高热消融疗效寻找新思路。

参考文献:

[1] Ahmed M, Goldberg SN. Basic science research in thermal ablation[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2011, 20 (2):237-258.
[2] Bhardwaj N, Dormer J, Ahmad F, et al. Microwave ablation of

the liver: a description of lesion evolution over time and an investigation of the heat sink effect[J]. Pathology, 2011, 43 (7):725-731.
[3] Luo W, Zhou X, Ren X, et al. Enhancing effects of SonoVue a microbubble sonographic contrast agent, on high-intensity focused ultrasound ablation in rabbit livers in vivo [J]. Ultrasound Med, 2007, 26(4):469-476.
[4] Sun C, Sun HY, Xiao WH, et al. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell based immunotherapy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015,36 (10):1191-1199.
[5] Lim O, Jung MY, Hwang YK, et al. Present and future of allogeneic natural killer cell therapy[J]. Front Immunol, 2015, 6(286):1-8.
[6] Luo W, Zhou X, Yu M, et al. Ablation of high-intensity focused ultrasound assisted with SonoVue on Rabbit VX2 liver tumors: sequential findings with histopathology, immunohistochemistry, and enzyme histochemistry[J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(4):2359-2368.
[7] 李晓曦,郭宁,曹雪涛. 肿瘤相关巨噬细胞促进肿瘤生长与转移的研究现状[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(1):788-781.
[8] Granot T, Venticinque L, Tseng JC, et al. Activation of cytotoxic and Regulatory Functions of NK cells by sindbis viral vectors[J]. PLoS One, 6(6):e20598.
[9] 张金岭,殷忠美,李宝生. 肝内 NK 细胞抗肿瘤机制的研究进展[J].中华肿瘤防治杂志,2013,20(13):1038-1042.
[10] 王文秀,习佳飞,赵月,等. NK 细胞对人肝癌细胞的杀伤作用及其可能机制[J]. 军事医学,2017,9(41):775-783.
[11] Sun C, Sun HY, Xiao WH, et al. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell based immunotherapy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015,36(10):1191-1199.
[12] Lim O, Jung MY, Hwang YK, et al. Present and future of allogeneic natural killer cell therapy[J].Front Immunol,2015,6 (286):1-8.
[13] OHL C D, ARORA M, IKINK R, et al. Sonoporation from jetting cavitation bubbles[J]. Biophys J,2006,91 (11):4285-4295.
[14] Miller MW, Everbach EC, Cox C, Knapp RR, et al. A comparison of the hemolytic potential of optison and Albunex in whole human blood in vitro: acoustic pressure, ultrasound frequency, donor and passive cavitation detection considerations [J]. Ultrasound Med Biol, 2001, 27(5):709-721.
[15] 王凯. 微波消融对原发性肝癌患者免疫功能的影响[D].青岛大学,2017.
[16] Klingemann HG. Natural killer cell-based immunotherapeutic strategies[J]. Cytotherapy, 2005,7(1):16-22.
[17] 黄庆生,李琦,黄勇,等. 人 NK 细胞体外高效扩增的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24 (12):1167-1173.
[18] Feril LB Jr, Tachibana K. Use of ultrasound in drug delivery systems: Emphasis on experimental methodology and mechanisms [J]. Int J Hyperthermia, 2012, 28(4):282-289.
[19] 夏祯,金利芳,杜联芳.CEUS 定量分析在肾脏肿瘤诊断中的应用[J].中国医学影像技术,2018,34(4):629-632.
[20] 李松英,张织英,洪德飞.激光局部热凝固肝组织的动态病理学研究[J].浙江医学,2005,27(5):337-340.

孙振宇,武鸿彪,刘宁,等. 小鼠原发性肝癌模型的建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 22-27.
Sun ZY, Wu HB, Liu N, et al. Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 22-27.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 004

小鼠原发性肝癌模型的建立与优化

孙振宇^{1,2},武鸿彪¹,刘 宁³,徐胤淇²,周 健²,陈雪健²,王 伟²,
徐力善²,袁旦平^{1*}

(1.宁波市第一医院,浙江 宁波 315000; 2.哈尔滨医科大学附属第四医院,哈尔滨 150001; 3.军事科学院军事医学研究院生物工程研究所,北京 100850)

【摘要】 目的 使用三种造模方法以建立小鼠的原发性肝癌模型,并比较各自的优缺点。**方法** 将 80 只 14~16 日龄的 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组(低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组、对照组);低剂量 DEN 组小鼠腹腔注射浓度为 25 mg/kg 的二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)染毒;高剂量 DEN 组小鼠腹腔注射浓度为 40 mg/kg 的 DEN 染毒;DEN+CCl₄ 组小鼠腹腔注射 2 mg/kg 的 DEN 染毒,两周后按 20%浓度的四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)按 5 mL/kg 剂量腹腔注射小鼠,每周给药 2 次共 16 周;对照组不予任何处理。统计各组小鼠的生存情况,各组小鼠在造模的第 24 周集中麻醉断颈处死后剖取肝,比较各组间肝的外观、肿瘤的数目及肿瘤的发生率,并检测血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、高尔基体跨膜糖蛋白 73(Golgi protein 73, GP73)以及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)的水平。**结果** 与对照组相比,三个实验组的 ALT($P<0.001$)、AST($P<0.001$)、GP73($P<0.001$)、AFP($P<0.01$)、肿瘤发生率($P<0.001$)和肿瘤数目显著增加($P<0.001$)。截止造模后的 24 周,低剂量 DEN 组小鼠死亡率为 15%,肝癌发生率为 35%;高剂量 DEN 组小鼠死亡率为 30%,肝癌发生率为 86%;DEN+CCl₄ 组小鼠死亡率为 20%,肝癌发生率为 56%;对照组小鼠全部存活且肝未发现异常。**结论** 各实验组的造模方法均可以成功进行小鼠肝癌造模,但高剂量 DEN 组表现出了明显的优势,它可以在短时间内成功的建立起高发生率且稳定的小鼠原发性肝癌模型,为小鼠肝癌造模提供了新的途径。

【关键词】 原发性肝癌;小鼠模型;二乙基亚硝胺;四氯化碳;化学诱导法
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0022-06

Establishment and optimization of a mouse model of primary liver cancer

SUN Zhenyu^{1,2}, WU Hongbiao¹, LIU Ning³, XU Yinqi², ZHOU Jian², CHEN Xuejian², WANG Wei²,
XU Lishan², YUAN Danping^{1*}

(1. Ningbo First Hospital, Ningbo 315000, China. 2. The Fourth Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin 150001. 3. Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

【Abstract】 Objective To establish a model of primary liver cancer in mice using three method, and to compare their advantages and disadvantages. **Methods** Eighty male C57BL/6 mice aged 14 - 16 days were randomly divided into four groups: control, low-dose diethylnitrosamine (DEN), high-dose DEN, and DEN + carbon tetrachloride (CCl₄). Mice

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31670761)。
[作者简介] 孙振宇(1993—),男,医学硕士,住院医师。E-mail: 1105519047@qq.com
[通信作者] 袁旦平(1964—),男,教授,主任医师。E-mail: yuandanping1964@163.com

in the DEN+CCl₄ group were intraperitoneally injected with 2 mg/kg DEN, and then two weeks later CCl₄ (5 mL/kg, 20%) was intraperitoneally injected twice a week for 16 weeks. The control group was not administered any treatment. Mice in the low-dose DEN group were injected intraperitoneally with 25 mg/kg DEN, while mice in the high-dose DEN group were intraperitoneally injected with 40 mg/kg DEN. Survival curves were generated for mice in each group. Twenty-four weeks after establishing the model, mice in each group were anesthetized and sacrificed, and the liver was dissected. The appearance of liver, incidence of tumors, number of tumors, and serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), Golgi protein 73 (GP73), alpha fetoprotein (AFP) were measured. **Results** Compared with the control group, ALT ($P < 0.001$), AST ($P < 0.001$), GP73 ($P < 0.001$), AFP ($P < 0.01$), tumor incidence ($P < 0.001$), and tumor number in the three groups were significantly increased ($P < 0.001$). By 24 weeks after modeling, three mice in the low-dose DEN group had died, while six out of the 17 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence of 35%. In the high-dose DEN group, six mice died and 12 out of the 14 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence rate of 86%. In the DEN+CCl₄ group, four mice died and 9 out of the 16 surviving mice developed liver cancer, **Results** ing in an incidence rate of 56%. All mice in the control group survived and no liver abnormalities were observed. **Conclusions** The liver cancer mouse model was successfully established in all experimental groups, but the high-dose DEN group exhibited obvious advantages with regard to successful establishment of a primary liver cancer model with high incidence and stability in a short period of time. Our result provide a new method for the establishment of a liver cancer model in mice.

【Keywords】 primary liver cancer; mouse model; diethylnitrosamine; carbon tetrachloride; chemical induction

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 为肝的原发恶性肿瘤, 每年全世界上有超过 50 多万人被诊断为 HCC^[1-2], HCC 是由一系列相关病毒感染以及其他相关因素, 诸如高度酒精、糖尿病及其并发症和黄曲霉毒素暴露等引起的慢性疾病进展而来^[3-4]。HCC 的发生与发展是一个多步骤多因素的过程, 其中涉及到多种基因蛋白, 这些基因蛋白包括 p53 和 b-连环蛋白等等^[5], 它们与细胞的增殖、细胞周期的进程, 以及细胞的凋亡与侵袭有着极其密切的相关性。受到生长因子调节的信号通路^[6], 细胞分化相关通路和血管生成诱导的信号通路也可以促进 HCC 的发生与发展。另外, 相关基因的改变也可以导致 HCC 的发生。二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是一种具备高度遗传毒性的致癌物质, 研究人员通过比较基因组学分析之后得知 DEN 所诱导的肝癌模型中的基因表达与人类肝细胞癌的患者肝组织类似^[7]。研究表明 DEN 在小鼠的体内最终可以转化成为烷基化代谢物, 此代谢物可以导致 DNA 加合物的形成, 随后转化成中间体, 促使了甲基化, DEN 的成瘤过程中最关键的是由于 DNA 中的 O6 与 N-7 甲基鸟嘌呤的形成, 使得遗传信息的改变, 形成启动致癌的细胞^[8]。合理有效的建立原发性肝癌动物模型是研究肝细胞癌发生发展及致病机制的重中之重, 目前常用的肝癌动物模型通常选用小鼠 (BALB/c、C57BL/6、ICR), 目前诱导小鼠肝癌常用化学诱导法, 采用 DEN 溶液或

DEN 与 CCl₄ 联用对小鼠腹腔注射进行肝癌建模, 此方法经济节约, 操作简便, 稳定性高, 可以避免因小鼠个体差异带来的误差, 较好的模拟了肝癌在人体中自然形成过程。而目前腹腔注射法存在诱癌时间较长的缺点。本文旨在较短的时间内, 成功建立小鼠肝癌模型, 在此基础上衡量各自的优缺点, 克服难点, 更精准更合理的进行小鼠肝癌造模, 为研究肝癌的发生与发展奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 80 只, 14~16 日龄, 体重约为 4 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2016-0011]。饲养于军事科学院军事医学研究院生物工程研究所实验动物中心 [SYXK (军) 2016-0010], 恒温恒湿, 湿度 (60±5)%, 温度 24℃, 光照遵循昼夜节律, 每笼饲养 5 只 C57BL/6 小鼠。本实验通过哈尔滨医科大学实验动物中心和实验动物伦理委员会批准 (110052018016), 并且严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义的关怀照顾。

1.2 主要试剂与仪器

二乙基亚硝胺 (DEN, Sigma 公司); 四氯化碳 (CCl₄, Sigma 公司); 甲胎蛋白 (AFP) 与高尔基体蛋白 73 (GP73) ELISA 试剂盒 (北京热景生物技术股份有限公司)。全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); -80℃ 冰箱 (海尔公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验小鼠的分组及造模

将实验小鼠随机分为 4 组,每组 20 只,分别命名为低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组、对照组,随后分笼饲养。低剂量 DEN 组腹腔注射 DEN(25 mg/kg)。高剂量 DEN 组腹腔注射 DEN(40 mg/kg)。DEN+CCl₄ 组腹腔注射 DEN(2 mg/kg),两周后腹腔注射 CCl₄(5 mL/kg,20%),每周给药 2 次共 16 周。对照组不予染毒处理,饲养环境及饮食饮水与实验组保持一致。在造模的第 24 周集中麻醉断颈法处死各组小鼠,剖开腹腔,取得肝样本拍照,将部分肝组织冻存于-80℃ 冰箱中备用,比较各组间肝的外观,肿瘤的发生率,及肿瘤的大小与面积占比。

1.3.2 各组实验小鼠的存活状态及存活时间的观察

各组小鼠造模后观察小鼠的存活情况,如有小鼠死亡,则详细记录死亡时间,绘制存活曲线,比较各组差异。

1.3.3 小鼠血清 ALT 和 AST 的检测

在造模的第 24 周集中麻醉断颈法处死各组小鼠,收集血液标本并置于 37℃ 温箱放置 30 min。随后将收集的小鼠血液 2000 r/min 离心 10 min 以收集足量的血清,分别取 100 μL 小鼠血清放入 EP 管中注明各组组别并送至北京武警总医院生化分析室,使用全自动生化分析仪检测。

1.3.4 小鼠血清 GP73、AFP 的检测

按照 1.3.3 方法取得足量小鼠血清,使用鼠源 GP73、AFP 的 ELISA 试剂盒,体外定量检测鼠血清中 GP73、AFP 的表达水平(酶联免疫吸附技术)。具体的操作方法严格遵循试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学方法

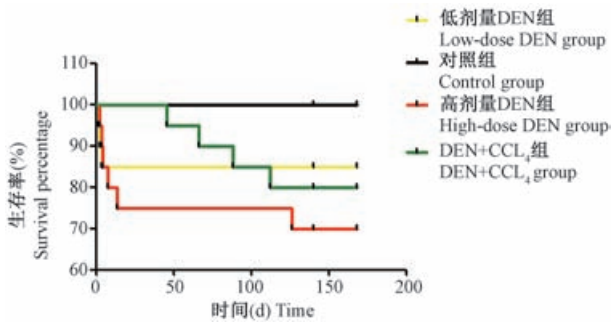
实验室数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,其中生存曲线使用 Log-rank 检验进行分析;计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均使用 *t* 检验进行分析;计数资料均使用卡方检验进行分析。以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的生存曲线统计与分析

生存曲线的统计时间为 24 周,从造模开始直至第 24 周造模结束。由图 1 可知低剂量 DEN 组与高剂量 DEN 组小鼠 DEN 染毒后造模开始的 1 周内死

亡率较高,第 2 周直至第 24 周两组小鼠几乎无死亡,而 DEN+CCl₄ 组小鼠在造模初期无死亡,直至造模第 4 周后开始呈现出较高的死亡率(*P*<0.001)。



注:各组小鼠的存活曲线比较。

图 1 各组小鼠的存活曲线

Note. Comparison of survival curves of mice in each group.

Figure 1 Survival curves of mice in each group

2.2 各组小鼠肝样本肉眼观察

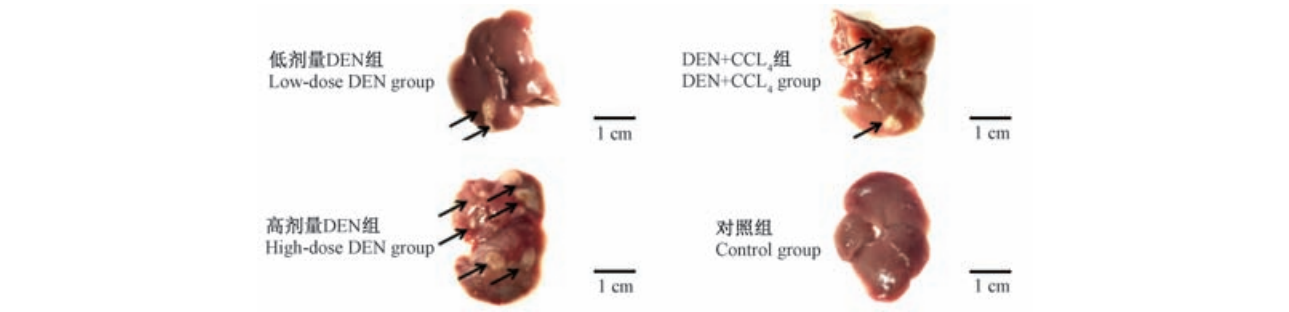
在造模过程中,低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组小鼠均出现食欲不振、体重下降、精神萎靡、退毛等等非正常现象,而对照组的小鼠精神状态良好,毛发光亮,食欲佳。在造模的第 24 周集中麻醉断颈处死小鼠,取得肝样本并拍照,由图 2 所示,高浓度 DEN 组小鼠的肝整体可见大面积坏死,水肿,肉眼可见大量的癌结节。低浓度 DEN 组与 DEN+CCl₄ 组小鼠肝的表面较为光滑,癌结节的数量少于高剂量 DEN 组。

2.3 各组小鼠的肿瘤数目及肿瘤发生率的比较

取得各组小鼠肝样本后对肝的肿瘤数目及发生率进行分析,如图 3 所示,对照组小鼠肝无肿瘤生长,肝癌发生率为 0%,低剂量 DEN 组小鼠肝肉眼可见 9 处肿瘤,肝癌发生率为 35%,高剂量 DEN 组小鼠肝肉眼可见 9 处肿瘤,肝癌发生率为 86%,DEN+CCl₄ 组小鼠肝肉眼可见 20 处肿瘤,肝癌发生率为 56%。

2.4 各组小鼠血清 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平

在造模的第 24 周处死各组小鼠取得血清标本后分别对小鼠血清 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平进行检测。如表 1 所示,低剂量 DEN 组、高剂量 DEN 组、DEN+CCl₄ 组小鼠的血清 ALT、AST、AFP、GP73 表达水平显著高于对照组(*P*<0.001)。ALT 与 AST 可以反映出肝的炎性损伤程度,AFP 与 GP73 是肝癌的肿瘤标记物,其数值明显高于对照组均可反映出肝癌造模成功。值得注意的是 GP73 在高剂量 DEN 组小鼠的血清表达水平升高得更为明显。

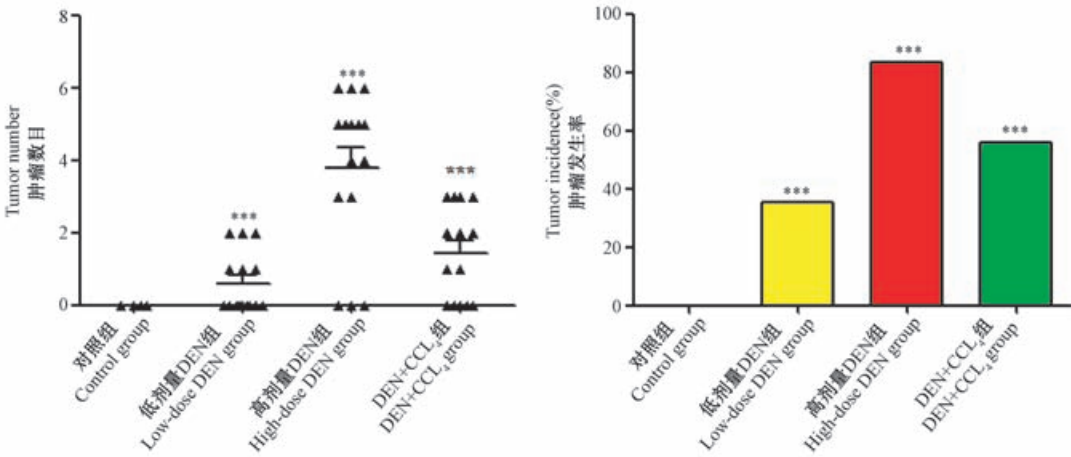


注:箭头表示肿瘤之所在。

图 2 各组小鼠造模后 24 周的肝样本肉眼观察

Note. Arrows indicate the location of the tumor.

Figure 2 Visual observation of liver specimens of the mice in each group at 24 weeks after modeling



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 各组小鼠肿瘤数目及肿瘤发生率

Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Number of tumors and tumor incidence in each group of mice

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST、AFP、GP73 的表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 1 Serum expression levels of ALT, AST, AFP, and GP73 in each group of mice

组别 Groups	ALT(U/L)	AST(U/L)	AFP(ng/mL)	GP73(ng/ml)
对照组 Control group	11.32±1.92	7.15±2.30	0.72±0.20	4.10±1.06
低剂量 DEN 组 Low-dose DEN group	43.30±1.61 ***	44.42±2.01 ***	6.04±0.53 **	137.30±14.64 ***
高剂量 DEN 组 High-dose DEN group	60.06±5.25 ***	71.64±6.20 ***	6.61±0.44 **	205.52±9.71 ***
DEN + CCl ₄ 组 DEN + CCl ₄ group	39.63±5.94 ***	43.55±1.67 ***	4.52±0.49 **	103.51±15.07 ***

注:与对照组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3 讨论

肝细胞癌的发生与发展是一个多步骤、多因素

的进程^[9]。在肝细胞癌中,可以观察到急、慢性肝损伤,肝的炎性病变,肝细胞的变性、再生、坏死等等与小细胞形态学相关的肿瘤癌前病变^[10]。肝细胞癌的发病率往往表现出与区域性和种族相关的

差异^[11]。一些 DNA 损伤性化学物质与细胞毒性物质被认为是肝细胞癌发生的根本原因,诸如二乙基亚硝胺(DEN),四氯化碳(CCl_4),全氟化学品,全氟辛酸,苯并芘,丙烯酰胺,膳食污染物等等^[12-14]。进行肝细胞癌的研究,建立稳定有效的动物模型是必不可少的,也是肝癌的发生发展研究的基本必要条件之一。

目前建立小鼠的肝癌模型以化学诱导法多见,其中又以二乙基亚硝胺(DEN)与四氯化碳(CCl_4)为主要的诱癌剂。使用化学诱导法造模大多选择用两周龄小鼠^[15-16],有研究指出,幼鼠的肝组织极易发生癌变,而且酶的活性会随着小鼠年龄增长,大概在 1~2 周时达峰值^[17]。由于化学诱导法建立小鼠原发性肝癌模型的时间多为 24~48 周^[18-19],故选用建模后第 24 周集中处死各组小鼠。本实验选用两种不同浓度的 DEN(25 mg/kg, 40 mg/kg)以及 DEN 与 CCl_4 联合应用进行小鼠原发性肝癌造模。DEN 与 CCl_4 联合应用的方法需每间隔一段时间进行 CCl_4 的注射,这使得造模过程过于繁琐,每一次对实验动物的注射无法保证绝对相同的剂量和与上次注射相近的实验环境。此法最终虽可成功建立小鼠原发性肝癌模型,但是肝细胞癌的形成是一个动态且持续的过程,不断的施加干扰措施会影响到小鼠肝细胞癌形成过程中的诸多指标,尤其对需要持续的进行称重、监测生存曲线、检测血清各项生化指标的动态变化实验尤为不利,加大了不稳定因素的干扰,往往使实验结果不够理想。

单独使用 DEN 建模可成功的建立肝癌模型,但是在剂量上始终没有明确的统一规定^[20],通过本实验结果可知高剂量 DEN 组(40 mg/kg)于 24 周时成瘤率可达 86%,而低剂量 DEN 组与 DEN+ CCl_4 组于 24 周的成瘤率分别为 35%与 56%,结果表明高剂量的 DEN(40 mg/kg)可以更快更稳定的建立小鼠原发性肝癌的模型。前文数据可知本次实验高剂量 DEN 组小鼠死亡率达 30%,由于 DEN 本身的急性肝毒性较大,对于幼鼠在造模的早期易使其夭折并可致更高的死亡率,故采取本法需要准备足量的小鼠进行造模,最大限度的减少由于造模初期存在的高死亡率所造成的实验误差。单独使用 DEN 并在 25 mg/kg 的基础上增加剂量到 40 mg/kg 建立小鼠肝癌模型,此法虽有不足之处,但是其优势较低剂量 DEN(25 mg/kg)与 DEN+ CCl_4 联合使用更加突出,主要在于更快速的建立小鼠原发性肝癌模型,

大幅度的缩短了实验时间,一次注射之后避免了后续的再次注射染毒操作,使得实验难度降低的同时也使得模型建立的过程比较平稳,无过多的外界干扰因素,尤其是对于需要进行在造模过程中动态监测小鼠血清生化指标的实验极具优势,可以最大限度的避免实验误差,使得实验结果更为理想。有研究认为 GP73 是肝癌最有价值的标志之一,并通过多种途径参与肝癌的发展^[21]。GP73 也在胆囊癌,胰腺癌,肺癌,膀胱癌和其他癌症中高表达,GP73 的高表达和预后不良与种种恶性生物学行为(如肿瘤大小、侵袭、迁移)密切相关^[22-24]。由此可知 GP73 相对于 AFP 具有更高的敏感性,对于肝癌手术的预后的评估,GP73 也表达出更精准的可靠性^[25]。因此,本实验检测了小鼠血清 GP73 的表达水平,值得注意的是,高剂量(40 mg/kg)DEN 组的小鼠血清 GP73 的升高水平尤为明显,这也间接的反映出了高剂量(40 mg/kg)DEN 建立的小鼠原发性肝癌模型更具说服力。

综上,高剂量(40 mg/kg)DEN 建立小鼠原发性肝癌模型简单易行,造模时间短,肿瘤发生率及肝癌的严重程度更高,这为进一步研究肝癌的发生与发展提供了更为合理有效的动物模型。

参考文献:

- [1] Akira A, Yusuke T, Hideko O, et al. Host antitumor resistance improved by the macrophage polarization in a chimera model of patients with HCC [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(4): e1299301.
- [2] Demetrios M, Amir A R, Zhang XF, et al. Program death-1 immune checkpoint and tumor microenvironment in malignant liver tumors [J]. *Surg Oncol*, 2017, 26(4): 423-430.
- [3] Wang S, Zhang HJ, Wang H, et al. A novel multidimensional signature predicts prognosis in hepatocellular carcinoma patients [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11610-11619.
- [4] Lee MS, Haeyong K, Yun MJ, et al. Cancer metabolism as a mechanism of treatment resistance and potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *Yonsei Med J*, 2018, 59(10): 1143-1149.
- [5] Barbara S, Deike S, Miriam S, et al. Improvement of clinical management and outcome in hepatocellular carcinoma nowadays compared with historical cohorts [J]. *Eur J Gastroen Hepat*, 2018, 30(12): 1422-1427.
- [6] Wu DD, Liu SY, Gao YR, et al. Tumour necrosis factor- α -induced protein 8-like 2 is a novel regulator of proliferation migration and invasion in human rectal adenocarcinoma cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(3): 1698-1713.
- [7] Zhao Z, Zhong L, He K, et al. Cholesterol attenuated the

- progression of DEN-induced hepatocellular carcinoma via inhibiting SCAP mediated fatty acid de novo synthesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(4): 855–861.
- [8] Sharma V, Janmeda P, Paliwal R, et al. Antihepatotoxic activity of *Euphorbia nerifolia* extract against *N*-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice [J]. J Chin Integr Med, 2012, 10(11): 1303–1309.
- [9] Berasain C. Hepatocellular carcinoma and sorafenib: too many resistance mechanisms [J]. Gut, 2013, 62(12): 1674–1675.
- [10] Fabio B, Gaya S, Matthew M, et al. Surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with cirrhosis: Impact of lymphadenectomy on Peri-operative outcomes [J]. World J Surg, 2018, 42(8): 2551–2560.
- [11] Castera L. Liver stiffness and hepatocellular carcinoma: liaisons dangereuses? [J]. Hepatology, 2009, 49(6): 1793–1794.
- [12] Zhao L, Zhang YJ, Zhang YB, et al. Long noncoding RNA CASC2 regulates hepatocellular carcinoma cell oncogenesis through miR-362-5p/Nf- κ B axis [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 6661–6670.
- [13] Scott MT, Matthew RC, Danielle E, et al. Heat stress-induced PI3K/mTORC2-dependent AKT signaling is a central mediator of hepatocellular carcinoma survival to thermal ablation induced heat stress [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162634.
- [14] Jang JW, Song Y, Kim KM, et al. Hepatocellular carcinoma-targeted drug discovery through image-based phenotypic screening in co-cultures of HCC cells with hepatocytes [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 810.
- [15] Hsu SH, Wang B, Kutay H, et al. Hepatic loss of miR-122 predisposes mice to hepatobiliary cyst and hepatocellular carcinoma upon diethylnitrosamine exposure [J]. Am J Pathol, 2013, 183(6): 1719–1730.
- [16] Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. The DEN and CCl₄-induced mouse model of fibrosis and inflammation-associated hepatocellular carcinoma [J]. Pharmacology, 2014, 66: 14. 30. 1–10.
- [17] 何晓东, 邹一贺, 黎冰林, 等. 不同配方饲料对 DEN 诱导小鼠肝癌模型建立的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 306–310.
- [18] Yang N, Fu Y, Zhang HB, et al. LincRNA-p21 activates endoplasmic reticulum stress and inhibits hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, 6(29): 28151–28163.
- [19] Wu C, Chen WY, Fang M, et al. Compound Astragalus and Salvia miltiorrhiza extract inhibits hepatocellular carcinoma progression via miR-145/miR-21 mediated Smad3 phosphorylation [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 98–112.
- [20] 赵彤, 李柏. 二乙基亚硝胺在小鼠诱发性肝癌模型中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 76–80.
- [21] Yang X, Wei C, Liu N, et al. GP73, a novel TGF- β target gene, provides selective regulation on Smad and non-Smad signaling pathways [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(4): 588–597.
- [22] Jiang K, Shang S, Li W, et al. Multiple lectin assays for detecting glyco-alteration of serum GP73 in liver diseases [J]. Glycoconj J, 2015, 32(9): 657–664.
- [23] Li B, Li BA, Guo TS, et al. The clinical values of serum markers in the early prediction of hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 5358615.
- [24] Cao Z, Li Z, Wang Y, et al. Assessment of serum Golgi protein 73 as a biomarker for the diagnosis of significant fibrosis in patients with chronic HBV infection [J]. J Viral Hepatitis, 2017, 24(Suppl 1): 57–65.
- [25] Wu Y, Ma J, Wang YP, et al. Development of an alpha-fetoprotein and Golgi protein 73 multiplex detection assay using xMAP technology [J]. Clin Chem, 2018, 482: 209–214.

[收稿日期] 2019-04-13

金亮,金爱,赵立智. 长链非编码 RNA LINC00152 对人脑胶质瘤裸鼠移植瘤生长的影响及机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 28-33,49.

Jin L, Jin A, Zhao LZ. Effect of long noncoding RNA LINC00152 on the growth of human glioma xenografts in nude mice and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 28-33,49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 005

长链非编码 RNA LINC00152 对人脑胶质瘤裸鼠移植瘤生长的影响及机制探讨

金 亮^{1*}, 金 爱², 赵立智¹

(1.沧州市人民医院神经外科,河北 沧州 061000; 2.沧州市人民医院输血科,河北 沧州 061000)

【摘要】 目的 观察长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA) LINC00152 过表达对人脑胶质瘤 U251 荷瘤鼠肿瘤生长的影响并对其机制进行探讨。**方法** 慢病毒转染法上调 U251 细胞 LINC00152 表达水平,设立 LINC00152 过表达组 (LV-LINC00152 组) 和空载对照组 (LV 组) 细胞,以正常 U251 细胞作为空白对照组 (control 组);qRT-PCR 检测 LINC00152 表达水平;构建 U251 荷瘤鼠模型,p-YAP 抑制剂 XMU-MP-1 进行处理,测量肿瘤体积,实验终点称量瘤重;免疫组织化学染色观察肿瘤组织 Ki67 表达;蛋白印记实验检测 YAP、p-YAP、LATS1、p-LATS1 蛋白表达。**结果** 与 LV 组相比,LV-LINC00152 组 LINC00152 表达明显上调 ($P<0.01$)。实验终点时,与 LV 组荷瘤鼠肿瘤相比,LV-LINC00152 组肿瘤体积显著增大,瘤重明显增加 ($P<0.01$);XMU-MP-1 (1 mg/kg 和 3 mg/kg) 处理明显降低 LV-LINC00152 组荷瘤鼠肿瘤体积和瘤重 ($P<0.01$),并呈剂量依赖性。LV 组肿瘤组织 Ki67 呈弱阳性表达,而 LV-LINC00152 组呈强阳性表达;XMU-MP-1 (1 mg/kg 和 3 mg/kg) 处理后二者肿瘤组织 Ki67 呈弱阳性和阳性。与 LV 组相比,LV-LINC00152 组肿瘤组织 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达明显上调 ($P<0.01$);XMU-MP-1 (1 mg/kg 和 3 mg/kg) 处理可逆转 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达 ($P<0.01$),并存在剂量依赖性。**结论** 长链非编码 RNA LINC00152 可诱导 YAP 磷酸化,促进脑胶质瘤生长,而 p-YAP 抑制剂 XMU-MP-1 能抑制长链非编码 RNA LINC00152 的上述生物学效应。

【关键词】 长链非编码 RNA (LncRNA); LINC00152; 脑胶质瘤; 生长; YAP 蛋白; 裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0028-06

Effect of long noncoding RNA LINC00152 on the growth of human glioma xenografts in nude mice and its mechanism

JIN Liang^{1*}, JIN Ai², ZHAO Lizhi¹

(1. Department of Neurosurgery, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China.
2. Department of Hematology, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000)

【Abstract】 Objective To observe the effect of overexpression of a long noncoding RNA (LncRNA) LINC00152 on the tumor growth of human glioma U251 tumor-bearing mice and to explore its related mechanisms. **Methods** Lentiviral transfection upregulated the expression of LINC00152 in U251 cells. LINC00152 overexpression (LV-LINC00152 group) and empty control (LV group) cells were established, and normal U251 cells were used as the blank group (Control

[基金项目] 2018 年沧州市科技计划项目 (183302129); 2016 年沧州市科技计划项目 (162302072)。

[作者简介] 金亮 (1981—), 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向: 脑胶质瘤基础与临床研究。E-mail: jinlianghospital@163.com

group). qRT-PCR was used to detect the expression of LINC00152. A U251 tumor-bearing mouse model was established. The p-YAP inhibitor XMU-MP-1 was administered to mice and the tumor volume was measured and the tumor weight was weighed at the end of the experiment. Immunohistochemical staining was used to observe the expression of Ki67 in tumor tissues. The expressions of YAP, p-YAP, LATS1 and p-LATS1 proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the LV group, the expression of LINC00152 in the LV-LINC00152 group was significantly upregulated ($P < 0.01$). End of experiment, compared with the LV tumor-bearing mice, the tumor volume and tumor weight in the LV-LINC00152 group were increased significantly ($P < 0.01$). XMU-MP-1 (1 and 3 mg/kg) treatment significantly reduced the tumor volume and tumor weight of LV-LINC00152 tumor-bearing mice in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Ki67 staining in the LV group was weakly positive but strongly positive in the LV-LINC00152 group. After XMU-MP-1 (1 and 3 mg/kg) treatment, Ki67 was weakly positive in the tumor tissues of the LV-LINC00152 group. Compared with the LV group, the expression of p-YAP and p-LATS1 protein in the LV-LINC00152 group was significantly upregulated ($P < 0.01$), and XMU-MP-1 (1 and 3 mg/kg) treatment reversed the p-YAP and p-LATS1 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusions** The long noncoding RNA LINC00152 induces YAP phosphorylation to promote glioma growth, while the p-YAP inhibitor XMU-MP-1 inhibits the above biological effects of the long noncoding RNA LINC00152.

[Keywords] long noncoding RNA(LncRNA); LINC00152; glioma; growth; YAP protein; nude mouse

脑胶质瘤(brain glioma)是常见的颅内原发性恶性肿瘤,当前其主要治疗手段为手术切除联合化学治疗和放射治疗^[1]。脑胶质瘤恶性程度较高,且常规化疗药物难以通过血脑屏障,临床治疗效果往往不佳^[2]。因此,如何有效治疗脑胶质瘤是临床面临的严重挑战。LINC00152 属于长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNA),并异常表达于肝癌、胃癌及结肠癌等恶性肿瘤细胞中^[3-5]。文献报道,LINC00152 参与恶性肿瘤细胞的增殖、迁移及转移等生物学行为^[3-5]。最新研究显示,LINC00152 与脑胶质瘤临床不良预后相关,下调 LINC00152 基因表达可抑制脑胶质瘤细胞的体内生长^[6]。还有研究显示,上调 LINC00152 可促进胶质瘤细胞侵袭^[7]。这些提示,LINC00152 与胶质瘤细胞的恶性生物学行为相关,能促进脑胶质瘤的体内生长。Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)为一种转录共激活因子,主要在 Hippo 通路下游发挥细胞增殖和凋亡调控作用^[8]。但 YAP 是否参与 LINC0015 对脑胶质瘤生长的调节还未有研究报道。本研究以慢病毒转染法上调脑胶质瘤 U251 细胞 LINC00152 表达水平并建立荷瘤鼠模型,观察 LINC00152 对脑胶质瘤生长的影响及 YAP 在其中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 BALB/c nu/nu 裸鼠 60 只,SPF 级,5~6 周龄,体重 13~15 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],质量合格证号:

No. 11400700329359。动物饲养于沧州医学高等专科学校实验动物中心 SPF 级动物房[SYXK(冀)2019-006]IVC 笼中,每笼 6 只,自由饮水、摄食,12 h 光照/12 h 黑暗,温度 20℃~25℃,相对湿度 40%~70%。体内实验通过了沧州医学高等专科学校实验动物中心动物管理和伦理委员会审批,审批号:CPH1702。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞株

人脑胶质瘤 U251 细胞(目录号:TCHu 58)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

XMU-MP-1(货号 HY-100526)购自美国 MCE 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、MEM 培养基和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)购自美国 Gibco 公司;Ki67 抗体(货号 sc-23900)购自美国 Santa Cruz 公司;YAP 抗体(货号 4912)、Phospho-YAP(Ser127)(货号 D9W2I)抗体(货号 13008)、Phospho-LATS1(Ser909)抗体(货号 9157)购自美国 CST 公司;LATS1 抗体购自美国 Abcam 公司(货号 ab70561);GAPDH 抗体(货号 AP0063)、抗兔 IgG-HRP 二抗(货号 BS13278)、抗鼠 IgG-HRP 二抗(货号 BS12478)购自南京巴傲得公司;HS 15(货号 42966)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;TRIzol 和 RIPA 细胞裂解液购自上海碧云天公司;SYBR Premix Ex Taq™ II 购自大连宝生物公司;ECL 化学发光液购自美国 Millipore 公司;EnVision 法免疫组织化学试剂盒购自丹麦 Dako 公司。全波段多功能酶标仪,美国 BioTek 公司;AI600 凝胶成像仪,美国

GE 公司; FACSCalibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; 7300 型实时荧光定量 PCR, 美国 ABI 公司产品; Allegra 64R Centrifuge 台式高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 慢病毒转染法构建 LINC00152 稳定表达细胞株

慢病毒转染法构建 LINC00152 过表达组 (LV-LINC00152 组) 和空载对照组 (LV 组) 细胞, 同时以正常 U251 作为空白对照组 (control 组)。将 U251 细胞以每孔 3×10^6 个接种于六孔板中, 当细胞汇合度达 50% 时进行转染。LV-LINC00152 组和 LV 组细胞更换为含 $10 \mu\text{g/mL}$ Polybrene 的 MEM 全培养基, 加入以培养基稀释好的空载和 LINC00152 包装的病毒液, 空白组细胞加入等量培养基, 37°C 、5% CO_2 过夜培养, 12 h 时更换为 MEM 全培养基, 继续培养至对数期传代, 嘌呤霉素筛选稳定表达的细胞株。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 LINC00152 表达水平

收集 LV-LINC00152 组、LV 组和对照组细胞, TRIzol 法提取细胞总 RNA, 用酶标仪对各组细胞总 RNA 浓度进行定量, 各取 $1 \mu\text{g}$ 进行反转录, 稀释反转录好的 cDNA 至 $500 \mu\text{L}$, 充分混匀备用。各引物按正向引物与反向引物 1:1 稀释, 利用 SYBR Premix Ex TaqTM II 在 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 系统中进行扩增, 反应条件: 95°C , 10 s; 95°C , 10 s, 60°C , 60 s, 40 个循环, 每组设置 6 个重复孔。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 LINC00152 的相对表达水平。

1.3.3 蛋白印迹检测蛋白表达

将各组动物肿瘤组织剖下, 切割 0.5 g 肿瘤组织并加入 $500 \mu\text{L}$ RIPA 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 研磨裂解 10 min, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 20 min, 吸取上清液至预冷的 EP 管中, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 制备蛋白样品。以 SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品中的蛋白质 (上样量为 $30 \mu\text{g}$); 将分离的蛋白湿法转印至 PVDF 膜上; 转膜完成后以 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 2 h; 然后按要求加入 YAP (1:2000)、p-YAP (1:1000)、LATS1 (1:1000)、p-LATS1 (1:1000) 或 GAPDH 抗体 (1:5000) 4°C 孵育过夜。次日, TBST 洗膜 3 次, 再加入相应的二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h, 以 ECL 化学发光液进行显色, 凝胶成像仪进行成像, 对蛋白印迹条带进行处

理和分析, 实验重复 3 次。

1.3.4 免疫组化及结果判断

所有组织标本按 EnVision 法进行免疫组织化学实验, 参考说明书进行固定、脱水、石蜡包埋、脱蜡、切片、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭剂孵育一抗 (1:1000)、孵育 EnVisionTM、孵育色源底物溶液和显色拍照。一抗为小鼠单克隆 Ki-67 抗体, 需 4°C 过夜, 阴性对照以 PBS 代替一抗。

Ki67 蛋白定位于细胞核, 出现棕黄色颗粒显色为阳性。随机选取 6 个高倍视野, 采用免疫组织化学评分方法半定量分析, 分别计算各视野中阳性细胞数平均百分比和染色强度。计数阳性细胞百分比, 阳性细胞数 $< 5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $76\% \sim 100\%$ 为 4 分。评价阳性染色强度, 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。最终评分为两项评分相乘: 0 分为阴性 (-), 1~4 分为弱阳性 (+), 5~8 分为阳性 (++) , 9~12 分为强阳性 (+++)。

1.3.5 肿瘤模型的建立及分组给药

于每只裸鼠右腋下接种 U251 细胞 2×10^6 个, 总体积 0.1 mL (含 0.05 mL Matrigel 胶)。接种后观察肿瘤生长情况, 最终以瘤体积 100 mm^3 左右为标准进行筛选, 剔除瘤体积过大或过小的动物, 选取合格动物纳入实验。

实验一分组: 分别以转染空载体的 LV 组细胞和过表达 LINC00152 的 LV-LINC00152 组细胞荷瘤, 筛选合格的实验动物, 前者设为 LV 组, 后者设为 LV-LINC00152 组;

实验二分组: 以 LV-LINC00152 组细胞荷瘤并筛选合格的实验动物分为生理盐水组 (normal saline 组)、XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组。

将 XMU-MP-1 溶解于 HS 15 中, 并以生理盐水稀释 XMU-MP-1 溶液, 同时配制含等量 HS 15 溶剂的生理盐水作为对照。XMU-MP-1 给药剂量为 1 mg/kg 和 3 mg/kg , 每周给药 3 次, 共给药 3 周, 采用游标卡尺测量并记录肿瘤长径、短径, 按照以下公式计算肿瘤体积: 肿瘤体积 = $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$, 瘤径测量时间分别为: 分组前测量瘤径 1 次, 首次给药后每周 3 次, 安乐死前 1 次。动物安乐死后剖下肿瘤组织并称重, 取适当肿瘤组织用于实验, 其余进行固定保存。

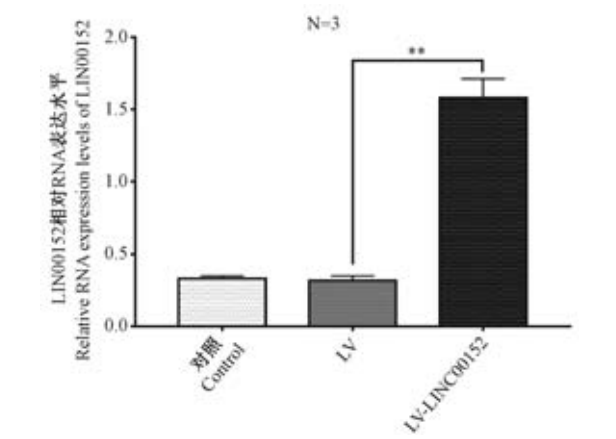
1.4 统计学方法

应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量数据以 Shapiro-Wilk 进行正态性检验,均为正态分布,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用两独立样本资料的 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒转染法外源性上调模型细胞 LINC00152 表达水平

实时荧光定量 PCR 结果显示,对照组、LV 组和 LV-LINC00152 组细胞中 LINC00152 mRNA 相对表达水平分别为 (0.33 ± 0.02) 、 (0.32 ± 0.03) 和 (1.58 ± 0.13) ,对照组和 LV 组无显著性差异 ($P>0.05$);与 LV 组相比, LV-LINC00152 组 LINC00152 mRNA 相对表达水平明显上调 ($P<0.01$)。见图 1。

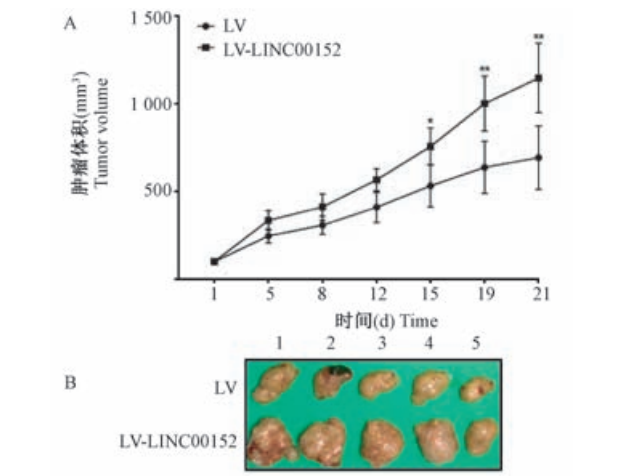


注: ** $P<0.01$ 。
图 1 对照组、LV 组和 LV-LINC00152 组 LINC00152 表达水平
Note. ** $P<0.01$ 。

Figure 1 Expression levels of LINC00152 in the control group, LV group and LV-LINC00152 group

2.2 LINC00152 促进模型细胞移植瘤生长

实验期间,各组动物生长状态良好,体重随时间逐渐增加,组间无明显差异 ($P>0.05$)。如图 2A 所示,分组给药后,随时间的增加,各组荷瘤鼠肿瘤体积逐渐增大。实验终点时,与 LV 组相比, LV-LINC00152 组肿瘤体积显著增大 ($P<0.01$)。实验终点时, LV 组和 LV-LINC00152 组瘤重分别为 (0.86 ± 0.29) g 和 (1.21 ± 0.40) g,与 LV 组相比, LV-LINC00152 组瘤重增加明显 ($P<0.01$),见图 2B。



注:A:LV 组和 LV-LINC00152 组肿瘤体积,与 LV 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;B:LV 组和 LV-LINC00152 组肿瘤图片,1~5 为各动物组内编号。
图 2 LV 组和 LV-LINC00152 组肿瘤生长情况
Note. A, Tumor volume in the LV group and LV-LINC00152 group. Compared with the LV group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. B, Tumor images in the LV group and LV-LINC00152 group. 1-5 are serial numbers of the animals in each group.

Figure 2 Tumor growth in the LV group and LV-LINC00152 group

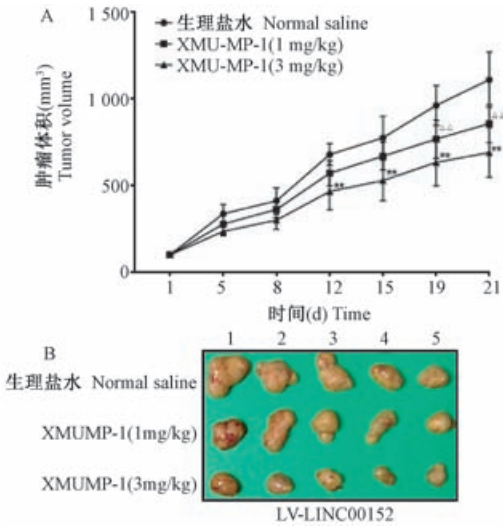
2.3 XMU-MP-1 处理抑制 LINC00152 诱导的模型细胞移植瘤生长

如图 3A 所示,分组给药后,随时间的增加,各组荷瘤鼠肿瘤体积逐渐增大。实验终点时,与生理盐水组相比, XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组肿瘤体积显著减小 ($P<0.01$),并呈剂量依赖性。实验终点时,生理盐水组、XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组瘤重分别为 (1.08 ± 0.41) g、 (0.35 ± 0.19) g 和 (0.68 ± 0.28) g,与生理盐水组相比, XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组瘤重显著减小 ($P<0.01$),并呈剂量依赖性,见图 3B。

2.4 各组肿瘤组织 Ki67 蛋白表达变化

免疫组织化学染色结果显示, LV 组肿瘤组织 Ki67 呈弱阳性表达,而 LV-LINC00152 组肿瘤组织 Ki67 呈强阳性表达。以生理盐水组作为对照, XMU-MP-1 处理 LV-LINC00152 细胞荷瘤鼠后发现,生理盐水组肿瘤组织 Ki67 呈强阳性, XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组呈阳性,而 XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组呈弱阳性。见图 4。

2.5 各组肿瘤组织 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达变化



注:A:生理盐水组、XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1(1 mg/kg)组肿瘤体积,与生理盐水组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;B:生理盐水组、XMU-MP-1 (3 mg/kg)组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg)组肿瘤图片,1~5 为各动物组内编号。

图 3 生理盐水组、XMU-MP-1 (3 mg/kg) 组和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 组肿瘤生长情况

Note. A, Tumor volume in the normal saline group, XMU-MP-1 (3 mg/kg) group and XMU-MP-1 (1 mg/kg) group. Compared with the normal saline group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. B, Tumor images of the normal saline group, XMU-MP-1 (3 mg/kg) group and XMU-MP-1 (1 mg/kg) group. 1-5 are serial numbers of the animals in each group.

Figure 3 Tumor growth in the normal saline, XMU-MP-1 (3 mg/kg) and XMU-MP-1 (1 mg/kg) groups

蛋白印记实验分析各组肿瘤组织 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达变化,与 LV 组相比,LV-LINC00152 组肿瘤组织 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。以不同浓度 XMU-MP-1 处理 LV-LINC00152 组裸鼠,结果发现与生理盐水组相比,

XMU-MP-1 (3 mg/kg) 和 XMU-MP-1 (1 mg/kg) 处理后 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.01$),并存在剂量依赖性。见图 5。

3 讨论

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA)是碱基组成从 200 nt 到 100 000 nt 的非编码 RNA,在细胞周期调控、表观遗传调控、转录调控及转录后调控等生物学过程中发挥重要作用,并涉及神经系统、心血管系统及恶性肿瘤等多种疾病^[9-10]。随着研究的深入,越来越多的 LncRNA 被发现与脑胶质瘤、白血病、乳腺癌、肝癌等恶性肿瘤的发生发展相关^[11-12]。LINC00152 是 LncRNA 大家族的一员,异常表达于肝癌、胃癌及结肠癌等恶性肿瘤^[13-14]。最新研究显示,LINC00152 与脑胶质瘤临床不良预后相关,而下调 LINC00152 基因表达可抑制脑胶质瘤细胞的体内生长^[6]。提示,LINC00152 胶质瘤中可能发挥促癌效应,能促进脑胶质瘤细胞的体内生长。

本研究通过慢病毒转染法外源性上调脑胶质瘤 U251 细胞中 LINC00152 表达水平,嘌呤霉素筛选稳定表达 LINC00152 的细胞株。以 BALB/c 裸鼠建立脑胶质瘤 U251 荷瘤鼠模型发现,实验终点 LINC00152 过表达 U251 荷瘤鼠肿瘤体积和瘤重明显增大。提示,LINC00152 能促进 U251 荷瘤鼠肿瘤生长。这与文献报道相类似^[6]。Ki67 定位于细胞核,是目前临床常用的恶性肿瘤增殖活性衡量指标之一^[15]。本研究观察了 Ki67 的表达变化,发现 LINC00152 过表达 U251 荷瘤鼠肿瘤组织中 Ki67 表达强于对照。表明 LINC00152 能增强 U251 荷瘤鼠肿瘤组织细胞的增殖活性。重要的是,本研究还发现 U251 荷瘤鼠肿瘤组织中 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白

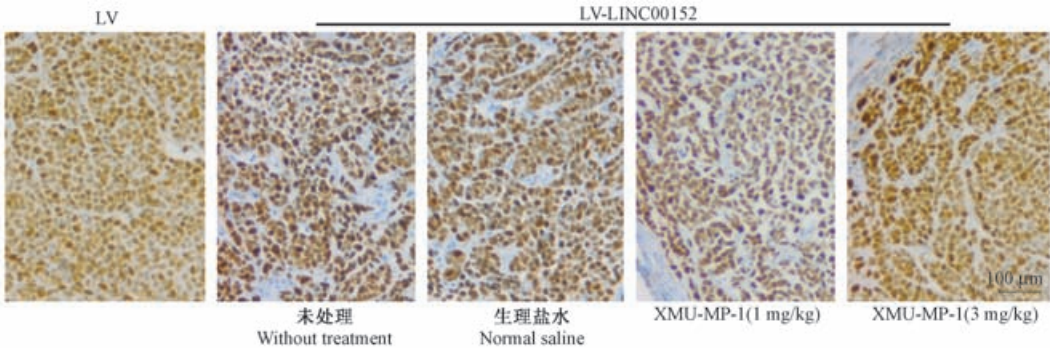
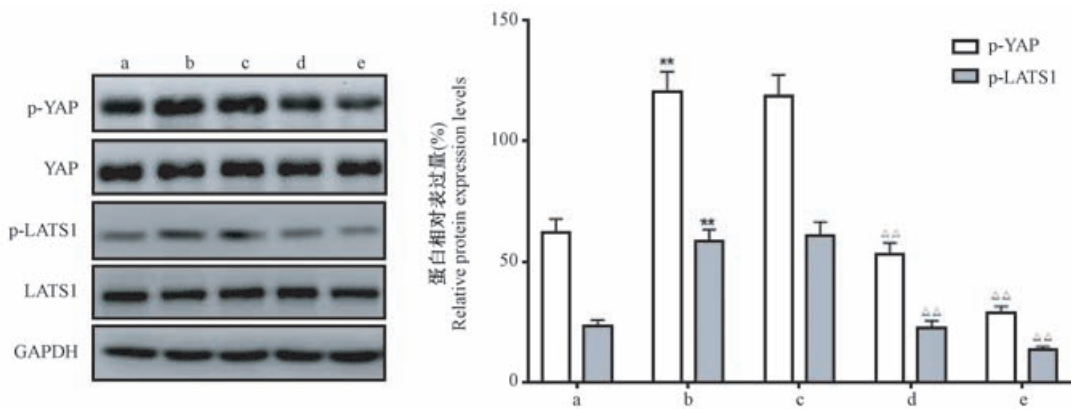


图 4 各组肿瘤组织 Ki67 蛋白表达变化(免疫组织化学染色,× 200)

Figure 4 Changes of Ki67 protein expression in tumor tissues of each group. Immunohistochemical staining



注:a;LV 组;b;LV-LINC00152 组;c;LV-LINC0015 + 生理盐水组;d;LV-LINC0015 + 1 mg/kg XMU-MP-1 组;e;LV-LINC0015 + 3 mg/kg XMU-MP-1 组。与 LV 组相比, ** $P<0.01$;与 LV-LINC0015 + 生理盐水组相比, ΔΔ $P<0.01$ 。

图 5 各组肿瘤组织 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达变化

Note. a, LV group. b, LV-LINC00152 group. c, LV-LINC0015 + normal saline group. d, LV-LINC0015 + 1 mg/kg XMU-MP-1 group. e, LV-LINC0015 + 3 mg/kg XMU-MP-1 group. Compared with the LV group, ** $P<0.01$. Compared with the LV-LINC0015 + normal saline group, ΔΔ $P<0.01$.

Figure 5 Changes of p-YAP and p-LATS1 protein expression in tumor tissues of each group

表达显著上调。LATS1 是 YAP 的上游信号靶点,当 LATS1 磷酸化后可引起下游效应物 YAP 磷酸化。文献报道,敲低脑胶质瘤 LN229 细胞中 YAP 的蛋白表达能显著抑制细胞增殖和 Ki67 蛋白表达^[16]。提示,p-YAP 参与 U251 荷瘤鼠肿瘤的增殖生长。XMU-MP-1 是研究已证实的 YAP 抑制剂,能够抑制 p-YAP 的表达^[17]。本研究进一步采用 XMU-MP-1 处理 LINC00152 过表达的 U251 荷瘤鼠。结果显示,XMU-MP-1 能显著抑制 p-YAP 和 p-LATS1 表达,同时还可抑制 TV 和瘤重的增加以及 Ki67 蛋白表达。提示,抑制 YAP 磷酸化能遏制 LINC00152 介导的 U251 荷瘤鼠肿瘤生长。

综上所述,本研究发现,LINC00152 能通过磷酸化 YAP 从而介导 U251 荷瘤鼠肿瘤生长。文献显示,在肝癌、肾癌中及膀胱癌等多种肿瘤细胞中,YAP 磷酸化后从细胞核转位至细胞质中,从而失去其直接的转录活性^[18-20]。提示本研究中 YAP 的生物学调节作用主要在细胞质中发挥。但其具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Byun HK, Kim N, Yoon HI, et al. Clinical predictors of radiation-induced lymphopenia in patients receiving chemoradiation for glioblastoma; clinical usefulness of intensity-modulated radiotherapy in the immuno-oncology era [J]. Radiat Oncol, 2019, 14(1): 51.

[2] Smith SJ, Tyler BM, Gould T, et al. Overall survival in malignant glioma is significantly prolonged by neurosurgical

delivery of etoposide and temozolomide from a thermo-responsive biodegradable paste [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25 (16): 5094-5106.

[3] Nötzold L, Frank L, Gandhi M, et al. The long non-coding RNA LINC00152 is essential for cell cycle progression through mitosis in HeLa cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2265.

[4] Ji J, Tang J, Deng L, et al. LINC00152 promotes proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting EpCAM via the mTOR signaling pathway [J]. Oncotarget, 2015, 6 (40): 42813-42824.

[5] Yue B, Cai D, Liu C, et al. Linc00152 functions as a competing endogenous RNA to confer oxaliplatin resistance and holds prognostic values in colon cancer [J]. Mol Ther, 2016, 24 (12): 2064-2077.

[6] Wang W, Wu F, Zhao Z, et al. Long noncoding RNA LINC00152 is a potential prognostic biomarker in patients with high-grade glioma [J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(10): 957-966.

[7] Reon BJ, Takao Real Karia B, Kiran M, et al. LINC00152 promotes invasion through a 3'-hairpin structure and associates with prognosis in glioblastoma [J]. Mol Cancer Res, 2018, 16 (10): 1470-1482.

[8] 梁明, 张亦磊, 范志刚, 等. 乳腺癌组织中 Yes 相关蛋白的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(4): 914-916.

[9] 鲁首男, 战铁翔, 苏志雷, 等. HOXA11-AS 在恶性肿瘤中的表达及作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 111-115.

[10] Zhang X, Tao W. Long noncoding RNA LINC00152 facilitates the leukemogenesis of acute myeloid leukemia by promoting CDK9 through miR-193a [J]. DNA Cell Biol, 2019, 38(3): 236-242.

(下转第 49 页)

陶涛,汪国文,李其才,等. 人参皂苷 Rg3 通过 TGF- β 1/ERK 信号通路调控原位荷瘤人肺癌裸鼠的淋巴管生成的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 34-40.

Tao T, Wang GW, Li QC, et al. Mechanism of ginsenoside Rg3 regulation of lymphangiogenesis in nude mice bearing human lung cancer by the TGF- β 1/ERK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 34-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 006

人参皂苷 Rg3 通过 TGF- β 1/ERK 信号通路调控原位荷瘤人肺癌裸鼠的淋巴管生成的机制

陶 涛,汪国文*,李其才,黎传奎

(蚌埠医学院第一附属医院,安徽 蚌埠 233004)

【摘要】 目的 探究人参皂苷 Rg3(GS-Rg3)通过转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路调控原位荷瘤人肺癌裸鼠淋巴管生成的机制。**方法** 60 只裸鼠随机分为 3 组,即模型组、GS-Rg3 组和 ERK 抑制剂(SCH772984)组。GS-Rg3 组和 SCH772984 组建立人肺癌裸鼠原位移植模型,GS-Rg3 组小鼠使用 GS-Rg3 灌胃,SCH772984 组小鼠腹腔注射 ERK 抑制剂 SCH772984。观察各组小鼠建模和淋巴转移情况。并分析各组肿瘤组织中淋巴管生成情况、TGF- β 1/ERK 信号通路以及血管内皮生长因子(VEGF)表达情况。**结果** HE 染色病理学检查证实肺癌以及肺癌淋巴转移。GS-Rg3 组和 SCH772984 组小鼠出现淋巴转移的比例、肿瘤体积和肿瘤质量均显著低于模型组,GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异。使用 podoplanin 蛋白标记淋巴管,GS-Rg3 组和 SCH772984 组 podoplanin 蛋白表达水平和淋巴管相对密度显著低于模型组,GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异。GS-Rg3 和 SCH772984 可以显著抑制 TGF- β 1/ERK 通路的激活。GS-Rg3 组和 SCH772984 组的 VEGF-C、VEGF-3 表达水平较模型组低,GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异。**结论** GS-Rg3 可以通过下调 TGF- β 1/ERK 信号通路的转导水平抑制 VEGF-C、VEGF-3 蛋白的表达,从而抑制淋巴管的生成降低肺癌的淋巴转移率,其作用水平与 SCH772984 相似。

【关键词】 肺癌;人参皂苷 Rg3;转化生长因子- β 1/细胞外调节蛋白激酶;淋巴管生成;血管内皮生长因子;裸鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0034-07

Mechanism of ginsenoside Rg3 regulation of lymphangiogenesis in nude mice bearing human lung cancer by the TGF- β 1/ERK signaling pathway

TAO Tao, WANG Guowen*, LI Qicai, LI Chuankui

(First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

【 Abstract 】 Objective To investigate the mechanism of ginsenoside Rg3 (GS-Rg3) regulation of lymphangiogenesis in nude mice bearing human lung cancer by the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/extracellular regulatory protein kinase (ERK) signaling pathway. **Methods** Sixty nude mice were randomly divided into three groups: model group, GS-Rg3 group and SCH772984 group. The orthotopic transplantation model of human lung cancer in nude

[作者简介] 陶涛 (1986—),男,住院医师,研究方向:普胸外科疾病。E-mail: jingqiao4242915@ 163.com

[通信作者] 汪国文 (1979—),男,副主任医师,研究方向:肺癌。E-mail: 33430687@ qq.com

mice was established in the GS-Rg3 and SCH772984 groups. The GS-Rg3 mice were gavaged with GS-Rg3. Mice in the SCH772984 group were intraperitoneally injected with the ERK inhibitor SCH772984. Modeling and lymphatic metastasis of each group of mice were observed. Lymphangiogenesis, TGF- β 1/ERK signaling pathway and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumor tissues of each group were analyzed. **Results** Pathological examination using HE staining confirmed the lung cancer and its lymphatic metastasis. The proportion of lymphatic metastasis, tumor volume and tumor mass in the GS-Rg3 group and the SCH772984 group were significantly lower than those in the model group. There was no significant difference between the GS-Rg3 group and the SCH772984 group. Podoplanin protein expression level and relative density of lymphatic vessels were significantly lower in the GS-Rg3 group and the SCH772984 group than in the model group when using the podoplanin protein to label lymphatic vessels. There was no significant difference between the GS-Rg3 group and the SCH772984 group. GS-Rg3 and SCH772984 significantly inhibited activation of the TGF- β 1/ERK pathway. The expression levels of VEGF-C and VEGF-3 in the GS-Rg3 group and the SCH772984 group were lower than those in the model group. There was no significant difference between the GS-Rg3 group and the SCH772984 group. **Conclusions** GS-Rg3 can inhibit the expressions of VEGF-C and VEGF-3 by downregulating the transduction level of the TGF- β 1/ERK signaling pathway, thereby inhibiting lymphangiogenesis and reducing the lymphatic metastasis rate of lung cancer.

【Keywords】 lung cancer; GS-Rg3; TGF- β 1/ERK; lymphangiogenesis; vascular endothelial growth factor; nude mouse

人参在我国具有悠久的历史,在抗肿瘤中也具有一定的功效,人参皂苷 Rg3(GS-Rg3)是一种从中药人参中提取的固醇类中药单体,具有多种生物学活性,包括对于肿瘤,GS-Rg3 具有抑制其增殖、促进细胞凋亡的作用,但是关于其具体机制尚不明确^[1]。最近有研究显示 GS-Rg3 也具有抑制淋巴管生成的作用,肿瘤细胞通过淋巴管进入淋巴结是肺癌淋巴转移的主要方式之一,有研究发现转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)在肿瘤中过表达,发挥促增殖的作用, TGF- β 1/ERK 可以促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达从而促进管生成^[2-3]。SCH772984 是一种新型特异性的 ERK 抑制剂,广泛应用于 ERK 相关信号通路的研究。因此本文主要分析人参皂苷 GS-Rg3 对荷瘤人肺癌裸鼠淋巴管生成的机制,并研究其对肿瘤组织 TGF- β 1/ERK 通路以及 VEGF 表达的影响,分析 GS-Rg3 的作用机制,为 GS-Rg3 在临床治疗肺癌提供理论依据和新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

4~5 周龄(体重 14 g~17 g)的 SPF 级 BALB/c 无胸腺雄性裸鼠 60 只,均购自华东师范大学科学实验动物中心闵行校区[SCXK(沪)2016-0004],饲养

于华东师范大学科学实验动物中心闵行校区[SYXK(沪)2015-0011]的独立通风笼盒中。

1.1.2 细胞系

人肺癌 A549 细胞购自 ATCC(美国)。

1.2 主要试剂与仪器

RPM1-1640 培养基以及胎牛血清等培养试剂购自 Gibco(美国);戊巴比妥购自 Sigma 公司(美国);GS-Rg3 购自齐一生物科技公司(中国,上海);ERK 抑制剂 SCH772984 购自 Selleck 公司;HE 染色试剂盒购自武汉华美公司(中国);逆转录试剂盒和 SYBR Prellix Ex TaqTM 实时 PCR 试剂盒购自 TaKaRa(日本);抗体 TGF- β 1、ERK、p-ERK、podoplanin、VEGF-C、VEGF-3 以及相关二抗均来自 Abcam 公司(美国);PVDF 膜(Bio-Rad, 美国);PCR 引物由 Genewiz(中国)设计和合成。显微镜 Nikon(日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 荷瘤裸鼠分组、建模及干预方法

将 60 只小鼠随机分为 3 组,各 20 只,即模型组、GS-Rg3 组和 ERK 抑制剂 SCH772984 组(以下简称为 SCH772984 组)。根据文献^[4]建立人肺癌裸鼠原位移植模型,将生长良好的 A549 细胞分裂并在新鲜培养基中再生长一天,皮下注射全部小鼠,注射细胞数为 5×10^6 个,待瘤体生长至 10 mm 使剥离瘤体移植至模型组、GS-Rg3 组和 SCH772984 组的小鼠肺组织。GS-Rg3 组小鼠在移植后第 3 天使用 GS-Rg3 灌胃,每只 0.8 mg/kg, SCH772984 组小鼠移植后第 3 天腹腔注射 SCH772984,每只 12.5

mg/kg,每 3 d 一次,饲养 28 d 后处死小鼠进行检验。实验过程遵循 3R 原则,并通过蚌埠医学院第一附属医院实验动物使用与管理委员会批准(H 2017123546)。

1.3.2 肿瘤生长情况以及病理学检查

戊巴比妥腹腔注射 (60 mg/kg) 麻醉后处死大鼠,打开胸腔,观察肺癌生长和转移情况,并取出肺组织,测量肿瘤体积,使用 HE 染色检测肺组组织学变化,按照试剂盒说明书操作。

1.3.3 免疫组化染色

肺癌原位移植瘤组织用甲醛和石蜡固定,将切片 (4.0 μm) 脱石蜡并再水合,抑制内源性过氧化物酶活性,首先封闭切片并在 4℃ 下用 VEGF-C、VEGF-3 或 podoplanin 抗体孵育过夜,然后在室温下与生物素化的抗小鼠 IgG 孵育 30 min,随后染色,显微镜观察,根据文献报道的方法^[5] 计算淋巴管密度。

1.3.4 qPCR

qPCR 用于检测肺癌原位移植瘤组织中 mRNA 水平,组织裂解后收集总 mRNA,通过 95℃ 激活 DNA 聚合酶 5 min 进行 PCR,然后进行 40 个循环的两步 PCR (95℃, 10 s 和 60℃, 30 s), 最终 75℃ 延伸 10 min,保持在 4℃, GAPDH 作为内参,使用 2^{-ΔΔCT} 法分析 mRNA 水平。

1.3.5 Western blot

使用 Western blot 检测肺癌原位移植瘤组织中蛋白水平。在液氮的保护下裂解组织,在 12 000 r/min, 4℃ 离心 15 min 收集上清液,使用 BCA 方法确

定蛋白质浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳,电泳后使用 PVDF 膜转膜并在室温下用 5% 无脂牛奶封闭 2 h。加入一抗室温震荡 2 h,后在 4℃ 孵育过夜,加入二抗。使用 GAPDH 作为内参。

1.4 统计学方法

所有实验数据均以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析使用 SPSS 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)。计量资料进行单因素方差分析 (ANOVA) 以评估实验组之间的差异,组间两两比较采用 *t* 检验;计数资料进行卡方分析。*P* < 0.05 表示差异有显著性。

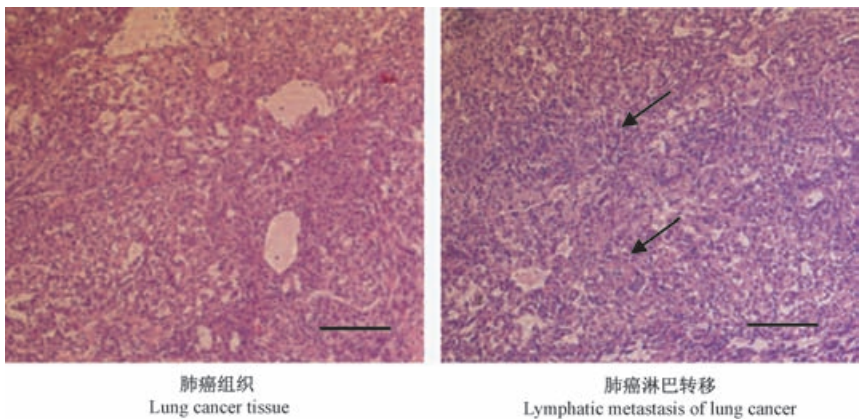
2 结果

2.1 建模及干预情况

模型组和各干预组小鼠肺癌模型均建立成功,并通过 HE 染色病理检查证实肺癌以及肺癌淋巴转移,见图 1。干预后 21 d 模型组小鼠死亡 1 只,其余小鼠无死亡。GS-Rg3 组和 SCH772984 组小鼠出现淋巴转移的比例、肿瘤体积和肿瘤质量均显著低于模型组,GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异,见表 1。

2.2 各组淋巴微管着色情况比较

本次研究使用 podoplanin 蛋白标记淋巴管,图 2 中褐色为 podoplanin 染色,可用于反映淋巴管生长情况。结果显示 GS-Rg3 组和 SCH772984 组 podoplanin 蛋白表达水平和淋巴管相对密度显著低于模型组,而 GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异,其免疫组化染色结果见图 2、表 2。



注:箭头指示淋巴转移。标尺=100 μm。

图 1 HE 染色检测肺癌组织和肺癌淋巴转移组织

Note. Arrows indicate lymph node metastasis. Bars = 100 μm.

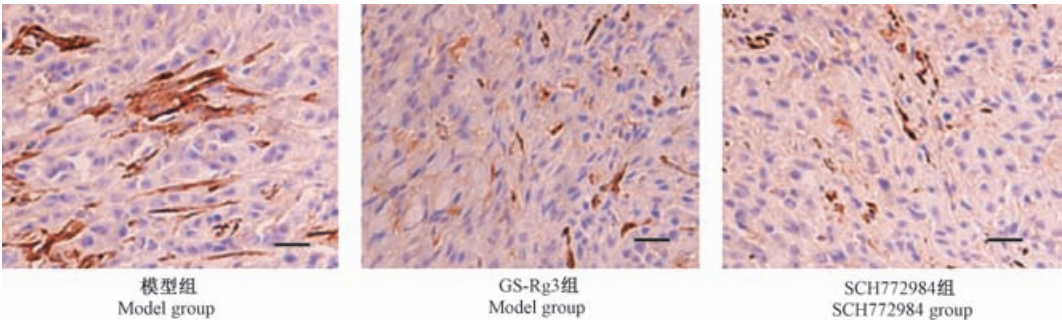
Figure 1 Pathological images of lung tissue and lymphatic metastasis of lung cancer. HE staining

表 1 各组小鼠淋巴转移情况和肺肿瘤体积比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of lymphatic metastases and lung tumor volumes of the mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	淋巴转移个数及百分比 Number and percentage of lymphatic metastases	肿瘤体积(mm ³) Tumor volume	肿瘤质量(g) Tumor mass
模型组 Model group	19	15(78. 95%)	583. 43±18. 54	0. 72±0. 21
GS-Rg3 组 GS-Rg3 group	20	7(35. 00%) **	302. 93±17. 51 **	0. 29±0. 17 **
SCH772984 组 SCH772984 group	20	5(25. 00%) **	231. 45±14. 25 **	0. 21±0. 14 **

注:与模型组比较, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$.



注:箭头所示褐色为 podoplanin 染色。标尺=20 μm 。

图 2 免疫组化染色检测肿瘤组织中 podoplanin 蛋白表达水平和淋巴管生长情况

Note. Arrows indicate the staining of podoplanin protein. Bars=20 μm .

Figure 2 Podoplanin protein expression and lymphangiogenesis in tumor tissues. Immunohistochemical staining

表 2 各组小鼠 podoplanin 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Expression levels of podoplanin protein of the mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	Podoplanin 蛋白表达水平 Expression levels of podoplanin protein
模型组 Model group	19	5. 33±2. 01
GS-Rg3 组 GS-Rg3 group	20	4. 01±1. 93 *
SCH772984 组 SCH772984 group	20	3. 89±1. 77 *

注:与模型组比较, * $P<0. 05$ 。
Note. Compared with the model group, * $P<0. 05$.

2.3 各组 TGF- β 1/ERK 通路表达水平比较

GS-Rg3 组和 SCH772984 组可以显著抑制 TGF- β 1 和 ERK mRNA 的表达,并且 GS-Rg3 组和 SCH772984 组的 p-ERK/ERK 水平显著低于模型组,而 GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异,说明 GS-Rg3 可抑制 TGF- β 1/ERK 通路的激活,见表 3 和图 3。

2.4 各组肿瘤组织中 VEGF-C、VEGF-3 表达水平比较

免疫组化检测结果显示 GS-Rg3 和 SCH772984 的 VEGF-C、VEGF-3 表达水平较模型组低,而 GS-Rg3 组和 SCH772984 组无显著差异,见图 4、图 5 和表 4。

表 3 各组小鼠 TGF- β 1、ERK mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of mRNA and protein expression levels of TGF- β 1 and ERK of the mice in each group

组别 Groups	mRNA		蛋白 Proteins	
	TGF- β 1	ERK	TGF- β 1	p-ERK/ERK
模型组 Model group	4. 62±0. 36	4. 36±0. 32	4. 89±0. 31	0. 24±0. 03
GS-Rg3 组 GS-Rg3 group	2. 49±0. 31 **	2. 55±0. 27 **	2. 95±0. 28 **	0. 11±0. 02 **
SCH772984 组 SCH772984 group	4. 71±0. 34	1. 63±0. 12 **	4. 87±0. 27	0. 07±0. 01 **

注:与模型组比较, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$.

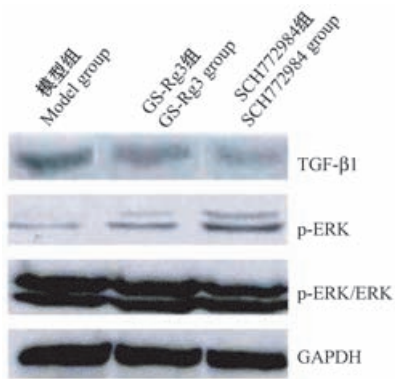


图 3 Western blot 检测各组小鼠中 TGF-β1、p-ERK 和 ERK 蛋白水平

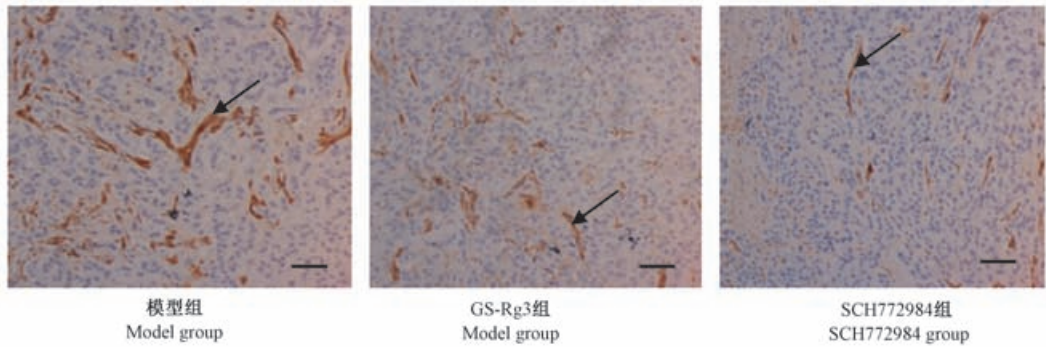
Figure 3 Western blot analysis of TGF-β1, p-ERK and ERK protein levels of the mice in each group

3 讨论

肺癌的发病率及病死率均高居首位,调查显示 2015 年我国肺癌新发病例数达到 73.3 万,死亡病

例高达 61 万,并且其发病率和死亡率仍呈现上升趋势^[6]。虽然随着新的激酶抑制剂药物、放疗新方法被不断应用于临床,肺癌患者的短期疗效有了显著的提升,但是肺癌的复发率和转移情况仍未得到显著的改善,并且对于化疗药物的耐药问题仍未得到有效的解决^[6]。

中药在治疗肿瘤中取得了一定的进展,可能成为治疗肺癌的新方法。人参在中国具有悠久的历史,已经有研究发现人参也具有较好的抗肿瘤作用,人参可以抑制胃癌细胞的生长并促进其凋亡^[7]。分析人参中的抗肿瘤活性成分并探究其抗肿瘤机制是研究的热点,也是将中药在临床上大范围推广的重要手段,GS-Rg3 是人参的主要活性成分之一,可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,从而抑制肿瘤生长和转移,但是关于其对肺癌作用的相关机制的研究还不足^[8-9]。血管以及淋巴管的形成是肿瘤向远端转移的主要途径,目前关于 GS-Rg3 在肿瘤管生成中的研究不多,最近的也有研究显示

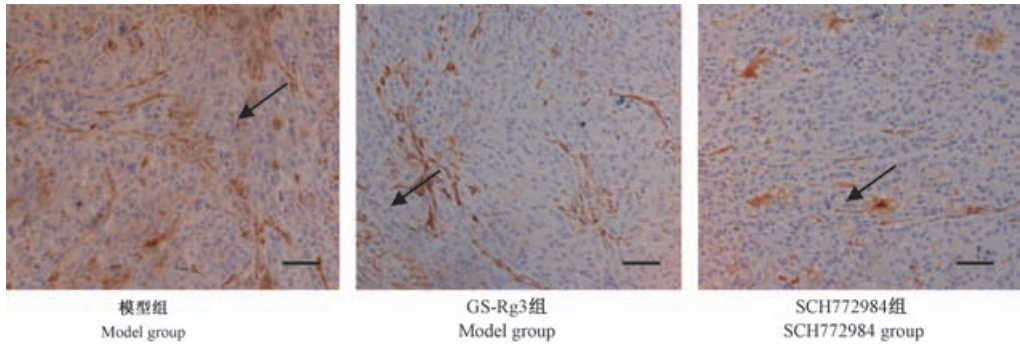


注:箭头所示褐色为 VEGF-C 阳性染色。标尺=20 μm。

图 4 免疫组化检测各组肿瘤组织中 VEGF-C 表达

Note. Arrows indicate the staining of VEGF-C. Bars=20 μm.

Figure 4 Immunohistochemical detection of VEGF-C expression in tumor tissues of each group



注:箭头所示褐色为 VEGF-3 阳性染色。标尺=20 μm。

图 5 免疫组化检测各组肿瘤组织中 VEGF-3 表达

Note. Arrows indicate the staining of VEGF-3. Bars=20 μm.

Figure 5 Immunohistochemical detection of VEGF-3 expression in tumor tissues of each group

表 4 各组小鼠肿瘤组织中 VEGF-C、VEGF-3 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression levels of VEGF-C and VEGF-3 in tumor tissues of the mice in each group

组别 Groups	<i>n</i>	VEGF-C	VEGF-3
模型组 Model group	19	3. 91±1. 22	4. 11±1. 35
GS-Rg3 组 GS-Rg3 group	20	2. 35±1. 02 **	2. 67±1. 10 *
SCH772984 组 SCH772984 group	20	2. 19±0. 99 **	2. 53±1. 03 **

注:与模型组比较, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$ 。
Note. Compared with the model group, * $P<0. 05$, ** $P<0. 01$.

GS-Rg3 也具有抑制血管生成的作用^[10],关于 GS-Rg3 对肿瘤淋巴管形成的影响研究极少。肺癌细胞进入淋巴管是肺癌淋巴转移的主要途径,淋巴转移患者的预后较差,为研究 GS-Rg3 对淋巴管生成的影响,我们建立了人肺癌裸鼠原位移植模型,并分别使用 GS-Rg3 干预,通过 HE 染色监测肿瘤建模情况和淋巴转移情况。结果显示模型组淋巴转移率为 78. 95%,而 GS-Rg3 可显著抑制淋巴转移情况,并且 GS-Rg3 也显著抑制肿瘤的质量和体积。为进一步分析 GS-Rg3 对淋巴管生成的影响,我们使用 podoplanin 蛋白标记淋巴管,结果显示模型组淋巴管较为丰富,而 GS-Rg3 可抑制 podoplanin 蛋白表达水平,减少淋巴管生成。国内已有临床研究显示 GS-Rg3 在治疗中晚期肺癌中的作用^[11],并且也有动物体内实验证实通过纳米材料递送 GS-Rg3 可以抑制小鼠肺癌模型的生长^[12]。国外也有研究显示,GS-Rg3 在异种移植小鼠模型中可以降低肿瘤体积和重量,并通过尾静脉注射显著降低肺组织中的肿瘤转移结节,GS-Rg3 可通过下调 FUT4 介导的 EGFR 失活和阻断 MAPK 和 NF- κ B 信号通路来抑制上皮间充质转化过程和肺癌的侵袭,研究还认为 GS-Rg3 可能是治疗肺癌的潜在有效药物^[13]。此外,Rg3 在异种移植小鼠模型中降低肿瘤体积和重量,并通过尾静脉注射显著降低肺组织中的肿瘤转移结节。戴晓军等^[14]研究也发现了 GS-Rg3 对淋巴管生成中的抑制作用。这说明 GS-Rg3 可以通过抑制肺癌组织中淋巴管的生成抑制淋巴转移。这说明了 GS-Rg3 可以抑制肺癌的生长以及荷瘤裸鼠肿瘤组织中的淋巴管的生成,从而减少了肺癌的淋巴转移。为进一步分析 GS-Rg3 抑制淋巴管生成的机制,使用 ERK 抑制剂 SCH772984 作为阳性对照,分析其对 TGF- β 1/ERK 信号通路和 VEGF 的表达水平的影响。TGF- β 1/ERK 信号通路在肺癌组织中过表达,并可通过调节细胞周期、凋亡以及上皮间充质

转化等相关蛋白促进肺癌的增殖、转移并抑制其凋亡,而抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路可有效的抑制肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡,并且具有抑制肿瘤组织血管生成、淋巴管生成的作用^[15]。VEGF 可以高度特异性的促血管内皮细胞生长,不但可以促进肿瘤组织血管生长,还具有促进迁移侵袭的作用,此外,VEGF 也具有促进淋巴管内皮细胞生长的作用,几乎在所有的肿瘤组织中 VEGF 的表达水平均上调。上调 VEGF 的表达可促进血管和淋巴管的生长从而为肿瘤生长提供养分养料以及促进肿瘤的转移,并且抑制 VEGF 的表达也是有效减少肿瘤生长和抑制肿瘤转移的方法^[16]。本次研究结果显示 SCH772984 可以抑制肺癌原位移植瘤组织中的淋巴管生成,并且 GS-Rg3 和 SCH772984 可以显著抑制 TGF- β 1 和 ERK mRNA 的表达,并且 GS-Rg3 和 SCH772984 可以显著抑制 ERK 磷酸化,抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路转导,并抑制 VEGF-C、VEGF-3 蛋白的表达。TGF- β 1/ERK 信号通路被激活后会促进多种肿瘤相关蛋白的表达,抑制 TGF β 信号通路抑制 VEGF 的表达,从而减少肿瘤细胞浸润^[17]。Liu 等^[18]的研究也发现抑制 ERK 通路也具有抑制 VEGF 表达的作用,从而抑制胰腺癌的血管生成。也有研究显示 VEGF 等蛋白的过表达也可以激活 ERK 等相关通路促进肿瘤细胞的迁移和侵袭引起肿瘤的转移和淋巴转移^[19]。Tang 等^[20]的研究显示 GS-Rg3 可通过抑制 TGF- β /Smad 和 ERK 信号通路在体外抑制瘢痕成纤维细胞增殖以及血管生成,说明 GS-Rg3 具有抑制制 TGF- β 以及 ERK 信号通路的作用。Cao 等^[21]的研究发现 GS-Rg3 可以抑制子宫内异位症大鼠 VEGF 的表达。国内也有研究显示在原代喉鳞癌细胞以及人喉鳞癌裸鼠移植瘤中,GS-Rg3 可以抑制 TGF- β 、VEGF-C 蛋白的表达^[22-23]。这提示在人肺癌裸鼠原位移植中,GS-Rg3 可能通过抑制 TGF- β 1/ERK 信号通路调节 VEGF 的

水平,从而抑制肿瘤组织中淋巴管的生成,从而减少肿瘤的淋巴转移。

综上所述,GS-Rg3 可以通过下调 TGF- β 1/ERK 信号通路的转导水平抑制 VEGF-C、VEGF-3 蛋白的表达,从而抑制淋巴管的生成降低肺癌的淋巴转移率,这提示 GS-Rg3 对于晚期或淋巴转移肺癌的治疗作用。但是关于 GS-Rg3 抑制淋巴管生成的机制和临床效果还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Liu QZ, Xing SP, et al. Inhibiting effect of Endostar combined with ginsenoside Rg3 on breast cancer tumor growth in tumor-bearing mice [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(2): 180-183.
- [2] Sritananuwat P, Sueangoen N, Thummarati P, et al. Blocking ERK1/2 signaling impairs TGF- β 1 tumor promoting function but enhances its tumor suppressing role in intrahepatic cholangiocarcinoma cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 85.
- [3] Park SJ, Choi YS, Lee S, et al. BIX02189 inhibits TGF- β 1-induced lung cancer cell metastasis by directly targeting TGF- β type I receptor [J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(2): 314-322.
- [4] 魏淑珍, 孙宇, 杨志坚, 等. EGFP 标记的人肺癌裸鼠原位移植模型的建立 [J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(7): 670-675.
- [5] 郑玲玲, 李兴普, 徐华, 等. 乳腺癌中 COX-2 表达与微血管密度及微淋巴管密度的相关性 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(1): 98-100.
- [6] 兰蓝, 赵飞, 蔡玥, 等. 中国居民 2015 年恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2018, 39(1): 32-34.
- [7] 钱军, 刘元, 郭成旭, 等. 人参与胃癌 SGC-7901 侧群细胞裸鼠移植瘤生长及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(6): 773-777.
- [8] 严春花, 张大力, 安昌善. 人参皂苷 Rg3 诱导肺癌细胞株凋亡的机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2634-2637.
- [9] 王杰, 余方. 人参皂苷 Rg3 的抗乳腺癌转移作用研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(6): 12-14.
- [10] 刘军, 徐冉, 赵晓昆. 人参皂苷 Rg3 对膀胱癌细胞血管生成相关蛋白的表达及癌细胞生长和转移的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2): 219-225.
- [11] 梁俊燕, 韩秀文. 人参皂苷 Rg3 配合化疗对中晚期非小细胞肺癌患者血清中 TGF- α 、TGF- β 1 和 VEGF 的影响 [J]. *临床肺科杂志*, 2016, 21(9): 1675-1678.

- [12] 人参皂苷 Rg3 和 PEG-PLGA-Rg3 纳米微粒对 Lewis 肺癌小鼠的作用及其机制 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2016, 48(3): 496-501.
- [13] Tian L, Shen D, Li X, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 1619-1632.
- [14] 戴小军, 陆建伟, 王珍, 等. 人参皂苷免疫纳米对人胃癌裸鼠移植瘤生长抑制机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(24): 1935-1939.
- [15] Wu L, Han L, Zhou C, et al. TGF- β 1-induced CK17 enhances cancer stem cell-like properties rather than EMT in promoting cervical cancer metastasis via the ERK1/2-MZF1 signaling pathway [J]. *FEBS J*, 2017, 284(18): 134-137.
- [16] 王来, 朱孟沙, 田君海, 等. Six1 和 TGF- β 及 VEGF-C 在人喉鳞状细胞癌裸鼠移植瘤淋巴转移中的作用 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2016, 30(24): 1960-1964.
- [17] Carbone C, Tamburrino A, Piro G, et al. Combined inhibition of IL1, CXCR1/2, and TGF β signaling pathways modulates in-vivo resistance to anti-VEGF treatment [J]. *Anticancer Drugs*, 2016, 27(1): 29-40.
- [18] Liu Y, Li F, Gao F, et al. Periostin promotes tumor angiogenesis in pancreatic cancer via Erk/VEGF signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40148-40159.
- [19] Andrikopoulos P, Eccles SA, Yaqoob MM. Coupling between the TRPC3 ion channel and the NCX1 transporter contributed to VEGF-induced ERK1/2 activation and angiogenesis in human primary endothelial cells [J]. *Cell Signal*, 2017, 37: 12-30.
- [20] Tang M, Bian W, Cheng L, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits keloid fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen synthesis in vitro via the TGF β /Smad and ERK signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1487-1499.
- [21] Cao Y, Ye Q, Zhuang M, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0186520.
- [22] 张继华, 陈帅, 董凯峰, 等. 人参皂苷 Rg3 对原代人喉鳞癌细胞 SIX1、TGF- β 、VEGF-C 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(7): 1700-1703.
- [23] 张继华, 陈春菊, 宋冬梅, 等. 人参皂甙 Rg3 对人喉鳞癌裸鼠移植瘤中 SIX1、TGF- β 、VEGF-C 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(2): 91-94.

[收稿日期]2019-04-22

张弅宁,靳晓飞,唐敬龙,等. 毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 41-49.

Zhang XN, Jin XF, Tang JL, et al. Effect of calycosin on PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 41-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11.007

毛蕊异黄酮减轻缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤

张弅宁,靳晓飞,唐敬龙,赵艳萌,周晓红,高维娟*

(河北中医学院,河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050091)

【摘要】 目的 探讨毛蕊异黄酮(calycosin)对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤的影响。**方法** 采用缺氧缺糖/复氧复糖(OGD/R)模型,将 PC12 细胞随机分为 5 组:正常对照组(control 组),缺氧缺糖/复氧复糖组(model 组),毛蕊异黄酮高、中、低剂量(0.140 μmol/L、0.070 μmol/L、0.035 μmol/L)组。倒置显微镜观察细胞形态变化;CCK-8 法检测细胞活力;LDH 法检测细胞乳酸脱氢酶漏出率;PI 荧光染色检测细胞膜完整性;免疫组化法检测 caspase-3 表达;Bax、Bcl-2 免疫荧光法检测细胞凋亡情况。**结果** Control 组细胞生长状态良好;与 control 组比较,model 组细胞数量减少,突触减少,细胞出现皱缩,胞膜破坏,细胞活性显著降低($P < 0.05$),乳酸脱氢酶漏出率显著升高($P < 0.05$),PI 红染细胞数增多($P < 0.05$),caspase-3 表达明显升高($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著升高($P < 0.05$);与 model 组比较,calycosin 中、低剂量组细胞数量均增多,突触增多,细胞较为规整,细胞活性显著提高($P < 0.05$),乳酸脱氢酶漏出率显著降低($P < 0.05$),PI 红染细胞数减少($P < 0.05$),caspase-3 表达显著降低($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 比值显著降低($P < 0.05$),且以上指标中剂量组效果更加显著;而高剂量组与模型组比较,以上指标差异均不明显($P > 0.05$)。**结论** 毛蕊异黄酮可优化缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞生长状态,提高细胞活力,抑制乳酸脱氢酶漏出,并通过降低 caspase-3 表达和 Bax/Bcl-2 比值抑制细胞凋亡,有效减轻细胞损伤,发挥保护作用。

【关键词】 毛蕊异黄酮;缺血性脑卒中;缺氧缺糖/复氧复糖;细胞凋亡;PC12 细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0041-09

Effect of calycosin on PC12 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation

ZHANG Xuening, JIN Xiaofei, TANG Jinglong, ZHAO Yanmeng, ZHOU Xiaohong, GAO WeiJuan*
(Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease,
Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of calycosin on the injury of oxygen and glucose deprivation/reoxygenation PC12 cells. **Methods** PC12 cells were randomly divided into 5 groups: control group; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) (model group); and high, medium, and low (0.140 μmol/L, 0.070 μmol/L, 0.035 μmol/L) dose groups of calycosin. The CCK-8 method was used to detect cell viability, the lactate dehydrogenase

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873180);河北省中医药管理局科研计划项目(2019093);河北省教育厅青年基金项目(QN2018059);河北省研究生创新资助项目(CXZZSS2019066);河北中医学院优秀青年教师基础研究计划项目(YQ2018005);河北中医学院青年教师科研基金项目(QNZ2018001)。

【作者简介】 张弅宁(1990—),女,硕士研究生,专业:中西医结合临床。E-mail: 1142551926@qq.com

【通信作者】 高维娟(1966—),女,博士生导师,教授,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail: gwj6088@163.com

leakage rate in cells was determined with the LDH method, cell morphology was observed with an inverted microscope, cell membrane integrity was detected with PI fluorescence staining, caspase-3 expression was detected by immunohistochemistry, and Bax and Bcl-2 immunofluorescence staining was used to detect apoptosis. **Results** The cells in the control group grew well. Compared with the control group, the number of cells in the model group decreased, the cells appeared to shrink, cell membranes were destroyed, cell activity decreased significantly ($P < 0.05$), the lactate dehydrogenase leakage rate was significantly increased ($P < 0.05$), the number of PI red-stained cells increased significantly ($P < 0.05$), the expression of caspase-3 was significantly increased ($P < 0.05$), and the ratio of Bax/Bcl-2 increased significantly ($P < 0.05$). There were no significant differences observed between the model group and the high dose group ($P > 0.05$). However, the number of cells in the middle and low dose groups increased, the cells showed regular morphology, the membrane damage was reduced ($P < 0.05$), the cell viability was significantly increased ($P < 0.05$), the lactate dehydrogenase leakage rate was significantly decreased ($P < 0.05$), the number of PI red-stained cells decreased ($P < 0.05$), the expression of caspase-3 was significantly decreased ($P < 0.05$), and the ratio of Bax/Bcl-2 was significantly lower ($P < 0.05$). The changes in the above indicators were more significant in the middle dose group, with the differences between the high dose group and the model group not reaching statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusions** Calycosin can optimize the growth status of PC12 cells following injury through oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, improve cell viability, inhibit lactate dehydrogenase leakage, and inhibit cell apoptosis by reducing caspase-3 expression and the Bax/Bcl-2 ratio, effectively alleviating cell damage and playing a protective role.

【Keywords】 calycosin; ischemic stroke; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); apoptosis; PC12 cell

脑卒中(stroke)发病率逐年攀升,发病人群已经出现年轻化趋势,严重影响着居民身体健康和生 活质量,给患者家庭和社会造成了沉重的经济负担。脑卒中可分缺血性脑卒中和出血性脑卒中两大类,其中缺血性脑卒中更为多见。溶栓治疗是缺血性脑卒中的首选治疗方法,由于溶栓后缺血血管的再灌注,会给患者带来再次损伤,故疗效不佳。因此,寻求特效药物已成为防治缺血性脑卒中的研究重点。目前,临床上应用中药黄芪治疗缺血性脑卒中已取得良好效果,但其具体药效成分尚未完全证实,亟待探究。毛蕊异黄酮(calycosin)是黄芪黄酮类的有效单体成分,研究发现毛蕊异黄酮具有抗氧化、抗炎、抗病毒、保肝、延缓衰老等生物作用^[1],但其在缺血性脑卒中方面尚缺乏研究。本实验采用缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞模型,模拟神经元体外缺血再灌注的环境,在细胞水平,探讨毛蕊异黄酮对缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞损伤的影响,为筛选黄芪治疗缺血性脑卒中的药效成分提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PC12 细胞(大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系,经过神经生长因子 NGF 处理后具有神经元的相关特性)购自 Boster 公司。

1.2 主要试剂与仪器

毛蕊异黄酮购自上海士峰生物制品有限公司,20 mg/瓶,纯度 $\geq 98\%$; CCK-8 试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; Bcl-2 抗体、Bax 抗体、DAPI 染色剂、Cy3 和 Alexa Fluor488 荧光二抗均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; PI 染色剂购自美国 Sigma 公司; caspase-3 抗体购自 Gene Tex 公司; LDH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 青链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM 高糖培养液、胰蛋白酶购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司; Earle's 平衡盐溶液购自安徽雷根生物技术有限公司; 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。

SW-CJ-ID 型超净工作台购自苏州净化公司; Axio Observer 7 型倒置荧光显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司; DPX-9052B-1 型电热恒温培养箱购自上海福玛实验设备有限公司; 3111 型二氧化碳(CO_2)培养箱、Multiskan FC 型酶标仪、3131 型三气培养箱均购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及 PC12 细胞模型的建立

将 PC12 细胞随机分为 5 组: 正常对照组(control 组)、缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)组(model 组)、毛蕊异黄酮高剂量($0.140 \mu\text{mol/L}$)组、毛蕊异

黄酮中剂量(0.070 $\mu\text{mol/L}$)组、毛蕊异黄酮低剂量(0.035 $\mu\text{mol/L}$)组。正常对照组采用 DMEM 培养液(10%胎牛血清)于 CO_2 培养箱内正常培养,其余各组细胞均建立缺氧缺糖/复氧复糖细胞模型:用无糖 Earle's 平衡盐溶液替代 DMEM 培养液,置于三气培养箱(94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2)内培养 2 h,即氧、糖剥夺 2 h,之后模型组更换为 DMEM 培养液,给药组则更换为含有不同浓度毛蕊异黄酮(0.140 $\mu\text{mol/L}$ 、0.070 $\mu\text{mol/L}$ 、0.035 $\mu\text{mol/L}$)的培养液,放入 CO_2 培养箱内继续培养 24 h,即复氧复糖 24 h。

1.3.2 CCK-8 法检测各组细胞活性

各组细胞以 $1 \times 10^6/\text{L}$ 的密度接种于 96 孔板,OGD/R 造模和给药处理后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于 CO_2 培养箱中孵育 50 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值。OD 值越大,细胞活性越强。细胞存活率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.3.3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率

造模和给药处理后,取出各组细胞,按照 LDH 试剂盒操作步骤,在 96 孔板中分别加入各组细胞上清液和 LDH 试剂,充分混匀,室温静置 5 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值,此为细胞上清液中的 LDH 含量。之后向原含有细胞的培养板内加入 1% Tritonx-100,室温破膜 20 min 后,取细胞培养液和 LDH 试剂混匀,室温静置 5 min,酶标仪检测各孔 450 nm 波长下的吸光(OD)值,此为细胞破膜液 LDH 释放量。LDH 漏出率(%)=上清 LDH/(上清 LDH+细胞破膜液 LDH) $\times 100\%$ 。

1.3.4 PI 荧光染色观察各组细胞膜完整性

配制 PI 工作液 20 $\mu\text{g/mL}$ 于 PBS 中,避光配置,现配现用,取出各组细胞爬片,PBS 清洗 1 min $\times 3$ 次,加入 PI 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温培养箱中避光孵育 30 min,PBS 清洗 5 min $\times 3$ 次,待细胞爬片稍干后,封片,红染的细胞为阳性细胞,荧光显微镜下随机选取 6 个视野,观察各组细胞的荧光表达。PI 阳性细胞发生率=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 免疫组化法检测各组细胞 caspase-3 表达

细胞传代时,进行细胞爬片预培养,之后给予造模给药处理,取出各组细胞爬片,用含 4%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液固定 25 min,室温干燥 5 min,PBS 清洗 2 min $\times 3$ 次,待爬片甩干后,每个爬片滴加 50~100 μL 0.2% Triton X-100 细胞破膜液,室温破

膜 20 min,5%山羊血清封闭 20 min,甩掉封闭液后,滴加 caspase-3 单克隆抗体(1:600),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗去一抗,滴加山羊抗兔 IgG(1:200)二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min,洗去二抗,DAB 显色 15 min,苏木素复染 10 min,脱水,透明,封片。显微镜下随机选取 6 个视野,采用 Image J 软件分析 caspase-3 平均光密度值,用积分光密度 IOD/Area 表示。

1.3.6 免疫荧光法检测各组细胞 Bax、Bcl-2 表达

各组细胞爬片、固定、破膜同上述免疫组化步骤,各组细胞破膜后,加 4% BSA 室温封闭 30 min,甩掉封闭液后,滴加 Bax 抗体(1:100)和 Bcl-2 抗体(1:100)50~100 μL 于爬片上,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗去一抗,滴加山羊抗小鼠 IgG(1:300)和驴抗兔 IgG(1:200)二抗,室温避光孵育 60 min,洗去二抗,滴加 DAPI 染液室温避光 10 min,封片,荧光显微镜下随机选取 6 个视野,观察各组细胞的荧光表达。Bax 为红色荧光,Bcl-2 为绿色荧光,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 Bax 与 Bcl-2 的荧光强度值,并计算 Bax/Bcl-2 比值。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,各组数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

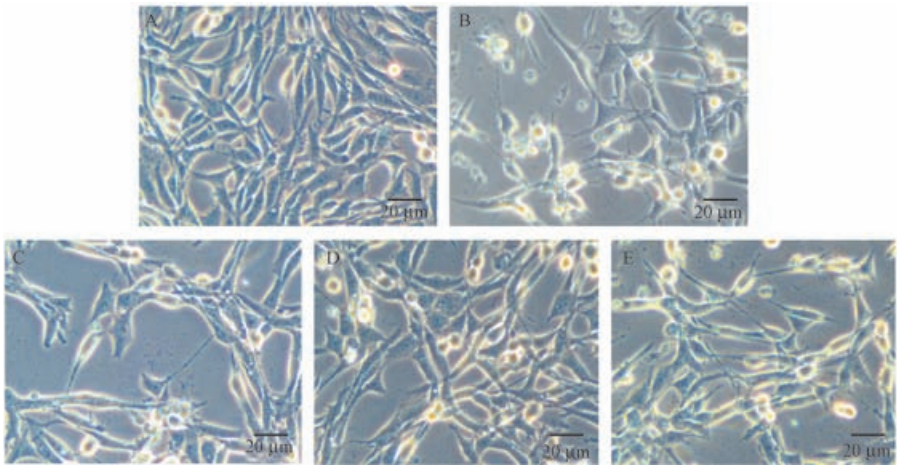
2 结果

2.1 倒置显微镜观察各组细胞形态

Control 组细胞形态饱满,折光性较好;与 control 组相比,OGD/R 处理后,PC12 细胞的折光性降低,突触减少,细胞干瘪,细胞数量减少;与 model 组相比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组显著改善 OGD/R 诱导的细胞损伤,PC12 细胞突触增多,胞体变圆,且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞恢复较好;calycosin 高剂量组与 model 组相比无明显差异。见图 1。

2.2 CCK-8 法检测各组细胞活性

与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞的活性明显降低($P < 0.05$);与 model 组对比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可显著提高 OGD/R 诱导的 PC12 细胞活性($P < 0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞活性较高($P < 0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组对比无显著性差异($P > 0.05$)。见图 2。

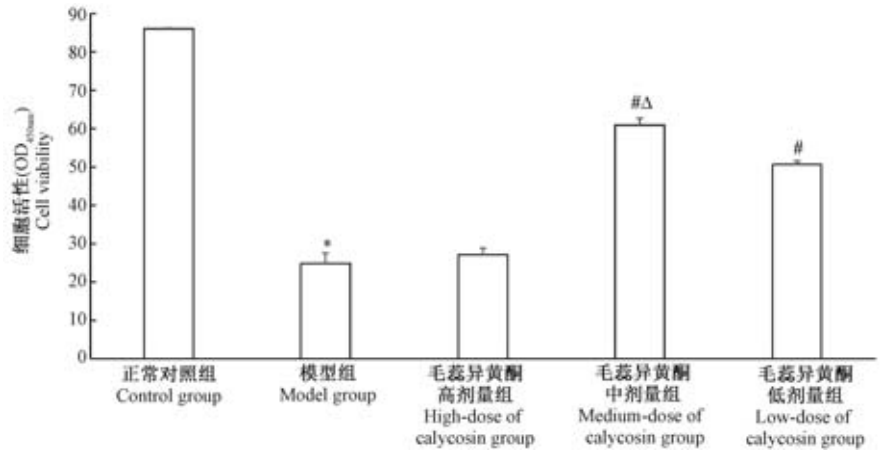


注:A:正常对照组;B:模型组;C:毛蕊异黄酮高剂量组;D:毛蕊异黄酮中剂量组;E:毛蕊异黄酮低剂量组。

图 1 倒置显微镜下观察各组细胞形态(×400)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group.

Figure 1 Observation of cell morphology in each group under an inverted microscope



注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比,Δ $P<0.05$ 。

图 2 CCK-8 法检测各组细胞活性($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 2 Cell viability was determined in each group with CCK-8

2.3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率

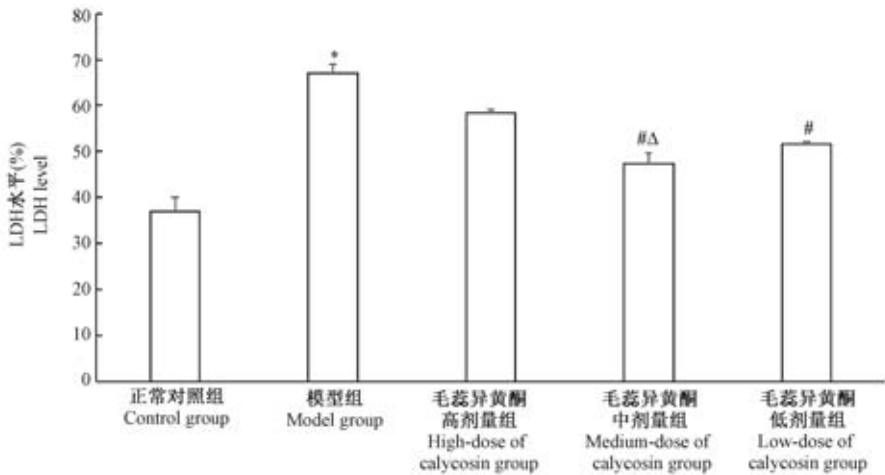
与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞的乳酸脱氢酶漏出率明显提高($P<0.05$);与 model 组对比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可显著降低 OGD/R 诱导的 PC12 细胞乳酸脱氢酶漏出率($P<0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组乳酸脱氢酶漏出率较低($P<0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组对比无显著性差异($P>0.05$)。见图 3。

2.4 PI 荧光染色观察各组细胞胞膜完整性

PI 是一种不透膜的红色荧光染料,不能通过活细胞膜,但却能穿过破损的细胞膜而对核染色。与 control 组相比,OGD/R 处理后,PC12 细胞红染数明显增多($P<0.05$);与 model 组相比,calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组红染细胞数减少($P<0.05$),且与 calycosin 低剂量组相比,calycosin 中剂量组细胞红染数较少($P<0.05$);calycosin 高剂量组与 model 组相比无明显差异($P>0.05$)。见图 4。

2.5 免疫组化法检测各组细胞 caspase-3 表达

与 control 组相比,OGD/R 处理后 PC12 细胞

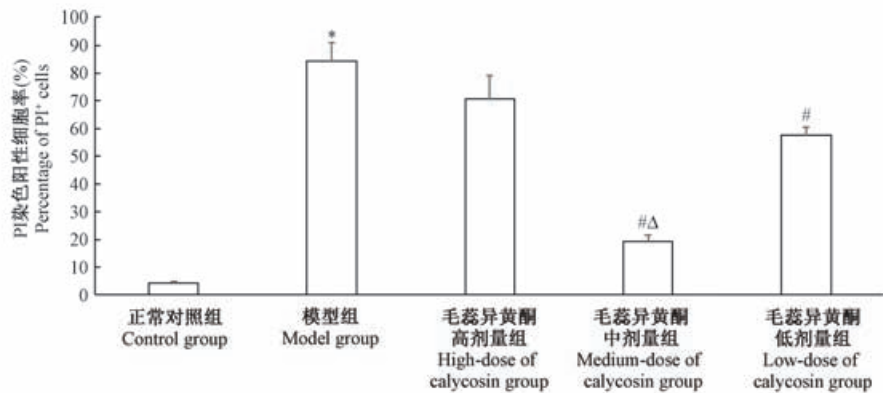
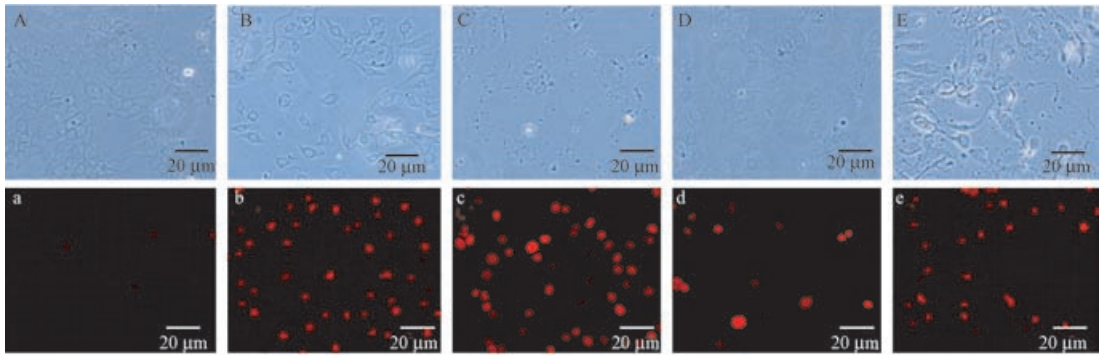


注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 3 LDH 法检测各组细胞乳酸脱氢酶漏出率 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, $\Delta P<0.05$.

Figure 3 Detection of the lactate dehydrogenase leakage rate with LDH



注:A、a;正常对照组;B、b:模型组;C、c:毛蕊异黄酮高剂量组;D、d:毛蕊异黄酮中剂量组;E、e:毛蕊异黄酮低剂量组。A~E:倒置荧光显微镜相差下拍摄图片($\times 400$);a~e:倒置荧光显微镜下拍摄的荧光图片($\times 400$)。与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 4 PI 荧光染色检测各组细胞膜完整性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A & a, Control group. B & b, Model group. C & c, High-dose of calycosin group. D & d, Medium-dose of calycosin group. E & e, Low-dose of calycosin group. A-E, Pictures taken under inverted fluorescence microscope with phase difference. a-e, Fluorescent images taken under inverted fluorescent microscope. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, $\Delta P<0.05$.

Figure 4 PI fluorescence staining to detect cell membrane integrity in each group

caspase-3 表达显著升高 ($P<0.05$); 与 model 组相比, calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组可明显减少 caspase-3 表达 ($P<0.05$), 且与 calycosin 低剂量组相比, calycosin 中剂量组 caspase-3 表达较低 ($P<0.05$); calycosin 高剂量组与 model 组对比差异不明显 ($P>0.05$)。见图 5。

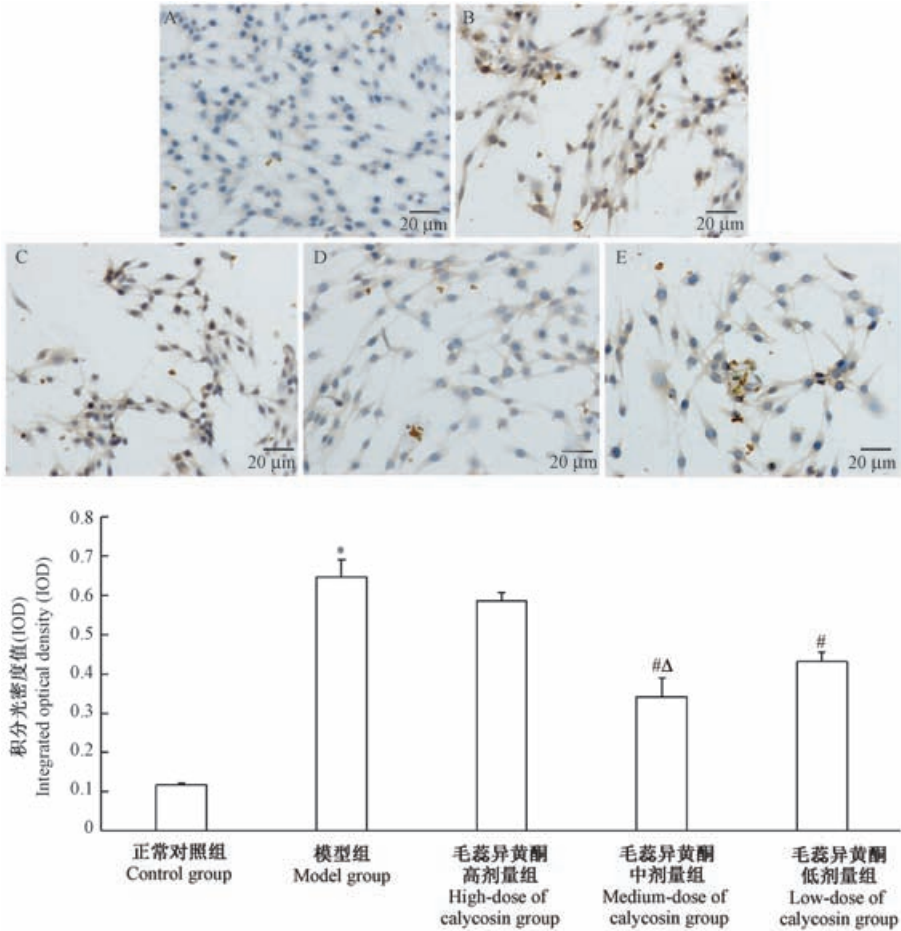
2.6 免疫荧光法检测各组细胞 Bax、Bcl-2 表达

与 control 组相比, OGD/R 处理后, 细胞出现凋亡, Bax/Bcl-2 比值明显升高 ($P<0.05$); 与 model 组相比, calycosin 中剂量组和 calycosin 低剂量组 Bax/Bcl-2 比值明显降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡程度减轻, 且与 calycosin 低剂量组相比, calycosin 中剂量组降低更明显 ($P<0.05$); calycosin 高剂量组与 model 组

对比无显著差异 ($P>0.05$)。见图 6。

3 讨论

目前, 早期恢复血流是治疗缺血性脑卒中的最好方法, 但恢复血液供应也可能加剧缺血组织损伤, 产生较为严重的病理反应——脑缺血再灌注损伤, 其发生机制主要涉及细胞凋亡、钙超载、氧化应激、炎症反应等因素^[2], 各因素之间相互作用, 致使脑组织产生不可逆性损伤。脑缺血后再灌注引起的迟发型神经细胞死亡多以细胞凋亡为主, 在线粒体调控的细胞凋亡途径中, Bcl-2 蛋白家族发挥着关键作用, caspase-3 在启动线粒体途径细胞凋亡过程中扮演着重要角色。Bcl-2 家族蛋白可以与孔蛋白

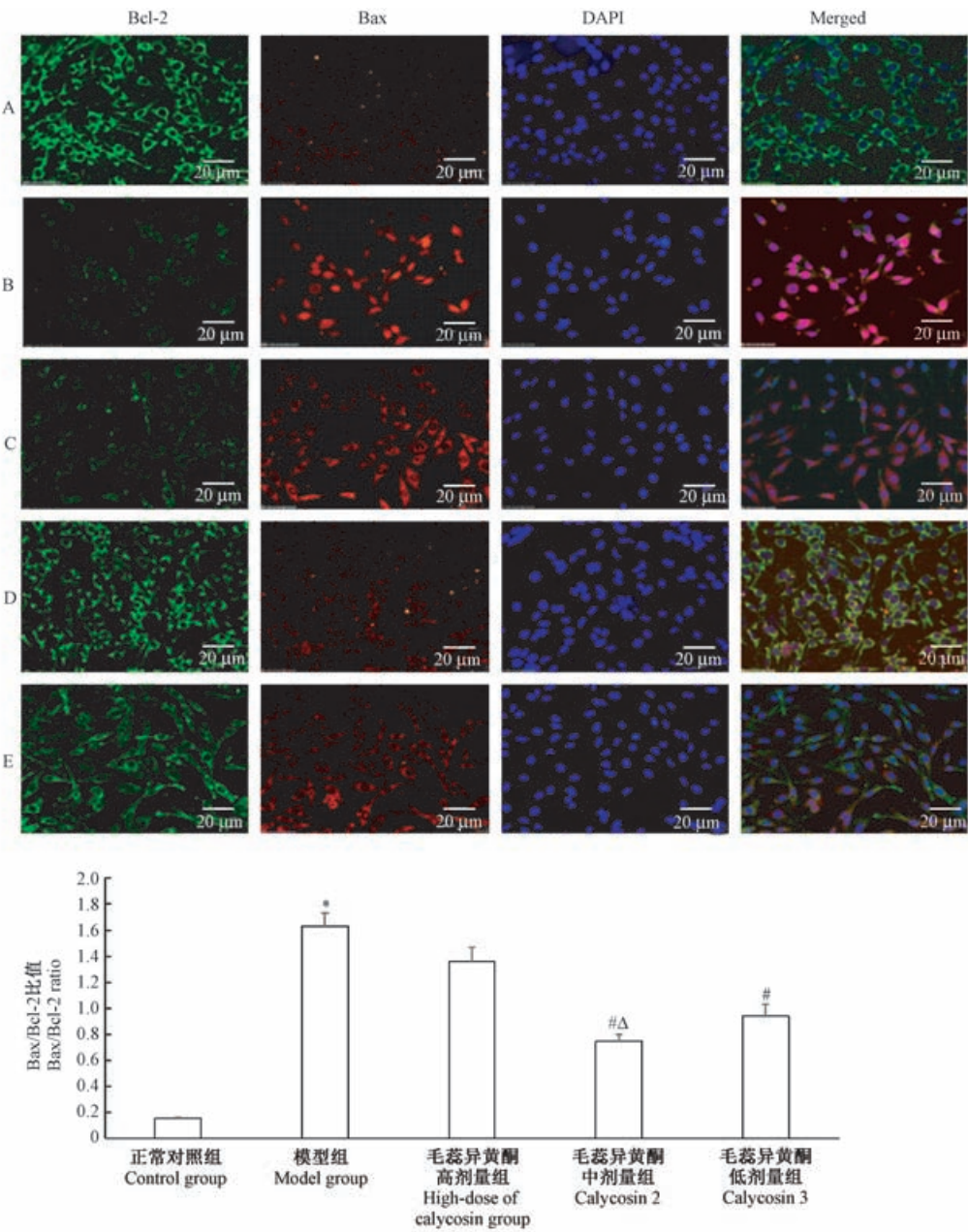


注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: 毛蕊异黄酮高剂量组; D: 毛蕊异黄酮中剂量组; E: 毛蕊异黄酮低剂量组。与对照组相比, * $P<0.05$; 与模型组相比, # $P<0.05$; 与毛蕊异黄酮低剂量组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 5 免疫组化法观察各组细胞 caspase-3 表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 5 Immunohistochemical staining for caspase-3 expression in each group



注:A:正常对照组;B:模型组;C:毛蕊异黄酮高剂量组;D:毛蕊异黄酮中剂量组;E:毛蕊异黄酮低剂量组。绿色荧光:Bcl-2;红色荧光:Bax;蓝色荧光:DAPI。与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$;与毛蕊异黄酮低剂量组相比,Δ $P<0.05$ 。

图6 免疫荧光染色检测各组细胞 Bax 和 Bcl-2 的比值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, High-dose of calycosin group. D, Medium-dose of calycosin group. E, Low-dose of calycosin group. Green fluorescence, Bcl-2. Red fluorescence, Bax. Blue fluorescence, DAPI. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with the low-dose of calycosin group, Δ $P<0.05$.

Figure 6 Detection of the Bax/Bcl-2 ratio by immunofluorescence staining

相互作用,使位于线粒体内、外膜的通透转换孔 PTP 开放,大量的有机溶质进入细胞内,导致线粒体内膜膨胀破裂,CytC、AIF 等释放入胞质,激活 caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡^[3]。Bax、Bcl-2 是 Bcl-

2 蛋白家族的重要成员,当细胞受到缺血等刺激时,位于胞质中的 Bax 向线粒体膜聚集,促使线粒体膜通透性改变,进而释放 CytC,诱导 caspase-3 活化,引起细胞凋亡;而 Bcl-2 作为一种与线粒体相关的膜

稳定蛋白,能够维持和保护膜的稳定性,与 Bax 形成异源二聚体,抑制 caspase-3 活化,阻止细胞凋亡的发生^[4,5]。

中药黄芪是临床常用补气要药,始载于《神农本草经》,具有保元补虚、益卫固表、利尿消肿的功效。大量医籍记载和实验发现,黄芪不仅具有补气保元的作用,还具有良好的活血化瘀之功。古代医家根据中医“气为血之帅”、“血为气之母”、“气能生血”、“气行则血行”等理论,常以黄芪配伍成方,治疗中风之半身不遂后遗症。补阳还五汤即为治疗中风的代表方剂,重用君药黄芪,意在气旺则血行,瘀去则络脉通畅,在临床上应用至今,尤其在治疗缺血性中风方面疗效显著^[6-10]。现代药理学研究发现,黄芪的主要活性成分包括黄酮、皂苷、多糖三大类成分^[11]。研究者通过大量离体或在体实验,对黄芪主要活性成分进行了深入研究,发现黄芪三大主要成分在抗炎、抗氧化、调控自噬、调节血压、促进干细胞增值、改善认知功能障碍等方面均发挥着重要作用,其中黄芪黄酮类成分更是受到越来越多的关注^[12-15]。

黄芪黄酮类化合物主要包括异黄酮、黄酮、异黄酮烷和紫檀烷四大类,毛蕊异黄酮(calycosin)是异黄酮类代表性有效单体成分,是检测黄芪质量的重要参考指标,具有抗氧化、促进细胞增殖、延缓衰老、抗炎、抗心肌肥厚等生物作用。LIU 等^[16]采用 B3LYP 方法对黄芪中毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷 4 种成分进行了研究,发现毛蕊异黄酮的抗氧化活性最为显著,其抗氧化性明显高于其它 3 种成分。朱嘉欢等^[17,18]研究表明毛蕊异黄酮与阿魏酸、黄芪甲苷、芒柄花素联合应用时,可以明显降低衰老造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)衰老时细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达水平,能够抑制 HSCs 衰老和促进其增殖。赵海鹏等^[19]研究发现,毛蕊异黄酮可通过激活 AMPK 通路,抑制炎症因子 IL-6 和 IL-8 活性和 NF- κ B 的过度激活,从而减轻 PM2.5 诱导的小鼠肺泡上皮细胞系 MLE12 细胞损伤和炎症反应。

毛蕊异黄酮作为黄芪黄酮类的重要有效单体成分,在抗氧化、抗炎、促进细胞增殖、延缓衰老等方面均有应用,但是目前尚缺乏毛蕊异黄酮防治缺血性脑卒中方面的研究,亟需探索。本研究通过体外实验,建立 PC12 细胞的缺氧缺糖/复氧复糖(OGD/R)模型模拟神经细胞缺血再灌注环境,在细

胞水平,探讨了不同剂量(高剂量 0.140 μ mol/L、中剂量 0.070 μ mol/L、低剂量 0.035 μ mol/L)毛蕊异黄酮对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤的影响。实验结果显示,毛蕊异黄酮中、低剂量组可明显提高 OGD/R 诱导的 PC12 细胞活力,降低乳酸脱氢酶漏出率,有效改善 OGD/R 引起的 PC12 细胞皱缩、膜破坏等现象,降低促凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax 表达,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,从而显著减轻 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤,其中毛蕊异黄酮中剂量组效果更为显著,而高剂量组与模型组比较无明显差异。表明毛蕊异黄酮可优化缺氧缺糖/复氧复糖 PC12 细胞生长状态,提高细胞存活率,抑制细胞凋亡,发挥保护作用,且其药物作用无剂量依赖性。目前,毛蕊异黄酮减轻 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤是本课题组针对毛蕊异黄酮在防治缺血性脑卒中方面的一个初步探讨,其具体作用机制尚不明朗,本课题组将继续深入探讨毛蕊异黄酮拮抗脑缺血再灌注损伤、发挥神经保护作用的分子机制,为黄芪治疗缺血性脑卒中药效成分的筛选提供更有力的实验依据。

参考文献:

- [1] Li S, Zhou XL, Dang YY, et al. Basal FIt1 tyrosine kinase activity is a positive regulator of endothelial survival and vascularization during zebrafish embryogenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(2): 373-384.
- [2] Wang J, Han D, Sun M, et al. Cerebral ischemic postconditioning induces autophagy inhibition and a HMGB1 secretion attenuation feedback loop to protect against ischemia reperfusion injury in an oxygen glucose deprivation cellular model [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4162-4172.
- [3] Yatsushige H, Ostrowski RP, Tsubokawap T, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. J Neurosci Res, 2007, 85(7): 1436-1448.
- [4] Roth JM. Recombinant tissue plasminogen activator for the treatment of acute ischemic stroke [J]. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2011, 24(3): 257-259.
- [5] Zhou F, Gao S, Wang L, et al. Human adipose -derived stemcells partially rescue the stroke syndromes by promoting spatial learning and memory in mouse middle cerebral artery occlusion mode [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6(1): 92-103.
- [6] 丛文杰, 洪显钗, 金珍珍, 等. 补阳还五汤辅助针灸治疗对中风神经功能的影响研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 217-219.
- [7] Auyeung KK, Han QB, Ko JK. Astragalus membranaceus: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(1): 1-22.
- [8] 傅晓燕, 雷珊珊, 李雄英. 黄芪配方颗粒对衰老大鼠认知功

能的影响及机制初探 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1184-1189.

[9] Bao H, Sun D, Qi P, et al. Astragaloside protects oxygen and glucose deprivation induced injury by regulation of microRNA-21 in retinal ganglion cell line RGC-5 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1826-1833.

[10] Yu W, Lv Z, Zhang L, et al. Astragaloside IV reduces the hypoxia-induced injury in PC-12 cells by inhibiting expression of miR-124 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 419-425.

[11] 李延勋, 栗章彭, 颜世利, 等. 膜荚黄芪化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2601-2607.

[12] Li Y, Yang Y, Zhao Y, et al. Astragaloside IV reduces neuronal apoptosis and parthanatos in ischemic injury by preserving mitochondrial hexokinase-II [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 251-263.

[13] Hu H, Yang R, Jin G, et al. Effect of astragaloside IV on neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease rat models [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 3106980.

[14] 王洪军, 于淼, 王云鹤, 等. 黄芪总黄酮对柯萨奇 B3 病毒感染心肌细胞内质网应激及促凋亡信号因子作用 [J]. 临床心

血管病杂志, 2016, 32(1): 70-73.

[15] 张怡, 周晓红, 靳晓飞, 等. 黄芪甲苷通过抑制细胞凋亡减轻缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 46-51.

[16] 刘靖丽, 于海东, 梁艳妮. 中药黄芪中黄酮类化合物抗氧化活性的 DFT 研究 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(1): 39-43.

[17] 朱嘉欢, 黄小平, 邓常清, 等. 黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究 [J]. 中草药, 2018, 50(1): 111-119.

[18] Li F, Tang R, Chen LB, et al. Effects of astragalus combined with angelica on bone marrow hematopoiesis suppression induced by cyclophosphamide in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(5): 598-609.

[19] 赵海鹏, 李小平, 雒晶晶, 等. 毛蕊异黄酮对 PM2.5 介导炎症反应的作用及其机制 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38(11): 2147-2152.

[收稿日期] 2019-06-19

(上接第 33 页)

[11] Virgilio E, Giarnieri E, Giovagnoli MR, et al. Long non-coding RNAs in the gastric juice of gastric cancer patients [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(9): 1239-1246.

[12] Agirre X, Meydan C, Jiang Y, et al. Long non-coding RNAs discriminate the stages and gene regulatory states of human humoral immune response [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 821.

[13] Shen X, Zhong J, Yu P, et al. YY1-regulated LINC00152 promotes triple negative breast cancer progression by affecting on stability of PTEN protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(2): 448-454.

[14] Ma P, Wang H, Sun J, et al. LINC00152 promotes cell cycle progression in hepatocellular carcinoma via miR-193a/b-3p/CCND1 axis [J]. Cell Cycle, 2018, 17(8): 974-984.

[15] 高聪, 林大勇, 韩勇, 等. 罗哌卡因对结肠癌细胞增殖和裸鼠人结肠癌皮下瘤生长的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(4): 558-563.

[16] 于福华, 贾志凡, 浦佩玉, 等. YAP 调控人胶质瘤细胞生长的体外研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(11): 689-692.

[17] Fan F, He Z, Kong LL, et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(352): 352ra108.

[18] Yuan WC, Pepe-Mooney B, Galli GG, et al. NUAK2 is a critical YAP target in liver cancer [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4834.

[19] Zhang X, Li Y, Ma Y, et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1 α and sustains HIF-1 α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 216.

[20] Meng Z, Qiu Y, Lin KC, et al. RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway [J]. Nature, 2018, 560(7720): 655-660.

[收稿日期] 2019-04-24

管博文,卢延华,苏路路,等. 亚致死剂量 γ -射线全身照射对小鼠造血免疫功能远期影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (11): 50-57,64.

Guan BW, Lu YH, Su LL, et al. Long-term effects of a sublethal γ -ray total body irradiation on the long-term hematopoietic immune function in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 50-57,64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11.008

亚致死剂量 γ -射线全身照射对小鼠造血免疫功能远期影响

管博文¹, 卢延华¹, 苏路路¹, 李程程¹, 荆学双², 董银萍², 王月英²,
李德冠^{2*}, 孟爱民^{1*}

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021; 2.中国医学科学院/北京协和医学院放射医学研究所,天津市放射医学与分子核医学重点实验室,天津 300192)

【摘要】 目的 观察 4 Gy、6 Gy 全身照射后 6 个月 C57BL/6 J 小鼠的造血和免疫等功能指标变化。**方法** 对 8~12 周的 C57BL/6 J 小鼠分别进行 4 Gy 和 6 Gy 全身照射,照射 6 个月后检测外周血细胞计数及分类、胸腺系数及脾系数、外周血及脾免疫细胞分型、脾 T 细胞 p16 表达水平。**结果** 照射后 6 个月外周血白细胞、红细胞计数仍然明显低于对照组。血小板与对照组无明显差异。外周血细胞分类结果显示照射组小鼠中性粒细胞比例升高、淋巴细胞比例下降,呈现细胞分化偏移现象。与对照组相比,6 Gy 照射后 6 个月,胸腺系数明显降低($P<0.05$)。脾系数无差异。外周血流式分析,结果显示 4 Gy、6 Gy 照射后,B 淋巴细胞、NK 细胞仍然低于对照组,提示受照后 6 个月未完全恢复。受照组 CD4 比例高于对照组。CD8、单核细胞与对照组未见差异。脾免疫细胞进行流式分析,结果显示 4 Gy 和 6 Gy 照射后 6 个月,B220 对于对照组均有明显下降,均具极显著性差异($P<0.01$)。相比于对照组,6 Gy 组脾 T 细胞 p16 表达有升高的趋势,但无显著性差异。**结论** 亚致死剂量照射后 6 个月各项检测基本恢复,但是外周血分类中性粒持续升高,胸腺系数及外周血、脾 B 淋巴细胞比例仍低于对照组。提示可能有远期损伤。本项实验数据为中高剂量照射后造血免疫功能长期损伤研究提供了基础数据。

【关键词】 亚致死剂量照射;远期;外周血细胞计数;免疫脏器;免疫分型;小鼠
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0050-08

Long-term effects of a sublethal γ -ray total body irradiation on the long-term hematopoietic immune function in mice

GUAN Bowen¹, LU Yanhua¹, SU Lulu¹, LI Chengcheng¹, JING Xueshuang², DONG Yinpings², WANG Yueying²,
LI Deguan^{2*}, MENG Aimin^{1*}

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS);
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of

【基金项目】 国家自然科学基金(81372928,81573094);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-3-015);国家重点研发计划(2017YFA0105200);国家自然科学基金(81703170)。

【作者简介】 管博文(1992—),男,技师,研究方向:比较医学。E-mail: 872724882@qq.com

【通信作者】 孟爱民(1963—),女,研究员,博士生导师,研究方向:比较医学。E-mail: ai_min_meng@126.com

李德冠(1982—),男,副研究员,研究方向:放射生物学、实验动物学。E-mail: ldguan@163.com * 共同通信作者

Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing100021, China. 2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) and Peking Union Medical College (PUMC); Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192)

【Abstract】 Objective To observe the changes in hematopoietic and immune function at 6 months post 4 Gy or 6 Gy γ -ray total body irradiation (TBI) in C57BL/6 J mice. **Methods** C57BL/6 J mice of 8–12 weeks of age were irradiated with 4 Gy or 6 Gy TBI. At 6 months after irradiation exposure, the peripheral blood cell count and classification, immune organ coefficient, immune phenotyping of the peripheral blood and spleen cells, and expression level of splenic T cell p16 were detected. **Results** Six months after irradiation exposure, the peripheral blood leukocyte and red blood cell count in the mice exposed to TBI remained significantly lower than those in the control group. There was no significant difference in the count of platelets in the irradiated mice compared to the control group. The result of the peripheral blood cell classification showed that the proportion of neutrophils in the irradiated mice group increased and the proportion of lymphocytes decreased, indicating a skew in blood cell differentiation. Compared with the control group, the thymus coefficient in the irradiated mice was significantly decreased at 6 months post 6 Gy TBI ($P < 0.05$). There was no significant difference in the spleen coefficient. Phenotyping of the peripheral blood cells was performed by flow cytometry. The result showed that the proportion of B lymphocytes and NK cells in the irradiated mice remained lower than those in the control group, while the proportion of CD4 lymphocytes in the irradiated group was higher than that in the control group. There was no significant difference between CD8 lymphocytes and monocyte levels in the irradiated group compared with the control group. The proportion of B220 cells was clearly decreased in the irradiated mice compared with the control group based on the splenic immune phenotyping assay ($P < 0.01$). Compared with the control group, the expression of p16 in the splenic T cells of the 6 Gy TBI mice was increased but not significantly ($P > 0.05$). **Conclusions** Hematopoietic immune phenotyping indicated the recovery at 6 months after the sublethal dose of TBI but the neutrophils in the peripheral blood continued to be increased, and the thymus coefficient and the proportion of B lymphocytes in the peripheral blood and spleen were still lower than those in the control group, suggesting a long-term injury. These experimental result provide basic data for the study of total body irradiation-induced long-term injury of hematopoietic immune function.

【Keywords】 sublethal irradiation; long-term; peripheral blood cell count; immune organ; immunophenotyping; mouse

随着科学技术的进步,核电设施使用增多,人类太空活动能力提升使辐射暴露的可能性不断增加。另外临床接受放射性治疗癌症患者也在不断上升。造血系统和免疫系统对电离辐射(ionizing radiation, IR)具有高度的敏感性。受照后不仅会引起急性骨髓抑制,对远期造血免疫也会有影响。

受到亚致死剂量照射后会出现造血免疫系统急性损伤性变化。随着时间延长机体各项免疫指标逐步恢复,但也会出现一些持久性改变,从而影响机体的健康状态,本文对在 4 Gy、6 Gy 亚致死剂量 γ 射线全身照射(total body irradiation, TBI)后 6 个月 C57BL/6 J 小鼠的各项免疫指标进行检测,为照射后造血免疫功能长期损伤研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10~12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 J 小鼠,体重

22~24 g,共 24 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。小鼠饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物房屏障环境[SYXK(津)2014-0002]。本实验经过中国医学科学院放射医学研究所 IACUC 的批准,批准号为 1402,并根据 3R 原则对实验动物的使用和饲养给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

荧光标记抗体 NK1.1-FITC 购于 Biolegend 公司;CD11b-APC 购于 Invitrogen 公司;B220-percp、F4/80-PE、CD4-PE-cy7、CD8a-APC-cy7 购于 BD 公司;B220-percp-cy5.5、CD3-APC 购于 Biolegend 公司;EDTA-K₃ 购于 Sigma 公司;红细胞裂解液购于 Invitrogen 公司;大鼠脾单个核细胞分离液试剂盒购于索莱宝公司;EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit 购于 STEMCELL Technologies 公司。全自动血液分析仪 MEK-7222 K(日本光电);BD 流式分析仪(BD

FACSAria II cell sorter, BD Bioscience); 铯源伽马射线辐照仪(Gammacell-40, 加拿大原子能有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与照射

小鼠随机分为对照(control)组、4 Gy IR 组和 6 Gy IR 组。照射组接受¹³⁷Cs γ 射线一次性全身照射 4 Gy 或 6 Gy, 剂量率为 1Gy/min。对照组接受假照射。

1.3.2 外周血细胞计数及分类

将小鼠称重, 0.5%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。进行内眦静脉取血, EDTA-K₃ 抗凝, 血细胞计数仪测定外周血计数及分类^[1]。

1.3.3 免疫脏器系数

小鼠称重后, 分别取胸腺和脾并称量, 记录下用于计算胸腺系数和脾系数。脏器系数=脏器重量(mg)/小鼠体重(g)^[2-3]。

1.3.4 外周血免疫细胞和脾淋巴细胞分型检测

将分离的小鼠脾研磨制备脾细胞悬液。分别取外周血和脾细胞悬液 50 μ L, 各加入 1 mL 1 $\times$ 红细胞裂解液, 室温条件下裂解 8 min(期间混匀两次), 1500 r/min 离心 5 min, 4 $^{\circ}$ C。弃去上清, 每个样品加入 100 μ L PBS 重悬, 分别加入对应的混合抗体, 冰上避光孵育 30 min。2 mL PBS 洗一遍, 离心条件保持不变。加入 300 μ L PBS 重悬并过滤至流式管, 上机检测^[4]。

1.3.5 脾 T 细胞分离及 p16 mRNA 表达量检测

按索莱宝 ficoll 试剂盒和 STEMCELL Technologies 的 T 细胞阴选试剂盒说明书方法进行分离。将收集的细胞重悬计数, 按每 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞加入 1 mL TRIzol 保存, 送至上海欧易生物医学科技有限公司检测 p16 mRNA 表达量。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件处理数据、作图, 计量资料数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用 ANOVA 检验和卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血计数及分类

外周血计数结果如图 1, 与对照组相比, 受照后 6 个月小鼠白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度均有一定程度的下降。其中 4 Gy 组与对照组相比, 白细胞计数从 8.62 ± 1.52 下降到 7.01 ± 0.8 ,

下降了 18.65% ($P < 0.001$)。红细胞计数从 8.99 ± 0.36 下降到 8.56 ± 0.33 , 下降了 4.70% ($P < 0.05$)。血红蛋白和血小板组差异没有显著性。

6 Gy 照射 6 个月后, 与对照组相比, 白细胞计数从 8.62 ± 1.52 下降到 5.94 ± 0.83 , 下降了 31.00% ($P < 0.001$)。红细胞计数也从 8.99 ± 0.36 下降到 8.33 ± 0.26 , 下降了 7.27% ($P < 0.001$)。血红蛋白浓度, 6 Gy 组比对照组从 123.13 ± 5.51 下降到 113.75 ± 2.71 , 下降了 7.55% ($P < 0.001$)。血小板计数 6 Gy 组和对照组相比未见显著性差异。可以看出血小板计数基本以恢复到正常水平, 见图 1A~1D。

4 Gy 与 6 Gy 两组间比较发现, 只有血红蛋白浓度这项指标在 4 Gy 和 6 Gy 之间有明显降低, 呈极显著性差异 ($P < 0.01$), 相差 5.04%。外周血计数各项指标均无计量依赖性, 各项指标均恢复到正常范围。

中性粒细胞百分比, 4 Gy 和 6 Gy 组相较于对照组有明显上升, 分别从 $(8.3 \pm 1.09)\%$ 上升到 $(15.46 \pm 1.94)\%$ ($P < 0.001$) 和 $(16.87 \pm 6.89)\%$ ($P < 0.05$)。淋巴细胞百分比从 $(90.95 \pm 1.9)\%$ 下降到 $(85.29 \pm 3.19)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(82.75 \pm 7.06)\%$ ($P < 0.05$), 分别具有极显著性和显著性。见图 1E~1F。

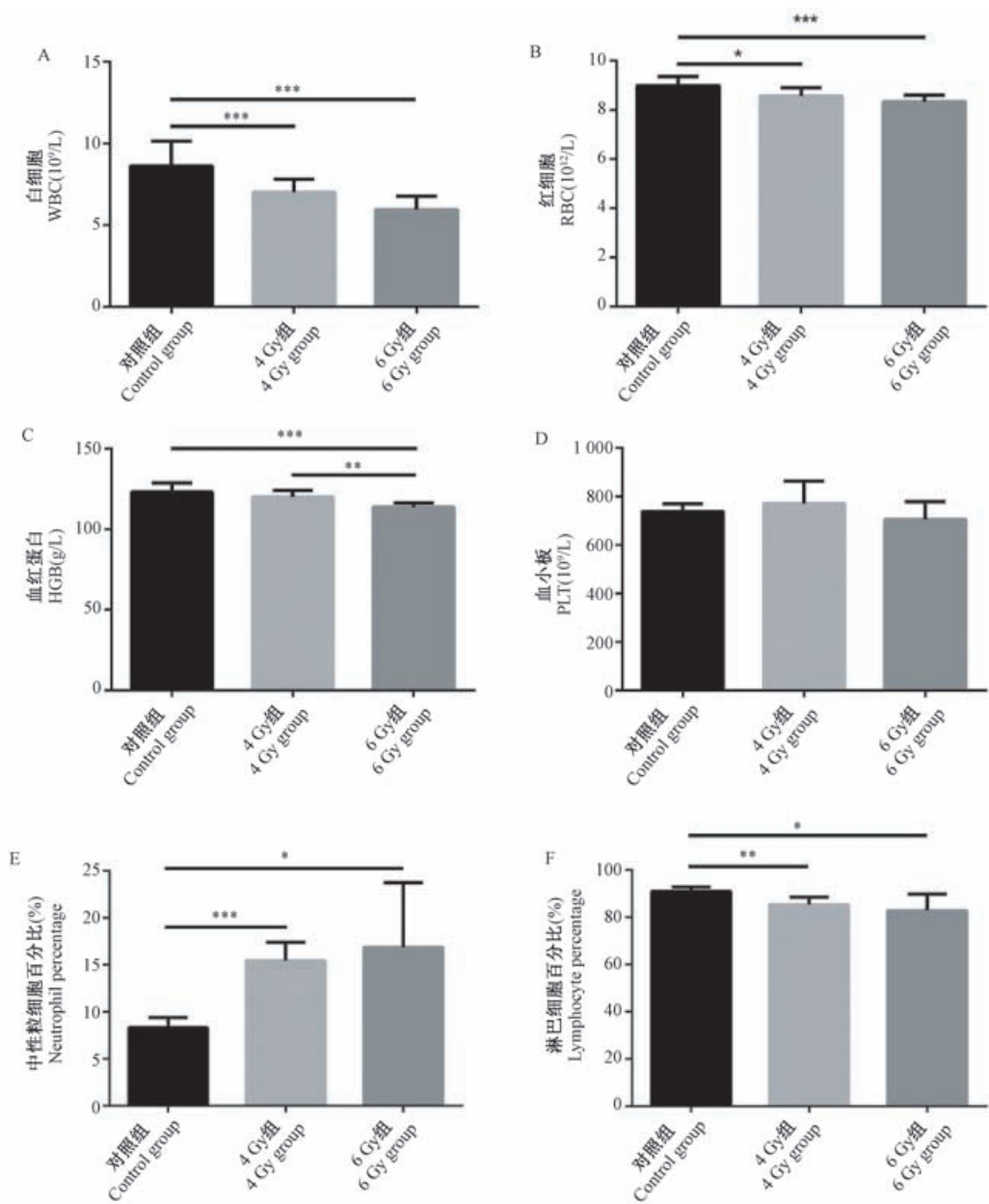
外周血白细胞计数及分类结果显示, 亚致死剂量全身照射后 6 个月, 外周血计数及分类已经恢复正常。但是白细胞、红细胞计数仍然明显低于对照组。白细胞降低有照射剂量依赖的趋势。外周血细胞分类结果显示照射组小鼠中性粒细胞比例升高、淋巴细胞比例下降, 呈现细胞分化偏移现象, 未见明显的剂量效应关系。

2.2 免疫脏器系数

与对照组小鼠相比, 4 Gy 组和 6 Gy 组小鼠胸腺系数降低, 其中 6 Gy 组与对照组差异有显著性 ($P < 0.05$); 脾系数略有增加, 差异无显著性, 结果见图 2。

2.3 外周血免疫分型

外周血采用流式分析法进行分型测定。检测辅助 T 细胞(CD4)、细胞毒 T 细胞(CD8a)、B 淋巴细胞(B220)、自然杀伤细胞(NK1.1), 单核细胞采用 F4/80 和 CD11b 共标。其中辅助 T 细胞、细胞毒 T 细胞和 B 淋巴细胞是从单个核细胞亚群去分析, NK 细胞和单核细胞是从白细胞群去分析。如图 3



注:A:白细胞计数;B:红细胞计数;C:血红蛋白浓度;D:血小板计数;E:中性粒细胞百分比;F:淋巴细胞百分比。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

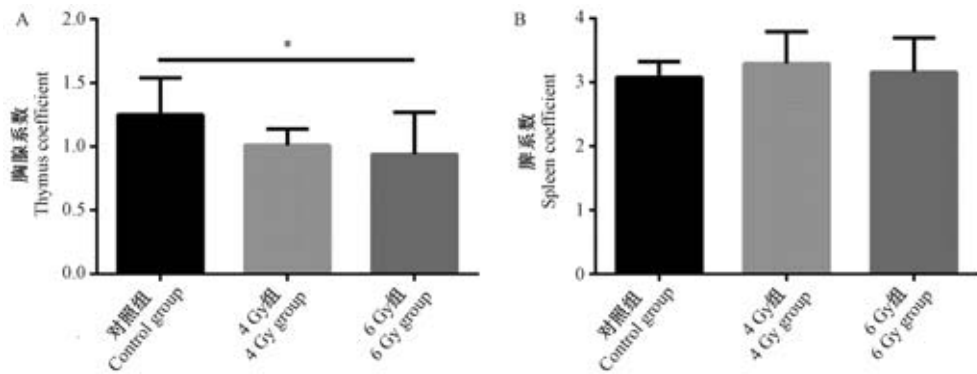
图1 受照组小鼠与对照组小鼠外血计数比较

Note. A, White blood cell count. B, Red blood cell count. C, Hemoglobin concentration. D, Platelet count. E, Neutrophil percentage. F, Lymphocyte percentage. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Comparison of the peripheral blood counts between irradiated mice and control mice

所示。

结果显示,相对于对照组,4 Gy 组和 6 Gy 组 CD4⁺均有上升,从 (12.49±1.16)% 分别上升到 (14.6±0.51)%和 (16.48±2.0)% ,差异均具有显著性 ($P<0.05$)。CD8a⁺细胞三个组别之间未见明显变化。CD4/CD8 比值分别为对照组 1.16±0.10,4 Gy 照射组 1.28±0.17,6 Gy 照射组 1.46±0.26,6 Gy 组 CD4/CD8 比值与对照组比较有明显上升 ($P<0.05$)。B220⁺细胞从对照组 (62.89±2.33)%降低到 4 Gy 照射组 (55.63±3.61)%和 6 Gy 照射组 (54.2±3.54)%,差异均具有极显著性 ($P<0.001$)。NK1.1⁺细胞与 B220⁺细胞变化趋势一样,从 (8.44±0.7)% 分别降低到 (6.81±1.58)%和 (6.6±0.65)%。上述三组 4 Gy 和 6 Gy 之间差异均无显



注:A;胸腺系数;B;脾系数。* $P<0.05$ 。
图 2 受照组小鼠与对照组小鼠脏器系数比较
Note.A, Thymus coefficient. B, Spleen coefficient. * $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of the organ coefficient between irradiated mice and control mice

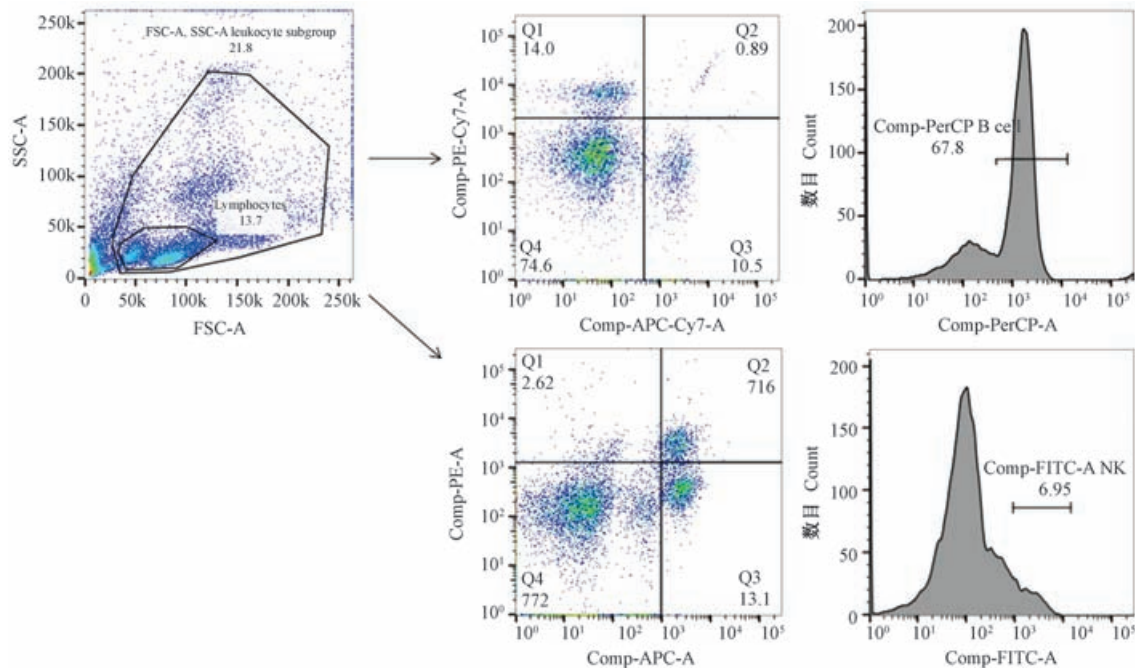


图 3 流式分析外周血门的设置及示意图

Figure 3 Representative gating strategy used for the peripheral blood immune cell phenotypes analyzed by flow cytometry

著性区别。单核细胞三个组别之间未见到明显差异。结果见图 4。

外周血细胞免疫分型结果显示,4 Gy、6 Gy 照射后,B 淋巴细胞、NK 细胞仍然低于对照组,提示受照后 6 个月未完全恢复。受照组 CD4 比例高于对照组。CD8 单核细胞与对照组未见差异。

2.4 脾免疫细胞分型

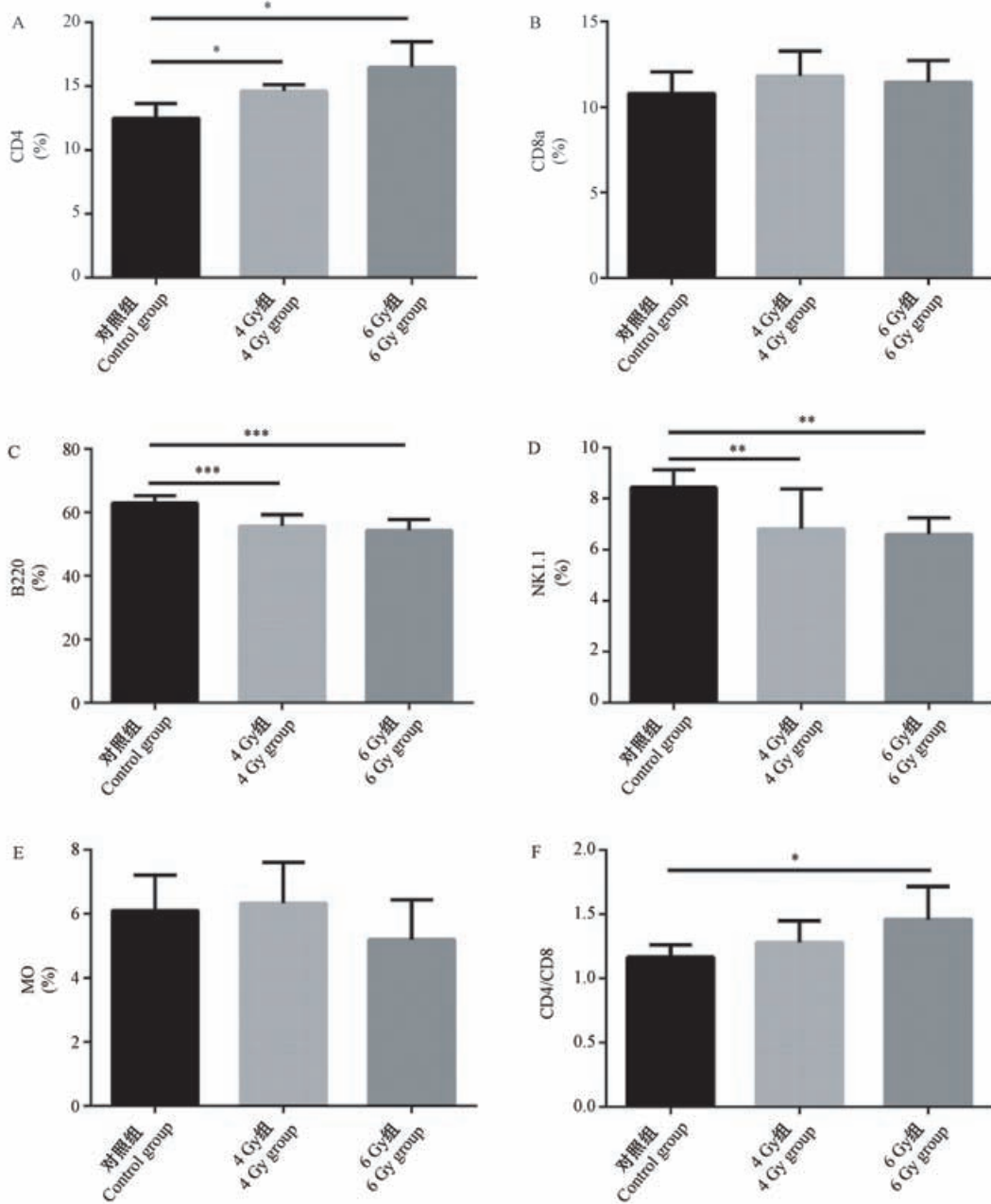
采用流式细胞术分析脾中 T 细胞 (CD3) 和 B 淋巴细胞 (B220) 在脾单个核细胞分群中的占比变化。如图 5 所示。

结果显示,相较于对照组,照射组 CD3⁺ 细胞有

上升的趋势,但无显著性差异。B220 细胞,照射组均有明显下降,4 Gy 组和 6 Gy 组相较于对照组有极显著差异 ($P<0.01$),两组之间未见明显差异。见图 6。

2.5 脾 T 细胞 p16 mRNA 表达量检测

为了进一步研究照射对小鼠免疫细胞的远期影响,分离小鼠脾 T 细胞,用 RT-PCR 检测照射后 6 个月脾 T 细胞中 p16 mRNA 表达,检测结果通过标准曲线公式以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行比较。结果显示,与对照组相比,6 Gy 组有个别数据 p16 mRNA 明显升高,采用卡方检验,未见显著性差异。结果见图 7。



注:A:CD4⁺;B:CD8⁺;C:B220⁺;D:NK1.1⁺;E:CD11b⁺F4/80⁺;F:CD4⁺/CD8⁺。**P*<0.05,***P*<0.01,****P*<0.001。

图4 老年小鼠与年轻小鼠外周血免疫细胞分型比较

Note. A, CD4⁺. B, CD8⁺. C, B220⁺. D, NK1.1⁺. E, CD11b⁺F4/80⁺. F, CD4⁺/CD8⁺. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

Figure 4 Comparison of peripheral blood immune cell typing between the irradiated mice and control mice

3 讨论

本研究检测亚致死剂量电离辐射全身照射对小鼠造血系统和免疫系统造成的远期损伤。与对照组比较,结果显示小鼠受到4 Gy或6 Gy全身照射6个月后,外周血白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度仍低于对照组。而照射组小鼠中性粒细胞比例升高,淋巴细胞的比例降低。提示受到照射后,与对照组比较外周血白细胞仍然处于较低水

平,可能导致机体抵抗力下降。外周血分类比例改变,提示出现了分化偏移现象。但是除了血红蛋白外,6 Gy组与4 Gy组差异没有统计学意义。说明在经过长时间恢复后,外周血和免疫细胞比例已经基本恢复。

小鼠胸腺对电离辐射十分敏感,在接受照射6个月后,胸腺系数依旧未恢复至对正常水平。另一免疫器官,脾系数虽和对照组无显著差别,外周血免疫分型中,照射组小鼠CD4⁺细胞占单个核细胞亚

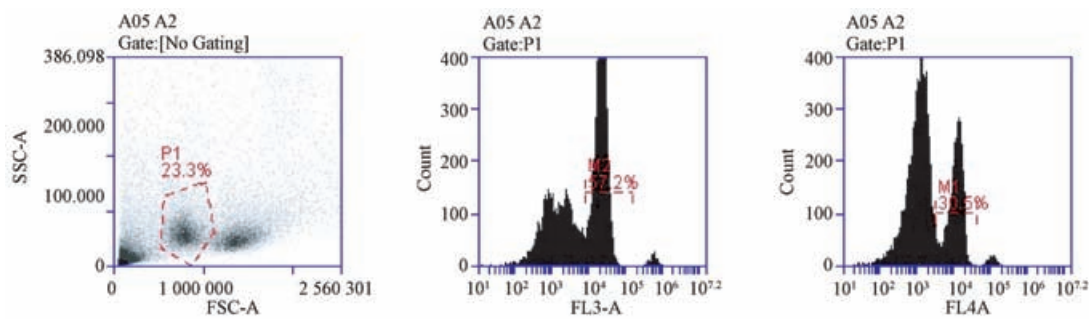
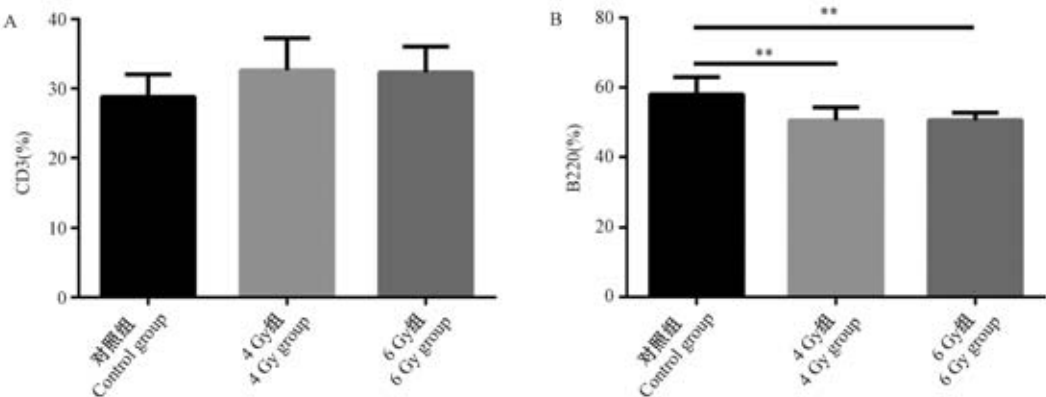


图 5 流式分析脾免疫细胞门的设置及示意图

Figure 5 Representative gating strategy used for spleen immune cell phenotypes analyzed by flow cytometry



注:A;CD3⁺;B;B220⁺。***P*<0.01。

图 6 受照组小鼠与对照组小鼠脾免疫细胞分型比较

Note.A,CD3⁺. B,B220⁺. ***P*<0.01.

Figure 6 Comparison of spleen immune cell phenotyping between the irradiated mice and control mice

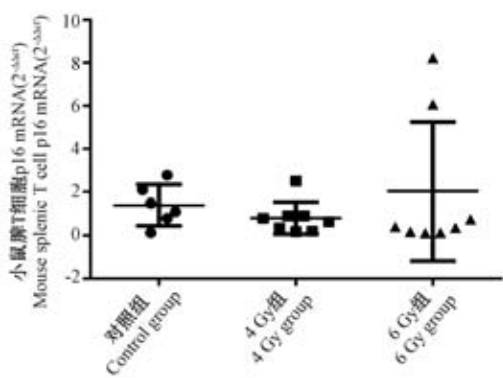


图 7 受照组小鼠与对照组小鼠脾 T 细胞的 p16 mRNA 表达比较

Figure 7 Comparison of p16 mRNA expression in the splenicT cells between irradiated mice and control mice

群的百分比上升,B 淋巴细胞下降,自然杀伤细胞在白细胞群中的百分比明显下降。提示照射引起天然免疫和适应性免疫功能下降。淋巴细胞比例下降,以 B 淋巴下降为主;天然免疫功能下降以 NK 细胞下降为主。脾免疫分型中,B 淋巴细胞在脾单个核细胞百分比降低。在脾 T 细胞中,6 Gy 照射 6 个

月后 p16 mRNA 表达量高于对照组,但无显著性差异。

课题组对辐射引起的造血系统免疫损伤进行了系统研究。小鼠外周血计数结果显示,受照后大部分指标恢复正常,但是白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度依然低于对照组。路璐等研究结果显示,6 Gy 照射 2 个月内,白细胞和血小板下降程度明显,红细胞和血红蛋白下降较为平缓^[5]。两个月内恢复的趋势也与本研究结果一致。造成这种现象的原因可能是造血系统对辐射损伤敏感,亚致死剂量的电力辐射造成了造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)损伤和衰老,影响其造血免疫功能,最后导致了度过了照射后初期白细胞血小板快速下降,以及中期红细胞和血红蛋白的下降后,远期(照射后 6 个月)外周血计数虽在缓慢恢复,但依然低于对照组。随着小鼠受照后时间的延长,造血干细胞的衰老和损伤会导致其分裂分化能力降低,进一步导致其数量减少,最终出现长期骨髓抑制等情况^[6]。外周血细胞分类结果显示照射组小

鼠中性粒细胞比例升高、淋巴细胞比例下降,呈现细胞分化偏移现象,没有明显剂量反应关系。与老年小鼠外周血计数结果一致,暗示着照射导致的骨髓细胞出现了病理性的衰老改变^[7]。在老年机体中,HSC 不能保持细胞静止状态,并趋向于向髓系细胞进行分化,使得幼稚淋巴细胞数量下降。最终导致免疫功能整体下降。发生髓系分化偏移除了会造成免疫功能的下降,还会使髓系白血病发生的危险性升高。在急性髓系白血病中,主要是由白血病前体干细胞异常增殖导致的。而白血病前体干细胞倾向分化为髓系细胞^[8]。亚致死剂量受照小鼠远期仍然表现出髓系偏移的变化,与老年小鼠一致。

照射组小鼠的胸腺系数出现明显下降,胸腺对电离辐射损伤敏感,在 6 个月后依旧没有恢复到正常水平。受照组小鼠脾系数有少许上升,但与对照组相比,无显著性差异。李德冠等^[9-10]的研究显示,照射组小鼠受 4 Gy 和 6 Gy 照射 10 周后胸腺系数脾系数分别出现上升或下降的改变,但均无显著性差异,且不呈剂量依赖性。胸腺受损会导致 T 细胞在发育过程中出现问题,减少幼稚 T 细胞的数量,进而影响细胞免疫效果。

外周血分型与李德冠等人^[11]的研究比较发现在 6 Gy 照射后 10 d 时,小鼠处于辐射损伤急性期,外周血 CD4、CD8、B220 分别从 $(19.7 \pm 4.7)\%$ 、 $(18.5 \pm 1.7)\%$ 和 $(52.0 \pm 6.6)\%$ 降到 $(15.5 \pm 2.0)\%$ 、 $(5.1 \pm 2.9)\%$ 和 $(7.9 \pm 4.1)\%$ 。在 10 周时,4 Gy 组和 6 Gy 组 CD4 从 $(12.1 \pm 0.9)\%$ 分别上升到 $(18.7 \pm 0.4)\%$ 和 $(21.9 \pm 7.4)\%$, CD8 由 $(11.7 \pm 0.8)\%$ 分别上升至 $(17.2 \pm 2.1)\%$ 和下降到 $(8.8 \pm 0.6)\%$, B220 则从 $(50.6 \pm 6.5)\%$ 分别下降到 $(38.1 \pm 2.9)\%$ 和 $(23.7 \pm 12.2)\%$ ^[9-10]。变化趋势与本研究照射后 6 个月时的外周血免疫分型结果接近。本实验中,CD4% 的上升是源于在单个核细胞群中,CD4 阳性细胞随时间的恢复,且 B220 阳性细胞死亡比例较高恢复较慢导致的,属于相对升高。崔玉芳等人^[12]在研究中认为小鼠受照后免疫方面有两个特点:①短期内损伤严重,②后期阶段机体恢复速度缓慢。其中特别的是,在受到照射后 6~12 月,淋巴细胞仍处于恢复阶段时,外周血淋巴细胞的凋亡率仍高出正常水平。CD3 和 CD8 阳性 T 细胞仍未恢复到对照的水平^[12]。本实验中,先天免疫主要以 NK 细胞的减少为主,单核细胞照射组与对照组之间基本无差别,淋巴细胞中 B 细胞依旧处

于缓慢恢复阶段,T 细胞则恢复明显。与吴安庆等人^[13]的研究中提出的淋巴细胞比单核细胞辐射敏感性强,淋巴细胞中 B 细胞也比 T 细胞对辐射更加敏感的结论相一致。6 Gy 组 CD4%/CD8% 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$),但比值的上升主要是因为 CD4% 的相对上升,与免疫系统亢进不一样。

之后进行脾免疫细胞分型中发现,B 淋巴细胞在单个核细胞中的比例有明显下降,并具有极显著差异 ($P < 0.01$)。说明虽然在脾系数上与对照组没有区别,但是功能上还没有恢复至对照组水平。B 淋巴细胞比例的下降可能会导致获得性免疫中体液免疫水平的降低。进一步造成抗体数量的减少和免疫记忆的减弱,无法及时在抗原入侵机体时有有效的启动免疫应答。

p16 基因是一种直接参与细胞周期调控的细胞周期基因,同是也是一个抑癌基因。在受到一些细胞因子或是 DNA 损伤刺激下,会激活 p38MAPK 级联反应,进而激活 p16-Rb 通路,造成细胞的衰老,是常用的衰老标志物^[14]。我们前期研究结果显示,亚致死剂量全身照射可以引起造血干细胞衰老,表现为 p16 升高,自我更新能力下降^[15-16]。临床研究显示细胞毒性化疗药物及骨髓移植患者 T 细胞中 p16 表达水平明显升高^[17]。本研究中,6 Gy 组结果显示在 8 个有效数据中,有 2 例明显升高,但无显著性差异。T 细胞 p16 mRNA 是否可以作为受照后引起的衰老生物学标志有待进一步研究认证。

本项研究对中高剂量照射对小鼠造血免疫远期损伤初步分析结果显示,受照组小鼠在经过 6 个月的恢复后,免疫系统基本重建完毕,趋于稳定。但髓系淋系分化偏移,B 淋巴细胞比例下降等仍持续存在。这与造血免疫系统老龄化改变相似。讨论中比较了照射后不同时间点造血免疫损伤程度及恢复情况,也与老年小鼠进行了比较。这些初步探讨进一步验证了亚致死剂量照射引起了小鼠造血免疫系统衰老性改变,为治疗改善远期辐射损伤提供了基础数据,也为受照小鼠用于造血免疫系统老年性改变机制研究提供支持。

参考文献:

- [1] 李程程,管博文,苏路,等. 白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用[J]. 中国比较医学杂志, 2018,28(2):26-32.
- [2] 巩萍,孙铜,戴晓莉,等. 松花粉对环磷酸腺苷增效减毒作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(5):60-63.

范新昊,田发明,王婧瑶,等. 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对尾悬吊诱导小鼠骨丢失的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (11): 58-64.

Fan XH, Tian FM, Wang JY, et al. Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on tail suspension-induced bone loss in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 58-64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 009

辛伐他汀联合利塞膦酸钠对尾悬吊诱导小鼠骨丢失的作用

范新昊¹, 田发明², 王婧瑶², 张楠¹, 迟博婧², 张国彬^{2*}, 郭志斌³

(1.开滦总医院,河北 唐山 063000; 2.华北理工大学,河北 唐山 063000;
3.开滦总医院林西矿医院,河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨和比较单独或联合应用辛伐他汀和利塞膦酸钠对地塞米松诱导的小鼠骨质疏松的作用。**方法** 12 周龄雌性 C57BL6 小鼠 30 只,随机分成 5 组(每组 6 只):对照组(A 组)、模型组(B 组)、辛伐他汀组(C 组)、利塞膦酸钠组(D 组)和联合干预组(E 组)。除 A 组外,通过尾悬吊制备小鼠骨质疏松模型,C、D、E 组分别给予辛伐他汀(5 mg/(kg·d))、利塞膦酸钠(1 mg/(kg·d))和两者联合干预,3 周后处死取材。微计算机断层扫描技术(micro-CT)检测左侧胫骨近端松质骨和皮质骨骨量及微结构参数,三点弯曲实验分析左侧股骨生物力学性能。提取右侧胫骨 RNA,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 OPG 和 RANKL 的表达,提取右侧股骨蛋白,Western blot 法检测 OPG 和 RANKL 蛋白的表达。**结果** Micro-CT:B 组骨小梁体积比(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)显著低于其余各组,骨小梁分离度(Tb.Sp)显著高于其余各组($P<0.05$),C、D 组 BV/TV 显著低于 A、E 组,Tb.Sp 显著高于 A 组($P<0.05$);②生物力学:最大载荷、弹性模量 B 组显著低于 A、E 组($P<0.05$)、其余各组间比较无统计学差异($P>0.05$);③PCR 检测结果:OPG 的 mRNA 表达在 C、E 组显著高于 B 组($P<0.05$);RANKL 在 B 组表达显著高于 A 组($P<0.05$);④Western blot:OPG 在 A 组的表达显著高于其余各组($P<0.05$),E 组显著高于 B 组($P<0.05$);RANKL 在 A 组的表达显著低于其余各组($P<0.05$)。**结论** 尾悬吊可以造成小鼠骨丢失和骨质量下降,辛伐他汀和利塞膦酸钠联合应用能阻止该模型骨丢失和骨质量下降,效果优于单独用药。

【关键词】 利塞膦酸钠;辛伐他汀;骨丢失;生物力学;微结构;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0058-07

Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on tail suspension-induced bone loss in mice

FAN Xinhao¹, TIAN Faming², WANG Jingyao², ZHANG Nan¹, CHI Bojing², ZHANG Guobin^{2*}, GUO Zhibin³

(1. KaiLuan General Hospital, Tangshan 063000, China. 2. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000. 3. KaiLuan Linxi Hospital, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To compare the efficiency of single or combined application of simvastatin and risedronate sodium on a disused osteopenia rat model with tail suspension. **Methods** Thirty 12-week-old C57BL6 mice were assigned

【基金项目】 国家自然科学基金(81773327);河北省自然科学基金(H2013209255);河北省医学科学研究重点课题(20160722)。

【作者简介】 范新昊(1985—),女,主治医师,主要从事骨质疏松发病机制和防治研究。E-mail: ricky130701@163.com

【通信作者】 张国彬(1980—),男,讲师,主要从事骨与关节退行性疾病的研究。E-mail: zgb826@163.com

to five groups of six mice each: control (A), tail suspension (B), simvastatin treatment (C), risedronate sodium treatment (D), and combined treatment (E). All but group A received tail suspension, and the groups were treated with the vehicle, simvastatin (5 mg/(kg·d)), risedronate sodium (1 mg/(kg·d)) or a combination of both, respectively. All mice were sacrificed after 3 weeks. Micro-CT was performed on the left tibia to determine the bone mass and microstructure of both the trabecular and cortical bones. Three-point bending test was used for biomechanical analysis of the left femur. The right tibias were subjected to RNA extraction and PCR analysis of *OPG* and *RANKL* expression, and the right femurs were used for protein level detection by western blot. **Results** Micro-CT: BV/TV and Tb.N in group B were significantly lower than those of the other groups ($P < 0.05$), the Tb.Sp in group B was significantly higher than that of the other groups. BV/TV in groups C and D were significantly lower than those in groups A and E, while Tb.Sp in groups C and D was significantly higher than that in group A ($P < 0.05$). ② Biomechanical test: maximal loading and the elastic modulus in group B were significantly lower than those of groups A and E ($P < 0.05$). ③ PCR: the mRNA level of *OPG* in groups C and E was significantly higher than that in group B ($P < 0.05$), and *RANKL* was expressed significantly higher in group B than that in group A ($P < 0.05$). ④ Western blot: the protein level of OPG in group A was markedly higher than that in the other groups ($P < 0.05$), OPG in group E was significantly higher than that in group B ($P < 0.05$), and the protein level of RANKL in group A was significantly lower than that in the other groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Tail suspension caused bone loss and deterioration of bone quality in mice, and simvastatin combined with risedronate sodium treatment showed more substantial attenuation of these effects than treatment with either drug alone.

【Keywords】 risedronate sodium; simvastatin; bone loss; biomechanics; micro-structure; mouse

一定的负荷刺激对于维持骨稳态和骨骼健康至关重要,适当应力刺激如体育锻炼可促进骨形成^[1],而失用造成的负荷刺激缺失往往会造成肌肉萎缩和骨量丢失,研究表明,长期卧床、瘫痪或航天飞行导致每月 1%~2% 的骨量丢失^[2]。目前对于该类骨丢失的治疗仍以二磷酸盐类药物为主,可以通过抑制骨吸收降低骨转换率部分抑制宇航员骨量下降,但该类药物对促进骨形成的作用有限^[3]。如果在干预方案中考虑抑制骨吸收与促进骨形成药物联合应用,可能疗效会优于单纯抑制骨吸收,也更适用于防治失用导致的骨丢失。

辛伐他汀是目前一线降血脂药物,其成骨作用潜能近年来备受关注。课题组前期研究证实辛伐他汀单纯体内干预虽表现出一定的骨保护作用^[4],但仅对大鼠股骨近端的骨丢失有抑制作用,如果联合应用骨吸收抑制剂如利塞膦酸钠,能否取得更好效果,尚有待进一步研究证实。基于以往研究,不同性质的骨代谢调节剂联合应用有可能取得更好的抗骨质疏松的作用^[5],我们推测辛伐他汀与利塞膦酸钠联合应用可以抑制失用性骨丢失,并较单独用药具有更好的效果。本研究拟通过尾悬吊法建立小鼠失用性骨丢失模型,并给予辛伐他汀和或利塞膦酸钠干预,观察单独用药与联合用药的干预效果,以期为进一步探索相关干预方案和作用机制等后续研究乃至相关临床干预提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究应用 SPF 级 12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 30 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2017-0001],体重(25±3)g,所有小鼠在华北理工大学动物中心屏障环境中饲养[SYXK(冀)2015-0038]。本研究中涉及实验动物的处理和干预,均符合华北理工大学实验动物伦理委员会的相关规定,动物实验伦理审查证明编号为:LX201809,并遵照实验动物使用的 3R(减少、替代、优化)原则给予人道关怀。制备模型与处死时应用小动物多功能麻醉机进行诱导麻醉,麻醉药物为异氟烷,气体流量 500 mL/min,浓度 1.5%,处死时与其他动物隔离。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(深圳市锐沃德生命科技有限公司);利塞膦酸钠(北京双鹭药业股份有限公司);辛伐他汀(浙江瑞邦药业有限公司生产);TRIzol(Invitrogen,美国);TaKaRa 逆转录试剂盒、Real-time PCR 试剂盒(大连宝生物有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京建成生物技术有限公司);小鼠 OPG(美国 Abcam 公司)、RANKL 抗体(美国 Santa Cruz 公司)、山羊抗兔二抗(美国 SAB 公司)。微计算机断层扫描(micro-CT,Skyscan,比利时);AG-IS 型万能试验机统(日本岛津公司);PCR 仪(Applied biosystems

美国);小动物多功能麻醉机(ZS-MV-I,北京众实迪创科技发展有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

所有小鼠随机分成 5 组,每组 6 只:对照组(A 组)、模型组(B 组)、辛伐他汀组(C 组)、利塞膦酸钠组(D 组)和联合干预组(E 组)。除 A 组外,其余各组小鼠均采用尾部悬吊(躯体与地面呈 40°左右角度,以后肢伸直不能着地为准)制备尾悬吊拟失重模型,分别给予生理盐水(B 组)、辛伐他汀(5 mg/(kg·d),C 组)、利塞膦酸钠(1 mg/(kg·d),D 组)和两者联合(E 组)灌胃干预,3 周后异氟烷麻醉处死取材。实验结束时各组均无小鼠死亡,所有动物纳入最终指标分析和结果统计。

1.3.2 Micro-CT 分析

应用 Sky Scan 1076 Micro-CT 对小鼠左侧胫骨进行扫描检测,收集数据,并利用 Micro-CT 配套软件对扫描图像进行三维重建及结果分析。胫骨近端松质骨兴趣区为上端生长板下 0.5~2 mm,皮质骨内侧的松质骨;胫骨中段皮质骨感兴趣区为胫腓骨连接处上方 1 mm。松质骨检测指标有:骨容积率(bone volume fraction, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb.Sp)、结构模型指数(Structure Model Index, SMI)。皮质骨检测指标 BV/TV、皮质骨厚度(Cortical bone thickness, Ct.Th)。

1.3.3 生物力学检测

取所有小鼠的右侧股骨行生物力学分析,采用三点弯曲试验,支点跨距(L)为 6 mm,中央垂直(股骨与载荷成 90°角)加载负荷,速率 5 mm/min,直至股骨断裂,记录并分析最大压缩载荷及弹性模量。

1.3.4 聚合酶链反应

实验结束后提取小鼠右侧胫骨,制备组织匀浆,采用 TRIzol 法提取总 RNA,应用 TaKaRa 试剂盒进行逆转录合成 cDNA,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 OPG 和 RANKL 的表达。配制反应液:10 μL SYBR Premix Ex Taq II, 0.8 μL Forward Primer, 0.8 μL Reverse Primer, ROX Reference Dye II 0.4 μL, 2 μL cDNA, 6 μL 灭菌水,总体积为 20 μL;Real-time PCR 反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s;60℃ 34 s,共 40 个循环;记录各标本扩增的 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为统计数值,检测各基因与内参基因

GAPDH 的比值,得出目的基因表达的相对含量,公式如下: $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{处理组}}(\text{目的基因}-\text{内参基因}) - Ct_{\text{对照组}}(\text{目的基因}-\text{内参基因})$ 。引物序列 OPG 上游 5'-TTTCTTCTGGGCTGATCTTCTTCC-3',下游 5'-CATCCAAGACATTGACCTCTCTTGA-3';RANKL 上游 5'-CTGATGAAAGGAGGGAGCACAG-3',下游 5'-GGAAGGGTTGGACACCTGAATG-3';GAPDH 上游 5'-GACATCAAGAAGGTGCTGAAGC-3',下游 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT-3'。

1.3.5 Western blot

实验结束后,提取各组小鼠右侧股骨总蛋白,采用 BCA 定量蛋白,根据测定蛋白浓度计算上样量,经电泳及转膜后,取出 PVDF 膜置于 TBST 配制的 5%脱脂奶粉中孵育、漂洗 2 h,完成对非特异性抗原的封闭。封闭结束后将膜与 OPG 抗体(1:200)或 RANKL(1:200)抗体孵育,4℃过夜。次日加入 IgG 二抗稀释液(1:1000)中,37℃摇床孵育 2 h,然后置于 TBST 缓冲液摇床漂洗,控干 TBST 后,用 ECL 显色液显色,待蛋白条带清晰后立刻取出 PVDF 膜,置于清水中终止显色。采用 Image J 软件进行图像灰度扫描测定,测定目的蛋白 OPG、RANKL 与内参蛋白 β -actin 的 OD 值,计算两者比值作为其相对表达量,进行统计分析。

1.4 统计学方法

收集所有实验数据录入 Excel 表,采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。利用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验组间差异,两组间比较采用 LSD-*t* 检验。实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 检测结果

各组小鼠胫骨中段皮质骨及胫骨近端松质骨的 micro-CT 三位重建图如图 1 所示。相关参数的数据分析结果如下:皮质骨:骨容积率比较,B、C、D、E 组均显著低于 A 组($P < 0.05$);E 组显著高于 B、C、D 组($P < 0.05$),其余组间比较无显著差别($P > 0.05$)。皮质骨厚度,B、C 组显著低于 A 组($P < 0.05$),E 组显著高于 B、C 组($P < 0.05$),其余组间比较没有显著差异($P > 0.05$)。见表 1。

胫骨近端松质骨分析结果:骨容积率:B、C、D、E 组显著低于 A 组($P < 0.05$);C、D 组显著高于 B 组($P < 0.05$),E 组显著高于 B、C、D 组($P < 0.05$);

骨小梁数量: B、C、D 组显著低于 A、E 组 ($P<0.05$); 骨小梁厚度: B 组显著低于 A 组 ($P<0.05$), C、D、E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$); 骨小梁分离度 B、C、D 组显著高于 A、E 组 ($P<0.05$); 结构模型指数 B、C、D、E 组显著低于 A 组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.2 生物力学

最大载荷: B、C、D、E 组显著低于 A 组 ($P<0.05$), E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$), 其余各组间两两比较无显著差别 ($P<0.05$); 弹性模量: B、C、D 组显著低于 A 组 ($P<0.05$), B、E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$), 其余各组间两两比较无显著差别 ($P<0.05$)。见表 3。

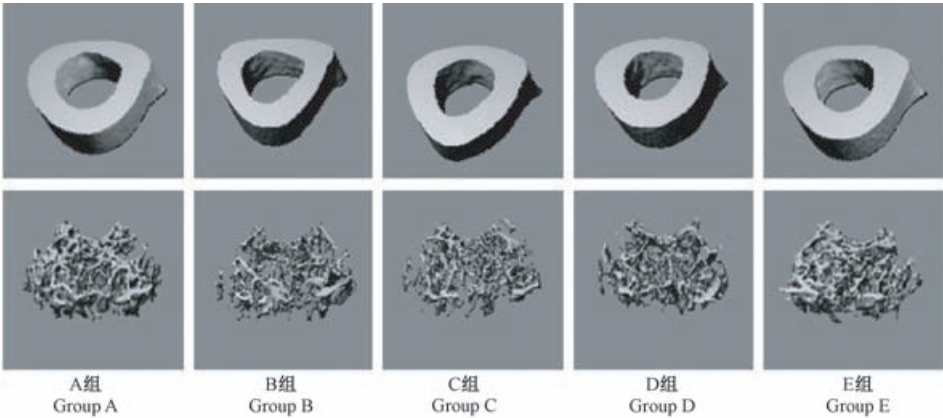


图 1 小鼠胫骨 micro-CT 三维重建图

Figure 1 Representative images for micro-CT of mouse tibia

表 1 胫骨中段皮质骨 micro-CT 分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Results of micro-CT of cortical bone in the middle shaft of the tibia

指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
骨容积率 (%) BV/TV	0.69±0.02	0.61±0.02 ^a	0.63±0.03 ^a	0.63±0.02 ^a	0.66±0.03 ^{abcd}
皮质骨厚度 (μm) Ct.Th	230.3±11	213.7±10.5 ^a	214.8±8.5 ^a	225.1±14.8	231±13.1 ^{bc}

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$; 与 C 组比较, ^c $P<0.05$; 与 D 组比较, ^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$. Compared with the group C, ^c $P<0.05$. Compared with the group D, ^d $P<0.05$.

表 2 胫骨近端松质骨 micro-CT 分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Results of micro-CT of the proximal tibia trabecular bone

指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
骨容积率 (%) BV/TV	0.18±0.02	0.08±0.02 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	0.11±0.02 ^{ab}	0.14±0.02 ^{abcd}
骨小梁数量 (mm ⁻¹) Tb.N	6.16±0.37	4.92±0.75 ^a	4.34±0.82 ^a	4.39±0.97 ^a	6.02±0.84 ^{bcd}
骨小梁厚度 (μm) Tb.Th	43.13±3.94	33.55±9.7 ^a	41.58±2.9 ^b	41.41±6.17 ^b	41.53±4.29 ^b
骨小梁分离度 (μm) Tb.Sp	152.56±9.1	235.27±38.2 ^a	213.8±40.8 ^a	217.02±60.1 ^a	163.7±22.03 ^{bcd}
结构模型指数 SMI	1.91±0.27	2.45±0.31 ^a	2.53±0.14 ^a	2.27±0.08 ^a	2.28±0.26 ^a

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$; 与 C 组比较, ^c $P<0.05$; 与 D 组比较, ^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$. Compared with the group C, ^c $P<0.05$. Compared with the group D, ^d $P<0.05$.

2.3 PCR 检测结果

实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *OPG* 的 mRNA 表达在 C、E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$), 其余组间比较未见显著差异 ($P<0.05$); *RNKL* 在 B 组表达显著高于 A 组 ($P<0.05$), 其余组间比较未见显著差异 ($P<0.05$)。见表 4。

2.4 Western blot 检测结果

Western blot 分析 *OPG*、*RANKL* 蛋白表达结果显示: *OPG* 在 A 组的表达显著高于其余各组 ($P<0.05$), E 组显著高于 B 组 ($P<0.05$); *RANKL* 在 A 组的表达显著低于其余各组 ($P<0.05$)。如图 2 所示。

3 讨论

失用性骨质疏松在临床中多见于长期卧床的

患者, 骨量丢失、肌肉力量减弱和协调性下降会增加骨折风险。而一旦发生骨折, 往往对患者乃至其家庭带来沉重打击, 目前对于失用性骨质疏松的重视程度仍亟待提高, 其有效防治方案也在积极探索中。通过对小鼠尾部悬吊离地, 导致后肢应力缺失是目前常用的模拟失用性骨质疏松的动物模型^[6-7]。本研究经过三周尾悬吊成功制备了该小鼠模型, Micro-CT 分析发现该模型小鼠骨量下降, 微结构退变, 蛋白水平 *RANKL* 表达水平上调, *OPG* 水平下调, 提示该模型同时伴有骨形成下降和骨吸收活性增强, 这也与部分研究结果一致^[8-9], 由于失重导致的骨细胞凋亡分泌更多的 *RANKL* 是该模型骨吸收活跃并导致骨丢失的重要机制^[9]。

表 3 生物力学检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Results of the biomechanical test

指标 Indices	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
最大载荷 Maximal loading	21.1±2.7	12.5±2.2 ^a	13.4±1.6 ^a	13.6±2.0 ^a	15.1±1.4 ^{ab}
弹性模量 Elastic modulus	7.1±0.9	3.9±0.6 ^a	5.3±1.3 ^{ab}	5.1±0.9 ^a	6.2±1.5 ^b

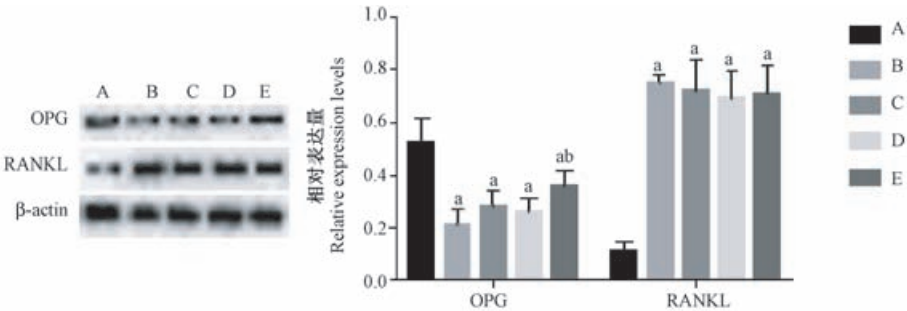
注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.

表 4 PCR 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Results of the PCR analysis

基因 Genes	对照组 (A 组) Control group (group A)	模型组 (B 组) Tail suspension group (group B)	辛伐他汀组 (C 组) Simvastatin treatment group (group C)	利塞膦酸钠组 (D 组) Risedronate sodium treatment group (group D)	联合治疗组 (E 组) combined treatment group (group E)
<i>OPG</i>	1.00±0.17	0.94±0.14	1.17±0.21 ^b	1.11±0.18	1.17±0.20 ^b
<i>RNKL</i>	1.00±0.16	1.29±0.21 ^a	1.2±0.13	1.12±0.19	1.14±0.15

注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.



注: 与 A 组比较, ^a $P<0.05$; 与 B 组比较, ^b $P<0.05$ 。

图 2 Western blot 检测结果

Note. Compared with the group A, ^a $P<0.05$. Compared with the group B, ^b $P<0.05$.

Figure 2 Results of the Western blot analysis

他汀类药物,尤其是水溶性他汀类药物,除了降脂外,其他潜在作用也日益受到关注,其促进骨形成潜能目前已初步得到认可^[10-12],课题组在前期研究中发现辛伐他汀可部分阻止尾悬吊大鼠股骨近端骨丢失,但未能达到正常对照组水平,本研究中我们发现,辛伐他汀作用 3 周可部分组织小鼠胫骨近端松质骨的骨丢失,但对胫骨中段皮质骨丢失的抑制作用并不显著。但是 mRNA 水平对 *OPG* 和 *RANKL* 的分析发现,辛伐他汀可有效促进 *OPG* 在 mRNA 水平的表达,但进一步分析发现对蛋白水平的表达影响并不显著。鉴于蛋白水平不仅仅取决于生产效率及 mRNA 翻译过程,也同样收到降解相关因素的影响,因此虽然我们在该单一节点提取的蛋白表达水平为观测到显著差异,但 mRNA 表达水平的升高也初步提示了辛伐他汀的促进骨形成作用。辛伐他汀对 *OPG* mRNA 表达的促进作用和对 *RANKL* mRNA 抑制作用在以往研究中均有报道^[13-14]。

利塞膦酸钠作为第三代二磷酸盐类药物^[15-17],是目前一线应用的抗股指数松药物之一,但主要应用于绝经后骨质疏松症,对于失用性骨质疏松的干预效果报道较少。本研究发现,利塞膦酸钠可以部分阻止该模型松质骨和皮质骨骨量丢失,较之辛伐他汀,对于维持皮质骨厚度的作用更为显著。但生物力学进一步分析发现,两者单独干预均未能表现出显著效果,利塞膦酸钠对该模型小鼠组织学水平的影响并无显著优势。有研究比较了联合阿仑膦酸盐和辛伐他汀或单独用药对高脂饮食卵巢切除大鼠的抗骨质疏松和抗动脉粥样硬化作用,结果发现阿仑膦酸钠和辛伐他汀联合应用具有抗骨质疏松、抗血脂异常和抗动脉粥样硬化的作用^[18]。本研究中,与单独用药相比,多项检测均支持两者联合应用效果更好,部分指标包括微观结构参数和弹性模量等与正常对照组无显著差别,且均优于单独用药组,*OPG* 和 *RANKL* 蛋白水平的分析亦发现,联合用药促进 *OPG* 表达的作用更显著。在一项糖皮质激素诱发的大鼠骨质疏松模型的研究中,虽然利塞膦酸钠表现出一定的保护骨质量的作用,但合并辛伐他汀干预较单纯利塞膦酸钠表现出更好的效果^[19]。

然而,不同性质药物合并使用并非能取得叠加或协同效应,比如与单独使用利塞膦酸钠相比,维生素 K2 与利塞膦酸钠合并使用并不能显著降低骨

质疏松患者骨折发生风险^[20]。因此,本研究采用的干预方案对该类骨质疏松的干预效果尚有待更多的研究证实和探讨。此外,本研究存在一定的局限性。首先,两种药物选择单一剂量,并未探讨不同剂量配比的作用效果,不排除更佳药物剂量的联合应用方案。此外,本研究并未探讨联合用药方案对不同月龄大鼠模型的干预效果,且尾悬吊法不能完全模拟人类失用性骨质疏松。因此,干预方案的单一和动物模型的选择是本研究的主要局限,后续仍需更多研究深入探讨。

参考文献:

- [1] Willems HME, van den Heuvel EGHM, Schoemaker RJW, et al. diet and exercise: a match made in bone[J]. Curr Osteoporos Rep, 2017, 15(6):555-563.
- [2] Alexandre C, Vico L. Pathophysiology of bone loss in disuse osteoporosis[J]. Joint Bone Spine, 2011, 78(6):572-576.
- [3] Leblanc A, Matsumoto T, Jones J, et al. Bisphosphonates as a supplement to exercise to protect bone during long-duration spaceflight[J]. Osteoporos Int, 2013, 24(7):2105-2114.
- [4] 田发明, 张柳, 邢磊, 等. 辛伐他汀部分阻止尾悬吊大鼠股骨近端骨量的丢失[J]. 中国骨质疏松, 2013, 19(12):1228-1231.
- [5] Shao Y, Hernandez-Buquer S, Childress P, et al. Improving combination osteoporosis therapy in a preclinical model of heightened osteoanabolism[J]. Endocrinology, 2017, 158(9):2722-2740.
- [6] Colaiani G, Mongelli T, Cuscito C, et al. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):2811.
- [7] Bullock WA, Hoggatt A, Horan DJ, et al. Expression of a degradation-resistant β -catenin mutant in osteocytes protects the skeleton from mechanodeprivation-induced bone wasting[J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(10):1964-1975.
- [8] Gerbaix M, Vico L, Ferrari SL, et al. Periostin expression contributes to cortical bone loss during unloading[J]. Bone, 2015, 71:94-100.
- [9] Cabahug-Zuckerman P, Frikha-Benayed D, Majeska RJ, et al. Osteocyte apoptosis caused by hindlimb unloading is required to trigger osteocyte RANKL production and subsequent resorption of cortical and trabecular bone in mice femurs[J]. J Bone Miner Res, 2016, 31(7):1356-1365.
- [10] Raafat SN, Amin RM, Elmazar MM, et al. The sole and combined effect of simvastatin and platelet rich fibrin as a filling material in induced bone defect in tibia of albino rats[J]. Bone, 2018, 117:60-69.
- [11] Kim AR, Kim JH, Kim A, et al. Simvastatin attenuates tibial bone loss in rats with type 1 diabetes and periodontitis[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):306.

[12] Kaleağasıoğlu F, Olcay E, Onur R. Statins as potential agents for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Endocrine*, 2018, 62(1):269.

[13] Liu S, Bertl K, Sun H, et al. Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells [J]. *Hum Cell*, 2012, 25(2):29-35.

[14] Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Statins modulate the levels of osteoprotegerin/receptor activator of NFκB ligand mRNA in mouse bone-cell cultures [J]. *Horm Metab Res*, 2005, 37(10):589-592.

[15] Naylor KE, Jacques RM, Paggiosi M, et al. Response of bone turnover markers to three oral bisphosphonate therapies in postmenopausal osteoporosis: the TRIO study [J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(1):21-31.

[16] Liu GF, Wang ZQ, Liu L, et al. A network meta-analysis on the short-term efficacy and adverse events of different anti-osteoporosis drugs for the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6):4469-4481.

[17] Durden E, Pinto L, Lopez-Gonzalez L, et al. Two-year persistence and compliance with osteoporosis therapies among postmenopausal women in a commercially insured population in the United States[J]. *Arch Osteoporos*, 2017, 12(1):22.

[18] Sequetto PL, Gonçalves RV, Pinto AS, et al. Low doses of simvastatin potentiate the effect of sodium alendronate in inhibiting bone resorption and restore microstructural and mechanical bone properties in glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Microsc Microanal*, 2017, 23(5):989-1001.

[19] Mohamed MT, Abuelezz SA, Atalla SS, et al. The anti-osteoporotic and anti-atherogenic effects of alendronate and simvastatin in ovariectomized rats fed high fat diet: A comparative study of combination therapy versus monotherapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:1115-1124.

[20] Tanaka S, Miyazaki T, Uemura Y, et al. Comparison of concurrent treatment with vitamin K2 and risedronate compared with treatment with risedronate alone in patients with osteoporosis: Japanese Osteoporosis Intervention Trial-03[J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(4):385-395.

[收稿日期]2019-06-17

(上接第 57 页)

[3] 陶祥,郑芹,杨惠玲. S₁₈₀ 荷瘤鼠免疫器官等变化及小柴胡汤对其影响的研究[J]. *广东医学*, 2004,25(12):1384-1385.

[4] 林帅,陈孟毅,刘冰,等. 环磷酸腺苷对不同年龄小鼠免疫细胞损伤及修复作用的影响[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(36):8-13.

[5] 路璐,张俊伶,李德冠,等. 6 Gy ¹³⁷Cs γ 射线照射对小鼠造血功能损伤的动态观察研究[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2015,39(5):393-396.

[6] 李德冠,樊赛军,孟爱民. 辐射导致长期骨髓抑制的研究进展[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2015,39(4):324-327.

[7] 管博文,卢延华,苏路路,等. 老年和青年 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫细胞分型测定分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7):24-28.

[8] Pang WW, Schrier SL, Weissman IL. Age-associated changes in human hematopoietic stem cells[J]. *Semin Hematol*, 2017, 54(1):39-42.

[9] 李德冠,王月英,路璐,等. 辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011,27(12):1362-1363.

[10] 李德冠,王月英,吴红英,等. 大剂量 γ 射线照射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2012,36(2):109-112.

[11] 李德冠,王月英,王小春,等. p38 抑制剂对辐射损伤小鼠中免疫细胞的作用[J]. *天津医药*, 2011,39(10):933-935.

[12] 崔玉芳,丁彦青,徐菡,等. 大剂量 γ 线照射对小鼠免疫功能近期、远期的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004,20(6):675-677.

[13] 吴安庆,陈秋,刘伟,等. X 射线全身照射对小鼠免疫系统的损伤效应[J]. *现代免疫学*, 2013,33(3):193-196.

[14] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease[J]. *Cell*, 2017,169(6):1000-1011.

[15] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells[J]. *Free Radic Biol Med*,2010,48(2):348-356.

[16] Shao L, Wang Y, Chang J, et al. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury[J]. *Transl Cancer Res*,2013,2(5):397-411.

[17] Wood WA, Krishnamurthy J, Mitin N, et al. Chemotherapy and stem cell transplantation increase p16^{INK4a} expression, a biomarker of T-cell aging[J]. *EBioMedicine*, 2016, 11:227-238.

[收稿日期]2019-06-17

卜兰兰,金剑,李思迪,等. 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态及认知能力的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 65-70,115.

Bu LL, Jin J, Li SD, et al. Effects of sleep interruption on gait performance and cognitive ability of SD rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 65-70,115.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 010

不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态及认知能力的影响

卜兰兰^{1#}, 金 剑^{2#}, 李思迪³, 刘新民^{4*}

(1. 湖南中医药大学医学院病理教研室, 长沙 410208; 2. 郑州大学第三附属医院, 郑州 451200; 3. 吉首大学, 湖南 吉首 416000; 4. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

【摘要】 目的 研究不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态及认知能力的影响。**方法** 将 64 只 SD 大鼠随机分为睡眠干扰 2 d、5 d、10 d、15 d 模型组及相应对照组, 共 8 组, 每组 8 只。用滚筒法对大鼠进行睡眠干扰后, 到达相应时间点时先进行自主活动检测, 再用步态分析仪评估睡眠干扰对 SD 大鼠步态的影响, 最后用水迷宫检测其学习记忆能力。**结果** 自主活动显示, 与相应对照组比较, 5 d 模型组总路程、平均速度、运动总时间、边缘区运动时间明显减少 ($P < 0.05$), 静息总时间明显增加 ($P < 0.05$); 10 d 模型组总路程、平均速度减少 ($P < 0.05$), 运动总时间、边缘区运动时间显著减少 ($P < 0.01$), 静息总时间显著增加 ($P < 0.01$)。步态结果显示, 与相应对照组比较, 5 d 模型组平均步行周期明显缩短 ($P < 0.05$); 2 d、15 d 模型组步行速度明显下降、双支撑时相-左前-右后明显缩短 ($P < 0.05$), 双支撑时相-左后-右前显著缩短、三支撑时相-右后-左后-右前显著增加 ($P < 0.01$); 2 d、5 d、15 d 模型组右后步幅明显缩小 ($P < 0.05$)。水迷宫结果显示, 与相应对照组比较, 5 d 模型组定位航行第 1 ~ 4 天潜伏期明显增加 ($P < 0.05$), 10 d 模型组定位航行第 2、4 天潜伏期明显增加 ($P < 0.05$), 15 d 模型组定位航行第 1 ~ 5 天潜伏期明显增加 ($P < 0.05$), 其中 5 d 模型组定位航行第 1 天潜伏期显著增加 ($P < 0.01$), 15 d 模型组定位航行第 1 ~ 3 天潜伏期显著增加 ($P < 0.01$)。**结论** 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态、自主活动、空间定位学习能力有不同程度的影响。步态检测相比自主活动和水迷宫检测, 是评价滚筒法睡眠干扰模型更为敏感的方法。

【关键词】 睡眠干扰; 滚筒; 步态; 自主活动; 水迷宫; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0065-06

Effects of sleep interruption on gait performance and cognitive ability of SD rats

BU Lanlan^{1#}, JIN Jian^{2#}, LI Sidi³, LIU Xinmin^{4*}

(1. Department of Pathology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.
2. The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 451200. 3. Jishou University, Jishou 416000. 4. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

【Abstract】 Objective To study the effects of sleep interruption (SI) on the gait performance and cognitive ability

【基金项目】 湖南省教育厅科研一般项目 (15C1031); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2018CX02); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (2018020178); 吉首大学大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (JDCX2018007, JDCX2018045, JDCX2018046)。

【作者简介】 卜兰兰 (1983—), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向: 神经药理学。E-mail: bulanlan216@163.com

金剑 (1986—), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 神经发育。E-mail: jinjian86@hotmail.com * 共同第一作者

【通信作者】 刘新民, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经药理学。E-mail: liuxinmin@hotmail.com

of SD rats. **Methods** SD rats were randomly divided into eight groups: SI 2 days, SI 5 days, SI 10 days, SI 15 days, and their corresponding control groups, 8 rats in each group. Behavioral alterations in the gait detection (GD), open field (OF), and Morris water maze (MWM) tests were detected after SI for the indicated time periods. **Results** For the OF test, the total distance, movement speed, total duration of movement, and movement time in the peripheral area decreased following SI, and the total resting duration increased in the 5-day and 10-day SI groups compared with the control group ($P < 0.05$). The GD result showed that compared with the control group, the stride time decreased in the 5-day SI group; the walking speed, Lh-Rf double support time, and Lf-Rh double support time all decreased in the 2-day and 15-day groups, while the Rh-Lh-Rf three support time increased in the 2-day and 15-day SI groups; and the Rh stride length decreased in the 2-day, 5-day, and 15-day SI groups ($P < 0.05$). For the MWM test, compared with the control group, the latency of place navigation of MWM increased between days 1 and 4 in the 5-day SI group, increased between days 2 and 4 in the 10-day SI group, and increased between days 1 and 5 in the 15-day SI group. **Conclusions** Different durations of SI have varying effects on the result of the GD, OF, and MWM tests in SD rats. The GD test is a more sensitive method for evaluating the SI model than the OF and MWM tests.

【**Keywords**】 sleep interruption; rotating drum test; gait detection test; spontaneous activity; Morris water maze; rat

流行病学调查显示,国人睡眠障碍发生率很高,有睡眠障碍者约占 38%,高于世界 27% 的比例,严重影响人们健康^[1]。睡眠干扰对机体的影响十分明显,包括学习记忆、精神情绪、运动表现、生物钟、免疫、能量平衡等多方面^[2-6]。本实验室前期研究发现,滚筒法睡眠干扰可造成小鼠学习能力下降、抑郁、疲劳以及大鼠运动行为异常^[6-13]。但滚筒法不同程度睡眠干扰对大鼠的步态运动及认知能力影响如何,尚未见报道。本研究旨在观察滚筒法不同时长睡眠干扰后大鼠步态、认知能力的变化特征,动态分析不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态及认知能力的影响,为睡眠干扰机制及防护措施研究提供实验模型和评价指标提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 64 只,雄性,体重 220 ~ 240 g, 6 ~ 8 周龄,购自北京维通利华公司[SCXK(京)2016-0006]。实验在中国医学科学院药用植物研究所进行[SYXK(京)2018-0020]。本研究经中国医学科学院/北京协和医学院药用植物研究所实验动物管理与动物福利委员会审查批准(伦理委员会审批号:SLXD-201803170028)。实验遵守 3R 原则,国际实验动物伦理学要求。动物自由摄食饮水,实验室安静,温度 22℃ ~ 24℃,湿度 40% ~ 60%,12 h 照明/12 h 黑暗。

1.2 主要仪器

滚筒式大小鼠睡眠干扰仪、大鼠自主活动仪、大鼠 Morris 水迷宫、大小鼠步态分析仪由北京鑫海华仪公司、中国航天员科研训练中心及中国医学科

学院药用植物研究所联合研发。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

SD 大鼠适应性喂养 3 d 后按体重随机分为睡眠干扰 2 d、5 d、10 d、15 d 模型组及相应对照组,共 8 组,每组 8 只。

1.3.2 睡眠干扰实验

实验在滚筒式大小鼠睡眠干扰仪^[6-14]中进行。先适应,后造模。

适应:睡眠干扰组大鼠放入滚筒,滚动参数 1 r/min、转 5 圈休息 1 min,每天 3 h,连续 3 d。

造模:睡眠干扰组大鼠放入滚筒,滚动参数 1 r/min、转 5 圈休息 1 min^[11],开始运转。2 d、5 d、10 d、15 d 时取出相应模型组和对照组进行行为学检测。

1.3.3 自主活动实验

大鼠自主活动仪^[9-11, 14]由 4 个可移动圆桶(直径 75 cm,高 50 cm)和图像采集分析系统组成。圆桶正上方的摄像头能自动监测动物的运动轨迹并将信息传送至计算机。圆桶底部活动场所被软件分为三个区即中央区(中心直径 20 cm)、边缘区(周边宽 10 cm)、探索区(中央与边缘区之间)。睡眠干扰相应时间到,取出相应模型组和对照组。设定参数后,迅速将动物沿壁放入桶内,软件采集动物 10 min 的轨迹,并通过总路程、平均速度、运动总时间、中央区运动时间、边缘区运动时间等反映动物活动情况。

1.3.4 步态实验

大小鼠步态分析仪^[9, 11-12, 17]由装有高频摄像头的步行通道、足迹增强板、背景增强装置、图像采

集分析系统等组成(见图 1)。光线从荧光管中发出,透过玻璃平板,当动物脚掌与玻璃平板表面接触时,光线向下反射,下方的高频摄像头捕捉到脚印图像。该系统全程采集动物行走时的足印信息,分析足迹的步行周期、支撑距离、支撑时长、摆动时长、制动时长、推进时长、步频等 97 种指标,可客观、准确、全面地反映动物步态的变化情况^[12]。

为使大鼠能在正式实验中恒速无停顿地通过步态仪的通道,必须对其进行规范的前期训练。在睡眠干扰前,对所有大鼠进行步态训练,每天 3 次,连续 1 周。睡眠干扰相应时间点到,自主活动检测后,对其进行步态检测。

检测前,调试仪器采光系统,在适当的光线条件下,保证大鼠足印在采集图像窗口中清晰可见,每只大鼠不间断连续跑过步行通道时,高频摄像机记录步态录像,并通过计算机分析软件进行图像分析,统计步态指标。

1.3.5 Morris 水迷宫实验

睡眠干扰相应时间点到,自主活动和步态实验后,进行水迷宫实验。

大鼠 Morris 水迷宫^[9, 11, 15-16, 18] 由一个直径 180 cm、高 38 cm 的圆形水池及图像采集分析系统组成^[11]。平台直径 6 cm、高 13 cm,水深 15 cm。实验分为定位航行和空间探索两个阶段。定位航行历时 5 d,空间探索历时 1 d。检测时间设定为 120 s。具体实验方法同前期实验^[13]。

1.4 统计学方法

用 SPSS 25.0 软件分析实验结果,数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠自主活动的影响

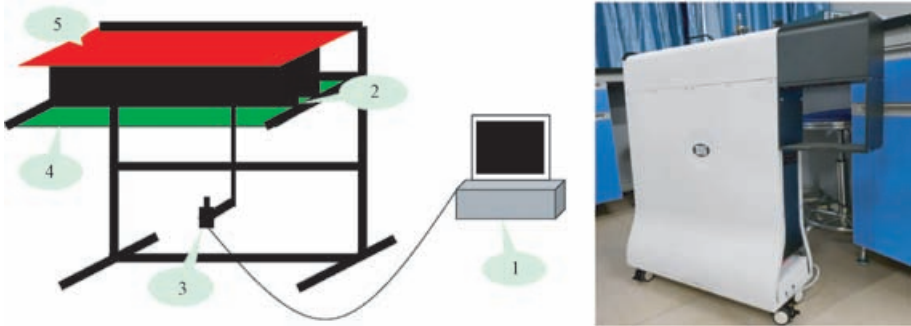
如表 1 所示,与相应对照组比较,5 d 模型组总路程、平均速度、运动总时间、边缘区运动时间明显减少($P < 0.05$),静息总时间明显增加($P < 0.05$);10 d 模型组总路程、平均速度明显减少($P < 0.05$),运动总时间、边缘区运动时间显著减少($P < 0.01$),静息总时间显著增加($P < 0.01$)。

2.2 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠步态行为的影响

如图 2 所示,与对照组比较,2 d 模型组大鼠步行速度明显下降、双支撑时相-左前-右后明显缩短、右后步幅明显缩小、体转角标准偏差明显减小($P < 0.05$),三支撑时相-右后-左后-右前显著增加($P < 0.01$),双支撑时相-左后-右前显著缩短($P < 0.01$);5 d 模型组大鼠平均步行周期明显缩短、右后推进时长明显减少($P < 0.05$),右后步幅显著缩小($P < 0.01$);15 d 模型组大鼠步行速度明显下降、右后步幅明显缩小、双支撑时相-左前-右后明显缩短、右后推进时长明显减少($P < 0.05$),三支撑时相-右后-左后-右前显著增加($P < 0.01$),双支撑时相-左后-右前和右后推进指数显著缩短($P < 0.01$)。

2.3 不同时长睡眠干扰对 SD 大鼠水迷宫的影响

如表 2 所示,与对照组比较,5 d 模型组大鼠定位航行第 1 ~ 4 天潜伏期增加($P < 0.05$);10 d 模型组大鼠定位航行第 2,4 天潜伏期明显增加($P < 0.05$);15 d 模型组大鼠定位航行第 1 ~ 5 天潜伏期明显增加($P < 0.05$),其中 5 d 模型组大鼠定位航行



注:1:视频采集分析系统;2:动物步行通道;3:高速摄像机;4:足迹增强板;5:背景增强装置。

图 1 步态分析系统硬件结构模式图(左)及实物图(右)

Note. 1, Video capture and analysis system. 2, Animal walkway. 3, High-speed camera. 4, Footprint enhancement plate. 5, Background intensifier.

Figure 1 Hardware pattern diagram (left) and product picture (right) of the gait detection system

第 1 天潜伏期显著增加 ($P < 0.01$), 15 d 模型组大鼠定位航行第 1 ~ 3 天潜伏期显著增加 ($P < 0.01$); 2 d 模型组大鼠定位航行第 4 天潜伏期显著减少 ($P < 0.01$)。如表 3 所示, 与相应对照组比较, 2 d、5 d、10 d、15 d 模型组大鼠空间探索各指标差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 睡眠干扰对 SD 大鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effects of sleep interruption on the open field test in SD rats

指标 Indices	2 d		5 d		10 d		15 d
	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组
	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group
总路程 (cm)	4476.83±	3905.04±	4737.59±	3237.54±	4704.13±	3620.93±	5015.99±
Total distance	1454.02	1164.47	1183.23	892.76 *	928.24	586.61 *	1100.95
平均速度 (cm/s)	7.46±	6.51±	7.90±	5.40±	7.84±	6.04±	8.36±
Movement speed	2.42	1.94	1.97	1.49 *	1.55	0.98 *	1.83
运动总时间 (s)	251.64±	221.89±	271.71±	166.27±	285.52±	186.08±	299.83±
Total duration of movement	90.62	90.25	86.85	77.81 *	66.23	48.65 **	76.03
静息总时间 (s)	348.32±	378.07±	328.26±	433.70±	314.44±	413.89±	300.14±
Total resting duration	90.63	90.25	86.84	77.81 *	66.24	48.64 **	76.03
中央区运动时间 (s)	15.78±	22.83±	3.62±	1.58±	17.29±	10.80±	3.82±
Movement time in central area	3.87	2.04	2.13	2.25	5.67	5.23	2.85
边缘区运动时间 (s)	203.88±	138.09±	197.78±	115.72±	213.23±	146.54±	212.49±
Movement time in peripheral area	74.59	61.51	62.09	78.34 *	42.87	43.91 **	42.15

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下图、下表同。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same in the following figure and tables.

表 2 睡眠干扰对 SD 大鼠水迷宫 (定位航行) 潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effects of sleep interruption on latency in the Morris water maze test (place navigation) in SD rats

时间 Time	2 d		5 d		10 d		15 d	
	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group	Model group
第 1 天 Day 1	66.41±28.94	59.93±18.45	48.90±23.12	97.03±26.97 **	64.72±23.99	82.75±27.66	51.48±19.03	98.05±28.27 **
第 2 天 Day 2	18.91±7.24	30.22±20.56	33.35±16.80	66.04±18.40 *	24.67±12.24	47.69±21.15 *	26.36±10.79	66.56±27.67 **
第 3 天 Day 3	18.06±10.13	15.60±9.84	20.29±10.23	59.20±13.25 *	20.54±13.98	37.64±17.41	14.51±4.32	43.59±17.22 **
第 4 天 Day 4	29.50±17.22	14.73±5.63 *	10.95±3.41	51.50±18.21 *	14.13±7.57	33.78±12.90 *	12.61±4.38	30.79±16.61 *
第 5 天 Day 5	16.72±6.67	16.21±10.66	11.58±4.76	29.86±15.04	19.67±13.05	12.27±7.08	13.55±8.58	32.61±19.78 *

表 3 睡眠干扰对 SD 大鼠水迷宫 (空间探索) 成绩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Effects of sleep interruption on the Morris water maze test (spatial probe) in SD rats

指标 Indices	2 d		5 d		10 d		15 d	
	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group	Model group	Control group	Model group
目标象限穿台次数 Times of crossing in the target quadrant	1.67±0.37	1.25±0.28	2.50±0.56	1.40±0.19	2.25±0.16	1.50±0.31	2.29±0.20	2.00±0.39
目标象限游程比 (%) Percentage of swimming distance in the target quadrant	0.35±0.10	0.34±0.05	0.10±0.05	0.08±0.04	0.36±0.13	0.39±0.08	0.37±0.07	0.30±0.12
目标象限时间比 (%) Percentage of swimming time in the target quadrant	0.37±0.10	0.36±0.07	0.37±0.09	0.33±0.02	0.37±0.06	0.42±0.09	0.38±0.08	0.30±0.02

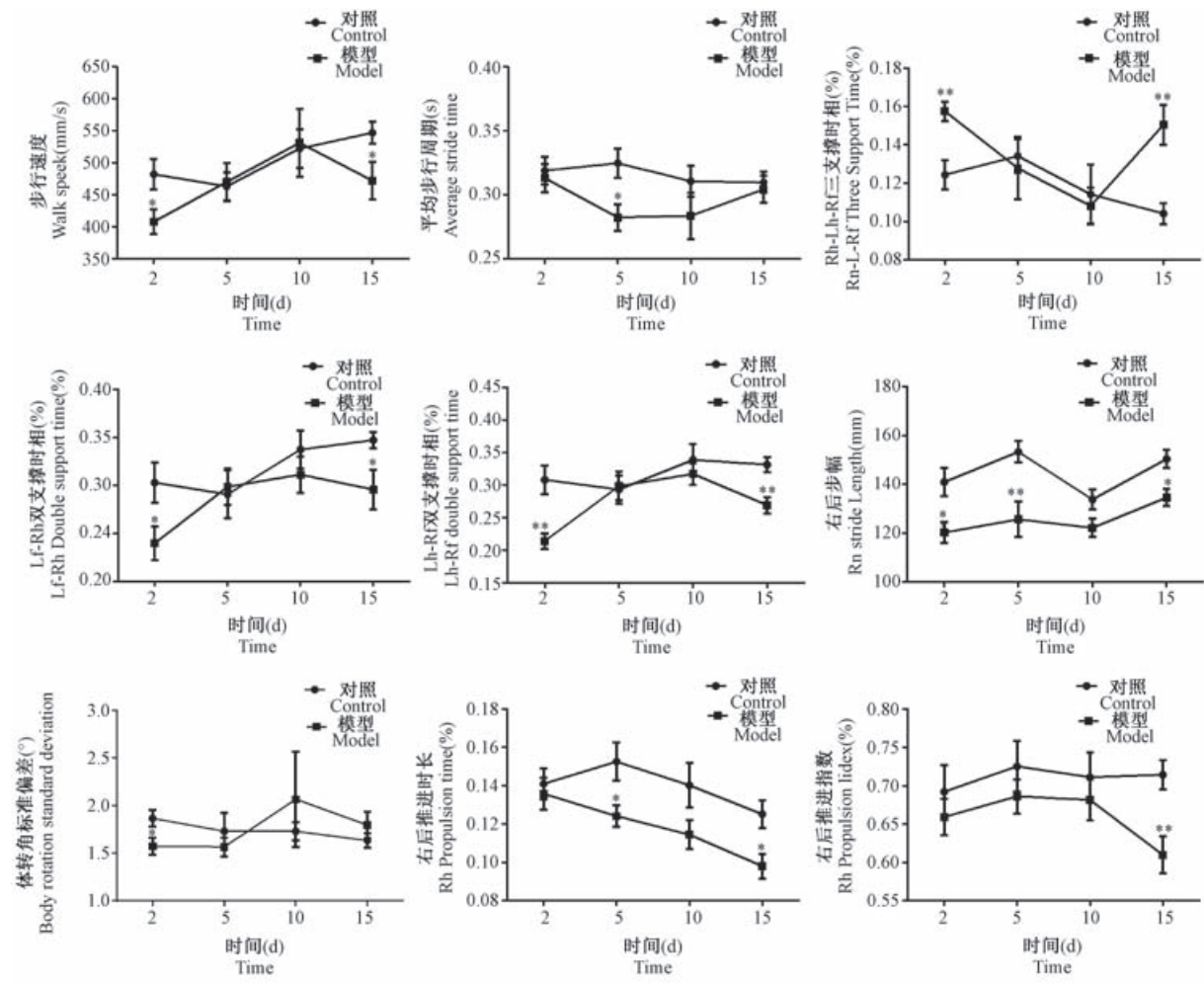


图 2 睡眠干扰对 SD 大鼠步态行为的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 2 Effects of sleep interruption on the gait detection test in SD rats

3 讨论

水迷宫和自主活动分别是评价啮齿类动物空间认知和探索行为的经典方法^[19-20]。不同方法、不同程度睡眠干扰对学习记忆有不同程度损害,对探索运动行为有不同的影响^[21-24]。以前期研究和预实验为基础,我们探索性地研究了 2 d、5 d、10 d、15 d 睡眠干扰对 SD 大鼠认知能力及探索运动行为的影响。本研究显示,滚筒法短时长睡眠干扰(2 d)大鼠空间定位学习能力有一过性提高,但随干扰时间延长,学习能力下降。干扰初期(2 d)、后期(15 d)自主活动指标无差异,与干扰时间短或大鼠对滚筒产生适应有关;干扰中间阶段(5 d、10 d)运动探索减少,表明兴奋性下降。不同时长睡眠干扰,水迷宫、自主活动结果与我们前期研究一致^[10-11]。这表明滚筒法睡眠干扰结果的稳定性和可靠性。

步态指机体步行时的姿势和运动。机体对行

走过程中步态的调控极其复杂,步行高级中枢的定位和其对步态的调控方式至今尚未明了,据推测大脑皮质、脑干和小脑均存在步行调控中枢,当其受损或传导通路发生障碍时,可能导致不同类型的异常步态^[12]。目前,步态研究主要集中在帕金森病、脑卒中、老年痴呆、脑瘫、周围神经损伤、骨关节病损等的评价^[25-29]。而睡眠干扰动物行为学研究及评价集中在学习记忆、抑郁、焦虑、疲劳等方面^[6-10, 13, 30]。有关睡眠干扰所致步态异常的系统性研究报道非常少,仅见有应用药物注射模拟失眠的报道一篇^[31]。化学法干扰睡眠虽简单易行,但化学药品多属精神药品受到严格管制,睡眠干扰效果和程度会因动物个体差异而不易掌握,也会由于注射药物的时间长短及量的多少而出现差异,且造模药物可能干扰实验药物的药效学研究,故应用较少^[11]。滚筒法睡眠干扰通过滚筒滚动,使筒内动物被打扰而保持清醒,因造模方法简单、效果明显、稳

定性和重复性好而在睡眠干扰模型制作和研究中广泛应用^[6-13, 30]。但滚筒法不同时长睡眠干扰对动物步态的影响尚未见报道。

本研究动态观察和分析了滚筒法不同时长睡眠干扰 SD 大鼠的步态变化,发现随干扰时间的延长,SD 大鼠出现了不同特点的步态功能异常。首先,双支撑时相减少、三支撑时相增加,提示大鼠行走稳定性下降,为提高行走稳定性而增加多肢体支撑时相。平均体转角标准偏差在干扰初期发生显著变化,说明干扰初期大鼠行走方向虽未偏移,但左右摇摆幅度增大,行走稳定性下降,这与双支撑时相减少、三支撑时相增加反映情况相一致。平均体转角标准偏差只在干扰初期出现,多支撑时相在干扰初期和后期均有变化,提示干扰初期步态稳定性下降程度更大。推进时长和推进指数是肢体蹬地启动、身体移动指标,反映行走时肢体发力。睡眠干扰中间较早时(5 d)和干扰后期推进时长或推进指数下降,提示肢体支撑力减弱,这也是大鼠移动速度下降重要原因之一。其次,睡眠干扰大鼠步行速度、双支撑时相、三支撑时相、后肢推进时长在干扰初期和后期均显著下降,而中间阶段(5 d、10 d)未见差异。这与干扰初期睡眠时间突然减少,机体处于急性应激状态,之后机体启动代偿机制,但随应激持续(至 15 d),最终表现为失代偿有关。因此滚筒法(1 r/min,连续 5 r,间隔 1 min)不同时长睡眠干扰对雄性 SD 大鼠步态的影响呈现“损伤-代偿性恢复-失代偿性损伤”的规律。应用步态分析仪对滚筒法不同时长睡眠干扰大鼠进行系统全面的步态指标分析,在睡眠干扰动物模型评价中尚未见报道。步态异常机制有待进一步研究。

评价睡眠干扰模型时,我们用步态、自主活动、水迷宫分别评价 SD 大鼠运动协调能力、探索运动行为和空间认知能力。通过分析发现,滚筒法睡眠干扰模型对 SD 大鼠步态、自主活动、空间定位学习能力有不同程度的影响。从指标方面看,潜伏期指标较为单一,自主活动指标只有在中间阶段才显示造模对 SD 大鼠探索运动行为的影响,不够敏感。而步态检测可灵敏地探测到动物运动协调能力的改变,在睡眠干扰模型行为学评价中指标类型较多,且无创。本研究为睡眠干扰模型评价筛选到更敏感的行为学评价方法,可为睡眠干扰程度及相关药物研发提供好的行为学方法,为睡眠干扰疾病模型的机制研究、药效学评价选择合适的时间窗提供

依据,也为从睡眠方面入手、科学地干预机体运动能力提供好的动物模型,为防护产品研发提供参考。

参考文献:

- [1] 中国成人睡眠障碍者达 38.2% [J]. 中国护理管理, 2012, 12(4): 18.
- [2] Thun E, Bjorvatn B, Flo E, et al. Sleep, circadian rhythms, and athletic performance [J]. Sleep Med Rev, 2015, 23: 1-9.
- [3] Halson SL, Juliff LE. Sleep, sport, and the brain [J]. Prog Brain Res, 2017, 234: 13-31.
- [4] Capers PL, Fobian AD, Kaiser KA, et al. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of the impact of sleep duration on adiposity and components of energy balance [J]. Obes Rev, 2015, 16(9): 771-782.
- [5] Bollinger T, Bollinger A, Oster H, et al. Sleep, immunity, and circadian clocks: a mechanistic model [J]. Gerontology, 2010, 56(6): 574-580.
- [6] Feng L, Wu HW, Song GQ, et al. Chronical sleep interruption-induced cognitive decline assessed by a metabolomics method [J]. Behav Brain Res, 2016, 302: 60-68.
- [7] 张北月, 石晋丽, 郑志全, 等. DS-1226 对慢性睡眠干扰所致小鼠抑郁行为的改善作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 85-89.
- [8] 黄红, 姜宁, 吕静薇, 等. 不同时间睡眠干扰致小鼠体力疲劳模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 16-20.
- [9] 卢聪, 金剑, 王克柱, 等. 人参皂苷 Rg1、Rb1 对睡眠干扰所致 SD 大鼠认知和运动行为障碍的影响 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 82-87.
- [10] 卜兰兰. 睡眠干扰致学习记忆障碍动物模型的建立及 DS-1226 益智作用研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2011.
- [11] 金剑. 一种基于睡眠干扰动物模型的中药药效研究方法 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2013.
- [12] 李思迪. 基于全自动步态分析系统的复方中药药效评价方法研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [13] 卜兰兰, 石哲, 武宏伟, 等. 达玛烷苷元对睡眠干扰所致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(10): 48-53.
- [14] 王克柱, 孙军花, 徐攀, 等. 硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠自主活动的变化 [J]. 神经药理学报, 2015, 5(3): 6-11.
- [15] 王逸, 卢聪, 宋广青, 等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 40-44.
- [16] 马静遥, 陈铃铃, 王琼, 等. 模拟航天特因环境下大鼠认知功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(10): 58-62.
- [17] 张胜威, 董世芬, 武汀, 等. APP/PS1 双转基因小鼠认知功能和实时步态行为的相关性 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(5): 19-24, 9.

潘明子,贺玉伟,李海龙,等. *Uox* 基因敲除自发高尿酸血症对小鼠体重、血压及血液生理生化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 71-77.

Pan MZ, He YW, Li HL, et al. Effects of *Uox* gene knockout-induced spontaneous hyperuricemia on body weight, blood pressure, and blood physiological and biochemical parameters of mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 71-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.11.011

Uox 基因敲除自发高尿酸血症对小鼠体重、 血压及血液生理生化的影响

潘明子¹, 贺玉伟^{1,2}, 李海龙², 梁楠¹, 李长贵^{1,2*}

(1.青岛大学附属医院, 山东 青岛 266021; 2.青岛大学代谢病研究院, 山东 青岛 266021)

【摘要】 目的 明确尿酸氧化酶(urate oxidase)基因(*Uox*)敲除(*Uox*^{-/-})自发高尿酸血症对 C57BL/6 J 小鼠体重、血压及血液生理生化等基础生物学指标的影响。**方法** 选取 6、12 周龄 C57BL/6 J 野生型(*Uox*^{+/+})、尿酸氧化酶基因杂合缺失(*Uox*^{+/-})和尿酸氧化酶基因敲除(*Uox*^{-/-})雌性和雄性小鼠,测量体重、血压,并检测主要血生理、生化指标。**结果** 体重结果显示,雄性和 6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠体重显著低于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠($P<0.05$);雄性 *Uox*^{+/+} 和 *Uox*^{+/-} 小鼠体重显著高于同周龄雌性小鼠($P<0.05$),而不同性别 *Uox*^{-/-} 小鼠体重之间无统计学差异。血压结果显示,6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠和 12 周龄雄性 *Uox*^{-/-} 小鼠血压显著高于同周龄 *Uox*^{+/+} 和 *Uox*^{+/-} 小鼠($P<0.05$)。血液学生理指标结果显示,*Uox*^{-/-} 小鼠红细胞计数(RBC)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)和血红蛋白(HGB)水平显著低于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$),平均血红蛋白浓度(MCHC)和血小板压积(PCT)高于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$);*Uox*^{+/-} 小鼠 RBC、HCT 和 HGB 水平也低于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$),PCT 高于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$)。血液学生化指标结果显示,*Uox*^{-/-} 小鼠白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)和直接胆红素(DBIL)水平明显低于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$),尿酸(UA)、肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(CHOL)和低密度脂蛋白(LDL)水平均显著高于 *Uox*^{+/+} 小鼠($P<0.05$)。**结论** 建立了 *Uox* 基因敲除 C57BL/6 J 小鼠基础生物学数据,*Uox*^{-/-} 自发高尿酸血症能够引起小鼠体重、血压、肾功能及脂类代谢等变化。

【关键词】 尿酸氧化酶;基因敲除;高尿酸血症;血压;血生理生化指标;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0071-07

Effects of *Uox* gene knockout-induced spontaneous hyperuricemia on body weight, blood pressure, and blood physiological and biochemical parameters of mice

PAN Mingzi¹, HE Yuwei^{1,2}, LI Hailong², LIANG Nan¹, LI Changgui^{1,2*}

(1. The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266021, China.

2. Institute of Metabolic Diseases, Qingdao University, Qingdao 266021)

【Abstract】 Objective To determine the effects of urate oxidase (*Uox*) gene knockout (*Uox*^{-/-})-induced spontaneous hyperuricemia on the body weight, blood pressure, and blood physiological and biochemical parameters of C57BL/6 J mice. **Methods** Both female and male C57BL/6 J mice at six- and twelve- week-old were contained, including

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2018ZC1053);山东省重大科技创新工程项目(2018CXGC1207);中国博士后科学基金面上项目(2018M630755)。

【作者简介】 潘明子(1994—),女,硕士研究生,专业:内科学。E-mail: 598907458@qq.com

【通信作者】 李长贵(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向:内分泌与代谢病。E-mail: lichanggui@medmail.com.cn

wild-type ($Uox^{+/+}$), urate oxidase knockout heterozygotes ($Uox^{+/-}$) and urate oxidase knockout homozygous ($Uox^{-/-}$) mice. Mice body weight, blood pressure, and major blood physiological and biochemical parameters were observed. **Results**

The average body weight of the 6-week-old female $Uox^{-/-}$ mice and all male $Uox^{-/-}$ mice was significantly lower than that of the $Uox^{+/+}$ mice ($P < 0.05$). The body weight of the male $Uox^{+/+}$ and $Uox^{+/-}$ mice was significantly higher than that of the female mice of the same genotype and age ($P < 0.05$), but the body weight showed no statistical differences between the $Uox^{-/-}$ mice of different sex. Compared with $Uox^{+/+}$ and $Uox^{+/-}$ mice of the same age, 6-week-old female $Uox^{-/-}$ mice and 12-week-old male $Uox^{-/-}$ mice had significantly higher blood pressure ($P < 0.05$). Blood physiological parameters showed that the red blood cell (RBC), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), and hemoglobin (HGB) of the $Uox^{-/-}$ mice were significantly lower than those of the $Uox^{+/+}$ mice ($P < 0.05$), and their mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and plateletcrit (PCT) were higher than those of the $Uox^{+/+}$ mice ($P < 0.05$). Compared with the $Uox^{+/+}$ mice, RBC, HCT and HGB of the $Uox^{+/-}$ mice were significantly decreased ($P < 0.05$), while PCT was significantly increased ($P < 0.05$). The blood biochemical parameters showed that albumin (ALB), total bilirubin (TBIL), and direct bilirubin (DBIL) of the $Uox^{-/-}$ mice were lower than those of the $Uox^{+/+}$ mice ($P < 0.05$), and their uric acid (UA), creatinine (CREA), blood urea nitrogen (BUN), cholesterol (CHOL), and low density lipoprotein (LDL) were significantly higher than those of the $Uox^{+/+}$ mice ($P < 0.05$). **Conclusions** The basic biological data of C57BL/6 J mice with the urate oxidase gene knockout were established. $Uox^{-/-}$ -induced spontaneous hyperuricemia could cause abnormal changes in body weight, blood pressure, kidney function, and lipid metabolism of mice.

[Keywords] urate oxidase; gene knockout; hyperuricemia; blood pressure; blood physiological and biochemical parameters; mouse

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是由尿酸合成增加和(或)排泄减少引起的代谢性疾病,其定义为在正常嘌呤饮食状态下,非同日两次空腹血尿酸水平男性高于 $420\ \mu\text{mol/L}$, 女性高于 $360\ \mu\text{mol/L}$ ^[1]。近年来,随着生活水平的提高和高嘌呤食物摄入的增加,HUA 的患病率逐年上升,并呈现年轻化趋势^[2]。大量研究证实,HUA 与肥胖、高血压、慢性肾脏病、2 型糖尿病、痛风等疾病的发生发展密切相关,严重危害人类健康^[3-7]。随着对 HUA 研究的深入,构建合适的高尿酸血症动物模型成为揭示其发病机制与研发治疗药物亟需解决的问题。课题组前期使用类转录激活因子效应物核酸酶敲除目的小鼠的尿酸氧化酶(urate oxidase, Uox)基因,基于 C57BL/6 J 遗传背景成功构建了 Uox 敲除($Uox^{-/-}$)小鼠模型。该模型血尿酸水平长期 $>420\ \mu\text{mol/L}$,自发高尿酸血症,在 62 周内存活率约为 40%,同时伴随肾功能损害、脂质代谢障碍、胰岛素分泌受损等代谢紊乱的特征^[8],类似于人类高尿酸血症患者,为 HUA 发病机制研究及新药研发提供了较为理想的动物模型。

为明确 $Uox^{-/-}$ 自发高尿酸血症对 C57BL/6 J 小鼠体重、血压及血液生理生化指标的影响,本研究对三种不同尿酸酶基因的小鼠上述指标进行检测和分析,为利用该小鼠进行生命科学研究和生物医药研发提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取同窝出生的 6、12 周龄 C57BL/6 J 尿酸氧化酶基因敲除($Uox^{-/-}$)、尿酸氧化酶基因杂合缺失($Uox^{+/-}$)及野生型($Uox^{+/+}$)对照小鼠,每组 12 只,雌雄各半。野生型 C57BL/6J 小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司[SCXK(沪)2014-0002]。 $Uox^{-/-}$ 小鼠由作者所在实验室构建^[8],具体方法如下:选择 Uox 两端 DNA 序列,体外转录,得到两段 mRNA 序列,分别标记为 TALEN-L1 mRNA 和 TALEN-R1 mRNA。该序列可将尿酸氧化酶基因原序列中的 T 替换为 U,产生终止密码子,使尿酸氧化酶基因变为哑基因不表达。将这两个序列注射到 C57BL/6 J 小鼠的受精卵胞质中,得到 F0 代嵌合体小鼠;F0 代小鼠与野生型小鼠进行杂交,获得 F1 代杂合体小鼠;杂合体小鼠自交后获得尿酸氧化酶基因敲除的纯合体小鼠,即为自发高尿酸血症小鼠模型。所有小鼠均按照 SPF 级标准饲养于青岛大学附属医院实验动物中心[SYXK(鲁)2015-0003]IVC 无菌通风笼中,自由饮水、摄食,12 h 昼夜循环,室温(22 ± 2)℃,湿度(75 ± 5)%。实验过程中,在不影响实验要求和实验结果的基础上,严格按实验动物使用的 3R 原则关注实验动物福利。

1.2 主要试剂与仪器

美国肯特 CODA Monitor 多动物多通道尾袖套

法无创血压系统,罗氏 Roche cobas 6000 c501 全自动生化分析仪和配套试剂,迈瑞 BC-5300 全自动血细胞分析仪和配套试剂,凯丰 KFS1000 电子秤, Thermo Heraeus Fresco 17 微量冷冻离心机,离心管, EDTA.K2 抗凝管。

1.3 实验方法

小鼠生长至 6 周龄和 12 周龄,检测小鼠体重、血压及血液生理生化指标。

1.3.1 体重的测量

禁食 12 h,用电子秤分别称取小鼠体重。

1.3.2 血压的测量

使用美国肯特 CODA Monitor 多动物多通道尾袖套法无创血压系统对小鼠血压进行监测,每只小鼠测量三次以上,取平均值作为最终血压。

1.3.3 血液生理指标的检测

从小鼠眼眶后静脉丛采集 0.1 mL 小鼠静脉血至 EDTA.K2 抗凝管内,快速弹匀,进行血生理指标测定。12 项血生理指标分别为:红细胞压积(HCT)、血红蛋白(HGB)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、平均红细胞体积(MCV)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)、血小板体积分布宽度(PDW)、血小板(PLT)、红细胞计数(RBC)、红细胞体积分布宽度(RDW-C)、红细胞体积分布宽度(RDW-S)和白细胞计数(WBC)。

1.3.4 血液生化指标的检测

从小鼠眼眶后静脉丛采集 0.3 mL 小鼠静脉血至离心管内,4℃ 静置 20 min,3000 r/min 离心 10 min,取上层血清进行血生化指标测定。15 项血生化指标分别为:白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、谷草转氨酶/谷丙转氨酶(AST/ALT)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IDBIL)、血糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆

固醇(CHOL)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)和尿酸(UA)。

1.4 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 24 统计软件进行独立样本 *t* 检验和单因素方差分析方法统计,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *Uox*^{-/-} 自发高尿酸血症对小鼠体重的影响

结果显示,6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠和 12 周龄 *Uox*^{-/-} 小鼠体重均显著低于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠 ($P<0.05$)。相较于雄性 *Uox*^{+/+} 和 *Uox*^{+/-} 小鼠体重显著高于同周龄雌性小鼠 ($P<0.05$),雄性和雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠之间体重无统计学差异。三种基因背景 12 周龄小鼠体重均明显高于 6 周龄小鼠体重 ($P<0.01$)。见表 1、图 1。

2.2 *Uox*^{-/-} 自发高尿酸血症对小鼠血压的影响

结果显示,6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠和 12 周龄雄性 *Uox*^{-/-} 小鼠血压显著高于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠 ($P<0.05$)。 *Uox*^{-/-} 小鼠不同性别及不同周龄间血压比较没有差异。见表 2、图 2。

2.3 *Uox*^{-/-} 自发高尿酸血症对小鼠血液生理指标的影响

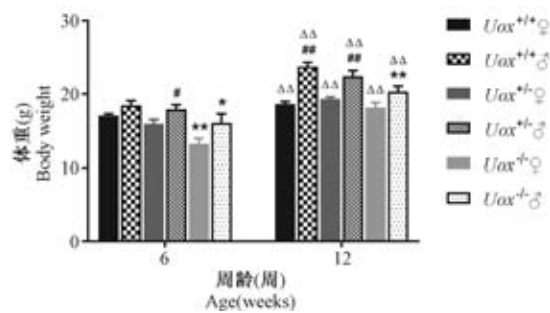
结果如表 3 所示, *Uox*^{-/-} 小鼠 HCT、HGB、MCH、MCV、RBC 和 RDW-S 均显著低于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠 ($P<0.05$),而 MCHC 和 PCT 高于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠 ($P<0.05$)。6 周龄 *Uox*^{+/-} 小鼠 HCT、HGB 和 RBC 也明显低于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠,PCT 高于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠 ($P<0.05$)。与 6 周龄 *Uox*^{-/-} 小鼠相比,12 周龄 *Uox*^{-/-} 小鼠 MPV 和 PDW 明显升高 ($P<0.05$),WBC 显著降低 ($P<0.01$)。

表 1 三种小鼠体重测量结果($\bar{x} \pm s$, g)

Table 1 Body weights of the three *Uox* genotypes of mice

指标 Index	周龄 Weeks old	<i>Uox</i> ^{+/+}		<i>Uox</i> ^{+/-}		<i>Uox</i> ^{-/-}	
		雌	雄	雌	雄	雌	雄
		Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 7)	Male (<i>n</i> = 9)
体重 Body weight	6 周龄 6 weeks	17.05±1.01	18.45±2.29	15.93±1.79	17.95±1.82 ^a	13.22±1.81 ^C	16.04±3.7 ^c
	12 周龄 12 weeks	18.65±1.12 ^B	23.77±1.84 ^{AB}	19.30±0.98 ^B	22.43±2.66 ^{AB}	18.13±1.91 ^B	20.32±2.26 ^{BC}

注:与同周龄同基因型雌性小鼠相比,^a $P<0.05$,^A $P<0.01$;与同性别同基因型 6 周龄小鼠相比,^b $P<0.05$,^B $P<0.01$;与同周龄同性别 *Uox*^{+/+} 小鼠相比,^c $P<0.05$,^C $P<0.01$ 。下表同。
Note. Compared with the female mice of the same age and the same genotype, ^a $P<0.05$, ^A $P<0.01$. Compared with the 6-week-old mice of the same sex and the same genotype, ^b $P<0.05$, ^B $P<0.01$. Compared with the *Uox*^{+/+} mice of the same age and the same sex, ^c $P<0.05$, ^C $P<0.01$. The same in the following tables.



注:与同周龄同基因型雌性小鼠相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与同性别同基因型 6 周龄小鼠相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与同周龄同性别 $Uox^{+/+}$ 小鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。下图同。

图 1 三种小鼠体重比较结果

Note. Compared with the female mice of the same age and the same genotype, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the 6-week-old mice of the same sex and the same genotype, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$. Compared with the $Uox^{+/+}$ mice of the same age and the same sex, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. The same in the following figures.

Figure 1 Body weight of the three *Uox* genotypes of mice

2.4 *Uox*^{-/-}自发高尿酸血症对小鼠血液生化指标的影响

结果显示, *Uox*^{-/-}小鼠 ALB、TBIL 和 DBIL 低于 *Uox*^{+/+}对照小鼠 ($P<0.05$), UA、CREA、BUN、CHOL 和 LDL 显著高于 *Uox*^{+/+}对照小鼠 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4、图 3。

3 讨论

动物模型是开展疾病发病机制研究与创新药物研发的基石。目前高尿酸血症动物模型主要为禽类和啮齿类,造模方法有促进尿酸生成法、抑制尿酸代谢法及这两种方法的联合应用^[9]。然而,这些方法存在需要对小鼠长期使用药物处理,血尿酸水平波动较大,有的药物甚至本身就具有肾毒副作用等缺点^[10]。为此,课题组构建了 *Uox*^{-/-}自发高尿酸血症小鼠模型,该小鼠具有稳定的高血尿酸水平,且能够很好地模拟 HUA 患者的发病状态,在医学生物学研究中的应用价值备受关注,曾被应用于

表 2 三种小鼠血压测量结果($\bar{x} \pm s$, mmHg)
Table 2 Blood pressure of the three *Uox* genotypes of mice

指标 Indices	周龄 Weeks old	<i>Uox</i> ^{+/+}		<i>Uox</i> ^{+/-}		<i>Uox</i> ^{-/-}	
		雌 Female (<i>n</i> = 12)	雄 Male (<i>n</i> = 12)	雌 Female (<i>n</i> = 12)	雄 Male (<i>n</i> = 12)	雌 Female (<i>n</i> = 7)	雄 Male (<i>n</i> = 9)
收缩压 SBP	6 周龄 6 weeks	107.44±4.17	106.39±7.87	107.11±6.73	99.86±8.65	116.72±9.36 ^a	107.34±12.95
	12 周龄 12 weeks	107.19±9.49	102.95±4.90	105.97±10.53	100.56±7.90	109.14±11.37	110.47±9.50 ^c
舒张压 DBP	6 周龄 6 weeks	90.11±6.26	88.56±6.66	90.53±6.45	84.58±6.85	99.02±10.22 ^a	90.42±11.50
	12 周龄 12 weeks	88.17±8.83	81.82±3.10 ^{ab}	86.96±10.32	81.41±6.44	92.54±10.78	87.42±6.49 ^c

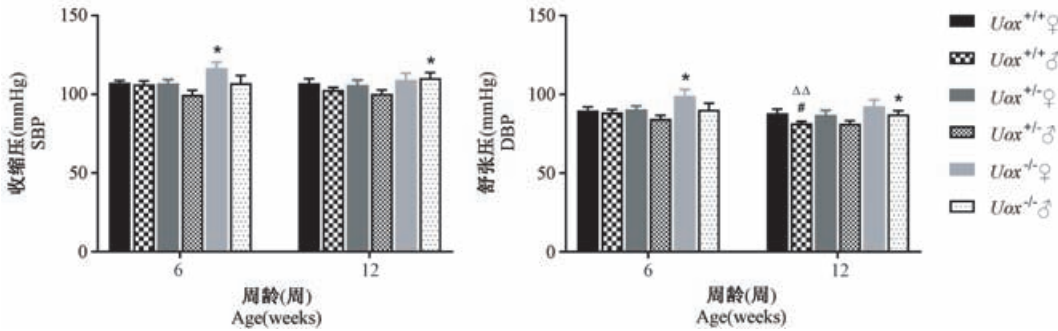


图 2 三种小鼠收缩压和舒张压比较结果

Figure 2 SBP and DBP of the three *Uox* genotypes of mice

动脉粥样硬化^[11]、帕金森病^[12]、肾损伤^[13]、癫痫^[14]等人类疾病机制研究及药物评价中。本实验通过检测幼龄和成年不同 *Uox* 基因型 C57BL/6 J 雌性和雄性小鼠的体重、血压以及血生理生化指标等基础生物学数据,发现 *Uox*^{-/-} 自发高尿酸血症能够对小 鼠体重、血压、肾功能、脂类代谢以及血生理指标产生影响,为该模型小鼠的使用提供参考。

6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小鼠和 12 周龄 *Uox*^{-/-} 小鼠体 重均显著低于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠,这与临床观察到 HUA 伴随肥胖的现象相反^[3]。与本研究结果一致, 牛效清等^[15]发现通过药物诱导的 HUA 模型小鼠体

重也明显低于对照小鼠,可能由于 HUA 影响妊娠、 出生体重及生长发育所导致^[16-17]。

12 周龄雄性 *Uox*^{-/-} 小鼠和 6 周龄雌性 *Uox*^{-/-} 小 鼠血压明显高于 *Uox*^{+/+} 对照小鼠,与 Lu Jie 等研究的 结果一致^[8]。大量临床报道及流行病学研究结果发 现,HUA 是高血压发病的独立危险因素,二者可能存 在因果关系^[18]。HUA 可通过降低一氧化氮合成和 激活肾素-血管紧张素系统等机制导致人体血压水平 升高^[19]。有动物实验证明给予降尿酸药物使血尿酸 水平达到正常后血压不再升高^[20],因此 *Uox*^{-/-} 小鼠 可为进一步研究两者关系提供动物模型。

表 3 三种小鼠血液生理指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Blood physiological parameters of the three *Uox* genotypes of mice

周龄 Weeks old	指标 Indices	<i>Uox</i> ^{+/+}		<i>Uox</i> ^{+/-}		<i>Uox</i> ^{-/-}	
		雌	雄	雌	雄	雌	雄
		Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 6)	Male (<i>n</i> = 9)
6 周龄 6 weeks	HCT(%)	49.66±3.17	48.19±6.07	43.37±6.95 ^c	44.91±6.81	40.70±3.70 ^C	44.93±3.28
	HGB(g/L)	153.00±5.50 ^c	152.00±8.50	134.88±21.91 ^c	134.00±16.33 ^C	132.80±12.72 ^c	138.43±7.28 ^c
	MCH(pg)	16.64±0.43	16.06±0.78	17.15±0.83	16.93±0.53 ^C	16.22±0.83	16.10±0.36
	MCHC(g/L)	302.14±8.86	295.27±7.47	303.14±7.58	302.29±7.65	319.60±7.06 ^C	310.11±8.21 ^C
	MCV(fL)	54.06±2.25	54.30±1.61	56.09±1.90	56.45±1.91 ^c	50.74±3.43 ^c	51.87±1.47 ^C
	MPV(fL)	6.43±0.71	6.06±0.65	6.00±0.33	5.99±0.54	5.48±0.34 ^C	5.79±0.57
	PCT(%)	0.63±0.09	0.63±0.07	0.61±0.11	0.74±0.09 ^{ac}	0.70±0.04	0.77±0.07 ^C
	PDW(%)	15.28±0.32	14.96±0.27 ^a	15.16±0.24	15.06±0.21	14.78±0.28 ^C	14.90±0.22
	PLT(10 ⁹ /L)	1011±150.03	1053±138.60	1037±99.56	1199±121.02 ^c	1283±110.80 ^C	1279±103.56 ^C
	RBC(10 ¹² /L)	9.19±0.49	9.42±1.05	7.92±1.64 ^c	7.96±1.19 ^C	7.78±1.10 ^c	8.38±0.81
	RDW-C(%)	17.15±1.20	17.21±2.06	19.14±2.38 ^c	18.40±0.87	17.22±1.14	15.70±0.53 ^{ac}
	RDW-S(fL)	37.73±2.20	37.18±3.32	41.90±5.13	43.46±2.66 ^C	35.82±4.36	33.98±0.64 ^c
	WBC(10 ⁹ /L)	8.52±1.93	7.13±1.89	11.25±4.19	7.83±2.58	10.63±1.11	10.14±1.60 ^C
	HCT(%)	49.60±1.98	51.02±2.03	48.08±2.12	49.09±1.50	42.15±3.12 ^C	43.21±3.24 ^C
12 周龄 12 weeks	HGB(g/L)	150.45±7.39	152.82±4.96	145.82±6.87	147.60±3.50	130.00±11.78 ^C	133.86±9.12 ^C
	MCH(pg)	15.81±0.33 ^B	15.43±0.25 ^{Ab}	16.04±0.37 ^B	15.36±0.43 ^{AB}	15.63±0.75	15.51±0.27 ^B
	MCHC(g/L)	304.58±9.16	299.82±7.56	302.67±6.68	299.42±5.13	308.00±6.81 ^b	307.14±8.44 ^c
	MCV(fL)	51.98±1.35 ^b	51.43±1.24 ^B	53.03±1.33 ^B	51.32±1.61 ^{AB}	50.72±1.42	50.64±1.46
	MPV(fL)	6.12±0.36	5.84±0.31	6.55±0.68 ^b	6.28±0.65 ^c	6.55±0.36 ^B	6.71±0.51 ^{BC}
	PCT(%)	0.64±0.08	0.69±0.10	0.73±0.10 ^{bc}	0.72±0.10	0.67±0.10	0.72±0.13
	PDW(%)	15.18±0.20	14.96±0.15 ^A	15.31±0.09	15.11±0.18 ^{Ae}	15.30±0.30 ^b	15.21±0.20 ^{BC}
	PLT(10 ⁹ /L)	1078±68.94	1169±59.94 ^{Ab}	1229±186.78 ^{bc}	1236±186.74	1050±141.82 ^{bc}	1208±157.41
	RBC(10 ¹² /L)	9.35±0.82	9.92±0.38 ^a	8.98±0.64	9.35±0.80 ^{BC}	8.30±0.42 ^C	8.29±0.68 ^C
	RDW-C(%)	15.04±0.74 ^B	14.68±0.33 ^B	15.29±0.73 ^B	15.07±0.87 ^B	16.75±2.27 ^C	15.28±1.21
	RDW-S(fL)	32.75±2.57 ^B	31.06±1.21 ^B	33.44±1.84 ^B	32.38±3.01 ^B	34.73±3.76	32.02±2.63
	WBC(10 ⁹ /L)	6.05±1.58 ^B	6.76±1.69	5.37±1.76 ^B	6.40±1.54	5.22±0.82 ^B	7.46±0.60 ^{AB}

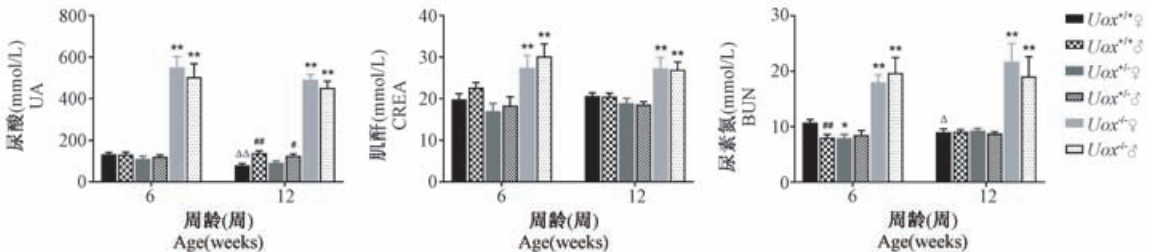


图 3 三种小鼠 UA、CREA、BUN 比较结果

Figure 3 UA, CREA and BUN of the three *Uox* genotypes of mice

表 4 三种小鼠血液生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Blood biochemical parameters of the three *Uox* genotypes of mice

周龄 Weeks old	指标 Indices	<i>Uox</i> ^{+/+}		<i>Uox</i> ^{+/-}		<i>Uox</i> ^{-/-}	
		雌	雄	雌	雄	雌	雄
		Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 12)	Male (<i>n</i> = 12)	Female (<i>n</i> = 6)	Male (<i>n</i> = 9)
6 周龄 6 weeks	ALB(g/L)	42. 04±3. 46	37. 88±4. 52 ^a	41. 86±1. 73	37. 49±3. 47 ^A	39. 40±3. 44	37. 83±2. 15
	ALT(U/L)	28. 40±4. 40	36. 00±8. 66 ^a	36. 29±7. 97 ^c	34. 88±11. 42	38. 60±6. 66 ^C	29. 88±5. 84 ^a
	AST(U/L)	56. 56±9. 04	52. 91±8. 77	55. 38±7. 65	48. 00±6. 13	61. 80±2. 05	61. 14±7. 03 ^c
	AST/ALT	2. 12±0. 42	1. 52±0. 33 ^A	1. 70±0. 32 ^c	1. 69±0. 46	1. 64±0. 30 ^c	2. 19±0. 32 ^{AC}
	TBIL(μmol/L)	1. 23±0. 47	1. 28±0. 56	1. 30±0. 37	1. 13±0. 52	1. 74±0. 53	1. 2±0. 68
	DBIL(μmol/L)	0. 90±0. 24	0. 96±0. 32	0. 93±0. 27	0. 90±0. 33	0. 72±0. 13	0. 76±0. 13
	IDBIL(μmol/L)	0. 33±0. 31	0. 33±0. 29	0. 38±0. 21	0. 23±0. 31	1. 02±0. 47 ^C	0. 44±0. 61
	GLU(mmol/L)	7. 24±1. 38	9. 46±0. 94 ^A	8. 18±1. 48	8. 52±1. 75	7. 27±1. 22	8. 50±1. 84
	TG(mmol/L)	1. 23±0. 15	1. 47±0. 30 ^a	0. 96±0. 04 ^c	1. 28±0. 29 ^a	1. 00±0. 31 ^c	1. 31±0. 47
	CHOL(mmol/L)	2. 34±0. 33	2. 68±0. 18 ^A	2. 26±0. 20	2. 51±0. 19 ^a	2. 41±0. 42	2. 68±0. 30
	HDL(mmol/L)	1. 79±0. 35	2. 10±0. 17 ^a	1. 78±0. 22	1. 96±0. 22	1. 88±0. 48	2. 08±0. 28
	LDL(mmol/L)	0. 38±0. 07	0. 37±0. 08	0. 40±0. 08	0. 39±0. 11	0. 48±0. 15	0. 51±0. 16 ^c
	BUN(mmol/L)	10. 77±1. 50	8. 06±1. 78 ^A	7. 93±1. 89 ^c	8. 54±2. 20	17. 96±3. 08 ^C	19. 68±8. 37 ^C
	CREA(μmol/L)	19. 89±4. 04	23. 36±4. 18	17. 00±4. 97	18. 38±5. 85	27. 40±6. 66 ^C	30. 22±8. 80 ^C
	UA(μmol/L)	133. 10±26. 88	131. 91±35. 91	110. 29±35. 62	121. 13±22. 47	551. 00±116. 27 ^C	505. 13±179. 16 ^C
12 周龄 12 weeks	ALB(g/L)	42. 69±2. 33	38. 87±2. 20 ^A	39. 69±3. 19 ^c	38. 04±3. 33	39. 48±3. 44 ^c	38. 56±2. 74
	ALT(U/L)	22. 42±3. 06 ^B	34. 50±5. 44 ^A	30. 20±5. 57 ^C	26. 92±4. 14 ^C	21. 67±1. 63 ^B	27. 43±4. 50 ^{aC}
	AST(U/L)	48. 75±6. 73 ^b	58. 00±6. 95 ^A	58. 00±7. 04 ^C	48. 15±7. 88 ^{AC}	49. 00±2. 76 ^B	47. 33±3. 08 ^{BC}
	AST/ALT	2. 05±0. 44	1. 79±0. 44	2. 07±0. 55	1. 70±0. 41	2. 27±0. 20 ^B	1. 85±0. 24 ^{Ab}
	TBIL(μmol/L)	1. 91±0. 63 ^b	1. 70±0. 42	1. 47±0. 52	1. 57±0. 67	1. 83±0. 46	0. 94±0. 36 ^{AC}
	DBIL(μmol/L)	1. 25±0. 20 ^B	1. 23±0. 33	0. 97±0. 22 ^C	1. 15±0. 30	0. 87±0. 08 ^{bC}	0. 83±0. 18 ^C
	IDBIL(μmol/L)	0. 66±0. 61	0. 47±0. 25	0. 50±0. 40	0. 42±0. 43	0. 97±0. 46	0. 11±0. 21 ^{Ac}
	GLU(mmol/L)	9. 17±1. 78 ^b	9. 75±1. 15	8. 26±1. 77	9. 37±2. 11	8. 48±1. 05	9. 39±2. 43
	TG(mmol/L)	1. 17±0. 56	1. 40±0. 37	1. 35±0. 36 ^B	1. 31±0. 41	1. 28±0. 36	1. 16±0. 24
	CHOL(mmol/L)	1. 96±0. 23 ^B	2. 25±0. 18 ^{AB}	1. 97±0. 54	2. 43±0. 21 ^a	2. 46±0. 42 ^c	2. 79±0. 35 ^C
	HDL(mmol/L)	1. 74±0. 34	2. 11±0. 24 ^A	1. 75±0. 48	2. 10±0. 26 ^a	2. 13±0. 24	2. 47±0. 26 ^{abC}
	LDL(mmol/L)	0. 34±0. 11	0. 35±0. 06	0. 48±0. 11 ^C	0. 38±0. 07 ^a	0. 40±0. 06	0. 37±0. 09
	BUN(mmol/L)	9. 00±2. 00 ^b	9. 09±1. 39	9. 30±1. 33	8. 79±1. 06	21. 77±7. 82 ^C	19. 07±9. 32 ^C
	CREA(μmol/L)	20. 73±2. 33	20. 50±2. 81	18. 91±4. 01	18. 62±2. 43	27. 33±6. 31 ^C	27. 00±4. 83 ^C
	UA(μmol/L)	79. 64±28. 96 ^B	138. 75±35. 69 ^A	91. 50±26. 85	126. 23±32. 65 ^a	491. 83±62. 11 ^C	452. 86±80. 83 ^C

Uox^{-/-}自发高尿酸血症能够影响小鼠贫血相关血生理指标。与 *Uox*^{+/+}对照小鼠相比, *Uox*^{-/-}小鼠 RBC、HCT、MCV、RDW-S、HGB 和 MCH 显著降低, *Uox*^{+/-}小鼠 RBC、HCT 和 HGB 也明显降低,这与临床观察到 HUA 伴随血 RBC、HCT、HGB 和 RDW 指标升高的现象相反^[21],但也有临床文献报道由于肾素基因突变导致出现高尿酸血症、贫血和慢性肾脏病的表现^[22-23]。提示该类指标的变化可能与尿酸氧化酶基因敲除遗传背景相关, *Uox*^{-/-}小鼠模型是否可用于血液学相关疾病研究尚待进一步明确。

Uox^{-/-}自发高尿酸血症小鼠 UA、CREA 和 BUN 等生化指标显著高于 *Uox*^{+/+}对照小鼠。大量临床研究发现,血尿酸水平升高导致尿酸性肾病、肾结石和肾功能衰竭的患病率显著增加^[24]。HUA 可通过结晶阻塞肾小管引发炎症反应及诱导细胞凋亡等

机制造成肾结构及功能异常^[25],且病理结果证实有明显尿酸盐晶体沉积于 *Uox*^{-/-}小鼠肾组织^[8]。 *Uox*^{-/-}小鼠 6 周龄就已出现明显肾功能受损,提示该小鼠是研究尿酸性肾病相关的理想模型。

Uox^{-/-}小鼠是本实验室构建的国内首个基因敲除自发高尿酸血症小鼠模型,其生物学特性尚缺乏系统研究。通过对三种不同 *Uox* 基因的 C57BL/6 J 小鼠体重、血压及血液生理生化指标进行检测,明确了 *Uox*^{-/-}自发高尿酸血症对小鼠上述指标的影响,为今后生物医学领域利用该动物模型从事疾病尤其是尿酸性肾病发病机制研究及新型药物开发奠定了基础。

参考文献:

[1] Bardin T, Richette P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions[J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(2): 186-191.

- [2] 中华医学会内分泌学分会. 高尿酸血症和痛风治疗的中国专家共识[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2013, 29(11): 913-920.
- [3] Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, et al. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals[J]. J Rheumatol, 2010, 37(2): 410-416.
- [4] Han T, Lan L, Qu R, et al. Temporal Relationship Between Hyperuricemia and Insulin Resistance and Its Impact on Future Risk of Hypertension[J]. Hypertension, 2017, 70(4): 703-711.
- [5] Mallat SG, Al Kattar S, Tanios BY, et al. Hyperuricemia, Hypertension, and Chronic Kidney Disease: an Emerging Association[J]. Curr Hypertens Rep, 2016, 18(10): 74.
- [6] Li C, Hsieh MC, Chang SJ. Metabolic syndrome, diabetes, and hyperuricemia[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(2): 210-216.
- [7] Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout[J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2039-2052.
- [8] Lu J, Hou X, Yuan X, et al. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders[J]. Kidney Int, 2018, 93(1): 69-80.
- [9] 陶慧, 闫婕, 林发全. 啮齿类动物高尿酸血症模型的研究进展[J]. 实验动物科学, 2014, 31(4): 59-62.
- [10] 裴忆雪, 刘永杰, 张笛, 等. 建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 46-54.
- [11] Lu J, Sun M, Wu X, et al. Urate-lowering therapy alleviates atherosclerosis inflammatory response factors and neointimal lesions in a mouse model of induced carotid atherosclerosis[J]. Febs j, 2019, 286(7): 1346-1359.
- [12] Chen X, Umeh CC, Tainsh RE, et al. Dissociation between urate and blood pressure in mice and in people with early Parkinson's disease[J]. EBioMedicine, 2018, 37: 259-268.
- [13] Hosoyamada M, Tsurumi Y, Hirano H, et al. Urat1-Uox double knockout mice are experimental animal models of renal hypouricemia and exercise-induced acute kidney injury[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2016, 35(10-12): 543-549.
- [14] Thyron L, Raedt R, Portelli J, et al. Uric acid is released in the brain during seizure activity and increases severity of seizures in a mouse model for acute limbic seizures[J]. Exp Neurol, 2016, 277: 244-251.
- [15] 牛效清, 赵玉杰, 白雪, 等. 慢性高尿酸血症小鼠模型的制备和筛选[J]. 黑龙江医药科学, 2017, 40(6): 19-21, 24.
- [16] Merviel P, Ba R, Beaufils M, et al. Lone hyperuricemia during pregnancy: maternal and fetal outcomes[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1998, 77(2): 145-150.
- [17] Nasri K, Razavi M, Rezvanfar MR, et al. Mid-gestational serum uric acid concentration effect on neonate birth weight and insulin resistance in pregnant women[J]. Int J Crit Illn Inj Sci, 2015, 5(1): 17-20.
- [18] Feig DI, Madero M, Jalal DI, et al. Uric acid and the origins of hypertension[J]. J Pediatr, 2013, 162(5): 896-902.
- [19] 李晓霞. 高尿酸血症与血管内皮细胞功能障碍的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2015, 36(2): 173-176.
- [20] Mazzali M, Hughes J, Kim YG, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism[J]. Hypertension, 2001, 38(5): 1101-1106.
- [21] 孙秋, 万明, 冯会芳, 等. 高尿酸血症生化血常规特征分析[J]. 医学信息, 2018, 31(6): 153-155.
- [22] Zivna M, Hulkova H, Matignon M, et al. Dominant renin gene mutations associated with early-onset hyperuricemia, anemia, and chronic kidney failure[J]. Am J Hum Genet, 2009, 85(2): 204-213.
- [23] Beck BB, Trachtman H, Gitman M, et al. Autosomal dominant mutation in the signal peptide of renin in a kindred with anemia, hyperuricemia, and CKD[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 58(5): 821-825.
- [24] Kawashima M, Wada K, Ohta H, et al. Association between asymptomatic hyperuricemia and new-onset chronic kidney disease in Japanese male workers: a long-term retrospective cohort study[J]. BMC Nephrol, 2011, 12: 31.
- [25] Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases[J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31(6): 890-896.

[收稿日期] 2019-05-30

王志远,刘月环. 基于荧光素酶双报告基因系统体外验证长爪沙鼠 *Cip4* 基因受 RXR 及 T4 调控 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 78–84.

Wang ZY, Liu YH. *In vitro* verification of *Cip4* gene regulation by RXR and T4 in Mongolian gerbils using luciferase double-reporter gene system [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 78–84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 012

基于荧光素酶双报告基因系统体外验证长爪沙鼠 *Cip4* 基因受 RXR 及 T4 调控

王志远,刘月环*

(浙江省医学科学院,杭州 310013)

【摘要】 目的 探讨核转录因子 TRB、RXR 和激动剂 T4 对长爪沙鼠 *Cip4* 基因表达的调控作用。**方法** 合成长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子区序列,构建报告载体 pGL3-*Cip4*;将转录因子 TRB、RXR 克隆到 pcDNA3.1 表达载体上。将 pGL3-*Cip4*, pcDNA3.1-TRB, pcDNA3.1-RXR 和 pRL-TK(参照质粒)载体共转染到 HEK-293 细胞,构建 *Cip4* 基因的荧光素酶双报告系统。观察质粒用量、TRB 的激动剂甲状腺素 T4 等处理对转录活性的影响。**结果** 以长爪沙鼠 *Cip4* 启动子区为启动序列的双荧光素酶报告基因系统在(启动子+转录因子):pRL-TK=20:1、总质粒量为 2 μg 时转染效率最高,并具有最高的荧光素酶活性。检测结果显示,仅加入 TRB 不改变 *Cip4* 的转录水平($P>0.05$),仅加入 RXR 可以增加 *Cip4* 的转录水平($P<0.05$),RXR 与 T4 共同作用可上调 *Cip4* 的转录水平($P<0.001$)。TRB 与 T4 共同作用可下调 *Cip4* 活性($P<0.05$)。RXR、TRB、T4 共存时,*Cip4* 的转录水平显著下调($P<0.01$)。**结论** 本研究证实了 T4、TRB 及 RXR 共调控长爪沙鼠 *Cip4* 基因的转录,模拟了配体激活型转录因子 TRB/RXR 活化目的基因 *Cip4* 的转录,同时证实了 *Cip4* 的转录活化与 RXR 信号通路密切相关,为揭示甲状腺素在人类 NAFLD 中的作用机制奠定了基础。本报告基因系统可用于配体激活型转录因子调控 *Cip4* 基因表达的机理分析及相关药物的筛选。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病模型;长爪沙鼠;*Cip4* 基因;荧光素酶双报告基因系统;维甲酸 X 受体(RXR);甲状腺素受体 B(TRB)

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0078-07

In vitro verification of *Cip4* gene regulation by RXR and T4 in Mongolian gerbils using luciferase double-reporter gene system

WANG Zhiyuan, LIU Yuehuan*
(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of nuclear transcription factors thyroxine receptor (TRB) and retinoic acid receptor X (RXR), as well as the agonist T4, on Cdc42-interacting protein 4 (*Cip4*) gene expression. **Methods** The *Cip4* gene promoter of Mongolian gerbils was cloned into the luciferase-reporter sequence of pGL3 basic to construct a new plasmid pGL3-*Cip4*. Coding sequences of transcription factors TRB and RXR were cloned into pcDNA3.1 eukaryotic expression vectors. pGL3-*Cip4*, pcDNA3.1-TRB, pcDNA3.1-RXR, and pRL-TK (reference

[基金项目] 浙江省自然科学基金(LY16H030011);浙江省科技厅公益技术应用研究计划(2011C37096,2015C37102);浙江省医药卫生平
台骨干人才基金(2015RCA006)。

[作者简介] 王志远(1986—),男,硕士,助理研究员,研究方向:药理学。E-mail: 593984800@qq.com

[通信作者] 刘月环(1974—),女,医学博士后,研究员,研究生导师。E-mail: yuehuanliu@163.com

plasmid) vectors were used to transfect HEK-293 cells to form a luciferase double-reporter system for the *Cip4* gene. Transfection efficiency was optimized by adjusting the ratio of these plasmids. The agonist T4 was used to analyze transcriptional activity. **Results** Transfection efficiency and luciferase activity were the highest when a total amount of 2 μ g plasmid and a ratio of 20:1 between the (promoter + transcription factor) and pRL-TK. RXR could significantly increase *Cip4* gene transcription of ($P < 0.05$), whereas TRB did not alter *Cip4* transcription ($P > 0.05$). Thyroxine T4 could enhance RXR upregulation ($P < 0.001$), while a combination of T4 and TRB downregulated *Cip4* transcription ($P < 0.05$). Levels of *Cip4* transcription were significantly downregulated in the presence of T4, RXR, and TRB ($P < 0.01$). **Conclusions** T4, TRB, and RXR had coregulatory effects on *Cip4* gene transcription in Mongolian gerbils; moreover, they simulated the process of ligand T4 agonizing TRB/RXR to activate *Cip4* gene transcription. These result indicating that *Cip4* transcription was significantly affected by the RXR signaling pathway lay the foundation for revealing thyroxine's mechanism of action in human nonalcoholic fatty liver disease, as well as the study of ligand-agonizing nuclear transcription factor regulation of *Cip4* gene expression and related drug screening.

【Keywords】 nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) model; Mongolian gerbil; *Cip4* gene; dual-luciferase reporter gene system; retinoic acid receptor X(RXR); thyroxine receptor B(TRB)

CIP4 (CDC42-interacting protein-4) 为甲状腺素受体作用因子 10 (thyroid hormone receptors interactor 10, *TRIP10*) 基因表达的蛋白, 是一种细胞骨架调节蛋白, 由 545 氨基酸残基组成, 广泛存在于脑、气管、肝、肾、结肠、心、肺、前列腺等人体多种器官中, 其表达受全反式维甲酸调节, 作为活化的 CDC42 的下游, *Cip4* 在调节肌动蛋白细胞骨架的形成和重排, 调节细胞间的粘附, 内吞等过程中起着重要的作用, 目前的研究进展包括: (1) 是 EGFR 的上游^[1]; (2) 高糖下 *Cip4* 能诱导腹膜上皮细胞向间质细胞的转分化 (epithelial to mesenchymal transition, EMT)^[2]; (3) 间充质干细胞出现多种分化倾向并能引发肿瘤的转移^[3]; (4) 丢失 *Cip4* 蛋白会造成血小板硬膜化^[4]; (5) *Cip4* 基因敲除小鼠表现出餐后低血糖, 胰岛素抵抗, 葡萄糖, 转铁蛋白吸收下降^[5]; (6) 胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 的大鼠磷酸酶高表达抑制了内脏脂肪组织中 *Cip4* 的表达^[6]。现已知甲状腺素受体 (Thyroxine receptor, TR, 特定组织核受体之一, 是一类配体激活型转录因子) 与配体甲状腺素 (三碘甲状腺原氨酸 T3 或四碘甲状腺原氨酸 T4) 结合后 TR 构象改变, 通过与 RXR (retinoic acid receptor X, 维甲酸 X 受体) 结合成二聚体来调控基因的表达, TR 能够与特定的基因 DNA 序列 (比如甲状腺素应答元件) 结合而发挥生理作用。RXR 是核受体蛋白家族 (此外还包括 TR 及过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 等数十种) 的核心成员, 在细胞发育和代谢调节上处于核心地位。维甲酸信号转导系统中每两个核受体形成一个同源二聚体 (RXR/RXR) 或异源二聚体 (RXR/RAR 或

PPAR/RXR 或 TR/RXR, 加上各自的配体称为同源或异源四聚体), 作为转录因子与靶基因 DNA 或是其上游的应答元件结合, 从而调控基因的转录和表达, 发挥一系列生物学效应^[7]。

长爪沙鼠在高脂饲料 (与高脂诱导大小鼠模型不同的是不需要加入抑制甲状腺的药物) 喂养 1 周后即可形成单纯性脂肪肝, 2 周形成脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 4~12 周即可形成不同程度的肝纤维化, 12~16 周出现肝硬化, 具有成模速度快、死亡率低 (成活率高于 90%)、适于连续观察非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的病理进展的优点^[8], 在长达十多年研究中, 笔者课题组用高通量测序法检测了高脂饲料诱导 4 周 (NAFLD 早期纤维化) 及 8 月龄以上高龄 (中老年) 自发 NAFLD (高脂血症) 长爪沙鼠转录组, 获得了 352 个差异基因和 32 个通路, 总结出 NAFLD 长爪沙鼠模型的 10 大特点^[9]。对测序数据的生信分析表明, 与 *Cip4* 基因相关的通路 (ko04910, 胰岛素信号通路) 显著上调, 高脂诱发 NAFLD 上调大于 3 倍, 这个结果显示出 *Cip4* 基因有可能受甲状腺素及甲状腺素受体变化而发生转录活性变化。另外, 我们也发现 *Cip4* 基因显著上调与 RXR 低表达现象, 但二者究竟有没有互作关系, 目前没有明确的报道。关于 *Cip4* 基因研究较多的是其与 CDC42 的关系, 即 CDC42 是 *Cip4* 上游, 与细胞分裂周期密切相关^[10]。*Cip4* 作为一种受全反式维甲酸调节的甲状腺素受体作用因子, 其转录激活是否可直接基于上述二聚体的结合, 是否需要甲状腺素 T4 作为配体呢? *Cip4* 的表达是否受配体激活型核转录因子及激动剂 T4 的调控, 且是否与 RXR

信号通路相关?

报告基因检测是研究结构基因旁侧区域潜在的顺式元件(如启动子、增强子和沉默子等)和反式作用因子相互作用关系的一种重要工具^[11]。通常是用萤火虫荧光素酶定量基因表达时,采用第二个报告基因来减少实验误差。目前不少公司可以提供萤火虫荧光素酶检测(一般是 pGL3 质粒作为载体)和海肾荧光素酶检测(一般是 pRL-TK 质粒作为内参)组合的双报告系统。在使用荧光素酶报告基因检测系统结合 pRL 载体系统,即表达第二个报告基因海肾荧光素酶的载体系统,就可以在单管中进行双荧光素酶报告基因的检测,较为灵敏快捷。本研究就是采用荧光素酶双报告基因系统对 *Cip4* 的表达是否受 RXR, TRB(甲状腺素受体 TR 的 B 亚型)调控进行实验。

1 材料和方法

1.1 细胞系

肾细胞系 HEK293(ATCC, 自行培养传代)。

1.2 主要试剂与仪器

TRB 激动剂(TRB 的配体)T4(左旋甲状腺素钠五水合物)(Damas-beta, 货号 P1081372), DMEM(Hyclone, 货号 SH30243.01B), FBS(Gibco, 货号 26400-044), 双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit, Promega, 货号 E1910), 转染试剂 Lipofectamine2000(Thermofisher, 货号 11668030)。移液器(Gilson);离心机(Ependorf, 型号 5424R);恒温振荡器(上海知楚, 型号 ZQWY-200);细胞培养箱(Thermo, 型号 Forma 3111);超速离心机(Beckman, 型号 Avanti J-30I);化学发光分析仪(中生北控, 型号 BK-L96C)。

1.3 实验方法

1.3.1 质粒构建

通过化学合成方法将转录因子 CDS 序列克隆并构建到 pcDNA3.1 表达载体上;将长爪沙鼠 *Cip4* 启动子序列克隆并构建到 pGL3 basic 的载体上(下文质粒中标绿的那部分)。所涉及的转录因子是 TRB 和 RXR, 启动子序列是长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子区, 基因克隆、合成及载体构建均由南京一道基因公司完成, 碱基序列、长度及 GeneBank 号如下。

(1)转录因子 TRB CDS 区:长爪沙鼠 thyroid hormone receptor beta (TRB), transcript variant X1,

mRNA (1428 bp), NCBI 参考序列为 XM_021654936.1, TRB 通过两侧(5' BamHI-3' EcoRI)添加酶切位点引入 pcDNA3.1(+), 碱基序列共 1464 bp, 质粒图谱如图 1 所示。

(2)转录因子 RXR CDS 区:长爪沙鼠全部信息链接见 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=RXR%20Gerbillinae>, 共有三个亚型, 选取肝表达高的 RXR^[12], 即长爪沙鼠 retinoid X receptor alpha (RXRa), transcript variant X1, mRNA, NCBI 参考序列为 XM_021638115.1, 1404 bp, RXR-XM_021638115.1 通过 5' HindIII-3' XhoI 克隆到 pcDNA3.1(+)载体, 碱基序列共 1440 bp, 质粒图谱如图 2 所示。

(3)长爪沙鼠 *Cip4* 启动子:即长爪沙鼠 thyroid hormone receptor interactor 10 (Trip10), Gene ID 为 110545609, 1426 bp, *Cip4* 启动子通过在两侧引入 5' NheI-3' XhoI 酶切位于点, 克隆到 pGL3 basic 载体, 碱基序列共 1438 bp, 质粒图谱如图 3 所示。

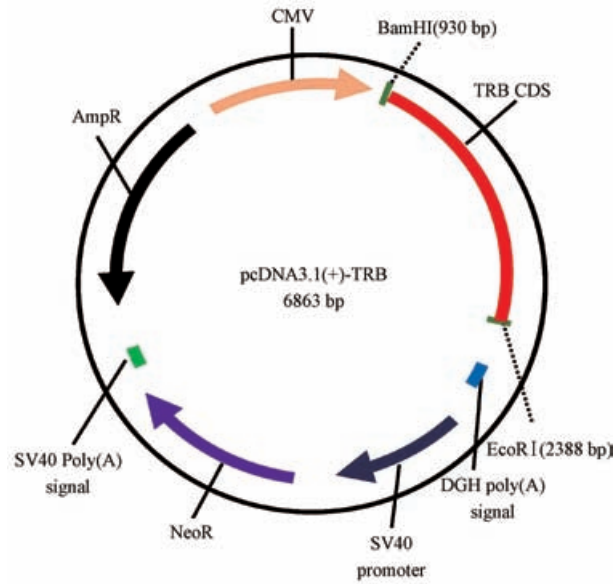


图 1 转录因子 TRB 的质粒示意图

Figure 1 Plasmid map of the transcription factor TRB

1.3.2 TRB 的配体——激动剂甲状腺素 T4 的浓度梯度实验

以 RXR 及 TRB 的表达量为标记, T4 设置梯度浓度为 0.1 μmol/L, 0.01 μmol/L, 0.001 μmol/L, 设置 24 h 与 48 h 两个时间点, 用荧光定量 PCR 法进行检测, RXR 上游引物: 5'-TGCTCATCGCCTCCTTCTCC-3', 下游引物 5'-GCTCCGTCTTGTCCATCTGC-3', 片段长度为 177 bp; TRB 上游引物:

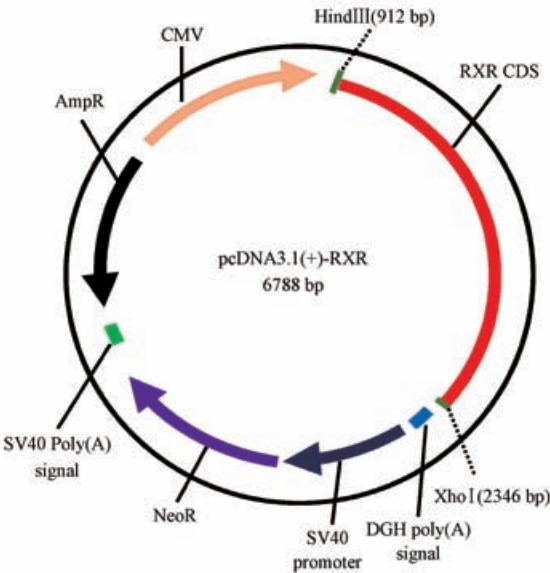


图 2 转录因子 RXR 的质粒示意图

Figure 2 Plasmid map of the transcription factor RXR

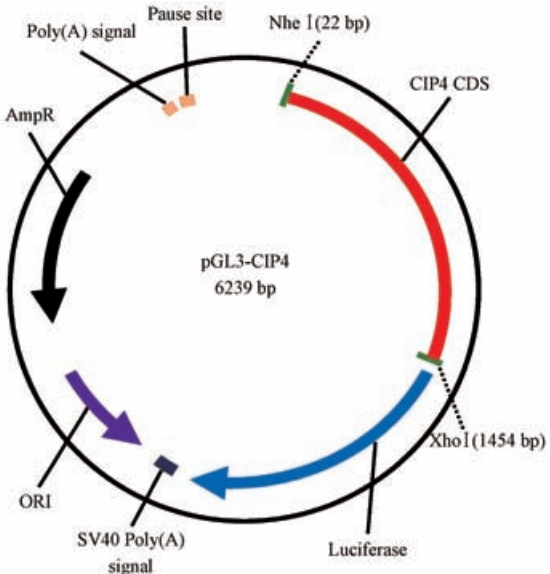


图 3 启动子 *Cip4* 的质粒示意图

Figure 3 Plasmid map of the *Cip4* promoter

5'-GAACAGTCGTCGCCACATCTC-3', 下游引物: 5'-CCTTTACATTTCTTCTCCTCCGTTTG-3', 片段长度为 131 bp。PCR 程序为 95℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 10 min, 40 个循环, 99℃ 度保温。取两个基因与未加 T4 的空白组相比有差异的浓度为 T4 的工作浓度。

1.3.3 质粒转染与荧光素酶活性检测

利用 Lipo2000 转染试剂盒, 将转录因子和重组的质粒利用脂质体转染的方法转染到 HEK293T 细胞中, 用荧光素酶双报告基因法检测 *Cip4* 与 RXR/

TRB 转录因子二聚体结合情况。

(1) 质粒转染: ①转染前一天 24 孔培养板中接种细胞, 使转染时细胞密度在 70%~80%, 培养基为含 1.3.2 筛选出的工作浓度 (0.01 μmol/L) T4 药物的 DMEM + 10% FBS (每个分组均包括含甲状腺素 T4 与不含甲状腺素 T4, 下同); ②2 μL Lipo2000 转染试剂稀释到 50 μL 无血清 DMEM 培养基中, 质粒稀释到 50 μL 无血清 DMEM 培养基中 (启动子+转录因子: TK=20:1 总质粒量 2 μg), 混合室温孵育 20 min, 补无血清 DMEM 培养液 100 μL; ③吸除皿中培养基, 加入上一步制备的转染复合物 200 μL, 37℃ 培养 5 h; ④吸除培养基, 换 0.5 mL 含有 1.3.2 筛选出的工作浓度 (0.01 μmol/L) T4 药物的完全培养基, 37℃ 培养 48 h; ⑤转染做 5 次重复; ⑥质粒转染组合: 第一次转染分组如表 1 所示, 其中 pcDNA3.1、pGL3 basic 为空载质粒, pRL-TK 为提供海肾荧光素酶检测的内对照质粒, pGL3 basic-Cip4、pcDNA3.1-TRB 分别是报告载体与 TRB 表达质粒, 检测 TRB 对 *Cip4* 转录活性的影响。以上分组均包括含甲状腺素 T4 和不含 T4 两种处理, 以检测 T4 的激动效果; 第二次转染分组如表 2 所示, 增加了 pcDNA3.1-RXR 表达质粒, 第五组为检测 RXR、TRB 同时存在对 *Cip4* 转录活性的影响, 其余同上 (亦包括含甲状腺素 T4 和不含 T4 两种处理, 以检测 T4 的激动效果)。

表 1 TRB 增强 <i>Cip4</i> 启动转录作用的质粒分组	
Table 1 Plasmid grouping of TRB on the initiation of <i>Cip4</i>	
序号 No.	转染质粒组合 Plasmid groups
1	pcDNA3.1 + pGL3 basic + pRL-TK
2	pcDNA3.1 + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
3	pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic + pRL-TK
4	pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK

表 2 RXR、TRB 对 <i>Cip4</i> 启动作用的质粒分组	
Table 2 Plasmid grouping of RXR and TRB on the initiation of <i>Cip4</i>	
序号 No.	转染质粒组合 Plasmid groups
1	pcDNA3.1 + pGL3 basic + pRL-TK
2	pcDNA3.1 + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
3	pcDNA3.1-RXR + pGL3 basic + pRL-TK
4	pcDNA3.1-RXR + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK
5	pcDNA3.1-RXR + pcDNA3.1-TRB + pGL3 basic-Cip4 + pRL-TK

(2) 双荧光素酶检测: ①裂解细胞: 每孔中加入细胞裂解液 200 μL, 室温孵育 10 min, 充分裂解细胞; ②收裂解液 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清作

为待测液;③溶解萤火虫萤光素酶检测试剂和海肾萤光素酶检测缓冲液,并达到室温。海肾萤光素酶检测底物(100×)置于冰浴或冰盒上备用;④按仪器操作说明书开启化学发光仪,取 100 μL 裂解液上清加入 96 孔发光板中,加入 100 μL 萤火虫萤光素酶检测工作液,吹吸混匀;⑤上机测发光值,激发时间 5 s;⑥加入海肾萤光素酶检测工作液 100 μL,吹吸混匀,上机测发光值,激发时间 5 s;⑦在以海肾萤光素酶为内参的情况下,用萤火虫萤光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾萤光素酶测定得到的 RLU 值。根据得到的比值来比较不同样品间报告基因的活化程度。

1.4 统计学方法

实验结果所有数据表示方式为平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$),数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析,并采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析作图。采用 *t* 检验法分析基因表达量。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 T4 浓度影响 RXR、TRB 的表达量

T4 刺激后 RXR、TRB 两个基因表达的 qPCR 结果分析绘制图 4~6,从图上可以看出,0.1 μmol/L,1 μmol/L 的 T4 刺激 HEK293T 在 24 hr 及 48 hr 后,两个基因表达均无差异,而用 0.01 μmol/L 的 T4 刺激 HEK293T 后,TRB、RXR 在两个时间点均表现出一定的差异,RXR 表达量趋于增加,而 TRB 表达量趋于下降,鉴于 RXR 与 TRB 的表达量的差异,从实验的目的出发,选取 0.01 μmol/L 的 T4 作为下一步实验的工作浓度。

2.2 TRB 的启动作用检测

根据计算测定的活性值进行绘图,如图 7 所示,进行统计学分析结果显示,从实验组及对照组的萤光素酶相对活性显示,TRB 的共转没有提高 *Cip4* 启动子序列的转录活性 ($P > 0.05$)。

2.3 RXR 与 TRB 对 *Cip4* 的启动作用

根据计算测定的活性值进行绘图,如图 8 所示,进行统计学分析结果显示,从实验组及对照组的萤光素酶相对活性显示,RXR 的共转提高 *Cip4* 启动子序列的转录活性 ($P < 0.001$),但 RXR、TRB 两个转录因子共转,在甲状腺素 T4 激动的情况下 *Cip4* 活性较 RXR 单独存在的情况下显著下降 ($P < 0.01$)。

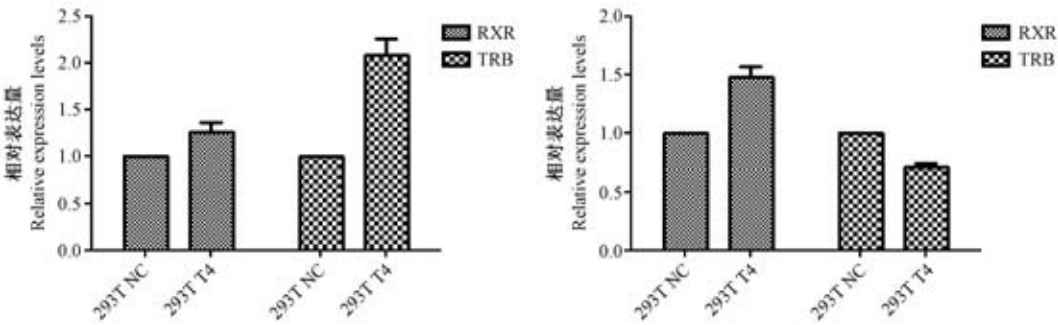


图 4 0.01 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量

Figure 4 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 0.01 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)

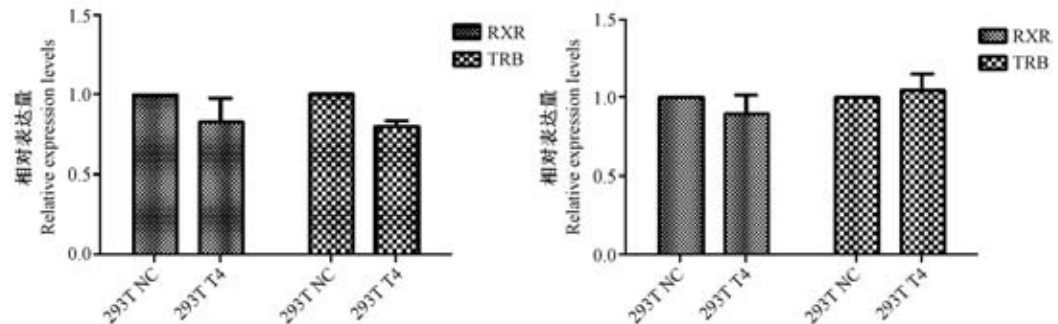


图 5 0.1 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量

Figure 5 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 0.1 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)

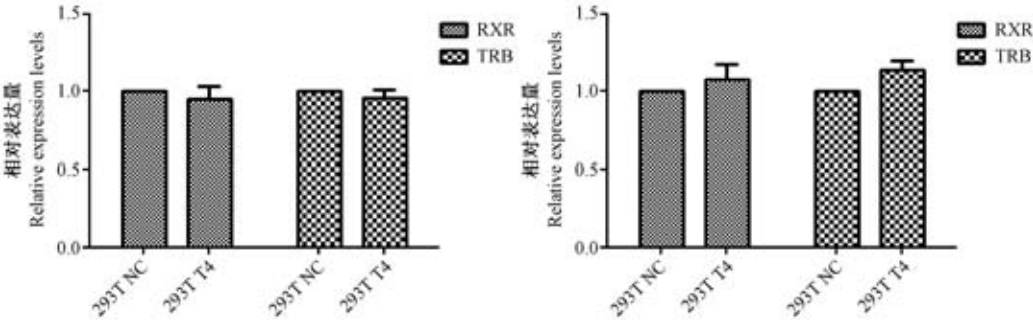
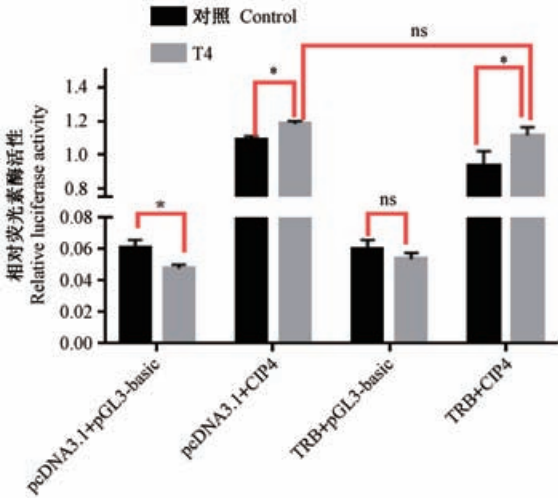
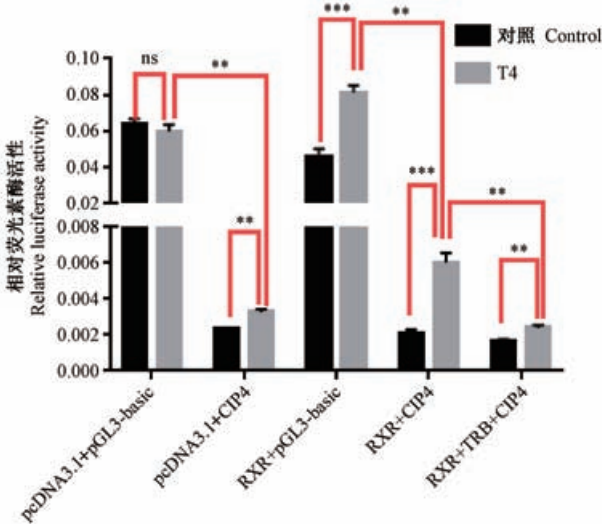


图 6 1 μmol/L T4 刺激 24 h(左)或 48 h(右)的 HEK293T 中 RXR 与 TRB 的基因表达量
Figure 6 Expression of RXR and TRB in HEK293T stimulated with 1 μmol/L T4 for 24 h (left) or 48 h (right)



注:各组质粒组合均含 pRL-TK。* $P < 0.05$;“ns”表示差异无显著性。

图 7 TRB 与 *Cip4* 启动子双荧光素酶检测结果
Note. pRL-TK was used in all groups. * $P < 0.05$, and “ns” means non-significant difference.



注:各组质粒组合均含 pRL-TK。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;“ns”表示差异无显著性。

图 8 TRB、RXR 与 *Cip4* 启动子双荧光素酶检测结果
Note. pRL-TK was used in all groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and “ns” means non-significant difference.

Figure 7 Detection of double luciferase reporter for TRB and *Cip4* promoter

Figure 8 Detection of double luciferase reporter for TRB, RXR, and *Cip4* promoter

3 讨论

报告基因系统是把编码序列和基因表达调节序列相融合形成嵌合基因,通过检测其表达产物(精确定量荧光信号)来标定目的基因表达的调控情况^[13]。该技术具有实时定量性、操作简单、灵敏度高、特异性强等优点,因此在启动子活性分析、基因转移及表达分析、信号转导通路研究、大分子互作等生物医学领域都有广泛的应用^[14]。

本研究是在获得长爪沙鼠 *Cip4* 基因启动子序列的基础上,将 *Cip4* 基因启动子序列以化学合成的方式插入到荧光素酶报告基因载体 pGL3-basic 中,然后和以相同方式构建在 pCDNA3.1 上的长爪沙鼠两个转录因子 TRB、RXR、TK 的质粒共转染 HEK293 细胞检测其荧光素酶活性,并将这个组成

型 *Cip4* 基因启动序列全长荧光素酶报告质粒与 T4 共孵育,确定了 T4、TRB 与 RXR 对 *Cip4* 基因的启动及调控作用。研究结果表明:单纯加入 TRB(T4 受体)并不能改变 *Cip4* 的转录水平($P > 0.05$),但单纯加入 RXR,可以明显改变 *Cip4* 的转录水平($P < 0.05$),在 T4 的作用下是可以明显上调 *Cip4* 的转录水平($P < 0.001$),这证实了 RXR 可以优先与 *Cip4* 结合^[15-16],同时表明 T4 对 *Cip4* 有本底调控作用或存在其他不依赖 TRB(或称为非经典)的调控途径。TRB 是在启动子区与 *Cip4*-RXR 复合物结合的另一转录因子,TRB 受 T4 的激动后,*Cip4* 活性变化明显($P < 0.05$),这符合配体激活型转录因子的特征^[15]。如果有 RXR、TRB 共同存在的条件下,*Cip4* 的转录水平是受到更严格的下调(共调节)($P <$

0.01)^[17-18]。现已知代谢性疾病中,核转录因子中 RXR、PPAR、TRB 等转录因子在靶基因转录激活中所起的作用是不相同的,一般情况下 RXR 和 PPAR 是占主要地位(核心地位)的核转录因子,其数量在正常与应激情况下都占多数^[19-20]。本研究中 T4 浓度选择亦是考虑二种转录因子对 T4 的激动出现表达量差异时(即对二种受体转录因子效应不同,类似于依赖或不依赖型途径)的最佳浓度为首选^[21], T4 主要是 TRB 的激动剂,因此选择了 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

荧光素酶报告系统实验是检测转录因子与其价靶启动子中的特异性序列结合的重要手段,也是目前配体激活型转录因子(如 miRNA,激动剂,抑制剂及其他环境影响要素等)的作用研究中常用的方法^[22-23]。本研究提供了 T4、TRB 及 RXR 调控长爪沙鼠 *Cip4* 基因转录表达的证据,间接模拟了配体激活型转录因子 RXR-TRB 异源二聚体在配体 T4 存在对 *Cip4* 的转录活化现象^[24],也证实了 *Cip4* 的转录活化与 RXR 信号通路密切相关。对单一靶基因的转录调控方式,所建立双荧光素酶报告基因系统也适用于其他受核转录因子调控的基因。另外本研究中用甲状腺素作为激动剂(配体)的实验为揭示长爪沙鼠 NAFLD 模型的特色及甲状腺素在人类 NAFLD 发病机制的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Hu J, Troglio F, Mukhopadhyay A, et al. F-BAR-containing adaptor *Cip4* localizes to early endosomes and regulates Epidermal Growth Factor Receptor trafficking and downregulation [J]. Cell Signal, 2009, 21(11): 1686-1697.
- [2] Zhang J, Bi M, Zhong F, et al. Role of *Cip4* in high glucose induced epithelial-mesenchymal transition of rat peritoneal mesothelial cells [J]. Ren Fail, 2013, 35(7): 989-995.
- [3] Koshkina NV, Yang G, Kleinerman ES. Inhibition of Cdc42-interacting protein 4 (*Cip4*) impairs osteosarcoma tumor progression [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(1): 48-56.
- [4] Chen Y, Aardema J, Kale S, et al. Loss of the F-BAR protein *Cip4* reduces platelet production by impairing membrane-cytoskeleton remodeling [J]. Blood, 2013, 122(10): 1695-1706.
- [5] Feng Y, Hartig SM, Bechill JE, et al. The Cdc42-interacting protein-4 (*Cip4*) gene knock-out mouse reveals delayed and decreased endocytosis [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4348-4354.
- [6] Jun HS, Hwang K, Kim Y, et al. High-fat diet alters PP2A, TC10, and *Cip4* expression in visceral adipose tissue of rats [J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(6): 1226-1231.
- [7] 马雄. 代谢性核受体:非酒精性脂肪性肝病治疗的新靶点

- [J]. 国际消化病杂志, 2008, 28(2): 91-93.
- [8] Liu Y, Yu C, Li Y. A new model: genetic characterizations of nonalcoholic fatty liver disease in mongolian gerbil [J]. Hepatology Intrenational, 2017, 11(Suppl 1): S1-S1093.
- [9] 刘月环. 长爪沙鼠高脂血症模型的建立及脂代谢相关基因的表达研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [10] Wang L, Rudert WA, Grishin A, et al. Identification and genetic analysis of human and mouse activated Cdc42 interacting protein-4 isoforms [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293: 1426-1430.
- [11] 刘相连, 乔芳, 黄德玉, 等. 转录因子研究方法进展 [J]. 生理科学进展, 2017, 48(1): 73-76.
- [12] 黄玥晔, 曲伸. 甲状腺激素受体已成为非酒精性脂肪性肝病的新靶点 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2014, 34(1): 43-45.
- [13] Wu GQ, Wang X, Zhou HY, et al. Evidence for transcriptional interference in a dual-luciferase reporter system [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17675.
- [14] 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其应用研究进展 [J]. 生命科学研究, 2011, 15(3): 277-282.
- [15] Cave MC, Clair HB, Hardesty JE, et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1859(9): 1083-1099.
- [16] 王水良, 傅继梁. 核受体的研究进展 [J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 420-429.
- [17] 裘佳. 甲状腺激素受体 Q 1 与类胰岛素生长因子结合蛋白 6 相互作用及其成骨细胞分化的调节 [D]. 中国医学科学院北京协和医学院, 2010.
- [18] Giudici M, Goni S, Fan R, et al. Nuclear receptor coregulators in metabolism and disease [J]. Handb Exp Pharmacol, 2016, 233: 95-135.
- [19] Adams AC, Astapova I, Fisher FM, et al. Thyroid hormone regulates hepatic expression of fibroblast growth factor 21 in a PPAR-dependent manner [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 14078-14082.
- [20] Fuchs CD, Claudel T, Scharnagl H, et al. FXR controls CHOP expression in steatohepatitis [J]. FEBS Lett, 2017, 591(20): 3360-3368.
- [21] Øvrevik J, Låg M, Lecureur V, et al. AhR and Arnt differentially regulate NF- κ B signaling and chemokine responses in human bronchial epithelial cells [J]. Cell Commun Signal, 2014, 12: 48.
- [22] Zhong D, Zhang Y, Zeng YJ, et al. MicroRNA-613 represses lipogenesis in HepG2 cells by downregulating LXR α [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12: 32.
- [23] Gramec Skledar D, Tomašić T, Sollner Dolenc M, et al. Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays [J]. Chemosphere, 2019, 220: 706-713.
- [24] Fuchs CD, Traussnigg SA, Trauner M. Nuclear receptor modulation for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Semin Liver Dis, 2016, 36(1): 69-86.

蔡方舟,陈倩,佟巍,等. 小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 85-90.
Cai FZ, Chen Q, Tong W, et al. Establishment of an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody of rabies virus [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 85-90.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 013

小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法的建立

蔡方舟,陈倩,佟巍,李丹,王卫*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法,用于狂犬病小鼠模型的检测和分析。**方法** 通过正交实验确定样品最佳稀释度和二抗最佳浓度等工作条件;并对该方法的特异性、灵敏性、稳定性等进行分析;与商品化试剂盒一同用于小鼠样品的检测,确定该 ELISA 方法的符合率。**结果** 该 ELISA 方法的样品最佳稀释度是 1:100,二抗最佳浓度是 40 ng/mL,阳性临界值为 0.121。该 ELISA 方法与小鼠常见病毒阳性血清无交叉反应;检测浓度下限为 129 μg/mL;样本三次重复的变异系数小于 10%。与商品化试剂盒的符合率为 100%。**结论** 成功建立小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法,可应用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估工作中。

【关键词】 狂犬病毒;IgG 抗体;小鼠;ELISA;检测方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0085-06

Establishment of an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody of rabies virus

CAI Fangzhou, CHEN Qian, TONG Wei, LI Dan, WANG Wei*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS);
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Beijing Key Laboratory for
Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases; NHC Key Laboratory of Human
Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish an ELISA assay for the detection of mouse IgG antibody to rabies virus.
Methods Orthogonal experiments were used to determine the optimal dilution of the sample and optimal concentration of the secondary antibody. The stability, specificity and sensitivity test of the assay was determined. The assay result of these samples were compared with those of a commercial kit. **Results** The optimal dilution of the sample was 1:100, the optimal concentration of the secondary antibody was 40 ng/mL, and the cutoff value was 0.121. There was no crossover with the common mouse viruses, and the minimum detection sensitivity was 129 μg/mL, and the coefficient variation of the three replicates of the sample was less than 10%. The coincidence rate with the commercial kit was 100%. **Conclusions** An ELISA assay for the detection of a mouse IgG antibody to rabies virus was successfully established, which can be used for detection and analysis of rabies mouse models.

【Keywords】 rabies virus; IgG Antibody; mouse; ELISA; detection assay

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务费课题(2018JT35001);国家传染病重大专项课题(2017ZX10304402-001)。

【作者简介】 蔡方舟(1997—),男,学士,实习技术员,生物技术专业。E-mail: caifangzhou11@sina.com

【通信作者】 王卫(1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。E-mail: wangw@cnilas.org

狂犬病是一种由狂犬病毒(rabies virus, RV)感染引起的急性传染病,是迄今为止唯一病死率高达 100% 的烈性传染病^[1-2]。我国是世界第二大狂犬病高发国,仅次于印度;1949 年至 2015 年,我国大陆报告狂犬病 130494 例,平均每年 1977 例^[3]。近年来,在全社会的重视和努力下,我国狂犬病病例持续下降,但发病数和死亡数在法定传染病报告里依然排列前茅,不可忽视^[4]。狂犬病可防不可治,合格的疫苗可用于狂犬病毒暴露前或暴露后预防;一旦发病,则无有效的治疗方法或策略。因此,完善狂犬病动物模型,检定狂犬病疫苗效价,探索狂犬病发病机制,对于狂犬病的防治均具有非常重要的现实意义。实验小鼠具有遗传背景均一、实验操作简便、实验试剂完善等优点,常用于狂犬病的发病机制研究及预防疫苗的评价^[3]。

为了解狂犬病毒及疫苗对实验小鼠的免疫效果,常需要检测小鼠血清中抗狂犬病毒抗体水平。常用的检测方法包括世界动物卫生组织(OIE)推荐的荧光抗体病毒中和试验(FAVN),以及世界卫生组织(WHO)推荐的快速荧光灶抑制试验(RFFIT),可定量检测动物或人体内狂犬病中和抗体水平;但缺少规范的结合抗体检测方法。基于此,为完善狂犬病小鼠模型技术体系,本研究建立了一种基于间接 ELISA 法检测小鼠血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体的方法,可用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠(雌性,体重 12~14 g,3~4 周龄),由北京华阜康生物技术股份有限公司提供[SCXK(京)2014-0004],用于狂犬病毒阳性血清和阴性血清的制备。动物饲养与实验均在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全二级动物实验室(ABSL-2),遵照 3R 原则进行。动物实验方案得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准(批准号:WW18003)。

1.1.2 实验样品

狂犬病毒阳性血清和阴性血清由本课题组自行制备,具体方法详见 1.3.1。用于特异性实验的

小鼠肝炎病毒、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的阳性血清来自中国医学科学院医学实验动物研究所检测中心,免疫荧光法(IFA)确认阳性,抗体效价均不低于 1:320。

1.2 主要试剂与仪器

狂犬病疫苗国家标准品购自中国食品药品检定研究院,批号为 250009-201108,效价为 6.61 U/mL。狂犬病毒抗原预包被微孔板(96 微孔板)、TMB 显色液、终止液(稀硫酸)、PBST 洗液等购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司(批号:20180906)。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(货号:ZB-2305WW)购于北京中杉金桥生物技术有限公司,抗体浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 。PBS(货号:SH30256.01)购自 HyClone 公司。酶标仪(型号:FLUOStar Omega)由德国 BMG Labtech 公司生产。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠阳性血清及阴性血清的制备

狂犬疫苗国家标准品用 PBS 稀释成 1:125,每只小鼠腹腔注射 0.5 mL,0 d、7 d 免疫,共免疫 2 次。分离免疫后 14 d 小鼠血清,进行抗狂犬病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)测定。根据 WHO 指导原则,RFFIT 结果大于 0.5 IU/mL 的样品确定为阳性血清。阳性血清混合后,使用 BSA 方法测定其浓度为 64.5 mg/mL。阴性血清来自未免疫小鼠,RFFIT 实验确认对狂犬病毒没有中和效果。

1.3.2 ELISA 方法的基本流程

狂犬病毒抗原包被由北京世纪元亨公司具体操作,其简单流程如下:96 孔板使用纯化的狂犬病毒进行包被,包被时将包被液(0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸盐缓冲液,0.05 mol/L 碱)稀释后加入微孔板中,每孔加 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,甩干;加入封闭液(0.12% Tris 缓冲液,含蛋白),每孔加 200 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h,甩干。对包被板做干燥、密封等处理,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。获得狂犬病毒抗原包被板之后,向其中加入 PBS 稀释的血清标本,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min;PBST 洗板 5 次,加入 PBS 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 30 min;PBST 洗板 5 次,加入显色底物 A(0.05 mol/L pH 5.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液,含 H_2O_2)及显色底物 B(0.01 mol/L pH 5.0 柠檬酸缓冲液,含

EDTA-Na₂、四甲基联苯胺 TMB), 37℃ 显色 15 min; 加入终止液(0.5 mol/L H₂SO₄), 用酶标仪测定波长 450 nm 处的 OD 值。

1.3.3 实验条件的优化

为确定样品的最佳稀释度及二抗的最佳浓度, 根据文献^[5], 使用正交实验法优化 ELISA 实验条件。样品使用 PBS 进行系列稀释, 根据实验经验, 稀释成 4 个稀释度, 分别为 1:50~1:400; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体也使用 PBS 进行系列稀释, 根据抗体说明书, 稀释为 5 个浓度, 稀释度为 1:2500~1:40 000, 浓度分别为 160 ng/mL、80 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL, 详见表 1。

根据阴性血清的检测结果, 结合文献^[6], 并根据统计学方法确定临界值(cut-off 值) 的计算公式: cut-off 值= $\bar{x} + (2 \times SD)$ 及数值。

1.3.4 方法特异性测试

使用该 ELISA 方法检测实验小鼠常见病毒的阳性血清, 包括小鼠肝炎病毒、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的阳性血清, 以及小鼠阴性血清; 判断其结果是否为阴性, 从而确定该方法的特异性。

1.3.5 方法敏感性测试

使用 PBS 系列稀释阳性血清, 稀释度分别为 1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10 000、1:50 000、1:100 000、1:500 000、1:1 000 000, 浓度分别为 6.45 mg/mL、1.29 mg/mL、645 μg/mL、129 μg/mL、64.5 μg/mL、12.9 μg/mL、6.45 μg/mL、1.29 μg/mL、645 ng/mL、129 ng/mL、64.5 ng/mL。用建立的 ELISA 方法进行检测, 确定其能检测出阳性结果的最低样品浓度, 从而确定该方法的敏感性。

1.3.6 方法重复性测试

选择本课题组制备的阳性血清样本各 3 份, 经

3 次重复检测, 每次同一样本设 3 个复孔, 确定检测符合率, 并计算变异系数($CV = (SD \div MN) \times 100\%$)^[7], 从而确定该方法的重复性。

1.3.7 符合率检验

将本文建立的间接 ELISA 方法与美国 Alpha Diagnostic International 公司的间接法试剂盒 Mouse Anti-Rabies IgG ELISA (货号: 600-030-MRG) 比较, 分析两种方法检测结果的一致性及符合率。

2 结果

2.1 间接 ELISA 法工作条件的确定

为建立该 ELISA 方法, 使用正交实验方法(表 1), 确定检测样品的最佳稀释度和二抗最佳工作浓度。根据实验结果, 随着样品稀释度的提高, OD 值逐渐降低; 随着二抗浓度的降低, OD 值逐渐降低, 符合实验预期。按照阳性样品 OD₄₅₀ 值>1.0, 阴性结果 OD₄₅₀ 值<0.1, P/N 值最大的实验组合为最佳组合的标准^[8], 我们发现该 ELISA 的样品最佳稀释度是 1:100, 二抗最佳浓度为 40 ng/mL, 结果见表 2; 后续均使用该工作浓度进行实验。

2.2 临界值(cut-off 值) 的确定

为确定该方法的临界值(cut-off 值), 使用建立的间接 ELISA 方法对 33 份阴性血清进行测定, 每份样品做 2 个复孔, 结果发现 OD 平均值($\bar{x}$) 为 0.061, 标准方差(SD) 为 0.03, 根据公式 cut-off 值= $\bar{x} + (2 \times SD)$ ^[6], 计算其临界值(cut-off 值) 为 0.121(见图 1)。因此, 当待检血清样本满足 OD ≥0.121, 即可判定为阳性; 反之当 OD<0.121 则判断为阴性。

2.3 方法特异性

为了解该方法是否特异, 用所建立的间接 ELISA 方法检测小鼠肝炎、小鼠呼肠孤病毒 III 型、小鼠细小病毒、小鼠多瘤病毒、小鼠腺病毒、小鼠仙

表 1 正交实验实验设计表

Table 1 Level of the factors in the orthogonal experiment

序号 Serial numbers	样品稀释度 Sample dilution	二抗稀释度及浓度 Dilution and concentration of secondary antibody
1	1:50	1:2500 (160 ng/mL)
2	1:100	1:5000 (80 ng/mL)
3	1:200	1:10 000 (40 ng/mL)
4	1:400	1:20 000 (20 ng/mL)
5	/	1:40 000 (10 ng/mL)

表 2 不同稀释倍数血清与不同浓度二抗反应的 OD₄₅₀ 值

Table 2 OD₄₅₀ value of ELISA with different dilutions of serum and different concentrations of secondary antibody

样品类型及稀释度 Sample type and dilution		二抗浓度 (ng/mL) Concentration of secondary antibody				
		160	80	40	20	10
1:50	阳性样品 Positive control	1.992	1.169	0.651	0.331	0.174
	阴性样品 Negative control	0.085	0.051	0.094	0.017	0.014
	阳性样品/阴性样品 P/N	23.435	22.921	6.625	19.470	12.428
1:100	阳性样品 Positive control	2.627	1.826	1.029	0.502	0.227
	阴性样品 Negative control	0.109	0.066	0.017	0.042	0.003
	阳性样品/阴性样品 P/N	24.100	27.666	60.529	11.952	75.666
1:200	阳性样品 Positive control	1.405	0.757	0.363	0.179	0.080
	阴性样品 Negative control	0.077	0.078	0.030	0.009	0.005
	阳性样品/阴性样品 P/N	18.246	9.705	12.100	19.888	16.000
1:400	阳性样品 Positive control	0.907	0.416	0.235	0.096	0.031
	阴性样品 Negative control	0.108	0.070	0.017	0.011	0.030
	阳性样品/阴性样品 P/N	8.398	5.942	13.823	8.727	1.033

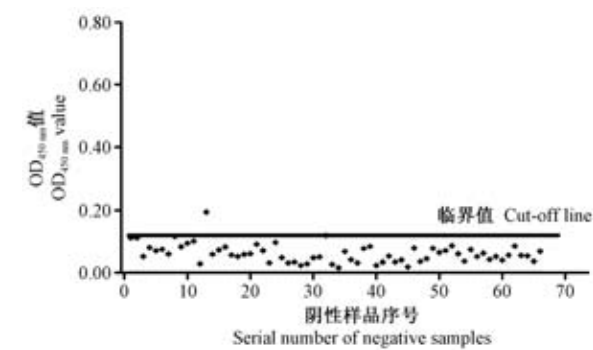


图 1 阴性血清间接 ELISA 检测结果

Figure 1 Indirect ELISA results of negative serum

台病毒、小鼠脑脊髓炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒等小鼠常见病毒的阳性血清,结果均为阴

性,见表 3,说明该 ELISA 方法与上述病毒抗体无交叉反应,具有较好的特异性。

2.4 方法敏感性

为了解该方法的检测灵敏度,本研究还进行了敏感性实验。将本科室制备的浓度为 64.5 mg/mL 的阳性样品进行稀释(1:10、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10 000、1:50 000、1:100 000、1:500 000、1:1 000 000),浓度分别为 6.45 mg/mL、1.29 mg/mL、645 μg/mL、129 μg/mL、64.5 μg/mL、12.9 μg/mL、6.45 μg/mL、1.29 μg/mL、645 ng/mL、129 ng/mL、64.5 ng/mL,用建立的 ELISA 方法进行检测。经 3 次试验,发现样品稀释度在 1:500 时仍能检测出阳性(见图 2),说明该方法的最低检测灵敏度为 129 μg/mL。

表 3 方法特异性实验检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Result of specificity test

样品 Samples	OD ₄₅₀ 值 OD ₄₅₀ value	结果判断 Result judgment
小鼠肝炎 Mouse hepatitis virus	0.085±0.014	阴性 Negative
呼肠孤病毒 III 型 Respiratory enteric orphan virus III	0.020±0.019	阴性 Negative
小鼠细小病毒 Minute virus of mice	0.072±0.004	阴性 Negative
多瘤病毒 Polyma virus	0.049±0.009	阴性 Negative
小鼠腺病毒 Mouse adenovirus	0.120±0.014	阴性 Negative
小鼠仙台病毒 Sendai virus	0.031±0.015	阴性 Negative
脑脊髓炎病毒 Encephalomyelitis virus	0.069±0.018	阴性 Negative
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic choriomeningitis virus	0.055±0.016	阴性 Negative
样品稀释液 Sample diluent	-0.015±0.007	阴性 Negative
阴性对照 1 Negative control 1	0.053±0.011	阴性 Negative
阴性对照 2 Negative control 2	0.022±0.016	阴性 Negative
阴性对照 3 Negative control 3	0.039±0.019	阴性 Negative

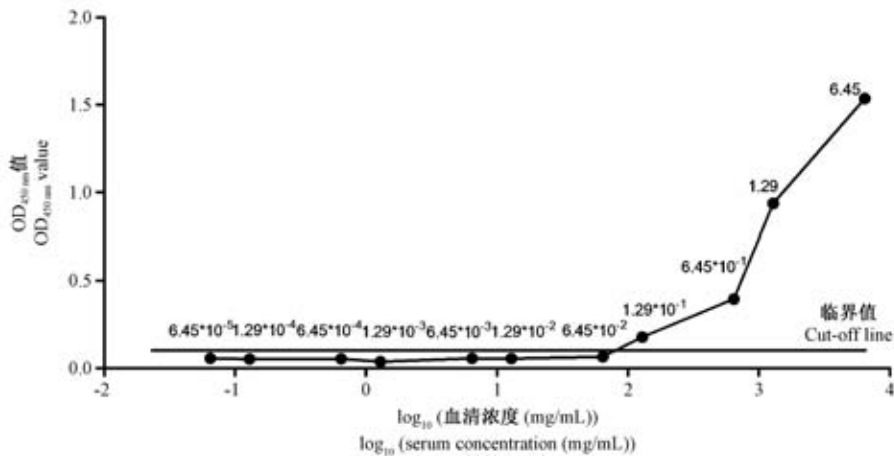


图 2 方法敏感性实验检测结果
Figure 2 Results of sensitivity test

表 4 重复性实验结果
Table 4 Results of reproducibility test

样品 Samples	1st		2nd		3rd	
	$\bar{x} \pm s$	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%	$\bar{x} \pm s$	CV%
1	0.572±0.126	3.6	0.456±0.044	9.7	0.430±0.059	7.6
2	1.216±0.108	8.9	1.115±0.082	7.3	1.034±0.061	5.9
3	0.903±0.170	1.5	0.769±0.081	6.1	0.657±0.025	3.8

2.5 可重复性

为了解本研究建立方法的可重复性,选择本科室制备的阳性血清样本各 3 份,经 3 次检测,每次同一样本设 3 个复孔,确定检测符合率,并计算变异系数(CV%)。结果发现,3 份阳性血清样本经重复检测,诊断符合率为 100%,变异系数为 1.5%~9.7%,小于 10%,见表 4;说明该方法具有较好的重复性。

2.6 符合率检验

将本文建立的间接 ELISA 方法与商品化的试剂盒进行比较,分别检测 18 个样品,本文建立的方法和商品化试剂盒均检出 10 例阳性,阳性率为 55.56%,与样品实际情况相符,两者总符合率为 100%。

3 讨论

为研究狂犬病毒的感染及致病机制,评价狂犬疫苗及药物的效果,动物模型是非常重要的研究工具。狂犬病毒几乎可以感染所有的温血脊椎动物,包括许多野生动物和常用的实验动物,如犬、仓鼠、小鼠、豚鼠、大鼠和家兔等(其敏感性递减)。实验研究和病毒分离时较常应用幼龄小鼠和仓鼠,因其敏感性高,潜伏期短且恒定(5~7 d)。家兔在感染

后,规律地显现麻痹症状。给 1 日龄雏鸡脑内接种狂犬病毒,可以使其发生致死性麻痹(初代街毒的潜伏期可能长达 1 个月左右),连续传代后的潜伏期缩短至 6 d。地鼠也常被用于狂犬病暴露后疫苗免疫动物模型^[9]。鉴于实验小鼠的诸多优点,小鼠模型被广泛应用于狂犬病感染及发病机制研究,以及狂犬病疫苗体内评价等工作中^[10]。

了解狂犬病毒或疫苗对小鼠的免疫效果,进行狂犬病小鼠模型分析,抗体水平检测是非常关键的一环。目前,检测狂犬病抗体的有很多种,如荧光抗体中和实验(FAVN)、小鼠中和实验(MNT)、快速荧光灶抑制试验(RFFIT)等^[11-13],但是这些实验都存在着相应的缺点,如仪器需求较高、成本较高、试验周期较长等;还需要使用狂犬病毒活毒,存在实验室生物安全风险。为完善狂犬病小鼠模型技术体系,了解结合抗体在小鼠体内的变化规律,急需建立一种简便易行的抗体检测方法。国际上只有少数公司能生产类似试剂盒,但也存在货期长、成本高等问题。

酶联免疫吸附试验(ELISA)只需要较短的时间(2~3 h)以及较低的成本,在定性分析上 ELISA 具有较大优势。而且,ELISA 与其他抗体检测技术具

有非常高的符合率。如 ELISA 和 FAVN 检测狂犬病疫苗免疫犬血清抗体的阳性符合率为 100%^[14]。RFFIT、FAVN 及 RVNA Kit 等三种方法可通用于人血清中抗狂犬病毒中和抗体的检测,而 ELISA 检测结果与中和抗体效价有一定差距,但在经过优化、校验后 ELISA 也可以在有效范围内用于狂犬病抗体的检测^[15-16]。为此,作者尝试建立一种基于间接 ELISA 法检测小鼠血清中抗狂犬病毒 IgG 抗体的方法,可用于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗效价的评估。

本研究建立的小鼠抗狂犬病毒 IgG 抗体 ELISA 检测方法具有良好的可重复性,且特异性良好,与小鼠常见病毒无交叉反应,能在抗体浓度大于 129 $\mu\text{g/mL}$ 时检测出阳性结果。本实验以商品化的试剂盒作为对照进行比较,发现二者符合率很高,符合率达到 100%,证明自研试剂盒性能良好,可应用于狂犬病小鼠模型的抗体动力学追踪分析。综上所述,本文所建立的间接 ELISA 方法适于狂犬病小鼠模型的分析以及疫苗临床前的检测。

参考文献:

- [1] Fisher CR, Streicker DG, Schnell MJ. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(4): 241-255.
- [2] 王朝,周明,傅振芳,等. 狂犬病病毒逃逸宿主天然免疫反应的研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(3): 237-244.
- [3] Ruan S. Modeling the transmission dynamics and control of rabies in China[J]. *Math Biosci*, 2017, 286: 65-93.
- [4] 徐素萍,黄小芳,刘宇明,等. 4 株狂犬病毒感染小鼠的临床症状及脑组织病理学观察[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(3): 586-591.
- [5] 杜燕华,李懿,程宁宁,等. 新布尼亚病毒 IgG 抗体间接

ELISA 检测方法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(2): 126-129.

- [6] 陈武娟,贺美荣,杨蓉,等. 人类巨细胞病毒 IgG 抗体 ELISA 检测试剂的研制[J]. *免疫学杂志*, 2017, 33(4): 349-353.
- [7] 李一经,刘博,姜艳平,等. 双抗体夹心 ELISA 检测排泄物 PEDV[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(2): 1-10.
- [8] 徐保娟,王丽萍,崔晓霞,等. 猪圆环病毒 2 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2019, 27(2): 25-34.
- [9] 汤重发,石磊泰,俞永新,等. 金黄地鼠作为狂犬病暴露后疫苗免疫动物模型的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(3): 225-230.
- [10] 唐利军, Kuang KY, Zhao L, 等. 狂犬病小鼠模型的制作[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(5): 330-333.
- [11] Mebatsion T, Sillero-Zubiri C, Gottelli D, et al. Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simien jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia[J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1992, 39(3): 233-235.
- [12] 吴小红,李加,唐建蓉,等. 抗狂犬病病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)的建立及应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(11): 1145-1148.
- [13] 张守峰,张菲,刘晔,等. FAVN 与 RFFIT 在动物和人狂犬病中和抗体检测中的比较[J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(9): 1161-1163.
- [14] 孙招金,薛素强,刘晓慧,等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(3): 204-206.
- [15] 于鹏程,由淑珍,卢学新,等. RFFIT、FAVN、ELISA 及狂犬病中和抗体检测试剂盒对狂犬病抗体检测的比较研究[J]. *病毒学报*, 2017(2): 265-268.
- [16] 章雨辰,何婉婷,张鸿宇,等. 狂犬病病毒实验室检测技术的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(5): 416-421.

[收稿日期] 2018-12-11

姜华,文海若,刘丽,等. BALB/c 小鼠、SD 大鼠及食蟹猴淋巴细胞亚群参考值的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 91-97.

Jiang H, Wen HR, Liu L, et al. Establishment of reference ranges for lymphocyte subsets in BALB/c mice, SD rats and cynomolgus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 91-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 014

BALB/c 小鼠、SD 大鼠及食蟹猴淋巴细胞亚群参考值的建立

姜 华[#],文海若[#],刘 丽^{*},王亚楠,李路路,刘晓萌,李 伟,王 欣,
周晓冰,王三龙,霍 艳^{*}

(中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心,药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,
北京 100176)

【摘要】 目的 收集国家药物安全评价监测中心于 2007 年至 2019 年间符合药物非临床研究质量管理规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 条件下完成的外周血淋巴细胞亚群测定结果,建立 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴相应正常值参考范围。**方法** 使用肝素钠抗凝管采集动物外周血,303 只 BALB/c 小鼠、359 只 SD 大鼠和 460 只食蟹猴的血样经不同荧光抗体组合染色后,用流式细胞计数法对样本中表达 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD20⁺ (仅食蟹猴) 的淋巴细胞分类计数。所有数据以性别、周龄 (大鼠和小鼠) 分类后,分别计算正常参考值范围及 95% 置信区间。**结果** BALB/c 小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值范围为 1.07~8.59;SD 大鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值范围为 0.54~11.67;年龄为 3~4 周岁的食蟹猴的 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞比值和 CD3⁺CD20⁺ 淋巴细胞百分比的范围分别是 0.35~4.22 和 1.40%~51.99%。**结论** 淋巴细胞亚群分类计数是生物制品免疫毒性评价的重要参考指标,相关背景数据的收集和确立有助于对药物作出合理的毒性评价。

【关键词】 淋巴细胞亚群;流式细胞法;食蟹猴;SD 大鼠;BALB/c 小鼠;外周血;参考值

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0091-07

Establishment of reference ranges for lymphocyte subsets in BALB/c mice, SD rats and cynomolgus monkeys

JIANG Hua[#], WEN Hairuo[#], LIU Li^{*}, WANG Yanan, LI Lulu, LIU Xiaomeng, LI Wei, WANG Xin,
ZHOU Xiaobing, WANG Sanlong, HUO Yan^{*}

(National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control;
Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China)

【Abstract】 Objective To collect the results of peripheral blood lymphocyte subsets determination conducted in

[基金项目] 重大新药创制科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(2015ZX09501007-004);国家重点研发计划课题“干细胞移植后体内分布/动态变化及致癌性/促瘤性等安全性评价”(2016YFA0101503);重大新药创制科技重大专项“创新药物非临床安全性评价关键技术研究”(2018ZX09201-017)。

[作者简介] 姜华(1976—),女,实验员,学士,研究方向:药物安全性评价。E-mail: 1828800241@qq.com

文海若(1981—),女,副研究员,博士,研究方向:药理毒理研究。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn [#]共同第一作者

[通信作者] 霍艳(1971—),女,研究员,博士,研究方向:药理毒理研究。E-mail: yanhuo@nifdc.org.cn

刘丽(1976—),女,主任药师,博士,研究方向:新药非临床安全性研究。E-mail: liuli@nifdc.org.cn ^{*}共同通信作者

National Center for Safety Evaluation of Drugs from 2007 to 2019 in accordance with Good Laboratory Practice (GLP), and establish reference ranges for corresponding normal values in BALB/c mice, Sprague Dawley (SD) rats, and cynomolgus monkeys. **Methods** Peripheral blood samples were collected from animals and put into heparin sodium anticoagulant tubes. Blood samples from 303 BALB/c mice, 359 SD rats, and 460 cynomolgus monkeys were stained with different combinations of fluorescent antibodies, and lymphocytes were classified and counted by their expression of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD20⁺ (cynomolgus monkeys only) using flow cytometry. For each species, the data were classified by gender and age (rat and mouse) and then calculated for normal reference range and 95% confidence interval, respectively. **Results** The range of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes ratio was 1.07–8.59 in BALB/c mice and 0.54–11.67 in SD rats. Ranges of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes ratio and the percentage of CD3⁺CD20⁺ lymphocytes in cynomolgus monkeys aged 3–4 years were 0.35–4.22 and 1.40%–51.99%, respectively. **Conclusions** Classified counts of lymphocyte subsets provide an important reference index for evaluating the immunotoxicity of biological products. The collection and establishment of relevant background data will facilitate more reasonable evaluations of drug toxicity.

【Keywords】 lymphocyte subsets; flow cytometry; cynomolgus monkey; SD rat; BALB/c mouse; peripheral blood; reference value

生物制品在创新药物研发中占据重要地位,在全球最畅销的药物排行榜中占据半壁江山。生物制品的主要药理作用是通过刺激机体免疫系统产生免疫物质来激活人体免疫系统^[1-2]。免疫系统功能异常可导致感染及肿瘤性病变,严重时可危及生命。药物免疫毒性是当前仅次于肝毒性的全球第二大新药召回原因,故生物制品的免疫毒性风险是其安全性评价的重要关注点^[3]。淋巴细胞表面的跨膜糖蛋白以表面受体的形式,可特异性识别并参与机体抗原呈递过程,并参与免疫调节功能。如 T 淋巴细胞中 CD4⁺ 和 CD8⁺ 表型的数值变化常用于监测肿瘤、和获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 等与免疫功能有关的疾病的发生与发展^[4-6]。使用流式细胞术分类计数淋巴细胞亚群已成为非临床安全性评价中常规的免疫毒性评价手段之一。常见的淋巴细胞亚群分类包括 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 与 CD3⁺CD20⁺ 细胞等^[7]。

小鼠、大鼠和食蟹猴均为常用的安全性评价动物模型。使用标准化的样本制备方法,在符合药物非临床研究质量管理规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 试验条件下建立淋巴细胞亚群分类背景数据,有助于研究和监管者了解数值变化范围,对动物免疫毒性作合理评估^[8]。当前国内食蟹猴外周血淋巴细胞亚群流式检测参考值相关文献已有数篇报道^[8-11],但数据涉及动物数量有限 (不超过 100 只) 或仅分析单一性别,仅有一篇为由安评机构汇总的基于多年大量动物的背景数据^[8]。此外,大鼠及小鼠淋巴细胞亚群流式检测参考值相关报道较少,因不同品系的大鼠和小鼠其背景值范

围也有所差异,有必要在安评机构中建立基于大量动物样本数的淋巴细胞亚群的背景值范围。本研究收集国家药物安全评价监测中心 2007 年至 2019 年在 GLP 条件下开展的生物制品安全性评价研究中未给药组或溶媒组的 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴 (广西或北京) 的 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 和 CD3⁺CD20⁺ (仅食蟹猴) 检测值,根据动物性别不同分别汇总以确定不同种属动物淋巴细胞亚群的参考值,为生物技术类药物的免疫毒性评价提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF/VAF 级 BALB/c 小鼠共 303 只 (来自 10 项研究), SPF/VAF 级 SD 大鼠共 359 只 (来自 11 项研究), 雌雄各半 (购入时约 5~9 周龄), 小鼠体重范围约 25~40 g, 大鼠体重约 300~400 g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2002-0003] [SCXK (京) 2012-0001] [SCXK (京) 2016-0011]。动物饲养于本中心 [SYXK (京) 2011-0037] [SYXK (京) 2016-0045] 屏障系统的大鼠笼具 (长×宽×高: 460 mm×315 mm×210 mm) 和小鼠笼具 (长×宽×高: 350 mm×140 mm×136 mm) 内, 饲养密度为 2~3 只/笼。给予鼠全价颗粒饲料喂养, 自由摄食及饮水。大鼠和小鼠饲养于恒温 (20℃~26℃)、恒湿 (40%~70%) 的条件下, 明暗周期为 12 h, 每小时最低换气次数 15 次。

普通级食蟹猴共 460 只, 雌雄各半 (购入时约 3~4 岁, 体重约 3~5 kg, 来自共 12 项研究), 购自广西桂东灵长类开发实验有限公司 [SCXK (桂) 2011

-0001][SCXK(桂)2016-0001]或北京协尔鑫生物资源研究有限责任公司[SCXK(京)2015-0011]。饲养于本中心[SYXK(京)2011-0037][SYXK(京)2016-0045]普通级动物房不锈钢笼具内(长×宽×高:80 cm×70 cm×75 cm),单笼饲养。动物自由饮水,每只动物每天定量给料和水果各 150 g,自由摄取。食蟹猴饲养于恒温(16℃~26℃)、恒湿(40%~70%)的条件下,明暗周期为 12 h,每次小时最低换气次数 8 次。

所有研究方案均通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会(institutional animal care and use committee, IACUC)的伦理审查(IACUC 编号为:IACUC-2008-023、IACUC-2010-008、IACUC-2013-031、IACUC-2014-068、IACUC-2015-028、IACUC-2016-005、IACUC-2017-005、IACUC-2018-001、IACUC-2018-058,等等),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括流式仪校准微球(BD Calibrite™ 3-color,批号:7347634、APC bead,批号:80129)、BALB/c 小鼠用抗体 FITC-CD8a(Clonel 53-6.7,批号:3177592,8152865)、PerCP-CD4(Clonel RM4-5,批号:8025572,8194889,8025572)、Hamster 抗 Mouse PE-CD3e(Clonel 145-2C11,批号:6012949,7158744)和食蟹猴用抗体 FITC-CD8(Clonel RPA-T8,批号:5341673,5159821)、PE-CD4(Clonel L200,批号:7299836,5313876,5057543)、PerCP-CD3(Clonel SP34-2,批号:8124735,6092584,7069961)和 APC-CD20(Clonel 2H7,批号:3291627)均购自 BD 公司;SD 大鼠用抗体 CD3-FITC/CD4-RPE(Clonel IF4:W3/25,批号:1113)、CD8ALPHA:Alexa Fluor647(Clonel OX-8,批号:0310)购自 BIO-RAD;红细胞裂解液主要成分:氯化氨(批号:20161208)、碳酸氢钾(批号:20150924)和乙二胺四乙酸二钠(批号:20140328)购自国药集团,磷酸盐缓冲液(PBS 批号:AD2016267,AD22391274)购自 Hyclone;多聚甲醛(批号:20170825)购自国药集团,使用前经 PBS 稀释为 1%的应用液。主要仪器包括 BD FACSCalibur 流式细胞仪,分析软件 Cell Quest™ Pro;H-500FRS 高速离心机。

1.3 检测方法

1.3.1 血样采集

本研究收录动物数据均来自未给药动物或生

物制品溶媒对照组动物数据,全部动物采血前过夜禁食。啮齿类动物腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉后经腹主静脉采血,食蟹猴不麻醉由前臂静脉采血。全部动物采集全血 0.3~0.5 mL,血样于肝素钠抗凝管中混匀,所有样本在采集后 4 h 之内完成制备与测定分析。

1.3.2 检测流程

将各相应荧光抗体组合和 50 μL 抗凝全血加入流式管中,混匀样本后于室温、避光条件下孵育 30 分钟。在流式管中分别加入 1 mL 的红细胞裂解液并混匀,小鼠和大鼠样本的裂解时间通常为 1~3 min,食蟹猴样本约 4~9 min。红细胞充分裂解后,以 1000 r/min 离心 5 min,弃上清并加入 1 mL PBS 再次离心(离心条件同上)并弃上清。每管加入 1%多聚甲醛重悬细胞后上机测定。小鼠和大鼠样本共收集 3000~5000 个淋巴细胞,食蟹猴共收集 5000 个淋巴细胞。分别计算表达 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺(仅食蟹猴)的淋巴细胞百分率。

1.4 统计学方法

所有数据以种属及性别不同分组,列出其最大值和最小值。使用 Kolmogorov-Smirnov (IBM SPSS Statistics)检验数据的正态性,当数据呈正态分布时(双尾检验, $P \geq 0.05$ 时)列出其平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)及 95%置信区间;当数据分布不呈正态时(双尾检验, $P < 0.05$ 时),分别描述四分位数(即 25%、50%和 75%)。

2 结果

雄性和雌性 BALB/c 小鼠外周血 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺淋巴细胞范围(表 1),雄性的结果分别为 45.45%~85.86%、12.73%~42.48%、1.07~6.74;雌性为 53.27%~84.15%、8.95%~37.49%、1.42±8.59。雄性和雌性 SD 大鼠平均 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺和 CD4⁺/CD8⁺范围(表 2),雄性的结果分别为 48.26%~84.53%、16.35%~62.75%、0.99~8.78;雌性为 34.06%~86.24%、7.39%~62.75%、0.54±11.67。约 3~4 岁龄雄性和雌性食蟹猴 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺范围(表 3),雄性的结果分别为 28.42%~72.83%、23.93%~65.32%、0.44±3.04、1.40%~47.91%;雌性为 22.70%~75.90%、17.43%~65.13%、0.35±4.22、9.6%~51.99%。

表 1 BALB/c 小鼠 T 淋巴细胞亚群参考范围
Table 1 Reference range of T lymphocyte subsets in BALB/c mice

性别 Sex	指标 Indices	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
雄性 Male	最大值 Maximum value	85. 86	42. 48	6. 74
	最小值 Minimum value	45. 45	12. 73	1. 07
	动物数 Number of animals		152	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 005	0. 003	0. 029
	$\bar{x}\pm s$	/	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	/	/
	25%	70. 23	18. 14	2. 78
	50%	75. 57	20. 72	3. 55
	75%	79. 38	25. 21	4. 37
	最大值 Maximum value	84. 15	37. 49	8. 59
	最小值 Minimum value	53. 27	8. 95	1. 42
	动物数 Number of animals		151	
雌性 Female	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 034	0. 200	0. 003
	$\bar{x}\pm s$	/	22. 71±4. 71	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	23. 47	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	21. 96	/
	25%	69. 38	/	2. 64
	50%	72. 67	/	3. 18
	75%	77. 48	/	3. 88

表 2 SD 大鼠 T 淋巴细胞亚群参考范围
Table 2 Reference range of T lymphocyte subsets in SD rats

性别 Sex	指标 Indices	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
雄性 Male	最大值 Maximum value	84. 53	62. 75	8. 78
	最小值 Minimum value	48. 26	16. 35	0. 99
	动物数 Number of animals		180	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 200	0. 200	0. 000
	$\bar{x}\pm s$	66. 46±6. 31	33. 00±7. 46	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	67. 37	34. 59	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	65. 56	31. 41	/
	25%	/	/	1. 83
	50%	/	/	2. 18
	75%	/	/	2. 69
	最大值 Maximum value	86. 24	62. 75	11. 67
	最小值 Minimum value	34. 06	7. 39	0. 54
	动物数 Number of animals		179	
雌性 Female	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)			
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)	0. 200	0. 200	0. 000
	$\bar{x}\pm s$	63. 91±7. 59	31. 28±8. 43	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	64. 99	32. 49	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	62. 82	30. 07	/
	25%	/	/	1. 67
	50%	/	/	2. 06
	75%	/	/	2. 6

表 3 食蟹猴淋巴细胞亚群参考范围

Table 3 Reference range of lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys					
性别 Sex	指标 Indices	T 细胞亚群 T cell subsets		B 细胞亚群 B cell subsets	
		CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁻ CD20 ⁺ (%)
雄性 Male	最大值 Maximum value	72.83	65.32	3.04	47.91
	最小值 Minimum value	28.42	23.93	0.44	1.40
	动物数 Number of animals	230		81	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)	0.094	0.200	0.000	0.000
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)				
	$\bar{x}\pm s$	49.21±7.99	43.73±7.83	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	50.25	44.74	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	48.18	42.72	/	/
	25%	/	/	0.94	14.92
	50%	/	/	1.12	18.17
	75%	/	/	1.38	22.83
	最大值 Maximum value	75.90	65.13	4.22	51.99
	最小值 Minimum value	22.70	17.43	0.35	9.60
雌性 Female	动物数 Number of animals	230		81	
	Kolmogorov-Smirnov 检验 P 值(双尾)	0.009	0.007	0.000	0.008
	Kolmogorov-Smirnov P value (two tailed test)				
	$\bar{x}\pm s$	/	/	/	/
	95%置信区间上限 95% CL upper	/	/	/	/
	95%置信区间下限 95% CL lower	/	/	/	/
	25%	48.83	35.24	1.09	12.94
	50%	53.74	39.89	1.34	17.01
	75%	58.25	44.57	1.64	22.67

上述背景数值分布范围较广,故对不同种属及性别动物的淋巴细胞亚群分布情况作进一步分析汇总。BALB/c 小鼠的 CD3⁺CD4⁺数值分布集中于 60%~80%,CD3⁺CD8⁺分布多集中于 15%~35%,CD4⁺/CD8⁺比值集中于 1.5~4.5 的区间范围(表 4);SD 大鼠的 CD3⁺CD4⁺数值分布集中于 60%~80%,CD3⁺CD8⁺分布集中于 25%~45%,CD4⁺/CD8⁺比值多集中于 1.5~4.5 的区间范围(表 5);食蟹猴的 CD3⁺CD4⁺分布集中于 40%~60%,CD3⁺CD8⁺分布多集中于 30%~50%,CD4⁺/CD8⁺比值多集中于 1.0~2.0,CD3⁻CD20⁺分布多集中于 10%~30%(表 6)。上述分布情况未见性别差异。

表 4 BALB/c 小鼠淋巴细胞亚群总体分布情况

Table 4 Overall distribution of lymphocyte subsets in BALB/c mice									
性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 区间(%)	例数	比例(%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 区间(%)	例数	比例(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 区间	例数	比例(%)
	CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	Cases	Ratio	CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	Cases	Ratio	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	Cases	Ratio
雄性 Male	40~60	7	4.6	<15	7	4.6	<1.5	1	0.7
	60~70	40	26.3	15~25	99	65.1	1.5~3.0	61	40.1
	70~80	88	57.9	25~35	43	28.3	3.0~4.5	73	48
	80~90	16	10.5	>35	2	1.3	4.5~6.0	11	7.2
	/	/	/	/	/	/	>6.0	5	3.3
	合计 Total	151			151			151	
雌性 Female	40~60	7	4.6	<15	17	11.2	<1.5	3	2
	60~70	28	18.4	15~25	95	62.5	1.5~3.0	44	28.9
	70~80	82	53.9	25~35	36	23.7	3.0~4.5	71	46.7
	80~90	35	23	>35	4	2.6	4.5~6.0	29	19.1
	/	/	/	/	/	/	>6.0	5	3.3
	合计 Total	152			152			152	

表 5 SD 大鼠 T 淋巴细胞亚群总体分布情况
Table 5 Overall distribution of lymphocyte subsets in SD rats

性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺ 区间 (%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	CD3 ⁺ CD8 ⁺ 区间 (%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 区间 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio
雄性 Male	<50	1	0.6	<15	2	1.1	<1.5	15	8.3
	50~60	27	15	15~25	28	15.6	1.5~3.0	141	78.3
	60~70	104	57.8	25~35	107	59.4	3.0~4.5	18	10
	70~80	45	25	35~45	42	23.3	4.5~6.0	5	2.8
	>80	3	1.7	>45	1	0.6	>6.0	1	0.6
	合计 Total	180			180			180	
雌性 Female	<50	9	5	<15	1	0.6	<1.5	33	18.4
	50~60	42	23.5	15~25	28	15.6	1.5~3.0	127	70.9
	60~70	96	53.6	25~35	86	48	3.0~4.5	10	5.6
	70~80	28	15.6	35~45	55	30.7	4.5~6.0	8	4.5
	>80	4	2.2	>45	9	5	>6.0	1	0.6
	合计 Total	179			179			179	

表 6 食蟹猴淋巴细胞亚群总体分布情况
Table 6 Overall distribution of lymphocyte subsets in cynomolgus monkeys

性别 Sex	CD3 ⁺ CD4 ⁺			CD3 ⁺ CD8 ⁺			CD4 ⁺ /CD8 ⁺			CD3 ⁻ CD20 ⁺		
	区间 (%) CD3 ⁺ CD4 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 (%) CD3 ⁺ CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio	区间 (%) CD3 ⁻ CD20 ⁺ interval	例数 Cases	比例 (%) Ratio
雄性 Male	<30	3	1.3	<20	1	0.4	<0.5	3	1.3	<10	1	1.2
	30~40	14	6.1	20~30	20	8.7	0.5~1.0	41	17.8	10~20	52	64.2
	40~50	53	23	30~40	97	42.2	1.0~2.0	158	68.7	20~30	20	24.7
	50~60	120	52.2	40~50	94	40.9	2.0~3.0	25	10.9	30~40	7	8.6
	60~70	37	16.1	50~60	11	4.8	>3.0	3	1.3	>40	1	1.2
	>70	3	1.3	>60	7	3	/	/	/	/	/	/
	合计 Total	230			230			230			81	
雌性 Female	<30	1	0.4	<20	0	0	<0.5	4	1.7	<10	3	3.7
	30~40	24	10.4	20~30	6	2.6	0.5~1.0	82	35.7	10~20	47	58
	40~50	99	43	30~40	64	27.8	1.0~2.0	133	57.8	20~30	25	30.9
	50~60	83	36.1	40~50	119	51.7	2.0~3.0	10	4.3	30~40	5	6.2
	60~70	22	9.6	50~60	32	13.9	>3.0	1	0.4	>40	1	1.2
	>70	1	0.4	>60	9	3.9	/	/	/	/	/	/
	合计 Total	230			230			230			81	

3 讨论

免疫毒性评价已成为药物毒理学评价中不可或缺或缺的单元。使用流式细胞计数法(flowcytometry, FM)检测外周血淋巴细胞表型已成为毒理学评价实验室常规的试验手段,该方法与免疫组化检测法相比灵敏度高、更客观、且可以更好地兼容高通量评价。外周血淋巴细胞表型是评估动物免疫功能的重要指标,而动物的产地、环境、样本制备和所用试剂不同等诸多因素均可对其数值产生影响^[12-13]。在实验室内确立一套正常动物外周血淋巴细胞亚群正常参考范围,有利于查找研究数据存在的问题并对药物潜在免疫毒性作出有效判断,满足不断提高的实验结果准确度的要求,从而推动生物制品产品研发并更好地服务于毒理数据监管。当试验中阴性组数值偏离背景数据时,认为该组数据不可靠,应查找原因并重复采血检测。本研究汇总 12 年来我中心未给药或仅给予溶媒的啮齿类动物和灵长类动物的淋巴细胞亚群分类结果,所有数据均来自 10 以上次独立研究,背景值范围在文献报道范围之内^[8-11]。

CD3⁺CD4⁺为辅助/诱导细胞亚群,主要通过分泌的淋巴因子来增强和扩大免疫应答;而 CD3⁺CD8⁺属于抑制/细胞毒细胞亚群,可特异性杀伤靶细胞,具有抗病毒、抗肿瘤及重要的调节作用^[14]。影响 CD4⁺/CD8⁺的因素除种属外,也与年龄和性别等因素有关。如,衰老与免疫功能减退息息相关。本研究中发现 BALB/c 小鼠、SD 大鼠和食蟹猴的 CD4⁺/CD8⁺范围分别为 1.07~8.59、0.54~11.67 和 0.35~4.22,范围区间大,与个别动物个体差异导致头尾两端的数据差异大有关。故进一步对所有数据分区间进行汇总,发现相同种属大多数动物的数

值(约 70%~85%左右)位于相同区间内,且数据分布无明显性别差异。黄秋香等对不同性别和不同周龄的食蟹猴的淋巴细胞亚群分类结果比较分析,发现 3~5 岁的食蟹猴存在雌性动物 CD3⁺CD4⁺较高的现象,而 1.5~2 岁的食蟹猴数据中未见上述差异^[8]。此外,李岩等汇总的 4~7 岁食蟹猴淋巴细胞亚群分类结果中亦未见性别差异^[11]。食蟹猴通常约 4 岁左右达性成熟,本中心用于药物临床前安全性评价的食蟹猴年龄通常为 3~4 岁,处于接近性成熟或性成熟伊始阶段。辅助性 T 淋巴细胞(CD3⁺CD4⁺)变化可与动物的性成熟和胸腺萎缩程度有关,动物的年龄以及雌性动物性成熟时间早于雄性动物等因素可能是造成年龄和性别差异的主要原因。因上述文献使用动物产地各异,不排除存在食蟹猴产地原因。

除 CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺和 CD3⁻CD20⁺外,其它淋巴细胞表型对特殊靶向的生物制品的免疫毒性也有一定提示,然而涉及研究较少,未获得大量数据用于制定背景数据。如自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)认为是 T 细胞和 B 细胞外的第三大最重要的免疫细胞,可通过 CD16⁺或 CD56⁺识别。作为天然免疫的核心细胞,外周血中 NK 的多寡也可反应受试物的免疫毒性^[15]。而表达 CD40⁺的 B 细胞可激活树突状细胞(dendritic cell,DC)并在 CD8⁺的调控中至关重要^[16]。当前已有针对 CD40⁺开发的一系列抗体抗肿瘤药物,如 SEA-CD40、鲁卡木单抗、阿韦舒托等陆续进入临床,上述药物的毒性评估中应关注 CD40⁺的表达水平。此外,近年来靶向 CD19、CD20 和 CD22 的嵌合抗原受体(Chimeric antigen receptor,CAR)修饰的 T 细胞治疗在复发/难治型急性淋巴细胞白血病的治疗中彰显优势^[17,18],类似细胞治疗产品陆续进入安评领域,而表型为 CD19⁺、CD20⁺和 CD22⁺的淋巴细胞表达水平也成为其毒性监测的关注点。今后应注意收集相关数值,完善背景数据积累。

本研究规范而系统性地收集了 12 年来大量小鼠、大鼠和食蟹猴的外周血淋巴细胞亚群背景数据,尤其是首次报道了基于大量样本的小鼠和大鼠淋巴细胞亚群背景数据,作为生物制品临床前动物试验数据解读的重要支持,对进一步讨论药物或疾病对动物免疫功能状态的影响提供参考。当前有关啮齿类动物的淋巴细胞亚群背景值信息罕有报道,本文对以啮齿类动物为模型的生物制品评价及研究具有借鉴意义。

参考文献:

[1] Davda J, Declerck P, Hu-Lieskovan S, et al. Immunogenicity of

immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics[J]. J Immunother Cancer, 2019,7(1):105.

[2] Zhang J, Medeiros LJ, Young KH. Cancer immunotherapy in diffuse large B-cell lymphoma[J]. Front Oncol, 2018, 8: 351.

[3] 王雅坤, 张小田. 免疫检查点抑制剂的毒性风险分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2017,22(8):735-741.

[4] Song K, Wu ZM, Peng LY, et al. Canine distemper virus increased the differentiation of CD4⁺CD8⁺ T cells and mRNA expression of inflammatory cytokines in peripheral blood lymphocyte from canine[J]. Microb Pathog, 2019, 131: 254-258.

[5] Lisco A, Wong CS, Lage SL, et al. Identification of rare HIV-1-infected patients with extreme CD4⁺ T cell decline despite ART-mediated viral suppression [J]. JCI Insight, 2019, 4(8): 127113.

[6] Zhang X, Su L, Huang H, et al. Coating with Chitooligosaccharides enhances the Cytokine induction of *Listeria ivanovii*-based vaccine strain[J]. J Pharm Sci, 2019, 108(9): 2926-2933.

[7] 王志鹏, 李晨, 曹云新, 等. 实验用猕猴 CD3、CD4、CD8、CD20 细胞阳性率的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(5):287.

[8] 黄秋香, 孙建华, 秦秋平, 等. 食蟹猴外周血淋巴细胞亚群的流式法分析验证和正常参考值测定[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(z2):75-78.

[9] 韦毅, 符明泰, 阳明, 等. 正常成年雄性食蟹猴部分免疫功能指标观测[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(3):236-238.

[10] 佟巍, 王卫, 魏强. 北京地区实验恒河猴外周血 T 淋巴细胞亚群分析[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5):38-40.

[11] 李岩, 何君, 孙井江, 等. 实验用食蟹猴生物学指标的研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(13):2503-2505.

[12] 张琰, 温浩, 张朝霞, 等. 新疆地区维吾尔族和汉族血液淋巴细胞免疫表型参考值范围的调查[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1):133-136.

[13] 季芳, 饶军华, 刘晓明. 人工饲养恒河猴血液生化正常参考值的测定与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(6):345-349.

[14] Hendrickx AG, Makori N, Peterson P. The nonhuman primate as a model of developmental immunotoxicity[J]. Hum Exp Toxicol, 2002, 21(9-10):537-542.

[15] Davis ZB, Vallera DA, Miller JS, et al. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy[J]. Semin Immunol, 2017, 31:64-75.

[16] Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4):1083-1088.

[17] Fry TJ, Shah NN, Orentas RJ, et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy [J]. Nat Med, 2018, 24(1):20-28.

[18] Chappell CP, Draves KE, Clark EA. CD22 is required for formation of memory B cell precursors within germinal centers [J]. PLoS One, 2017, 12(3):e174661.

郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 98-104.

Guo WW, Qiao TY, Zhang CQ, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 98-104.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 015

免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用

郭文文^{1,2}, 乔天运², 张彩勤², 赵菊梅^{1*}, 师长宏^{2*}

(1.延安大学医学院,陕西 延安 716000; 2.空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 人源化小鼠是指体内携带有人源细胞、组织或器官的小鼠模型,而通过将人免疫细胞移植入免疫缺陷小鼠后构建的模型,即为免疫系统人源化小鼠模型。它可有效重建人类免疫系统,更好地模拟人体的特征。该类模型的成功建立为研究免疫系统与肿瘤之间的相互作用提供了良好的实验工具。本文主要针对不同类型免疫系统人源化小鼠模型的构建、优缺点及其在肿瘤免疫治疗中的应用进行综述。

【关键词】 免疫系统;人源化小鼠;免疫缺陷;肿瘤;免疫治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0098-07

Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy

GUO Wenwen^{1,2}, QIAO Tianyun², ZHANG Caiqin², ZHAO Jumei^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China.

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 The term “humanized mouse” refers to the use of a mouse model with human cells, tissues, or organs. Transplantation of human immune cells into immunodeficient mice is an established humanized mouse model of the immune system that effectively simulates characteristics of the human immune system. Indeed, it provides an ideal experimental tool for studying interactions between the immune system and tumors. In this article, we review the construction method, advantages, and disadvantages of different types of humanized mouse models of the immune system, and further illustrate their applications for tumor immunotherapy.

【Keywords】 immune system; humanized mouse; immunodeficiency; tumor; immunotherapy

肿瘤免疫治疗是继手术、放疗、化疗与分子靶向治疗后,又一种新的能够改善肿瘤患者生存期的治疗方法。自 2011 年 FDA 批准首个免疫检查点抑制剂 ipilimumab 应用于黑色素瘤治疗后,免疫制剂

在临床上已用于非小细胞肺癌、肾癌、头颈鳞癌、霍奇金淋巴瘤、恶性黑色素瘤等的治疗,并显示出良好的应用前景^[1-3]。肿瘤免疫治疗的进一步研究需要建立人体肿瘤与人体免疫系统相互作用的动物

[基金项目] 国家自然科学基金(31772546)。

[作者简介] 郭文文(1993—),女,硕士生,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: 2399316897@qq.com

[通信作者] 师长宏,男,教授,博士生导师,研究方向:医学实验动物学。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: jnz2003.stu@163.com * 共同通信作者

模型。通常肿瘤模型是利用免疫缺陷动物移植入人体肿瘤细胞或组织,而该类动物由于缺乏完整的免疫系统,无法用于免疫治疗研究。人们尝试在免疫缺陷小鼠体内移植入人造血干细胞或功能性的淋巴细胞,使其具有人的免疫功能,这样的小鼠称为免疫系统人源化小鼠。该模型可模拟人体肿瘤细胞与免疫系统之间的相互作用,在肿瘤免疫治疗药物的研发与临床前评估方面具有重要的应用前景。本文重点综述免疫系统人源化小鼠模型的类型、构建方法以及在肿瘤免疫治疗中的应用。

1 免疫系统人源化小鼠模型的构建

重度联合免疫缺陷动物由于 T、B、NK 免疫细胞的缺乏,广泛应用于人源化小鼠模型的构建,常用品系主要有 NSG (NOD. Cg-Prkdcscid $Il-2rg^{tm1Wjl}/SzJ$)^[4]、NOG (NOD. Cg-Prkdcscid $Il-2rg^{tm1} Sug/JicTac$)^[5]、NRG (C. Cg-Rag1 $^{tm1Mom} Il-2rg^{tm1Wjl}/SzJ$)^[6]等。除此之外,用于人源化的 NSG-SGM3 (NOD.Cg-Prkdcscid $Il-2rg^{tm1Wjl} Tg$ (CMV $IL-3, CSF2, KITLG$) 1Eav/MloySzJ) 小鼠表达人 IL-3、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 和干细胞因子,允许人造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 的稳定植

Rag2 $^{-/-} IL2Rgc^{-/-}$) 小鼠可支持较高水平的髓细胞发育,促进人单核细胞、树突状细胞 (dendritic cell, DC) 和巨噬细胞的分化,并促进 NK 细胞的发育^[8]。由于上述动物体内仍然存在有少量鼠源性免疫细胞,通常在移植人源性细胞之前均需进行辐照,以达到清髓的效果^[9]。而 NBSGW (NOD, B6. SCID $Il2r\gamma^{-/-} Kit^{W41/W41}$) 小鼠由于携带 c-Kit 基因突变,可支持无辐照小鼠造血干细胞的移植^[9-10]。

依据人免疫系统重建的方法,将免疫系统人源化小鼠模型分为三大类: Hu-BLT (humanized-bone marrow, liver, thymus) 小鼠模型、Hu-HSCs (humanized-hematopoietic stem cells) 和 Hu-PBL (humanized-peripheral blood mononuclear cells) 小鼠模型(表 1)。

1.1 Hu-BLT 小鼠模型

该模型是将免疫缺陷小鼠经亚致死剂量辐照处理后,肾包膜下合并移植人胎胸腺和胎肝组织,同时再经尾静脉注射分离自同一个体的胎肝或骨髓来源的造血干细胞^[11]。Hu-BLT 小鼠体内能检测到完整的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、单核细胞、DC、巨噬细胞等多种人免疫细胞,并可产生人源性的适应性免疫应答,是人源免疫系统重建最完善的小鼠模型^[12]。经流式细胞术检测, Hu-BLT 模型中可表达稳定的人 CD45 $^{+}$ 细胞,其在外周血细胞的比例约

表 1 不同免疫系统人源化小鼠模型的特点
Table 1 Characteristics of humanized mouse models with different immune systems

模型 Models	构建方法 Construction methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
Hu-BLT	将人胎胸腺和胎肝共同移植于小鼠的肾包膜下,并将同一个体的胎肝或骨髓来源的造血干细胞注入小鼠体内	① 具有完整的免疫系统 ② T 细胞可以在人胸腺上皮内发育成熟	① 胚胎肝、胸腺来源受限 ② 可诱发 GVHD
	Co-transfection of human fetal thymus and fetal liver into the renal capsule of mice, associated with the injection of hematopoietic stem cells from fetal liver or bone marrow of the same individual into mice	① Complete immune system ② Capacity to promote the maturation of T cells in human thymic epithelium	① Limited source of fetal liver and thymus ② Induction of GVHD possibly
Hu-HSCs	注射来源于人的粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 动员的血液、骨髓、脐带血或胎儿肝等的 CD34 $^{+}$ HSC	多系造血细胞发育,包括 T 细胞、B 细胞、髓细胞及 NK 细胞	缺少供 T 细胞发育成熟的人胸腺, T 淋巴细胞少,且无功能
	Injection of CD34 $^{+}$ HSC derived from Human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) mobilized blood, bone marrow, umbilical cord blood or fetal liver	Multiple lines of hematopoietic cell development, including T, B, myeloid, and NK cells	Lacks of human thymus for promoting the maturation of T cells, and the presence of limited and nonfunctional T lymphocytes
Hu-PBL	注射成熟外周血单个核细胞	① 移植方法简单 ② T 细胞移植效率高且稳定	GVHD 反应,导致观察窗口期短,研究时间受限
	Injection of mature peripheral blood mononuclear cells	① Simple transplantation ② Efficient and stable transplantation of T cells	GVHD reaction, resulting in a shortened observation window period, and limited study time

为 30% ~ 80%。而 CD45⁺ 细胞比例超过 25% 标志着 Hu-BLT 模型构建成功^[13]。

该模型的重要特征是能产生人类粘膜免疫系统,因此可以应用于 HIV^[14]、EDV^[15] 等粘膜感染机制模型、造血系统及肿瘤免疫治疗的研究。但其供体样本难以获得,而且由于人胸腺组织中的 T 细胞对小鼠的主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 仍然有高的亲和力,因此 Hu-BLT 模型可能在植入 20 周后出现移植物抗宿主反应 (graft versus host disease, GVHD)。而有研究报道将 C57BL/6 小鼠的 Rag2、IL-2Yc 和 CD47 基因三重敲除后的 TKO-BLT 模型在植入人的免疫细胞后 45 周末发生 GVHD 迹象,且保持人免疫细胞的高度重建,显著优于现有的 BLT 模型^[16]。

1.2 Hu-HSCs 小鼠模型

Hu-HSCs 模型是将新生或成年免疫缺陷小鼠经亚致死剂量辐照处理后,破坏小鼠自体骨髓造血功能,再将新鲜的人 CD34⁺ HSC (可来源于人的 G-CSF 动员的血液、骨髓、脐带血或胎儿肝等) 在 24 h 内经尾静脉或者骨髓腔注射入免疫缺陷小鼠体内,使多系 Hu-HSC 发育成包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 和其他谱系阴性细胞在内的免疫细胞^[17]。通常在植入后第 4 周 hCD45⁺ T 细胞可达 25% ~ 60%,外周血中人 CD45⁺ T 细胞超过 25%,标志 Hu-HSC 模型构建成功^[18]。

该模型的优势在于其造血系统及免疫细胞是 HSC 在小鼠体内重新发育而来的,对小鼠宿主具有免疫耐受,通常不会发生 GVHD,模型稳定期可长达 10~12 周^[19],可应用于 HIV^[20]、EBV^[21] 等感染模型及造血系统发育的长期研究,在肿瘤免疫治疗研究中显示出巨大的应用前景。然而,在该模型中影响免疫细胞分化成熟的因素较多。如成年 NSG 小鼠体内植入 HSC 后,12 周才能够在外周血中检测出人 T 细胞,且 T 细胞的数量相对较少,活性不高^[22-24]。相反,将 HSC 植入新生 NSG 小鼠后,很容易产生人 T 细胞。另有研究证明,雌性 NSG 小鼠比雄性 NSG 小鼠更支持人 HSC 的植入^[25-26]。

1.3 Hu-PBL 小鼠模型

该模型是将免疫缺陷小鼠经亚致死剂量辐照处理后,将 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 个新鲜的人 PBMCs 经尾静脉或腹腔移植入小鼠体内,以实现血液和脾中 50% ~ 80% 的 CD45⁺ 细胞的植入,通常第一周就可

获得人 CD3⁺ T 细胞,第四周可检测到人 CD3⁺ CD45⁺ T 细胞超过 25%^[22, 27]。

Hu-PBL 小鼠是目前最简单、经济的人源化小鼠模型,以重建人的 T 细胞为主并保持其免疫功能。与 CD34⁺ HSC 衍生 T 细胞相比,当免疫缺陷小鼠移植 PBMC 时,人 T 细胞增殖速度更快,可重建更高水平的人 T 细胞,是研究成熟效应 T 细胞的理想模型^[22]。同时该模型中还可检测到少量的 B 细胞、髓系细胞或其他免疫细胞。但该模型存在的主要问题是,由于人 T 细胞和小鼠免疫细胞之间的 MHC 不匹配而出现的致死性 GVHD 反应^[28-29]。通常会在人 PBMC 注射后 4~6 周出现明显的 GVHD 症状,治疗观察窗口期短,使用受限^[8, 27]。但此实验窗口期可以通过改造 NSG (NDG、NPG 等) 小鼠,使其缺失 MHC-I 或 II 基因而得到延长^[30]。此外,降低 PBMCs 中 CD4⁺ T 细胞的比例也可显著减缓 GVHD 反应^[31]。然而,CD4⁺ T 辅助细胞亚群比例的降低会损害细胞免疫,这可能会降低该类小鼠模型的适用性。

2 Hu-PDX 模型

基于临床肿瘤标本建立的 PDX (patient-derived xenograft) 模型较好的保持了原发瘤的特征,但由于其缺乏人体免疫系统,无法针对特定患者的肿瘤细胞或组织开展免疫治疗研究。在免疫系统人源化小鼠体内移植入特定患者的肿瘤组织而建立的模型称为 Hu-PDX (humanized patient-derived xenograft) 模型,因其可模拟人体中肿瘤细胞与免疫系统之间的相互作用,在抗肿瘤免疫治疗研究方面具有重要的应用前景。

Hu-PDX 模型的构建与肿瘤移植的时间和人源化的方法密切相关。如 Hu-PBL 小鼠模型免疫重建维持时间较短,因此 Hu-PBL-PDX 模型的构建通常是先移植患者的肿瘤组织,待肿瘤体积达到约 120~180 mm³ 时,对小鼠进行亚致死性辐照后,再经尾静脉注射人 PBMC; Hu-HSC 小鼠模型由于 GVHD 反应较弱,免疫重建维持时间约为 10~12 周,所以 Hu-HSC-PDX 模型通常是先将人 CD34⁺ HSC 移植入经亚致死性辐照处理的免疫缺陷小鼠体内,当小鼠体内人 CD3⁺ CD45⁺ 比例超过 15% (通常为移植后 12 周),再移植入患者肿瘤组织^[22]。该模型构建成功的标志是在肿瘤组织中能够检测到人的免疫细胞和细胞因子等。

目前,Hu-PDX 模型已应用于多种类型的肿瘤研究中,如非小细胞肺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、三阴性乳腺癌、黑色素瘤等^[22, 31-34]。这些模型给肿瘤细胞提供与人体更相似的生长微环境,可以从组织病理学、基因表达、基因突变、炎症和治疗反应等方面真实准确的反映了临床肿瘤患者的表现,在肿瘤的发生、发展和转移机制研究等方面具有重要的应用价值,尤其在肿瘤免疫治疗研究方面,是理想的肿瘤模型。

3 人源化小鼠模型在肿瘤免疫治疗研究中的应用

肿瘤免疫治疗是通过激活机体抗肿瘤免疫反应或阻断肿瘤免疫逃逸,以控制和杀伤肿瘤。主要包括嵌合抗原受体 T 细胞(chimeric antigen receptor T cells,CAR-T)、免疫检查点抑制剂治疗以及与其他免疫疗法相结合的综合疗法等,而人源化小鼠模型是开展上述免疫治疗研究的理想的临床前模型。表 2 是目前已报道的部分人源化小鼠模型在不同类型肿瘤免疫治疗研究中的应用。

3.1 CAR-T 治疗中的应用

CAR-T 细胞免疫疗法原理在于经嵌合抗原受体修饰的 T 细胞,可以特异性地识别肿瘤相关抗原,使效应 T 细胞的靶向性和杀伤活性均较常规的免疫细胞高,从而发挥抗癌作用。目前 CAR-T 疗法临床上主要应用于 B 细胞淋巴瘤、白血病等血液系统恶性肿瘤的治疗^[35-36],而在实体肿瘤的治疗中应用较少。人源化小鼠模型目前已应用于各种 CAR 设计的抗肿瘤疗效评估。Abate-Daga 等^[37]利用胰腺癌 Hu-PBMC-PDX 模型,开发了一种针对前列腺干细胞抗原(PSCA)的 CAR,为将 PSCA 作为基于 CAR 的胰腺癌免疫治疗的靶抗原提供了证据;另有研究报道证明在卵巢癌 Hu-PBMC-PDX 模型上,CD27 能够共刺激 CAR-T 细胞以获得更高的持久性和抗肿瘤活性^[38]。显然,Hu-PDX 模型为评估 CAR-T 疗法在实体肿瘤中的有效性提供了新的方法。

3.2 肿瘤免疫检查点抑制剂研究中的应用

肿瘤细胞可以通过多种途径避免免疫系统的识别及杀伤。通过激活肿瘤微环境中特定的抑制性信号通路是肿瘤逃避免疫监视的途径之一,这些抑制信号被称为免疫检查点。目前发现的免疫检查点包括:细胞毒性 T 淋巴细胞抗原 4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4,CTLA-4)、程序性死

亡受体-1/程序性死亡受体-配体 1(programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1,PD-1/PD-L1)、T 细胞免疫球蛋白-3(T cell immunoglobulin-3,TIM-3)、T 细胞免疫球蛋白 ITIM 结构域(T cell immunoglobulin and ITIM domains,TIGIT)、淋巴细胞活化基因-3(lymphocyte activation gene-3,LAG-3)及唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素-15(sialic acid-binding Ig-like lectin-15,Siglec-15)等。其中 CTLA-4 与 PD-1/PD-L1 信号通路的研究获得了 2018 年诺贝尔生理学或医学奖。目前免疫检查点抑制剂的研究主要集中在临床研究,但由于缺乏大量的动物模型进行筛选和验证,所以相关结果并不理想。许多研究已证实人源化小鼠模型在免疫检查点抑制剂研究中的独特优势。例如,Kenneth 等^[39]应用 EBV 相关淋巴瘤的 Hu-PBL-SCID 小鼠模型来筛选一组抗人 CTLA-4 单克隆抗体(MAb),结果显示不同单抗在小鼠模型中活化人 T 细胞的效能具有显著的差异。Lin 等^[22]构建了 Hu-PBL-NSI 和 Hu-HSPCs-NSI(humanized-hematopoietic stem and progenitor cells-NSI)两种人源化小鼠的非小细胞肺癌 PDX 模型,并评估了针对 PD-L1/PD-1 免疫检查点靶向治疗的效果。研究发现与 Hu-HSPCs-NSI 小鼠相比,Hu-PBL-NSI 人源化小鼠模型在免疫靶向治疗中显示出更高的抗肿瘤效果。此外,Roberto 等^[33]成功构建了三阴性乳腺癌的 Hu-CD34-HSC-PDX 模型,并评估了抗 PD-1 抗体治疗的有效性。研究结果显示,抗 PD-1 抗体治疗可显著抑制肿瘤的生长并提高患者的生存率。

尽管部分人源化小鼠模型在免疫治疗中取得了成功,但在一项针对非小细胞肺癌 Hu-PDX 模型的研究中发现,不同来源的 CD34⁺HSPC 供体重建的人源化小鼠针对免疫检查点抑制剂治疗的反应不尽相同,这与临床上患者对抗 PD-1 治疗的不同反应率是一致的。并且在人源化小鼠模型中反应性的差异可能与供体的 T 细胞谱系有关^[18]。因此,人源化小鼠模型在肿瘤免疫治疗中的应用仍然需要进一步的改进。

3.3 免疫综合治疗中的应用

逆转 T 细胞抑制信号的药物(例如 PD-1/PD-L1 疗法)的成功应用使人们对癌症免疫疗法充满了信心,但单药治疗效果有限,联合免疫治疗可能具有良好的抗肿瘤效能。2019 年 3 月美国 FDA 批准了 PD-L1 抑制剂 Atezolizumab 联合依托泊苷、卡铂

表 2 人源化小鼠模型在肿瘤免疫治疗中的应用
Table 2 Application of humanized mouse models in tumor immunotherapy

癌症 Cancers	人免疫细胞/组织 Human immune cells/tissues	小鼠品系 Mouse strains	免疫治疗方法 Immunotherapeutic methods	引用文献 References
胰腺癌 Pancreatic cancer	PBMC	NSG	CAR-T	[37]
卵巢癌 Ovarian cancer	PBMC	—	CAR-T	[38]
淋巴瘤 Lymphoma	PBMC	NSG	免疫检查点抑制剂(抗 CTLA-4 抗体) Immune checkpoint inhibitor (anti-ctla-4 antibody)	[39]
肾细胞癌 Renal cell carcinoma	PBMC	NSG	CAR-T/PD-L1	[41]
间皮瘤 Mesothelioma	PBMC	NOD-SCID	CAR-T/PD-1	[42]
结肠癌/胃癌 Colon/gastric cancer	PBMC	NSG	hCD137/PD-1	[31]
非小细胞肺癌 Non-small cell lung cancer	PBMC/CD34 ⁺ HSC	NSI	免疫检查点抑制剂(抗 PD-1/PD-L1 抗体) Immune checkpoint inhibitor (anti-PD-1/PD-L1 antibody)	[22]
三阴性乳腺癌 Triple negative breast cancer	CD34 ⁺ HSC	NSG	免疫检查点抑制剂(抗 PD-1 抗体) Immune checkpoint inhibitor (anti-PD-1 antibody)	[33]
淋巴瘤 Lymphoma	CD34 ⁺ HSC	NSG	PD-1/CTLA-4	[43]

用于广泛期小细胞肺癌患者的一线治疗,这标志着免疫治疗进入联合治疗为主的 2.0 时代。人源化小鼠模型用于评价 CAR-T 细胞与抗体靶向免疫检查点抑制剂(如 PD-L1 和 CTLA-4)联合治疗的效果^[40]。Suarez 等^[41]在转移性透明细胞肾细胞癌的人源化小鼠模型中使用 CAR-T 细胞和免疫检查点抑制剂进行联合治疗。这些靶向人抗碳酸酐酶的 CAR-T 细胞还可分泌人抗 PD-L1 抗体,以克服 PD-1 和 PD-L1 相互作用介导的检查点抑制。与仅使用 CAR-T 细胞处理组相比,联合免疫检查点阻断方法可有效增强抗肿瘤效力。Leonid 等^[42]使用胸膜间皮瘤的原位小鼠模型研究 PD-1 介导的 T 细胞衰竭与间皮素靶向的 CAR-T 细胞之间的关系,研究结果显示通过阻断 PD-1/PD-L1 可以增强 CAR-T 细胞的疗效。另有研究报道,在 EBV 相关淋巴瘤的 Hu-HSC-NSG 模型中,PD-1 和 CTLA-4 阻断抗体的联合治疗可显著抑制 EBV 诱导的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的生长,并且两种抗体联合用药的抗肿瘤效果优于单药治疗^[43]。此外,在人结肠癌组织植入 Hu-PBL-BRG 小鼠模型中,利用抗人 CD137 和抗 PD-1 单抗联合作用具有显著抑制肿瘤生长的效果;研究者在利用人胃癌组织和自体 PBMC 构建的 Hu-PDX 模型中获得了相同的结果^[31]。

4 未来的发展趋势

在癌症免疫治疗的新时代,人源化小鼠模型是

评估新疗法、研究组合疗法以及指导个性化免疫治疗的有效工具。但该模型的构建目前仍存在诸多缺陷,如免疫细胞与移植瘤之间的组织相容性问题、小鼠残留的先天免疫系统影响人免疫细胞的植入、缺乏物种特异性的生长因子促进某些免疫亚群的成熟等,这些因素导致人源化小鼠模型不能完全满足肿瘤—免疫研究的需求。为此,正在研发的下一代人源化小鼠,包括 MHC 基因人源化的小鼠^[44]、抑制鼠源免疫细胞的人信号调节蛋白 α (signal regulatory protein alpha, SIRPα)转基因小鼠^[45-46]以及转入人源细胞因子如 IL-2、IL-3、GM-CSF、SCF 等的小鼠^[47-48],有望通过解决这些问题以实现更高水平及更全亚群的人免疫细胞的植入。

人源化小鼠模型在肿瘤免疫治疗研究中的进一步应用有望解决临床治疗中存在的问题。如寻找明确的生物标志物以解决临床反应率低的问题、探索肿瘤免疫治疗与传统治疗方法相结合的联合疗法以解决免疫相关不良反应问题等。总之,人源化小鼠模型的不断优化以及其在肿瘤免疫治疗领域应用的扩大,必将为癌症免疫学和个性化医学提供前所未有的研究平台。

参考文献:

[1] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Five-year survival and correlates among patients with advanced melanoma, renal cell carcinoma, or non-small cell lung cancer treated with nivolumab [J]. JAMA Oncol, 2019: e192187.

- [2] Szturz P, Vermorken JB. Immunotherapy in head and neck cancer; aiming at EXTREME precision [J]. BMC Med, 2017, 15(1): 110.
- [3] Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(2): 116-132.
- [4] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid *IL2Rγ^{null}* mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells [J]. J Immunol, 2005, 174 (10): 6477-6489.
- [5] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/ γ_c^{null} mouse; an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. Blood, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [6] Pearson T, Shultz LD, Miller D, et al. Non-obese diabetic-recombination activating gene - 1 (NOD-Rag1^{null}) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (*IL2rγ^{null}*) null mice; a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 154(2): 270-284.
- [7] Magnotti E, Marasco WA. The latest animal models of ovarian cancer for novel drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2018, 13(3): 249-257.
- [8] De La Rochere P, Guil-Luna S, Decaudin D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. Trends Immunol, 2018, 39(9): 748-763.
- [9] McIntosh BE, Brown ME. No irradiation required: The future of humanized immune system modeling in murine hosts [J]. Chimerism, 2015, 6(1-2): 40-45.
- [10] Theocharides AP, Rongvaux A, Fritsch K, et al. Humanized hemato-lymphoid system mice [J]. Haematologica, 2016, 101(1): 5-19.
- [11] Melkus MW, Estes JD, Padgett-Thomas A, et al. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1 [J]. Nat Med, 2006, 12(11): 1316-1322.
- [12] Wege AK, Melkus MW, Denton PW, et al. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 324: 149-165.
- [13] Smith DJ, Lin LJ, Moon H, et al. Propagating humanized BLT mice for the study of human immunology and immunotherapy [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(24): 1863-1873.
- [14] Mandal S, Kang G, Prathipati PK, et al. Long-acting parenteral combination antiretroviral loaded nano-drug delivery system to treat chronic HIV-1 infection: A humanized mouse model study [J]. Antiviral Res, 2018, 156(8): 85-91.
- [15] Bird BH, Spengler JR, Chakrabarti AK, et al. Humanized mouse model of ebola virus disease mimics the immune responses in human disease [J]. J Infect Dis, 2016, 213(5): 703-711.
- [16] Lavender KJ, Pace C, Sutter K, et al. An advanced BLT-humanized mouse model for extended HIV-1 cure studies [J]. AIDS, 2018, 32(1): 1-10.
- [17] Rongvaux A, Takizawa H, Strowig T, et al. Human hemato-lymphoid system mice; current use and future potential for medicine [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31(1): 635-674.
- [18] Meraz IM, Majidi M, Meng F, et al. An improved patient-derived xenograft humanized mouse model for evaluation of lung cancer immune responses [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(8): 1267-1279.
- [19] Kim SS, Kumar P, Ye C, et al. Humanized mice for studying human leukocyte integrins *in vivo* [J]. Methods Mol Biol, 2012, 757: 509-521.
- [20] Su H, Cheng Y, Sravanam S, et al. Immune activations and viral tissue compartmentalization during progressive HIV-1 infection of humanized mice [J]. Front Immunol, 2019, 10(2): 340.
- [21] Worni-Schudel IM, Clark AG, Chien T, et al. Recovery of a human natural antibody against the noncollagenous-1 domain of type IV collagen using humanized models [J]. J Transl Med, 2015, 13: 185.
- [22] Lin S, Huang G, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. MAbs, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [23] Liu G, Fan X, Cai Y, et al. Efficacy of dendritic cell-based immunotherapy produced from cord blood *in vitro* and in a humanized NSG mouse cancer model [J]. Immunotherapy, 2019, 11(7): 599-616.
- [24] Legrand N, Weijer K, Spits H. Experimental models to study development and function of the human immune system *in vivo* [J]. J Immunol, 2006, 176(4): 2053-2058.
- [25] McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains [J]. Blood, 2010, 116(2): 193-200.
- [26] Akiyama Y, Nonomura C, Ashizawa T, et al. The anti-tumor activity of the STAT3 inhibitor STX-0119 occurs via promotion of tumor-infiltrating lymphocyte accumulation in temozolomide-resistant glioblastoma cell line [J]. Immunol Lett, 2017, 190(10): 20-25.
- [27] Koo GC, Hasan A, O'Reilly RJ. Use of humanized severe combined immunodeficient mice for human vaccine development [J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(1): 113-120.
- [28] King MA, Covassin L, Brehm MA, et al. Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin - 2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex [J]. Clin Exp Immunol, 2009, 157(1): 104-118.
- [29] Nervi B, Rettig MP, Ritchey JK, et al. Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2m^{null} mice [J]. Exp Hematol, 2007, 35(12): 1823-1838.
- [30] Brehm MA, Kenney LL, Wiles MV, et al. Lack of acute xenogeneic graft- versus-host disease, but retention of T-cell function following engraftment of human peripheral blood mononuclear cells in NSG mice deficient in MHC class I and II expression [J]. FASEB J, 2019, 33(3): 3137-3151.
- [31] Sanmamed MF, Rodriguez I, Schalper KA, et al. Nivolumab and

- urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2^{-/-}IL2R γ ^{null} immunodeficient mice [J]. Cancer Res, 2015, 75(17): 3466–3478.
- [32] Zhao Y, Shuen TWHo, Toh TB, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy [J]. Gut, 2018, 67(10): 1845–1854.
- [33] Rosato RR, Dávila-González D, Choi DS, et al. Evaluation of anti-PD-1-based therapy against triple-negative breast cancer patient-derived xenograft tumors engrafted in humanized mouse models [J]. Breast Cancer Res, 2018, 20(1): 108.
- [34] Chang DK, Moniz RJ, Xu Z, et al. Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma *in vitro* and in a humanized mouse model *in vivo* [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 119.
- [35] Jacoby E, Shahani SA, Shah NN. Updates on CAR T-cell therapy in B-cell malignancies [J]. Immunol Rev, 2019, 290(1): 39–59.
- [36] Universal CAR T cells treat leukemia [J]. Cancer Discov, 2017, 7(4): 342.
- [37] Abate-Daga D, Lagisetty KH, Tran E, et al. A novel chimeric antigen receptor against prostate stem cell antigen mediates tumor destruction in a humanized mouse model of pancreatic cancer [J]. Hum Gene Ther, 2014, 25(12): 1003–1012.
- [38] Song DG, Powell DJ. Pro-survival signaling via CD27 costimulation drives effective CAR T-cell therapy [J]. Oncoimmunology, 2012, 1(4): 547–549.
- [39] May KF, Roychowdhury S, Bhatt D, et al. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies [J]. Blood, 2005, 105(3): 1114–1120.
- [40] Gay F, D'Agostino M, Giaccone L, et al. Immuno-oncologic approaches: CAR-T cells and checkpoint inhibitors [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2017, 17(8): 471–478.
- [41] Suarez ER, Chang DK, Sun J, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model [J]. Oncotarget, 2016, 7(23): 34341–34355.
- [42] Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR-T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition [J]. Clin Invest, 2016, 126(8): 3130–3144.
- [43] Ma SD, Xu X, Jones R, et al. PD-1/CTLA-4 blockade inhibits epstein-barr virus-induced lymphoma growth in a cord blood humanized-mouse model [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(5): e1005642.
- [44] Zeng Y, Liu B, Rubio MT, et al. Creation of an immunodeficient HLA-transgenic mouse (HUMAMICE) and functional validation of human immunity after transfer of HLA-matched human cells [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0173754.
- [45] Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4): 364–372.
- [46] Saito Y, Ellegast JM, Rafiei A, et al. Peripheral blood CD34 cells efficiently engraft human cytokine knock-in mice [J]. Blood, 2016, 128(14): 1829–1833.
- [47] Billerbeck E, Barry WT, Mu K, et al. Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor⁻, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor⁻, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ ^{null} humanized mice [J]. Blood, 2011, 117(11): 3076–3086.
- [48] Miller PH, Cheung AM, Beer PA, et al. Enhanced normal short-term human myelopoiesis in mice engineered to express human-specific myeloid growth factors [J]. Blood, 2013, 121(5): e1-e4.

[收稿日期]2019-08-25

叶永才,陈哲璇,李想,等. 环氧二十碳三烯酸通过线粒体途径保护缺血/再灌注损伤机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 105-110.

Ye YC, Chen ZX, Li X, et al. Advances in understanding the mechanism by which epoxyeicosatrienoic acids protect against ischemia/reperfusion injury through the mitochondrial pathway [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 105-110.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 016

环氧二十碳三烯酸通过线粒体途径保护缺血/再灌注损伤机制的研究进展

叶永才^{1,2}, 陈哲璇¹, 李 想², 谭伟江², 杨丰华^{2*}, 张良清^{1*}

(1.广东医科大学附属医院麻醉科,广东 湛江 524000; 2.广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室,广州 510633)

【摘要】 越来越多的证据表明环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)能够通过多种作用机制在组织器官缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤中发挥保护性作用,其中线粒体途径在这些作用机制中有着重要的地位。然而作为 I/R 损伤防治的重要靶点,线粒体途径在 EETs 介导的 I/R 损伤保护机制中却未得到很深入的探讨。本文就线粒体 K⁺通道、线粒体通透性转换孔、线粒体促凋亡蛋白以及线粒体结构完整性在 EETs 减轻 I/R 损伤中所起的作用作一综述,为以后更深层次的研究提供理论基础,同时这对于寻找 I/R 新的防治方式和靶点、保护重要组织器官、改善患者的病情及预后都有着重要意义。

【关键词】 环氧二十碳三烯酸;缺血/再灌注损伤;线粒体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0105-06

Advances in understanding the mechanism by which epoxyeicosatrienoic acids protect against ischemia/reperfusion injury through the mitochondrial pathway

YE Yongcai^{1, 2}, CHEN Zhexuan¹, LI Xiang², TAN Weijiang², YANG Fenghua^{2*}, ZHANG Liangqing^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, China.

2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute; Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangzhou 510633)

【Abstract】 Increasing evidence suggests that epoxyeicosatrienoic acids (EETs) play a protective role in tissue and organ ischemia/reperfusion (I/R) injury through a variety of mechanisms, and the mitochondrial pathway plays an important role in these mechanisms. However, as an important target for I/R injury prevention and treatment, the mitochondrial pathway has not been explored in depth for EET-mediated protective mechanisms in I/R injury. This review summarizes the role of mitochondrial K⁺ channels, mitochondrial permeability transition pores, mitochondrial proapoptotic proteins, and mitochondrial structural integrity in EET-mediated reductions of I/R injury, providing a theoretical basis for further research. This is of great significance for preventing and treating I/R injury of organs, and improving the prognosis

[基金项目] 国家自然科学基金(81470405);广东省实验动物重点实验室(2017B030314171);广东省科技专项(2017B020231001, 2017A020215076);广州市计划项目(201707010376)。

[作者简介] 叶永才(1993—),男,硕士研究生,研究方向:围手术期心血管保护。E-mail: 625142023 @ qq.com

[通信作者] 杨丰华(1970—),女,副研究员,研究方向:心血管生物学与心血管疾病动物模型的构建。E-mail: fenghua.yang@ gdlami.com

张良清(1970—),男,副教授,博士生导师,研究方向:围手术期器官保护。E-mail: zhanglq1970@ 163.com * 共同通信作者

of this disease.

【Keywords】 epoxyeicosatrienoic acids(EETs); ischemia/reperfusion(I/R) injury; mitochondria

缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是一种常见的病理过程,广泛发生于急性心肌梗死、急性肾衰竭、脑中风等缺血缺氧性疾病过程^[1]。I/R可引起组织器官的损伤和功能障碍,并带来严重的并发症,因而减轻 I/R 带来的损伤对患者病情的好转和康复至关重要。另外,随着近年来医疗水平的提高,器官移植手术日益增多,如何减少器官移植过程带来的 I/R 损伤也是亟待解决的问题。在组织器官 I/R 损伤中,线粒体因其在生成 ATP 以及在细胞凋亡中发挥关乎细胞存亡的关键作用而备受重视,许多促生存信号通路作用于线粒体这个终效应器来维持细胞膜的完整性并阻止细胞死亡^[2],因此,如何维持线粒体结构和功能成为减轻 I/R 损伤策略的关键点。

近年的研究结果表明环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)是一种适合治疗组织器官 I/R 损伤的成分。EETs 是一类生物活性很强的脂质环氧化物,已有许多研究证明 EETs 与心、脑、肾等重要器官的 I/R 过程密切相关,其中抗炎、抗凋亡等作用机制在 EETs 的 I/R 保护作用中发挥至关重要的作用,这与 EETs 介导的抗凋亡机制密切相关,同时线粒体途径也是组织器官 I/R 损伤防治的重要靶标,因此线粒体途径在 EETs 介导的 I/R 损伤保护作用中具有重要地位。然而作为 I/R 损伤防治的重要靶点,线粒体途径在 EETs 介导的 I/R 损伤保护作用中却未得到很深入的探讨,并且分子机制仍未完全阐明。本文就线粒体途径在 EETs 保护 I/R 损伤中的作用进行总结,并指出潜在的研究方向。

1 EETs 的生物学功能

花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是一种广泛存在于人体内的多元不饱和脂肪酸,在体内的代谢途径主要有 3 种,即环氧化酶途径(cyclooxygenase pathway, COX)、脂氧合酶途径(lipoxygenase pathways, LOX)和细胞色素 P450 途径(cytochrome P450, CYP)。其中 AA 经 CYP 途径代谢后会产生 EETs,主要包括 5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET 和 14,15-EET 四种区域异构体^[7]。体内的 EETs 可被可溶性环氧化物水解酶(soluble epoxide hydrolase, sEH)快速代谢成生物活性低的二羟基二十碳三烯

酸(dihydroxyeico satetraenoic acids, DHETs),其许多潜在有益作用也随着被转化为 DHETs 而减弱。研究发现 EETs 具有扩血管、抗炎、促纤溶、调节血管生长等多种生物学功能。同时, EETs 作为许多组织信号通路的重要组成部分能增加细胞内促生存和抗凋亡信号通路的表达^[8-9]。另外研究还发现抑制 sEH 的表达能减少内源性 EETs 的降解,在 I/R 损伤中起到保护作用^[3-5],因此提高体内 EETs 的有效浓度成为研究 EETs 生物学作用及机制的研究方法。

2 组织器官缺血/再灌注损伤

组织器官缺血后重新得到血液再灌注在多数情况下可使组织器官功能得到恢复,但有时缺血后的再灌注反而加重组织器官的功能障碍和结构损伤,这种在缺血基础上恢复血流后组织进一步的损伤,甚至不可逆性的现象称为缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[10]。组织器官 I/R 引起的缺氧会影响细胞 ATP 的产生,而 ATP 作为保证细胞各项生命活动的能量供应者,它的消耗会引发诸如膜离子泵衰竭、细胞钾外流、细胞内和线粒体钙超载等缺血性级联反应^[11]。另外组织器官 I/R 还会引起活性氧的产生、炎症细胞的聚集、内质网应激和缺血后毛细血管无复流的发生。这些病理过程的发生最终会导致线粒体 K⁺通道受损、线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放以及线粒体结构异常^[12],最终导致细胞裂解和死亡。

3 EETs 防治缺血/再灌注损伤的重要靶标:线粒体

EETs 作为许多组织信号通路的重要组成部分能增加细胞内促生存和抗凋亡信号通路的表达^[8-9],能有效减轻组织器官的 I/R 损伤,其中线粒体是 EETs 防治 I/R 损伤的重要靶点。线粒体是具有双膜结构的广泛分布于细胞内的细胞器,它的主要作用是通过线粒体电子传递链经氧化磷酸化以 ATP 的形式产生细胞能量,在细胞能量稳态中发挥关键作用。除能量产生外,线粒体也是活性氧的主要来源^[13],同时还涉及细胞凋亡、自噬和坏死性细胞凋亡等细胞死亡的调节^[14],是细胞存活和死亡的

关键。

组织器官 I/R 时会导致线粒体活性氧的大量产生,过量的活性氧直接导致线粒体呼吸链和代谢酶的氧化损伤^[15],同时也会破坏线粒体膜结构并增加 mPTP 开放^[16]。线粒体通透性的增加则会使促凋亡因子向细胞质的释放增多^[17],最终导致细胞凋亡并加剧各种组织器官中 I/R 诱导的损伤,因此线粒体功能障碍被认为是导致组织器官 I/R 损伤的标志之一。研究表明 EETs 能有效通过抗炎与抗凋亡等作用机制减轻组织器官的 I/R 损伤^[3-6],其中线粒体途径在这些机制中起着至关重要的作用^[2],这提示 EETs 能通过保护线粒体减少组织器官的 I/R 损伤。然而线粒体尽管在 EETs 介导的 I/R 保护作用中的占有重要地位,但相关保护作用中却未得到很深入的探讨,并且分子机制仍未完全阐明,这值得我们进行深入研究。

4 EETs 保护线粒体免受缺血/再灌注损伤的作用机制

研究表明 EETs 和 sEH 抑制剂能有效减轻组织器官 I/R 损伤引起的线粒体功能障碍。目前人们认为 EETs 主要通过以下几个途径来保护线粒体免受 I/R 损伤(详见表 1):①EETs 激活线粒体 K^+ 通道;②EETs 限制 mPTP 开放;③EETs 减少线粒体促凋亡蛋白的激活;④EETs 维持线粒体结构的完整性。

4.1 EETs 与线粒体 K^+ 通道

EETs 能够作用于包括线粒体 ATP 敏感性钾(mitochondrial ATP-sensitive K^+ , mito-KATP)通道和线粒体 Ca^{2+} 激活的 K^+ (mitochondrial calcium-activated potassium, mito-KCa)通道在内的线粒体 K^+ 通道来减轻组织器官的 I/R 损伤。mito-KATP 位于线粒体内膜上,由内向整流钾通道和 ATP 结合蛋白两部分组成,其主要功能是将 K^+ 转运至线粒体基质内调节线粒体内 K^+ 的浓度从而影响线粒体能量代谢,同时还参与线粒体的氧化磷酸化过程进而维持线粒体跨膜电位的稳定性^[18]。研究表明 mito-KATP 的激活能减少线粒体内膜的部分去极化、线粒体钙超载以及活性氧的产生,从而赋予缺血后组织器官保护作用^[19]。而 EETs 被证明能激活 mito-KATP 通道,如在 CYP 过表达即内源性增高 EETs 浓度的小鼠中,赋予的心脏保护作用涉及 mito-KATP 通道的激活^[20]。同时用外源性 EETs 处理野生型小鼠心肌细胞也能通过增加线粒体的氧化还原状态,表明 EETs 能激活 mito-KATP 通道^[20]。在

进一步的 EETs 调控 mit-KATP 机制研究中, Katragadda D 等^[21]用 mito-KATP 的抑制剂 5-HD 进行实验发现 EETs 通过减少线粒体应激而起作用,相关的研究也表明磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)信号通路参与了 EETs 激活 mito-KATP 通道的过程^[22],但此调控通路可能不是唯一通路, Sreedhar B^[23]等发现即使 PI3K 被抑制 EETs 也能刺激 mito-KATP 通道的激活,并且在 mito-KATP 通道阻滞剂作用下也会发生 PI3K-Akt 的激活,提示在 EETs 调控 mito-KATP 通道的保护作用中有更加复杂的信号调控机制,有待进一步的研究探讨。

mito-KCa 通道也是线粒体 K^+ 离子通道的一种, mito-KCa 通道可以通过细胞内 Ca^{2+} 的升高和膜去极化被激活,进而促进细胞线粒体 K^+ 的摄取,减少 Ca^{2+} 流入引起的线粒体 Ca^{2+} 超载,提示 mito-KCa 通道的激活在组织 I/R 损伤中具有保护作用^[24]。进一步的研究表明天然缺失 mito-KCa 通道使得组织更容易受到 I/R 损伤^[25]。EETs 被证明能激活 mito-KCa 通道,如 Katragadda D 等^[21]用 mito-KCa 通道抑制剂 PAX 处理心肌组织,结果发现它消除了 EETs 对缺血组织的保护作用,但 EETs 通过什么途径作用于 mito-KCa 通道并不清楚。有证据表明 PKA 或 PKC 在涉及 K^+ 通道的 I/R 损伤保护途径中起重要作用^[26],那么 PKA 或 PKC 通路很可能是 EETs 激活 mito-KCa 的一种机制,这需要进行进一步的实验来确定 EETs 介导的 I/R 损伤保护作用是否涉及 PKA 或 PKC 向线粒体的早期激活或共定位。

4.2 EETs 与线粒体通透性转换孔

mPTP 是线粒体内膜上的蛋白质复合物,由 ATP 合酶的二聚体构成,是细胞死亡的关键效应器,在正常生理条件下 mPTP 保持闭合,它的开放受基质亲环蛋白 D(cyclophilin D, CyPD)的调节^[27]。组织器官 I/R 时,由于细胞缺乏氧供,线粒体代谢功能会受到抑制进而引起线粒体 Ca^{2+} 超载、氧化应激、腺嘌呤核苷酸消耗和线粒体去极化等不良反应,在这些不良反应作用下 mPTP 持续开放。mPTP 的开放会允许 $> 1.5 \times 10^3$ 的分子自由通过,这引发细胞渗透压的变化和氧化磷酸化的解偶联,最终导致细胞死亡^[28]。EETs 被证明能抑制 mPTP 的开放从而减轻组织器官 I/R 损伤,如 Katragadda D 等^[21]发现 EETs 能减少由氧化应激引起的 H9C2 心脏细胞线粒体内膜电位(mitochondrial membrane potential,

$\Delta\Psi_m$) 的损失和 mPTP 的开放,同时也指出 EETs 介导的保护作用可能通过限制 $\Delta\Psi_m$ 的损失减缓 mPTP 的开放,并有研究指出 EETs 可能通过 PI3K-AKT 信号通路来影响 $\Delta\Psi_m$ 以达到限制 mPTP 的开放^[29]。进一步的 mPTP 开放的机制研究表明,AMP 依赖的蛋白激酶 (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 的内在激活对于防止在再灌注期间过量的线粒体活性氧产生和随后的 JNK 信号传导至关重要,能够限制 mPTP 的开放进而减轻不可逆的线粒体损伤^[30]。由于 EETs 能通过激活 AMPK 和增强 Akt 的核转位来减轻心脏肥大^[31],提示我们 EETs 很可能通过激活 AMPK 信号通路进而限制 mPTP 的开放,从而减轻组织器官的 I/R 损伤。

随着近年来高通量细胞实时成像技术的发展,研究者可以更好的对一些细胞亚结构进行观察。最近一项研究通过同时对 500 至 1000 个单独的线粒体进行实时成像,发现 mPTP 的激活机制涉及瞬时低电导开口,被称为 MitoWinks^[32]。这种 MitoWinks 能通过重置单个线粒体以限制线粒体基质钙超载,进而以较小的能量成本来促进线粒体和细胞存活^[32],但 EETs 是否会引起 MitoWinks 还有待研究,这可能是未来研究 EETs 通过线粒体途径保护组织器官 I/R 机制的一个新焦点。

4.3 EETs 与线粒体促凋亡蛋白

细胞凋亡的内在途径即线粒体相关途径在组织器官 I/R 损伤过程中发挥重要的作用,其中线粒体外膜上的促凋亡蛋白扮演着重要的角色。研究发现用 EETs 预处理缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 细胞以及利用具有 EETs 模拟特性和 sEH 抑制特性的新型双功能化合物 UA-8 处理小鼠离体心脏都能够减弱细胞的凋亡^[33-34]。有趣

的是有报道指出 EETs 可以激活 PI3K/Akt 信号通路并防止肺动脉内皮细胞凋亡^[35],提示 EETs 在组织器官 I/R 中可能是通过 PI3K/Akt 信号通路调节线粒体相关途径发挥抗凋亡作用,这在 Wenshu C 等^[36]的研究中得到证实。他们通过肺组织 I/R 模型,发现肺组织缺血会导致线粒体功能障碍和 NADPH 氧化酶的激活,导致活性氧过量产生进而调节 Bcl-2 家族蛋白的表达和激活 Caspase-3 来触发细胞凋亡过程。同时 I/R 诱导的这些有害作用会通过 CYP 过表达或外源性增加 EETs 处理而减弱,并且 CYP 和 EETs 的保护作用会被被 PI3K-Akt 抑制剂 LY294002 阻断,表明 EETs 的保护作用至少部分通过 PI3K-Akt 途径调节位于线粒体外膜的 Bcl-2 家族蛋白的表达进而在组织 I/R 损伤中发挥抗凋亡作用^[36]。但是细胞凋亡涉及非常复杂的信号传导通路,提示我们可以关注其它相关信号通路,例如最近有研究发现 EETs 可以通过靶向 JNK/c-Jun 信号通路抑制氧葡萄糖剥夺对脑微血管平滑肌细胞凋亡的作用^[37],那么 EETs 是否也通过 JNK/c-Jun 信号通路调节线粒体途径发挥组织 I/R 损伤的保护作用,这可能也是未来研究的一个方向。

4.4 EETs 与线粒体结构完整性

线粒体的结构由外至内可划分为线粒体外膜、线粒体膜间隙、线粒体内膜和线粒体基质四个功能区。其中线粒体内膜向内皱褶形成线粒体嵴,是许多生化反应的重要场所。线粒体的结构完整性一旦受到破坏就会引起线粒体功能的障碍。研究发现 EETs 能够保护线粒体结构的完整性维持线粒体的正常功能。El-Sikhry 等^[38]在 HL-1 心肌细胞饥饿模型中,通过评估 ADP/ATP 比率和氧化呼吸能力发现,EETs 在心肌细胞饥饿胁迫期间能增加 OPA-1 寡聚体水平和线粒体嵴密度,保留线粒体功能,延

表 1 EETs 保护线粒体免受 I/R 损伤的途径及作用机制			
Table 1 Pathways and mechanisms of action of EETs to protect mitochondria from I/R injury			
EETs 介导的线粒体途径类型	EETs 的作用	作用机制	参考文献
Types of EET-mediated mitochondrial pathways	Role of EETs	Mechanisms	References
线粒体 K ⁺ 通道 Mitochondrial K ⁺ channel	激活 mito-KATP 和 mito-KCa Activate mito-KATP and mito-KCa	PI3k-Akt	[22]
		ROS	[20]
		PKA/PKC	[26]
线粒体通透性转换孔 Mitochondrial permeability transition pore	限制 $\Delta\Psi_m$ 的损失进而减少 mPTP 的开放 Limiting the loss of $\Delta\Psi_m$ and thus reducing the opening of mPTP	PI3k-Akt	[29]
		AMPK	[30]
		ROS	[21]
线粒体促凋亡蛋白 Mitochondrial pro-apoptotic protein	减少 Caspase-3 促凋亡蛋白的激活 Reduces the activation of Caspase-3 pro-apoptotic protein	PI3k-Akt	[36]
		JNK/c-Jun	[37]
线粒体结构完整性 Mitochondrial structural integrity	增加 OPA-1 寡聚体水平和线粒体嵴密度 Increase OPA-1 oligomer level and mitochondrial density	Cav-1	[38, 40]

长细胞对饥饿应激的应答的存活期,揭示了 EETs 在调节线粒体中的新作用。Akhnoh 等^[39]利用 sEH 敲除鼠和对应的野生型小鼠进行心梗造模,并用 sEH 抑制剂 tAUCB 治疗,结果发现 tAUCB 治疗或 sEH 缺乏可以通过减少 EETs 的降解显著减轻线粒体结构损伤从而改善心肌梗死后的收缩和舒张功能,同时还发现抑制 sEH 会使线粒体酶活性显著改善,进而说明 EETs 可以保留缺血性损伤后的线粒体功能。然而 EETs 如何将保护信号传达到线粒体并保持其结构的完整性并未探索明白。有研究认为小窝蛋白 1 (Caveolin-1, Cav-1) 可能起到一个信号传达的作用, Chaudhary 等^[40]从 I/R 的野生型小鼠心脏中分离出心肌细胞的质膜和线粒体,结果显示其中 Cav-1 缺失以及细胞膜穴样内陷的缺乏,而从 EETs 处理后的心脏中分离的质膜和线粒体则存在 Cav-1 和细胞膜穴样内陷,提示 Cav-1 信号传导可能是 EETs 介导保护信号到线粒体从而引起保护效应的一个新机制,但还需更多的研究加以证明。

5 小结与展望

综上所述, EETs 能通过调节线粒体 K^+ 通道、mPTP、线粒体促凋亡蛋白以及线粒体结构的完整性在组织器官 I/R 损伤中发挥重要的保护作用。作为组织器官 I/R 损伤防治的重要靶点,线粒体结构和功能稳定性的维持一直是研究的重点。而 EETs 作为一种能保护组织器官 I/R 损伤的脂质环氧化物,其对线粒体的作用机制尽管部分已经得到阐述,但仍然还有很多未知的机制存在,这就需要我们接下来深入去探索。全面深入了解 EETs 作用于线粒体的机制对于寻找新的防治方式,发现新的治疗靶点来保护组织器官 I/R 损伤有着重要的意义。

参考文献:

- [1] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion from mechanism to translation [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [2] Yang JL, Mukda S, Chen SD. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke [J]. Redox Biol, 2018, 16: 263-275.
- [3] Tu R, Armstrong J, Lee K, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition decreases reperfusion injury after focal cerebral ischemia [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5279.
- [4] Islam O, Patil P, Goswami SK, et al. Inhibitors of soluble epoxide hydrolase minimize ischemia-reperfusion induced cardiac damage in normal, hypertensive, and diabetic rats [J]. Cardiovascular Ther, 2017, 35(3): .

- [5] Liu LP, Li B, Shuai TK, et al. Deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates mice Hyperoxic acute lung injury [J]. BMC Anesthesiol, 2018, 18(1): 48.
- [6] Zhu Y, Blum M, Hoff U, et al. Renal ischemia/reperfusion injury in soluble epoxide hydrolase-deficient mice [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0145645.
- [7] Aliwarga T, Evangelista EA, Sotoodehnia N, et al. Regulation of CYP2J2 and EET levels in cardiac disease and diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): E1916.
- [8] Campbell WB, Imig JD, Schmitz JM, et al. Orally active epoxyeicosatrienoic acid analogs [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 70(4): 211.
- [9] Inceoglu B, Bettaieb A, Haj FG, et al. Modulation of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress are key mechanisms for the wide-ranging actions of epoxy fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2017, 133: 68-78.
- [10] Chouchani ET, Pell VR, James AM, et al. A Unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury [J]. Cell Metab, 2016, 23(2): 254-263.
- [11] Dharmasaroja PA. Fluid intake related to brain edema in acute middle cerebral artery infarction [J]. Translstroke Res, 2016, 7(1): 49-53.
- [12] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/Reperfusion [J]. ComprPhysiol, 2016, 7(1): 113-170.
- [13] Boengler K, Kosiol M, Mayr M, et al. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017, 8(3): 349-369.
- [14] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 99-163.
- [15] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. Physiol Rev, 2014, 94(3): 909-950.
- [16] Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman N, et al. SPG7 is an essential and conserved component of the mitochondrial permeability transition pore [J]. Front Physiol, 2015, 60(1): 47-62.
- [17] Zhou H, Hu S, Jin Q, et al. Mit-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(3): e005328.
- [18] Mironova GD, Negoda AE, Marinov BS, et al. Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K^+ channel (mitoKATP) and its inward rectifier subunit (mitoKIR) [J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32562-32568.
- [19] Brian OR. Evidence for mitochondrial K^+ channels and their role in cardioprotection [J]. Circ Res, 2004, 94(4): 420-432.
- [20] John S, Baichun Y, J Alyce B, et al. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves

- mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and p42/p44 MAPK pathway [J]. *Circ Res*, 2004, 95(5): 506–514.
- [21] Katragadda D, Batchu SN, Cho WJ, et al. Epoxyeicosatrienoic acids limit damage to mitochondrial function following stress in cardiac cells [J]. *J Mol CellCardiol*, 2009, 46(6): 867–875.
- [22] You-Yang Q, Mei-Yan Y, Yu L, et al. The protective effect of epoxyeicosatrienoic acids on cerebral ischemia/reperfusion injury is associated with PI3K/Akt pathway and ATP-sensitive potassium channels [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(1): 1–14.
- [23] Sreedhar B, Rong Z, Dexter E J, et al. Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid; dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels [J]. *J Mol CellCardiol*, 2009, 46(6): 978–988.
- [24] Balderas E, Zhang J, Stefani E, et al. Mitochondrial BKCa channel [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 104.
- [25] Frankenreiter S, Bednarczyk P, Kniess A, et al. cGMP-elevating compounds and ischemic conditioning provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury via cardiomyocyte-specific BK channels [J]. *Circulation*, 2017, 136(24): 2337–2355.
- [26] Sato T, Saito T, Saegusa N, et al. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^+ channels in cardiac myocytes a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A [J]. *Circulation*, 2005, 111(2): 198–203.
- [27] Valentina G, Sophia VS, Manuela A, et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore [J]. *Proc Nati Acad Sci U S A*, 2013, 110(15): 5887–5892.
- [28] S-B O, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, et al. Role of the MPTP in conditioning the heart translatability and mechanism [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(8): 2074–2084.
- [29] Sreedhar B, Rong Z, Dexter EJ, et al. Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid; Dual targeting of cardiovascular PI3K and K channels [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(6): 978–988.
- [30] Zaha VG, Qi D, Su KN, et al. AMPK is critical for mitochondrial function during reperfusion after myocardial ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 104–113.
- [31] Wang B, Zeng HS, Wen Z, et al. CYP2J2 and its metabolites (EETs) attenuate cardiac hypertrophy by activating AMPK α 2 and enhancing nuclear translocation of Akt1 [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(5): 940–952.
- [32] Lu X, Kwong J, Molkenin JD, et al. Individual cardiac mitochondria undergo rare transient permeability transition pore openings [J]. *Circ Res*, 2015, 118(5): 834–841.
- [33] Dhanasekaran A, Gruenloh SK, Buonaccorsi JN, et al. Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): H724–H735.
- [34] Batchu SN, Lee SB, Qadhi RS, et al. Cardioprotective effect of a dual acting epoxyeicosatrienoic acid analogue towards ischaemia reperfusion injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(4): 897–907.
- [35] Feng W, Xu X, Zhao G, et al. EETs and CYP2J2 inhibit TNF- α -induced apoptosis in pulmonary artery endothelial cells and TGF- β 1-induced migration in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(3): 685–693.
- [36] Chen W, Zheng G, Yang S, et al. CYP2J2 and EETs protect against oxidative stress and apoptosis *in vivo* and *in vitro* following lung ischemia/reperfusion [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1663–1680.
- [37] Qu Y, Liu Y, Zhu Y, et al. Epoxyeicosatrienoic acid inhibits the apoptosis of cerebral microvascular smooth muscle cells by oxygen glucose deprivation via targeting the JNK/c-jun and mTOR signaling pathways [J]. *Molecules*, 2017, 40(11): 837–846.
- [38] El-Sikhry HE, Alsaleh N, Dakarapu R, et al. Novel roles of epoxyeicosanoids in regulating cardiac mitochondria [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160380.
- [39] Akhnokh MK, Yang FH, Samokhvalov V, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits mitochondrial damage and preserves function following ischemic injury [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7(242): 133.
- [40] Chaudhary KR, Cho WJ, Yang F, et al. Effect of ischemia reperfusion injury and epoxyeicosatrienoic acids on caveolin expression in mouse myocardium [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61(3): 258–263.

[收稿日期]2019-01-30

张元慧,蒋建东,孔维佳. 非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 111-115.
Zhang YH, Jiang JD, Kong WJ. Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 111-115.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 017

非啮齿类动物在生殖毒性试验中的应用进展

张元慧¹, 蒋建东², 孔维佳^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

【摘要】 随着社会的发展,人类可接触的化学物质不断增多,导致生殖功能受损、生育能力下降等问题愈发严重,因此生殖毒性研究已经变得越来越重要。在进行临床前生殖毒性试验时,选择合适的动物模型非常关键,非啮齿类动物与啮齿类动物相比,生殖系统与人类更为接近,实验结果更具有参考价值。本文对非啮齿类动物的自身特点及其目前在生殖毒性研究中的应用情况进行总结,以期扩大试验中动物模型的选择范围,为受试物临床前安全性评价提供新的研究方法。

【关键词】 非啮齿类动物;生殖毒性试验;研究现状
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 11-0111-05

Research progress with non-rodent species in reproductive toxicity studies

ZHANG Yuanhui¹, JIANG Jiandong², KONG Weijia^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China. 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)

【Abstract】 With the observed decline in human fertility, reproductive toxicity research has become increasingly important. It is crucial to select appropriate animal models for evaluating the toxicity of compounds of interest. Because of similarities in their reproductive system, non-rodent animals are valuable models for researching reproductive health and disorders. In this review, we summarized the characteristics of non-rodent animal models and their current applications in reproductive toxicity studies. The aim of this study was to expand the range of animal models available for selection and to provide new approaches for nonclinical reproductive toxicity studies.

【Keywords】 non-rodent; reproductive toxicity study; research status

随着医疗水平的提高,新生儿畸形现象正在逐渐减少,然而不孕不育症却愈发严重,据最新文献报道,全球范围内大概有 20% 的人患有不孕不育症^[1],这引起了人们对生殖毒性研究的重视。生殖毒性是指外源因素(如药品、食品添加剂、环境污染

物、辐射)对亲代生殖功能和子代生长发育所产生的有害作用^[2],该研究是安全性评价的重要内容。在进行生殖毒性试验时,实验动物的选择对于研究具有重要意义,一般会采用两类动物进行实验,即啮齿类动物和非啮齿类动物。非啮齿类动物通常

【作者简介】张元慧(1993—),女,在读博士生,研究方向:代谢性疾病分子药理学。E-mail: 369098717@qq.com
【通信作者】孔维佳(1972—),男,博士生导师,研究方向:分子医学与药物研究。E-mail: wjkong894@163.com

会选择家兔,在一些特殊条件下也会选择其他动物进行实验,如犬、小型猪或非人灵长类动物。生殖毒性研究主要根据受试物的药代动力学特点、药理学和毒理学信息进行判断,通常选择对受试物的体内代谢过程以及毒效学参数与人体相似的实验动物^[3]。目前,对于非啮齿类动物在生殖毒性研究中的应用资料较少。因此,本文根据不同实验动物的自身特点,对各种非啮齿类实验动物模型在生殖毒性研究中的现状进行总结,旨在为科研工作者选择合适的动物模型提供一些参考。

1 家兔

家兔作为生殖毒性研究的动物模型具有很多优点:无发情期,一年四季均可交配繁殖;妊娠期较短,一般为 30~33 d;繁殖能力强,每胎产仔数 7~12 只^[4]。家兔属于刺激性排卵动物,经过交配的刺激后可进行排卵。其胎盘是血窦内皮型,与人类的血窦绒毛型胎盘较为相似。生殖道与人类最接近,适用于评价避孕药和局部用的药物(如凝胶剂、阴道环等)^[5]。

在对新型左炔诺孕酮和炔雌醇复方避孕贴剂进行安全性评价时,研究人员选用了新西兰家兔进行实验,多次给予此避孕贴后家兔的体内并未发生药物蓄积^[6]。Susheela 等人^[7]在研究饮用水中超标氟化物对生殖功能的影响时,发现氟化处理可导致家兔精小管退化、抑制精子生成,这与氟化物对人体产生的影响一致。另有研究发现,在停药期间给予家兔维生素 D 和 E 可以修复氟化物引起的生殖功能损伤^[8],这为超标氟化物引起的不孕不育症提供了新的治疗手段。

家兔由于具有上述优点,在生殖毒性试验中应用最多,积累了丰富的基础数据。但家兔是食草动物,对能够引起消化道功能紊乱的化学物质以及抗生素类药物较敏感,临床表现难以解释,因此不适合评价此类物质。

2 犬

犬无需借助电刺激等痛苦的采精技术即可获得精子,因此常用于精子数量、成熟度和活力测定的分析研究^[9]。目前国际公认的标准实验用犬为比格犬,其具有体型小,性情温顺,便于实验操作的优点^[10]。同时,其生理生化指标稳定,实验结果的重复性好,遗传学资料丰富^[11]。另外,比格犬易于

驯化,能够采用注射等在其他实验动物不宜操作的给药方式^[12]。

羟胺基组蛋白去乙酰化酶抑制剂 HZ1006 是一种有临床应用前景的抗癌药物,研究者选择了比格犬作为该药物临床前毒性评价的动物模型,实验表明男性生殖道、消化道、呼吸道和血液系统可能是 HZ1006 的毒性靶点,提示该药物可能存在一定的生殖毒性^[13]。另有研究者发现犬对谷物中广泛存在的玉米赤霉烯酮的毒性作用敏感,幼龄雌犬接触低剂量玉米赤霉烯酮可引起子宫和卵巢功能异常,类固醇激素发生变化,生育能力下降^[14]。

但是,犬是季节性繁殖动物,只在春秋季节发情,产仔数量变动较大,每胎 2~10 只不等,并且存在近亲繁殖因素的影响,这些特点均限制了犬在生殖毒性试验中的应用。已有文献表明犬对抗高血压药物、拟交感神经药物和非甾体抗炎药物的反应与人体存在较大差异^[15],因此不适用于此类药物的安全性评价。

3 小型猪

小型猪在生理学和解剖学等方面与人类有很多相似性,具有胎仔数量多、性成熟时间短等优点。动情周期、子宫组织学和精子学资料与人类非常接近^[16]。有证据表明^[17],小型猪对很多人类致畸物质敏感,如乙醇、羟基脲、维甲酸、沙利度胺、氨基蝶呤等。相对于其他实验动物,小型猪对这些化合物的反应性可能更具有参考价值。

在进行维甲酸的致畸作用研究时,研究人员选用了哥廷根小型猪进行实验,证实了维甲酸的致畸作用非常明显^[18],该研究结果显示,随着给药剂量的增加,胎仔畸形发生率不断上升,畸形程度也越来越严重,且畸形表现与人类的视黄酸肝病(小颌、小耳、腭裂、心脏和胸腺的缺陷、中枢神经系统异常)极为相似。另外,Hayama 等^[19]发现在器官形成期给予孕猪乙嘧啶可导致上腭裂等结构性缺陷,也可引起后肢瘫痪等功能性缺陷。美国食品药品监督管理局在 2013 年批准上市的新药阿法替尼^[15](主要用于治疗晚期非小细胞肺癌和晚期乳腺癌),在其临床前安全性评价中,由于犬发生严重的胃肠道反应,研究人员选用了哥廷根小型猪进行安全性评价,表明小型猪在新药临床前研究中具有良好的应用前景^[20]。

目前,小型猪在生殖毒性评价方面的应用还存

在一些局限性。首先,小型猪的体型较大,导致实验人员的操作难度增加,操作过程中体能消耗较大。其次,目前尚无用于研究的商业试剂盒^[21],给实验带来一定困难。最后,小型猪的胎盘不能转移大分子物质,无法用于抗体、疫苗等生物制品的安全性评价。

4 非人灵长类动物

非人灵长类动物与人类的生殖系统具有很多相似性,首先两者均是单胎妊娠,内分泌系统对生殖功能的调控都是通过下丘脑-垂体-卵巢轴进行^[22],均在更年期阶段丧失生育能力。女性的生理周期一般是 30 d 左右,而雌猴一般是 28 d^[23]。雌猴生殖道的生理结构,包括输卵管、子宫和阴道均与人类具有可比性。胎盘的生理结构和转移机制等方面也与人类相似^[24-25]。

非人灵长类动物在比较胎儿和新生儿发育能力方面具有极大优势,特别是脑部发育。与大脑发育不成熟的啮齿类动物不同,新生恒河猴在出生时脑白质明显增多,这使得恒河猴成为评估不良妊娠(如胎盘功能不全、胎儿生长受限和子痫前期)导致新生儿认知和行为异常的良好模型^[26-27]。

Frias 等人^[28]通过研究发现,雌性恒河猴长期接触尼古丁(接近怀孕女性吸烟者的水平)后,胎盘血流量在短期内降低,绒毛组织学异常。然而,联合服用抗坏血酸药物(如维生素 C)减轻了这些变化。这些研究表明产前接触尼古丁对胎盘结构和功能产生有害作用,并为补充维生素 C 可以减弱孕期吸烟的一些不良影响这一发现提供了新的证据。

虽然非人灵长类动物生殖系统的结构和功能与人类最为相近,在生殖毒性研究中具有极大的应用价值,但其价格昂贵,资源稀缺,对于实验方案设计和执行均有一定挑战。另外,非人灵长类动物面对极大的动物福利压力和伦理挑战,进一步限制了其在此类研究中的应用。

5 斑马鱼

斑马鱼的基因组与人类的基因相似度高达 87%^[29],这使其成为人类疾病研究的良好动物模型。在生殖毒性试验中,斑马鱼具有其他动物无法比拟的优点:生殖周期短,每次产卵数量多,胎仔发育迅速。个体小,对环境适应力强,可以减少实验周期和成本。在早期发育阶段通体透明,便于开展

胚胎、胎仔的发育研究^[30-31]。另外,斑马鱼和人类的生殖调控系统具有高度相似性,这使得研究人员能够通过研究斑马鱼的重要神经元,以及生殖激素及其作用效果来全面地研究和理解人类生殖系统^[32-33]。

随着研究的不断深入,斑马鱼逐渐成为科学家们评估人类生殖系统潜在危险化合物的良好动物模型,特别是评估环境污染物。以哺乳动物为主的评估生殖毒性的分析方法耗时、复杂且昂贵,需要进行大规模的实验分析^[34]。同时,哺乳动物往往需要较高剂量,但环境中化学物质的浓度水平往往较低^[35],从而导致现实环境的毒性水平无法预测。而微量的化合物在较短的时间内就可以进入斑马鱼体内,因此斑马鱼可以作为环境污染物研究的最佳实验动物模型。此外,斑马鱼易受基因操纵,为研究基因对繁殖的影响提供了一个新的选择^[36]。

Webster 等人^[37]将斑马鱼暴露于除草剂草甘膦后,发现斑马鱼 *cyp19a1* 基因的表达上调、芳香化酶的活性以及卵巢中主要雌激素受体 *esr1* 的表达均显著增加,从而揭示草甘膦对斑马鱼生殖器官的类固醇合成具有破坏作用。Lopes 等人^[38]在暴露于草甘膦的成年雄性斑马鱼中也观察到抗氧化基因的上调和精子运动性降低的现象,这表明草甘膦在诱导睾丸氧化应激方面具有一定作用。这与许多人类细胞体外研究结果一致^[39],均揭示了草甘膦通过破坏激素合成、抑制芳香化酶活性而使精子和卵子质量下降,最终导致胚胎早期发育阶段死亡率上升。

迄今为止,斑马鱼作为生殖领域的研究模型只有十几年^[40],与其他传统的高等脊椎动物相比,其生殖系统的基础资料明显缺乏,特别是对雄性生殖系统的了解还很有限。另外,斑马鱼是卵生动物,交配方式是体外受精,这与人类的繁殖方式存在巨大差异。

6 小结

综上所述,在评价避孕药、凝胶剂和阴道环等局部给药的药物时可以优先考虑家兔作为研究对象。评价孕激素类和生育调节药物时,非人灵长类动物是最好的选择。斑马鱼适用于评价环境污染物和作用于中枢神经系统的药物。犬不适合评价抗高血压药、拟交感神经药和非甾体抗炎药。小型猪不适合评价抗体、疫苗等大分子药物。所有动物模型都有其优点和局限性,家兔胎仔数量多、便于

操作,但是食草性动物,消化道与人类存在差异。犬生理指标稳定、结果的重复性好,但犬是季节性繁殖,给实验设计带来较大困难。小型猪对某些致畸物质的反应与人类存在相似性,但其胎盘无法转移大分子物质。非人灵长类动物是单子宫、有月经周期,但价格昂贵、资源稀缺、动物福利压力大。斑马鱼与人类基因高度一致,在发育前期通体透明、便于观察,但斑马鱼是卵生动物,繁殖方式与人类存在一定差异。因此,在研究人类生殖毒性时,并没有单一的理想动物模型,应根据受试物的理化性质、与人体的相互作用以及实验动物的特点进行综合考量,选择最适合的动物模型,在一定条件下也可采用多个动物模型进行评价。

参考文献:

- [1] Turchi P. Prevalence, definition, and classification of infertility [M]// Cavallini G, Beretta G. Clinical management of male infertility. Springer International Publishing, 2015: 5-12.
- [2] 孙祖越,周莉,闫晗,等. 如何成功开展药物非临床生殖毒性试验 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(22): 2195-2204.
- [3] 张伟. 在路上——我国创新药物注册管理体制现状与展望 [J]. 中国食品药品监管, 2012(2): 8-14.
- [4] Esteves P, Abrantes J, Baldauf HM, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases [J]. Exp Mol Med, 2018, 66(50): 1-10.
- [5] Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, et al. Rabbit as a reproductive model for human health [J]. Reproduction, 2012, 144(1): 1-10.
- [6] 李钊,郭湘洁,谢淑武,等. 应用液质联用法同时测定新西兰家兔血浆中左炔诺孕酮和炔雌醇浓度及其药理学 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(8): 823-831.
- [7] Susheela AK, Kumar A. Ultrastructural studies on the leydig cells of rabbits exposed to chronic fluoride toxicity [J]. Environ Sci, 1997, 5: 79-94.
- [8] Kumar N, Sood S, Arora B, et al. To study the effect of vitamin D and E on sodium-fluoride-induced toxicity in reproductive functions of male rabbits [J]. Toxicol Int, 2012, 19(2): 182-187.
- [9] 国家食品药品监督管理局. 药物生殖毒性研究技术指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006-2007: 143-168.
- [10] Kutter A, Kantyka M, Meira C, et al. Effect of 50 mg/kg intravenous tranexamic acid on coagulation assessed by rotational thromboelastometry (ROTEM) in healthy Beagle dogs [J]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2019, 161(6): 369-376.
- [11] 赵永斌,胡卫列. 比格犬实验动物应用进展 [A]. 中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会第十四次全国学术会议暨 2016 年广东省中西医结合学会泌尿外科专业委员会学术年会论文集 [C]. 2016: 422-425.
- [12] Faehnrich B, Pastor A, Heide C, et al. Effects of isoquinoline alkaloids from *Macleaya cordata* on physiological, immunological and inflammatory parameters in healthy beagles; Alkaloids in dog nutrition [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2019, 103(2): 661-667.
- [13] Zhang X, Zhang X, Yuan B, et al. Subchronic toxicities of HZ1006, a hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, in Beagle dogs and sprague-dawley rats [J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(12): 1190-1212.
- [14] Magdalena G, Ukasz Z, Maciej G. The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs [J]. Molecules, 2015, 20(11): 20669-20687.
- [15] 丁言伟,周大鹏,史激空,等. 小型猪在新药安全性评价中的应用展望 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(5): 543-547.
- [16] van der Laan JW, Brightwell J, McNulty P, et al. Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 62(3): 184-195.
- [17] 陈华. 小型猪在毒理学研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(3): 175-178.
- [18] 陈华. 小型猪医学研究模型的建立与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 281-282.
- [19] Hayama T, Kokue E. Use of the Goettingen miniature pig for studying pyrimethamine teratogenesis [J]. Crit Rev Toxicol, 1985, 14(4): 403.
- [20] 张元慧,高虹. 小型猪在生殖毒性实验中的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(18): 49-52.
- [21] Vamathevan JJ, Hall MD, Hasan S, et al. Minipig and beagle animal model genomes aid species selection in pharmaceutical discovery and development [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 270(2): 149-157.
- [22] Plant TM. A comparison of the neuroendocrine mechanisms underlying the initiation of the preovulatory LH surge in the human, Old World monkey and rodent [J]. Front Neuroendocrinol, 2012, 33(2): 160-168.
- [23] Chaffin CL, Vandervoort CA. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: A comparative perspective [J]. Exp Biol Med, 2013, 238(5): 539-548.
- [24] Acosta EP, Grigsby PL, Larson KB, et al. Transplacental transfer of azithromycin and its use for eradicating intra-amniotic ureaplasma infection in a primate model [J]. J Infect Dis, 2014, 209(6): 898-904.
- [25] Hong S, Winkler T, Wu C, et al. Path to the clinic: assessment of iPSC-based cell therapies *in vivo* in a nonhuman primate model [J]. Cell Rep, 2014, 7(4): 1298-1309.
- [26] Schneider ML, Champoux M, Moore CF. Neurobehavioral assessments of non-human primate neonates [M]// Sackett GP, Ruppenthal GC, Elias K. Nursery rearing of non-human primates in the 21st century. Springer, 2006: 215-247.
- [27] Curtis B, Liberato N, Rulien M, et al. Examination of the safety of pediatric vaccine schedules in a non-human primate model: assessments of neurodevelopment, learning, and social behavior

- [J]. *Environ Health Perspect*, 2015, 123(6): 579–589.
- [28] Lo JO, Schabel MC, Roberts VHJ, et al. Vitamin C supplementation ameliorates the adverse effects of nicotine on placental hemodynamics and histology in nonhuman primates [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2015, 212(3): 370.e1–370.e8.
- [29] 祁美娟, 石美智, 韩永龙. 斑马鱼在药学领域的应用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(7): 903–906.
- [30] He JH, Gao JM, Huang CJ, et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 42: 35–42.
- [31] Akhter A, Kumagai R, Roy SR, et al. Generation of transparent zebrafish with fluorescent ovaries: a living visible model for reproductive biology [J]. *Zebrafish*, 2016, 13: 155–160.
- [32] Ying HJ, Yatinesh K, Farooq SM, et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 1–20.
- [33] Shkil F, Siomava N, Voronezhskaya E, et al. Effects of hyperthyroidism in the development of the appendicular skeleton and muscles of zebrafish, with notes on evolutionary developmental pathology (Evo-Devo-Path) [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1–13.
- [34] Arora T, Mehta AK, Joshi V, et al. Substitute of animals in drug research: an approach towards fulfillment of 4R's [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2011, 73(1): 1–6.
- [35] Prins GS, Patisaul HB, Belcher SM, et al. CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose bisphenol A effects on multiple organ systems [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019, 125(Suppl 3): 14–31.
- [36] Fuentes R, Letelier J, Tajer B, et al. Fishing forward and reverse: Advances in zebrafish phenomics [J]. *Mech Dev*, 2018, 154: 296–308.
- [37] Webster TMU, Laing LV, Florance H, et al. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(2): 1271–1279.
- [38] Lopes FM, Varela Junior AS, Corcini CD, et al. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *danio rerio* [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 155: 322–326.
- [39] Benachour N, Sipahutar H, Moslemi S, et al. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2007, 53(1): 126–133.
- [40] Bradford YM, Toro S, Ramachandran S, et al. Zebrafish models of human disease: Gaining insight into human disease at ZFIN [J]. *ILAR J*, 2017, 58(1): 4–16.

[收稿日期]2019-05-05

(上接第 70 页)

- [18] 陈善广. 动物学习记忆计算机测控系统研制及实验测评方法 [A]. 中国科学技术协会. 生命科学与生物技术: 中国科协第三届青年学术年会论文集 [C]. 中国科学技术协会: 中国科学技术协会学会学术部, 1998: 3.
- [19] Barnhart CD, Yang D, Lein PJ. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124521.
- [20] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1–3): 3–33.
- [21] Saygin M, Ozguner MF, Onder O, et al. The impact of sleep deprivation on hippocampal-mediated learning and memory in rats [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118(7): 408–416.
- [22] Zielinski MR, Davis JM, Fadel JR, et al. Influence of chronic moderate sleep restriction and exercise training on anxiety, spatial memory, and associated neurobiological measures in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 1(250): 74–80.
- [23] 芮霞. 睡眠剥夺小鼠模型的建立及宁心安神法的干预作用 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [24] 冯忠胜, 汤永红. 睡眠剥夺致相关功能障碍的研究进展 [J]. *世界睡眠医学杂志*, 2018, 5(7): 866–870.
- [25] Wassom DJ, Lyons KE, Pahwa R, et al. Qigong exercise may improve sleep quality and gait performance in Parkinson's disease: a pilot study [J]. *Int J Neurosci*, 2015, 125(8): 578–584.
- [26] Moon HI, Yoon SY, Jeong YJ, et al. Sleep disturbances negatively affect balance and gait function in post-stroke patients [J]. *Neuro Rehabilitation*, 2018, 43(2): 211–218.
- [27] O'Dowd S, Galna B, Morris R, et al. Poor sleep quality and progression of gait impairment in an incident Parkinson's disease cohort [J]. *J Parkinsons Dis*, 2017, 7(3): 465–470.
- [28] 王茹, 刘楠, 王少朋, 等. 脑小血管病患者步态障碍、平衡障碍和跌倒研究进展 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2019, 19(4): 281–285.
- [29] 戴红. 康复医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [30] 李孟秋. 黄秋葵种子抗抑郁活性及机制研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2016.
- [31] 张亚宁, 张军武, 张胜威, 等. 基于步态分析系统的 DL-4-氯苯基丙氨酸致大鼠失眠模型的研究 [J]. *现代中医药*, 2014, 34(2): 80–83.

[收稿日期]2019-05-20

陈玥,苏丹,贵文娟,等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 116–122.
Chen Y, Su D, Gui WJ, et al. Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 116–122.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 018

实验动物与人类年龄相关性研究进展

陈 玥¹, 苏 丹¹, 贵文娟², 孙效容^{1*}

(1.成都合拓创展生物科技有限公司,成都 610000; 2.宁夏医科大学总医院,银川 750004)

【摘要】 动物实验在医学领域的研究中不可或缺,众多学者致力于使动物实验数据结果更加准确、可靠、科学,与人体反应更加接近。大多数人类疾病及并发症往往具有年龄相关性,药物研究也需与年龄匹配,且机体发育和衰老的不同阶段对药物的反应也不尽相同。因此,良好的动物实验必须在尽可能与人类年龄相似的生命阶段中开展。多年来国内外学者们针对动物与人类发育比对及年龄相关性进行了大量研究,本研究旨在总结常用实验动物(大小鼠、兔)与人类发育,年龄匹配相关理论和研究方法,即物种之间的相似性在特定发展阶段反映出基本相似的生物过程的程度,为动物实验提供参考。

【关键词】 实验动物;生物学年龄;发育;人类年龄

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0116-07

Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans

CHEN Yue¹, SU Dan¹, GUI Wenjuan², SUN Xiaorong^{1*}
(1. Chengdu Bio-HT Company Limited, Chengdu 610000, China.
2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

【Abstract】 Animal research, which plays a critical role in drug discovery, has been of central importance for the production of background knowledge for clinical investigations and the optimization of procedures prior to human trials. An important feature of in vivo modeling is matching of the age of animals used in preclinical research to the age of peak incidence for a disease state in humans. Indeed, it is clear that animal models must match humans at a similar stage of life to be used as successful platforms for clinical translation, as many conditions that are targeted for drug treatment are age dependent. Valid age matching is critical for successful use of animal modelling in biomedical research in general and, in particular, drug discovery. It is important for researchers to understand that relative ages are different depending upon the stage of life. Therefore, one has to determine the relevant age under investigation and what factors are being analyzed. For this, special attention is needed to verify the phase of life of the animal (in days) and its correlation with the age of humans (in years). In this article, we focus on an even more specific issue: the degree to which similarities between species reflect fundamentally similar biological processes at a particular stage of development or age.

【Keywords】 laboratory animal; biological age; developmental biology; human lifespan

[作者简介]陈玥(1984—),女,硕士,研究方向:药物临床前有效性评价。E-mail: yue.chen@bio-ht.cn
[通信作者]孙效容(1986—),女,硕士,研究方向:药物临床前有效性评价。E-mail: xiaorong.sun@bio-ht.cn

动物实验在基础研究、药物发现、药物临床前研究中至关重要^[1]。多学科研究者广泛使用实验动物作为研究对象,包括:毒理学、肿瘤学、免疫学、遗传学、病理学、儿科学、妇产科学、老年医学等学科范畴^[2-4]。动物实验为临床研究背景提供重要信息,并对人体实验前的程序优化具有重大意义。然而,在神经保护^[5]、消化系统^[6]和癌症研究等诸多领域,从临床前动物研究到有效临床治疗的年龄匹配度并不高。

体内实验的一个重要特征是需要将临床前研究中使用的动物年龄与人类疾病状态的峰值发病年龄相匹配,但离乳动物物种之间的生长和发育变化很大,年龄匹配总是基于对发育性质的假设。许多作为药物治疗的目标病症都具有年龄依赖性,疾病病变发生率和严重程度以及对治疗的反应都随着年龄而变化。此外,年龄的变化通常会带来不同的并发症,使药物治疗和检测复杂化^[7]。很明显,良好的动物实验必须在尽可能相似的生命阶段匹配人类年龄,以便使动物实验结果更加科学可靠。

物种之间的相似性在特定发育阶段反映出基本相似的生物过程的程度,称之为年龄匹配问题。动物在发育和衰老过程中对许多药物的反应不同。因此,有效的年龄匹配对于在生物医学研究中成功使用动物模型至关重要。

1 物种间相似性发展理论假说

在进化论中,物种之间的相似性有三种类型^[7]:①血缘相似性(同源性);②适应进化而产生的相似性(类比);③来自类似祖先状态自适应形式的并行发展相似性。这意味着功能相似性可能受到不同生物化学和生理过程的影响,并且同源的生物化学反应可以在不同物种发挥不同的功能作用。在当前的动物实验中,这些复杂的相似性经常被忽略。事实上,所有动物与人类年龄匹配方式都取决于生物进化发展理论。目前有许多进化发展理论:如经典发育生物学,“进化论”^[8]等。

2 实验动物与人类年龄匹配发展理论

目前,动物实验中动物与人类年龄匹配中所探讨的发展理论,主要包含以下四种^[7]。

2.1 线性缩放

线性缩放是一种简单的年龄匹配方法,离乳动

物的发育被认为是一种高度进化保守的序列(即离乳动物物种之间高度相似),通过计算模型物种的平均寿命与人类的平均寿命百分比,最终计算得出动物相对于人类的年龄^[7]。

2.2 非线性缩放

在该理论中,仍然假设离乳动物的发育遵循相对一致的步骤顺序。较为流行的发展理论是关于性成熟的理论,认为相关物种之间的一个关键差异是性成熟发育阶段的相对持续时间^[9]。可以说,非线性缩放是研究人员在尝试将动物与人类进行年龄匹配时使用的较多理论之一。研究者们认识到每个阶段的相对持续时间和速度对于每个物种而言差异是非常显著的。

两种缩放理论具有直观的意义,它们是基于分支因果关系的发展理论^[7]。

2.3 解剖结构模块化

Williams^[10]认为机体发展包括组织解剖模块的定时增长。模块化发展理论认为不仅离乳动物物种的某些发育阶段可能不同,甚至某些阶段的序列也可能不同,各种物种机体子系统以不同的速度发展。基于这种发展理论,年龄匹配不是根据人类和模型物种之间发育阶段的匹配顺序发生的,而是更加集中在身体发育状态上。子系统被认为部分地与身体的其他部分隔离开来,当解剖标记做为使用的主要标准时,可以称为结构模块性。

2.4 功能模块化

在该理论中,发育不仅仅是一个系统通过不成熟阶段进入成熟阶段的过程,而是一个过程中,根据生物体在该特定点的需要,机体功能发育过程中在机体系统内发生变化^[7]。发育可以被视为遵循一系列生理和生态优先事项,其中一些功能早期出现(例如,血管循环,其执行在生物体发育早期需要的功能)和一些晚期出现(例如,生殖系统往往是许多物种中最后完全发育的系统)。

3 实验动物与人类年龄相关性的几种常用研究方法

有多位学者进行了离乳动物与人类年龄相关性研究,例如:通过人体和动物晶状体质量对比^[11]、牙齿发育对比^[12]、胫骨骨内膜层数对比^[13]、骨骺闭合情况对比^[14]等。但是,这些技术都以相对的方式对动物年龄与人类年龄相关性进行研究,而不能准

确定绝对年龄,因此,研究人员在每一次进行年龄换算时常需同时采用多种方法。

3.1 晶状体重量对比法

已有研究尝试通过关联动物和人类眼晶状体在生命周期中的发育过程,找寻动物与人类年龄相关性^[11]。在大多数离乳动物的正常生命周期内,晶状体重量呈渐进曲线增加,且与动物营养状态无关,但该方法适用于发育阶段动物^[15]。这项技术在 20 世纪 80 年代后期被广泛接受,认为是一种较为准确的方式,然而,这种方法只适用于 3~4 月以内的大小鼠,对于超过该年龄阶段的大小鼠,则无法得出准确的相关性。

3.2 牙齿发育

一些研究人员确定了使用臼齿生长的情况来测定小型离乳动物年龄的方法。幼年动物的磨牙仅由一个特殊棱镜部分(即齿冠)组成,经过大约 2.5 个月的牙根部生长,并且连续向上推动齿冠的发育,而在老年动物中,大部分的齿冠都发生了磨损,相比较而言牙根部较长。所以,该推算方式主要包括臼齿老化法或齿冠法。主要观察动物磨牙和臼齿的牙根、牙冠发展情况^[16]。由于饮食和地理区域的等因素均会影响原生磨牙硬度,因此,磨牙老化方法并不能直接适用于广泛地区内的实验动物。

3.3 胫骨骨内膜层数

在脊椎动物中应用较广泛的方法是计算胫骨的骨内膜层数推算实验动物年龄。但在几项研究报告中发现在幼龄动物体内发现的骨板与它们的年龄并不完全匹配^[13, 17]。所以,该计算方式未得到广泛推广,而仅限于有限的实验动物物种,如双冠鸬鹚^[13]、Lewis 大鼠^[17]。

3.4 骨骺闭合

对动物年龄的估计部分依赖于观察骨骼的形成,尤其是长骨的长度,以及其他骨骼的发育,如评估髌骨和颞部的皮脂部分的发育情况。在动物的幼年期,通常采用额中缝闭合和骨化中心的出现进行判断^[14]。除了测量骨骼和评估牙齿,骨骺的形成和愈合程度也很重要。在人类 6 岁之前,骨化中心主要出现在肱骨、股骨、胫骨、桡骨、髌骨和尺骨;14~18 岁上肢骨骨骺闭合;18~25 岁下肢骨骨骺闭合。骨骺评估包括骨骺的大体检查和动物放射学评估^[18]。由于人类是直立行走的哺乳动物,其骨化

中心发育情况和骨骺的形成和愈合程度与主要利用四肢行走及攀爬的动物差异较大,所以该计算方式更加适用于计算灵长类动物相对于人类的年龄。

上述四种常见方法均针对某一种实验动物的某段年龄,无法对某一种实验动物的全部生命周期进行推演,不能精准实现动物与人类年龄相关性对比。因此近年来不断有研究者尝试探索更准确的方法。

4 实验动物全生命周期与人类年龄匹配相关性研究

曾经大多数研究人员简单的将人类和实验动物的寿命联系起来,来判断人类和实验动物的年龄的关系,但是,因为在一项特定的研究工作中,人们使用的是实验动物处于特定的发育阶段,简单的推算并不科学。研究中应考虑动物生命的不同阶段来推断准确的相关性。

4.1 大鼠年龄与人类年龄的匹配相关性

4.1.1 常见的线性缩放的推算方法

实验大鼠的寿命约为 2~3.5 岁(平均 3 岁)^[19],而全球人类的预期寿命为 80 岁^[20],各国根据各自的社会经济条件而有所不同。将他们的寿命统一衡量,可以计算为:

$$(80 \times 365) \div (3 \times 365) \approx 26.7 \text{ 人类日} = 1 \text{ 大鼠日};$$

$$365 \div 26.7 \approx 13.7 \text{ 鼠日} = 1 \text{ 人类年}。$$

因此,当与大鼠的整个寿命周期相关联时,人类 1 年约相当于 13.7 个大鼠日^[21]。

然而,考虑到大鼠的不同生命阶段,从离乳到老年阶段,相对于人类,大鼠有一个短暂而快速的童年。大鼠在婴儿期发育迅速,在 6 周左右性成熟,在 5~6 个月大社会成熟^[22]。而人类发育缓慢,直到 11~12 岁左右才进入青春期。大鼠和人类在不同的生命阶段中的发育速度不同,不能粗暴的将大鼠看做人类的微缩版,不能以同等倍数的关系看待人类与大鼠年龄的相关性,因此简单的线性缩放推算整个生命周期不够客观合理。

4.1.2 依据生长发育阶段进行推演的方法

(1) 离乳阶段年龄匹配:从一般意义上讲,离乳是实现独立的一个里程碑,这是离乳动物发展中标志着生活模式发生重大变化的一个突出而普遍的不连续现象^[14],严格地说,离乳过程涉及到进食行

为的改变,婴儿期的营养获取完全依靠母乳,而离乳后大鼠则需独立选择和摄取食物。大鼠是研究摄食行为的重要实验动物物种,幼鼠在出生后 18 d (postnatal day 18, P18) 左右开始确定能够摄取固体食物, P21 左右摄乳时间开始减少, 摄入固体食物的时间增加。人的平均离乳年龄约为 6 个月 (180 d), 而实验大鼠平均约为 3 周 (P21)^[2]。据此,从离乳年龄进行计算:

$180 \div 21 \approx 8.6$ 人类日 = 1 大鼠日;
 $365 \div 8.6 \approx 42.4$ 大鼠日 = 1 人类年。
因此,在离乳阶段,人类 1 年约相当于大鼠的 42.4 d^[21]。

(2) 青春期阶段年龄匹配: 大鼠生命的第二阶段是青春期, 这时大鼠第一次拥有繁殖能力。大鼠在出生后平均 50 d 进入青春期 (P50), 而人类发育缓慢, 直到 11.5 岁左右进入青春期^[23] ($11.5 \times 365 \approx 4\,198$ d)。另一方面, 大鼠在 6 周时性成熟 (P42)。然而, 在几项比较大鼠和人类出生体重的研究, 均认为大鼠在出生后第 12 天 (P12) 才真正达到人类的“出生”。这意味着大鼠在大约 38 d 左右达到性成熟 (即比它们在 P50 时的青春期实际年龄少 12 d)。据此,从青春期阶段年龄计算:

$4\,198 \div 38 \approx 110.5$ 人类日 = 1 大鼠日;
 $365 \div 110.5 \approx 3.3$ 大鼠日 = 1 人类年。
因此,在青春期阶段,人类 1 年约相当于大鼠的 3.3 d^[21]。

(3) 成年阶段年龄匹配: 青春期阶段之后, 大鼠开始经历性成熟^[24]。性成熟通常是由阴道开口 (雌性) 或龟头包皮分离 (雄性) 进行定义。个体间性成熟的年龄差异很大, 雌性大鼠在 P32~P34 左右达到性成熟, 而雄性大鼠的性成熟年龄从 P40 到 P76 不等^[25]。性成熟本身并不标志着成年的开始, 大鼠长骨中没有骨骺闭合, 所以用大鼠的肌肉骨骼成熟度来确定是否成年也存在问题^[26]。在大约 7~8 个月大 (P210) 时, 雄性和雌性 SD 大鼠的骨骼生长逐渐减弱^[21]。在人类生长板闭合过程中, 个体间以及个体内不同生长板之间存在较大的不一致性, 人体最后融合的生长板之一是肩胛骨, 肩胛骨平均在 20 岁左右闭合^[27] ($365 \times 20 = 7\,300$ d)。因此采用大鼠骨与人类骨融合时间作为成年的标志较为客观统一。据此,从骨融合时间计算:

$7\,300 \div 210 \approx 34.8$ 人类日 = 1 大鼠日;

$365 \div 34.8 \approx 10.5$ 大鼠日 = 1 人类年。
因此,在成年阶段,约 10.5 大鼠日相当于人类 1 年^[21]。

(4) 生殖衰退阶段年龄匹配: 大多数老年雌性啮齿动物表现出持续发情期 (持续的性接受能力)。由于强化的雌激素分泌刺激阴道上皮细胞的角质化, 这种状态也称为持续性阴道角质化, 这是实验室大鼠最常见的非循环性状态, 雌性大鼠在 15~20 个月 (600 d) 之间进入更年期^[21]。人类妇女生殖衰退的传统标志是更年期, 其特征是中年时月经减少或生育周期终止, 据美国医学协会统计, 女性的更年期平均年龄为 51 岁^[28] ($51 \times 365 = 18\,615$ d)。因此,从生殖衰退计算:

$18\,615 \div 600 \approx 31.0$ 人类日 = 1 大鼠日;
 $365 \div 31.0 \approx 11.8$ 大鼠日 = 1 人类年。
在生殖衰退期, 约 11.8 个大鼠日相当于人类 1 年^[21]。

(5) 老年阶段年龄匹配: 比较生殖衰退期至死亡的时间, 雌性大鼠在生殖衰退后平均存活 495 d, 而人类女性在衰老后平均存活 10 585 d^[29]。由此进行计算:

$10\,585 \div 495 \approx 21.4$ 人类日 = 1 大鼠日;
 $365 \div 21.4 \approx 17.1$ 大鼠日 = 1 人类年。
在老年阶段, 约 17.1 个大鼠日相当于人类 1 年^[21]。

4.2 小鼠年龄与人类年龄的匹配相关性

4.2.1 常见的线性缩放的推算方法
与大鼠的线性缩放推算方法一样, 该方法以实验小鼠的寿命约为 24 个月^[30], 而人类的预期寿命为 80 岁。因此, 将小鼠与人类寿命统一衡量, 可以计算为:

$(80 \times 365) \div (2 \times 365) = 40$ 人类日 = 1 小鼠日;
 $365 \div 40 = 9.125$ 小鼠日 = 1 人类年。
以简单线性缩放推算方法计算, 人类 1 年相当于小鼠的 9.125 d。

4.2.2 依据生长发育阶段进行推演的方法

(1) 离乳阶段年龄匹配: 小鼠幼鼠在出生后第 3~4 周, 第 28 天 (P28) 左右开始确定能够摄取固体食物^[31]。人的平均离乳年龄约为 6 个月 (180 d)。据此,从离乳阶段年龄进行计算:

$180 \div 28 \approx 6.43$ 人类日 = 1 小鼠日;
 $365 \div 6.43 \approx 56.77$ 小鼠日 = 1 人类年。

因此,在离乳阶段,人类 1 年约相当于小鼠的 56.77 d^[32]。

(2) 青春期阶段年龄匹配:小鼠青春期最常见的标志是阴道角化^[33],小鼠在出生后平均 42 d 进入青春期(P42)^[33-34],而人类 11.5 岁左右才进入青春期(4198 d)。据此,计算青春期阶段年龄相关性:

$$4198 \div 42 \approx 99.95 \text{ 人类日} = 1 \text{ 小鼠日};$$

$$365 \div 99.95 \approx 3.65 \text{ 小鼠日} = 1 \text{ 人类年}。$$

因此,在青春期阶段,人类 1 年约相当于小鼠的 3.65 d^[32]。

(3) 成年阶段年龄匹配:小鼠 8~12 周时达成年阶段,平均 10 周(P70)^[23],人类成年平均 20 岁(7300 d)。据此,计算成年阶段年龄相关性:

$$7300 \div 70 \approx 104.3 \text{ 人类日} = 1 \text{ 小鼠日};$$

$$365 \div 104.3 \approx 3.50 \text{ 小鼠日} = 1 \text{ 人类年}。$$

因此,在成年阶段,约 3.50 小鼠日相当于人类 1 年^[32]。

(4) 生殖衰退阶段年龄匹配:小鼠生育功能在 15 个月结束(P450)^[35],人类女性绝经平均年龄为 51 岁(18 615 d)。因此,计算生殖衰退阶段年龄相关性:

$$18\,615 \div 450 \approx 41.37 \text{ 人类日} = 1 \text{ 小鼠日};$$

$$365 \div 41.37 \approx 8.82 \text{ 小鼠日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在生殖衰退期,约 8.82 个小鼠日相当于 1 个人类年^[32]。

(5) 老年阶段年龄匹配:小鼠在衰老后平均存活约为 280 d,人类女性在衰老后平均存活 10 585 d。因此,计算老年阶段年龄相关性:

$$10\,585 \div 280 \approx 37.8 \text{ 人类日} = 1 \text{ 小鼠日};$$

$$365 \div 37.8 \approx 9.66 \text{ 小鼠日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在老年阶段,约 9.66 个小鼠日相当于 1 个人类年。

4.3 兔年龄与人类年龄的匹配相关性

4.3.1 常见的线性缩放推算方法

兔寿命约为 8~12 岁^[36],实验兔的平均寿命约为 10 岁^[37],与大、小鼠的线性缩放简单推算方法一样,将它们的寿命统一衡量,可以计算为:

$$(80 \times 365) \div (10 \times 365) = 8 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 8 = 45.625 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

以简单线性缩放推算方法计算,人类 1 年相当于兔的 45.625 d^[38]。

4.3.2 依据生长发育阶段进行推演的方法

(1) 离乳阶段年龄匹配:兔在出生后约第 28 天

(P28)离乳^[37],人的平均离乳年龄约为 6 个月(180 d)。因此,从离乳阶段年龄计算:

$$180 \div 28 \approx 6.43 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 6.43 \approx 56.77 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在离乳阶段,人类 1 年约相当于兔的 56.77 d^[38]。

(2) 青春期阶段年龄匹配:兔进入青春期平均年龄约为 150 d(P150)^[39],人类 11.5 岁左右进入青春期(4 198 d)。因此,计算青春期阶段年龄相关性:

$$4\,198 \div 150 \approx 27.99 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 27.99 \approx 13.04 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在青春期阶段,人类 1 年约相当于兔的 13.04 d^[38]。

(3) 成年阶段年龄匹配:兔大约在 1 岁时达到性成熟(P365)^[39],人类平均约 20 岁(7 300 d)。因此,计算成年阶段年龄相关性:

$$7\,300 \div 365 = 20 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 20 = 18.25 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在成年阶段,18.25 兔日相当于人类 1 年^[38]。

(4) 生殖衰退阶段年龄匹配:兔生殖衰退时间约为出生后 6 年(P2 190)^[39],人类生殖衰退平均年龄为 51 岁(18 615 d)。因此,计算生殖衰退期年龄相关性:

$$18\,615 \div 2190 = 8.5 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 8.5 \approx 42.94 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在生殖衰退期,约 42.94 个兔日相当于一个人类年^[38]。

(5) 老年阶段年龄匹配:兔在生殖衰退后生活近 4 年(1 460 d)^[39],女性在衰老后可存活约 10 585 d。因此,计算老年阶段年龄相关性:

$$10\,585 \div 1\,460 = 7.25 \text{ 人类日} = 1 \text{ 兔日};$$

$$365 \div 7.25 \approx 50.34 \text{ 兔日} = 1 \text{ 人类年}。$$

在老年阶段,约 50.34 个兔日相当于人类一年^[38]。

4.4 小结

实验动物与人年龄相关性理论及计算方式不同,根据研究类型可采用不同计算方式。通过本文动物与人年龄相关性理论及计算方式,将上述计算方式汇总,得到人类年龄计算实际动物年龄(表 1),人类年与实验动物日匹配表(表 2),便于广大研究者查阅。

表 1 以人类年龄计算实验动物年龄

Table 1 Correlating human age with laboratory animal age

阶段 Stages	人类 Humans	大鼠 Rats	小鼠 Mice	兔 Rabbits
整个生命周期 Entire lifespan	29 200 d	1 095 d	730 d	3 650 d
离乳期节点 Time point of weaning period	P180	P21	P28	P28
青春期节点 Time point of adolescent period	P4 198	P38	P42	P150
成年期节点 Time point of adulthood	P7 300	P210	P70	P365
生殖衰退期节点 Time point of reproductive senescence period	P18 615	P600	P450	P2 190
老年期持续时长 Duration of aged period	10 585 d	495 d	280 d	1 460 d

注:P 表示出生后的天数;表格内容为笔者根据参考文献^[22, 32, 38]整理汇总所得。

Note. P indicates postnatal day. Table contents were collected by us according to the references^[22, 32, 38].

表 2 人类年与实验动物日匹配表

Table 2 Correlating human year with laboratory animal days

时期 Periods	大鼠(d) Rats	小鼠(d) Mice	兔(d) Rabbits	人类(年) Humans (year)
整个生命周期 Entire lifespan	13. 7	9. 125	42. 625	
离乳期 Weaning period	42. 4	56. 77	56. 77	
青春期 Adolescent period	3. 3	3. 65	13. 04	
成年期 Adulthood	10. 5	3. 50	18. 25	1
生殖衰退期 Reproductive senescence period	11. 8	8. 82	42. 94	
老年期 Aged period	17. 1	9. 66	50. 34	

注:表格内容为笔者根据参考文献^[22, 32, 38]整理汇总所得。

Note. Table contents were collected by us according to the references^[22, 32, 38].

5 结语

实验动物是生物医学研究中不可或缺的元素,通过大量文献发现动物不是一种微缩的人类;当年龄是关键因素时,对实验动物的任何研究结果进行分析,都必须考虑到解剖学、生理学、发育和生物学现象的差异。需要特别注意以天为动物年龄单位与以年为人类年龄单位的年龄相关性。

许多研究揭示了实验动物与人类发育持续时间和阶段的广泛差异,动物模型在生物医学科学中对于研究人体生理学及其调节至关重要,实验动物与人类的相对年龄在各个生命阶段中有较大差异。研究人员通过明确实验动物年龄与人类年龄的相关性,进而选择科学合理的动物种类和动物年龄,并在生物医学研究中科学合理地运用,使所得到的

动物实验资料更能拟推至人类具有重要意义。

参考文献:

[1] Fox JG, Anderson LC, Otto GM, et al. Laboratory animal medicine [M]. Third edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2015.

[2] Hernandez-Lallement J, Van Wingerden M, Kalenscher T. Towards an animal model of callousness [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 91: 121-129.

[3] 叶尤松,王陈芸,李哲丽,等. 不同年龄段雌性 Wistar 大鼠不同骨骼区域骨密度值的测定与比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 65-68.

[4] 袁松华,何涌泉,徐建青,等. 炎症因子风暴对老年小鼠感染免疫应答的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 1-8.

[5] Ferraris S, van der Merwe J, Van Der Veeken L, et al. A magnetic resonance multi-atlas for the neonatal rabbit brain [J]. Neuroimage, 2018, 179: 187-198.

- [6] Prieto V, Ludwig JM, Farris AB, et al. Establishment of human metastatic colorectal cancer model in rabbit liver: A pilot study [J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177212.
- [7] Rivers JR, Ashton JC. Age matching animal models to humans—theoretical considerations [J]. Curr Drug Discov Technol, 2013, 10(3): 177–181.
- [8] Brakefield PM. Evo-devo and accounting for Darwin's endless forms [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1574): 2069–2075.
- [9] Penin X, Berge C, Baylac M. Ontogenetic study of the skull in modern humans and the common chimpanzees: neotenic hypothesis reconsidered with a tridimensional procrustes analysis [J]. Am J Phys Anthropol, 2002, 118(1): 50–62.
- [10] Williams GC. Natural selection: domains, levels, and challenges [M]. Oxford University Press, New York, 1992.
- [11] Hardy AR, Quy RJ, Huson LW. Estimation of age in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout) from the weight of the eye lens [J]. J Appl Ecol, 1983, 20(1): 97–102.
- [12] Pankakoski E. An improved method for age determination in the muskrat, *Ondatra zibethica* (L.) [J]. Annales Zoologici Fennici, 1980, 17(2): 113–121.
- [13] Broughton JM, Rampton D, Holanda K. A test of an osteologically based age determination technique in the Double-crested Cormorant *Phalacrocorax auritus* [J]. Ibis, 2010, 144(1): 143–146.
- [14] Kahana T, Birkby WH, Goldin L, et al. Estimation of age in adolescents—the basilar synchondrosis [J]. J Forensic Sci, 2003, 48(3): 504–508.
- [15] Augusteyn RC. Growth of the eye lens: I. Weight accumulation in multiple species [J]. Mol Vis, 2014, 20: 410–426.
- [16] Almayahi BA, Tajuddin AA, Jaafar MS. Measurements of natural radionuclides in human teeth and animal bones as markers of radiation exposure from soil in the Northern Malaysian Peninsula [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2014, 97(4): 56–67.
- [17] Salazar-Noratto GE, De Nijs N, Stevens HY, et al. Regional gene expression analysis of multiple tissues in an experimental animal model of post-traumatic osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(2): 294–303.
- [18] Ekizoglu O, Inci E, Ors S, et al. Applicability of T1-weighted MRI in the assessment of forensic age based on the epiphyseal closure of the humeral head [J]. Int J Legal Med, 2019, 133(1): 241–248.
- [19] Dye JA, Gibbs-Flournoy EA, Richards JH, et al. Neonatal rat age, sex and strain modify acute antioxidant response to ozone [J]. Inhal Toxicol, 2017, 29(7): 291–303.
- [20] Castanon A, Landy R, Pesola F, et al. Prediction of cervical cancer incidence in England, UK, up to 2040, under four scenarios: a modelling study [J]. Lancet Public Health, 2018, 3(1): e34–e43.
- [21] Robert Q. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? [J]. Nutrition, 2005, 21(6): 775–777.
- [22] Sengupta P. Health impacts of Yoga and Pranayama: A state-of-the-art review [J]. Int J Prev Med, 2012, 3(7): 444–458.
- [23] Taft RA, Davisson M, Wiles MV. Know thy mouse [J]. Trends Genet, 2006, 22(12): 649–653.
- [24] Sengupta P. Environmental and occupational exposure of metals and their role in male reproductive functions [J]. Drug Chem Toxicol, 2013, 36(3): 353–368.
- [25] Lewis EM, Barnett JF Jr, Freshwater L, et al. Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors [J]. Drug Chem Toxicol, 2002, 25(4): 437–458.
- [26] Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone [J]. Clin Sci (Lond), 2000, 98(2): 217–240.
- [27] Grant JCB. An atlas of anatomy, by regions [M]. 6th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1972.
- [28] Bhattarai T, Bhattacharya K, Chaudhuri P, et al. Correlation of common biochemical markers for bone turnover, serum calcium, and alkaline phosphatase in post-menopausal women [J]. Malays J Med Sci, 2014, 21(1): 58–61.
- [29] Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's [J]. Int J Prev Med, 2013, 4(6): 624–630.
- [30] Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, et al. Rapamycin slows aging in mice [J]. Aging Cell, 2012, 11(4): 675–682.
- [31] Lerch S, Brandwein C, Dormann C, et al. Mice age — Does the age of the mother predict offspring behaviour? [J]. Physiol Behav, 2015, 147: 157–162.
- [32] Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages [J]. Life Sciences, 2016, 152: 244–248.
- [33] Kercmar J, Tobet SA, Majdic G. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice [J]. Front Behav Neurosci, 2014, 8: 337.
- [34] Hagenauer MH, Perryman JI, Lee TM, et al. Adolescent changes in the homeostatic and circadian regulation of sleep [J]. Dev Neurosci, 2009, 31(4): 276–284.
- [35] Fox JG. The mouse in biomedical research [M]. 2nd ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2007.
- [36] Del Amo EM, Urti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data [J]. Exp Eye Res, 2015, 137: 111–124.
- [37] Elkomy AE, Abd El-hady AM, Elghalid OA. Dietary boron supplementation and its impact on semen characteristics and physiological status of adult male rabbits [J]. Asian J Poultry Sci, 2015, 9(2): 85–96.
- [38] Dutta S, Sengupta P. Rabbits and men: relating their ages [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2018, 29(5): 427–435.
- [39] Mapara M, Thomas BS, Bhat KM. Rabbit as an animal model for experimental research [J]. Dent Res J (Isfahan), 2012, 9(1): 111–118.

齐俊芳,包龙. 兔脑出血模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 123-127.
Qi JF, Bao L. Research progress on rabbit model of cerebral hemorrhage [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 123-127.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 11. 019

兔脑出血模型研究进展

齐俊芳,包 龙*

(苏州大学附属第一医院,江苏 苏州 215000)

【摘要】 兔与灵长类动物具有相似的进化历史,具有与人类相似的脑血管形态特征,并且易于定位基底神经区域,成功率高,长期死亡率低,故被视为制作脑出血模型较为理想的动物。目前兔脑出血模型制作主要有以下几种方法:①自体血注入脑出血模型;②胶原酶诱导脑出血模型;③创伤脑出血模型;④刺破大脑中动脉所致脑出血模型。该模型制作成功与否可通过以下方面评估,如:行为学、大体解剖、影像学、病理学等方面;而制作成功的模型可用来研究脑出血的病理生理机制、早期诊断方法、探索新的治疗方式等。本文主要对兔脑出血模型进行综述。

【关键词】 兔;脑出血;动物模型

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2019) 11-0123-05

Research progress on rabbit model of cerebral hemorrhage

QI Junfang, BAO Long*

(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China)

【Abstract】 Rabbits have similar evolutionary history to primates, similar cerebral vascular morphological features to humans, and easily localized basal ganglia. Moreover, as their success rates for cerebral hemorrhage modeling are high, while long-term mortality is low, rabbits are considered to be an ideal research model of cerebral hemorrhage. At present, there are several method for inducing a rabbit cerebral hemorrhage model: ① autologous blood injection, ② collagenase induction, ③ trauma, and ④ caused by puncturing middle cerebral artery. Whether the model has been successfully established can be assessed through the following aspects: behavioral analysis, gross anatomy, imaging, pathology, and so on. And the successfully established models can be used to study the pathophysiological mechanisms of cerebral hemorrhage and early diagnosis method, and to explore new treatment method, etc. This article mainly reviews the rabbit model of cerebral hemorrhage.

【Keywords】 rabbit; cerebral hemorrhage; animal model

脑出血是指由脑血管破裂引起的脑实质出血。我国脑出血占有所有脑卒中的 18.8%~47.6%。脑出血发病率危险,病情变化迅速,死亡率高。3 个月内的死亡率 20%~30%^[1]。脑出血造成了沉重的社会经济负担,故对脑出血的病因、病理生理改变、诊断、治疗等方面的研究近年来重视程度逐渐加深。

为了更好的认识和了解脑出血,需借助于与临床作用机制相似的模型,并通过它来研究其病理生理机制、诊断、治疗等。因此,制作稳定且可复制的脑出血动物模型尤为重要。脑出血的动物模型始建立于 20 世纪 60 年代,通过输注自体血建立脑出血模型,主要应用于狗、猴子、猫等大型动物^[2]。随后由

[作者简介] 齐俊芳(1994—),女,硕士研究生,专业:急诊医学。E-mail: 20185232214@stu.suda.edu.cn
[通信作者] 包龙(1976—),男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事脑出血研究。E-mail: Baolong@suda.edu.cn

于立体定位仪的发明、动物伦理、费用等原因,加之大鼠尾状核较易定位,更多的重心放在大鼠脑出血模型的一系列研究上,因此脑出血的大鼠模型较为成熟。而兔脑出血模型始于 20 世纪 80 年代^[2],与大型动物模型相比费用较少,且其高成功率和低长期死亡率可以帮助医疗人员更好研究脑出血后的长期神经功能和病理生理机制;与大鼠相比,兔基底神经节更发达,兔脑容积明显大于大鼠,便于外科手术和标本采集。因此,是较为理想的制作脑出血模型的动物。

1 兔脑出血模型的建立方法

1.1 自体血注入脑出血模型

该模型的建立主要分为采血过程和血液注入过程。

取血过程:根据自体血的来源,一般有以下几种:耳正中动脉血,股动脉血^[3-4],心室血^[5-6]。心室穿刺血液采样血液采集时间短,不易凝固。然而穿刺过程有导致心跳骤停的风险,实验中应用率不高。股动脉血液采集创伤性大,采血成功率低,影响下肢功能,干扰行为观察评分^[2],需抽取少量血液时一般不作为首选。耳正中动脉采集血较为简便,损伤较前两者都小,不影响动物的行为学评分,但取血时间稍长且易凝血,需采血成功后尽快注入脑内,此为建造兔脑出血模型中最为常用的采血方法。在兔脑出血实验中为了更好模拟临床脑出血,大多数实验动脉血不抗凝,直接将新鲜动脉血注入脑内。

注血过程:获得自体血后,如何注入脑内又是个很关键的问题。自体血注入脑出血模型目前主要有两种方法:一种是抽取新鲜的自体动脉血,然后直接注射到大脑中,另一种是动脉插管颅内注射。注射目标区域多选择基底节区(人脑出血好发部位),另外可根据不同的研究目的、实验要求选择不同的注入部位,如基底节区、脑叶等均可。目前,多采用立体定位仪与兔脑图谱结合使用以进行定位。固定兔头后,沿正中线作切开口,暴露“十”字缝和“人”字缝。调整兔头部平面,使“十”字缝比“人”字缝高 1.5 mm。参考 Sawyer 兔脑立体定位图谱^[7],根据目标区域找到对应坐标。该图谱将穿过前囟中心(十字缝中心)的冠状面,作为冠状零平面(AP0)。A1 表示 AP0 前 1 mm 的冠状面,P1 表示 AP0 后 1 mm 的冠状面。将通过十字缝交叉点的矢

状平面作为矢状零平面,如 R6 代表矢状零平面右 6 mm 的矢状平面,水平零面 H0 在颅骨顶前囟下方 12 mm 处的水平面。制作兔脑出血模型时常用的位置有:内囊后肢(P1 mm, R6 mm, H13 mm)^[8],基底节外侧区(A2 mm, R5 mm, H6 mm)^[4]等。注血量多为动物脑体积的 1%~5%,兔为 0.5~3 mL^[9]。1985 年 Kaufman 等^[10]首次将兔用于颅内出血(intracerebral hemorrhage, ICH)模型研究,用 0.5 mL、0.75 mL、1.5 mL、2.0 mL、3.0 mL 等不同注血量将一组兔脑出血的形态学和生存率进行了比较。其中注射 2~3 mL 血液的兔死亡率为 41%,且分组中注射 2 mL、2.5 mL、3 mL 自体血的兔随着注入血液的增多,兔的死亡率逐渐增高,分别为 1/9、4/6、2/2,这些兔的死亡在注血后几小时内即可迅速发生。故若需要长期观察兔模型,为保证兔的长期生存率,在兔脑出血的建造中要控制注血量,该实验提示控制在 1.5 mL 以下相对较为安全。另外在该实验中也观察到小剂量注血后血液易进入脑室或蛛网膜下腔的情况,超过 2 mL 时可观察到明显的血液溢出,故在制作兔脑出血模型时需考虑到注射压力高导致破入脑室或沿针道返流的问题,注血量,注射速度,留针时间都是关键。而近几年有学者分梯度定量向兔脑内注血,结果示 0.3 mL 是最佳注入量^[4],而另外也有学者注入 0.5 mL 血液兔也耐受良好^[11-13]。从近些年文献来看,注血量无统一定论,综合来看注血量均不超过 0.5 mL、注射速度不超过 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

一种是将新鲜的自体动脉血直接注入大脑。具体如下:2001 年张亦波等^[4]采用双套管结合微量泵和立体定位术进行两次注血、三次拔针法成功造出了兔脑基底神经节出血模型。双套管包括内套管和外套管以及针芯。第一步:以 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 向套管内注入目标注血量的血 1/4,然后将针芯插入内套管,停针 7 min;第二步:将内插管向下插入 2.5 mm(通过血凝块)并从股动脉抽取 0.3~0.5 mL 新鲜血液。使用显微注射泵以 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ 将剩余的 3/4 血液注入套管,再将针芯插入套管内。拔针分三步:第一步:插入芯后,将套管固定 8 min 后,将内套拉出 2.5 mm;第二步:在该位置固定套管 10 min 后,将两个套管同时拔出 3 mm;第三步:该位置固定 12 min 后,将两个套管同时缓慢拔出。本实验形成的 34 例脑内血肿均为 100%,针道血液返流率为 0。作者将新鲜的未肝素化自体血注入 34 只兔基底神

经节的侧面区域,并通过连续冰冻切片计算血肿体积、观察血肿本身和周围组织形态。结果 300 μL 组中的 20 只兔只有 2 例失败,合格率达 90%,且失败的兔考虑与针的定位和麻醉的不稳定性有关。500 μL 组 8 只兔的合格率仅为 62.5%,3 例不合格。因此,笔者认为注射量 300 μL 所形成的出血量适中,可观察到兔有脑出血后的症状表现,较少出现短期内迅速死亡的事件,故是适当的血液注射量。该实验中的方法避免了兔注血期间的血液反流,和在拔出针头时和取出针头后,由针头路径中的血液损失引起的血肿量的差异。而 2009 年 Yu 等^[3]采用了类似的方法建造兔脑出血模型。据报道该方法的实验存活率达到了 93.5%,且未发生破入侧脑室和蛛网膜下腔的意外,该方法使自体血注射法形成脑内血肿模型达到稳定可控。另外在制作脑出血模型时,考虑到兔的凝血时间约为 5 min^[14],留针时间一般都不小于 5 min^[3-4, 6, 12, 15-16]。

另一种是通过动脉插管进行颅内血液注射。2001 年 Qureshi 等^[17]为了研究与脑出血相关的细胞损伤,遂利用此法建造兔脑出血模型,通过自制的分流导管将动脉血立体定位植入兔的额叶,并使用兔的动脉压将血液缓慢注入额叶的深部。该实验指出缓慢的灌注会限制血液破入蛛网膜下腔或脑室,且可以模拟渐进的脑出血血凝块形成过程,更接近人类脑出血的自然过程。

自体血注入脑出血模型不能模拟脑出血时动脉破裂和快速血肿形成的过程,也不能模拟出血后血肿的持续扩张。然而,由于注射的为非肝素化的自体血,故可以观察到血液凝固过程中血管活性释放物质对脑循环和脑组织的影响。因此,它更接近临床脑出血,并且在一定程度上类似于人脑出血的病理过程,加之操作简单且易于定位,可根据实验目的选择目标区域致大脑各个部位出血,故在家兔脑出血模型制作时是最常用的方法。

1.2 胶原酶诱导脑出血模型

胶原酶是一种金属酶,可以破坏细胞基底膜和组织中细胞间基质的胶原蛋白,导致血管壁受损并导致血液外渗。胶原酶有很多种,其中 IV 型和 VII 型细菌胶原酶广泛用于脑出血动物模型的制备,目前还没有研究报道它们之间的差异^[18]。1993 年, Rosenberg 等^[19]首次报道了胶原酶诱导的脑出血模型。该模型的缺点是胶原酶诱导的脑出血形成时间较长,且血肿为弥漫性渗血与脑组

织的混合物。它并非完全的血肿,故与临床脑内血肿的急性发生存在一定差距。为此,一些学者通过向大脑注射胶原酶和肝素混合物来改善这一点。据研究该模型注射后比较单纯胶原酶注射血肿区形成,血肿大小基本一致,神经行为学显示偏瘫提前。这种改进的优点是可以显著减少产生相同大小的血肿所需的胶原酶的量。另外研究中观察到加入肝素后致出血时间延长,血肿迅速形成,形状一致,可重复性高。

该方法主要应用于大鼠。有国内学者曾报道将该方法应用于兔,成功造出了兔脑出血模型,据报道,兔内囊出血可在注入胶原酶 30 min 内引起,效果稳定^[20]。该学者采用微量注射器抽取胶原酶配置液 6 μL ,其配置比例为(VII 型胶原酶 0.2 U+肝素 2 U)/ μL ,需要在 5 min 内缓慢注入兔脑组织,停针 2 min 后慢慢取出针头。注射胶原酶 30 min 后,固定脑并取出冠状切片,可观察到明显的脑出血。组织切片显示大量红细胞从血管中漏出。行为学方面观察到兔在注射胶原酶 4 h 后具有肢体运动障碍,身体扭曲到一侧,详细的观察显示兔的舌头是歪斜的,舌头会伸到病变肢体的对侧^[20]。

胶原酶注入法诱导脑出血,操作简单,出血量容易控制,周期短。其优点是可以更好地模拟人类自发性颅内出血和出血后血肿不断扩大的动态过程,该模型的成功率和稳定性较高,但该模型的缺点是胶原酶诱导的脑出血主要是渗出,而不是完全血肿。临床上见到的脑血管破裂引起的脑出血与之有一定的差距,且炎症反应明显,不适合研究脑出血后炎症反应的机制^[21]。与自体血注入脑出血模型相比,该方法对脑组织具有直接的细胞毒作用。该方法使血脑屏障受损更严重,神经功能缺损程度也更重,恢复时间更长。因此动物实验中多用此来研究脑出血后的水肿情况或药物治疗后的预后观察。

1.3 创伤致脑出血模型

通过外部打击暴力的方法造成兔的颅脑外伤,从而导致颅内血肿形成。该方法所受暴力不可量化加之个体差异影响,导致颅内血肿形成时机、大小、部位无法预测,且动物易多发伤、心跳骤停,需心肺复苏、开通静脉通道及时抢救等,对实验人员要求高耗费大且造模成功率不稳定^[22-24],造模成功率低且可重复性差^[25],导致在兔脑出血动物模型建造中受限。

1.4 兔脑出血模型的其他方法

通过刺破大脑中动脉制作脑出血模型是近年来随着影像技术的进步新兴的一种方法。据报道,2005 年,周宇腾等人^[26]实施了数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)介导下的犬大脑中动脉穿刺术,成功制作了脑出血模型。该方法可以在很大程度上模拟人脑出血中血管破裂的过程,但该方法成本高,操作者需要高技术并且易受辐射的影响。基于辐射安全因素考虑,2012 年周璇等^[27]首次应用超声介入方法制作脑出血模型,大脑中动脉的主要分支在超声引导下被针刺引起出血,类似于人 ICH 中的血管破裂。然而,限于声学特性,超声引导的 ICH 模型需要开放骨窗,其对动物具有很大的损害并且出血量不固定。该方法与缺血诱发脑出血^[28]、脑血管撕脱诱导脑出血模型^[29]主要见于应用于大型动物如犬类、猪类等,在小动物脑出血模型上应用较为罕见。偶有学者曾在白兔上利用显微镜下用特制刀片钩破大脑中动脉制作脑出血模型,实验中共使用 50 只兔制作脑出血模型,实验前期 4 d 共死亡 8 只兔,前期死亡率偏高导致长期存活率受限^[30]。

2 兔脑出血模型的评估方法

兔脑出血模型建立后,成功与否可从多方面评估,如:行为学评分、大体解剖、影像学(多为头颅 CT 或 MRI)、病理学等。行为学方面:目前无针对兔脑出血的行为学评分,兔脑出血的实验中多采用犬脑卒中、鼠脑卒中的评分,目前兔脑出血实验中应用较多的为 Purdy 评分法(犬)^[31]、Longa 法(鼠)^[32];大体解剖方面:一般为处死兔后断头取脑、切片,进针层面多可见血肿形成表示造模成功,切片可放置于计算扫描仪下计算血肿面积(S),进而累加计算血肿体积,公式为血肿体积(μL) = $(S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n) \times \text{总扫描片数} \times 0.5/2$ ^[4];影像学方面:CT、MRI 在兔脑出血造模评价中较常应用^[33],影像学中可见到异常出血灶密度影存在,若与进针部位相符,即可证明血肿存在,优点是无创、快速、便捷,并可通过影像测量计算血肿体积,多采用 Tada 公式(出血量 = 长 $\times$ 宽 $\times$ 高 $\times 0.5$)^[12];病理方面:评价脑出血造模成功与否的金标准,兔断头取脑,脑组织置于福尔马林中固定、石蜡包埋、切片、HE 染色,切片可见出血灶内大量变形红细胞,边缘可见炎性细胞,周边可见坏

死神经细胞和胶质细胞,即可通过病理证明兔脑出血造模成功。

3 小结

相比于兔脑出血模型,大鼠脑出血模型更为成熟及在实验中使用数量、分组存在一定的优势,但从手术操作、标本收集、影像学评价、长期预后观察等方面来看,大鼠脑出血模型有局限性,而兔有更大的优势,原因如下:①相比大鼠,兔脑生理解剖更接近人脑,人脑脑出血多发生于基底节区,而兔脑基底节区较为发达,制作基底节区脑出血模型较为方便。②兔脑平均脑容量为 30 g,大鼠平均为 6 g,相差五倍^[34],大鼠脑容积小,造模成功后脑血肿测量及影像学评价较为困难;而兔脑大小适中,便于磁场处理和 CT 扫描^[30],脑出血后影像的变化、脑出血后周围脑组织的灌注、测量脑血肿范围的实验中较常用到兔模型。③兔脑容积大,手术操作、标本收集较为方便,实验中比较脑血肿清除术的效果时常用到兔模型,加之兔静脉表浅,便于采血、监测血清指标及开通静脉通道维持术中生命体征、便于抢救^[4]。④兔性情温和,脑出血多为一侧肢体瘫痪,一般无其他损害,易于长期饲养、观察^[30],可为大型动物(如狗、猴)脑出血建模提供参考依据。

本文中提到的刺破大脑中动脉制作脑出血模型、创伤脑出血模型由于各自的局限性,目前较少用于兔脑出血实验研究。总体来说,自体血注入脑出血模型和胶原酶诱导脑出血模型是兔脑出血实验中两种较为常见的建模方法。如果观察脑出血的早期形成和病理生理变化,则自体血注入法更为合适,如果观察长时间过程的功能预后,则应选择胶原酶诱导模型。在兔脑出血模型的构建中,前者更为经典和成熟,胶原酶诱导的脑出血模型在大鼠脑出血模型的构建中应用相对较为成熟,而在兔脑出血模型建造中应用相对较少,故胶原酶在兔脑出血模型中的应用剂量、注射速度、注射时间、留针时间尚无统一论,可进一步研究探索。

参考文献:

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2014) [J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(6): 435-444.
- [2] Ma Q, Khatibi NH, Chen H, et al. History of preclinical models of intracerebral hemorrhage [M]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(1): 3-8.

- [3] Yu Z, Chen LF, Li XF, et al. A double-injection model of intracerebral hemorrhage in rabbits [J]. J Clin Neurosci, 2009, 16(4): 545-548.
- [4] 张亦波, 张玉林, 陈衍城, 等. 稳定、可控的兔脑内血肿模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(3): 269-271.
- [5] Li G, Sun J, Ma K, et al. Construction of a cerebral hemorrhage test system operated in real-time [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42842.
- [6] Yang L, Liu W, Chen R, et al. *In vivo* bioimpedance spectroscopy characterization of healthy, hemorrhagic and ischemic rabbit brain within 10 Hz-1 MHz [J]. Sensors, 2017, 17(4): 791.
- [7] Sawyer CH, Everett JW, Green JD. The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates [J]. J Comp Neurol, 1954, 101(3): 801-824.
- [8] 景文莉, 张向群, 金学隆. 家兔内囊出血模型制作及出血后颅内压和迷走神经放电变化的研究 [J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(1): 18-21.
- [9] 何纲, 刘茂才. 实验性脑出血动物模型的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2001, 28(2): 80-83.
- [10] Kaufman HH, Pruessner JL, Bernstein DP, et al. A rabbit model of intracerebral hematoma [J]. Acta Neuropathol, 1985, 65(3-4): 318-321.
- [11] 陶胜忠, 苏芳忠, 杨金庆, 等. 兔脑内血肿模型的制作 [J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(6): 674-675.
- [12] Wu G, Jiao Y, Wu J, et al. Rosiglitazone infusion therapy following minimally invasive surgery for intracranial hemorrhage evacuation decreased perihematomal glutamate content and blood-brain barrier permeability in rabbits [J]. World Neurosurg, 2018, 111: e40-e46.
- [13] 牟朝晖, 吴剑, 周和平, 等. 人羊膜上皮细胞移植治疗兔脑出血 [J]. 中华创伤杂志, 2013, 29(11): 1112-1116.
- [14] 张建军, 刘铁. 兔脑出血模型的建立及其方法比较 [J]. 浙江临床医学, 2007, 9(6): 727-728.
- [15] Wu J, Chen J, Guo H, et al. Effects of high-pressure oxygen therapy on brain tissue water content and AQP4 expression in rabbits with cerebral hemorrhage [J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 70(3): 1579-1584.
- [16] Koeppen AH, Dickson AC, Smith J. Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: The benefit of Tin-mesoporphyrin [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(6): 587-597.
- [17] Qureshi AI, Ling GS, Khan J, et al. Quantitative analysis of injured, necrotic, and apoptotic cells in a new experimental model of intracerebral hemorrhage [J]. Crit Care Med, 2001, 29(1): 152-157.
- [18] 陈彦克, 陈衍城. 自发性脑出血动物模型 [J]. 国外医学(脑血管疾病分册), 2004, 12(8): 576-578.
- [19] Rosenberg GA, Estrada E, Kelley RO, et al. Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat [J]. Neurosci Lett, 1993, 160(1): 117-119.
- [20] 刘文博. 电阻抗体层成像(EIT)技术对自发性脑出血实时监护的可行性实验研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2012.
- [21] James ML, Warner DS, Laskowitz DT. Preclinical models of intracerebral hemorrhage: a translational perspective [J]. Neurocrit Care, 2008, 9(1): 139-152.
- [22] 曹云星, 张静, 尹志勇, 等. 兔颅脑棍棒打击伤模型的建立及实验条件探讨 [J]. 军事医学, 2013, 37(12): 914-916, 931.
- [23] 谭源福, 曹美鸿, 刘运生. 减速性脑损伤动物模型的创建 [J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(4): 212-215.
- [24] 袁涛, 刘怀军, 全冠民, 等. 兔闭合性颅脑外伤功能影像学模型的建立 [J]. 中国医学影像技术, 2009, 25(1): 33-35.
- [25] 罗思敏, 冉慕光, 余丹媛, 等. 机械性损伤致脑出血动物模型的建立 [J]. 广东公安科技, 2017, 25(1): 49-52.
- [26] 周玉滕, 李红卫, 石义亨, 等. DSA 介入下制作犬脑出血模型的研究 [J]. 医学影像学杂志, 2005, 15(12): 1092-1095.
- [27] 周璇, 陈力, 李蓓, 等. 超声引导脑出血动物模型的建立及其应用研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2012, 21(4): 340-343.
- [28] 安庆祝, 毛颖, 朱巍. 植入异物法构建自发性脑出血实验动物模型 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50): 9934-9936.
- [29] 周璇. 脑出血动物模型的建立与超声介入实验研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2012.
- [30] 谢青, 郭云琴. 磁场治疗白兔脑出血的安全性及疗效的实验研究 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(8): 459-461.
- [31] Purdy PD, Devous MD, Batjer HH, et al. Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction [J]. Stroke, 1989, 20(10): 1361-1367.
- [32] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [33] 李华兵, 赵瑞峰, 晋记龙, 等. 超高场 3.0T 磁共振敏感加权成像对脑出血的动物实验研究 [J]. 实用医学影像杂志, 2016, 17(6): 504-506.
- [34] 陶胜忠, 苏芳忠, 杨金庆, 等. 兔颅内血肿吸收速度比较及 VWF 的表达 [J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(6): 675-677.

[收稿日期] 2019-06-18

为新药高效研发体系 提供临床前动物实验完善服务



实景图（2016年11月5日航拍图）

合肥半汤生物经济实验区是未名集团投资建设的生物药研发和制造基地，位于安徽省合肥市，占地31平方公里；整个建筑群工程浩大，带状绵延犹如一条巨龙，每栋单个建筑都是一个字母，组合起来看，从左到右8栋建筑组成英文“抗体”即ANTIBODY，将成为世界一流水平的抗体药生产基地；右侧ATCG为基因的四个碱基，作为国家大基因中心；未名实验动物中心位于实验区内（龙尾处），也是中国实验动物联盟的核心基地，占地100亩，中心建筑面积6万平方米，为新药高效研发体系提供临床前动物实验完善服务，建立新药研发临床期前实验的“巴拿马运河”。