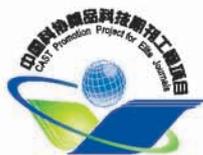


ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

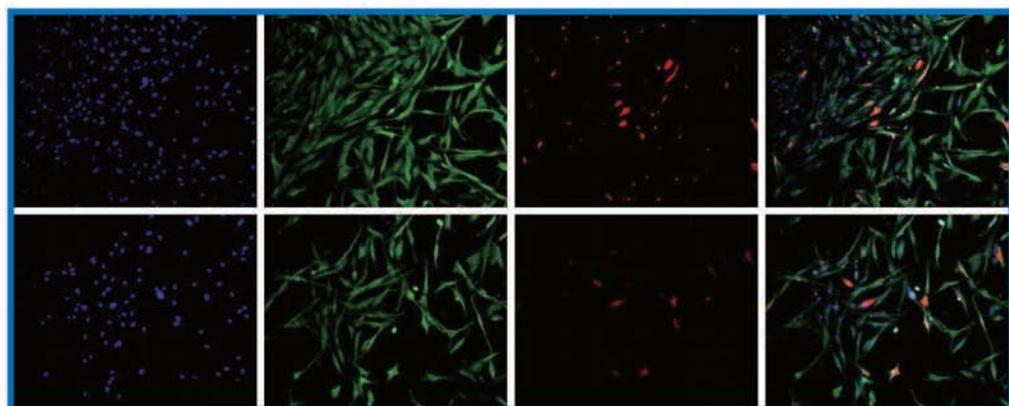


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第27卷 第4期 / Vol.27 No.4



王文广：CA16感染树鼯肺成纤维细胞模型的建立及其受体SCARB2的表达

数据库收录：

中国科学引文数据库CSCD
中文核心期刊要目总览（北大图书馆）
中国科技论文统计源期刊
世界卫生组织西太平洋地区医学索引
中国核心期刊（遴选）数据库
中国学术期刊综合评价数据库
中国生物医学文献数据库
万方数据资源系统中国数字化期刊群
美国化学文摘

主办单位：

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



2019

4

目次

研究报告

- Smad2/3a 对斑马鱼神经嵴细胞标记基因 *crestin* 表达的影响..... 李丽芳,陈露西,贾顺姬,颜光玗(415)
- 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制 付鹏宇,胡扬,李燕春,于加倍,朱榕鑫,贾杰,龚丽景(423)
- 裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因的分子进化及低氧诱导表达 吴蓉蓉,晁燕,赵永丽,陈祺昌,郑志琴,夏明哲,祁得林(433)
- 慢性 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6J 小鼠肺组织炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响 丁世彬,高丽云,李玉春,卜勇军,张国富(444)
- 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点 谭启钊,牛国栋,赵振达,李思维,宋纯理,冷慧杰(450)
- 树鼯 *PSEN1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析* 李明学,王文广,李娜,匡德宣,仝品芬,黄鑫,黎晓慧,孙晓梅,陆彩霞(456)
- 树鼯背部肌肉植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能* 蒋学泉,张文云,李娜,何武书,和丽佳,袁艳波(466)
- 非人灵长类个性化麻醉方案的探讨* 周智刚,段志刚,王宏,龚南南,刘杰,陈兴龙,卓艳,周引,张婷,陈永昌(473)
- CA16 感染树鼯肺成纤维细胞模型的建立及其受体 SCARB2 的表达* 王文广,匡德宣,李娜,陆彩霞,罕园园,仝品芬,孙晓梅,代解杰(479)
- 基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的大鼠外周痛感觉调控机制 杜俊英,房军帆,项璇儿,徐子童,方剑乔(485)
- 利用 CRISPR-Cas9 敲除 *Tyr* 基因制作白化 C57BL/6N 小鼠 常秋荣,刘丽丽,王会阳,付丽,邢凤英,李垚,陈学进,李善刚(493)
- 莫扎特 K448 奏鸣曲高频段声波对小鼠抑郁模型干预治疗的分析 李彦霖,谭思然,何丽雯,曹科,张倩,谭冬梅,谭毅(501)
- 中国仓鼠自发性 2 型糖尿病基础代谢特征及相关基因的表达差异 王璐,张锐虎,王晨阳,余婧婧,宋国华,王春芳,陈朝阳(508)

利用正交试验优化建立大鼠条件恐惧记忆模型 ... 郭冷秋,郭壮丽,朱霄,周蕾,王梦楠,张立光,周扬(516)

无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* 双转基因小鼠模型建立及脑内斑块变化初步观察..... 朱华,郭亚茜,杜晓鹏,李卓,秦川(521)

精神依赖性海洛因对大鼠胚胎发育和脑组织 Bax 表达的影响 俞发荣,李建军,连秀珍,李登楼,谢明仁(527)

复方太子参止咳益气散治疗大鼠哮喘的机制探讨 赵晨,赵娇,赵晓波,白燕,金润铭(532)

研究进展

治疗脊髓损伤之建立星形胶质细胞模型的研究进展 杜凯然,邓强,张彦军,朱宝,马同,彭冉东,李军杰,徐浩军,王雨榕,郭挺(540)

结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植动物模型的研究进展 乔大伟,李玉芳,张蕾,姜礼双,孔桂美,卜平(545)

广告 (彩插 1-5)

* :非人灵长类动物模型研究及其应用

| | |
|---|--|
| <p>主 管 中国科学技术协会</p> <p>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</p> <p>主 编 秦川</p> <p>编辑部主任 李继平</p> <p>编 辑 《中国实验动物学报》编辑部</p> <p>出 版 《中国实验动物学报》编辑部</p> <p>发 行 《中国实验动物学报》编辑部 100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号 电话:010-67779337 传真:010-67770690 E-mail:bjb@cnilas.org http://zgsydw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx</p> <p>本期执行主编 黄 韧</p> <p>本期专题组织 代解杰</p> <p>本期责任编辑 郭梦征 李继平</p> | <p>照 排 同方知网(北京)技术有限公司</p> <p>印 刷 北京博海升彩色印刷有限公司</p> <p>邮发代号 2-748</p> <p>广告发布登记 京朝工商广登字 20170142 号</p> <p>定 价 每期 50.00 元,全年 300.00 元</p> <p>中国标准连续出版物号 <u>ISSN 1005-4847</u> <u>CN 11-2986/Q</u></p> <p>2019 年版权归中国实验动物学会所有 本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。 本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com</p> |
|---|--|

CONTENTS

- Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker *crestin* in zebrafish
..... *LI Lifang, CHEN Luxi, JIA Shunji, YAN Guangyu* (415)
- Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia
..... *FU Pengyu, HU Yang, LI Yanchun, YU Jiabei, ZHU Rongxin, JIA Jie, GONG Lijing* (423)
- Molecular evolution and hypoxia-induced mRNA expression of *Hif- α* in schizothoracine fish
..... *WU Rongrong, CHAO Yan, ZHAO Yongli, CHEN Qichang, ZHENG Zhiqin, XIA Mingzhe, QI Delin* (433)
- Effects of chronic PM_{2.5} exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice
..... *DING Shibin, GAO Liyun, LI Yuchun, BU Yongjun, ZHANG Guofu* (444)
- Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat osteoarthritis models
..... *TAN Qizhao, NIU Guodong, ZHAO Zhenda, LI Siwei, SONG Chunli, LENG Huijie* (450)
- Cloning and characterization of presenilin 1 in the Chinese tree shrew *LI Mingxue,*
WANG Wenguang, LI Na, KUANG Dexuan, TONG Pinfen, HUANG Xin, LI Xiaohui, SUN Xiaomei, LU Caixia (456)
- Biological properties of porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscle of tree shrew ...
..... *JIANG Xuequan, ZHANG Wenyun, LI Na, HE Wushu, HE Lijia, YUAN Yanbo* (466)
- Exploration of an individualized anesthesia method for non-human primates
..... *ZHOU Zhigang, DUAN Zhigang, WANG Hong,*
GONG Nannan, LIU Jie, CHEN Xinglong, ZHUO Yan, ZHOU Yin, ZHANG Ting, CHEN Yongchang (473)
- Establishment of a tree shrew lung fibroblast model of CA16 infection and the expression of its receptor SCARB2
..... *WANG Wenguang,*
KUANG Dexuan, LI Na, LU Caixia, HAN Yuanyuan, TONG Pinfen, SUN Xiaomei, DAI Jiejie (479)
- Regulation mechanism of peripheral pain sensation in rats based on the interaction between TRPV1 and P2X3 ...
..... *DU Junying, FANG Junfan, XIANG Xuaner, XU Zitong, FANG Jianqiao* (485)
- Knockout of *Tyr* gene by CRISPR-Cas9 to produce albino C57BL/6N mice *CHANG Qiurong,*
LIU Lili, WANG Huiyang, FU Li, XING Fengying, LI Yao, CHEN Xuejin, LI Shangang (493)

Treatment with the high frequency of Mozart K448 in a mouse model of depression
..... *LI Yanlin, TAN Siran, HE Liwen, CAO Ke, ZHANG Qian, TAN Dongmei, TAN Yi*(501)

Characteristics of basal metabolism and expression of related genes in spontaneous type 2 diabetic Chinese hamster
..... *WANG Lu,*
..... *ZHANG Ruihu, WANG Chenyang, YU Jingjing, SONG Guohua, WANG Chunfang, CHEN Zhaoyang*(508)

Optimization of a rat model of conditioned fear memory using an orthogonal design
..... *GUO Lengqiu, GUO Zhuangli, ZHU Xiao, ZHOU Lei, WANG Mengnan, ZHANG Liguang, ZHOU Yang*(516)

Establishment of germ free *APP^{swe}/PS1 Δ E9* transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain
..... *ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LI Zhuo, QIN Chuan*(521)

Effects of heroin on embryonic development and Bax expression in embryonic rat brain tissue
..... *YU Farong, LI Jianjun, LIAN Xiuzhen, LI Denglou, XIE Mingren*(527)

Exploration of the mechanism of Taizishen Zhike Yiqi Powder in the treatment of asthma in rats
..... *ZHAO Chen, ZHAO Jiao, ZHAO Xiaobo, BAI Yan, JIN Runming*(532)

Advances in the establishment of astrocyte models for spinal cord injury *DU Kairan, DENG Qiang,*
..... *ZHANG Yanjun, ZHU Bao, MA Tong, PENG Randong, LI Junjie, XU Haojun, WANG Yurong, GUO Ting*(540)

Progress in research on animal models of colorectal cancer with liver metastasis generated by patient-derived tumor
xenograft *QIAO Dawei, LI Yufang, ZHANG Lei, JIANG Lishuang, KONG Guimei, BO Ping*(545)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

LI Jiping(李继平)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: 010-67779337
Fax: 010-67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

**Copyright 2019 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences**

李丽芳,陈露西,贾顺姬,等.Smad2/3a对斑马鱼神经嵴细胞标记基因 *crestin* 表达的影响[J].中国实验动物学报,2019,27(4):415-422.

Li LF, Chen LX, Jia SJ, et al. Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker *crestin* in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):415-422.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.001

Smad2/3a对斑马鱼神经嵴细胞标记基因 *crestin* 表达的影响

李丽芳^{1#}, 陈露西^{2#}, 贾顺姬^{2*}, 颜光玗^{1*}

(1. 南方医科大学基础医学院, 发育生物学教研室, 广州 510515;
2. 清华大学生命科学学院, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100084)

【摘要】 目的 探讨 Smad2/3a 对脊椎动物神经嵴细胞发育的影响。方法 通过在斑马鱼胚胎单细胞时期显微注射 *smad2/3* 吗啉环修饰的反义寡核苷酸的方法, 特异性敲降 *smad2/3* 基因的表达, 至胚胎发育至 6 体节, 利用整胚原位杂交检测神经嵴细胞特异性标记基因 *snail1b*, *sox10*, *foxd3* 和 *crestin* 的表达情况; 通过 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 显微注射的方法过表达 *smad2* 和 *smad3a*, 同样利用整胚原位杂交检测神经嵴细胞特异性标记基因 *crestin* 的表达情况; 通过过表达 *casmad2* 及 *smad3a* 对下调 *smad2* 和 *smad3a* 的胚胎进行挽救。结果 *smad2/3a* 被敲低后, *crestin* 的表达量显著降低, 而 *snail1b*, *sox10* 和 *foxd3* 的表达量无明显变化。*smad3b* 被敲低后, *crestin*, *snail1b*, *sox10* 和 *foxd3* 的表达量均无明显变化; 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 均可导致 *crestin* 的表达量增高; 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可挽救由于 *smad2/3a* 敲降所造成 *crestin* 的低表达量。结论 Smad2 和 Smad3a 对神经嵴细胞标记基因 *crestin* 的表达具有重要作用。

【关键词】 Smad2/3a; 斑马鱼; 神经嵴细胞; *crestin*

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0415-08

Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker *crestin* in zebrafish

LI Lifang^{1#}, CHEN Luxi^{2#}, JIA Shunji^{2*}, YAN Guangyu^{1*}

(1. Department of Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.

2. State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084)

Corresponding author: JIA Shunji. E-mail: jiasj@mail.tsinghua.edu.cn; YAN Guangyu. E-mail: kuangyuyen@smu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the function of Smad2/3a on vertebrate neural crest cell development. **Methods** Knock-down of *smad2/3* and overexpression of *casmad2* and *smad3a* were achieved by microinjection of antisense morpholino (MO) and mRNA into one-cell stage embryos, respectively. Then, the expression of *snail1b*, *sox10*, *foxd3*, and *crestin* in MO-injected embryos and *crestin* in mRNA-injected embryos at the 6-somite stage were detected using whole-mount *in situ* hybridization. *casmad2* mRNA and *smad3a* mRNA were used to rescue *smad2* and *smad3a* morphants. **Results** Knockdown of *smad2* and *smad3a* resulted in a remarkable downregulation of *crestin*, while there were no obvious changes in the expression of *snail1b*, *sox10*, or *foxd3* in the *smad2/3a* morphants. Knockdown of *smad3b* did not inhibit the expression of

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31522035, 31371460, 31522031, 31571526)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31522035, 31371460, 31522031, 31571526)。

【作者简介】 李丽芳(1993—)女, 硕士研究生。研究方向为斑马鱼胚胎早期发育。Email: lilf_16@163.com; 陈露西(1989—)女, 博士。研究方向为斑马鱼胚胎早期发育。Email: lucychen1234@hotmail.com。#共同第一作者

【通信作者】 贾顺姬(1982—)女, 副研究员。研究方向为斑马鱼胚胎发育。Email: jiasj@mail.tsinghua.edu.cn; 颜光玗(1975—)女, 教授, 博士生导师。研究方向为表观遗传、造血发育。Email: kuangyuyen@smu.edu.cn。*共同通讯作者

crestin, *snail1b*, *sox10*, or *foxd3*. Overexpression of *casmd2* and *smad3a* led to an upregulation of *crestin*. Overexpression of *smad2* and *smad3a* restored the reduction of *crestin* expression caused by *smad2* and *smad3a* depletion. **Conclusions** Smad2 and Smad3a play key roles in the regulation of expression levels of *crestin* during neural crest cell development.

【Keywords】 Smad2/3a; zebrafish; neural crest cell; *crestin*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

TGF- β 超家族参与调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡,在胚胎发生以及组织器官稳态维持的过程中发挥了至关重要的作用^[1]。TGF- β 信号传递可以通过 SMAD 信号通路^[2] 和/或 DAXX 信号通路^[3]。SMAD 信号通路的转导主要是通过膜外的 TGF- β 配体结合位于膜上的 TGF- β II 型受体,活化的 TGF- β II 型受体招募、结合并磷酸化 TGF- β I 型受体,激活的 TGF- β I 型受体磷酸化下游的受体调控型 Smads (R-Smads),磷酸化的 R-Smads 与 Smad4 形成复合体进入细胞核,与各种转录因子结合来调节下游目的基因的表达^[4]。哺乳动物中,R-Smads 包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 和 Smad8,这些蛋白包含两个保守的结构域,MH1 和 MH2。N 端的 MH1 结构域主要与 DNA 结合,C 端的 MH2 结构域对于互作蛋白的结合至关重要^[5]。TGF- β 超家族包括 TGF β 1、TGF β 12、TGF β 13、激活素(activins)、抑制素(inhibins)、Nodal、骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) 和生长分化因子(GDFs)等^[1],其中 Nodal 信号在脊椎动物中内胚层诱导、神经诱导和神经板的前后分化、左右不对称以及背腹轴的形成过程中具有非常重要的作用^[6]。Nodal 信号的转导依赖于下游效应因子 Smad2 和 Smad3。在小鼠中,Smad2 缺失的小鼠不能形成前端内脏内胚层(AVE)^[7],不能形成 A-P 轴^[8]。smad3 突变小鼠体型偏小,有前肢畸形的表型^[9],存在黏膜免疫缺陷,但仍可存活至成年^[10]。小鼠胚胎成纤维细胞中 smad3 缺失导致其不能形成 Smad-DNA 复合物,进而不能响应 TGF- β 信号,从而调控下游基因的转录^[9]。smad2 和 smad3 双纯合突变体不能形成中胚层和进行原肠作用^[11]。在斑马鱼中,目前没有 smad2/3 纯合突变体,但表达其显性抑制形式(*dnsmad2*、*dnsmad3a* 和 *dnsmad3b*)会导致中内胚层发育缺陷,过表达 smad3 会促进神经诱导以及神经外胚层的后部化^[12]。目前这些研究主要集中在 Smad2 和 Smad3 在中内胚层诱导以及前后轴线形成中的作用,但 Smad2/3 是否在神经嵴的发育过程中起作用,目前尚无相关报道。

神经嵴起源于神经外胚层和表皮外胚层交界

的双侧结构域。当神经外胚层汇聚到中线形成神经管后,神经嵴细胞经历上皮-间充质细胞转换,在沿着神经管的背外侧形成一个离散的间充质细胞群,随后以固定的时间和空间模式向特定组织部位迁移,最终形成多种分化的细胞类型,包括周围神经元、胶质细胞、色素细胞和颅面骨骼细胞等^[13]。神经嵴细胞的诱导发生主要受到 BMP、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、Wnt、Notch 等多种信号的调节^[14]。这些信号以及其他转录因子,共同组成基因调控网络,调控神经嵴的早期诱导发生、神经嵴祖细胞的维持、神经嵴祖细胞的上皮间充质转换以及通过不同通路向特定细胞的分化过程等。其中,Foxd3 和 Snail 在早期诱导完成到神经嵴边界祖细胞确定过程中发挥了重要作用,同时其与 Sox9 共同在神经嵴祖细胞多能性维持以及祖细胞从神经管分离过程有一定的功能。此外,Sox9 还与 Sox10 在神经嵴细胞终末分化过程中有作用^[15]。这些转录因子是神经嵴细胞的标记基因,仅在迁移前神经嵴细胞中表达^[16]。与这些基因不同,*crestin* 在神经嵴前体细胞以及分化细胞中均有表达,其可以被用来较灵敏地评估神经嵴细胞或多或少的变化^[13]。

目前,有一些研究结果提示 Smad2 以及 Smad3 可能在神经嵴细胞的发育中存在一定的功能,如:斑马鱼胚胎中 *smad3a* 在迁移的躯干神经嵴细胞中表达^[17],小鼠胚胎中 *smad2* 杂合突变可导致颅面缺损^[18]等。本研究以斑马鱼作为模式动物,利用吗啉环修饰的反义寡核苷酸(antisense morpholino oligonucleotide, MO)技术敲降斑马鱼 *smad2* 和 *smad3* 基因的表达,通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因的表达来初步探究 Smad2/3 在神经嵴细胞发育过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验中所用到的斑马鱼品系为 Tuebingen (TU)。野生型胚胎置于 Holtfreter 水(0.025 g/L 碳

酸氢钠, 0.1 g/L 无水氯化钙, 0.05 g/L 氯化钾, 3.5 g/L 氯化钠, pH 值 6.8~7.2) 中, 于 28.5°C 培养至特定时期。

1.1.2 主要试剂和仪器

RNeasy Mini 纯化回收试剂盒(Qiagen, # 74104, 美国), DNA 纯化回收试剂盒(# DP214, 天跟生化科技有限公司, 北京), GoScript 随机引物反转录试剂盒(Promega, # A2790, 北京照生莱博商贸有限公司), mMESSAGE mMACHINE T7/SP6 转录酶试剂盒(Ambion, # AM1345/AM1340, 美国), 地高辛标记 RNA 试剂盒(Roche, # 11175025910, 美国), BamH I (NEB, # R3136S, 美国), Not I (NEB, # R3189S, 美国), 封闭剂(Roche, # 11096176001 美国), 左旋咪唑(Sigma, # 16595-80-5, 美国), 地高辛抗体(Roche, # 11093274910), BM Purple AP (Roche, # 11442074001, 美国), 徕卡体视显微镜(M125 C, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸的设计与合成

根据 *smad2* 的前体 mRNA 序列设计 2 个反义寡核苷酸, 其中 MO1 序列位于第 4 个外显子和第 4 个内含子的交接处, MO2 序列位于第 4 个内含子和第 5 个外显子交接处。序列分别为 *smad2*-MO1 (简称 *smad2* SM1): 5'-CAATTTCCATACCTGGTG TCTCCAC-3', *smad2*-MO2 (简称 *smad2* SM2): 5'-AAGAACTACAGGAGAGAAGATTA-3'。MO 由 GeneTools 公司合成, 合成好的 MO 粉末用无核酸酶的纯水溶解成 20 μg/μL 的贮液, -80°C 冻存。使用时将 MO 稀释到合适浓度进行显微注射。*smad3a/b* MO 和 *p53* MO 的序列和信息详见已报道的文献^[12]。

1.2.2 检测 MO 效率的引物设计

根据斑马鱼 *smad2* 基因的核酸序列, 分别在 MO 所在区域的上下游约 150 bp 处设计检测引物。同时为了确定 *smad2* SM1 和 *smad2* SM2 共同注射是否会使得敲降效率更高, 上游引物设计在第 3 个外显子, 下游引物位于第 6 个外显子。阳性对照引物位于第 2 个外显子上。序列信息如表 1 所示。

1.2.3 胚胎总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

本研究使用 RNeasy Mini 试剂盒提取胚胎总 RNA, 其后使用随机引物反转录试剂盒制备 cDNA。提取总 RNA 需取 15~30 枚处于 6 体节时期经过不同处理的胚胎, 用蛋白酶脱去绒毛膜, 再用 DEPC 水

清洗两次后, 加入 600 μL 裂解液 RLT 和 24 μL 二硫苏糖醇(DTT, 1 mol/L), 涡旋振荡使细胞充分裂解, 直至无肉眼明显可见的颗粒。后续的详细步骤以及 cDNA 合成步骤参见产品说明书。

表 1 *smad2* MO 有效性验证的引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences for *smad2*

| MO validity detection | |
|-----------------------|--|
| 引物名称 Primer names | 核酸序列(5' to 3') Nucleic acid sequences |
| SM1-FP | GACGGGCGTTTGAAGTGTCTC |
| SM1-RP | GAGACAAGTGACGTCACCTCAATAATGGG |
| SM2-FP | TAGAGCAACTGCGCCGTCATAGCAATG |
| SM2-RP | GCTCGATCCCTGTTGGGAAGTTGG |
| MO-FP | CGATAGAACAGTGGGATACCTCAGG |
| MO-RP | GATTCATTTGCTGGTCACTGGCC |
| ctrl-FP | CTCCCCATTCTCTAGCCTCCATCTG |
| ctrl-RP | TGCTGTTGCGGTTTGTGTGGTG |
| <i>actin</i> -FP | ATGGATGATGAAATTGCCGCAC |
| <i>actin</i> -RP | ACCATCACCAGAGTCCATCACC |

1.2.4 体外合成 mRNA 及纯化回收

用于体外合成 *casmd2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 的质粒信息详见之前的报道^[12, 19]。提取 12 μg 质粒用相应的限制性内切酶切割, 纯化后获得线性化 DNA 模板, 然后体外合成 mRNA, 并将 mRNA 纯化回收, 于 -80°C 保存。体外合成 mRNA 及 mRNA 的纯化回收的具体步骤参见产品说明书。

1.2.5 MO 和 mRNA 的显微注射

smad2 SM1 的注射剂量为 5 ng, SM2 的注射剂量为 5 ng; *smad3a/b* MO 的注射剂量均为 5 ng; *p53* MO 的注射剂量为 5 ng; *casmd2* mRNA 的注射剂量为 5 pg; *smad3a* mRNA 的注射剂量为 20 pg。将合成的 MO 及 mRNA 注射到斑马鱼单细胞时期的受精卵中, 待胚胎发育至 6 体节时, 用蛋白酶脱去绒毛膜, 甲醛固定过夜后, 梯度脱水(25%, 50%, 100%, 100%)于甲醇中, -20°C 保存备用。

1.2.6 斑马鱼整胚原位杂交

选取 *crestin*, *snail1b* 和 *foxd3* 基因靠近 3' UTR 区域的一段 cDNA 序列作为探针的模板。设计引物用于模板的扩增, 其中下游引物 5' 端有 T7 启动子序列, 序列信息如表 2 所示。扩增后的产物经回收后可直接用于合成地高辛标记的反义 RNA 探针。合成的探针用原位杂交液 HYB⁺(50% 甲酰胺, 5 × SSC, 0.1% Tween-20, 0.5 mg/mL 酵母 RNA, 0.05 mg/mL 肝素)稀释到 1.5% 使用。探针使用之前, 需于 72°C 变性处理 10 min。sox10 探针的序列信息详见已报道的文献^[20]。

杂交第 1 天,取大约 30 枚胚胎到无核酸酶的 EP 管中,用配制在 DEPC 水中的 PBST 溶液梯度水化,水化后置换成 1 mL 4% 多聚甲醛,室温固定 20 min。然后用 1 mL PBST 溶液洗涤二次,每次 5 min。吸走 PBST 溶液,加入 300 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 HYB⁻ (50% 甲酰胺, 5 \times SSC, 0.1% Tween-20) 溶液, 65 $^{\circ}$ C 放置 5 min; 再置换成 300 μ L HYB⁺ 溶液, 65 $^{\circ}$ C 预杂交 3~4 h。将探针稀释, 于 72 $^{\circ}$ C 变性 10 min 后, 立即置于冰上, 用 100 μ L 探针稀释液置换 HYB⁺ 溶液, 65 $^{\circ}$ C 水浴杂交 12~16 h。第 2 天吸出探针, -20 $^{\circ}$ C 保存并可重复使用。胚胎用洗液 I (50% 甲酰胺, 2 \times SSC, 0.1% Tween-20) 65 $^{\circ}$ C 洗 2 次, 每次 30 min, 之后置换成 2 \times SSCT 溶液于 65 $^{\circ}$ C 洗涤胚胎 15 min。然后依次用 0.2 \times SSCT 溶液和 0.02 \times SSCT 溶液洗涤胚胎 4 次, 每个浓度两次, 每次 30 min。然后置换成 MABT 溶液, 室温放置 5 min, 重复一次后, 换成封闭液 (灭活山羊血清、10% 封闭剂和 MABT 按照

1:2:7 比例混合), 室温孵育 1 h。之后, 置换成抗体孵育液 (碱性磷酸酶标记的地高辛抗体按 1:3000 的比例稀释于封闭液中), 4 $^{\circ}$ C 孵育 12~16 h。第 3 天, 吸走抗体孵育液, 加入含 10% 灭活山羊血清的 MABT 溶液, 室温摇动 30 min; 置换成 MABT 溶液, 摇动 30 min, 再重复 2 次, 时间依次为 1 h 和 30 min。之后置换成染色缓冲液 (100 mmol/L 氯化钠, 50 mmol/L 氯化镁, 100 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L 左旋咪唑和 0.1% Tween-20), 室温放置 5 min, 重复 3 次。然后将胚胎转移至 48 孔板中, 除去染色缓冲液, 加入 200 μ L 底物, 用锡箔纸包裹后于室温反应。每 30 min 取出观察显色结果。待显色充分后, 吸走底物, 用 PBST 溶液洗涤两次, 然后置换成 4% 多聚甲醛, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜以终止反应。用 PBST 溶液洗涤胚胎两次后, 置换成甘油, 待胚胎完全浸润后在徕卡体式显微镜下进行拍照。

表 2 合成探针模板的引物名称及序列

Table 2 Primer names and sequences of the synthetic probe templates

| 引物名称 Primer names | 核酸序列 (5' to 3') Nucleic acid sequences |
|--------------------|---|
| <i>crestin</i> -FP | GAGAAGCCCTCATCAGAGAGTTTG |
| <i>crestin</i> -RP | TAATACGACTCACTATAGGGGTTCCTGTGCAGGCAGAATCAGG |
| <i>snail1b</i> -FP | CGAGGGGATATTACAAAGATGCCACGCTCATTCTCTG |
| <i>snail1b</i> -RP | TAATACGACTCACTATAGGGCATTAGTCACTGAGCGGTGTGTGTCCAC |
| <i>foxd3</i> -FP | AGCGACAGTCCCTGCGAGAGCAAC |
| <i>foxd3</i> -RP | TAATACGACTCACTATAGGGATTGAGAAGGCCATTTCGATACCGCTGCT |

2 结果

2.1 利用 MO 抑制 *smad2* 的表达

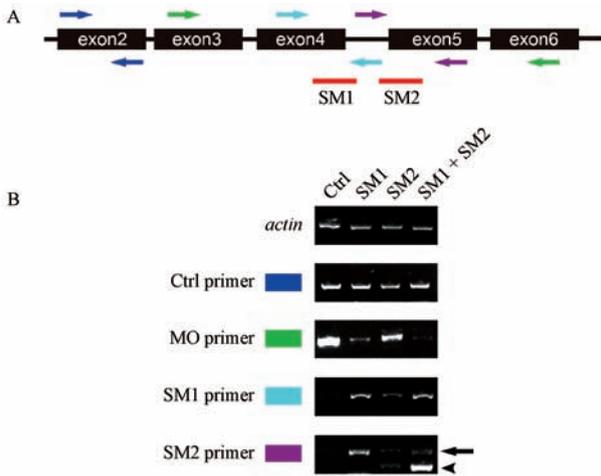
根据 *smad2* 的基因结构, 本研究设计了两条针对性干扰 *smad2* 第 4、5 外显子剪接的 MO, 分别命名为 SM1 和 SM2。为了确定 *smad2* SM1 和 SM2 是否可以干扰其正确剪接过程, 从而下调 *smad2* 基因的表达, 我们提取了未注射和不同注射组胚胎的总 RNA, 反转录得到 cDNA, 并通过不同位置的检测引物对目的片段扩增 (引物位置如图 1A 所示)。

核酸凝胶电泳显示注射 SM1 和 SM2 后, *smad2* 前体 mRNA 的剪接被破坏。其中, *actin* 引物扩增的目的条带大小和亮度在各个样品中一致, 表明各样品间总 RNA 的量一致; 阳性对照引物扩增的条带在各处理组间基本一致, 表明 *smad2* mRNA 的总量变化不大; 与未注射组相比, 在不同 MO 注射组中, MO 引物扩增的目的条带相对较少, 表明 *smad2* 第 4 和 5 号外显子正确剪接的比率降低, 其中 SM1 的效率

高于 SM2, 并且 SM1 与 SM2 共注几乎可以阻止 *smad2* 进行正确剪接; 在 MO 注射组中, SM1 与 SM2 引物扩增出非正确剪接的条带, 表明 4 号内含子被保留下来, 从而干扰正常 *smad2* mRNA 的表达 (如图 1B 所示)。

2.2 *p53* MO 不会影响神经嵴细胞的发育

由于注射 MO 可能会引起 *p53* 信号通路的激活, 进而导致细胞凋亡等非特异性表型的出现^[21]。并且之前的文献表明与 *p53* MO 共同注射可以挽救 *smad3* MO 引起的凋亡表型^[12]。为此, 我们注射 *p53* MO 至单细胞受精卵中, 通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因 *snail1b*, *sox10*, *foxd3* 及 *crestin* 的表达情况。结果显示, 与野生型胚胎相比, 注射 *p53* MO 的胚胎 *snail1b*, *sox10*, *foxd3* 和 *crestin* 的表达量均无明显变化 (图 2), 表明 *p53* 的敲低并不会影响神经嵴细胞的发育。因此, 在接下来的研究中, 为了避免非特异的凋亡现象, 我们注射 *smad2* MO 以及 *smad3a/b* MO 的同时, 均会与同浓度的 *p53* MO 共注射。



注:A. *smad2* SM1/2 有效性验证引物设计示意图。青色引物和紫色引物分别用于检测单独注射 SM1 和 SM2 的有效性,绿色引物用于检测 SM1 和 SM2 共同注射的有效性,蓝色引物作为阳性对照。红色短线标明 SM1 和 SM2 的结合位置。B. DNA 电泳结果显示 SM1/2 对 *smad2* mRNA 剪接正确性的影响。箭头表示目的条带,三角箭头表示新出现的剪接体。

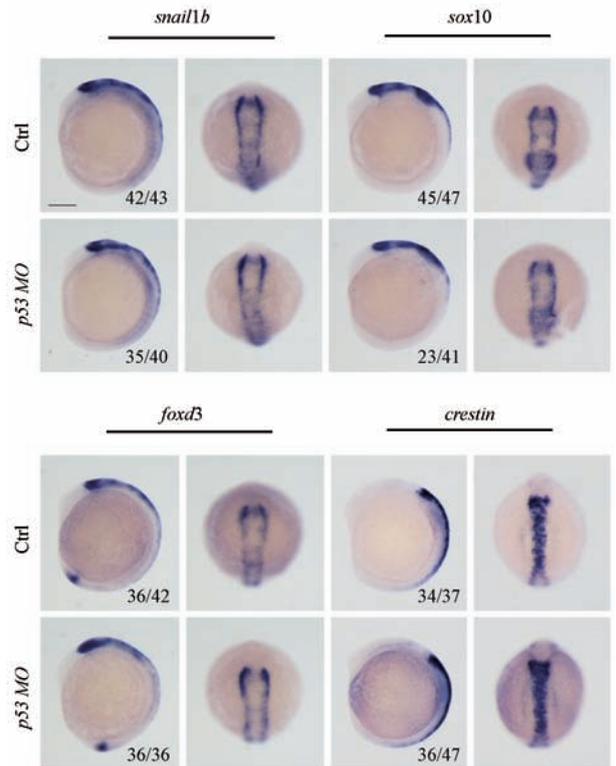
图 1 *smad2* SM1 和 SM2 有效性检测

Note. A. Schematic design of the *smad2* SM1/2 primer validation. Cyan primers and purple primers were used to detect the effectiveness of SM1 and SM2 injection alone, green primers were used to detect the effectiveness of SM1 and SM2 injection together, and blue primers were used as positive control. The red short line indicated the combination position of SM1 and SM2. B. DNA electrophoresis results showed that SM1/2 affected the splicing accuracy of *smad2* mRNA. The arrow represented the target band, and the triangular arrow showed the emerging splice.

Figure 1 Validity detection of the *smad2* SM1 and SM2

2.3 敲低 *smad2/3* 对不同神经嵴细胞标记基因的影响

为了探究 Smad2/3 对神经嵴细胞发育的影响,我们分别将 *smad2* SM1、*smad2* SM2、*smad3a* MO 和 *smad3b* MO 注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中,待胚胎发育至 6 体节时通过原位杂交检测神经嵴细胞标记基因 *snail1b*、*sox10*、*foxd3* 和 *crestin* 的表达情况。原位杂交结果显示,*smad2/3a* 被敲低后,*crestin* 的表达量显著降低,*snail1b*、*sox10* 和 *foxd3* 的表达量无明显变化;*smad3b* 被敲低后,*snail1b*、*sox10*、*foxd3* 和 *crestin* 的表达量均无明显变化(图 3)。*crestin* 是斑马鱼中特异标记所有神经嵴细胞的标志基因,其表达量的显著降低预示 *smad2/3a* 敲低使得神经嵴细胞发育异常。因此,在接下来的实验中,我们选择神经嵴细胞标记基因 *crestin* 作为研究对象探究 Smad2/3a 对神经嵴细胞发育的影响。



注:6 体节时期神经嵴细胞标记基因的原位杂交结果(bar = 200 μ m)。(下图同)

图 2 *p53* MO 不会影响神经嵴细胞的发育

Note. In situ hybridization of marker genes of neural crest cells at 6-somite stage (bar = 200 μ m). (The same in the following figures)

Figure 2 *p53* MO does not affect the development of neural crest cells

2.4 敲低 *smad2/3a* 会特异抑制 *crestin* 表达

为了探究 Smad2 和 Smad3a 对神经嵴细胞发育的影响,我们分别将 *smad2* SM1/SM2 和 *smad3a* MO 注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中,待胚胎发育至 6 体节时检测 *crestin* 的表达情况。原位杂交结果表明 *smad2/3a* 敲低使 *crestin* 表达下降,与前面的结果保持一致(图 4)。为了进一步确定 Smad2 和 Smad3a 对 *crestin* 的影响是否特异,本研究通过体外合成了 *casmd2* mRNA 和 *smad3a* mRNA,分别在单细胞时期注入野生型胚胎,6 体节时通过原位杂交检测 *crestin* 的表达情况。*caSmad2* 是持续激活形式的 Smad2,该突变体不含有 MH1 结构域,其位于羧基端的丝氨酸-甲硫氨酸-丝氨酸(SMS)基序被突变为天冬氨酸-甲硫氨酸-天冬氨酸(DMD)基序,以此来模拟 Smad2 被受体激活的磷酸化状态。之前的研究表明在斑马鱼中,过表达全长的 *smad2* 不会对胚胎造成任何影响,但过表达 *casmd2* 则导致严重的背部化和第二体轴的形成^[17],表明 *caSmad2* 是

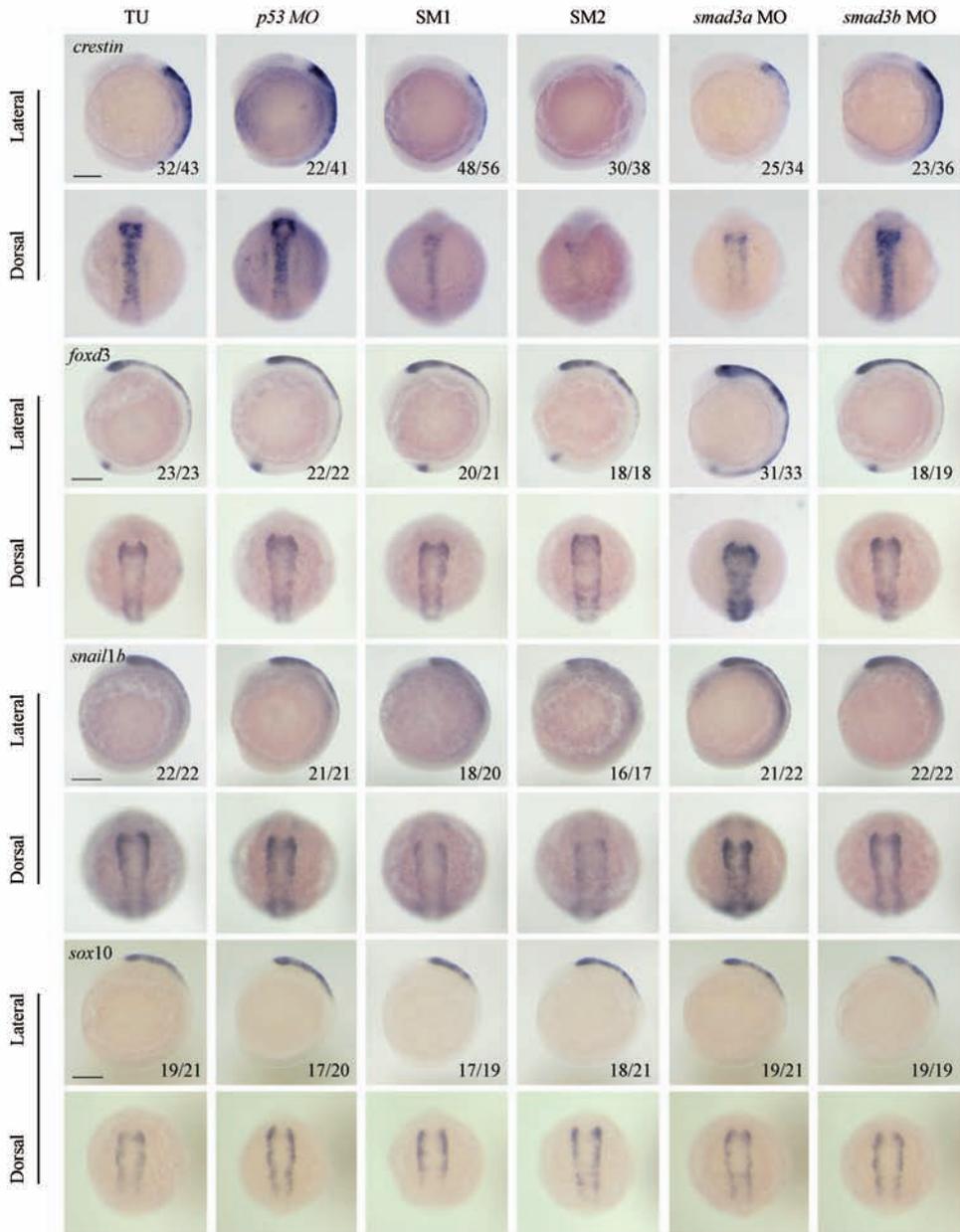


图 3 敲低 *smad2/3a* 对不同神经嵴细胞标记基因的影响

Figure 3 Effect of *smad2/3* knockdown on the expression of marker genes in different neural crest cells

Smad2 的持续激活形式,可以更有效的激活下游信号传导。结果显示,注射了 *casmad2* mRNA 和 *smad3a* mRNA 后,*crestin* 的表达量升高(图 4)。敲低和过表达 *smad2/3a* 对 *crestin* 的表达产生相反的结果,由此我们推测 Smad2/3a 特异性地调控 *crestin* 的表达。

2.5 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可拯救 *smad2/3a* 敲降所导致 *crestin* 的低表达

为了确定 *crestin* 的低表达是由 *smad2* 及 *smad3a* 基因敲降直接造成的,我们分别将 *smad2* SM1/SM2 和 *casmad2* mRNA 及 *smad3a* MO 和

smad3a mRNA 共注射到野生型斑马鱼单细胞期的受精卵中。待胚胎发育到 6 体节时,通过原位杂交检测 *crestin* 的表达是否被挽救。结果显示,与单独注射 MO 的胚胎相比,MO 和 mRNA 共注射胚胎中 *crestin* 的表达量基本可以回归到野生型胚胎的水平(图 5),进一步表明 Smad2 和 Smad3a 在神经嵴细胞的发育过程中特异性地调控 *crestin* 的表达。

3 讨论

神经嵴起源于神经板的边界,其诱导发生、分化和迁移受到一系列转录因子的调控,如 Snail,

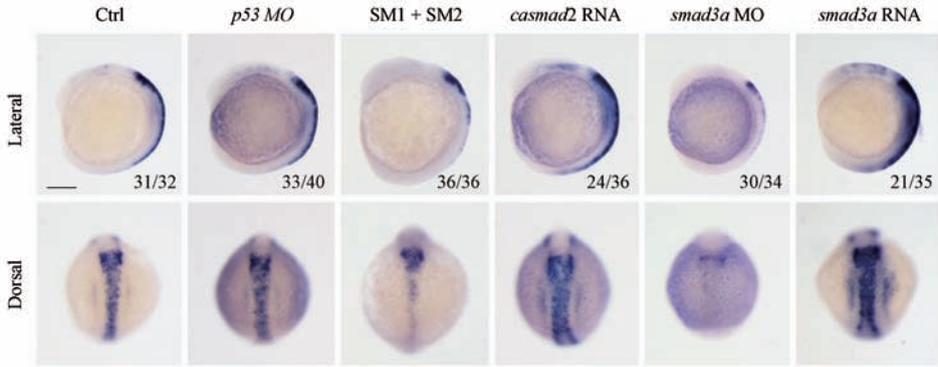


图 4 *smad2/3a* 特异性地调控 *crestin* 的表达

Figure 4 *smad2/3a* specifically regulates the expression of *crestin*

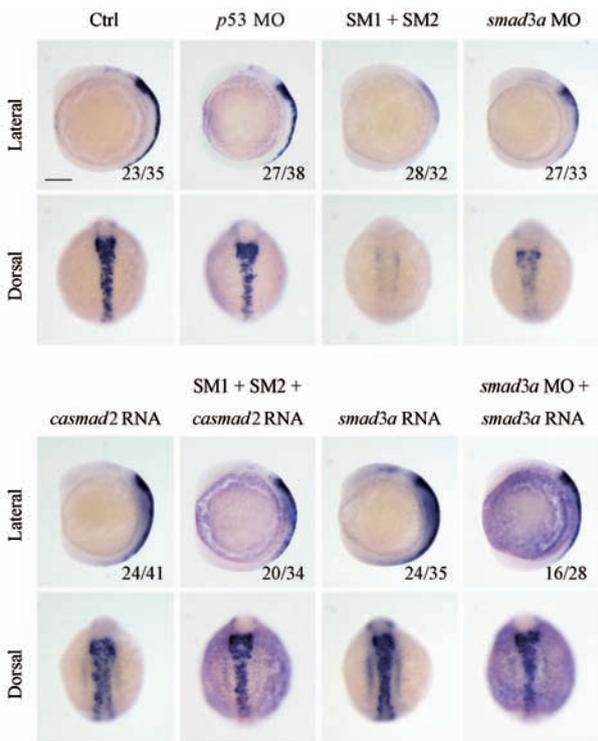


图 5 过表达 *casmad2* 和 *smad3a* 可拯救 *smad2/3a* 敲降所导致 *crestin* 的低表达

Figure 5 Overexpression of *casmad2* and *smad3a* rescues the down-regulation of *crestin* caused by *smad2/3a* MO injection

Sox9, Sox10, Foxd3 等^[16]。Foxd3 在维持神经嵴细胞祖细胞未分化状态发挥了重要作用, *foxd3* 突变体胚胎存在严重的颅面畸形、色素较少的表型, 其缺失导致 *sox10*, *sox9b*, *snail1b* 和 *crestin* 的表达均下调^[22]。Sox9b 对颅骨神经嵴细胞迁移过程有影响, 缺失 *sox9b* 导致胚胎仅有较少的软骨细胞, 而且 *sox9b* 的表达减少或增加都会影响 *sox10*, *snail1b*, *foxd3* 和 *crestin* 的正常表达^[23]。Sox10 在躯干和迷走神经嵴细胞分化迁移过程中有一定的作用, 缺失 *sox10* 的突变体胚胎缺乏色素, 神经嵴细胞在迁移过

程中凋亡^[24]。Snail1b 表达量的增加或减少导致神经嵴区域增加或神经嵴细胞分化迁移受阻, 同时 *snail1b* 可直接调控神经嵴细胞的上皮间充质转换过程, 进而影响神经嵴细胞的发育^[25]。本研究结果显示敲低 *smad2/3a* 后, 6 体节时期胚胎中 *foxd3*, *snail1b* 和 *sox10* 的表达量变化并不明显, 可能是因为 Smad2/3a 对于这些转录因子并没有直接调控作用, 或者是需要其他信号通路的协同作用, 单一信号通路的抑制并不会使这些转录因子的表达受到明显影响。而 *crestin* 有可能可以受到 *smad2/3a* 的直接调控。当然, 要更进一步探究 Smad2/3a 对神经嵴细胞发育的影响, 如对色素细胞、软骨细胞等形成的调控, 我们需收集 10~12 体节甚至更晚时期 *smad2/3a* 敲低、甚至是相应基因敲除的胚胎, 检测上述神经嵴细胞标记基因及下游分化细胞标记基因的表达, 确定 Smad2/3a 在神经嵴细胞发育中的功能。

smad2/3a 的表达被敲低后, *crestin* 的表达显著降低, 而且这种低表达可以被 *smad2/3a* 的过表达所挽救, 意味着 *smad2/3a* 调控 *crestin* 的表达是特异地, 为此我们通过生物信息学手段分析了 *crestin* 的启动子序列, 发现 *crestin* 启动子序列中存在着 Smad2/3a 的潜在结合区, 说明 Smad2/3a 可能通过与 *crestin* 启动子直接相互作用, 从而调控 *crestin* 的表达, 这种相互作用需要进一步的 ChIP 实验来验证。此外, 之前的研究表明在 *crestin* 的启动子区域存在包含 *sox10* 在内的多个转录因子结合位点, 突变 *sox10* 结合位点导致转基因鱼 *Tg(crestin:EGFP)* 的绿色荧光表达显著降低, 说明 *crestin* 受到 *sox10* 等多种神经嵴转录因子的调控^[26]。经过分析, 我们确实发现在 *crestin* 启动子区还存在 Sox 家族蛋白的潜在结合位点, 说明 Sox 可能作为上游调控因子参与调控 *crestin* 的表达。在爪蟾中, Smad3 与含有高迁移率 (HMG) 结构域的淋巴增强剂结合因子 1/T 细胞特异性因子 (LEF1/

TCF)存在物理相互作用^[27],而 Sox9 是含有 HMG 域的转录因子,提示 Smad3a 可能与 Sox9b 存在相互作用,共同调控 *crestin* 的表达,但这需要通过免疫共沉淀实验来证明。

斑马鱼胚胎神经嵴细胞的发育受一系列信号通路和转录因子的调控,其中任何一因子功能的缺失都会导致胚胎发育异常。本研究首次证实 Smad2/3a 对神经嵴细胞特异性标记基因 *crestin* 的表达有调控作用,这为后续进一步研究 Smad2/3a 或其介导的 TGF- β 信号通路在神经嵴细胞发育过程中的功能奠定了基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Keller B, Yang T, Chen Y, et al. Interaction of TGF β and BMP signaling pathways during chondrogenesis [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16421.
- [2] Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471.
- [3] Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, et al. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(8): 708-714.
- [4] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease [J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1350-1358.
- [5] Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus [J]. Cell, 2003, 113(6): 685-700.
- [6] Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation [J]. Development, 2007, 134(6): 1023-1034.
- [7] Brennan J, Lu CC, Norris DP, et al. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo [J]. Nature, 2001, 411(6840): 965-969.
- [8] Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, et al. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo [J]. Cell, 1998, 92(6): 797-808.
- [9] Datto MB, Frederick JP, Pan L, et al. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4): 2495-2504.
- [10] Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF-beta [J]. EMBO J, 1999, 18(5): 1280-1291.
- [11] Dunn NR, Vincent SD, Oxburgh L, et al. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo [J]. Development, 2004, 131(8): 1717-1728.
- [12] Jia S, Ren Z, Li X, et al. smad2 and smad3 are required for mesendoderm induction by transforming growth factor- β /nodal signals in zebrafish [J]. J Biol Chem, 2008, 283(4): 2418-2426.
- [13] Luo R, An M, Arduini BL, et al. Specific pan-neural crest expression of zebrafish Crestin throughout embryonic development [J]. Dev Dyn, 2001, 220(2): 169-174.
- [14] Huang X and Saint-Jeannet JP. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge [J]. Dev Biol, 2004, 275(1): 1-11.
- [15] Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(7): 557-568.
- [16] Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(10): 795-805.
- [17] Dick A, Mayr T, Bauer H, et al. Cloning and characterization of zebrafish smad2, smad3 and smad4 [J]. Gene, 2000, 246(1-2): 69-80.
- [18] Nomura M, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development [J]. Nature, 1998, 393(6687): 786-790.
- [19] Liu X, Xiong C, Jia S, et al. Araf kinase antagonizes Nodal-Smad2 activity in mesendoderm development by directly phosphorylating the Smad2 linker region [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1728.
- [20] Zheng X, Yang S, Han Y, et al. Loss of zygotic NUP107 protein causes missing of pharyngeal skeleton and other tissue defects with impaired nuclear pore function in zebrafish embryos [J]. J Biol Chem, 2012, 287(45): 38254-38264.
- [21] Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, et al. p53 activation by knockdown technologies [J]. PLoS Genet, 2007, 3(5): e78.
- [22] Montero - Balaguer M, Lang MR, Sachdev SW, et al. The mother superior mutation ablates foxd3 activity in neural crest progenitor cells and depletes neural crest derivatives in zebrafish [J]. Dev Dyn, 2006, 235(12): 3199-3212.
- [23] Yan YL, Willoughby J, Liu D, et al. A pair of Sox: distinct and overlapping functions of zebrafish sox9 co-orthologs in craniofacial and pectoral fin development [J]. Development, 2005, 132(5): 1069-1083.
- [24] Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates [J]. Development, 2001, 128(21): 4113-4125.
- [25] Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(10): 795-805.
- [26] Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, et al. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation [J]. Science, 2016, 351(6272): aad2197.
- [27] Labbé E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and Wnt pathways [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000, 97(15): 8358-8363.

付鹏宇,胡扬,李燕春,等. 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制[J].中国实验动物学报,2019,27(4):423-432.

Fu PY,Hu Y,Li YC, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):423 - 432.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.002

低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制

付鹏宇¹,胡扬²,李燕春²,于加倍¹,朱镕鑫^{1,3},贾杰¹,龚丽景^{2*}

(1. 北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084; 2. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084;
3. 上海体育科学研究所,上海 200030)

【摘要】目的 对比低氧暴露和常氧下配对低氧摄食干预(半饥饿状态)下大鼠骨骼肌蛋白质合成和分解相关基因表达的差异,以探讨低氧暴露诱导骨骼肌萎缩发生的可能机制。**方法** SD大鼠分为:①常氧正常饮食组(C组);②低氧正常饮食组(H组),氧气浓度为12.4%;③常氧配对饮食组(P组),投食量即为H组前一天摄食量。4周干预后测量大鼠体成分,取比目鱼肌(SOL)和趾长伸肌(EDL),称量湿重;HE染色观察肌纤维形态,计算肌纤维横截面积(FCSA);WB测试骨骼肌中HIF1 α 、Akt、p-Akt及骨骼肌蛋白合成和分解相关基因蛋白含量。**结果** 1)H组大鼠体重较C组持续下降,P组与C组间无显著性差异;干预初期H组(P组同)摄食量较C组显著下降,后期两组间无差异;2)干预后,H组大鼠体质量和肌肉总量较C组和P组显著性降低,P组与C组间无差异;H组两肌肉湿重较C组显著下降;H组EDL的FCSA显著低于C组和P组;3)H组EDL中HIF1 α 蛋白含量显著高于C组;H组和P组SOL中p-Akt/Akt比值显著低于C组;H组EDL中mTOR、4EBP1蛋白含量显著低于C组,atrogen 1、MuRF1、beclin 1蛋白含量及LC3 II/I比值显著高于C组,H组SOL中MuRF1蛋白含量显著高于C组和P组。**结论** 低氧所致的骨骼肌萎缩由低氧特异性因素诱发,表现为以快肌为主的骨骼肌蛋白合成减少和分解增加,而非低氧下摄食量减少引起。

【关键词】 低氧暴露;骨骼肌萎缩;半饥饿状态;骨骼肌蛋白转化调节;肌肉类型;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0423-010

Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia

FU Pengyu¹, HU Yang², LI Yanchun², YU Jiabei¹, ZHU Rongxin^{1,3}, JIA Jie¹, GONG Lijing^{2*}

(1. College of Human Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084, China.

2. China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084.

3. Shanghai Research Institute of Sports Science, Shanghai 200030)

Corresponding author: GONG Lijing. E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective The aim of this study was to identify the mechanism underlying skeletal muscle atrophy induced by hypoxia exposure. To this aim, expression levels of different types of skeletal muscle protein synthesis- and degradation-related genes were compared between rats that had experienced hypoxic exposure and normoxia in a hypoxic feeding intervention (semi-starvation state). **Methods** SD rats were divided into a normoxic normal diet group (group C), a hypoxic normal diet group (group H; oxygen concentration of 12.4%), or a normoxia-matched diet group (group P;

【基金项目】中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(2017SYS009);国家自然科学基金(31771317)。

Funded by Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2017SYS009) and National Natural Science Foundation of China (31771317).

【作者简介】付鹏宇(1991—),女,在读博士研究生,研究方向:运动生物化学。Email:1402884452@qq.com

【通信作者】龚丽景(1981—),女,助理研究员,博士,主要研究方向为运动与脂肪代谢;低氧与胃肠道、骨骼肌萎缩。Email:lijing.gong@bsu.edu.cn

the food intake was matched to that of group H). The body composition of rats was tested by DEXA after the 4-week intervention. The soleus (SOL) and the extensor digitorum longus (EDL) muscles were collected and weighed. Muscles fiber histology was observed using HE staining, and the muscle fiber cross-sectional area (FCSA) was calculated. The protein contents of HIF1 α , Akt, p-Akt, and skeletal muscle protein synthesis- and degradation-related genes were detected using Western blot. **Results** (1) Body weight was lower in the group H than group C, but there was no significant difference between the groups P and C during the intervention period. At the beginning of the intervention, the food intake of group H (which was the same as group P) was significantly lower than that of the group C, and there was no significant difference between the two groups. (2) After the intervention, the body weight and muscle mass were significantly lower in the group H compared to groups C and P; the wet weights of SOL and EDL muscles in the group H were significantly lower than those of the group C; and the FCSA of the EDL muscle was significantly lower in the group H than in groups C and P. (3) HIF1 α protein contents of the EDL muscle was significantly higher in the group H than group C; the ratio of p-Akt/Akt of the SOL muscle in the groups H and P was significantly lower than that of the group C; mTOR and 4EBP1 protein levels in the EDL muscle of group H was significantly lower than group C; atrogen1, MuRF1, and Beclin1 protein levels and the ratio of LC3II/I in EDL of the group H were significantly higher than those of the group C, and MuRF1 protein level in the SOL muscle of group H was significantly higher than that of the groups C and P. **Conclusions** Skeletal muscle atrophy caused by hypoxia is induced by hypoxia-specific factors, showing that decreased synthesis and decomposition of skeletal muscle proteins, which is manifested by a decrease in skeletal muscle protein synthesis and a decrease in decomposition of fast muscle fibers, rather than a decrease in food intake under hypoxia.

【Keywords】 hypoxic exposure; skeletal muscle atrophy; semi-starvation state; protein turnover-regulatory pathways; muscle types; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高原是指海拔超过 2400 m 的环境^[1]。急进高原会给机体的生理和代谢系统带来多种不利影响,骨骼肌萎缩就是其中之一^[2]。高原低氧暴露可造成运动员肌肉力量和耐力丢失,影响高原训练效果。低氧所致的肌萎缩还表现出快慢肌的差异,不同类型的骨骼肌可能对低氧刺激产生不同的应答,从而影响运动员相应运动素质的发挥;随着高原旅游的兴起,世居平原者进入高原可能会发生的肌肉丢失和肌力下降,从而影响其体力活动和健康状况^[3]。低氧下机体组织器官会发生功能改变或释放出各种调节因子以直接和/或间接调控骨骼肌质量。低氧环境下食欲和消化吸收能力会受到抑制,使能量摄入不足,导致机体处于负能量平衡状态,诱发骨骼肌蛋白代谢失衡,影响肌肉质量的维持^[4]。相反观点认为低氧诱导的肌萎缩与摄食行为无关,营养良好情况下的低氧暴露仍会使肌肉质量无法维持,可能与低氧特异性因素对骨骼肌蛋白转化(蛋白合成和分解间的动态平衡)的改变有关^[5]。

低氧下骨骼肌蛋白的转化过程由多基因协同发挥作用^[6]。其中低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α)是关键的低氧调节因子,参与调控低氧应激下蛋白质代谢;丝氨酸/苏氨酸

激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, Akt), 又称作蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt), 是蛋白合成和分解的中枢因子,磷酸化后有活性^[7];哺乳动物雷帕霉素靶向基因 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 可整合细胞外多种信号刺激,影响基因转录及蛋白质合成^[8]。其下游的真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1, 4EBP1) 和核糖体蛋白 S6 激酶 β -1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, P70S6K1/S6K1) 参与蛋白合成的调控^[9];叉头框蛋白 O1 (forkhead box O1, FoxO1) 是调控蛋白分解两条重要通路的关键基因,包括泛素蛋白酶途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 和自噬溶酶体途径 (autophagy-lysosome pathway, ALP), 其中肌萎缩 F-box 1 (muscle atrophy F-box 1, Fbx32/atrogen1) 和肌肉特异性环指蛋白 1 (muscle-specific ring finger 1, MuRF1) 是 UPP 的重要基因^[10];微管相关蛋白 3 (microtubule associated protein light chain 3, Map1lc3/LC3) 和 B 细胞淋巴瘤-2 相互作用蛋白 1 (B-cell lymphoma-2 interacting protein 1, Beclin1) 是 ALP 的重要基因^[11]。

目前,关于低氧暴露所致肌萎缩的发生机制和肌肉类型的选择性尚不清楚,是否与低氧下摄食量

减少有关还存在争议。低氧暴露与摄食量不足所致的半饥饿状态下骨骼肌蛋白转化的差异还有待于进一步的探究。因此,本研究中通过低氧暴露和常氧配对低氧摄食干预大鼠后,对比不同类型骨骼肌蛋白转化调节的差异,以探明低氧暴露诱导骨骼肌萎缩发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

21 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重约为 230 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2015-0004】。饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0034】。饲养期间各组大鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。所有操作均符合北京体育大学运动科学实验伦理学要求(审批号:IACUC 2017009 A)。

1.1.2 实验试剂

Anti-HIF1 α (Novusbio, NB100-479), Anti-pan-Akt (Abcam, ab8805), Anti-pSer473-Akt (Cell Signaling, 4060), Anti-mTOR (Abcam, ab2732), Anti-4EBP1 (Abcam, ab2606), Anti-p70S6K1 (Abcam, ab32529), Anti-FoxO1 (Abcam, ab52857), Anti-pSer256-FoxO1 (Abcam, ab131339), Anti-atrogin1/Fbx32 (Abcam, ab74023), Anti-MuRF1 (Abcam, ab172479), Anti-LC3B (Novusbio, NB100-2220), Anti-beclin1 (Abcam, ab207612)。

1.1.3 实验仪器

双能 X 射线骨密度仪 (dual energy X-ray absorptiometer, DEXA; Lunar Idxa, 美国), 天平 (Sartorius, 美国), 正置光学显微镜 (尼康, Nikon Eclipse E100, 日本), 电泳槽和干转膜系统 (Life Technologies, 美国), 近红外光谱检测系统 (LI-COR, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

大鼠随机分为 3 组:①常氧正常饮食组 (C 组):常氧环境中自由饮食;②低氧正常饮食组 (H 组):置于氧浓度为 12.4% 的低氧房中 (模拟海拔 4000 m 高度), 自由饮食;③常氧配对饮食组 (P 组):常氧环境中,控制其摄食量与 H 组配对 (H 组

前一天的摄食量,即为 P 组当天的投食量)。每组 7 只。

1.2.2 形态指标测试及取材

记录各组大鼠的摄食量和体重。4 周后,DEXA) 扫描大鼠体成分 (包括肌肉和脂肪总量);麻醉后取两侧比目鱼肌 (soleus, SOL) 和趾长伸肌 (extensor digitorum longus, EDL), 称量湿重。一侧肌肉投入多聚甲醛固定液中固定,另一侧肌肉置于 -80℃ 保存,用于蛋白含量的测试。

1.2.3 HE 染色观察肌纤维形态及肌纤维横截面积 (muscle fiber cross-sectional area, FCSA) 的计算

骨骼肌组织在多聚甲醛中固定 24 h 后,修剪为约 5 mm³ 的组织块,石蜡包埋切片,HE 染色,封片后,10×40 倍镜下拍照,用 Image J 软件分析计算 FCSA。

1.2.4 Western Blot (WB) 测试骨骼肌蛋白含量

分别提取各肌肉蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,调整上样量为 20 μ g。使用梯度胶电泳分离蛋白,转至 NC 膜,封闭液封闭 1 h,4℃ 孵育一抗过夜,洗去未结合的一抗,室温孵育二抗 1 h,洗去未结合的二抗,近红外光谱检测系统检测条带信号值,Image Studio 软件对结果进行相对定量分析。

1.3 统计学分析

结果用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠体重变化

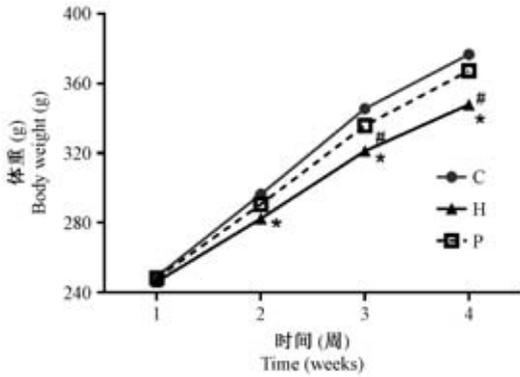
大鼠初始体重无明显差异,从第 2 周时,H 组体重较 C 组均显著下降 ($P < 0.05$),P 组与 C 组差别不大;干预 3 周、4 周时,H 组较 C 组和 P 组均显著下降 ($P < 0.05$),P 组较 C 组差异无显著性 (图 1)。

2.2 大鼠摄食量变化

干预期前 2 周,H 组大鼠 (P 组同) 日平均摄食量较 C 组显著下降 ($P < 0.05$),干预期后 2 周,H 组和 C 组间差异无显著性 (图 2)。

2.3 干预后大鼠体质量、肌肉质量和脂肪质量

4 周干预后,H 组大鼠体质量和肌肉总量较 C 组和 P 组显著性降低 ($P < 0.05$),P 组与 C 组间无差异;各组间脂肪量差异无显著性 (图 3)。

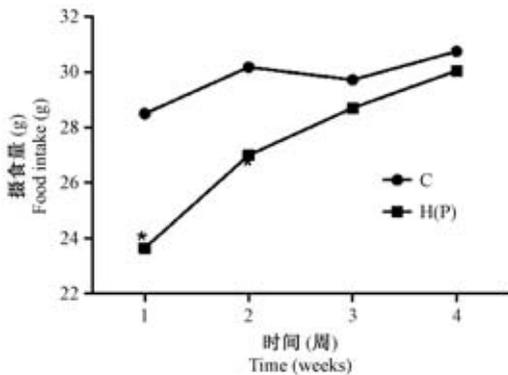


注:干预2,3,4周后,H组体重与C组相比差异具有显著性,* $P < 0.05$ 。干预3,4周后,H组体重与P组相比差异具有显著性,* $P < 0.05$ 。

图1 体重变化

Note. After 2, 3, and 4 weeks of intervention, the difference in body weight between the groups H and C was significant, * $P < 0.05$. After 3 and 4 weeks of intervention, the difference in body weight between the groups H and P was significant, * $P < 0.05$.

Figure 1 Changes in body weight of the rats



注:干预1,2周时,H组与C组相比具有显著性差异,* $P < 0.05$ 。

图2 摄食量变化

Note. At 1 and 2 weeks of intervention, there was a significant difference between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 2 Changes in food intake of the rats

2.4 干预后大鼠骨骼肌湿重

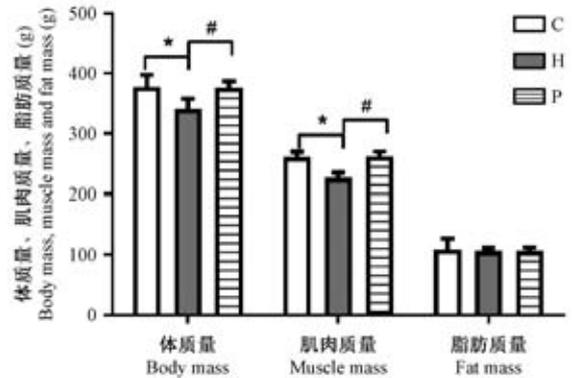
H组 SOL 和 EDL 湿重较 C 组显著下降($P < 0.05$),P 组各肌肉湿重与 C 组接近(图 4)。

2.5 干预后大鼠 FCSA

各组 SOL 的 FCSA 没有显著性差异;H 组 EDL 的 FCSA 较 C 组显著下降($P < 0.05$),H 组 EDL 的 FCSA 较 P 组显著下降($P < 0.05$)(图 5)。

2.6 干预后大鼠骨骼肌 HIF1 α 蛋白含量

H 组大鼠 EDL 中 HIF1 α 蛋白含量较 C 组显著



注:H组与C组相比,* $P < 0.05$ 。H组与P组相比,* $P < 0.05$ 。

图3 干预后大鼠体重、肌肉质量和脂肪质量的变化

Note. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Compared between the groups H and P, * $P < 0.05$.

Figure 3 Changes in body weight, muscle mass and fat mass of the rats after intervention

增加($P < 0.05$),P 组与 C 组间无显著性差异;SOL 各组间 HIF1 α 蛋白含量无显著差异(图 6)。

2.7 干预后大鼠骨骼肌 p-Akt 和 Akt 蛋白含量及两者比值

H 组大鼠 SOL 和 EDL 中 p-Akt 蛋白含量较 C 组显著下降,P 组 EDL 中 p-Akt 蛋白含量较 C 组显著下降($P < 0.05$)(图 7A, B);Akt 蛋白含量各组间无显著性差异(图 7A, C);H 组和 P 组 SOL 中 p-Akt/Akt 显著低于 C 组($P < 0.05$),而 EDL 中两者比值较 C 组无明显变化(图 7D)。

2.8 干预后大鼠蛋白合成相关基因(mTOR、4EBP1、p70S6K1)蛋白含量

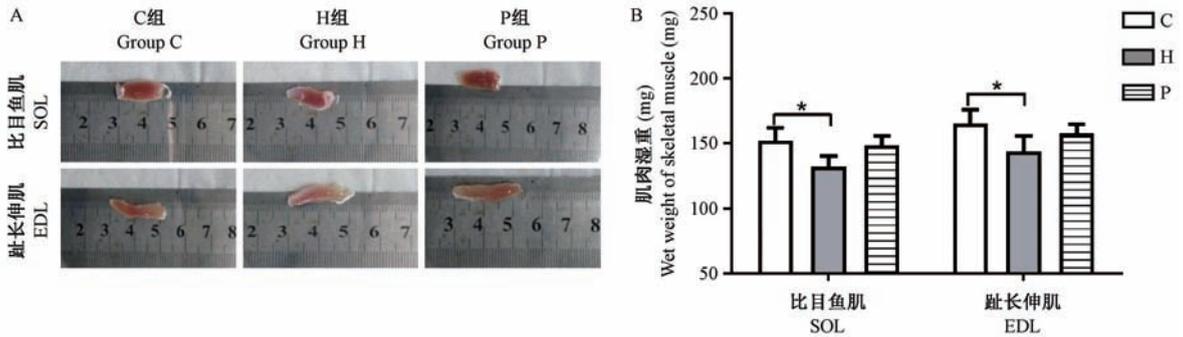
H 组大鼠 EDL 中 mTOR 蛋白含量较 C 组显著下降($P < 0.05$),P 组较 C 组无显著差异(图 8A, B);H 组大鼠 EDL 中 4EBP1 蛋白含量较 C 组显著下降($P < 0.05$)(图 8C, D),两肌肉中各组间 p70S6K1 蛋白含量无显著差异(图 8C, E)。

2.9 干预后大鼠蛋白分解相关基因(FoxO1、p-FoxO1、UPP 和 ALP 基因)蛋白含量

P 组 SOL 中 p-FoxO1 蛋白含量显著高于 C 组($P < 0.05$)(图 9A, B);两肌肉中各组间 FoxO1 含量无显著差异(图 9A, C);两肌肉中各组间 p-FoxO1/FoxO1 比值间无显著差异(图 9D)。

2.9.1 UPP 相关基因(atrogin1、MuRF1)蛋白含量

H 组大鼠 EDL 中 atrogin1 蛋白含量较 C 组显著上升($P < 0.05$),P 组与 C 组间无显著差异(图 10A, B);H 组两肌肉中 MuRF1 蛋白含量显著高于

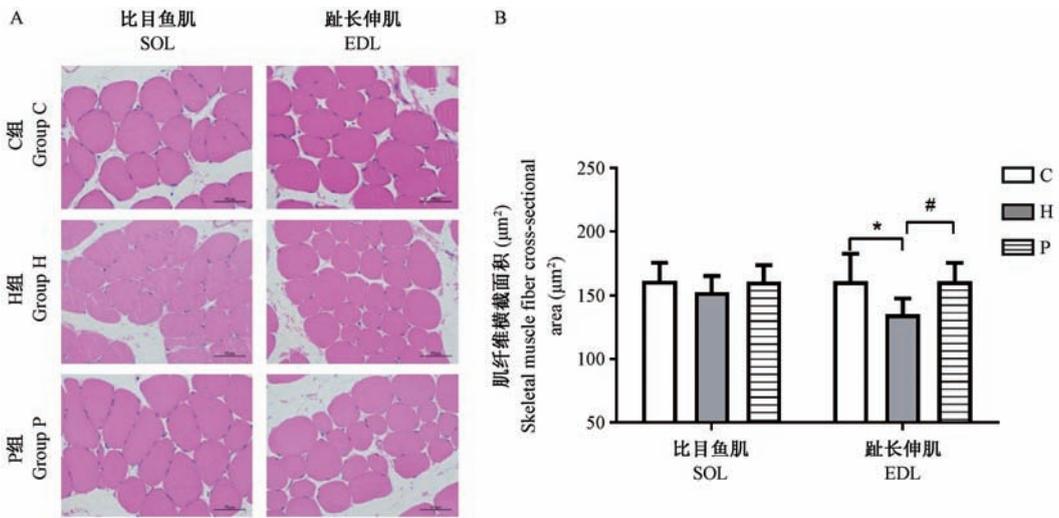


注:A. 各组大鼠 SOL 和 EDL 图片。B. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 干预后大鼠骨骼肌湿重

Note. A. Images of SOL and EDL muscles of the rats in each group. B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 4 Wet weight of skeletal muscle in the rats after intervention



注:A. 肌纤维的组织学结构(HE 染色, $\times 400$, 标尺 = 50 μm)。B. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$; H 组与 P 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 肌纤维形态与 FCSA

Note. A. Histological structure of muscle fibers ($\times 400$, HE staining. Bar = 50 μm). B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$. Compared between the groups H and P, # $P < 0.05$.

Figure 5 Muscle fiber morphology and muscle fiber cross-sectional area of the rats

C 组, P 组 SOL 中 MuRF1 蛋白含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$) (图 10A, C)。

2.9.2 ALP 相关基因(LC3、beclin1)蛋白含量

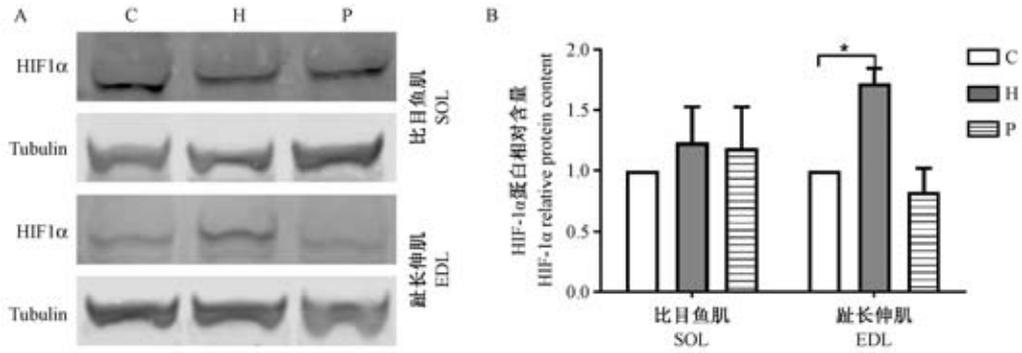
H 组大鼠 EDL 中 LC3 II 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$) (图 11A, B); H 组 SOL 中 LC3 I 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$) (图 11A, C); H 组 EDL 中 LC3 II / I 比值较 C 组显著上升 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著差异 (图 11D); H 组 EDL 中 beclin1 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著差异 (图 11A, E)。

3 讨论

世居平原者初上高原时常会出现骨骼肌质量的丢失。本研究,发现大鼠暴露在模拟海拔 4000 m 的低氧环境中,体重、肌肉总量、肌肉湿重和 FCSA 均出现下降,证明低氧暴露确可诱导肌萎缩的发生。

3.1 低氧暴露下摄食量变化对骨骼肌质量的调节作用

本研究观察到大鼠摄食量在低氧暴露初期下降,后期恢复正常;P 组体重随着干预时间延长逐渐接近 C 组,其肌肉质量、湿重和 FCSA 与 C 组均差异不大,提示低氧所致肌萎缩可能并非因摄食量减少

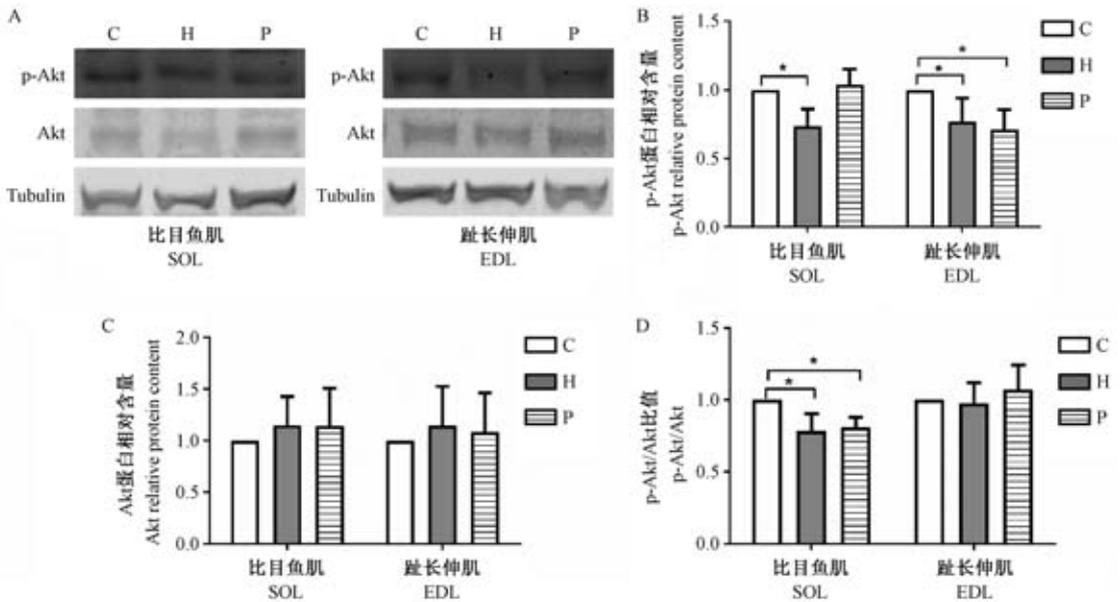


注:A. HIF1 α 的WB结果。B. H组与C组相比, * $P < 0.05$ 。

图6 HIF1 α 蛋白条带(A)和相对含量(B)

Note. A. Western Blot of HIF1 α . B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 6 HIF1 α protein bands (A) and relative content (B) of skeletal muscles of the rats



注:A. p-Akt和Akt的WB结果。B&C&D. H组与C组相比, * $P < 0.05$ 。

图7 p-Akt和Akt蛋白条带(A)和相对含量(B&C)以及两者比值(D)

Note. A. Western Blot results of p-Akt. B, C and D. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

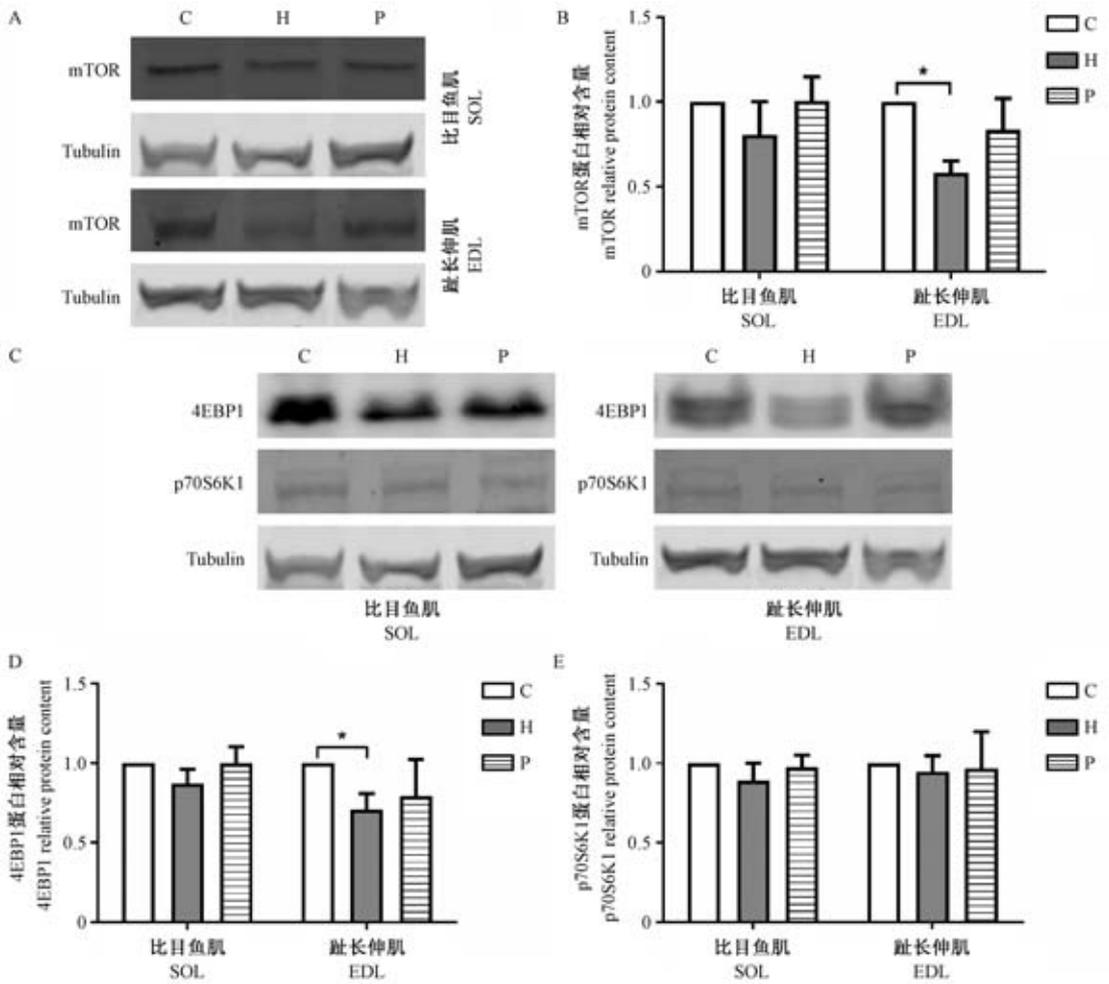
Figure 7 Protein bands (A), relative content (B, C) and p-Akt/Akt (D) ratio of the rat skeletal muscles

引起。低氧暴露初期体重和摄食量下降,可能原因是下丘脑、胃肠及脂肪组织中的胃促生长素(ghrelin)、多肽YY激素(peptide YY, PYY)、胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)和瘦素(Leptin)等食欲调节激素的水平在低氧下发生改变^[12],但随时间延长,机体肠道通透性和葡萄糖摄取量不再发生改变,机体主观食欲和摄食量逐渐回升,体重和肌肉质量恢复至常氧水平^[13]。

3.2 低氧暴露和半饥饿状态下骨骼肌蛋白转化调节的变化

低氧暴露下骨骼肌蛋白转化效率提高是诱导

肌萎缩发生的关键,表现为蛋白合成速率低于分解速率。HIF1 α 是转录调控的关键因子,参与低氧适应性反应过程,在骨骼肌蛋白的转化调节中发挥重要作用^[14]。本研究H组EDL中HIF1 α 含量显著增加,而P组较C组则无明显变化。HIF1 α 的稳定表达是其在低氧环境中发挥生理效应的关键。HIF1 α 的靶基因碳酸酐酶9(carbonic anhydrase IX, Ca-9)仅在持续低氧暴露(21 d)后显著增加,而常氧控食则不会诱导Ca-9的表达增加^[15]。Akt是蛋白合成和分解的中枢调节因子。本研究中P组p-Akt/Akt比值较C组无明显变化。Akt被磷酸化激活后,可



注:A&C. mTOR、4EBP1 和 p70SK61 的 WB 结果。B&D&E. H 组与 C 组相比, **P* < 0.05。

图 8 mTOR、4EBP1 和 p70SK61 蛋白条带(A&C)和相对含量(B&D&E)

Note. A&C. Western Blot. Protein bands of mTOR, 4EBP1 and p70SK61. B, D and E. Compared between the groups H and C, **P* < 0.05.

Figure 8 Protein bands (A&C) and relative content of mTOR, 4EBP1 and p70SK61 (B&D&E) in skeletal muscles of the rats

进一步激活 mTOR 及下游 mTOR 复合物 1/2(mTOR complex 1/2, mTORC1/2), 抑制结节性硬化复合物 1 和 2(tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/2) 表达以促进蛋白质合成; p-Akt 还可通过促进 FoxO1 蛋白磷酸化而抑制蛋白质分解。HIF1 α 可抑制 Akt 的表达, 急性低氧可降低 Akt 磷酸化水平, 持续低氧会增加 Akt 总量, 导致 p-Akt/Akt 下降^[16]。

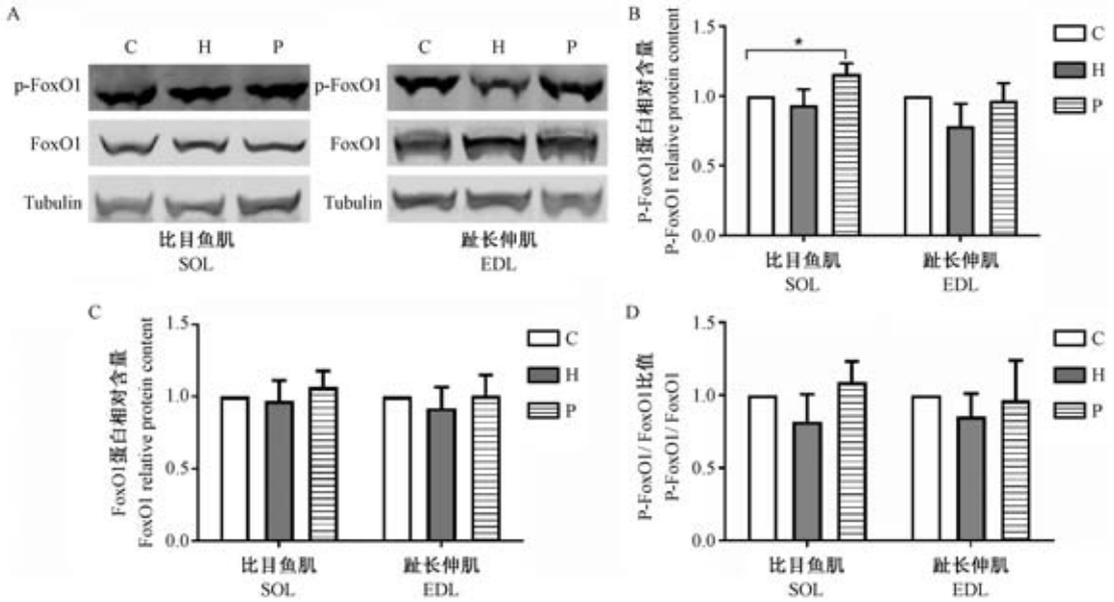
3.2.1 蛋白合成相关基因的变化

mTOR 可调节下游 4EBP1 和 p70SK61 促进骨骼肌蛋白质合成。4EBP1 激活后, 与 eIF4E 分离; p70SK61 在磷酸肌醇激酶 1 催化下活化, 两者共同促进 mRNA 的翻译^[16]。本研究 H 组 EDL 中 mTOR、4EBP1 含量较 C 组显著下降, P 组相关蛋白水平无明显变化。低氧可通过 AMP 依赖蛋白激酶 (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated

protein kinase, AMPK) 进一步激活 TSC2, 阻碍 mTOR 及其下游 4EBP1 和 p70S6K1 的表达, 抑制骨骼肌蛋白合成。有研究显示, mTOR 通路相关基因在低氧暴露 4 d 并未发生显著变化, 21 d 后显著降低, 而半饥饿干预初期和末期, 机体 mTOR 通路均未发生显著变化^[5]。

3.2.2 蛋白分解相关基因的变化

FoxO1 作为调节骨骼肌质量的关键转录因子, 可介导 UPB 和 ALP 以促进骨骼肌蛋白分解。它受 p-Akt 调节, p-FoxO1 出核失活^[17]。本研究 P 组 p-FoxO1/FoxO1 比值较 C 组无显著差异。低氧通过抑制 Akt 活性而减少 p-FoxO1, 间接促进蛋白分解相关基因表达; 同时直接增加 FoxO1 的表达, 促进骨骼肌萎缩发生。E3 泛素连接酶 atrogin1 和 MuRF1—骨骼肌蛋白分解途径中重要的限速酶, 其

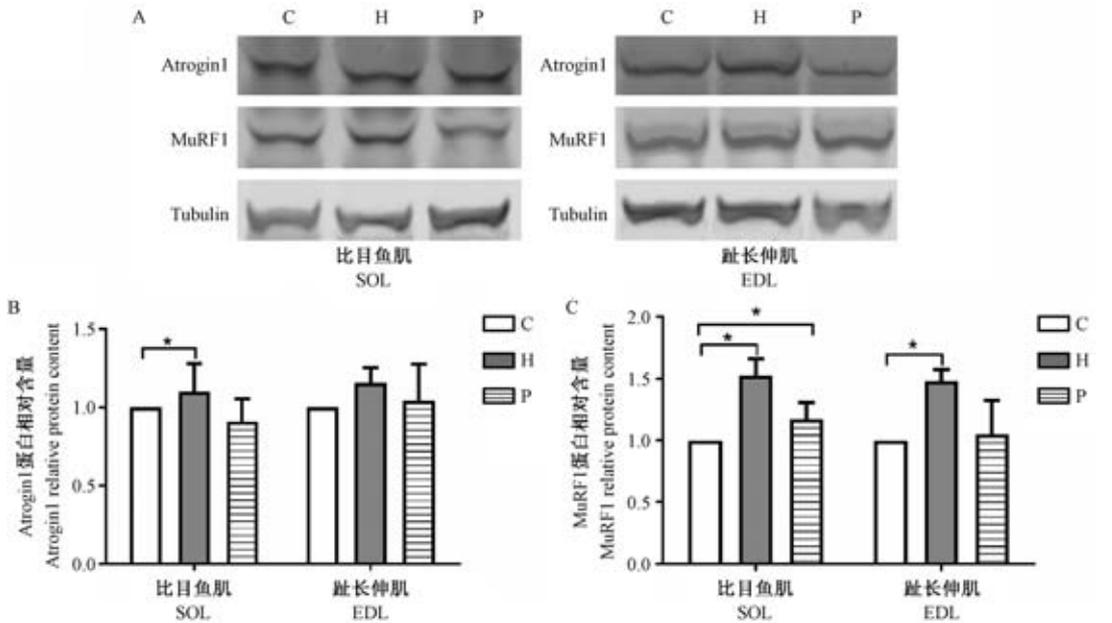


注: A. p-FoxO1 和 FoxO1 的 WB 结果。B&C&D. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 9 p-FoxO1 和 FoxO1 蛋白条带(A)和相对含量(B&C)及两者比值(D)

Note. A. Western Blot analysis of p-FoxO1 and FoxO1. B, C and D. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 9 Protein bands (A), relative contents (B, C) and p-FoxO1/FoxO1 ratio (D) in skeletal muscles of the rats



注: A. atrogin1 和 MuRF1 的 WB 结果; B&C. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

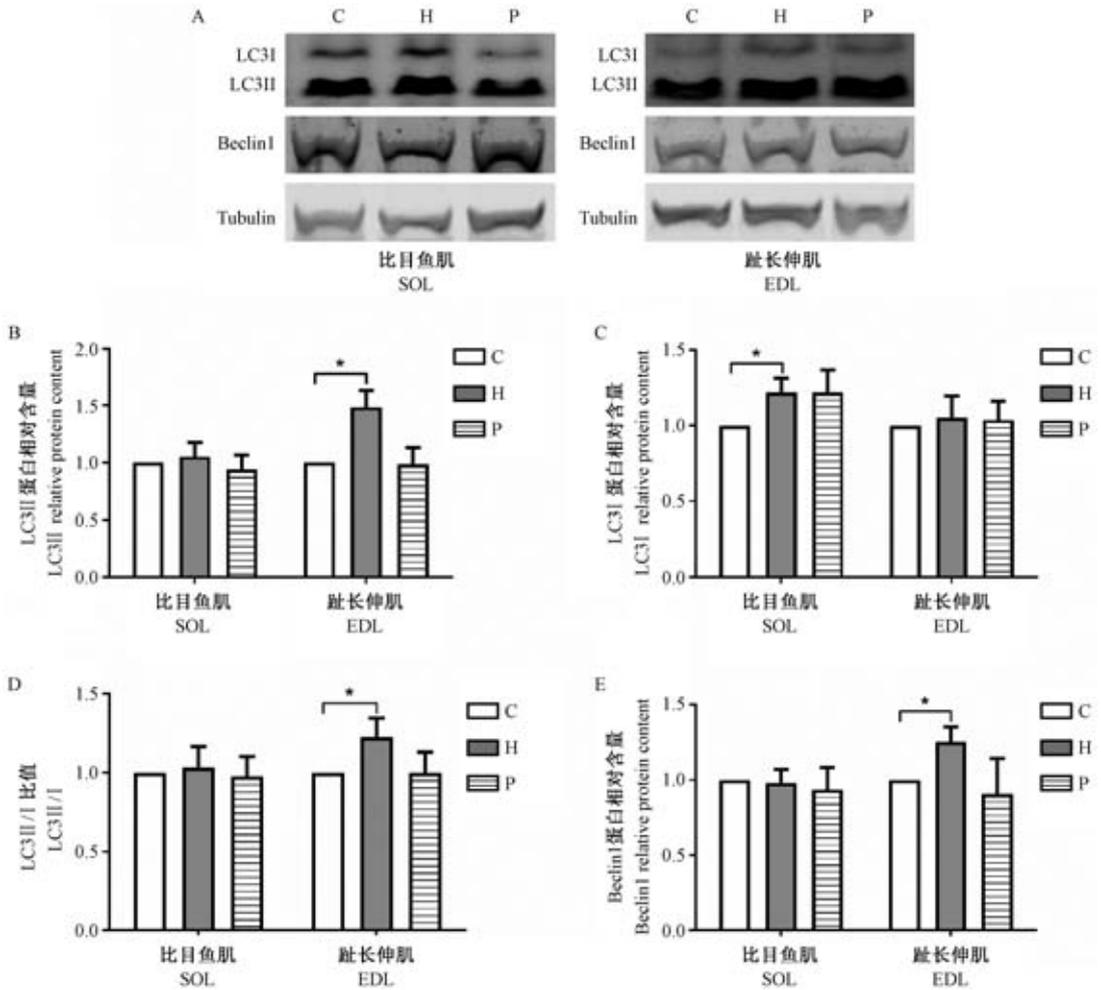
图 10 atrogin1 和 MuRF1 蛋白条带(A)和相对含量(B&C)

Note. A. Western Blot results of atrogin1 and MuRF1. B, C. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 10 Protein bands (A) and relative content of atrogin1 and MuRF1(B, C) of the rat skeletal muscles

表达的增加可作为 UPP 激活的标志,受 FoxO1 调控;LC3 和 beclin1 表达增加是溶酶体蛋白被激活的标志。其中 LC3 是自噬体形成阶段的标志,经剪切修饰变成胞质蛋白 LC3-I, LC3-I 与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamines, PE) 共价结合形成 LC3-

II,有助于自噬体双层膜闭合,LC3-II/I 常作为衡量自噬通量的关键指标;beclin1 是自噬执行者,调控自噬前体形成,引导部分自噬相关蛋白定位于自噬体膜。两者表达受 FoxO1 正调控。本研究 H 组 EDL 中 atrogin1、MuRF1、beclin1 蛋白含量及 LC3 II/



注:A. LC3 和 beclin1 的 WB 结果。B&C&D&E. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 11 LC3 和 beclin1 蛋白条带(A)和相对含量(B&C&D&E)

Note. A. Western Blot results of LC3 and beclin1. B, C. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 11 Protein bands (A), relative content and ratio of LC3 and beclin1 in skeletal muscles of the rats (B, C, D and E)

I 比值显著高于 C 组, 而 P 组与 C 组间无显著差异, 这与其他研究类似。低氧不仅可通过调节 FoxO1 以促进下游 UPP 和 ALP 相关蛋白表达, 也可直接作用于分解蛋白, 如 beclin1 的启动子包含一个功能性低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE), 可在低氧状态下直接促进蛋白分解^[18]。

3.3 低氧暴露诱导骨骼肌萎缩的肌肉类型差异

低氧所致肌萎缩常伴有肌肉类型差异。本研究中 H 组 SOL 和 EDL 湿重均出现显著下降, 但 SOL 的 FCSA 较 C 组未出现减少, 提示低氧所致骨骼肌萎缩可能选择性发生于快肌。不同类型骨骼肌可通过不同的途径参与对慢性低氧暴露的适应性改变。EDL 对低氧的反应主要表现在 UPP 和 ALP 相关基因的表达增加, 而 SOL 则对低氧特异性因素的反应较小, 对摄食量减少较为敏感。本研究低氧下

EDL 中 HIF1 α 、4EBP1、atrogen1、beclin1 水平和 LC3 II/I 比值显著增加, 而这些基因在 SOL 中则没有显著变化。研究认为, atrogen1 的表达增加可能是快肌对皮质酮和糖皮质激素受体信号的敏感性增加的结果, E3 泛素连接酶表达的增加可能更多的依赖于低氧刺激, 而非摄食量的变化; HIF1 α 靶基因 beclin1 是 bcl-2 家族中的低氧诱导成员, 低氧诱导的 EDL 中 beclin1 的增加独立于摄食量的影响^[19]。

参 考 文 献 (References)

[1] Askew EW. Nutrition and performance in hot, cold and high altitude environments [J]. Nutr Exercise Sport, 1998, 597-619.
 [2] Chaudhary P, Sharma YK, Sharma S, et al. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: Protective role of curcumin [J]. Biochimie, 2019, 156: 138-147.
 [3] Hoppeler H, Kleinert E, Schlegel C, et al. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia [J]. Int J

- Sports Med, 1990, 11(S1): S3-S9.
- [4] Millet GP, Debevec T, Brocherie F, et al. Commentaries on Viewpoint: Human skeletal muscle wasting in hypoxia: a matter of hypoxic dose? [J]. J Appl Physiol, 2017, 122(2): 409-411.
- [5] Edwards LM, Murray AJ, Tyler DJ, et al. The effect of high-altitude on human skeletal muscle energetics: 31P-MRS results from the Caudwell Xtreme Everest Expedition [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10681.
- [6] 赵建文, 银欢, 苏秋香. 大鼠肌卫星细胞移植失神经骨骼肌的形态学观测 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(3): 50-52+56+90.
- Zhao JW, Yin H, Su QX. Morphological observation on denervated skeletal by transplantation of skeletal muscle by transplantation of satellite cell in rats [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(3): 50-52+56+90.
- [7] de Theije C, Costes F, Langen RC, et al. Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease [J]. Cur Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(6): 548-553.
- [8] Ren H, Accili D, Duan C. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(13): 5857-5862.
- [9] Koritzinsky M, Rouschop KM, van den Beucken T, et al. Phosphorylation of eIF2alpha is required for mRNA translation inhibition and survival during moderate hypoxia [J]. Radiother Oncol, 2007, 83(3): 353-361.
- [10] Razeghi P, Baskin KK, Saumya S, et al. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(2): 361-364.
- [11] Sandri M. Autophagy in skeletal muscle [J]. FEBS Lett, 2010, 584(7): 1411-1416.
- [12] Debevec T, Simpson EJ, Mekjavic IB, et al. Effects of prolonged hypoxia and bed rest on appetite and appetite-related hormones [J]. Appetite, 2016, 107(12): 28-37.
- [13] Debevec T. Hypoxia-related hormonal appetite modulation in humans during rest and exercise: mini review [J]. Front Physiol, 2017, 8(5): 366.
- [14] Ren H, Accili D, Duan C. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(13): 5857-5862.
- [15] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases [J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 7075-7083.
- [16] Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets [J]. J Biol Chem, 2003, 278(32): 29655-29660.
- [17] McLoughlin TJ, Smith SM, DeLong AD, et al. FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(3): C548-555.
- [18] Al-Qusairi L, Prokic I, Amosii L, et al. Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways [J]. FASEB J, 2013, 27(8): 3384-3394.
- [19] de Theije CC, Langen RC, Lamers WH, et al. Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy [J]. J Appl Physiol, 2015, 118(2): 200-211.

[收稿日期] 2019-03-01

吴蓉蓉,晁燕,赵永丽,等. 裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因的分子进化及低氧诱导表达[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 433 - 443.

Wu RR, Chao Y, Zhao YL, et al. Molecular evolution and hypoxia-induced mRNA expression of *Hif- α* in schizothoracine fish[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 433 - 443.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.003

裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因的分子进化及低氧诱导表达

吴蓉蓉^{1,2}, 晁燕³, 赵永丽^{1,2}, 陈祺昌^{1,2}, 郑志琴^{1,3}, 夏明哲¹, 祁得林^{1*}

(1. 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 2. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; 3. 青海大学农牧学院动物科学系, 西宁 810016)

【摘要】 目的 探究低氧诱导因子 *Hif- α* 在裂腹鱼亚科鱼类适应低氧环境中的作用及表达调控。方法 利用 RT-PCR 技术获得了裂腹鱼亚科鱼类 13 个代表物种的 *Hif-1 α A*、*Hif-1 α B*、*Hif-2 α A* 和 *Hif-2 α B* 基因编码区序列, 基于裂腹鱼亚科鱼类系统进化关系开展了基因选择压力分析, 并选取花斑裸鲤进行低氧诱导表达研究。结果 *Hif-1 α A*、*Hif-1 α B*、*Hif-2 α A* 和 *Hif-2 α B* 基因编码区长度分别为 2196、2325、2544 和 2511 bp。通过序列比对发现裂腹鱼亚科鱼类 HIF1 α A NODD 结构域中保守脯氨酸羟基化基序 LxxLAP 发生缺失, 特化及高度特化的裂腹鱼的 HIF1 α B CODD 结构域中脯氨酸羟基化基序突变为 PxxLAP。与常氧组相比, 在重度缺氧条件下花斑裸鲤的脑和心脏组织中部分 *Hif- α* 基因表达量显著下降, 在中度低氧中心脏组织中的 *Hif-1 α A* 和 *Hif-2 α A* 基因表达量上调。结论 *Hif- α* 基因在 13 个物种中受到正向选择作用, 但具体物种分支有待进一步研究, 同时裂腹鱼亚科鱼类在适应慢性低氧和急性低氧环境可能存在两种不同的表达调控机制。

【关键词】 裂腹鱼亚科鱼类; 低氧诱导因子; 分子进化; 低氧环境

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0433-011

Molecular evolution and hypoxia-induced mRNA expression of *Hif- α* in schizothoracine fish

WU Rongrong^{1,2}, CHAO Yan³, ZHAO Yongli^{1,2}, CHEN Qichang^{1,2}
ZHENG Zhiqin^{1,3}, XIA Mingzhe¹, QI Delin^{1*}

(1. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China.

2. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016.

3. Animal Science Department of Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016)

Corresponding author: QI Delin. E-mail: delinqi@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and expression regulation of hypoxia-inducible factor alpha (*Hif- α*) for schizothoracine fish under hypoxic environment. **Methods** We obtained the coding regions of *Hif-1 α A*, *Hif-1 α B*, *Hif-2 α A*, and *Hif-2 α B* genes for 13 species of schizothoracine fish, endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau, using RT-PCR, then conducted molecular evolution analysis based on the schizothoracine fish phylogeny by comparing the non-synonymous/synonymous substitution ratios. *Gymnocypris eckloni* was selected to investigate the tissue expression patterns in

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31460094)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31460094).

【作者简介】 吴蓉蓉(1994—)女, 硕士研究生, 研究方向: 资源生物学。Email: wuluobo55rong@163.com

【通信作者】 祁得林(1973—)男, 教授; 研究方向: 动物分子遗传与生态学。Email: delinqi@126.com

response to hypoxia. **Results** The coding regions of *Hif-1 α A*, *Hif-1 α B*, *Hif-2 α A*, and *Hif-2 α B* genes were 2196 bp, 2325 bp, 2544 bp, and 2511 bp in length, respectively. Sequence alignment showed that the conserved proline hydroxylation motif LxxLAP was deletion in the NODD domain of HIF-1 α A in schizothoracine fish, and the mutation from the proline hydroxylation motif to PxxLAP was observed in the CODD domain of HIF-1 α B in the specialized and highly specialized schizothoracine fish. Under severe hypoxic conditions, the expression of *Hif- α* gene in the brain and heart of *G. eckloni* decreased significantly compared to normoxia control. Under moderate hypoxic conditions, the expression of *Hif-1 α A* and *Hif-2 α A* in the heart was up-regulated compared to normoxia control. **Conclusions** The *Hif- α* genes are identified positively selected in 13 species, but which species under positively selected is not yet clear and needs further study. There may be two different gene expression regulations for the schizothoracine fishes to adapt to moderate hypoxic environment and severe hypoxic environment.

[Keywords] schizothoracine fish; hypoxia-inducible factor; molecular evolution; hypoxic environment

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

裂腹鱼亚科(Schizothoracinae)鱼类属于鲤形目(Cypriniforme),鲤科(Cyprinidae),是青藏高原水生鱼类区系中主要类群之一,广泛分布于上至海拔5000~6000 m雪线附近和下至海拔1000 m左右的高原边缘的湖泊河流^[1],包含11~12属共100多种^[2],根据形态特征将裂腹鱼分为3个类群,即原始、特化和高度特化类群^[3],研究表明三个类群代表了青藏高原持续隆起过程的特定阶段^[4-5]。青藏高原具有高寒、低氧、强紫外线辐射等特征^[6],高原水体溶解氧波动较大(4.0~7.4 mg/L)^[5],这种极端的水体环境对土著鱼类的分布、生存适应及进化模式等产生了深刻的影响,同时赋予了裂腹鱼亚科鱼类抗缺氧、耐高寒的优良生物学特性。目前,对裂腹鱼类的研究多集中在形态分类及生物学特征等方面^[7],而在低氧适应方面的研究仍有欠缺。

氧是机体进行新陈代谢和维持生存的必要因素^[8],环境缺氧将严重影响鱼类的生存、生长和繁殖^[9-10]。鱼类在长期进化过程中具有独特的适应机制,如通过低氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)信号途径调节相关基因的转录进行低氧应答,增强低氧时的耐受性^[11-12]。HIFs是一组由低氧调节的 α 亚基和氧不敏感的 β 亚基组成的异二聚体转录因子^[13], β 亚基又称芳香烃受体核转运蛋白。 α 亚基是HIF唯一的氧调节亚基,即是低氧诱导的,它决定HIF的活性。在脊椎动物中发现HIF- α 基因至少存在3种亚型:*Hif-1 α* 、*Hif-2 α* 和*Hif-3 α* ,其皆具有N端保守的bHLH结构域,PAS和PAC结构域,氧敏感的ODD结构域以及C端负责转录激活的TAD结构域。其中HIF-3 α 仅有一个N-TAD,C-TAD缺失^[14]。

2001年,由Soitamo等^[15]从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中首先克隆得到*Hif-1 α* ,在低氧时*Hif-1 α* 表

达量明显上升。Rojas等^[16]从斑马鱼(*Danio rerio*)中克隆获得*Hif-1 α* 和*Hif-2 α* 基因序列,发现与其他脊椎动物*Hif*基因高度同源。Rytkönen等^[17]研究发现硬骨鱼在早期发生的硬骨鱼类特异性全基因组复制中产生了6个*Hif- α* 基因:1 A/B,2 A/B和3 A/B。目前多数硬骨鱼类有一个旁系同源基因发生丢失,但鲤科鱼类中两者都有保留^[18]。为了深入研究青藏高原裂腹鱼亚科鱼类对高原低氧水体环境的适应机制,本研究选取裂腹鱼亚科鱼类不同等级13个代表物种,通过RT-PCR获得硬骨鱼类特异性*Hif- α* 基因(*Hif-1 α A/Hif-1 α B*和*Hif-2 α A/Hif-2 α B*)序列,并开展分子进化分析。同时,选择广布种—花斑裸鲤,利用qRT-PCR方法检测了低氧胁迫下*Hif- α* 基因在主要组织中的表达调控,为进一步探索*Hif- α* 基因在高原鱼类低氧适应中的作用和调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

在青藏高原范围内采集13个裂腹鱼亚科鱼类代表物种,见表1。其中,澜沧裂腹鱼(*Schizothorax lantsangensis*)、巨须裂腹鱼(*Schizothorax macropogon*)、光唇裂腹鱼(*Schizothorax lissolabiatius*)、西藏裂腹鱼(*Schizothorax labiatius*)为原始类群;厚唇裸重唇鱼(*Gymnodiptychus pachycheilus*)、双须叶须鱼(*Ptychobarbus dipogon*)为特化类群;高原裸裂尻鱼(*Schizopygopsis stoliczkae*)、尖裸鲤(*Oxygymnocypris stewartii*)、高原裸鲤(*Gymnocypris waddelli*)、拉萨裸裂尻鱼(*Schizopygopsis younghusbandi*)、花斑裸鲤(*Gymnocypris eckloni*)、黄河裸裂尻鱼(*Schizopygopsis pylzovi*)、极边扁咽齿鱼(*Platypharodon extremus*)为高

度特化类群。野外采样时,用 100 mg/kg 的戊巴比妥钠(C₁₁H₁₇N₂NaO₃)对鱼进行麻醉,分别现场采集 13 个物种的肌肉、脑和鳃保存于液氮中,用于 HIF 基因克隆。

花斑裸鲤 30 尾(体重约 210 g)采集于青海省大通县湟水河支流—宝库河,活鱼运送并养于青海大学农牧实验室塑料桶中,经低氧处理后采集组织,检测各基因表达情况。

表 1 裂腹鱼亚科鱼类采样信息

Table 1 Sampling information of the schizothoracinae fishes

| 物种名 Species | 采样地点 Locality | 水系 Drainage system | 发育阶段 Developmental stage | 体长(mm) |
|---|---------------------------|------------------------|-----------------------------|--------|
| 澜沧裂腹鱼 <i>Schizothorax lantsangensis</i> | 青海杂多 Zadoi, Qinghai | 澜沧江 Mekong River | 成年 Adult | 242 |
| 巨须裂腹鱼 <i>Schizothorax macropogon</i> | 西藏日喀则 Rikaze, Tibet | 雅鲁藏布江 Tsangpo River | 成年 Adult | 410 |
| 光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiatus</i> | 青海囊谦 Nangqian, Qinghai | 澜沧江 Mekong River | 成年 Adult | 320 |
| 西藏裂腹鱼 <i>Schizothorax labiatus</i> | 西藏阿里 Ali, Tibet | 印度河 Indus River | 成年 Adult | 456 |
| 厚唇裸重唇鱼 <i>Gymnodiptychus pachycheilus</i> | 青海河南 Henan, Qinghai | 黄河 Yellow River | 成年 Adult | 276 |
| 双须叶须鱼 <i>Ptychobarbus dipogon</i> | 西藏日喀则 Rikaze, Tibet | 雅鲁藏布江 Tsangpo River | 成年 Adult | 253 |
| 尖裸鲤 <i>Oxygymnocypris stewartii</i> | 西藏拉萨 Lhasa, Tibet | 雅鲁藏布江 Tsangpo River | 成年 Adult | 192 |
| 高原裸鲤 <i>Gymnocypris waddelli</i> | 西藏浪卡子 Langkazi, Tibet | 羊卓雍湖 Yomzho Lake | 成年 Adult | 293 |
| 花斑裸鲤 <i>Gymnocypris eckloni</i> | 青海大通 Datong, Qinghai | 湟水河 Huangshui River | 成年 Adult | 233 |
| 高原裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis stoliczkae</i> | 西藏阿里 Ali, Tibet | 印度河 Indus River | 成年 Adult | 320 |
| 拉萨裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis younghusbandi</i> | 西藏拉萨 Lhasa, Tibet | 雅鲁藏布江 Tsangpo River | 成年 Adult | 210 |
| 黄河裸裂尻鱼 <i>Schizopygopsis pylzovi</i> | 青海大通 Datong, Qinghai | 湟水河 Huangshui River | 成年 Adult | 233 |
| 极边扁咽齿鱼 <i>Platypharodon extremus</i> | 青海玛多 Madoi, Qinghai | 黄河 Yellow River | 成年 Adult | 400 |

1. 1. 2 实验试剂

戊巴比妥钠(25 g 高纯级,容创),RNA Simple Total RNA kit(天根),FastQuant RT Kit(天根),Premix Ex Taq® Version 2.0 试剂盒(Takara),TIANGel Midi Purification Kit(天根),pMD19-T 载体(天根),SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒(天根)。

1. 1. 3 实验仪器

溶解氧测定仪 AZ8402(衡欣,台湾),氧泵(赛尔,浙江),高速冷冻离心机(Beckman Inc,美国),梯度 PCR 扩增仪(Bio-Rad,美国),Gel Doc XR+凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国),SX-500 高压灭菌锅(Tomy,日本)。

1. 2 方法

1. 2. 1 总 RNA 提取及 Hif-α 基因 cDNA 序列扩增

分别提取 13 种裂腹鱼亚科鱼类肌肉、脑和鳃

RNA,而后合成 13 个物种的 cDNA 第一链。以 13 个物种组织 cDNA 为模板,对 Hif-1αA、Hif-1αB、Hif-2αA 和 Hif-2αB 基因进行克隆,引物见表 2。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 36 次;72℃ 续延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后,进行回收纯化,然后连接转化以进行测序。

1. 2. 2 序列分析

测序完成后,利用 Lasergene 7.0 软件^[19]对测序结果分别进行分析;利用 Blastn 在线程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行确认并进行核酸比对;利用 DNAMAN 6.0(<http://www.lynnon.com>)分别计算其核苷酸组成,碱基变异情况及氨基酸同源性;利用 Smart(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI 中的 CDD 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行结构域分析。

表 2 裂腹鱼 *Hif-α* 基因 RT-PCR 引物及 qRT-PCR 引物Table 2 Primers for RT-PCR and qRT-PCR of *Hif-α* gene in the schizothoracine fish

| 引物名称 Primers | 序列(5'-3') Sequences | 用途 Usage |
|--------------|-------------------------|--------------------|
| Hif-1αA1F | AGCGAAGGAAGGAGAAATCC | RT-PCR |
| Hif-1αA1R | AATGCCATCTGTTGTGTGGA | RT-PCR |
| Hif-1αA2F | AAATCTGCCTCCTGGAAGGT | RT-PCR |
| Hif-1αA2R | TGGGATCTGGAAGAATCAGG | RT-PCR |
| Hif-1αA3F | GCCCTCTTCAAGTGTCTGCG | RT-PCR |
| Hif-1αA3R | GTAGCTCTCCCCCTGTAGC | RT-PCR |
| Hif-1αB1F | CCTGTCTGAAGATGGAGACAT | RT-PCR |
| Hif-1αB1R | TGCACGGGAGCGTTGACTT | RT-PCR |
| Hif-2αA1F | CAACTCAGGCCGCACAGT | RT-PCR |
| Hif-2αA1R | TGACTTATCATGCCTGTGT | RT-PCR |
| Hif-2αA2F | CAACTCAGGCCGCACAGT | RT-PCR |
| Hif-2αA2R | GTTGACTTATCATGCCTGAGT | RT-PCR |
| Hif-2αB1F | CAAACAGCACCAGCTCACAT | RT-PCR |
| Hif-2αB1R | GCGGCTCTTTAAATCCACAC | RT-PCR |
| Hif-2αB2F | CAGGCCACCTGAAGGTGTAT | RT-PCR |
| Hif-2αB2R | TGTCTCTTGCGTGTCCAAAG | RT-PCR |
| Hif-2αB3F | ATGGCCACCACTTTCTCTGT | RT-PCR |
| Hif-2αB3R | TGGCCTGGTCTAATGCCTTT | RT-PCR |
| Hif-1αArealF | CCCCACGGCGTCACCTCTAA | qRT-PCR |
| Hif-1αArealR | GGAAGGCCCAGGCAGTTGCT | qRT-PCR |
| Hif-1αBrealF | ACTGGACCTGTTGAGAAAATG | qRT-PCR |
| Hif-1αBrealR | TGGCTGACAAAAGATGAGGG | qRT-PCR |
| Hif-2αArealF | AATGGACGGTGAGGACTTCG | qRT-PCR |
| Hif-2αArealR | CGTTTGGTGGGTTTGGT | qRT-PCR |
| Hif-2αBrealF | GAAGGTGTATAACGGCTGTCCC | qRT-PCR |
| Hif-2αBrealR | CAGGTTCTGGTGGCTTTTGG | qRT-PCR |
| β-actinF | GCCAAACAGGAAAAGATGAC | qRT-PCR |
| β-actinR | TTGCCAATGGTGATGACCTG | qRT-PCR |
| M13-47 | CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC | 测序引物 |
| RV-M | GAGCGGATAACAATTTACACAGG | Sequencing primers |

1.2.3 选择压力分析

在遗传学中,通过比较其非同义替换率(dN)和同义替换率(dS)之间的比率(ω),判断基因是否有选择压力作用。 $dN/dS > 1$,则为正向选择; $dN/dS = 1$,则为中性选择; $dN/dS < 1$,则为纯化选择。基于 13 个裂腹鱼亚科鱼类的物种进化树,使用 Paml 的 codeml 程序进行最大似然法分析,包括位点模型,支模型和支位点混合模型,具体方法见 Qi 等^[20]文献。Bayes Empirical Bayes (BEB) 用于计算模型中发现的正选择位点的可能性。

1.2.4 低氧处理

本研究中所涉及裂腹鱼亚科物种多分布在偏远地带,因此选择离实验室较近的裂腹鱼亚科代表种—花斑裸鲤开展低氧实验。活鱼运送至实验室后,暂养于塑料桶中的 30 尾花斑裸鲤,使水充分曝气将溶解氧(dissolved oxygen, DO)保持在 (8.4 ± 0.1) mg/L,水温在 $10 \sim 13^\circ\text{C}$ 。预养 3 d 后,随机采集 3 尾花斑裸鲤白肌、红肌、心脏、脑、鳃组织作为对

照组。24 尾作为中度低氧组置于 40 L 塑料桶,1 h 内将溶解氧浓度从 (8.4 ± 0.1) mg/L 降低至 (3.0 ± 0.1) mg/L,并保持 96 h,每隔 12 h 采集 3 尾各组织。取 3 尾作为重度低氧组置于另一 40 L 塑料桶,1 h 内将溶解氧浓度降低至 (0.3 ± 0.1) mg/L,并保持 4 h,采集组织。低氧处理时,塑料桶顶部覆盖塑料膜,水体充氮除氧获得预期溶解氧浓度。维持低氧期间,利用溶解氧测定仪定期监控水体溶解氧浓度,氧含量若降低使用氧泵增氧至目的浓度。

1.2.5 qRT-PCR 检测低氧诱导下 *Hif-α* 基因的表达

将花斑裸鲤各低氧条件处理下的白肌、红肌、心、脑和鳃组织分别提取总 RNA,平衡各起始浓度合成 cDNA 第一链,然后进行荧光定量 PCR 分析。反应体系 25 μL : $2 \times$ SuperReal PreMix Plus 12.5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、cDNA 模板 1 μL 、ddH₂O 9.5 μL 。每个样品重复 3 次,结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析^[21]。qRT-PCR 测定时 β -actin 基因表

达量作为内标,引物见表 2。由于所测荧光定量原始数据量过多,在本研究中不再以表格形式展示。

2 结果

2.1 13 个裂腹鱼亚科鱼类 *Hif- α* 基因序列分析

13 个物种的 *Hif-1 α A*、*Hif-1 α B*、*Hif-2 α A* 和 *Hif-2 α B* 基因编码区核苷酸序列分别为 2196、2325、2544 和 2511 bp,分别编码 731、774、847、836 个氨基酸,见表 3。13 个物种间各 HIF- α 基因的同源性为 93.6%~99.4%、92.7%~99.9%、92.6%~99.8%、93.5%~99.8%,各类群代表物种间同源性大于 95%。同一物种的 HIF-1 α A 与 HIF-1 α B 的相似性为 50%~53%,HIF-2 α A 与 HIF-2 α B 的相似性为

54%~58%。裂腹鱼亚科鱼类 HIF- α 具有 bHLH 结构域、PAS 和 PAC 结构域、ODD 结构域以及 TAD 结构域。在高度特化等级、特化等级和原始等级类群中分别选取高原裸鲤、厚唇裸重唇鱼和巨须裂腹鱼作为代表种,将三个物种的 HIF- α 蛋白序列进行多序列比对,结果见图 1。HIF- α N 端的 bHLH-PAS 结构域是高度保守的,但 ODD 区域保守性较低,特别是在氧依赖性脯氨酸羟基化位点附近。在 13 个物种的 HIF- α 序列中检测到两个保守的脯氨酸羟基化序列 LxxLAP,但 13 个物种在 HIF-1 α A 的 NODD 中检测到特异性缺失,并且特化及高度特化类群的 HIF-1 α B 的 CODD 结构域中脯氨酸羟基化序列突变为 PxxLAP。

表 3 基因编码区序列信息表

Table 3 Sequence information of the gene coding region

| 基因 Genes | CDS 长度 Length (bp) | 氨基酸 Amino acids | 分子量 Molecular weight ($\times 10^3$ Da) | 等电点 pI | 保守位点 Conserved sites | 变异位点 Variable sites | 同源性 Homology (%) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------|--|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Hif-1αA</i> | 2196 | 731 | 78.93-81.02 | 5.15-5.34 | 2028 | 147 | 93.6-99.4 |
| <i>Hif-1αB</i> | 2325 | 774 | 84.83-85.68 | 4.95-5.14 | 2142 | 183 | 92.7-99.9 |
| <i>Hif-2αA</i> | 2544 | 847 | 93.35-94.10 | 6.02-6.24 | 2348 | 190 | 92.6-99.8 |
| <i>Hif-2αB</i> | 2511 | 836 | 89.97-93.26 | 6.24-6.68 | 2336 | 175 | 93.5-99.8 |

2.2 HIF- α 分子进化分析

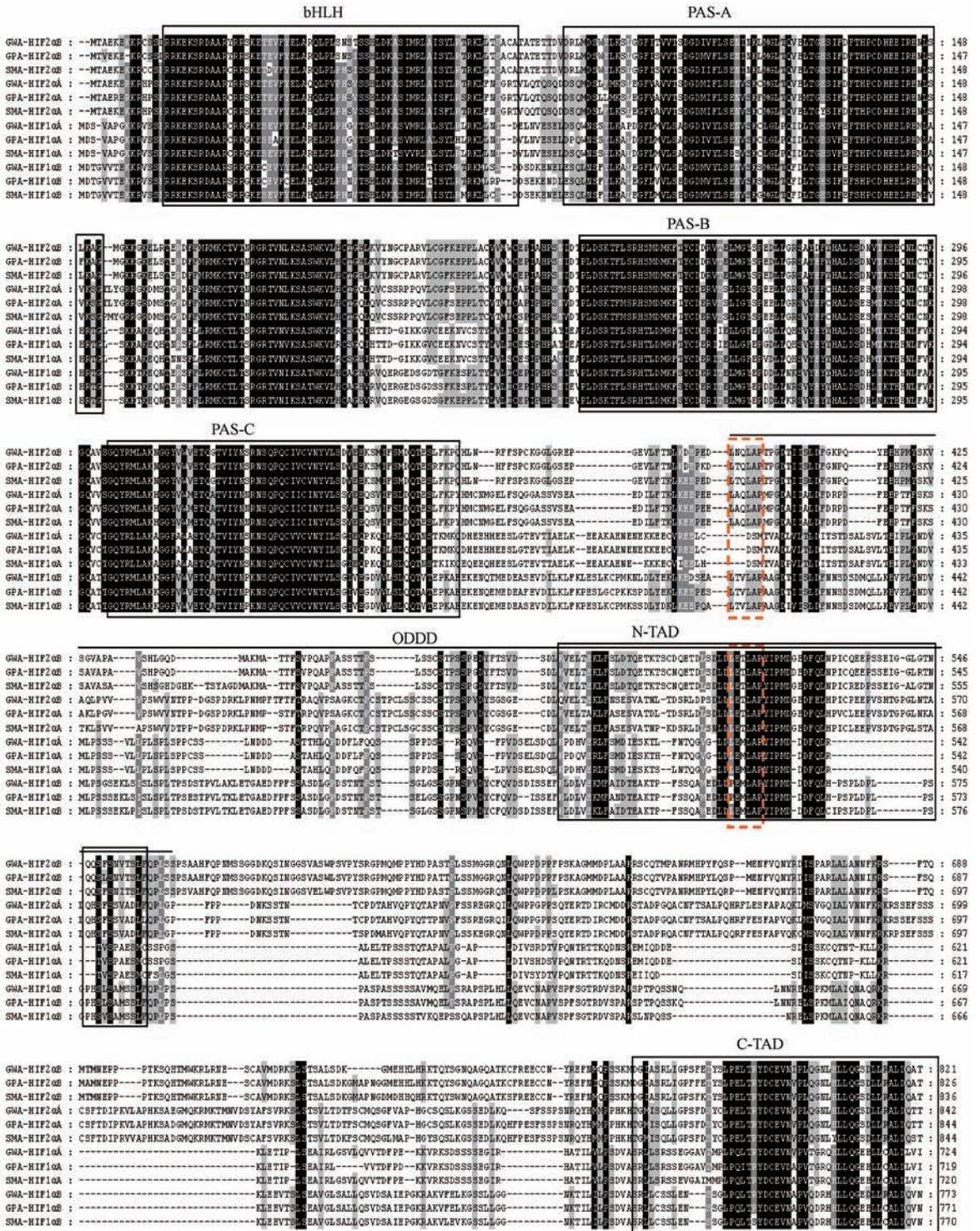
为了探索 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 在裂腹鱼亚科鱼类不同类群中是否发生选择作用,本文以 13 个裂腹鱼亚科鱼类的物种进化树作为输入树(图 2),运用 PAML 4.6 中 CODEML 程序的三个模型进行检测。位点模型中分析发现 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 存在正向选择作用($\omega > 1$),BEB 分析显示 HIF-1 α 和 HIF-2 α 中皆存在后验概率大于 0.95 的潜在选择位点(表 4)。支-位点混合模型中,以高度特化裂腹鱼亚科鱼类的 7 个代表物种作为前景支,其他物种作为背景支进行分子进化分析,结果显示 HIF-1 α A、HIF-1 α B 和 HIF-2 α B 中均未检测到正向选择位点($\omega = 1$),在 HIF-2 α A 中检测到一个正向选择位点(516 N),但后验概率小于 0.95。

为了进一步的检验 HIF-1 α 和 HIF-2 α 所有支系是否发生正向选择作用,本研究进行了支模型分析,结果表明 HIF-1 α A 中拉萨裸裂尻鱼及其祖先支(支 2、支 14 和支 18,图 2)、厚唇裸重唇鱼支(支 9)和澜沧裂腹鱼及其祖先支(支 12 和支 22)受到正向选择作用,HIF-1 α B 中极边扁咽齿鱼支(支 6)受到

选择作用,支 15 和支 16 也具有明显不同的进化速率,但具体的进化物种分支并未检测到。HIF-2 α A 中尖裸鲤支(支 7)、双须叶须鱼支(支 8)和西藏裂腹鱼支(支 10)受到正向选择作用,且支 14 和支 16 也具有明显不同的进化速率。HIF-2 α B 中花斑裸鲤支(支 5)受到选择作用,支 16 和支 22 也具有明显不同的进化速率,但具体的进化物种分支并未检测到。

2.3 低氧诱导下 *Hif- α* 基因的表达

在重度低氧处理 4 h 后,*Hif-1 α A* 基因在花斑裸鲤白肌组织中的表达量显著上升($P < 0.01$),是常氧组的 9.8 倍;而在心脏中的表达量显著降低($P < 0.01$);在脑、鳃和红肌组织中的表达量基本保持不变($P > 0.05$)。*Hif-1 α B* 基因在白肌、红肌、心脏和脑组织中显著降低($P < 0.01$);在鳃组织中表达量上调($P < 0.05$)。*Hif-2 α A* 基因在心脏($P < 0.01$)和红肌($P < 0.05$)组织中表达量上升,且心脏组织中的表达量为常氧组的 38 倍;在脑组织中的表达量显著降低($P < 0.01$)。*Hif-2 α B* 基因在白肌组织中的表达量上调($P < 0.01$);在心脏和脑组织中表达量显著下调($P < 0.01$)(图 3)。



注:GWA:高原裸鲤;GPA:厚唇裸重唇鱼;SMA:巨须裂腹鱼。

图 1 HIF-α 的蛋白序列比对

Note: GWA: *Gymnoctypus waddelli*; GPA: *Gymnodipteryx pachycheilus*; SMA: *Schizothorax macropogon*.

Figure 1 Sequence alignment of HIF-α proteins

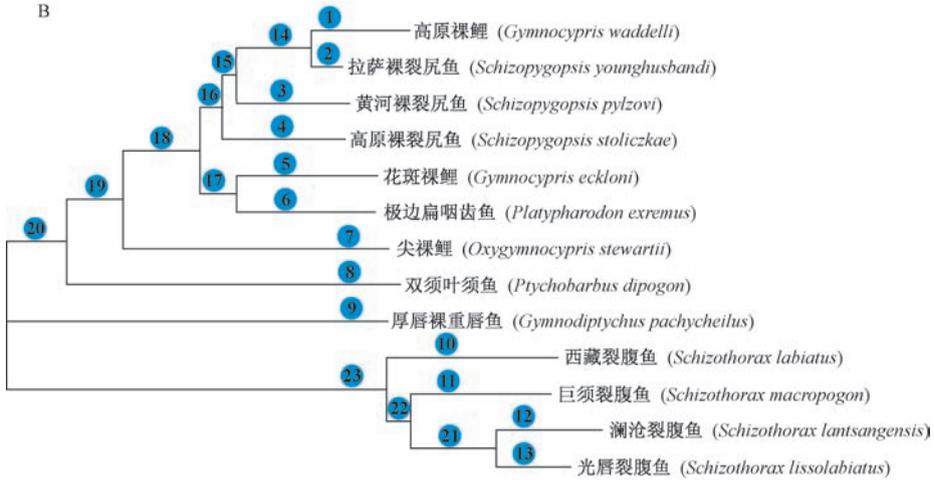
表 4 位点模型下似然率值和参数估计

Table 4 Likelihood and parameter estimates under locus model

| 基因 Genes | 参数估计 Parameter estimates | 似然率值 Likelihood values | 正向选择位点 Positively selected sites |
|----------------|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>Hif-1αA</i> | M0 | $\omega = 0.56181$ | 4753.99 |
| | M1a | $p0 = 0.679, p1 = 0.321$ | 4683.99 |
| | M2a | $p0 = 0.729, p1 = 0.154, p2 = 0.117, \omega1 = 7.899$ | 4626.15 |
| | M7 | $p = 0.005, q = 0.00502$ | 4695.43 |
| | M8 | $p0 = 0.89, p = 0.005, q = 0.021 (p1 = 0.11), \omega1 = 8.417$ | 4626.27 |
| <i>Hif-1αB</i> | M0 | $\omega = 0.43$ | 4665.21 |
| | M1a | $p0 = 0.561, p1 = 0.439$ | 4637.1 |
| | M2a | $p0 = 0.9727, p1 = 0, p2 = 0.027, \omega1 = 36.433$ | 4581.56 |
| | M7 | $p = 0.005, q = 0.00737$ | 4637.64 |
| | M8 | $p0 = 0.999, p = 0.005, q = 0.007 (p1 = 0.00097), \omega1 = 999$ | 4560.76 |
| <i>Hif-2αA</i> | M0 | $\omega = 0.53$ | 5213.57 |
| | M1a | $p0 = 0.549, p1 = 0.451$ | 5177.25 |
| | M2a | $p0 = 0.558, p1 = 0.4408, p2 = 0.00098, \omega1 = 999$ | 5097.15 |
| | M7 | $p = 0.005, q = 0.00747$ | 5178.24 |
| | M8 | $p0 = 0.999, p = 0.005, q = 0.0075 (p1 = 0.00094), \omega1 = 999$ | 5097.50 |
| <i>Hif-2αB</i> | M0 | $\omega = 0.459$ | 5084.73 |
| | M1a | $p0 = 0.611, p1 = 0.388$ | 5032.04 |
| | M2a | $p0 = 0.634, p1 = 0.356, p2 = 0.00965, \omega1 = 86.565$ | 4960.77 |
| | M7 | $p = 0.005, q = 0.0073$ | 5032.11 |
| | M8 | $p0 = 0.99, p = 0.005, q = 0.00754 (p1 = 0.00967), \omega1 = 90.867$ | 4961.17 |

A

| 支模型 Branch models | dN/dS | | | |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| | HIF-1αA | HIF-1αB | HIF-2αA | HIF-2αB |
| 1 | 0.57 | <0.01 | 0.14 | 0.16 |
| 2 | 1.15* | 0.12 | <0.01 | 0.10 |
| 3 | 0.68 | 0.93 | 0.13 | <0.01 |
| 4 | 0.49 | 0.16 | 0.55 | 0.71 |
| 5 | 0.21 | 0.28 | 0.77 | 1.26* |
| 6 | 0.27 | 1.51* | 0.19 | 0.31 |
| 7 | 0.82 | 0.56 | 3.44* | 0.44 |
| 8 | 0.22 | 0.49 | 1.31* | 0.44 |
| 9 | 1.13* | 0.40 | 0.50 | 0.71 |
| 10 | 0.53 | 0.34 | 1.13* | 0.45 |
| 11 | 0.47 | <0.01 | 0.31 | Inf |
| 12 | 1.59* | 0.75 | 2.33* | 0.84 |
| 13 | 0.96 | 0.19 | 0.84 | 0.55 |
| 14 | 2.94* | 0.37 | 1.99* | 0.26 |
| 15 | <0.01 | 3.61* | 0.09 | Inf |
| 16 | <0.01 | 2.33* | 124.44* | 1.21* |
| 17 | 0.17 | 0.56 | <0.01 | Inf |
| 18 | 203.69* | 0.09 | 0.61 | 0.12 |
| 19 | <0.01 | 0.34 | 0.28 | 0.43 |
| 20 | Inf | Inf | 0.43 | Inf |
| 21 | <0.01 | 0.20 | 0.33 | 0.32 |
| 22 | 2.09* | 0.86 | Inf | 324.53* |
| 23 | 0.78 | 0.45 | 0.64 | 0.52 |

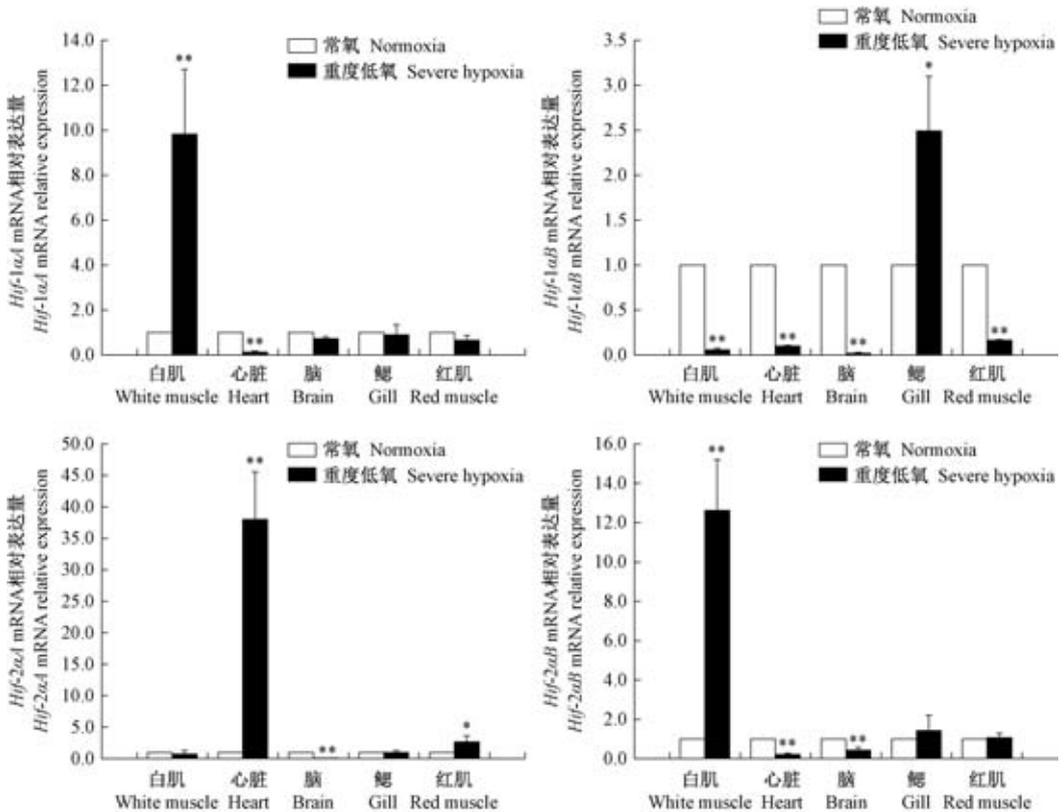


注:A 为不同支系 HIF-1 α A、HIF-1 α B、HIF-2 α A 和 HIF-2 α B 的 ω 值, B 中的分支编号是指 A 中系统发育树上的编号,* 表示 ω 值大于 1, Inf 表示相应 dN 值为 0, 其中 ω 值表示非同义替换与同义替换比值, dN 表示密码子的非同义替换。B 是 13 个裂腹鱼亚科鱼类的系统发育树。

图 2 13 个裂腹鱼亚科鱼类的系统发育树

Note. A is a phylogenetic tree of 13 subfamilies of schizothoracine fishes. B indicates the ω values of HIF-1 α A, HIF-1 α B, HIF-2 α A and HIF-2 α B. The numbers in B refer to the numbers on the phylogenetic tree in A. The symbol * indicates that the ω value is greater than 1, and Inf indicates that the corresponding dN value is 0, where the ω value indicates the ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions, and dN indicates nonsynonymous substitutions at codons.

Figure 2 Phylogenetic tree of 13 subfamilies of schizothoracine fishes



注:单因子方差分析法检测各组织基因的表达量差异($n=3$),与常氧组相比差异显著(** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

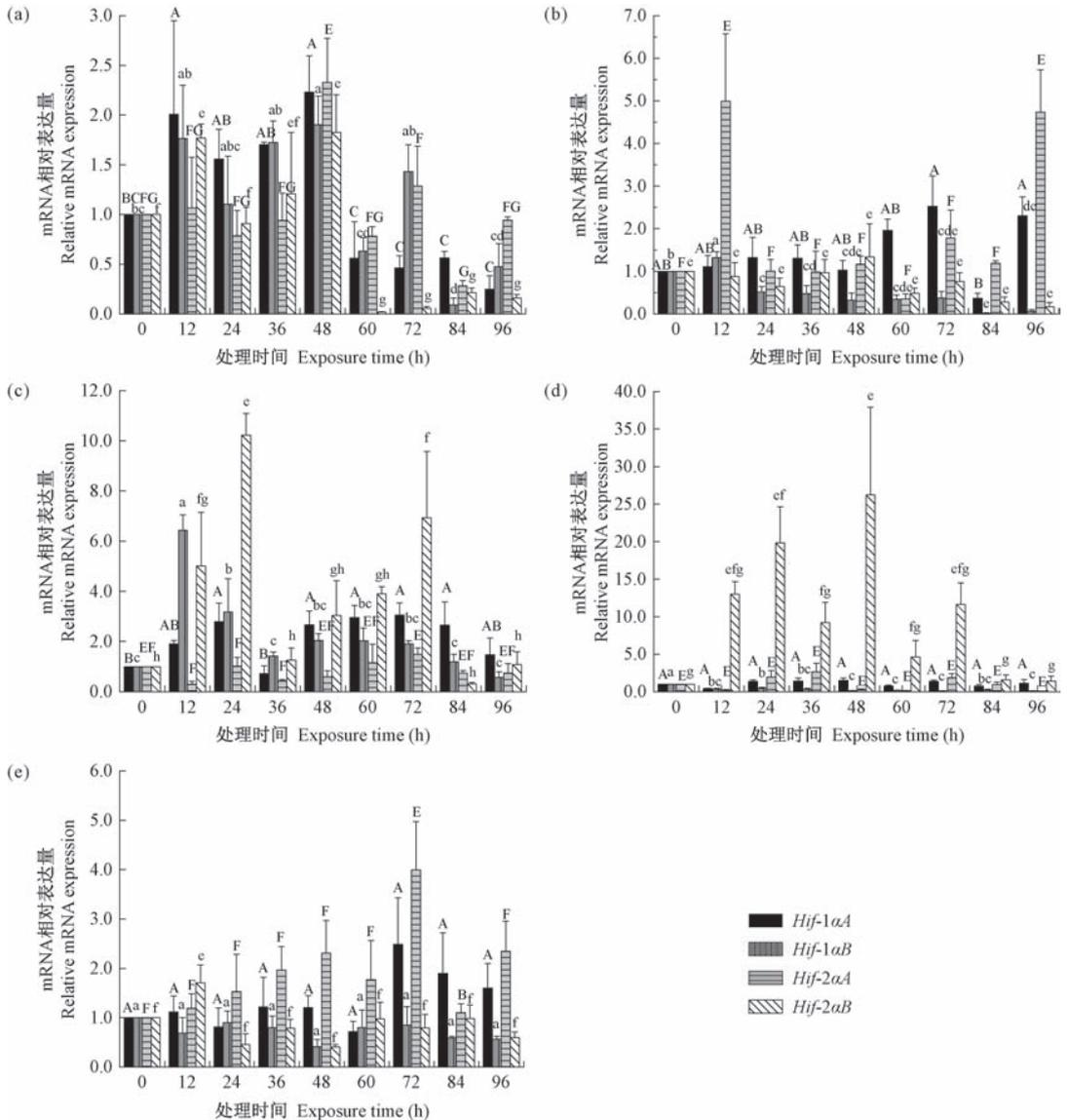
图 3 重度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 Hif- α 基因的表达量

Note. Significant differences between tissues were analyzed by one-way ANOVA ($n=3$). Compared with the normoxia control group, the asterisks indicate significant difference (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

Figure 3 Expression of Hif- α gene in main tissues of *Gymnocypris eckloni* under severe hypoxia and normoxia

中度低氧下,花斑裸鲤脑组织中 *Hif-1αA* 的表达量在 48 h 时达到最高,并且是 0 h 时的 2.2 倍,随后表达量急剧下调 ($P < 0.05$); 而 *Hif-1αB* 表达量从 0 h 开始逐渐上调,在 48 h 表达量最高,且 72 h 的表达量也明显高于 0 h ($P < 0.05$); *Hif-2αA* 表达量只在 48 h 和 72 h 时显著上调,在 84 h 时其表达量显著下调 ($P < 0.05$); 而 *Hif-2αB* 在脑组织中的表达量在 12 h 和 36 h 时显著高于 0 h,且在 48 h 时表达量最高,随后其表达量急剧下调。心脏组织中 *Hif-1αA* 的表达量在 72 h 和 96 h 显著高于 0 h ($P < 0.05$); 在 12 h 时 *Hif-1αB* 和 *Hif-2αA* 的表达量最高,且 *Hif-*

2αA 表达量在 96 h 时较 0 h 显著上调 ($P < 0.05$)。鳃组织中, *Hif-1αA* 的表达量除 36 h 外其他时间段均高于 0 h 的表达量 ($P < 0.05$); *Hif-1αB* 和 *Hif-2αB* 基因的表达量在 36、84 和 96 h 时基本保持不变 ($P > 0.05$),其他时间段显著上调 ($P < 0.05$); *Hif-2αA* 的表达量在 12 h 和 36 h 表达量降低 ($P < 0.05$)。白肌组织中,中度低氧胁迫时 *Hif-2αA* 的表达量远远高于其他三个基因,并在 48 h 时表达量最高; *Hif-1αA* 和 *Hif-2αA* 基因在各个时间段的表达量与 0 h 相比均无明显变化 ($P > 0.05$); *Hif-1αB* 各个时间段的表达量均比 0 h 的表达量显著下调 ($P < 0.05$)。



注: a: 脑; b: 心脏; c: 鳃; d: 白肌; e: 红肌。单因子方差分析法检测各组组织的基因表达量差异 ($n=3$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 4 中度低氧和常氧条件下花斑裸鲤主要组织 *Hif-α* 基因的表达量

Note. a: Brain. b: Heart. c: Gill. d: White muscle. e: Red muscle. Significant differences between tissues were analyzed by one-way ANOVA ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 4 Expression of *Hif-α* gene in main tissues of *Gymnocypris eckloni* under moderate hypoxia and normoxia

红肌组织中, *Hif-1 α* 和 *Hif-2 α* 基因在 72 h 表达量最高, 而 *Hif-1 β* 和 *Hif-2 β* 表达量在 24 h-96 h 时间段较 0 h 均无明显变化 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

鱼类具有同源基因 *Hif- α* 和 *Hif- β* , 并与人类 *HIF- α* 基因具有很高的相似性, 同时鱼类中的 *Hif- α* 基因可能在氧依赖基因的表达中产生的作用^[22]。裂腹鱼亚科鱼类 *HIF- α* 和 *HIF- β* 氨基酸序列长度与鲤科其他鱼类如鳙鱼 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)、鲫鱼 (*Carassius auratus*) 及斑马鱼基本一致, 并具有 bHLH 结构域、PAS 和 PAC 结构域、ODD 结构域以及 TAD 结构域。目前大多数硬骨鱼类丢失其中一个同源基因, 鲤科鱼类二者皆有保存, 以上表明 *HIF- α* 和 *HIF- β* 在鲤科鱼类长期进化过程中体现出较高的保守性, 与其产生的生物学功能一致。本研究获得了 13 个裂腹鱼亚科代表物种 *Hif-1 α* 、*Hif-1 β* 、*Hif-2 α* 和 *Hif-2 β* 基因编码区完整序列, 其 N 端的 bHLH-PAS 结构域是高度保守的, 但 ODD 结构域保守性较低, 特别是氧依赖性脯氨酸羟基化位点附近。*HIF- α* 中检测到两个保守的脯氨酸羟基化序列 LxxLAP, 但在 13 个物种 *HIF-1 α* 的 NODD 中检测到特异性缺失, 并且特化及高度特化的裂腹鱼的 *HIF-1 β* 的 CODD 结构域中脯氨酸羟基化序列突变为 PxxLAP。*HIF* 羟基化途径在后生动物中受氧依赖性脯氨酸羟基化酶 (prolyhydroxylases, PHD) 家族的调控^[23]。在哺乳动物中, CODD 结构域中 Pro-564 是 PHD 与 *HIF-1 α* 结合的重要位点^[18]。缺氧条件下, PHD 失活使 *HIF- α* 的羟基化受到抑制, 从而与 *HIF-1 β* 形成异源二聚体, 结合 DNA 序列上的低氧反应元件以激活下游基因的表达进行耐氧适应性反应^[24-25]。由此可以推断, 发生在 ODD 区域中的缺失和特异突变可能是裂腹鱼亚科鱼类在低氧适应中进化表现。

目前, 对于裂腹鱼亚科鱼类 *HIF- α* 分子进化研究报道甚少。管丽红等^[18] 在裂腹鱼亚科鱼类中首次克隆出 *Hif* 的旁系同源基因, 并结合其他鲤科鱼 *HIF- α* 中序列仅发现 *HIF-1 α* 中存在正向选择作用, 且在特化及高度特化的裂腹鱼中存在选择作用位点, *Hif-1 β* 基因是裂腹鱼适应低氧环境中重要的调节因子, 同时 *Hif- α* 基因的正向选择可能反映了裂腹鱼亚科鱼类在高海拔地区缺氧环境的适应性进化^[26]。本研究进一步对裂腹鱼亚科不同进化等级物种间是否存在选择压力进行分析, 结果表明 *HIF-1 α* 、*HIF-1 β* 、*HIF-2 α* 和 *HIF-2 β* 中皆存在

潜在的受到正向选择作用的氨基酸位点, 且后验概率大于 0.95。同时, 支模型表明 *HIF- α* 在特化各物种、高度特化各物种及其祖先支具有明显不同的进化速率, 但具体的进化物种分支并未检测到。在支位点混合模型中, 以高度特化等级物种作为前景支, 仅在 *HIF-2 α* 中存在正向选择作用。由此看来, *HIF- α* 在 13 个物种间存在正向选择作用, 但 *HIF-1 α* 、*HIF-1 β* 和 *HIF-2 β* 仅检测到特化等级支及高度特化支中存在选择作用, 具体物种分支有待进一步研究。

低氧诱导因子作为氧敏感的转录激活因子, 在低氧条件下可被诱导表达参与反应调节。*HIF-1 α* 和 *HIF-2 α* 两者具有不同的激活域从而形成了各自的特异性靶基因以及各自独特的功能^[23]。本研究结果表明, 重度缺氧条件下 *Hif-1 α* 和 *Hif-2 β* 基因在白肌组织中显著上升, 且在中度缺氧时, *Hif-2 β* 在白肌组织中的表达量远高于另外 3 个基因。*Hif-1 β* 在重度缺氧条件下在鳃组织中表达量显著升高。*Hif-2 α* 在重度缺氧条件下在心和红肌中的表达量显著上升, 并在中度缺氧条件的 12 h 和 96 h 具有较高的表达量。在不同组织中 *Hif- α* mRNA 表达不同, 可能是对氧气敏感度不同, 缺氧表达的动力学取决于氧气水平并存在组织器官特异性。在对尼罗罗非鱼的研究中发现硬骨鱼 *Hif-1 α* /*B* 和 *Hif-2 α* /*B* 基因在缺氧条件下的转录调节中存在物种特异性, 也还受缺氧的组织及缺氧状态的影响^[27]。在重度缺氧条件下, 花斑裸鲤的脑组织中 *Hif-1 β* 、*Hif-2 α* 和 *Hif-2 β* 基因表达量显著下降, 心脏组织中 *Hif-1 α* 、*Hif-1 β* 和 *Hif-2 β* 基因表达量显著下降, 可能在急性低氧环境中可以保护物种本身, 在中度低氧的后期, 心脏组织中的 *Hif-1 α* 和 *Hif-2 α* 基因表达量上调, 可能是为了提高携氧能力从而弥补机体缺氧而做出的应激性应答。由此推断, 裂腹鱼亚科鱼类在适应长期低氧和应激性低氧环境可能存在两种不同的机制。

参 考 文 献 (References)

- [1] 武云飞. 青藏高原鱼类 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992, 541-544.
Wu YF. The Fishes of the Qinghai-Xizang Plateau [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 1992, 541-544.
- [2] 代应贵, 肖海. 裂腹鱼类种质多样性研究综述 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(32): 38-46.
Dai YG, Xiao H. Review of studies on the germplasm resources of the schizothoracinae fishes [J]. Chin Agric Bull, 2011, 27(32): 38-46.

- [3] Li Y, Ren Z, Shedlock AM, et al. High altitude adaptation of the schizothoracine fishes (Cyprinidae) revealed by the mitochondrial genome analyses [J]. *Gene*, 2013, 517(2): 169-178.
- [4] 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞. 裂腹鱼的起源和演化及其与青藏高原的隆起关系 [A]. 见: 中国科学院青藏高原综合科学考察队, 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题 [M]. 北京: 科学出版社, 1981: 110-130.
- Cao WX, Chen YY, Wu YF. Origin and evolution of Schizothoracine fishes in relation to the upheaval of the Qinghai-Xizang Plateau [A]. In: Anonym. *Studies on the Period, Amplitude and Type of the Uplift of the Qinghai-Xizang Plateau* [M]. Beijing: Science Press, 1981: 118-130.
- [5] Cao YB, Chen XQ, Shen W, et al. Evolution and regulation of the downstream gene of hypoxia-inducible factor-1 α in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) from Lake Qinghai, China [J]. *J Mol Evol*, 2008, 67(5): 570-580.
- [6] Wang Z, Yonezawa T, Liu B, et al. Domestication relaxed selective constraints on the yak mitochondrial genome [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(5): 1553-1556.
- [7] 魏朝军, 申志新, 贾银涛, 等. 花斑裸鲤年龄鉴定材料的比较与年龄判别 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(9): 2537-2541.
- Wei CJ, Shen ZX, Jia YT, et al. Comparison of aging methods and discrimination analysis on age classification for *Gymnocypris eckloni* [J]. *Chin J Ecol*, 2015, 34(9): 2537-2541.
- [8] Wawrowski A, Gerlach F, Hankeln T, et al. Changes of globin expression in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to acute and chronic hypoxia [J]. *J Comp Physiol B*, 2011, 181(2): 199-208.
- [9] Cheung CH, Chiu JM, Wu RS. Hypoxia turns genotypic female medaka fish into phenotypic males [J]. *Ecotoxicology*, 2014, 23(7): 1260-1269.
- [10] Shang EH, Yu RM, Wu RS. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(9): 3118-3122.
- [11] 李艳丽, 徐功玉, 肖金文, 等. 血红素加氧酶 1 在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究 [J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 43-49.
- Li YL, Xu GY, Xiao JW, et al. Studies on the protective role of zebrafish HO1 in response to hypoxia [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2017, 41(1): 43-49.
- [12] Zhu CD, Wang ZH, Yan B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review [J]. *J Comp Physiol B*, 2013, 183(8): 1005-1013.
- [13] 常瑜, 孔祥会. 鱼类低氧诱导因子-1 基因的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(32): 13998-14000.
- Chang Y, Kong XH. Research progress in fish HIF-1 [J]. *J Anhui Agr Sci*, 2008, 36(32): 13998-14000.
- [14] Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α [J]. *Gene Expr*, 1998, 7(3): 205-213.
- [15] Soitamo AJ, Rabergh CM, Gassmann M, et al. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(23): 19699-19705.
- [16] Rojas DA, Perrz-Munizaga DA, Centanin L, et al. Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish [J]. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7(3): 339-345.
- [17] Rytik önen KT, Akbarzadeh A, Miandare HK, et al. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen sensing [J]. *Evolution*, 2013, 67(3): 873-882.
- [18] Guan L, Chi W, Xiao W, et al. Analysis of hypoxia-inducible factor alpha polyploidization reveals adaptation to Tibetan Plateau in the evolution of schizothoracine fish [J]. *BMC Evol Biol*, 2014, 14: 192.
- [19] Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. *Methods Mol Biol*, 2000, 132: 71-91.
- [20] Qi DL, Chao Y, Zhao YL, et al. Molecular evolution of myoglobin in the Tibetan Plateau endemic schizothoracine fish (Cyprinidae, Teleostei) and tissue-specific expression changes under hypoxia [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2018, 44(2): 557-571.
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Mikko N, Rees BB. Oxygen-dependent gene expression in fishes [J]. *Am J Physiol Reg I*, 2005, 288(5): R1079-1090.
- [23] Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 393-402.
- [24] Schöde J, Grampp S, Maher ER, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factors, and renal cancer [J]. *Eur Urol*, 2016, 69(4): 646-657.
- [25] 邹俊遐, 陈科. 缺氧诱导因子 (HIFs) 在肾癌发生中的作用及其分子机制 [J]. *遗传*, 2018, 40(5): 341-356.
- Zou JX, Chen K. Roles and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factors in renal cell carcinoma [J]. *Hereditas*, 2018, 40(5): 341-356.
- [26] Yonezawa T, Hasegawa M, Zhong Y. Polyphyletic origins of schizothoracine fish (Cyprinidae, Osteichthyes) and adaptive evolution in their mitochondrial genomes [J]. *Genes Genet Syst*, 2014, 89(4): 187-191.
- [27] 姜华鹏, 张驰, 王丛丛, 等. 软刺裸鲤和齐口裂腹鱼 HIF1B 和 HIF2A 的克隆及低氧适应性的表达分析 [J]. *淡水渔业*, 2015, 45(5): 11-18.
- Jiang HP, Zhang C, Wang CC, et al. Cloning of HIF1B and HIF2A genes and their expressions response to hypoxia in *Gymnocypris dobula* and *Schizothorax prenanti* [J]. *Freshwater Fish*, 2015, 45(5): 11-18.

丁世彬,高丽云,李玉春,等. 慢性PM2.5暴露对C57BL/6J小鼠肺组织炎症和NLRP3炎性小体活性的影响[J].中国实验动物学报, 2019,27(4):444 - 449.

Ding SB, Gao LY, Li YC, et al. Effects of chronic PM2.5 exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):444 - 449.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.004

慢性PM2.5暴露对C57BL/6J小鼠肺组织炎症和NLRP3炎性小体活性的影响

丁世彬^{1,2*}, 高丽云¹, 李玉春¹, 卜勇军¹, 张国富¹

(1. 新乡医学院, 河南新乡 453003; 2. 河南省分子诊断与检验医学协同创新中心, 新乡 453003)

【摘要】 目的 研究慢性PM2.5暴露对小鼠肺炎症和NLRP3炎性小体活性的影响,为防治PM2.5所致肺损伤提供新靶点。方法 雄性C57BL/6J小鼠通过不同剂量气管滴注法进行PM2.5染毒,剂量为2, 10 mg/(kg·bw),对照组小鼠滴注生理盐水。小鼠连续滴注20次,每3 d染毒1次后,取血和肺组织。三组小鼠进行血细胞计数;用免疫荧光染色法检测肺组织巨噬细胞水平;用试剂盒测定肺组织中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β , IL-18水平及caspase-1活性;用实时定量PCR法检测肺组织NLRP3炎性小体相关mRNA表达水平。结果 两个剂量PM2.5染毒均能明显降低单核细胞百分比($P < 0.01$),增加中性粒细胞百分比($P < 0.01$);导致肺炎症发生;增加肺组织caspase-1活性($P < 0.01$)及NLRP3和ASC的mRNA表达($P < 0.01$)。与对照组相比,两个剂量组小鼠肺组织IL-1 β 和IL-18水平均显著增高($P < 0.01$)。结论 慢性PM2.5暴露可能通过激活肺组织NLRP3炎性小体导致肺炎症发生。

【关键词】 小鼠; PM2.5; NLRP3炎性小体; 肺炎症

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0444-06

Effects of chronic PM2.5 exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice

DING Shibin^{1,2*}, GAO Liyun¹, LI Yuchun¹, BU Yongjun¹, ZHANG Guofu¹

(1. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan, China. 2. Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang 453003)

Corresponding author: DING Shibin. E-mail: dingshibin@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the effects of chronic PM2.5 exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in mice, and to provide a new target for prevention and treatment of lung injury caused by PM2.5. **Methods** Male C57BL/6J mice were exposed to two doses of PM2.5 by tracheal instillation [2, 10 mg/(kg·bw)], and the control mice were instilled with normal saline. After mice had been instilled for 20 times (1 time every 3 days), blood and lung tissues were collected. Blood cells were counted, and lung tissue macrophage levels were measured using immunofluorescence staining. Interleukin (IL)-1 β and IL-18 levels and caspase-1 activity in lung tissues were determined using ELISA and caspase-1 activity measurement kits. The expression levels of NLRP3 inflammasome-associated mRNA in lung tissue were detected using real-time PCR. **Results** The two doses of PM2.5 significantly reduced the percentage of

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(81502843);河南省高等学校重点科研项目(16A330002)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81502843), and the Key Scientific Research Project of Universities in Henan Province (16A330002).

【通信作者】 丁世彬(1982—)男,博士,研究方向:空气污染与慢性疾病。Email:dingshibin@163.com

monocytes ($P < 0.01$) and induced lung inflammation. The PM_{2.5}-treated mice had a higher percentage of neutrophils ($P < 0.01$), a higher in caspase-1 activity ($P < 0.01$), and a higher in mRNA expression of NLRP3 and ASC ($P < 0.01$) in lung tissues compared with the control mice. IL-1 β and IL-18 levels in the lung tissues of the two PM_{2.5}-exposed groups were significantly higher than those seen in the control group (both $P < 0.01$). **Conclusion** Chronic PM_{2.5} exposure may induce lung inflammation by activating the NLRP3 inflammasome in the lung tissue.

[Keywords] mouse; PM_{2.5}; NLRP3 inflammasome; lung inflammation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

大气细颗粒物 2.5 (particulate matter 2.5, PM_{2.5})是指空气动力学直径小于 2.5 μm 的大气颗粒物,是目前我国空气污染物主要组成(雾霾)。由于 PM_{2.5} 粒径较小,它可以随着呼吸过程到达呼吸道细支气管和肺泡腔并沉积^[1],因此 PM_{2.5} 对人体健康的危害程度远大于其他粒径较大的颗粒物。流行病学和临床研究证实,大气颗粒物(particulate matter, PM)污染水平升高与呼吸疾病的入院率及死亡率密切相关^[2-4]。动物实验显示:急性和亚慢性 PM_{2.5} 暴露均能导致肺炎症^[5-6];但慢性 PM_{2.5} 暴露对动物肺炎症的影响尚无报道。机体的先天免疫系统包含多种受体,称为模式识别受体(PRRs),PRRs 能检测即将发生的危险(如环境污染物或内源性有毒物质),并引发保护性反应^[7]。目前,NLRP3 炎性小体是 PRRs 中研究较多的一种。越来越多的证据显示,NLRP3 炎性小体与许多呼吸系统疾病(如慢性阻塞性肺疾病,呼吸系统炎症)的发生关系密切^[8-9],并且 PM_{2.5} 能激活肺组织 NLRP3 炎性小体^[6],但 NLRP3 炎性小体在 PM_{2.5} 导致肺损伤的机制尚不十分清楚。本研究旨在明确慢性 PM_{2.5} 暴露对肺炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响,为 PM_{2.5} 暴露所致肺毒性及其可能分子机制提供动物实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 23~25 g,来自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2015-0012】。小鼠饲养在室温 21~25℃ 和湿度 60%~70% 的环境中,自由摄食普通饲料和饮水。全部动物实验操作均严格遵守新乡医学院实验动物伦理管理条例,并经过新乡医学院实验动物伦理委员会许可【XXMU-2016-0007】。

1.1.2 试剂与仪器

白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和 IL-18 ELISA

试剂盒(eBioscience, 美国),Caspase-1 活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国),引物合成(上海生工生物技术有限公司,中国),RNA 提取试剂盒和 SYBR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司,中国),兔单克隆 F4/80 抗体(Cell Signaling Technology, 美国);石英纤维滤膜(PALL, 美国),低温离心机(Eppendorf, 德国,5424R),血细胞检测仪(Rayto, 美国),荧光定量 PCR 仪(罗氏,Light Cycler 480, 瑞士),全自动酶标仪(Thermo, 美国,Enspire)。

1.2 方法

1.2.1 PM_{2.5} 样品采集及处理

2016 年 10 月至 2017 年 3 月间,在新乡医学院 7 楼楼顶使用大流量 PM_{2.5} 采样器(Tisch Environmental, 美国,TE-6070C)收集 PM_{2.5},用石英纤维滤膜(20.3 \times 24.5 cm)作为收集介质。每日连续收集 24 h 后更换滤膜,并于 -20℃ 保存。将载有 PM_{2.5} 的滤膜剪碎,于超纯水中超声 20 min,真空干燥后称重,用生理盐水配成 2.25 mg/mL 和 7.15 mg/mL 的 PM_{2.5} 悬液待用。

1.2.2 动物分组及 PM_{2.5} 染毒

选取 6 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,小鼠饲养于 SPF 级动物房【SYXK(豫)2014-0005】,适应性喂养一周后将小鼠随机分为三组(每组 10 只):对照组给予生理盐水,低剂量 PM_{2.5} 组[2 mg/(kg·bw)]和高剂量 PM_{2.5} 组[10 mg/(kg·bw)]。小鼠采用气管滴注的方式染毒,每 3 d 染毒一次,连续染毒 20 次。气管滴注方法如下:小鼠经乙醚麻醉后,用镊子将小鼠舌头拉出暴露口腔和气管,用气管滴注套管将 50 μL 液体滴入气管。

1.2.3 动物血液和肺组织提取及指标检测

小鼠染毒结束后,用戊巴比妥(20 mg/kg)麻醉,心脏取血后,脱臼处死,血细胞检测仪进行血细胞计数。迅速分离肺组织,称取 100 mg 肺组织,按 1:9 比例加入生理盐水进行匀浆。将匀浆液 6000 r/min 离心后取上清液,按照 IL-1 β 和 IL-18 的 ELISA 检测试剂盒说明书测定肺组织匀浆中 IL-1 β 和 IL-18 的水平;

用试剂盒测定肺组织中 caspase-1 的活性。

1.2.4 肺组织免疫荧光染色

小鼠处死后,迅速分离右肺组织固定于4%多聚甲醛溶液,经酒精梯度脱水、石蜡包埋后进行F4/80抗体的免疫荧光染色,在荧光显微镜下观察肺组织F4/80水平。

1.2.5 肺组织 RNA 提取及 NLRP3 炎性小体相关基因检测

向50 mg肺组织中加入0.8 mL TRIzol,并用玻璃匀浆器匀浆后按说明书提取肺组织总RNA。NLRP3炎性小体相关基因的引物设计:NLRP3基因的引物序列为F5'-TGGGTTCTGCTCAGACACGAG-3', R5'-GGCGGGTAATCTTCCAAATGC-3'; 衔接分子凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的引物序列为F5'-GGAGTTCGTATGGCTTGGAGC-3', R5'-CGTCCACTTCTGTGACCCTG-3'; Caspase-1的引物序列为F5'-TGCCGTGGAGAGAAACAAGG-3', R5'-CCCCTGACAGGATGTCTCCA-3'; GAPDH基因的引物序列为F5'-ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', R5'-TGCCTGCTTACCACCTTCT-3'。按照RNA逆转录试剂盒说明书,将1 μg总RNA加入20 μL反应体系逆转录成cDNA;并依据荧光实时定量PCR试剂盒说明书,将25 μL反应体系(10 ng cDNA, 0.5 μmol引物和SYBR Green PCR混合试剂)下完成目的基因的扩

增和检测。将GAPDH基因作为内参基因。目的基因的表达用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。

1.3 统计学方法

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并应用SPSS 13.0软件包进行统计分析。各组均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较应用最小显著差法(LSD),检验水准为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PM2.5 暴露对小鼠血细胞的影响

由表1可见,低剂量PM2.5组和高剂量PM2.5组小鼠的血中性粒细胞百分比明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);并且两组小鼠的血单核细胞百分比明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。但三组小鼠的血白细胞总数和淋巴细胞百分比无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 PM2.5 暴露对小鼠肺组织巨噬细胞表达的影响

由图1的肺组织F4/80免疫荧光染色可见,与对照组小鼠相比,低剂量PM2.5组和高剂量PM2.5组小鼠肺组织F4/80表达明显增多,这些结果表明低剂量PM2.5暴露和高剂量PM2.5暴露能明显增

表1 慢性PM2.5染毒对小鼠血细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of PM2.5 exposure on blood cells in the mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 Groups | 白细胞($\times 10^6$ /mL) WBC | 中性粒细胞百分比(%) NEUT | 单核细胞百分比(%) MONO | 淋巴细胞百分比(%) LYMPH |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 对照组 Control | 6.35 ± 1.94 | 17.3 ± 2.9 | 3.1 ± 1.5 | 70.1 ± 3.6 |
| 低剂量 PM2.5 组 Low-dose PM2.5 | 7.32 ± 2.11 | 26.9 ± 2.8* | 1.4 ± 0.7* | 64.9 ± 4.4 |
| 高剂量 PM2.5 组 High-dose PM2.5 | 6.91 ± 2.35 | 27.2 ± 2.3* | 1.5 ± 0.8* | 67.2 ± 4.9 |

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 。

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

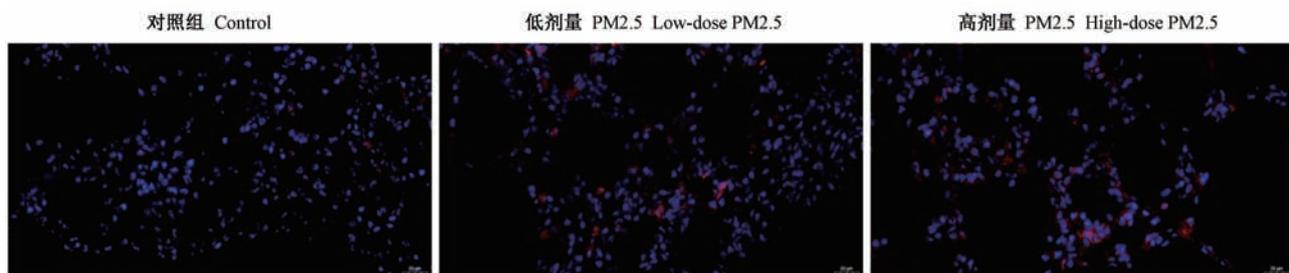


图1 三组小鼠肺组织F4/80表达情况(免疫荧光染色,×400)

Figure 1 Expression of F4/80 in the mouse lung tissues of three groups(Immunofluorescence staining,×400)

加小鼠肺组织的巨噬细胞浸润。

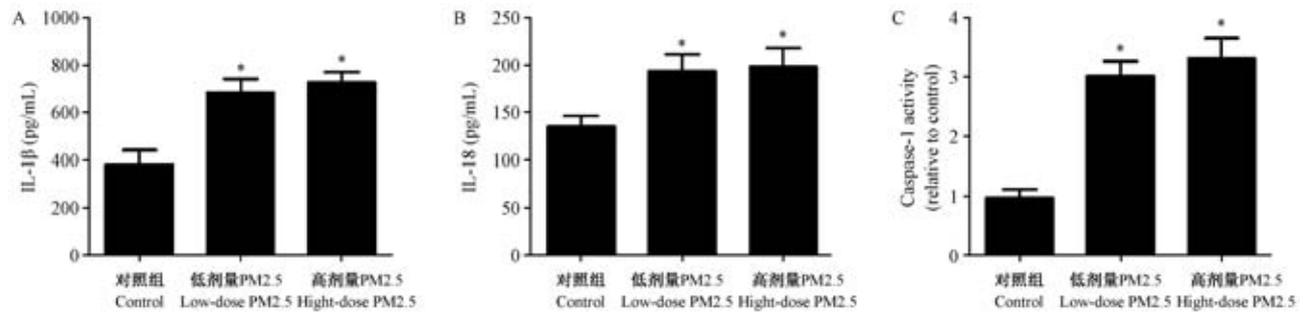
2.3 PM2.5 暴露对小鼠肺组织 IL-1 β 和 IL-18 表达水平及 caspase-1 活性的影响

由图 2 可见,与对照组相比较,低剂量 PM2.5 组和高剂量 PM2.5 组小鼠的肺组织 IL-1 β 和 IL-18 表达水平及 caspase-1 活性均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);然而,低剂量 PM2.5 组和高剂量 PM2.5 组小鼠的肺组织 IL-1 β 和 IL-18 表达水平

及 caspase-1 活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 PM2.5 暴露对小鼠肺组织 NLRP3 炎性小体相关基因表达的影响

由图 3 可见,与对照组相比较,低剂量 PM2.5 组和高剂量 PM2.5 组小鼠的肺组织 NLRP3 和 ASC 的 mRNA 表达水平均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。但三组小鼠的肺组织 caspase-1 的 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

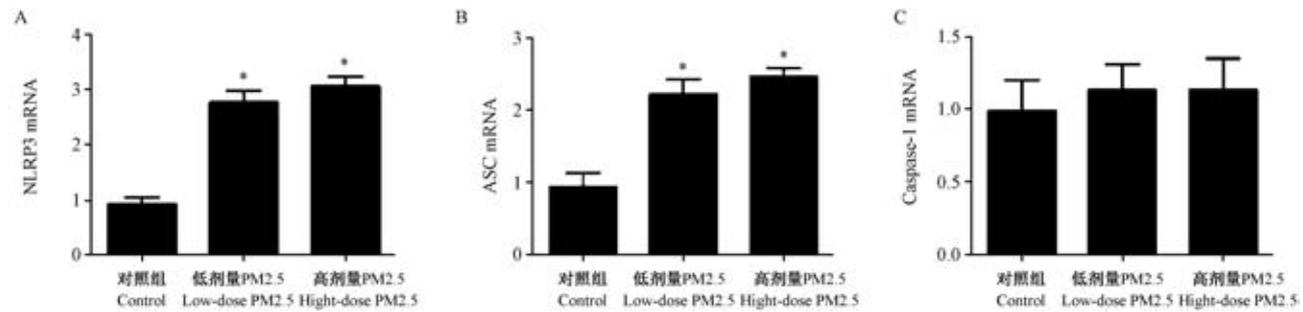


注: A. IL-1 β 水平; B. IL-18 水平; C. Caspase-1 活性; 与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

图 2 PM2.5 暴露对小鼠肺组织 IL-1 β 和 IL-18 表达水平及 caspase-1 活性的影响

Note. A. IL-1 β . B. IL-18. C. Caspase-1 activity. Compared with the control group, * $P < 0.01$.

Figure 2 Effects of PM2.5 exposure on IL-1 β , IL-18 expression and caspase-1 activity in the mouse lung tissues



注: A. 肺 NLRP3 mRNA 水平; B. 肺 ASC mRNA 水平; C. 肺 Caspase-1 mRNA 水平; 与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

图 3 PM2.5 暴露对小鼠肺组织 NLRP3 炎性小体相关基因 mRNA 表达的影响

Note. A. NLRP3 mRNA. B. ASC mRNA. C. Caspase-1 mRNA. Compared with the control group, * $P < 0.01$.

Figure 3 Effects of PM2.5 exposure on the mRNA expression of NLRP3 inflammasome-related genes in the mouse lung tissues

3 讨论

近年来,由于工业生产,化石燃料的燃烧及汽车尾气的排放等造成我国中北部平原,长江三角洲和珠江三角洲地区经常频繁遭受空气污染(尤其是雾霾)的困扰^[10]。PM2.5 是雾霾的主要组成,由于其粒径较小,并且能在空气中悬浮较长时间,因此 PM2.5 暴露对肺等靶器官的影响受到越来越多研究者的关注。之前的研究已经证明,炎症在 PM 暴露导致的人和动物的肺部疾病发生、发展的全过程都发挥至关重要作用^[11-12]。许多动物实验研究都

关注急性 PM2.5 暴露对肺的影响,并发现急性 PM2.5 暴露能导致动物的肺损伤发生^[13-15]。本实验主要研究慢性低剂量 PM2.5 暴露对肺炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响,并分析慢性 PM2.5 暴露造成肺损伤的可能机制。

本实验根据小鼠的生理参数和世界卫生组织(WHO)的第一个过渡阶段标准(24 h 平均 PM2.5 浓度为 75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)将 10 mg/(kg·bw)的 PM2.5 暴露剂量作为高剂量^[16],将 2 mg/(kg·bw)的 PM2.5 剂量作为低剂量开展暴露研究。肺泡巨噬细胞是肺组织的第一道免疫屏障,其可对进入肺内的细菌、多种颗粒物(例如 PM2.5)等异物进行吞噬。本

实验我们通过对小鼠肺组织 F4/80 免疫荧光染色发现,慢性 PM_{2.5} 暴露能导致肺组织巨噬细胞增多,这表明慢性 PM_{2.5} 暴露导致小鼠肺组织发生了广泛的炎症。NLRP3 炎性小体是先天免疫系统中的细胞内多蛋白细胞质复合物组成的 NOD 样受体,它由 NLRP3 蛋白、衔接分子凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和丝氨酸蛋白酶 caspase-1 组成^[17-18]。NLRP3 炎性小体控制 IL-18 的分泌及 IL-1 β 的成熟和分泌^[18-19];而促炎细胞因子 IL-1 β 募集巨噬细胞,中性粒细胞和肥大细胞以引发炎症反应^[20]。据报道,PM_{2.5} 可激活人单核细胞白血病细胞 (THP-1) 中的 NLRP3 并诱导 BALB/c 小鼠的肺纤维化^[6]。此外,急性 5 mg/(kg·bw) 剂量的 PM_{2.5} 暴露能增加 NLRP3 表达,并导致了肺炎症;而 0.5 mg/(kg·bw) 和 2.0 mg/(kg·bw) 两个剂量的 PM_{2.5} 急性暴露未能影响 NLRP3 表达,不会导致肺炎症^[21]。我们还发现:两个剂量的 PM_{2.5} 慢性暴露均能显著增加肺组织 NLRP3 和 ASC 的 mRNA 表达和 caspase-1 的活性,这表明慢性低剂量 PM_{2.5} 暴露也能激活肺组织 NLRP3 炎性小体。研究报道,PM_{2.5} [5、10、15 mg/(kg·bw)] 暴露 3 d 能导致大鼠肺巨噬细胞 caspase-1 表达增加^[21],但本研究中只观察到 caspase-1 的活性增加,没有观察到肺组织中 caspase-1 表达增加,这表明慢性低剂量 PM_{2.5} 可能通过调节 caspase-1 活性参与 NLRP3 炎性小体的活性上调。促炎细胞因子 IL-1 β 是肺中炎性细胞因子 IL-1 家族的重要成员,它是介导炎症的关键因子;IL-18 可与 IL-12 协同作用,通过激活 T 细胞和 NK 细胞诱导干扰素- γ 的产生^[7]。Wang 等^[22] 的研究发现,PM_{2.5} 急性暴露能导致 BALB/c 小鼠急性肺炎症,增加肺泡灌洗液和肺组织 IL-1 β 表达水平。与之前的研究一致,我们观察到慢性低剂量 PM_{2.5} 暴露能增加肺组织的 IL-1 β 和 IL-18 的蛋白表达水平。以上结果表明:PM_{2.5} 可能激活肺组织 NLRP3 炎性小体,并增加 IL-1 β 和 IL-18 分泌;即使低剂量的 PM_{2.5} 长期暴露也会造成肺组织的炎症损伤。据报道,急性 PM_{2.5} 暴露能升高中性粒细胞百分比,降低单核细胞百分比和淋巴细胞百分比^[23]。与之前的结果一致,本研究发现:慢性 PM_{2.5} [2、10 mg/(kg·bw)] 暴露能导致白细胞分类中中性粒细胞百分比升高,单核细胞百分比降低。以上研究结果表明:慢性 PM_{2.5} 暴露有可能导致系统炎症发生。

综上所述,慢性 PM_{2.5} 暴露可能通过激活肺组织 NLRP3 炎性小体进而导致肺组织炎症发生,这提示抑制 NLRP3 炎性小体的活性及其调控可能成为防治 PM_{2.5} 所致呼吸系统疾病的新靶点。

参 考 文 献 (References)

- [1] Falcon-Rodriguez CI, Osomio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, et al. Aeroparticles, composition, and lung diseases [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 3.
- [2] Makar M, Antonelli J, Di Q, et al. Estimating the causal effect of low levels of fine particulate matter on hospitalization [J]. *Epidemiology*, 2017, 28(5): 627-634.
- [3] Losacco C, Perillo A. Particulate matter air pollution and respiratory impact on humans and animals [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(34): 33901-33910.
- [4] Zhao Y, Wang S, Lang L, et al. Ambient fine and coarse particulate matter pollution and respiratory morbidity in Dongguan, China [J]. *Environ Pollut*, 2017, 222: 126-131.
- [5] Xu C, Shi Q, Zhang L, et al. High molecular weight hyaluronan attenuates fine particulate matter-induced acute lung injury through inhibition of ROS-ASK1-p38/JNK-mediated epithelial apoptosis [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 59: 190-198.
- [6] Zheng R, Tao L, Jian H, et al. NLRP3 inflammasome activation and lung fibrosis caused by airborne fine particulate matter [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 163: 612-619.
- [7] Sayan M, Mossman BT. The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1): 51.
- [8] Colarusso C, Terlizzi M, Molino A, et al. Role of the inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 81813-81824.
- [9] Kang MJ, Jo SG, Kim DJ, et al. NLRP3 inflammasome mediates interleukin-1 β production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice [J]. *Immunology*, 2017, 150(4): 495-505.
- [10] Zhang XY, Wang YQ, Niu T, et al. Atmospheric aerosol compositions in China: spatial/temporal variability, chemical signature, regional haze distribution and comparisons with global aerosols [J]. *Atmos Chem Phys*, 2012, 12: 779-799.
- [11] Kelly FJ, Fussell JC. Air pollution and airway disease [J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41(8): 1059-1071.
- [12] Cliff R, Curran J, Hirota JA, et al. Effect of diesel exhaust inhalation on bloodmarkers of inflammation and neurotoxicity: a controlled, blinded crossover study [J]. *Inhal Toxicol*, 2016, 8(3): 145-153.
- [13] Xu C, Shi Q, Zhang L, et al. High molecular weight hyaluronan attenuates fine particulate matter-induced acute lung injury through inhibition of ROS-ASK1-p38/JNK-mediated epithelial apoptosis [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 59: 190-198.
- [14] Zhao Y, Xu G, Wang S, et al. Chitosan oligosaccharides

- alleviate PM_{2.5}-induced lung inflammation in rats [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(34): 34221-34227.
- [15] Yang B, Guo J, Xiao C. Effect of PM_{2.5} environmental pollution on rat lung [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(36): 36136-36146.
- [16] Zhang Y, Hu H, Shi Y, et al.¹H NMR-based metabolomics study on repeat dose toxicity of fine particulate matter in rats after intratracheal instillation [J]. Sci Total Environ, 2017, 589: 212-221.
- [17] Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, et al. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases [J]. Redox Biol, 2015, 4: 296-307.
- [18] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(12): 1012-1021.
- [19] Mills KH, Dungan LS, Jones SA, et al. The role of inflammasome-derived IL-1 in driving IL-17 responses [J]. J Leukoc Biol, 2013, 93(4): 489-497.
- [20] Dos Santos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303(8): L627-633.
- [21] 顾娜, 张桂贤, 史鹏程, 等. PM_{2.5} 致大鼠肺损伤模型中巨噬细胞 NLRP3 炎性小体活化研究 [J]. 天津医药, 2018, 46(11): 1171-1175.
- Gu N, Zhang GX, Shi PC, et al. Study on NLRP3 inflammasome activation of alveolar macrophages in rat model of lung injury induced by PM_{2.5} [J]. Tianjin Med, 2018, 46(11): 1171-1175.
- [22] Wang H, Song L, Ju W, et al. The acute airway inflammation induced by PM_{2.5} exposure and the treatment of essential oils in Balb/c mice [J]. Sci Rep, 2017, 7: 44256.
- [23] 全国辉, 李煜, 郑德生, 等. PM_{2.5} 通过激活 Nlrp3 炎性小体诱导肺炎发生 [J]. 毒理学杂志, 2017, 31(3): 176-181.
- Tong GH, Li Y, Zheng DS, et al. PM_{2.5} induces lung inflammation response of mice by activation of Nlrp3 inflammasome [J]. Toxicology, 2017, 31(3): 176-181.

[收稿日期] 2019-02-21

谭启钊,牛国栋,赵振达,等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 450 - 455.

Tan QZ, Niu GD, Zhao ZD, et al. Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):450 - 455.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.005

关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点

谭启钊¹,牛国栋²,赵振达¹,李思维¹,宋纯理²,冷慧杰^{1*}

(1. 北京大学第三医院骨科,北京 100191; 2. 北京脊柱疾病重点实验室,北京 100191)

【摘要】 目的 探讨不同骨关节炎(osteoarthritis, OA)动物模型中软骨下骨和关节软骨的病理改变特征。方法 采用三种SD大鼠骨关节炎模型,将24只6月龄雌性大鼠随机分为4组:假手术对照组(Sham, n=6),前交叉韧带切除手术组(ACLT, n=6),木瓜蛋白酶关节腔注射组(Papain, n=6),以及卵巢切除手术组(OVX, n=6)。造模后8周取膝关节,胫骨平台行Micro-CT扫描分析,关节软骨行甲苯胺蓝染色、Mankin评分,比较软骨下骨和关节软骨改变情况。结果 造模操作后8周,不同OA模型的软骨破坏程度有所不同。ACLT和Papain组软骨破坏比较严重,OVX组软骨变化较轻。所有OA模型中的软骨下骨均发生改变,OVX组相对于Sham对照组,软骨下骨微结构显著疏松,而ACLT组与Papain组相对于Sham对照组,软骨下骨微结构没有显著改变,但相对于OVX组,有显著性差异。三种OA模型的软骨下骨板厚度都较Sham组减少。结论 三种动物模型软骨下骨和关节软骨都发生明显病理改变,并且改变有所不同。不同OA模型代表不同病理,预示着软骨下骨所发挥的作用有所不同,这为进一步研究不同类型OA发生发展的机制,以及将软骨下骨作为OA治疗的可能靶点提供了更多的依据。

【关键词】 骨关节炎;骨关节炎动物模型;关节软骨;软骨下骨;骨小梁分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0450-06

Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis

TAN Qizhao¹, NIU Guodong², ZHAO Zhenda¹, LI Siwei¹, SONG Chunli², LENG Huijie^{1*}

(1. Department of Orthopedics, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China.

2. Beijing Key Lab of Spine Diseases, Beijing 100191)

Corresponding author: LENG Huijie. E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To study the pathological changes of subchondral bone and cartilage in different osteoarthritis (OA) models. **Methods** Three Sprague Dawley (SD) OA models were used and twenty-four female rats were divided into four groups randomly: control group (Sham, n=6), anterior cruciate ligament transection operations group (ACLT, n=6), papain joint cavity injection group (Papain, n=6) and ovariectomy group (OVX, n=6). After 8 weeks, all knee joints were extracted. Subchondral bone specimens from tibia plateau were scanned, and trabecular parameters were obtained. Articular cartilage specimens were stained by toluidine blue, and OA was scored according to Mankin's histological grading system. **Results** After 8 weeks, the OA severity of cartilage are different for different OA models. Severe cartilage damage was observed in the ACLT and Papain groups. Only mild cartilage damage was occurred in the OVX group. Subchondral bone in all OA models also changed at week 8 post operation. Subchondral trabecular bone in the OVX group became looser than the Sham group. Subchondral

【基金项目】 国家自然科学基金(11872076,11472017,11002004)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (11872076,11472017,11002004).

【作者简介】 谭启钊(1992—),男,硕士,主要从事骨性关节炎方面的研究。Email: tanqz@bjmu.edu.cn

【通信作者】 冷慧杰(1975—),男,博士,副研究员,主要从事骨与关节生物力学研究。Email: lenghj@bjmu.edu.cn

trabecular bone in the ACLT group and Papain group didn't change significantly compared with the Sham group, but had significant difference from the OVX group. Thickness of subchondral bone plate in all groups became thinner than the Sham group. **Conclusions** Both subchondral bone and cartilage changed with OA progress for all the three OA animal models. Those alterations in different OA models are different, which implies that subchondral bone might play different roles for different types of OA. This study will provide us more evidences to further investigate mechanisms of different types of OA and more insight to treat subchondral bone as an OA therapeutic target.

[Keywords] osteoarthritis, OA; animal model; articular cartilage; subchondral bone; trabecular analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种全球性的疾病, 60 岁以上的妇女的发病率为 50% 以上, 已经日益成为危害人类健康和加重社会负担的重要因素^[1]。骨关节炎最主要的特征表现为关节软骨的破坏缺损。然而, 软骨在关节中并不是孤立的组织, 与其相连的组织均对其退变发挥着作用, 尤其是软骨下方直接相连的骨骼 (软骨下骨), 更是引起了学者们的注意, 甚至有学者将软骨和软骨下骨作为一个整体来看待^[2]。近年来越来越多的研究表明软骨下骨代谢改变在 OA 进程中发挥重要作用, 甚至有研究认为软骨下骨是 OA 治疗的靶点^[3-5]。创伤型 OA 模型, 如前交叉韧带切除术 (anterior cruciate ligament transection, ACLT), 因为其成模快, 模型较成熟, 目前很多关于软骨下骨与 OA 关系的研究都是基于该模型展开^[4]。OA 的发病原因多样, 除了运动创伤病因外, 还有退行性、激素改变等因素。软骨下骨的改变在不同病因导致的 OA 中表现和所发挥的作用还并不明确。文献中常用的 OA 动物模型包括 ACLT^[6]、关节腔注射木瓜蛋白酶 (Papain)^[7]、双侧卵巢切除术 (ovariectomy, OVX)^[8] 等, 它们代表了不同病因的 OA。不同模型的 OA 软骨退变进程不一样, 同时, 软骨下骨代谢也有所不同。目前已经有研究比较了创伤性 OA 模型和软骨降解酶注射 OA 模型软骨下骨的变化特征^[9]。OVX-OA 模型中软骨下骨可能表现与其他模型不同, 所发挥的作用可能也不相同。本研究假设不同类型 OA 中软骨和软骨下骨的病理改变机制不同, 对不同病因的三种 OA 模型软骨与软骨下骨同时观察, 并进行模型之间的横向比较, 希望有助于人们更深刻的认识软骨下骨对软骨代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

6 月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 24 只, 体重 (250±

15) g, 来源于北京大学医学部实验动物科学部【SCXK(京)2016-0010】, 进行编号, 根据编号随机抽取, 分为 4 组: 假手术对照组 (Sham, $n=6$), 前交叉韧带切除手术组 (ACLT, $n=6$), 木瓜蛋白酶关节腔注射组 (Papain, $n=6$), 以及卵巢切除手术组 (OVX, $n=6$)。大鼠在北京大学医学部实验动物部【SYXK(京)2016-0041】进行适应性饲养一周。饲养环境温度 (20±2) °C, 相对湿度为 40%~50%, 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由活动。

1.1.2 主要试剂和实验仪器

甲苯胺蓝试剂 (Amresco, 美国); 木瓜蛋白酶试剂 (美仑生物, 中国); EDTA 脱钙液 (博士德, 中国); 4% 多聚甲醛 (Biosharp, 中国); 戊巴比妥钠 (北京岚泰化工科技公司, 中国); 抗生素 (北京大学第三医院药房, 中国); micro-CT (Siemens, 美国); 梯度自动脱水机 (Leica, 德国); 全景数字病理切片扫描分析装置 (滨松, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备

(1) ACLT 诱导的骨关节炎模型

6 只 SD 大鼠于造模前 12 h 禁食, 用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 用量为 30 mg/kg, 待其麻醉后进行术前剃毛, 常规消毒, 铺巾, 在膝前正中切口切开, 皮肤皮下组织, 找到白色髌腱, 沿其内侧切开关节束, 同时使其膝关节过伸后屈曲膝关节找到前交叉韧带, 用眼科剪切断, 恢复其正常伸直位, 之后进行髌骨复位, 逐层缝合关节囊, 皮下组织和皮肤, 在缝合前再一次消毒, 并在术后进行抽屈实验验证确实切断了前交叉韧带。在术后每天注射抗生素连续注射 3 d, 预防术后感染。

(2) 木瓜蛋白酶注射模型

6 只 SD 大鼠在造模前 12 h 禁食, 手术时用 2% 的戊巴比妥钠进行腹腔麻醉, 用量 30 mg/kg, 等待其麻醉后取仰卧位, 在其膝关节髌骨下缘前内侧注射 100 μL 2% 的木瓜蛋白酶, 在 4, 7 d 分别再注射

一次。

(3) 卵巢切除动物模型

6 只雌性 SD 大鼠在手术前 12 h 禁食,手术用 2% 戊比妥钠腹腔麻醉,待其麻醉后,剔除其腰椎旁到股骨处毛发,取俯卧位,酒精消毒,脊柱旁 1.5 cm 处小切口切开背部皮肤,分离皮下脂肪,找到卵巢和子宫拉出后,紧贴卵巢下部结扎卵巢动脉,手术剪紧贴结扎线减掉卵巢,纱布适当止血后,用生理盐水冲洗伤口后,逐层缝合肌层和皮肤。术后每天注射抗生素连续注射 3 d,预防术后感染。

1.2.2 标本收取

在术后 8 周用 10% 过量麻醉法分别处死各组大鼠,取其膝关节,仔细剔除肌肉等周围软组织后,放入 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h。

1.2.3 Micro-CT 扫描重建

对膝关节标本进行扫描,扫描电压与电流分别设置为 80 kV, 500 μ A,扫描后进行重建,重建好的图像分辨率为 13 μ m。将胫骨平台钙化软骨以下、髌线以上区域作为感兴趣区域,对骨体积百分比、骨小梁数量、骨小梁厚度、骨小梁分离度、软骨下骨板厚度参数进行分析。

1.2.4 软骨组织染色与 OA 评分

扫描重建完成后的标本放入 0.5 mol/L 的 EDTA 溶液中脱钙 5 周,每 3 d 换液一次,脱钙后用手术刀沿冠状位切取标本,大小为 1 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm,之后进行流水冲洗 10 h,酒精脱水。经自动梯度脱水机进行后续脱水。石蜡包埋,进行连续切片,厚度为 5 μ m,切片行甲苯胺蓝染色。每个标本随机选择 3 个切片,每个切片根据软骨结构完整性、细胞排列方式、软骨基质染色、潮线情况进行 Mankin 法 OA 评分^[10]。

1.3 统计学方法

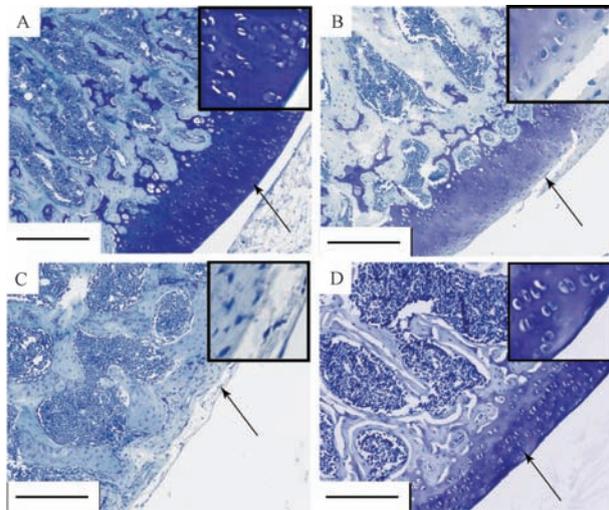
采用 SPSS 18 对 4 组间进行单因素方差分析,计量资料以平均值 \pm 标准差表示,检验值为 *P*,认为 *P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 关节软骨组织切片观察和 Mankin 评分结果

如图 1 所示,8 周后对照组软骨结构比较完整,细胞排列整齐,未见明显软骨缺损(图 1A)。ACLT 组软骨边缘出现结构破碎,表层出现毛糙,染色变浅。深层出现水平和垂直裂隙,染色缺失(图 1B)。木瓜蛋白酶组软骨整体结构破坏严重,软骨层变

薄,有些部位近乎消失,软骨细胞出现大范围缺失。软骨部位出现肉芽组织,并且与骨髓腔相通(图 1C)。OVX 组软骨大体结构完整,软骨表面出现少量多糖流失及少量毛糙,透明软骨表层稍有不平(图 1D)。



注:A. 假手术对照组;B. ACLT 手术组;C. 木瓜蛋白酶组;D. 卵巢切除组(bar=250 μ m)。

图 1 软骨甲苯胺蓝染色(箭头指示了软骨表面区域)
Note. A. Sham, B. ACLT, C. Papain, D. OVX(bar=250 μ m)。

Figure 1 Histological changes of articular cartilage in the rats(Toluidine blue staining)

根据 Mankin 法对手术后 8 周的各组软骨切片进行评分,各组的各分项评分如图表 1 所列,总分如图 2 所示。对于不同的 OA 模型,术后 8 周时,木瓜蛋白酶注射组 Mankin 评分最高,软骨破坏最为严重,OVX 组 Mankin 评分最低。各实验组除 OVX 组外,与 Sham 组相比较,均有显著性差异。

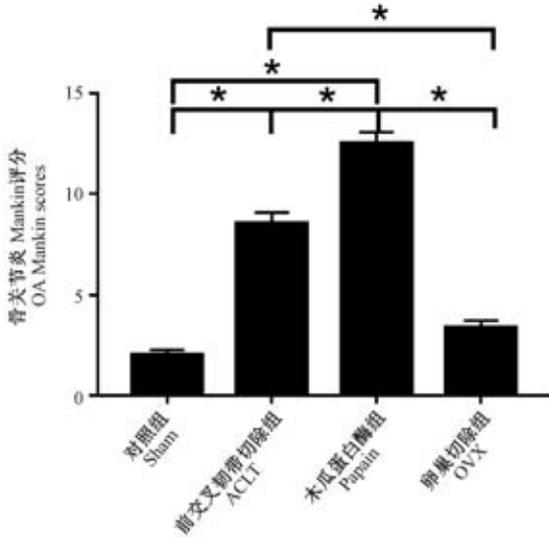
2.2 不同 OA 模型胫骨平台软骨下骨骨小梁参数

OVX 组与正常对照组相比 BV/TV 减低,较 ACLT 组也减低,且均有统计学差异。OVX 组与对照组和 ACLT 手术组相比骨小梁分离度增大,两者均有显著性差异。骨小梁厚度 ACLT 手术组较对照组稍高,OVX 组稍低,木瓜蛋白酶注射组与对照组基本相等,三组与对照组相比差异无显著性。OVX 组骨小梁数量与其他三组相比降低,且差异有显著性。ACLT 组骨小梁容积百分比、骨小梁数量显著高于 Papain 组,骨小梁分离度显著小于 Papain 组。三个实验组与对照组相比软骨下骨板厚度都减少,差异有显著性。(图 3,图 4)

表 1 各组 Mankin 方法 OA 评分($\bar{x}\pm s$)

Table 1 OA scores of all groups by Mankin's histological grading system($\bar{x}\pm s$)

| 分组 Groups | 结构 Structure | 细胞形态 Cellularity | 基质染色 Matrix staining | 软骨缺损 Cartilage defect | 潮线完整性 Tidemark integrity | 其他缺损数量 Number of other defects |
|---------------|-----------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 对照组 Sham | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 1.00±0.57 | 1.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |
| 前交叉韧带切除组 ACLT | 2.00±0.00 | 1.33±0.72 | 1.33±0.72 | 1.50±0.74 | 2.00±0.00 | 0.33±0.72 |
| 木瓜蛋白酶组 Papain | 2.33±0.72 | 2.00±0.79 | 3.00±0.00 | 3.00±0.00 | 2.00±0.82 | 0.17±0.64 |
| 卵巢切除组 OVX | 0.00±0.00 | 1.00±0.57 | 1.33±0.72 | 1.00±0.79 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |

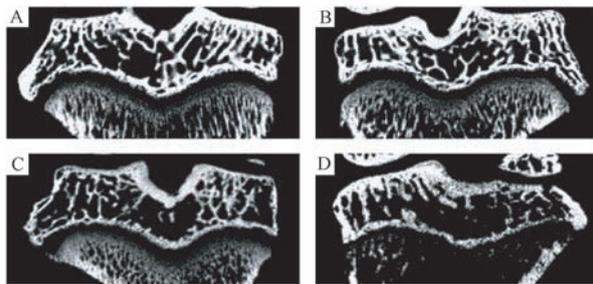


注: * $P < 0.05$ 。(下同)

图 2 各组关节 Mankin OA 评分

Note. * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 Mankin OA scores of articular cartilages in all groups



注:A.假手术对照组;B. ACLT 手术组;C.木瓜蛋白酶组;D. 卵巢切除组。

图 3 胫骨平台软骨下骨 Micro-CT 图像

Note. A. Sham, B. ACLT, C. Papain, D. OVX.

Figure 3 Micro-CT images of subchondral bones of different rat groups

3 讨论

本研究关注软骨下骨在 OA 进展中的作用这一热点问题,通过选取不同大鼠 OA 模型来探讨不同病理因素导致 OA 情况下,软骨以及软骨下骨在 OA

进展中的变化特点。研究显示,代表不同病理的 OA 模型在造模 8 周时,软骨缺损和软骨下骨微结构变化程度不同,提示软骨下骨可能发挥不同作用。

软骨是 OA 中最被人们所关注的部位。我们的研究发现,同样造模 8 周,软骨缺损程度 OVX 组最弱,仅出现了类似蛋白聚糖流失的表面退变;ACLT 组软骨缺损相对比较严重,某些部位已经出现了表层以及深层的缺损与破坏;Papain 组最为严重,软骨已经近乎完全破坏,肉芽组织增生。这三种 OA 模型的软骨缺损结果与文献中观察基本一致^[8-12]。有一点值得注意,OVX 组的 OA 评分虽然均值高于 Sham 组,但没有统计性差异。这是因为 OVX-OA 表征 OA 的最初期变化,其软骨缺损主要表现为软骨表层蛋白多糖的流失,尚未造成结构的显著改变,对经典的 OA 评分系统不敏感。Hoegh-Andersen 等^[8]认为宜采用表面缺损评分系统来评价此类初期 OA。

软骨下骨在 OA 进程中发挥的作用越来越受到人们重视,不过目前还没有研究对不同病理 OA 情况下软骨下骨的作用进行比较。研究结果显示,OVX 组相对于 Sham 对照组,软骨下骨微结构显著疏松,而 ACLT 组与 Papain 组相对于 Sham 对照组,软骨下骨微结构没有显著差异,但相对于 OVX 组,有统计性差异。在我们研究的三种 OA 模型中,ACLT 组通过手术手段令软骨所处的力学环境失稳,从而造成软骨磨损加剧,快速缺损。Papain 组通过关节腔直接注射木瓜蛋白酶,通过化学刺激,直接令软骨降解,极快速缺损。ACLT 和 Papain 这两种模型直接针对软骨组织,因此软骨缺损快。两者相比较,ACLT 是力学作用,相对较慢;Papain 是化学作用,相对更快。这两种模型中软骨下骨处于相对被动地位,在第 8 周时,并未发生显著变化,因此可能没有对软骨的退变起到关键作用。而 OVX-OA 模型的主要手段是降低雌激素水平,而雌激素缺乏直接导致骨量流失和骨质疏松^[13],因此研究发现软骨下骨微观结构的改变显著高于其他两个模型,而

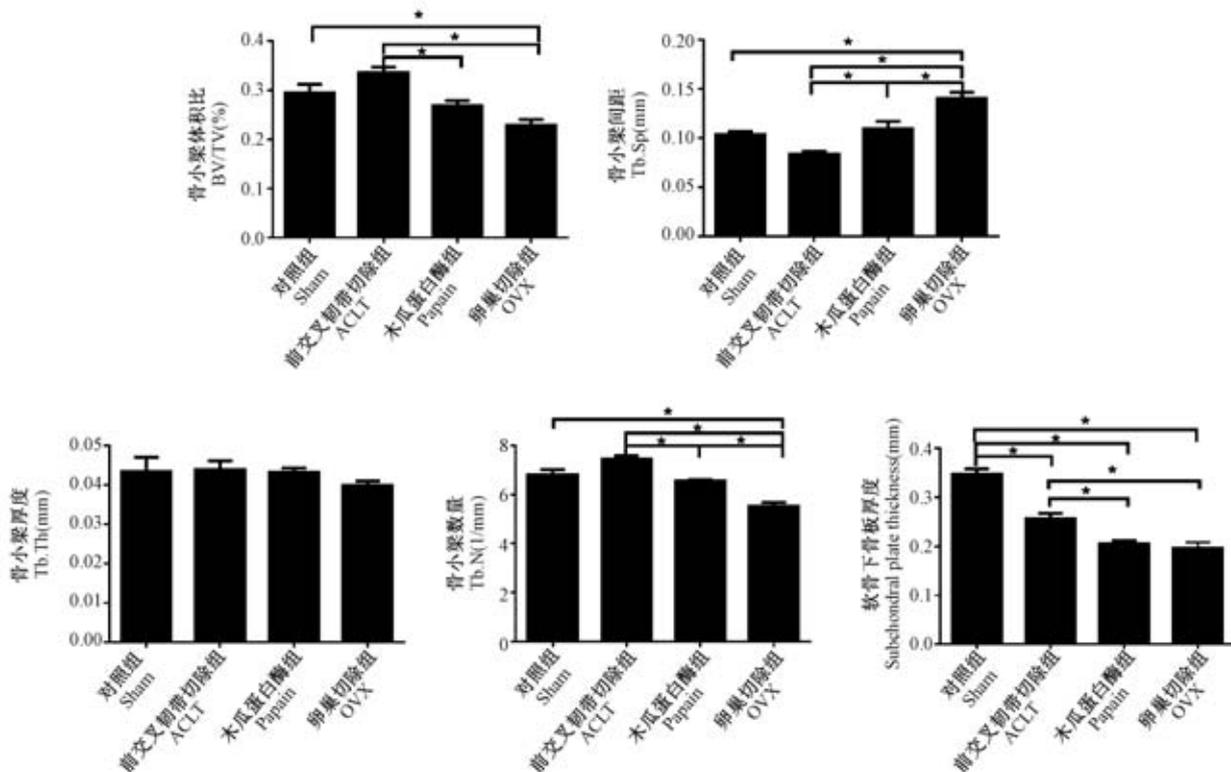


图 4 胫骨平台软骨下骨骨小梁结构分析结果

Figure 4 Trabecular analysis of subchondral bone by Micro-CT imaging

软骨缺损轻微。OVX-OA 中, 软骨下骨的改变可能对软骨造成力学与生物学环境的改变, 从而对软骨的缺损起到更重要的作用。在大多数 OA 人群中, Papain 和 ACLT 类似的 OA 只占少数, 因此在临床实践中, 软骨下骨对 OA 中的作用不容忽视。

有趣的是, 软骨下骨骨板厚度这一指标在不同 OA 动物模型中均相对于 Sham 组显著减少。这个结果与 Femke 等的研究结果相似, 他发现在 ACLT 和软骨破坏 OA 模型早期软骨下骨板厚度即可出现减少。有研究已经发现软骨下骨板厚度改变和软骨破坏有关系, 软骨下骨骨板在 OA 中变薄可能是面对软骨持续缺损的调节改变^[14-16]。我们研究发现 OVX-OA 软骨下骨板同样变薄。因为 OVX-OA 软骨缺损并不显著, 因此骨板变薄的机理可能与其他两个模型不一样, 具体机制还有待进一步探讨。我们的研究发现软骨下骨板在不同模型中变化趋势一致, 而骨小梁结构变化趋势不一致, 可能也说明软骨下骨板在 OA 进程中可能会起一个更重要的作用。

综合文献中的研究和本研究的结果看, 不同的 OA 造模方法可以造成软骨损伤与软骨下骨结构变化的差异, 这可能是由于不同的 OA 模型代表了不

同的 OA 发病机制。其中, 关节腔注射胶原蛋白降解酶类的 OA 模型造模速度快, 但与临床常见 OA 情况有所差异; ACLT 与 OVX 模型在临床上有对应的患者人群, 尤其是 OVX-OA 对应的绝经后妇女的 OA 的患者人群相对较大。我们在实验研究中要根据研究目的选择合适的 OA 模型; 在临床 OA 诊断治疗中, 要具体问题具体分析, 找准靶点, 在合理的时间点进行合理的治疗干预。

参 考 文 献 (References)

- [1] Sun BH, Wu CW, Kalunian KC. New developments in osteoarthritis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2007, 33(1): 135-148.
- [2] Li GY, Yin JM, Gao JJ, et al. Subchondral bone in osteoarthritis; insight into risk factors and microstructural changes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(6): 223-235.
- [3] Stewart HL, Kawcak CE. The importance of subchondral bone in the pathophysiology of osteoarthritis [J]. *Front Vet Sci*, 2018, 5: 178.
- [4] Coughlin TR, Kennedy OD. The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis [J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2016, 1383(1): 58-66.
- [5] Zhu S, Chen K, Lan Y, et al. Alendronate protects against articular cartilage erosion by inhibiting subchondral bone loss in ovariectomized rats [J]. *Bone*, 2013, 53(2): 340-349.

- [6] Boileau C, Martel-Pelletier J, Fahmi H, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone reduces the development of cartilage lesions in an experimental dog model of osteoarthritis: in vivo protective effects mediated through the inhibition of key signaling and catabolic pathways [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7): 2288–2298.
- [7] 杨峰, 史宗道. 用木瓜蛋白酶建立兔颞颌关节骨关节炎模型的研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(5): 330–332
Yang F, Shi ZD. A study on Appain-induced osteoarthritis in rabbit temporomandibular joint [J]. *West China J Stomatol*, 2002, 20(5): 330–332.
- [8] Hoegh-Andersen P, Tanko LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(2): R169-R180.
- [9] 余国荣, 查振刚, 汪飞, 等. 软骨下骨量变化与软骨退变的相关性 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(20): 3134–3140.
She GR, Zha ZG, Wang F, et al. Correlation between subchondral bone mass and cartilage degeneration [J]. *Chin J Tissue Engin Res*, 2015, 19(20): 3134–3140.
- [10] Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA, et al. Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(6): 1256–1264.
- [11] Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits [J]. *Osteoarthr Cartilage*, 1998, 6(3): 177–186.
- [12] Coughlin TR, Kennedy OD. The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1383: 58–66.
- [13] Wang Y, Liu Z, Wang Q, et al. Early detection of tibial cartilage degradation and cancellous bone loss in an ovariectomized rat model [J]. *Biomed Res Int*, 2017: 9654056.
- [14] Sniekers YH, Intema F, Lafeber FP, et al. A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models [J]. *BMC Musculoskel Dis*, 2008, 9(20): 11.
- [15] McCann MR, Yeung C, Pest MA, et al. Whole-body vibration of mice induces articular cartilage degeneration with minimal changes in subchondral bone [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25: 770–778.
- [16] Zhen GH, Wen CY, Jia XF, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 704–712.

[收稿日期] 2019-01-17

李明学,王文广,李娜,等. 树鼩 *PSEN1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 456 - 465.
Li MX, Wang WG, Li N, et al. Cloning and characterization of presenilin 1 in the Chinese tree shrew [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 456 - 465.
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.006

树鼩 *PSEN1* 全长编码序列的克隆及分子特征分析

李明学¹, 王文广¹, 李娜¹, 匡德宣¹, 仝品芬¹, 黄鑫^{1,2}, 黎晓慧¹, 孙晓梅^{1*},
陆彩霞^{1*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118;
2. 昆明医科大学, 昆明 650500)

【摘要】 目的 获取树鼩早老素蛋白-1(PSEN1)的全长编码序列并进行分子特征分析。方法 以树鼩脑组织总RNA为材料,通过RT-PCR、RACE-PCR扩增和序列拼接获得*PSEN1*基因全长编码序列,进而通过DNAMAN、MEGA等生物信息学软件对其序列和分子特征进行分析。qRT-PCR和Western Blot进一步分析PSEN1在树鼩各个组织的表达模式。结果 克隆鉴定了树鼩*PSEN1*基因,其cDNA的开放阅读框全长1128 bp,编码375个氨基酸。通过系统发育谱系树、氨基酸序列对比分析,发现树鼩PSEN1与小鼠、大鼠等相比更接近人类和非人灵长类动物。qRT-PCR和Western Blot的结果表明,树鼩PSEN1在脑组织的表达量明显高于其他脏器组织。结论 通过克隆树鼩*PSEN1*基因序列并进行分析,为今后进一步深入研究该基因功能和建立相关疾病动物模型提供理论基础。

【关键词】 树鼩; *PSEN1*; 分子克隆; 系统发育分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0456-010

Cloning and characterization of presenilin 1 in the Chinese tree shrew

LI Mingxue¹, WANG Wenguang¹, LI Na¹, KUANG Dexuan¹, TONG Pinfen¹, HUANG Xin^{1,2}, LI Xiaohui¹,
SUN Xiaomei^{1*}, LU Caixia^{1*}

(1. Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College(PUMC), Kunming 650118, China. 2. Kunming Medical University, Kunming 650500)
Corresponding author: LU Caixia. E-mail: lcx@imbcams.com.cn; SUN Xiaomei. E-mail: sxm@imbcams.com.cn

【Abstract】 **Objective** To get the full-length presenilin-1 (PSEN1) cDNA encoding sequence and analyze its molecular characteristics. **Methods** Full-length *PSEN1* cDNA was cloned from total RNA from brain tissue of tree shrew by RT-PCR and RACE-PCR. The molecular characteristics were compared with *PSEN1* in other mammals and evaluated using biology softwares such as DNAMAN, MEGA and others. Quantitative reverse transcription PCR and western blot assays were used to examine the mRNA and protein expression pattern of PSEN1 in various tissues of tree shrew. **Results** The open reading frame sequence of *PSEN1* was 1128 bp and encoded 375 amino acids. We constructed a phylogenetic family tree and compared their PSEN1 amino acid sequences. Tree shrew PSEN1 was closer to humans and non-human primates than mouse and rat. The expression of PSEN1 mRNA and protein was obviously higher in the brain than that of other organ tissues. **Conclusions** We successfully cloned the *PSEN1* gene in tree shrew and provided comparative analysis

【基金项目】 国家自然科学基金(31601907); 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019、2018HB071); 云南省重大科技专项(2017ZF007)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31601907); Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program(2017HC019, 2018HB071); Yunnan Province Major Science and Technology Project(2017ZF007).

【作者简介】 李明学(1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 实验动物学。Email: 18687520819@163.com

【通信作者】 陆彩霞(1979—), 女, 博士, 研究生导师。Email: lcx@imbcams.com.cn; 孙晓梅(1963—), 女, 主任技师, 研究生导师。Email: sxm@imbcams.com.cn。

* 共同通信作者

with other species. These findings provide a theoretical basis for further study on the function of this gene and the establishment of animal models of Alzheimer's disease (AD).

【Keywords】 tree shrew; *PSEN1*; cloning; phylogenetic analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

早老素-1 (presenilin 1, *PSEN1*) 是一种早老素蛋白,在人类中由位于染色体 14q24.2 的 *PSEN1* 基因编码,属于进化保守基因家族成员^[1-2]。随着研究的不断深入,人们发现 *PSEN1* 是构成 γ -分泌酶中四种核心蛋白之一^[3], γ -分泌酶与 β -分泌酶二者共同作用连续分解淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 产生 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$)^[4-5]。 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 累积是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 一个重要病理特征^[6-7]。相关的研究结果已明确表明 *PSEN1*、*PSEN2* 和 *APP* 是 AD 的致病基因^[1]。*PSEN1* 作为构成 γ -分泌酶的核心蛋白之一不仅在 AD 发病中起重要作用,而且在信号通路中亦起着关键作用。据文献^[8]报道 *PSEN1* 蛋白可以影响 Wnt 信号通路,能与 β -连环蛋白结合形成复合物,使其不被降解。而在 Notch 信号通路中,由于 *PSEN1* 在蛋白水解过程中起重要作用,从而影响 Notch 受体的成熟和活化^[9]。

树鼩 (*Tupaia belangeri chinensis*) 是一种新型的实验动物,其生理、生化、解剖结构以及基因组等生物学特性比啮齿类更接近于非人灵长类,已被广泛应用于生物医学研究中。Yamashita 等^[10]在正常年老的树鼩大脑中检测到 $A\beta$ 累积这一重要的病理特征。Fan 等^[6]分析树鼩脑组织中与 AD 相关 131 个基因,并与人、猕猴和小鼠进行同源性比对,发现树鼩与人类 AD 基因的序列同源性高于小鼠,而且树鼩脑组织中 $A\beta$ 累积与 NFTs 的表达模式与人类脑组织相似,具有类似的年龄依赖效应。这些研究提示树鼩可以作为一个潜在的 AD 动物模型。

本研究以确定树鼩 *PSEN1* 完整编码序列为目的,对其进行分子特征和组织表达量分析,为今后制备树鼩 *PSEN1* 单克隆抗体、研究其在树鼩 AD 模型中 $A\beta$ 累积机理及癌症研究中奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

采用本实验室繁育的普通级中缅树鼩 3 只,体重 160~200 g,2~3 岁,由中国医学科学院医学生物

学研究所树鼩种质资源中心提供【SCXK(滇)K2018-0002】。实验操作在本中心实验设施内进行【SYXK(滇)K2018-0002】,并遵循实验动物使用的 3R 和福利伦理原则。

采用过量戊巴比妥钠给予树鼩安乐死后,迅速解剖树鼩,并取心脏、肝、脾、肺、肾、胰、脑和肌肉等组织,立即放入 -80°C 冰箱,冷冻储存。

1.1.2 试剂与仪器

柱式 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (B511321, 生工, 中国); M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 试剂盒 (B532435, 生工, 中国); Ex Taq[®] Hot Start Version 试剂盒 (RR006 A, TaKaRa, 日本); One Step TB Green[™] PrimeScript[™] PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (RR096 A, TaKaRa, 日本); 柱式胶回收试剂盒 (B518131, 生工, 中国); PMSF (ST506, 碧云天, 中国); 蛋白裂解液 (P0013, 碧云天, 中国); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (P0010, 碧云天, 中国); 丙烯酰胺快速电泳预混液 (1610183, Bio-Rad, 美国); 0.2 μm PVDF 膜 (162-0177, Bio-Rad, 美国); *PSEN1* (GTX101028, GeneTex, 美国); β -actin (8H10D10, Abgent, 美国); TBST (T1081-500, 索莱宝, 美国); Goat Anti-Rabbit IgG (S0001, Affinity, 美国); Goat Anti-Mouse IgG (S0001, Affinity, 美国); Immobilon Western Chemilum HRP Substrate (WBKLS0100, Merck, 美国); 超速离心机 (L8-80 M, Hermle, 德国); 梯度 PCR 仪 (TP600, TaKaRa, 日本); 实时荧光定量 RCR (CFX-96, Bio-Rad, 美国); 凝胶成像系统 (GelDoc 2000, Bio-Rad, 美国)

1.2 方法

1.2.1 树鼩 *PSEN1* cDNA 的分子克隆

(1) *PSEN1* 引物设计

根据 Genbank 已经注册登记的人 *PSEN1* (NM 000021.3)、小鼠 *PSEN1* (NM 001362271.1) 和黑猩猩 *PSEN1* (NM 001132655.1) 的保守序列,设计表 1 中的 4 组引物,该 4 组引物分别覆盖了树鼩 *PSEN1* mRNA 的整个编码区(表 1)。

表 1 树鼩 *PSEN1* 和内参 *GAPDH* 的引物设计Table 1 Primer design of the tree shrew *PSEN1* and *GAPDH*

| 名称 Primers | 序列(5' to 3') Sequence(5' to 3') | 组别 Groups |
|--|--|--|
| 5' adaptor | GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGCCCCCCCCCCCCC | 接头引物 |
| 3' adaptor | GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT | Adaptor primer |
| 5. 3' outer | GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC | 外围引物 Outer primer |
| 5. 3' inner | GCTACGTAACGGCATGACAGTG | 内围引物 Inner primer |
| <i>PSEN1</i> -F <i>PSEN1</i> -R | GCCAAACATGTGATCATGCTTT ACTGGCTGTTGCTGAGGCTT | 中间序列扩增引物 Intermediate sequence amplification primer |
| <i>PSEN1</i> -F1 <i>PSEN1</i> -F2 | AGATGCTGTTGCAGAGAATGATGACGGT GTGGGAAGCCCAGAGGGACAGTCAT | 3' RACE 特异性引物 3' RACE specific primer |
| <i>PSEN1</i> -R1 <i>PSEN1</i> -R2 <i>PSEN1</i> -RT1 <i>PSEN1</i> -RT2 | TTTATACAGAACCACCAGGAGGATGGTCAT GACAATGACACTTATCATGATGGCAGCA AAACAGCCACTAAATCATATACT TTGTTGAGGAATAAATGAGGGCT | 5' RACE 特异性引物 5' RACE specific primer |
| <i>PSEN1</i> -F3 <i>PSEN1</i> -R3 <i>GAPDH</i> - F <i>GAPDH</i> - R | AGAGTGGGAAGCCCAGAGGG CACTGGCTGTTGCTGAGGCT CTTCAACTCTGGCAAGGT AAGATGGTGATGGACTTCC | qRT-PCR 特异性引物 qRT-PCR specific primer |

(2) RNA 与 cDNA 制备

取脑组织放入 1.5 mL 离心管,采用柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,并采用 3' adaptor 引物和 M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit M-MuLV 试剂盒一步法逆转录成 cDNA,并去除基因组 DNA 污染。

(3) 普通 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用表 1 中 *PSEN1*-F 和 *PSEN1*-R 中间序列扩增引物和 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version 试剂盒进行普通 PCR,进行基因调取。循环参数:95℃ 3min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物电泳后回收测序。

(4) 3' RACE 巢式 PCR

以 3' adaptor 为反转录引物的 cDNA 为模版,采用 3' RACE 特异性引物和接头引物进行巢式 PCR。

采用 *PSEN1*-F1 和 5. 3' outer 引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。以第一轮 PCR 产物为模版,采用 *PSEN1*-F2 和 5. 3' inner 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,58℃ 58 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。PCR 产物电泳后回收测序。

(5) 5' RACE 巢式 PCR

以特异性引物 *PSEN1*-RT1、*PSEN1*-RT2 进行反转录,得到 cDNA,经 RNase H 和 TdT 处理后,采用 5' RACE 特异性引物和接头引物进行巢式 PCR。以 5' adaptor 和 *PSEN1*-R1 为引物进行第一轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min。以第一轮 PCR 产物为模版,采用 5. 3' outer 和 *PSEN1*-R2 引物进行第二轮 PCR,循环参数:95℃ 3 min;94℃ 30 s,68℃ 68 s,72℃ 1 min,33 个循环;72℃ 7 min,PCR 产物电泳后回收测序。

(6) 测序

PCR 产物交由公司(生工生物工程股份有限公司)(上海)测序。将 PCR 纯化产物插入 pMD-18T 载体后,转化大肠杆菌感受态细胞,提取质粒进行双酶切鉴定,最终进行双向测序。进行序列拼接得到全长编码序列,拼接时要求序列间碱基重合大于 40 bp,一致性大于 90%。

1. 2. 2 分子特征分析

本文用于参考的核酸及氨基酸序列均来源于 GenBank,以 NCBI、DNAMAN 5. 0 和 MEGA 6. 0 分别进行核酸序列、氨基酸序列、物种间亲缘关系分析。

1. 2. 3 *PSEN1* 的表达模式分析

(1) RNA 相对表达定量

从树鼩的 13 个组织(其中脑组织分别取材顶叶、额叶、颞叶、枕叶、海马体和小脑)中提取总 RNA。在 MyIQ2 双色实时 PCR 检测系统上,使用 One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 和表 1 中的 *PSEN1* 特异性引物 (*PSEN1-F3* 和 *PSEN1-R3*) 与内参 *GAPDH* 特异性引物 (*GAPDH-F* 和 *GAPDH-R*) 进行 qRT-PCR。

(2) Western Blot

对收集的 13 个组织提取蛋白,超声波破碎仪破碎组织,并用含 PMSF 的裂解液裂解细胞。蛋白浓度测定按照碧云天(增强型)BCA 试剂盒说明书操作进行。采用 Western Blot 标准方法,25 mg 总蛋白的上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。采用 0.2 μm 的 PVDF 膜进行转膜,分别用抗 *PSEN1* 和 β -actin 抗体(稀释浓度 1:1000)4℃ 过夜孵育, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。摇床常温孵育 goat anti-rabbit IgG 与 goat anti-mouse IgG 二抗(HRP 标记,稀释浓度 1:5000)60 min, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。最后采用 ECL 底物化学发光法进行显色, Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像。使用 Image J 软件对 *PSEN1* 蛋白条带测定灰度值。

2 结果

2.1 树鼩 *PSEN1* 全长编码序列扩增

以树鼩脑组织总 RNA 为材料,反转录后进行 PCR 扩增测序。将中间序列及 5' 和 3' RACE 实验得到的序列进行拼接,得到 1680 bp 的核酸片段。将树鼩 *PSEN1* PCR 产物经 T/A 克隆并双向测序,得到树鼩 *PSEN1* 基因全长编码序列(GenBank 登录号:MK135065),开放阅读框长度为 1128 bp,编码 375 个氨基酸(图 1)。

2.2 树鼩 *PSEN1* 系统发育树构建及氨基酸序列比对分析

利用 MEGA 6.0 软件对树鼩与人(NM 000021.4、NM 007318.2)、黑猩猩(NM 001132655.1)、猕猴(NM 001266480.1)、小鼠(NM 001362271.1)、大鼠(NM 019163.3)等 13 个物种的 *PSEN1* 基因进行亲缘关系分析并构建进化树,结果发现,如图 2 所示,可观察到树鼩与人、黑猩猩及恒河猴的遗传距离较近,而与大鼠、小鼠距离较远,说明树鼩 *PSEN1* 基因在进化关系上更接近于人、黑猩猩和猕猴。

利用 Protein BLAST 及 Clustal W 2.0 对树鼩与人(NM 000021.4、NM 007318.2)、黑猩猩(NM 001132655.1)、猕猴(NM 001266480.1)、小鼠(NM 001362271.1)及大鼠(NM 019163.3)等哺乳动物的 *PSEN1* 氨基酸序列进行比较分析,同样发现树鼩 *PSEN1* 氨基酸序列与人、黑猩猩及猕猴同源性较高(分别为 97.6%、97.07%及 96.58%),而与小鼠、大鼠的同源性较低(分别为 95.47%及 94.95%),比对结果如图 3 所示。

2.3 树鼩 *PSEN1* 基因在各组织的表达分析

为进一步研究树鼩 *PSEN1* 的表达模式,我们采用相对 qRT-PCR 法测定 *PSEN1* 在树鼩不同组织中 mRNA 表达水平。如图 4A 所示,*PSEN1* 在脑组织表达较高,尤其在顶叶和额叶中,在其他脏器组织中的表达水平较低,脾脏和肌肉组织 *PSEN1* 表达水平中等,而胰腺组织 *PSEN1* 表达水平最低。我们进一步检索了人、小鼠和大鼠 *PSEN1* 表达信息(www.biogps.org),并与树鼩 *PSEN1* 在各个组织中的表达量进行对比,绘制了聚类热图,结果发现 *PSEN1* 在树鼩额叶表达最高,在大鼠、小鼠的海马表达最高,在人的枕叶表达最高,*PSEN1* 在外周组织的表达量均较低(图 4B)。

2.4 树鼩 *PSEN1* 蛋白的表达模式分析

为了评估 *PSEN1* 蛋白的表达,我们使用人类的抗 *PSEN1* 抗体对树鼩的 13 个组织进行 Western Blot 检测 *PSEN1* 的表达水平。在所有检测组织中除了心脏和肌肉,其他均表达了 *PSEN1* 蛋白(图 5A)。为了进一步确认树鼩 13 个组织 *PSEN1* 蛋白的表达量,使用 Image J 软件对 *PSEN1* 蛋白条带测定灰度值。通过计算 *PSEN1* 蛋白灰度值和 β -Actin 蛋白灰度值的比值(图 5B),结果表明 *PSEN1* 在脑组织高表达,其中表达最高的部位为小脑。外周组织表达较低,其中在肝表达量最低。

3 讨论

在本研究中,我们对树鼩 *PSEN1* 基因克隆并测序,得到了全长序列。以树鼩和其他 13 类物种的 *PSEN1* 序列,采用邻接法、最大似然法和最小简约法三种构建法进行系统发育分析,发现三种系统发育树的结点、进化分支和分支长度都极为相似,说明构建 *PSEN1* 基因的系统发育树是准确的。以邻接法构建的系统发育树分析结果表明,树鼩 *PSEN1* 比小鼠、大鼠更接近人类和非人灵长类动物(图 2)。

```

ATG GTG GTG GTT GTG GCT ACC ATC AAA TCG GTC AGC TTT TAT ACC CGG AAG GAT GGG CAG
M V V V V A T I K S V S F Y T R K D G Q
CTA ATC TAT ACT CCA TTC ACA GAA GAC ACC GAG ACT GTG GGC CAG AGA GCC CTG AAC TCA
L I Y T P F T E D T E T V G Q R A L N S
ATT CTG AAT GCT GCC ATC ATG ATA AGT GTC ATT GTC GTC ATG ACC ATC CTC CTG GTG GTT
I L N A A I M I S V I V V M T I L L V V
CTG TAT AAA TAC AGG TGC TAT AAG GTC ATC CAT GCC TGG CTT ATT ATC TCA TCT CTA TTG
L Y K Y R C Y K V I H A W L I I S S L L
TTG CTG TTC TTT TTT TCA TTC ATT TAC TTG GGG GAA GTA TTT AAA ACC TAT AAT GTT GCT
L L F F F S F I Y L G E V F K T Y N V A
GTG GAC TAC ATT ACT GTC GCA CTG CTG ATC TGG AAT TTT GGG GTA GTG GGG ATG ATT TCC
V D Y I T V A L L I W N F G V V G M I S
ATT CAC TGG AAA GGC CCC CTG CGA CTC CAG CAG GCG TAT CTC ATA ATG ATC AGT GCC CTC
I H W K G P L R L Q Q A Y L I M I S A L
ATG GCC TTG GTG TTT ATC AAG TAC CTC CCT GAG TGG ACG GCA TGG CTC ATC TTG GCT GTG
M A L V F I K Y L P E W T A W L I L A V
ATT TCA GTA TAT GAT TTA GTG GCT GTT TTG TGT CCA AAA GGT CCA CTT CGT ATG TTG GTT
I S V Y D L V A V L C P K G P L R M L V
GAA ACA GCA CAG GAG AGA AAT GAA ACT CTC TTT CCA GCC CTC ATT TAT TCC TCA ACA ATG
E T A Q E R N E T L F P A L I Y S S T M
GTG TGG TTG GTG AAT ATG GCA GAA GGA GAC CCA GAA GCC CAA AGA AGA GTA TCC AAA AGC
V W L V N M A E G D P E A Q R R V S K S
TCC AAG TAT AAT ACA CAA AGC ACA GAA AGG GAG CCA CAA GAT GCT GTT GCA GAG AAT GAT
S K Y N T O S T E R E P O D A V A E N D
GAC GGT GGC TTC AGT GAA GAG TGG GAA GCC CAG AGG GAC AGT CAT CTA GGG CCC CAT CGC
D G G F S E E W E A Q R D S H L G P H R
TCT ACA GCT GAG TCA CGA GCT GCT GTC CAG GAA CTT TCC AGC AGC ATC CTA GCC AGT GAA
S T A E S R A A V Q E L S S S I L A S E
GAT CCA GAG GAA AGG GGA GTA AAA CTT GGC TTG GGA GAT TTC ATC TTC TAC AGT GTT CTA
D P E E R G V K L G L G D F I F Y S V L
GTT GGA AAA GCC TCA GCA ACA GCC AGT GGA GAC TGG AAC ACT ACC ATC GCC TGT TTC GTA
V G K A S A T A S G D W N T T I A C F V
GCC ATA TTA ATT GGT TTG TGC CTT ACA CTG TTA CTC CTC GCT ATT TTC AAG AAA GCG TTG
A I L I G L C L T L L L L A I F K K A L
CCG GCA CTT CCC ATC TCC ATC ACC TTT GGG CTC GTT TTC TAC TTT GCC ACA GAT TAT CTT
P A L P I S I T F G L V F Y F A T D Y L
GTG CAG CCC TTT ATG GAC CAG TTA GCG TTT CAT CAG TTT TAT ATC TAG
V Q P F M D Q L A F H Q F Y I *

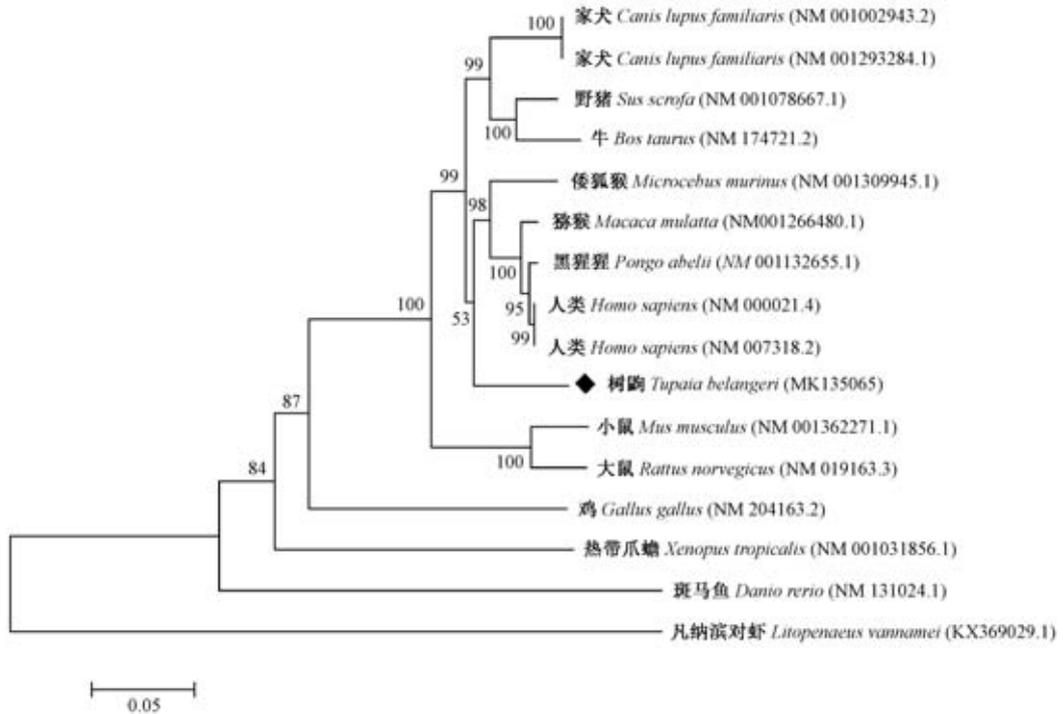
```

图 1 树鼩 *PSEN1* 核苷酸序列及对应氨基酸

Figure 1 Nucleotide sequences and corresponding amino acids of the tree shrew *PSEN1*

将树鼩 *PSEN1* 与人类、非人灵长类及大小鼠等 5 类物种进行氨基酸序列比对分析,发现树鼩 *PSEN1* 氨基酸序列与人类的同源性接近 97.6%(图 3)。

我们采用 qRT-PCR 技术对树鼩 13 个组织中 *PSEN1* 基因进行相对定量分析,发现树鼩 *PSEN1* 在脑组织的表达量明显高于外周组织。将树鼩



注:自展值:1000次。方法:邻接法。

图2 树鼩 *PSEN1* 系统发育树分析

Note. Bootstrap: 1000 replicates. Method: Neighbor-joining method.

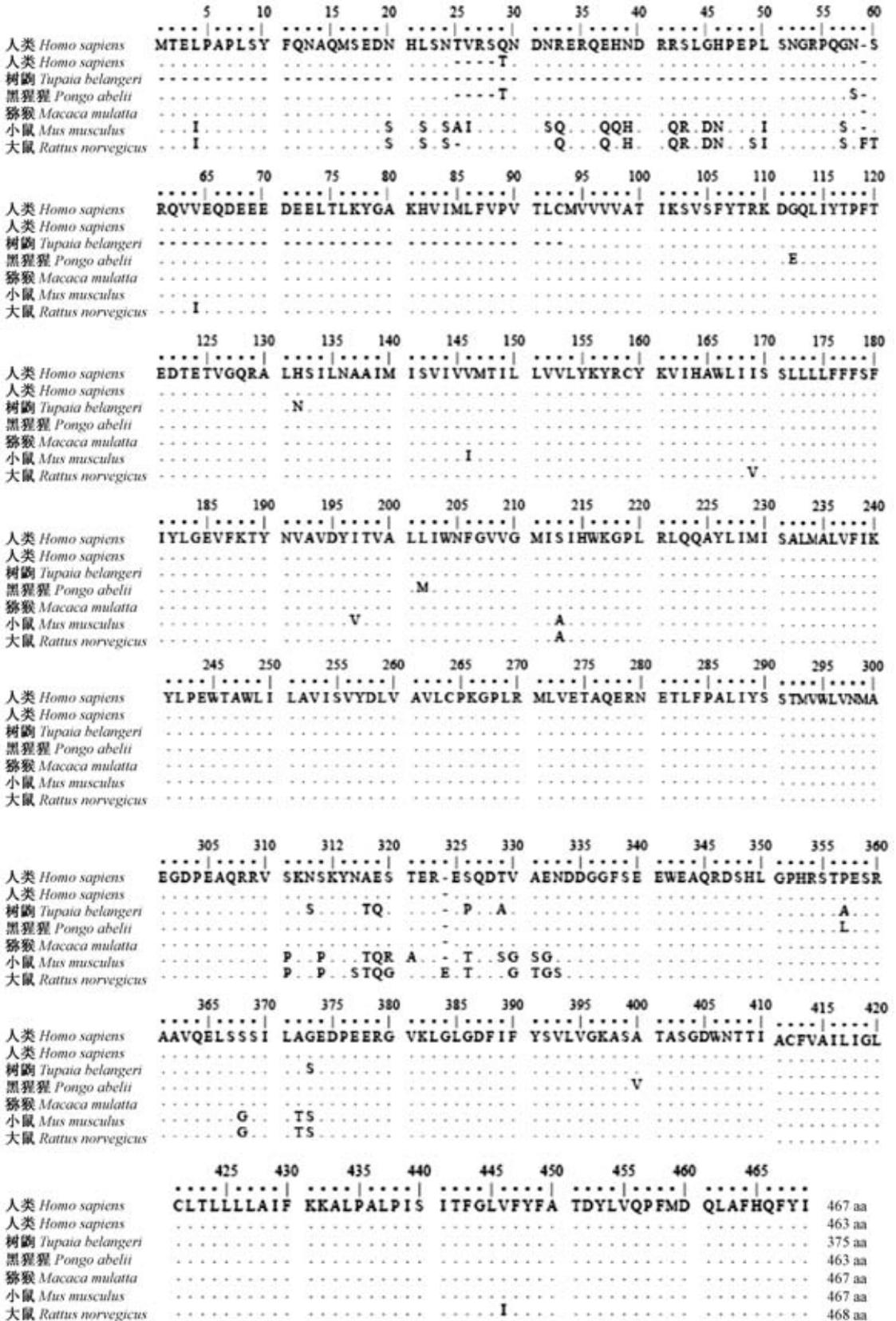
Figure 2 Phylogenetic tree of the tree shrew *PSEN1*

PSEN1 表达量与在 BioGPS 上获得的 *PSEN1* 在人类、小鼠和大鼠部分组织表达量绘制聚类热图进行分析,发现 *PSEN1* 在树鼩额叶表达最高,在大小鼠的海马表达最高,在人的枕叶表达最高,而在外周组织的表达量均较低。同时从图 4B 中也反映出,树鼩 *PSEN1* 的表达水平比小鼠、大鼠的表达较高,这更有利于对 *PSEN1* 的功能研究。树鼩 *PSEN1* 的氨基酸序列与人类的同源性高达 97.6%,因此利用人 *PSEN1* 抗体来鉴定树鼩 *PSEN1* 蛋白是可行的。在对树鼩 13 个组织的 *PSEN1* 蛋白的表达进行 Western Blot 分析时发现树鼩小脑组织的 *PSEN1* 表达要远高于其他组织(图 5B)。通过上述对 *PSEN1* 基因和蛋白的表达分析,两者之间的表达结果存在一定的差距,推测 *PSEN1* 在大脑的表达有自分泌和旁分泌模式^[11],也说明树鼩 *PSEN1* 具有较为复杂的转录水平调控模式,因此树鼩可能是开展 *PSEN1* 基因表达机制研究的良好动物模型。

Western Blot 分析结果显示,*PSEN1* 在树鼩大脑中的颞叶、海马体与小脑中表达水平较高。研究显示:颞叶负责处理听觉信息,并与记忆和情感有关^[12];海马体主要负责记忆存储、信息处理和定向等功能^[13];小脑不仅负责运动功能还负责处理与知

觉、语言及认知等功能外的非运动功能^[14]。此前,大量早期研究表明,阿尔茨海默病(AD)患者或 AD 模型鼠的大脑皮层颞叶和海马体内有大量 $A\beta$ 沉积^[15]。但后续随着临床研究的不断发现,AD 病人小脑内会出现与大脑皮层和海马体相似的形态变化,并且小脑后叶的萎缩伴随着的是更加严重的认知行为的损害^[14]。*PSEN1* 作为 γ -分泌酶的核心部分,与 β -分泌酶共同作用,将淀粉样前体蛋白(APP)水解产生与 AD 直接相关的 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ ^[3-4,16]。*PSEN1* 基因突变后并不损害 γ -分泌酶的酶切功能,仅 *PSEN1* 构像发生异构变化^[17-18],使 γ -分泌酶改变酶切位点,导致 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 比值增大。据此我们推测,脑组织中 *PSEN1* 高表达的三个区域(颞叶、海马体和小脑)可能会出现大量淀粉样斑块累积,进而影响其功能,从而能引起个体产生符合 AD 部分临床表现(如记忆障碍、失语、认知功能减退、视空间定向和执行功能障碍等)^[12,19]。Fan 等^[6]也证实,老年树鼩与人类因 $A\beta$ 累积而受累部位是一致的,主要是海马体与大脑皮质组织。这些证据都有力的表明树鼩可以作为一个潜在的 AD 研究模型。

近年来的研究表明,*PSEN1* 除了在 AD 中的作

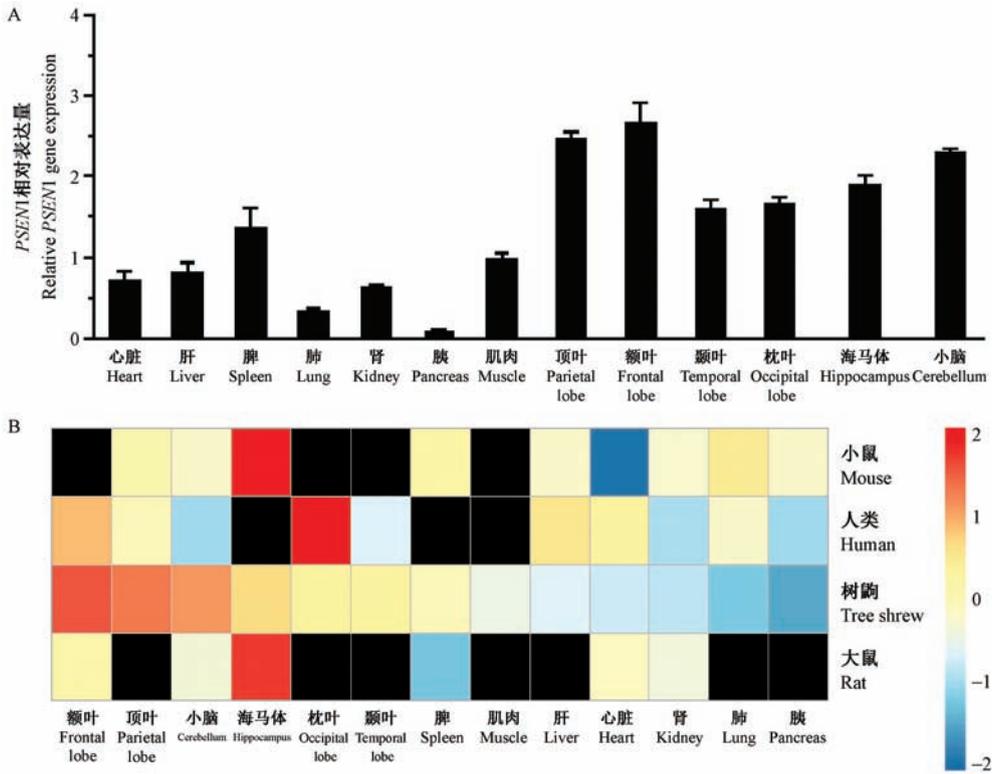


注:相同的氨基酸用·表示,缺失的氨基酸用-表示。

图3 PSEN1 氨基酸序列比对结果

Note. Identical amino acids are shown by a dot, gaps are represented by a dash.

Figure 3 Comparison of the PSEN1 amino-acid sequences

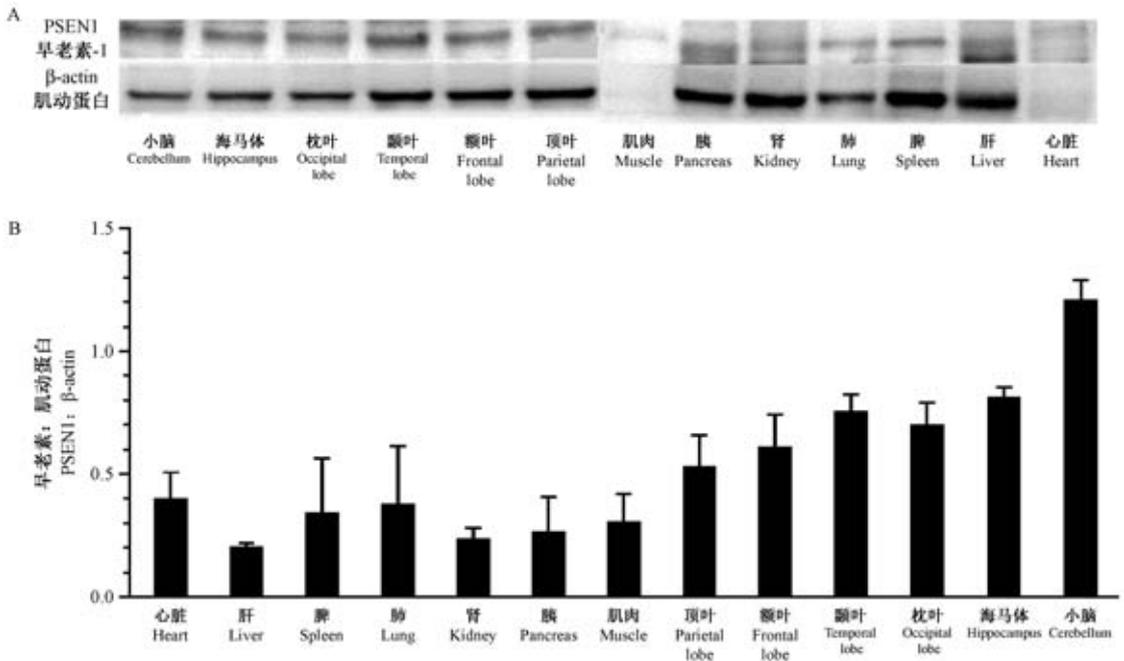


注:A:树鼩 13 种组织中 *PSEN1* mRNA 的相对表达量分析。B:树鼩与人类、小鼠和大鼠 13 个组织中 *PSEN1* 的表达量聚类热图。黑框表示缺失该信息。

图 4 树鼩 *PSEN1* mRNA 表达谱

Note. A, Quantitative real-time PCR analysis of *PSEN1* mRNA expression in 13 organ tissues of tree shrew. B, Heat map of *PSEN1* gene expression in 13 organ tissues of tree shrew, human, mouse and rat. Black boxes indicated missing information.

Figure 4 Expression profile of *PSEN1* mRNA in the tree shrew



注:A:树鼩 13 种组织中 PSEN1 蛋白的表达分析;B:树鼩 13 种组织的 PSEN1 蛋白定量分析。

图 5 树鼩 PSEN1 蛋白表达

Note. A, Expression of PSEN1 protein in 13 organ tissues of tree shrew. B, Quantitative analysis of PSEN1 protein in 13 organ tissues of tree shrew.

Figure 5 Expressions of PSEN1 protein in the tree shrew

用,还发现在癌症中也扮演重要角色。PSEN1 参与 Wnt^[7]、Notch^[8,20] 信号通路的调控,并与 PI3K-AKT-mTOR 通路、Ras-Raf-MEK 通路相互影响,影响黑色素瘤^[21]、脑胶质细胞瘤、乳腺癌等多种恶性肿瘤的细胞增殖、侵袭、转移及新生血管生成等进程^[22-23]。但由于所影响的信号通路较多,导致 PSEN1 在不同细胞环境和组织中扮演着不同的角色,即可以表达出促癌的功能,也能表达可以抑癌的功能。

PSEN1 基因是目前国内外研究的热点之一,该基因与 AD、肿瘤等多种疾病相关。对于 AD 的药物治疗,现阶段效果最卓越的药物靶点就是 γ -分泌酶,因此针对 PSEN1 深入研究将有助于研制有效的抗 AD 药物。另外,目前以 AD 所建立的成熟动物模型只有转基因小鼠^[24],但由于物种差异,治疗策略和药物并不能成功地转化到人类身上。现阶段已有研究者证明,树鼩可以作为一个可行的、理想的实验动物用于 AD 研究^[6,25]。随着 PSEN1 基因和树鼩动物模型研究的不断深入,相信它会在 AD 的治疗和药物研究等方面起到愈来愈大的作用。

综上,本研究通过调取树鼩 PSEN1 基因,获得其全长编码序列,通过系列比对、系统进化等分析发现树鼩 PSEN1 基因比小鼠、大鼠更接近人类和非人灵长类动物,有助于了解 PSEN1 在 A β 发生、AD 发展中的作用,有利于树鼩 PSEN1 单克隆抗体的合成与制备,并为进一步研究其作用机制奠定基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] 金范莹,张宝荣.老年痴呆的遗传机制研究进展[J].生命科学,2014,26(1):15-26.
Jin FY, Zhang BR. The genetics of Alzheimer's disease: a review of recent progress [J]. Chin Bull Life Sci, 2014, 26(1): 15-26.
- [2] Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease [J]. Nature, 1995, 375(6534): 754-760.
- [3] Selkoe DJ. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease [J]. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10: 373-403.
- [4] Delabio R, Rasmussen L, Mizumoto I, et al. PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach [J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42(3): 757-760.
- [5] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.
- [6] Fan Y, Luo R, Su LY, et al. Does the genetic feature of the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) support its potential as a viable model for Alzheimer's disease research? [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 61(3): 1015-1028.
- [7] Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, et al. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release [J]. Nature, 2009, 460(7255): 632-636.
- [8] Edler MK, Sherwood CC, Meindl RS, et al. Aged chimpanzees exhibit pathologic hallmarks of Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2017, 59: 107-120.
- [9] De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain [J]. Nature, 1999, 398(6727): 518-522.
- [10] Yamashita A, Fuchs E, Taira M, et al. Somatostatin-immunoreactive senile plaque-like structures in the frontal cortex and nucleus accumbens of aged tree shrews and Japanese macaques [J]. J Med Primato, 2012, 41(3): 147-157.
- [11] 郑红,牛世伟,李进涛,等.成年中缅树鼩大脑 BDNF、trkB、ChAT mRNA 与蛋白的表达 [J]. 中国比较医学杂志,2015,25(12): 21-25.
Zheng H, Niu SW, Li JT, et al. Expression levels of BDNF, trkB and ChAT in the brain of adult tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 21-25.
- [12] 赵娟,张彦妹,郑乃智.癫痫和阿尔茨海默病共病机制的研究进展 [J]. 中国医药导报,2017,14(21): 53-56.
Zhao J, Zhang YM, Zheng NZ. Research progress on mechanism of comorbidity of epilepsy and Alzheimer disease [J]. Chin Med Herald, 2017, 14(21): 53-56.
- [13] 白桂芹,刘尚清,邓世山,等.基于人脑海马结构的断层影像学 [J]. 解剖学杂志,2015,38(4): 458-461.
Bai GQ, Liu SQ, Deng SS, et al. Tomographic imaging study based on hippocampus formation of the human brain [J]. Chin J Anat, 2015, 38(4): 458-461.
- [14] 董雪帆. AD 转基因小鼠小脑内突触相关蛋白及超微结构变化的实验研究 [D]. 山西医科大学,2017.
Dong XF. Experimental study on the expression of synapse-associated proteins and ultrastructural changes in cerebellum of transgenic mice [D]. Shanxi Medical University, 2017.
- [15] Yakushev I, Landvogt C, Buchholz HG, et al. Choice of reference area in studies of Alzheimer's disease using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose-F18 [J]. Psychiatry Res, 2008, 164(2): 143-153.
- [16] Uemura K, Lill CM, Li X, et al. Allosteric modulation of PS1/gamma-secretase on formation correlates with amyloid beta (42/40) ratio [J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7893.
- [17] 谭媛,潘一龙,李心如.早老素 1 基因多态性与阿尔茨海默病关系研究的进展 [J]. 医学信息,2011,24(6): 3630-3631.
Tan Y, Pan YL, Li XR. Progress in the relationship between presenilin 1 gene polymorphism and Alzheimer's disease [J]. Med Inform, 2011, 24(6): 3630-3631.
- [18] Berezovska O, Lleo A, Herl LD, et al. Familial Alzheimer's disease presenilin 1 mutations cause alterations in the

- conformation of presenilin and interactions with amyloid precursor protein [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(11): 3009-3017.
- [19] 王倩, 范文娟, 孙仪征, 等. 淀粉样蛋白前体/早老素 1 转基因小鼠大脑皮质内 kinesin1 介导的神经元轴浆运输障碍 [J]. *解剖学报*, 2018, 49(2): 158-165.
Wang Q, Fan WJ, Sun YZ, et al. Kinesin1-mediated neuronal axoplasmic transport disorder in cerebral cortex of amyloid precursor protein /presenilin-1 transgenic mice [J]. *Acta Anat Sin*, 2018, 49(2): 158-165.
- [20] Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 338-351.
- [21] 黄斐超. 早老素 1 在胃癌中的表达及其临床意义 [D]. 福建医科大学, 2013.
Huang FC. The expression of PSEN1 in the gastric cancer and its clinical significance [D]. Fujian Medical University, 2013.
- [22] Su DM, Zhang Q, Wang X, et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5): 1292-1304.
- [23] Raurell I, Codina M, Casagolda D, et al. Gamma-secretase-dependent and -independent effects of presenilin1 on beta-catenin. Tcf-4 transcriptional activity [J]. *PLoS One*, 2008, 3:e4080.
- [24] Gotz J, Streffer JR, David D, et al. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy [J]. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(7): 664-683.
- [25] Ni RJ, Luo PH, Shu YM, et al. Whole brain mapping of afferent projections to the bed nucleus of the stria terminalis in tree shrews [J]. *Neuroscience*, 2016, 333: 162-180.

[收稿日期] 2019-04-12

蒋学泉, 张文云, 李娜, 等. 树鼩背部肌肉植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 466 - 472.

Jiang XQ, Zhang WY, Li N, et al. Biological properties of porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscle of tree shrew [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 466 - 472.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.007

树鼩背部肌肉植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能

蒋学泉¹, 张文云^{1*}, 李娜², 何武书¹, 和丽佳¹, 袁艳波¹

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院口腔科 昆明 650032;

2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 初步探讨多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的体内生物学性能。方法 选用树鼩 15 只, 雌雄不限, 每只背部肌肉均植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO、Bio-Oss 骨粉、ATLANTIK 人工骨、国产金世植骨灵人工骨, 多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 为实验组, 其余为对照组。术后进行动物大体观察及手术部位观察, 4 周、8 周、12 周每次随机抽取 4 只动物处死, 进行埋植部位肌肉组织病理学观察、碱性磷酸酶活性 (ALP) 及钙含量测定。结果 HE 染色显示实验 HAPw/n-ZnO 组与各对照组肌间质内均可见钙化灶, 实验组肌肉可见炎症细胞明显聚集; Masson 染色显示实验组与各对照组植入材料周边均可见绿染的胶原纤维; 碱性磷酸酶活性及钙含量测定实验组与金世植骨灵组及 Bio-Oss 骨粉组的差异有统计学意义, 金世植骨灵组及 Bio-Oss 骨粉组优于实验组, 与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义。结论 多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 在植入树鼩背部肌肉后有成骨活性但未异位成骨, 且引起炎症反应。

【关键词】 HAPw/n-ZnO 复合材料; 异位成骨; 生物活性; 炎症反应; 树鼩

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0466-07

Biological properties of porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscle of tree shrew

JIANG Xuequan¹, ZHANG Wenyun^{1*}, LI Na², HE Wushu¹, HE Lijia¹, YUAN Yanbo¹

(1. Department of Stomatology, the 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China.

2. Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118)

Corresponding author: ZHANG Wenyun. E-mail: wenyunzh88@126.com

【Abstract】 Objective To explore the biological properties of the porous composite material HAPw/n-ZnO implanted into the back muscles of tree shrew. **Methods** Fifteen healthy 12-month old male and female tree shrews were selected, and each of the back muscles were implanted with porous composite materials, including HAPw/n-ZnO, bio-oss bone powder, ATLANTIK artificial bone, and domestic product Jinshi Zhiguling artificial bone. Four animals were randomly sacrificed at 4 weeks, 8 weeks, and 12 weeks after surgery, and the gross observation, histopathological examination, alkaline phosphatase activity (ALP), and calcium content were determined. **Results** The pathological examination using

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81260272); 云南省科技人才和平台计划项目 (2017HC019)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81260272), Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program (2017HC019).

【作者简介】 蒋学泉 (1987—), 男, 医师, 硕士。Email: 352364866@qq.com

【通信作者】 张文云 (1970—), 男, 教授, 主任医师。主要从事牙科美容修复与材料研究。Email: wenyunzh88@126.com

HE staining revealed calcification in the muscle tissues in both of HAPw/n-ZnO and control groups. Obvious inflammatory cell infiltration in the muscle tissues was seen in the experimental group. Masson staining showed green-stained collagen fibers around the implanted material in both the experimental and control groups. There were significant differences in the alkaline phosphatase activities and calcium concentration among the experimental, Jinshi Zhiguling artificial bone, and Bio-Oss groups. The result of Jinshi Zhiguling artificial bone and Bio-Oss groups were better than the experimental group, and there were no significant differences compared with that of ATLANTIK artificial bone group. **Conclusions** The four kinds of materials have osteogenic activity in the back muscle of tree shrews, with no heterotopic osteogenesis, and induce inflammatory reaction.

【Keywords】 HAPw/n-ZnO porous composite material; ectopic osteogenesis; biological activity; inflammatory reaction; tree shrew

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

因外伤、肿瘤、牙周病及长期缺失牙等原因造成的颌面部骨缺损,严重影响患者的功能、外形和生活质量,需要通过植骨术来修复重建骨缺损^[1]。然而常常因植骨术后继发感染而导致失败,如何在彻底控制感染的同时促进骨质的生长愈合,成为目前研究的热点^[2]。Ripamonti 等^[3]发现 Ca.P 生物材料植入实验动物非骨部位的 HA 表面形成了类骨质,但以树鼯作为人工骨材料的实验动物目前还未见报道。本课题组前期制备得到多孔复合材料 HAPw/n-ZnO,实验证明该复合材料有优良的抗菌能力和一定的成骨能力。本实验将多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入树鼯背部肌肉内并通过大体观察、组织病理学等检测分析多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 的生物学性能,为构建新型抗菌骨修复材料提供部分实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 12 月龄清洁级树鼯 15 只,雌雄不限,体重 120~140 g,无背部疾患,由中国医学科学院医学生物学研究所【SCXK(滇)K2013-0001】提供,在中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心【SYXK(滇)K2013-0001】完成动物实验。实验方案获得中国人民解放军第九二〇医院伦理委员会通过(2016009)。

1.1.2 试剂与仪器

多孔复合材料 HAPw/n-ZnO(自制于昆明理工大学生物材料实验室)、Bio-Oss 骨粉(瑞士 Geistlich 集团)、法国 ATLANTIK 人工骨(法国),金氏植骨灵(中国)ALP 试剂盒、Masson 染色试剂及苏木精-伊红染液均来自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的构建

将所有骨修复材料用⁶⁰Co 照射消毒,手术器械进行高温高压消毒,备用。树鼯术前 12 h 常规禁食,背部术区备皮,用质量浓度为 6 g/L 的戊巴比妥钠经肌肉注射 0.1 mL 麻醉,背部棘突正中 5 cm 长皮肤切口,切开皮肤及皮下组织,暴露肌肉组织,于背部肌间隙内以止血钳钝性分离,制成双侧背部肌袋模型,每侧两个肌袋,前后共四个肌袋,每个肌袋间前后距离 6 cm,左右距离 2.5 cm。分别植入多孔复合材料 HAPw/n-ZnO、Bio-Oss 骨粉、ATLANTIK 人工骨和金世植骨灵各 0.1 mL。人工骨材料植入后逐层缝合肌层及皮肤,缝合皮肤后碘伏消毒,术后常规分笼饲养。术后处理:(1)每只树鼯肌肉注射青霉素(10 万 U/d),1 次/d,共 3 d;(2)术后进软食,10 d 后拆线;(3)定期观察动物状态及伤口愈合情况。

1.2.2 实验分组

以四个不同的植入位点分为四组,多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 组为实验组,其余三组为平行对照组。

1.2.3 标本处理

分别于术后 4、8、12 周行质量浓度为 6 g/L 戊巴比妥钠 1 mL 麻醉后牺牲 4 只树鼯。待树鼯心跳停止后,将其固定在手术台上,沿原手术入路切开皮肤,将植入材料及包裹材料的肌肉组织一并取出,取出部位肌肉大小为边长 1 cm 方形,厚度约 0.5 cm。取出后行大体观察,剖开后一部分置入 4% 的甲醛中固定 48 h,一部分行碱性磷酸活性及钙含量测定,行碱性磷酸活性及钙含量测定时随机取一块大小相同的大腿部正常肌肉组织作为空白对照组。剩余树鼯继续按同等条件饲养。

1.2.4 组织学观察

不同时期处死的标本固定完成并修整标本块后通过脱钙、流水冲洗、脱水透明、浸蜡包埋。然后以植入材料区域为中心做矢状面组织切片,切片厚 5 μm , 分别行 HE 染色和 Masson 三色染色,二甲苯透明中性树胶封固,光镜下观察。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定

取约 0.2 g 标本组织称重后,加入 1 mL 去离子水研磨成匀浆,吸入离心管中,用 1 mL 去离子水洗匀浆 2 次,均吸入同离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min (12 000 r/min),加细胞裂解液破膜。按 ALP 试剂盒进行检测,于 520 nm 波长处测定吸光度,并按其提供公式计算各管中计算单位质量标本组织 ALP 活性 (kat/g)。

1.2.6 钙含量测定

将植入物周围组织的去上清离心沉淀物用盐酸消化,用原子吸收分光光度仪测定钙含量,以标本湿重 (mg) 为除数,得出单位重量标本含钙量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重组织)。

1.3 统计学方法

全部数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,各组间样本均数差异比较采用单因素方差检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察结果

所有实验动物术后同一条件下分笼饲养,其活动、进食、精神状态良好,背部创口均为一期愈合,无明显感染、无材料脱落现象。术后 1~5 d,背部术区创面黏膜略充血发红,术后 10 d 所有动物背部术区创面愈合,可拆线。

2.2 组织学结果

2.2.1 大体观察

术后 4 周,可见植入材料分散在肌肉内,材料硬度高,骨修复材料颗粒棱角分明,骨材料表面部分肌肉附着;术后 8 周,植入骨材料在肌肉内呈分散状态,骨修复材料颗粒棱角较 4 周时明显变圆钝,骨修复材料已被肌肉完全包裹;术后 12 周,可见植入材料在肌肉内更加分散,骨修复材料表面圆钝,表面完全被肌肉附着,材料较大的空隙内可见有软组织生长。

2.2.2 HE 染色的组织学改变

(1) 术后 4 周:各组植入材料均较硬,且材料颗粒与颗粒之间呈分散状,无法行常规组织切片。

(2) 术后 8 周:由图 1 可见:实验组植入材料局部可见钙化灶(约 5%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%),实验组较多异物巨细胞,明显聚集,无其他炎症细胞,表明多孔 HAPw/n-ZnO 复合材料引起了机体炎症反应;ATLANTIK 人工骨组植入材料局部可见钙化灶(约 5%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%);Bio-Oss 组:植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生;金世植骨灵组植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生。

(3) 术后 12 周:图 2 可见:实验组植入材料局部可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见较多纤维组织增生(10%~15%),实验组较多异物巨细胞,明显聚集;ATLANTIK 人工骨组植入材料局部可见钙化灶(5%~10%),植入材料周边可见纤维组织增生(5%~10%);Bio-Oss 组:植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(约 10%),植入材料周边可见纤维组织增生;金世植骨灵组植入材料局部和肌间质内可见钙化灶(约 10%),植入材料周边可见纤维组织增生。

2.2.3 Masson 三色染色观察胶原纤维分布

(1) 术后 4 周:植入材料过硬,无法行常规组织切片。

(2) 术后 8 周:由图 3 可见,实验组植入材料周边少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内未发现骨胶原纤维;ATLANTIK 人工骨组:植入材料周边出现少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内未发现骨胶原纤维,但颜色较实验组深;Bio-Oss 组:植入材料周边和肌肉间质内均发现少量绿染的骨胶原纤维,颜色较实验组深;金世植骨灵组:结果与 Bio-Oss 组基本一致。

Masson 三色染色结果绿染的骨胶原纤维说明有少量不成熟的骨组织,Bio-Oss 组与金世植骨灵组绿染的范围与深度均优于实验组。ATLANTIK 人工骨组则略优于实验组。

(3) 术后 12 周:由图 4 可见:各组植入材料周边出现绿染的范围较 8 周时并无明显变化,但色泽较 8 周时略深,各组均没有出现蓝染和红染。

实验组和 ATLANTIK 人工骨组依然只有植入材料周边出现少量绿染的骨胶原纤维,肌肉间质内

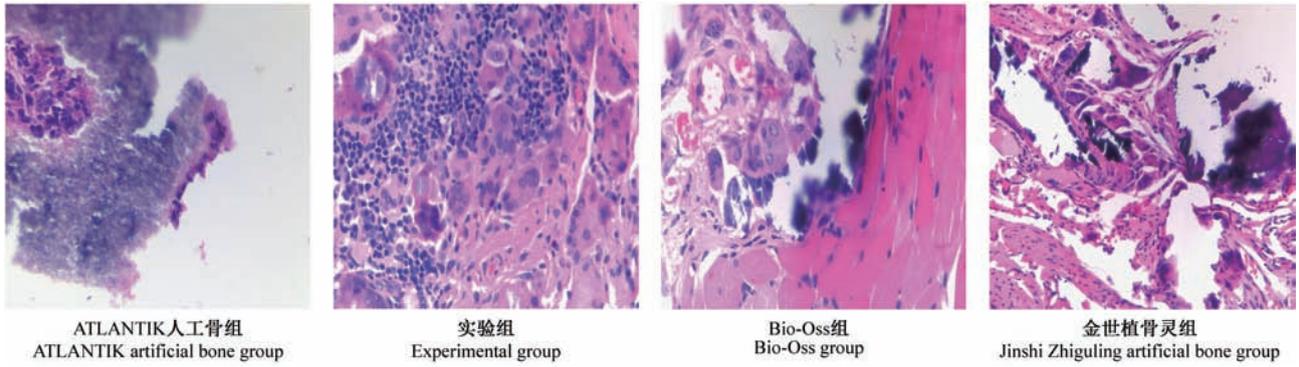


图 1 术后 8 周植入材料周围的肌肉组织的病理改变(HE 染色, ×400)

Figure 1 Histology of the muscle tissues around implant material at 8 weeks after surgery(HE staining, ×400)

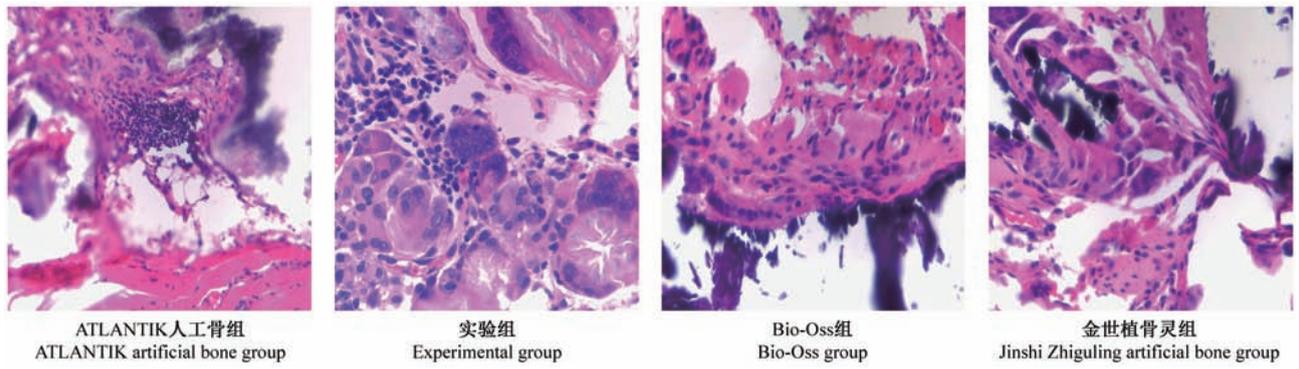


图 2 术后 12 周植入材料周围肌肉组织的组织学改变(HE 染色, ×400)

Figure 2 Histological changes in the muscle tissues around the implant material at 12 weeks after surgery(HE staining, ×400)

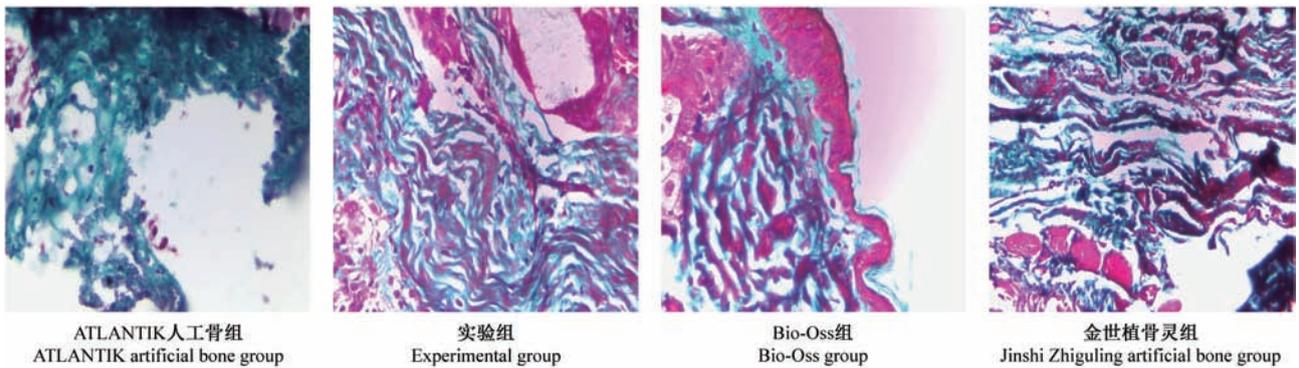


图 3 术后 8 周肌肉组织中的骨胶原分布(Masson 三色染色, ×400)

Figure 3 Distribution of collagen fibers in the bone tissues at 8 weeks after surgery(Masson trichrome staining, ×400)

未发现骨胶原纤维; Bio-Oss 组与金世植骨灵组: 植入材料周边和肌肉间质内均发现少量绿染的骨胶原纤维, 颜色较实验组和 8 周时变深。

Masson 三色染色有绿、蓝、红三色, 由绿至红说明骨质变得更为成熟。Bio-Oss 组与金世植骨灵组绿染的范围与深度均优于实验组, ATLANTIK 人工骨组则略优于实验组, 但均未在 8 周时在树鼯背部肌肉内诱导导出较为成熟的骨组织, 但均体现出较强

的体内生物活性。

2.3 碱性磷酸酶活性检测结果

在三个不同的时间段, 实验组较 Bio-Oss 组、金世植骨灵组和正常肌肉组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组, 实验组优于正常肌肉组, 且差异有统计学意义。与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

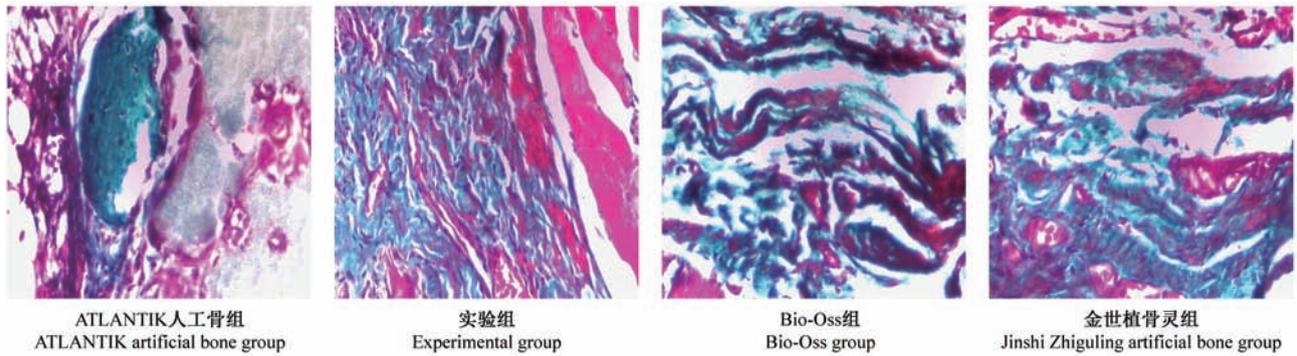


图 4 术后 12 周肌肉组织内的胶原纤维分布 (Masson 三色染色, $\times 400$)

Figure 4 Distribution of collagen fibers in the bone tissues at 12 weeks after surgery (Masson trichrome staining, $\times 400$)

表 1 各组肌肉组织内在不同时间点的碱性磷酸酶活性变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

Table 1 Alkaline phosphatase activity in the muscle tissues of different groups at different time points ($\bar{x} \pm s, g$)

| 组别 Groups | 4 周 4 weeks | 8 周 8 weeks | 12 周 12 weeks |
|---|-----------------|-----------------|------------------|
| ATLANTIK 人工骨 ATLANTIK artificial bone | 0.60 \pm 0.15 | 0.72 \pm 0.25 | 0.85 \pm 0.30 |
| 实验组 Experimental group | 0.58 \pm 0.70 | 0.68 \pm 0.30 | 0.80 \pm 0.31 |
| Bio-Oss Bio-Oss | 1.10 \pm 0.18 | 1.30 \pm 0.30 | 1.50 \pm 0.36 |
| 金世植骨灵 Jinshi Zhiguling artificial bone | 1.15 \pm 0.21 | 1.52 \pm 0.35 | 1.68 \pm 0.42 |
| 正常肌肉 Normal muscle | 0.18 \pm 0.04 | 0.18 \pm 0.04 | 0.18 \pm 0.04 |

表 2 各组肌肉组织中钙含量在不同时间点的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu g/mg$)

Table 2 Calcium content in the muscle tissues in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, \mu g/mg$)

| 组别 Groups | 4 周 4 weeks | 8 周 8 weeks | 12 周 12 weeks |
|---|-----------------|-----------------|------------------|
| ATLANTIK 人工骨 ATLANTIK artificial bone | 0.55 \pm 0.07 | 0.71 \pm 0.06 | 0.83 \pm 0.04 |
| 实验组 Experimental group | 0.58 \pm 0.06 | 0.74 \pm 0.07 | 0.90 \pm 0.08 |
| Bio-Oss Bio-Oss | 0.95 \pm 0.04 | 1.15 \pm 0.08 | 1.25 \pm 0.09 |
| 金世植骨灵 Jinshi Zhiguling Artificial bone | 1.10 \pm 0.05 | 1.30 \pm 0.11 | 1.38 \pm 0.15 |
| 正常肌肉 Normal muscle | 0.20 \pm 0.03 | 0.20 \pm 0.03 | 0.20 \pm 0.03 |

2.4 钙含量检测结果

在三个不同的时间段, 实验组较 Bio-Oss 组、金世植骨灵组和正常肌肉组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组, 实验组优于正常肌肉组, 且差异有统计学意义, 与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。钙含量检测结果见表 2。

3 讨论

选择合适的动物作为骨修复材料肌肉植入是研究的前提及基础^[4-5]。很多研究报道钙磷陶瓷植入狒狒、犬、羊、猪、兔、鼠的非骨性部位 (如肌肉和皮下) 有骨诱导出现^[6-7], 不同的结果可能是因为动物种属间的差异和植入物差异造成。但以树鼯作为人工骨材料肌肉植入实验的实验动物还未见

报道。

在本实验中的四种人工骨,除本课题组自制的多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 外其余三种均已用于临床,ATLANTIK 人工骨主要成分为 70%的羟基磷灰石与 30%的磷酸三钙;Bio-Oss 为脱钙牛骨;金世植骨灵为经过特殊处理并复合 BMP 的牛骨。将四种人工骨材料植入树鼯背部肌肉中,最长为 12 周。通过组织学观察,均未发现成熟的新生骨组织出现,但出现一些钙化灶和幼稚的骨胶原纤维即本研究制备的多孔 HAPw/n-ZnO 复合材料与植入树鼯背部肌肉 12 周后并未诱导出成熟的骨质,尚不能说明多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 是否具有异位成骨能力,但体现出一定的成骨活性。种植体植入部位,也同样影响种植体内骨形成。为了顺利诱导出骨细胞产生,脱钙骨基质通常种植部位是在小鼠的后肢股部肌肉陷窝内,大鼠及兔子的腹部肌肉内及狗颈背部肌肉内。因而,种植体植入部位选择不当可能无法诱导骨形成^[8-9]。树鼯作为人工骨材料软组织植入实验动物目前在国内外还未见报道,树鼯在生理解剖、神经发育、肝炎病毒感染特性及心理应激模式等方面与灵长类,甚至与人类高度相似^[10-11],且树鼯具有较强的抗感染能力,其大腿部肌肉和背部肌肉可作为口腔科填充类骨材料肌肉植入模型的选择,但因为树鼯个体较小,肌肉较薄,如果是块状骨材料植入时不易操作。本研究结果显示,树鼯可成功构建骨材料肌肉植入动物模型。与非人灵长类动物相比,树鼯来源广泛、价格低廉,可预测树鼯在口腔骨材料相关研究中具有良好的应用前景。

本研究通过 ALP 及钙含量活性检测发现 Bio-Oss 组与金世植骨灵组优于实验组,实验组优于正常肌肉组,与 ATLANTIK 人工骨组差异无统计学意义。ALP 是成骨细胞和成骨细胞分化的代表性酶,ALP 作为成骨细胞表型特征之一,在体内外钙化中起关键性作用,随着 ALP 升高的同时出现大量钙盐的沉积,ALP 活性越高,表明成骨前体细胞向成骨细胞分化越明显^[12-13]。本实验中组织学发现实验组与 ATLANTIK 人工骨组植入材料表面有钙化灶,Bio-Oss 组与金氏植骨灵组在植入材料表面与肌肉间质内均发现有钙化灶,表明植入材料表现出生物活性,为骨组织形成提供了部分条件。

本实验不足之处:首先树鼯用量较少,其次观察时间较短,不能更好的了解骨材料的异位成骨

能力。

本实验中,实验组中机体出现了炎症反应且长时间存在,该结果与国内外的研究符合。国外研究认为,n-ZnO 导致细胞产生过量的活性氧,使细胞内氧化和抗氧化状态失去平衡,发生氧化应激反应,导致细胞氧化损伤。如何在发挥 n-ZnO 优异的抗菌性能的同时避免其引发的氧化应激反应^[14-17],本课题组将进一步研究。

4 结论

多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入到树鼯背部肌肉中 12 周后未异位成骨,对照组骨修复材料也未异位成骨,但均体现出异位成骨潜力;多孔复合材料 HAPw/n-ZnO 植入机体后引起炎症反应。

参 考 文 献(References)

- [1] Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (36): 9622-9629.
- [2] Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, et al. A review of dental implants and infection [J]. *J Hosp Infect*, 2009, 72 (2): 104-110.
- [3] Ripamonti U, Crooks J, Kirkbride AN. Sintered porous hydroxyapatites with intrinsic osteoinductive activity: geometric induction of bone formation [J]. *South Afr J Sci*, 1999, 95 (81): 335-343
- [4] Qu SX, Guo X, Weng J, et al. Evaluation of the expression of collagen type I in porous calcium phosphate ceramics implanted in an extra-osseous site [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (4): 659-667.
- [5] Le Nihouannen D, Daculsi G, Saffarzadeh A, et al. Ectopic bone formation by microporous calcium phosphate ceramic particles in sheep muscles [J]. *Bone*, 2005, 36 (6): 1086-1093.
- [6] Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, et al. Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (5): 4419-4427.
- [7] Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Cross species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12 (6): 1607-1615.
- [8] 李世普. 生物医用材料导论 [M]. 武汉工业大学出版社, 2000.
Li SP. Introduction to biomedical materials [M]. Wuhan University of Technology Press, 2000.
- [9] 张士成,李世普,陈芳. 磷灰石超微粉对癌细胞作用的初步研究 [J]. 武汉工业大学学报, 1996, 18 (1): 5-8.
Zhang SC, Li SP, Cheng F. Studies on effects of apatite ultrafine powder on cancer cells [J]. *J Wuhan Univ Technol*, 1996, 18

- (1): 5-8.
- [10] 许凌,范宇,蒋学龙,等. 树鼩进化分类地位的分子证据 [J]. 动物学研究,2013,34(2): 70-76.
Xu L, Fan Y, Jiang XL, et al. Molecular evidence on the phylogenetic position of tree shrews [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 70-76.
- [11] 徐林,张云,梁斌,等. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述[J]. 动物学研究,2013,34(2): 59-69.
Xu L, Zhang Y, Liang B, et al. Tree shrews under the spot light: emerging model of human diseases [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 59-69.
- [12] Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, et al. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dkl1/pref-1 [J]. Bone Miner Res, 2004, 19(5): 841-852.
- [13] Yamamoto N, Isobe M, Negishi A, et al. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells [J]. Med Dent Sci, 2003, 50(1): 63-69.
- [14] Xia T, Kovochich M, Liong M, et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties [J]. ACS Nano, 2008, 2(10): 2121-2134.
- [15] O' Toole TE, Hellmann J, Wheat L, et al. Episodic exposure to fine particulate air pollution decreases circulating levels of endothelial progenitor cells [J]. Circ Res, 2010, 107(2): 200-203.
- [16] He LQ, Lu JH, Yue ZY. Autophagy in ageing and ageing-associated diseases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(5): 605-611.
- [17] Roy R, Kumar S, Tripathi A, et al. Interactive threats of nanoparticles to the biological system [J]. Immunol Lett, 2014, 158(1-2): 79-87.

[收稿日期] 2019-01-07

周智刚,段志刚,王宏,等. 非人灵长类个性化麻醉方案的探讨[J].中国实验动物学报, 2019,27(4):473 - 478.

Zhou ZG, Duan ZG, Wang H, et al. Exploration of an individualized anesthesia method for non-human primates [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):473 - 478.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.008

非人灵长类个性化麻醉方案的探讨

周智刚^{1,2}, 段志刚¹, 王宏^{1,2}, 龚南南^{1,2}, 刘杰^{1,2}, 陈兴龙¹, 卓艳^{1,2}, 周引^{1,2}, 张婷^{1,2},
陈永昌^{1,2*}

(1. 云南中科灵长类生物医学重点实验室; 2. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 比较氯胺酮、舒泰、速眠新Ⅱ、戊巴比妥钠等4种全身麻醉药或其组合对非人灵长类的麻醉效果, 探寻能替代或者减少氯胺酮使用的个性化麻醉方案。**方法** 以单独使用氯胺酮麻醉的方案作为对照, 另设单独使用舒泰、氯胺酮复合速眠新Ⅱ、舒泰复合速眠新Ⅱ和戊巴比妥钠复合速眠新Ⅱ等麻醉4个实验组, 每组选取5只食蟹猴进行实验, 记录麻醉后的心率、体温、血氧饱和度、以及麻醉诱导时间和维持时间, 以比较各方案的麻醉效果。**结果** 与单独使用氯胺酮麻醉比较, 其他四种麻醉方案在心率、体温、血氧饱和度和麻醉诱导时间上均无显著性差异, 不同方案麻醉维持时间分布在30~200 min之间。在非人灵长类的全身麻醉中, 舒泰可以很好地替代氯胺酮; 氯胺酮复合速眠新Ⅱ麻醉可取得较长的麻醉维持时间, 并减少氯胺酮的使用量; 舒泰与速眠新Ⅱ联用、戊巴比妥钠与速眠新Ⅱ联用的方案也可替代氯胺酮, 且麻醉维持时间较长。**结论** 在一定的麻醉时间内, 联合用药可以降低氯胺酮的使用量, 不同麻醉方案灵活运用可满足不同实验对麻醉维持时间的需求。

【关键词】 全身麻醉; 非人灵长类; 氯胺酮; 舒泰; 速眠新Ⅱ; 戊巴比妥钠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0473-06

Exploration of an individualized anesthesia method for non-human primates

ZHOU Zhigang^{1,2}, DUAN Zhigang¹, WANG Hong^{1,2}, GONG Nannan^{1,2}, LIU Jie^{1,2},
CHEN Xinglong¹, ZHUO Yan^{1,2}, ZHOU Yin^{1,2}, ZHANG Ting^{1,2}, CHEN Yongchang^{1,2*}

(1. Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research; 2. Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Corresponding author: Chen Yongchang. E-mail: chenyc@lpbr.cn

【Abstract】 Objective To meet the individual anesthesia requirements for different surgical procedures for non-human primates that can replace or reduce the use of ketamine. To this aim, we compared the effects on body temperature, heart rate and blood oxygen saturation of ketamine, Zoletil, SumianxinII, pentobarbital, and their combination anesthesia in monkeys. **Methods** Fifteen healthy female cynomolgus monkeys were divided into the following five groups: Zoletil alone, Zoletil + Sumianxin II, ketamine + Sumianxin II, pentobarbital + Sumianxin II groups, and ketamine alone as a control group ($n=5$ per group). After the monkeys were anesthetized, the heart rate, body temperature, blood oxygen saturation, induction time, and maintenance time of anesthesia were recorded. **Results** There were no significant differences in heart rate, body temperature, blood oxygen saturation, or induction time between the control group and experimental groups. The maintenance time of each group ranged from about 30 to 200 minutes. Moreover, in general

【基金项目】 国家自然科学基金联合重点项目(U1602224)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(U1602224).

【作者简介】 周智刚(1988—), 男, 研究方向: 发育生物学。Email: zhouzg@lpbr.cn

【通信作者】 陈永昌(1976—), 男, 教授, 研究方向: 发育生物学, 博士生导师。Email: chenyc@lpbr.cn

anesthesia of non-human primates, ketamine can be replaced by Zoletil; Ketamine combined with Sumianxin II can achieve a longer maintenance time and a reduced dose of ketamine; Zoletil combined with Sumianxin II and pentobarbital combined with Sumianxin II can also replace ketamine, and the maintenance time of these combinations is longer than ketamine.

Conclusions During certain operation duration, the combined administration can reduce the dosage of ketamine, and the flexible use of different anesthesia method can meet the individualized needs of different maintenance times in general anesthesia in non-human primates.

[Keywords] general anesthesia; non-human primates; ketamine; Zoletil; Sumianxin II; pentobarbital

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非人灵长类(non-human primates, NHPs)在遗传学、解剖学和生理学上与人类高度相似,极大的扩展了其在生命科学中的应用范围。尤其是近几年,灵长类动物在神经系统、生殖系统、干细胞、安全性评价等研究领域发挥了重要作用^[1]。如何根据科研目的采用合适的实验动物并选择恰当的麻醉药物是顺利进行动物实验的重要前提。理想的麻醉应该既要保证实验操作顺利进行,使获得的实验数据准确可靠,又要将实验动物遭受的痛苦降至最低,保证动物福利和伦理要求^[2]。

氯胺酮作为一种典型的全身麻醉药物,被广泛应用于所有动物物种的麻醉。氯胺酮在灵长类和其他物种中使用有一些副作用,包括注射时的疼痛、注射部位的肌肉和神经损伤,以及恢复性谵妄,但可以通过添加其他药剂来降低。尽管有这些问题,氯胺酮仍被广泛应用于灵长类动物,主要是因为它有较高的安全范围以及它对心血管和呼吸系统的抑制作用较小。氯胺酮属于非巴比妥类麻醉药物,是一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,作用于大脑皮质和脊髓神经元,注射后对大脑中枢的丘脑-新皮质系统产生抑制,故镇痛作用较强,但麻醉作用短。故对手术时间短、要求尽快苏醒的动物实验通常可采用该药进行麻醉,能取得理想的麻醉效果^[3-6]。

随着麻醉的频繁实施,也遇到了一些问题:有些动物对某种麻醉药物产生了一定的耐药性,单独使用某一种麻醉药已经难以达到满意的效果;有些麻醉药物的成本过于高昂;有些麻醉药品的供应也存在一定的困难^[7]。特别是近几年来,麻醉药品尤其是氯胺酮管制严格,国内麻醉药的研发基本处于停滞状态。为规避氯胺酮管制可能带来的无药可用的尴尬局面,也为了满足个性化的实验需求,寻找氯胺酮的替代品或者优化氯胺酮相关的麻醉方案显得十分必要。

目前除氯胺酮以外,常用于非人灵长类的全身

麻醉药物有舒泰、速眠新 II、戊巴比妥钠、丙泊酚、异氟烷等。舒泰的主要成分为盐酸替来他明和盐酸唑拉西洋,在动物手术的全身麻醉时,能够保证较短的诱导时间,同时副作用较小,安全性也高。速眠新 II 注射液合剂是由氟哌啶醇、保定宁、双氢埃托啡等药物制成的复方制剂,具有诱导迅速、麻醉维持与苏醒平稳、副作用小、可控性好等特点。苏 3 号为特异性 α_2 受体阻断剂,注射后可迅速翻转速眠新 II 的药理作用,实际运用中常搭配使用,能让麻醉方法更加灵活。戊巴比妥钠属于中效巴比妥类镇静催眠药,随用量的增加逐渐产生镇静、催眠和抗惊厥作用,大剂量使用时可产生麻醉作用。戊巴比妥钠对呼吸中枢有较强的抑制作用,安全范围较小,麻醉过量易导致动物死亡。丙泊酚为乳状制剂,作用迅速,停药后动物能迅速恢复,给药方法为持续静脉滴注。异氟烷为气体麻醉剂,麻醉效果好,可控性强,需持续给药,且由专业人员操作机器。考虑到丙泊酚和气体麻醉剂的给药难度较高,在常见的猕猴和食蟹猴上运用有限,舒泰、速眠新 II、戊巴比妥钠 3 种麻醉药物或其组合更适合非人灵长类的全身麻醉^[8-16]。

我们选择性情温顺,体型小,用药量少的食蟹猴为实验对象,通过比较氯胺酮、舒泰、速眠新 II、戊巴比妥钠或其组合对食蟹猴体温、心率、血氧饱和度的影响,希望找出合适的氯胺酮替代品或者能够减少氯胺酮用量的麻醉方法。同时,涉及非人灵长类的实验繁多,不同实验对动物麻醉的程度和维持时间都各不相同,探索个性化的麻醉方案以满足不同实验的需求也是我们的研究目标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 25 只清洁级雌性食蟹猴,体重 3~5 kg,年龄在 6~10 岁之间,用于评价氯胺酮和其他 3 种常

用的全身麻醉药物(舒泰、速眠新Ⅱ、戊巴比妥钠)或其组合对食蟹猴体温、心率、血氧饱和度的影响。所有动物均来自云南中科灵长类生物医学重点实验室【SCXK(滇)K2015-0003;SYXK(滇)K2015-0005】。动物单独笼养在一个可控的环境下(温度 $18\sim 26^{\circ}\text{C}$,湿度 $40\%\sim 80\%$),饲养的设施及管理规范已通过国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC International)的完全认证。该实验经云南中科灵长类生物医学重点实验室实验动物伦理委员会(IACUC)审查合格(编号为LPBR201801010)。

1.1.2 试剂与仪器

主要试剂:盐酸氯胺酮注射液(商品名“泰眠康”, $2\text{ mL}:0.1\text{ g}$),江苏中牧倍康药业有限公司生产;舒泰(Zoletil,每瓶 5 mL ,含替来他明 125 mg 和唑拉西泮 125 mg),法国维克有限公司(Virbac S. A.)生产;戊巴比妥钠,德国默克公司生产,本研究中将其与 0.9% 氯化钠溶液按 40 mg/mL 的比例配制成 4% 的混合溶液;速眠新Ⅱ注射液(又名“盐酸塞拉嗪注射液”, $1.5\text{ mL}:0.03\text{ g}$)吉林省敦化市圣达动物药品有限公司生产;苏3号注射液(又名“盐酸苯恶唑注射液”, $2\text{ mL}:0.03\text{ g}$),吉林省敦化市圣达动物药品有限公司生产;硫酸阿托品注射液($1\text{ mL}:0.5\text{ mg}$),河南遂成药业股份有限公司生产。

主要仪器:SurgiVet V9201 全参数生理监护仪,史密斯医疗公司生产(美国);水银玻璃温度计(测量范围 $35\sim 42^{\circ}\text{C}$),江苏鱼跃医疗设备股份有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组

氯胺酮安全性能和镇痛作用特别突出,对呼吸系统影响较轻,不良反应较其他麻醉少。因此选择单独使用氯胺酮的方案作为对照组,取该组的心率、血氧饱和度和体温作为参考标准^[17],将其他组的数据与之比较,若差异不显著则视该麻醉方案安全、有效。每组包括5只成年雌性食蟹猴。

实验分为5组:对照组:单独使用氯胺酮,肌注,剂量 0.2 mL/kg ;实验组1:单独使用舒泰,肌注,剂量 0.05 mL/kg ;实验组2:氯胺酮复合速眠新Ⅱ,分别肌注,氯胺酮剂量 0.1 mL/kg ,速眠新Ⅱ剂量 0.05 mL/kg ;实验组3:舒泰复合速眠新Ⅱ,分别肌注,舒泰剂量 0.05 mL/kg ,速眠新Ⅱ剂量 0.05 mL/kg ;实验组4:戊巴比妥钠复合速眠新Ⅱ,分别肌注,戊巴

比妥钠剂量 0.2 mL/kg ,速眠新Ⅱ剂量 0.05 mL/kg 。

1.2.2 给药及监测

雌性食蟹猴先在相同条件下适应性饲养一周,给药前禁食 12 h ,禁水 2 h ,实验前 20 min 按照 0.05 mg/kg 的剂量注射硫酸阿托品,以防止流涎或呕吐导致窒息。食蟹猴四肢无力,皮肤痛觉消失视为完全麻醉。给完药到完全麻醉之间的间隔视为诱导期,从开始进入完全麻醉到第一次出现自主运动的时间视为麻醉期。完全麻醉后 $15\sim 20\text{ min}$ 之间用生理监护仪监测每只食蟹猴的心率和血氧饱和度,同时用温度计测量直肠温度(时间不少于 3 min)。

1.3 统计学方法

实验数据用平均值 \pm 标准差表示,采用SPSS 17.0 统计软件分析处理数据,所有数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)统计,检验结果取 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 作为统计学意义差异判断标准。

2 结果

2.1 各实验方案对食蟹猴体温、心率、血氧饱和度的影响

与氯胺酮组比较,舒泰组、氯胺酮+速眠新Ⅱ组、舒泰+速眠新Ⅱ组、戊巴比妥钠+速眠新Ⅱ组在体温、心率和血氧饱和度水平上均无显著性差异($P > 0.05$),说明这几种麻醉方法下,食蟹猴的生命体征与单独使用氯胺酮麻醉时候是相似的,能起到很好的麻醉效果,同时也是安全的。见表1所示。

2.2 各实验方案诱导期和麻醉期的比较

与氯胺酮组比较,其他各实验组在诱导期上非常接近($P > 0.05$);舒泰组在麻醉期上与氯胺酮组相近($P > 0.05$),氯胺酮+速眠新Ⅱ组、舒泰+速眠新Ⅱ组、戊巴比妥钠+速眠新Ⅱ组的麻醉期则明显长于氯胺酮组($P < 0.001$),即可提供更长的麻醉维持时间(表2)。

2.3 一岁以下食蟹猴婴幼儿猴的麻醉方案

为研究灵长类动物脑发育,我们对7只食蟹猴婴幼儿猴从满月开始便每月(半岁以后为每3个月一次)到医院做头部MRI扫描,单次扫描时间约 100 min 。一般在完全麻醉后 5 min 以上,待眨眼反射消失后再送到机器上扫描,扫描过程中头部周围用毛巾稍加固定。MRI图像显示麻醉到位的小猴扫描过程中几乎没有头动伪影,图像质量较高。扫描结束后根据所注射速眠新Ⅱ的剂量,按照 $1:1$ 的比例

注射拮抗剂苏 3 号。注射苏 3 号到小猴恢复自主运动之间的时间视为恢复期。表 3 展示了两种麻醉方案的药物剂量以及恢复时间的比较。

表 1 各方案下体温、心率、血氧饱和度的比较

Table 1 Comparison of temperature/heart rate/blood oxygen saturation in different methods

| 组别 Groups | 体温(°C) Body temperature | 心率(bpm) Heart rate | 血氧饱和度(%) Blood oxygen saturation |
|--|----------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| 氯胺酮 Ketamine | 36.70 ± 0.21 | 186.2 ± 25.24 | 89.4 ± 7.50 |
| 舒泰 Zoletil | 37.06 ± 0.49 | 179.60 ± 15.08 | 92.60 ± 0.49 |
| 氯胺酮+速眠新 II Ketamine + Sumianxin II | 37.32 ± 0.58 | 117.00 ± 17.53 | 90.60 ± 5.54 |
| 舒泰+速眠新 II Zoletil + Sumianxin II | 37.12 ± 1.32 | 147.00 ± 18.31 | 89.80 ± 6.27 |
| 戊巴比妥钠+速眠新 II Pentobarbital + Sumianxin II | 36.82 ± 0.32 | 112.40 ± 17.96 | 88.60 ± 3.26 |

注:与氯胺酮组比较, $P > 0.05$ 。

Note. Compared with the ketamine group, $P > 0.05$.

表 2 各方案诱导期和麻醉期的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Comparison of the induction period and anesthesia period in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 分组 Groups | 诱导期(min) Induction periods | 麻醉期(min) Maintenance period |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| 氯胺酮 Ketamine | 3.6 ± 0.80 | 30.4 ± 4.94 |
| 舒泰 Zoletil | 2.8 ± 0.75 | 30.60 ± 7.09 |
| 氯胺酮+速眠新 II Ketamine + Sumianxin II | 4.20 ± 1.17 | 100.0 ± 14.88*** |
| 舒泰+速眠新 II Zoletil + Sumianxin II | 3.00 ± 1.10 | 109.20 ± 9.28*** |
| 戊巴比妥钠+速眠新 II Pentobarbital + Sumianxin II | 9.40 ± 3.14 | 213.20 ± 30.87*** |

注:与氯胺酮组比较, *** $P < 0.001$ 。

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

表 3 一岁以下食蟹猴婴幼儿猴的麻醉方案

Table 3 Anesthesia method for infant cynomolgus monkeys under 1 year of age

| 月龄 (month) Month age | 体重(kg) Weight | 方案 A 剂量 (mL/head) Dose of method A | 方案 B 剂量 (mL/head) Dose of method A | 诱导期 (min) Induction period | 麻醉期(min) Maintenance period | 方案 A 恢复 时间(min) Recovery time of method A | 方案 B 恢复时间 (min) Recovery time of method B |
|----------------------------|------------------|---|--|-------------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| 1 | 0.42 ± 0.07 | 0.1 + 0.05 | 0.05 + 0.05 | < 3 | > 120 | 19.60 ± 2.87 | 28.8 ± 7.78 |
| 2 | 0.50 ± 0.06 | 0.1 + 0.1 | 0.05 + 0.05 | < 3 | > 120 | 16.00 ± 3.74 | 24.00 ± 3.79 |
| 3 | 0.64 ± 0.08 | 0.1 + 0.1 | 0.05 + 0.05 | < 3 | > 120 | 9.60 ± 3.83 | 19.40 ± 2.94 |
| 4 | 0.80 ± 0.14 | 0.15 + 0.1 | 0.05 + 0.1 | < 3 | > 120 | 6.20 ± 3.19 | 12.00 ± 1.67 |
| 5 | 0.96 ± 0.16 | 0.15 + 0.1 | 0.1 + 0.1 | < 3 | > 120 | 6.60 ± 2.87 | 9.00 ± 2.61 |
| 6 | 1.10 ± 0.18 | 0.2 + 0.1 | 0.1 + 0.1 | < 3 | > 120 | 3.80 ± 1.60 | 9.20 ± 3.76 |
| 9 | 1.40 ± 0.14 | 0.2 + 0.15 | 0.1 + 0.15 | < 3 | > 120 | 3.00 ± 2.10 | 14.00 ± 3.74 |
| 12 | 1.64 ± 0.19 | 0.3 + 0.15 | 0.1 + 0.15 | < 3 | > 120 | 3.00 ± 1.41 | 10.60 ± 5.04 |

注:方案 A(氯胺酮+速眠新 II), 动物数量为 3 只; 方案 B(舒泰+速眠新 II), 动物数量为 4 只。

Note. Method A(ketamine + sumianxin II), $n = 3$. Method B(Zoletil + sumianxin II), $n = 4$.

3 讨论

本研究中,不同方案下麻醉期的心率、体温和血氧饱和度的监测结果显示,舒泰组、氯胺酮+速眠新 II 组、舒泰+速眠新 II 组、戊巴比妥钠+速眠新 II 组在体温、心率和血氧饱和度水平上与单独使用氯胺酮的组无显著性差异。实验过程所有动物均呼

吸正常,未出现任何异常情况。实验结束后的观察和护理中也未发现异常情况。另外,除本次研究过程外,在平时的非人灵长类实验中,这几个麻醉方法也反复多次被使用,无一例死亡,说明了这几种麻醉药和麻醉组合运用于非人灵长类是安全和有效的。

复合麻醉是由两种或两种以上的麻醉药物或

麻醉方法同时或先后应用,以达到完善的术中及术后镇痛效果。因为它的全麻药用量少及副作用小等特点,已逐渐成为动物医学领域的主要流行趋势^[18]。本研究中的氯胺酮复合速眠新Ⅱ、舒泰复合速眠新Ⅱ、戊巴比妥钠复合速眠新Ⅱ等 3 种麻醉方法就是复合麻醉。比较不同方案的麻醉期,可以看出单独使用舒泰和单独使用氯胺酮的麻醉维持时间都在 30 min 左右,因此舒泰可以替代氯胺酮,且舒泰的麻醉效果优于氯胺酮,因为舒泰具有更好的肌肉松弛效果,便于开展各种外科手术。氯胺酮与速眠新Ⅱ联用可减少氯胺酮的使用量,且麻醉期较长(大于 100 min),很好的弥补了单独使用氯胺酮麻醉时间较短的缺点。舒泰复合速眠新Ⅱ、戊巴比妥钠复合速眠新Ⅱ麻醉时,麻醉期大于 100 min,也可以替代氯胺酮起到很好的麻醉效果,但是比较适合需要维持较长麻醉时间的手术。加入了速眠新Ⅱ的复合麻醉方案麻醉期都很长,若在平时的动物实验中不需要如此长时间的麻醉维持,可在实验结束后根据所使用速眠新Ⅱ的剂量,按照 1:1 的比例注射拮抗剂苏 3 号,动物将很快从麻醉状态下恢复过来。麻醉药及麻醉方法的选择,不仅考虑手术部位,还应考虑手术时间长短^[19]。本研究中的几种麻醉方法,麻醉维持时间从 30 min 至 200 min 不等,能够满足大部分手术和实验的需求。

在本次研究过程中,我们也发现一些问题。例如舒泰与速眠新Ⅱ联合使用时,即使两者的使用剂量远低于说明书上的参考剂量,也能维持较长时间的麻醉。在小猴进行 MRI 扫描后,根据速眠新Ⅱ的剂量,同样按照 1:1 的比例注射拮抗剂苏 3 号后,舒泰+速眠新Ⅱ组的小猴的恢复时间要明显长于氯胺酮+速眠新Ⅱ组。我们推测舒泰和速眠新Ⅱ联用可延长麻醉后的苏醒时间。

有报道称一些动物使用氯胺酮后会出现不同程度的木僵直或“木僵样”症状^[20]。我们在平时繁多反复的实验中也遇到过这种情况,有极少数食蟹猴和猕猴,在使用氯胺酮麻醉后,会出现颈部僵直,身体轻微或剧烈抽搐的症状,有时还伴随潮式呼吸。出现这些类似过敏反应的情况时,一般不需要药物干预,症状会在 30 min 内自行缓解。若症状不能及时解除,可考虑用地塞米松、氢化可的松和肾上腺素进行治疗^[21]。这些疑似氯胺酮过敏的动物在使用舒泰时则能取得很好的麻醉效果。有报道显示单独使用速眠新Ⅱ可以用于猕猴的麻醉^[22]。

由于食蟹猴与猕猴同属,我们在实验中也尝试过单独使用速眠新Ⅱ来麻醉食蟹猴。结果发现,无法达到麻醉效果,速眠新Ⅱ能对食蟹猴产生镇静效果,使其进入嗜睡状态,但在受到刺激时立刻恢复攻击性。因此本研究考虑其他麻醉药物与速眠新Ⅱ联用。速眠新Ⅱ可以通过胎盘屏障,从而造成胎畜处于麻醉状态,抑制呼吸系统机能,而且速眠新Ⅱ所含氟哌啶醇对胎畜致畸作用^[23]。所以在妊娠动物和动物剖腹产手术中应该慎用。此外,氯胺酮也容易通过胎盘屏障,怀孕后期动物禁用。因此,在平时的动物实验中,我们应该根据实验需要和动物情况,选择最佳的麻醉方案,以便获得可靠的实验结果,同时也保证了动物的福利和伦理要求。

综上所述,在非人灵长类的全身麻醉中,舒泰可以很好地替代氯胺酮;氯胺酮复合速眠新Ⅱ麻醉可取得较长的麻醉维持时间,并减少氯胺酮的使用量;舒泰与速眠新Ⅱ联用、戊巴比妥钠与速眠新Ⅱ联用的方案也可替代氯胺酮,且麻醉维持时间较长。我们的实验数据对于非人灵长类实验过程中开展个性化麻醉提供了多种备选方案。

参 考 文 献 (References)

- [1] 石巧娟, 李巍, 萨晓婴, 等. 食蟹猴在医学研究中的应用进展 [J]. 实验动物比较医学, 2012, 32(4): 358-365.
Shi QJ, Li W, Sa XY, et al. Application of cynomolgus monkey in medical science [J]. Lab Anim Comp Med, 2012, 32(4): 358-365.
- [2] 李丹, 郭玉莹, 邓昊, 等. 实验动物麻醉剂使用的福利伦理问题研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 87-91.
Li D, Guo YY, Deng H, et al. Research progress on ethical issues of anesthetics application in laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(9): 87-91.
- [3] 马保臣. 动物全身麻醉药的应用现状以及管控初探 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(2): 114-115.
Ma BC. Preliminary study of general anaesthesia in animals on current situation and its surveillance [J]. Chin J Vet Med, 2018, 54(2): 114-115.
- [4] 许霓虹, 赵平, 王多友, 等. 氯胺酮对应激大鼠脑组织不同区域 c-fos mRNA 表达的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2000, 20(4): 236-238.
Xu JH, Zhao P, Wang DY, et al. Effects of ketamine on c-fos gene expression in the different regions of rat brain following stress [J]. Chin J Anesthesiol, 2000, 20(4): 236-238.
- [5] Martin D, Lodge D. Ketamine acts as a non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist on frog spinal cord in vitro [J]. Neuropharmacology, 1985, 24(10): 999-1003.
- [6] 杨建生, 高保国, 张继晨. 麻醉基本技能与药物 [M]. 山西科学技术出版社, 2014; 258.

- Yang JS, Gao BG, Zhang JC. MA ZUI JIBEN JINENG YU YAO WU [M]. Shanxi: Science and Technology Press, 2014; 258.
- [7] 段俊堂. 野生动物临床中麻醉药的联合应用[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(2): 40-42.
- Duan JT. Combined application of anesthetics in wildlife clinic [J]. Chin J Vet Med, 2015, 51(2): 40-42.
- [8] 姜龙, 张晓燕, 姜平. 动物麻醉方法和麻醉药物研究现状 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(2): 119-123.
- Jiang L, Zhang XY, Jiang P. Research status in anesthesia methods and anesthetics in animals [J]. Prog Vet Med, 2014, 35(2): 119-123.
- [9] 郭优勤, 郭锐, 魏桂林, 等. 浅谈舒泰麻醉药在动物临床麻醉中的应用 [J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(1): 77-78.
- Guo YQ, Guo R, Wei GL, et al. Application of zoletil in animal clinical anesthesia [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2012, 6(1): 77-78.
- [10] 刘雪萍, 谢莉萍, 韦祝梅. 四种麻醉药物对食蟹猴麻醉效果分析和选择应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 45-47.
- Liu XP, Xie LP, Wei ZM. Effects of four anesthetic agents in surgery for cynomolgus monkey and their selective application [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(2): 45-47.
- [11] 张彦, 朱艳菊, 张芳, 等. 动物实验中常用麻醉药的选择与应用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(1): 164-165.
- Zhang Y, Zhu YJ, Zhang F, et al. Selection and application of commonly used anesthetics in animal experiments [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2009, 11(1): 164-165.
- [12] 文小玲, 张平, 姜德诵. 速眠新与戊巴比妥钠在动物麻醉中的应用比较 [J]. 中南医学科学杂志, 2004, 32(1): 131-132.
- Wen X, Zhang P, Jiang DS. Comparison of Sumianxin and pentobarbital sodium in animal anesthesia [J]. Med Sci J Central South Chin, 2004, 32(1): 131-132.
- [13] Bertrand HG, Ellen YC, O'Keefe, et al. Comparison of the effects of ketamine and fentanyl-midazolam-medetomidine for sedation of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. BMC Vet Res, 2016, 12(1): 93.
- [14] Abbe CR, Mansfield K, Tardif SD, et al. (Eds.) Non-human primates in biomedical research, Volume 1: Biology and Management, and Volume 2: Diseases. [M]. Academic Press, 2012.
- [15] Christe KL, Lee UJ, Lemoy MJ, et al. Generalized seizure activity in an adult rhesus macaque (*Macaca mulatta*) during ketamine anesthesia and urodynamic studies [J]. Comp Med, 2013, 63(5): 445-447.
- [16] Pulley ACS, Roberts JA, Lerche NW. Four preanesthetic oral sedation protocols for rhesus macaques (*macaca mulatta*) [J]. J Zoo Wildlife Med, 2004, 35(4): 497-502.
- [17] 段俊堂, 徐春忠, 吴昆, 等. 不同剂量的舒泰对猕猴麻醉效果的观察 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 44(增刊): 147-151.
- Duan JT, Xu CZ, Wu K, et al. Observation on the anesthetic effect of different doses of Zoletil on rhesus monkeys [J]. Chin J Vet Med, 2012, 44: 147-151.
- [18] 张俊红. 动物麻醉研究进展 [J]. 山西农业科学, 2007, 35(2): 85-88.
- Zhang JH. Progress in animal anesthesia research [J]. J Shanxi Agr Sci, 2007, 35(2): 85-88.
- [19] 赵厚德, 陶均, 郝智慧, 等. 麻醉对动物实验的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 386-387.
- Zhao HD, Tao J, Hao ZH, et al. The effect of anesthesia on animal experiments [J]. Chin J Comp Med, 2004, 14(6): 386-387.
- [20] 杨万吉, 张波, 夏茂华, 等. 氯胺酮对川金丝猴的麻醉效应 [J]. 兽类学报, 2018, 38(3): 63-69.
- Yang WJ, Zhang B, Xia MH, et al. The anesthetic effects of ketamine on golden snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. Acta Theriol Sin, 2018, 38(3): 63-69.
- [21] 刘焕奇, 张廷荣, 闵令江, 等. 动物围麻醉期麻醉意外的原因分析及抢救 [J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(11): 28-30.
- Liu HQ, Zhang TR, Min LJ, et al. Cause analysis and rescue of anesthesia accidents in animal perianesthesia [J]. Chin J Vet Med, 2004, 40(11): 28-30.
- [22] 和占龙, 鲁帅尧, 陈丽雄, 等. 速眠新在实验猕猴麻醉中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4): 236-237.
- He ZL, Lu SY, Chen LX, et al. Application of Sumianxin in anesthesia of experimental rhesus monkeys [J]. Lab Anim Comp Med, 2005, 25(4): 236-237.
- [23] 吴曙光, 钱宁. 速眠新在实验动物麻醉中的应用 [J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(1): 58-60.
- Wu SG, Qian N. Application of Sumianxin in anesthesia of laboratory animals [J]. J Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2007, 29(1): 58-60.

[收稿日期] 2019-02-15

王文广,匡德宣,李娜,等. CA16感染树鼩肺成纤维细胞模型的建立及其受体 SCARB2 的表达[J].中国实验动物学报, 2019, 27(4):479 - 484.

Wang WG, Kuang DX, Li N, et al. Establishment of a tree shrew lung fibroblast model of CA16 infection and the expression of its receptor SCARB2 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):479 - 484.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.009

CA16 感染树鼩肺成纤维细胞模型的建立 及其受体 SCARB2 的表达

王文广, 匡德宣, 李娜, 陆彩霞, 罕园园, 仝品芬, 孙晓梅, 代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心云南省重大传染病疫苗研发重点实验室;
中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 昆明 650118)

【摘要】 目的 探讨建立 CA16 感染树鼩肺成纤维细胞(tree shrew lung fibroblasts, TSLF)实验模型的可行性。
方法 用肠道病毒 CA16 感染 TSLF, 以人肺成纤维细胞(KMB-17)作对照, 镜下观察细胞病变情况, 间接免疫荧光实验观察病毒蛋白和感染相关受体 SCARB2 蛋白的表达情况, 探针法实时荧光定量 PCR 检测病毒载量, 以 β -Actin 作内参染料法实时荧光定量 PCR 检测受体 SCARB2 基因的相对表达量, 结合基因序列比对, 分析其与感染的相关性。
结果 CA16 感染 TSLF, 可引起明显的细胞病变, 免疫荧光实验可见病毒和受体 SCARB2 蛋白, 以 100TCID₅₀/10⁵ cells 的比例感染 TSLF 可在 48 h 左右病毒载量达到最高, SCARB2 基因有与感染相关的高表达, 而其基因序列也与人有较高同源性。
结论 CA16 可感染 TSLF, 树鼩 SCARB2 可参与感染。

【关键词】 CA16; 树鼩肺成纤维细胞; 感染; SCARB2

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0479-06

Establishment of a tree shrew lung fibroblast model of CA16 infection and the expression of its receptor SCARB2

WANG Wenguang, KUANG Dexuan, LI Na, LU Caixia, HAN Yuanyuan, TONG Pinfen, SUN Xiaomei, DAI Jiejie*

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; the Key Laboratory of Yunnan Province for Vaccine Development for Major Infectious Disease Control; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 6500118, China)

Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the feasibility of establishing an experimental model of tree shrew lung fibroblasts (TSLF) infected with CA16. **Methods** TSLF were infected with enterovirus CA16, and human lung fibroblasts (KMB-17) were used as controls. The cytopathic effects (CPE) were observed using an inverted microscope. The expression of viral protein and the SCARB2 receptor protein was observed by indirect immunofluorescence assay, and viral load was detected by TaqMan real-time PCR assay. Using β -actin as an internal reference, the relative expression of the SCARB2 gene was detected using SYBR Green real-time PCR, and its correlation with the infection process was analyzed along with the gene sequence alignment. **Results** CA16 infected TSLF and caused obvious CPE. The virus and SCARB2

【基金项目】 云南省应用基础研究面上项目(2018FB045); 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019); 云南省重大科技专项(2017ZF007)。

Funded by Yunnan Province Applied Basic Research General Program(2018FB045), Yunnan Province Science and Technology Talent and Platform Program (2017HC019), and Yunnan Province Major Science and Technology Project (2017ZF007).

【作者简介】 王文广(1985—), 男, 助理研究员, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: windgoon@foxmail.com

【通信作者】 代解杰(1961—), 男, 研究员, 研究方向: 疾病动物模型研究。Email: dj@imbcams.com.cn

protein were observed by immunofluorescence assay. Under the infection rate of $100\text{TCID}_{50}/10^5$ cells, the viral load was highest 48 h after infection. The *SCARB2* gene had a high expression that was associated with infection, and its gene sequence also has a high homology with that of humans. **Conclusion** CA16 can infect TSLF and SCARB2 is related to the infection.

【Keywords】 CA16; tree shrew lung fibroblasts; Infection; SCARB2

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠道病毒 EV71 (enterovirus 71, EV71) 和 CA16 (coxsackie virus A16, CA16) 是引起手足口病的主要病原体, 随着 EV71 疫苗的上市和对 EV71 型手足口病的有效控制, 人们不得不将焦点转向 CA16, 因为单价 EV71 疫苗尚不能交叉保护抗 CA16 感染, 而针对 CA16 研究的相对滞后使得全面控制手足口病流行的计划受阻。实际上, CA16 早先就曾在世界范围内引发手足口病的大规模流行^[1-4]。我国的一些流行病学调查显示, 在近年来日益增加的手足口病致死病例和爆发事件中, 多半是由肠道病毒 71 型和 CA16 型交替传播或同时传播引起的^[5-11], 并且有证据表明, CA16 感染也可以导致严重的中枢神经系统并发症和死亡^[12]。

因此, 加快 CA16 的基础研究和药物疫苗开发是已经成为当前手足口病防控工作的新重心, 而合适的动物模型是支撑研发工作的关键。现已报道的 CA16 动物模型中^[13-15], 啮齿类的乳鼠和新生小鼠等因其感染年龄偏低、发病周期过短等不足限制其深入应用, 非人灵长类的婴猴模型虽然病程和病症较为理想, 但其实验成本过高而无法广为应用, 尚需开发更为合适的动物模型。另有研究发现 CA16 可经呼吸道感染 2 月龄树鼩, 使之表现出一系列与人相似的症状, 并可检测到病毒血症和病理变化^[16]。在此基础上, 本研究拟通过 CA16 对树鼩肺成纤维细胞 (tree shrew lung fibroblasts, TSLF) 的感染实验, 就其感染特性进行定性与定量研究, 结合 CA16 受体 SCARB2 的表达情况和基因同源性分析结果, 探讨建立其细胞感染模型的可行性, 以期为 CA16 感染机制研究或者药物筛选提供一种新的细胞平台和技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒

TSLF, 人胚肺二倍体成纤维细胞 (KMB-17), 柯萨奇病毒 A 组 16 型 (CA16) 均来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 其中 TSLF

由本实验室分离保存, CA16 病毒由 KMB-17 细胞培养获得, 滴度为 $8.5 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

1.1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基 (HyClone, 美国), 胎牛血清 (BI, 美国), 0.25% 胰蛋白酶溶液 (HyClone, 美国), 双抗 (HyClone, 美国), 抗 CA16 抗体 (Millipore, 美国), 山羊抗小鼠 IgG H&L-Alexa Fluor[®] 647 (Abcam, 英国), 抗 Scarb2 抗体 (GeneTex, 美国), 山羊抗兔 IgG H&L -Alexa Fluor[®] 488 (Abcam, 英国), RNAiso Plus (Takara, 日本), One Step PrimeScript[™] RT-PCR Kit (RR064 A, Takara, 日本), One Step TB Green[™] PrimeScript[™] PLUS RT-PCR Kit (RR096 A, Takara, 日本)。

CFX 96 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), Eclipse 倒置荧光显微镜 (Nikon, 日本), 二氧化碳培养箱 (Thermo, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 感染实验

将状态良好的 TSLF 制成密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液, 按照 2 mL/孔的量进行六孔板布板, 待基本形成细胞单层 (90% 左右长满), 吸弃培养液, PBS 冲洗细胞单层 1 次, 每孔加 100TCID_{50} 的 CA16 病毒液 1 mL, 孵育 1 h, 吸弃病毒液, 添加无血清的 DMEM 培养液 2 mL, 以 KMB-17 细胞作对照进行同样处理, 持续培养并定期观察细胞病变情况。

1.2.2 CA16 病毒蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光检测

为同时观察病毒蛋白和相关受体的表达情况, 间接免疫荧光鉴定实验设计为双染, 即其中 CA16 抗体和其二抗均为鼠源, 且二抗为红色荧光标记; 受体 SCARB2 抗体和其二抗均为兔源, 且二抗为绿色荧光标记。具体操作如下: 使用 4% (质量体积比) 的多聚甲醛溶液固定细胞 20 min; 加 PBS 置于水平摇床上清洗 2 min, 反复 3 次; 0.5% (质量体积比) 的 Triton-X100 穿孔 15 min; 同上操作 PBS 清洗 3 次, 山羊血清封闭液封闭 30 min; PBS 清洗 3 次, 双染组同时加入 1% BSA (质量体积比) 稀释的抗

CA16 一抗(1:500)和抗 SCARB2 一抗(1:200),各自单染对照,4℃过夜;PBS 清洗 3 次,分别加入用 PBS 按 1:500 稀释的羊抗鼠(红色荧光)和羊抗兔二抗(绿色荧光),37℃避光孵育 1 h;暗光环境中, PBS 清洗 3 次,滴加 DAPI 染核,避光孵育 2 min; PBS 清洗 3 次,在荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 病毒载量的检测

将 TSLF 按 5×10^4 /孔布置 24 孔板,待细胞贴壁基本形成单层,以 PBS 冲洗后按 100 TCID₅₀ 每孔接种 CA16 病毒 0.05 mL,无血清 DMEM 培养,实验组按照时间点 2、4、6、8、10、12、18、24、48、72 h 收样,每个时间点样品均设置复孔,设置空白对照。用 RNAiso Plus 提取 RNA,按 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (RR064 A) 试剂盒说明进行 real-time RT-PCR 操作,根据不同时间点病毒的载量绘制增殖曲线。定量标准品稀释梯度为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 拷贝/ μ L,引物探针根据 CA16 基因序列保守区设计:

CA16-F:5'-GTGACAAGAACCTCATTG-3'

CA16-R:5'-GAGCATATCCCATCAAATC-3'

CA16-P: 5'-(FAM) TGTGAACCATCACTCC ACGC(BHQ1)-3'。

1.2.4 受体 SCARB2 基因相对表达量的检测

以 1.2.3 中各个时间点样品所提取的 RNA 为模板,以树鼩 β -actin 作为内参,按照 One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (RR096 A) 说明进行 real-time RT-PCR 操作,均一化后的基因表达水平以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计。反应中所使用的引物根据 NCBI 上公布的树鼩 β -actin 和 SCARB2 相关序列设计如下:

β -actin-F:5'-CGGGAATTTGTGCGTGACAT-3'

β -actin-R:5'-AGATTCCATGCCAGAAAGA-3'

SCARB2-F:5'-CCCTACATCATCATGGCGCT-3'

SCARB2-R:5'-CAGGCGATGGTTAGGTTTCGT-3'

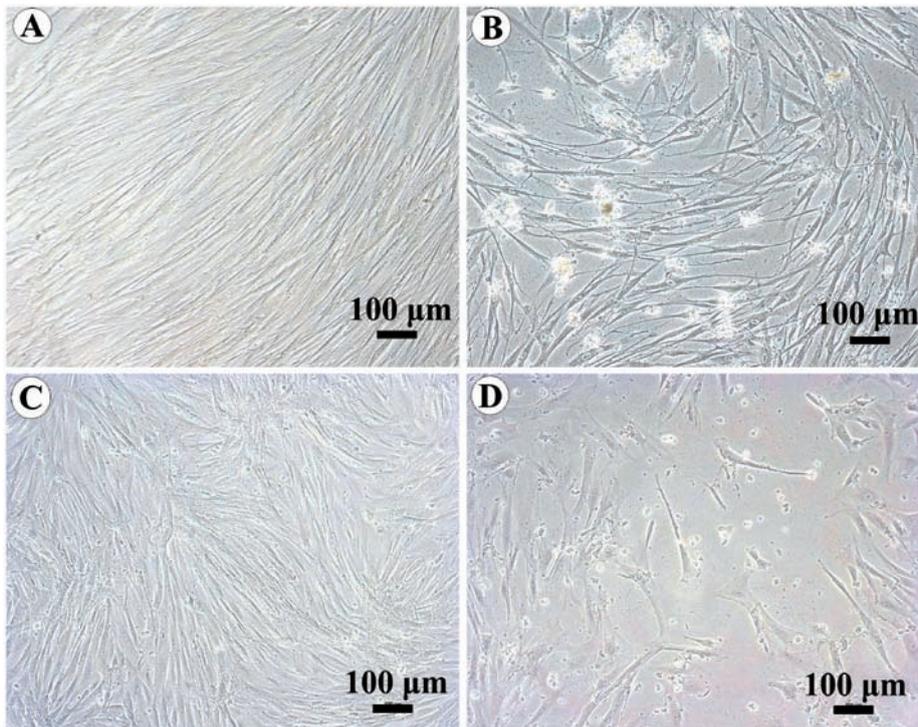
1.2.5 SCARB2 基因序列同源性分析

利用 NCBI 的 BLAST 工具对树鼩 SCARB2 基因进行同源性分析,利用 MEGA7 软件构建相关物种的系统进化树。

2 结果

2.1 CA16 感染 TSLF 的显微镜观察

CA16 病毒接种 TSLF 后,定期进行显微镜观察,在感染后 12 h,可见部分细胞变圆脱落;24 h 后,普遍可见细胞解体,游离或成团(见图 1);48 h



注:A;KMB-17 细胞对照;B:CA16 感染 KMB-17(24 h);C:TSLF 细胞对照;D: CA16 感染 TSLF(24 h)。

图 1 TSLF 感染 CA16 后 24 h 的形态

Note. A, KMB-17 control. B, KMB-17 infected with CA16(24 h). C, TSLF control. D, TSLF infected with CA16(24 h).

Figure 1 Morphology of TSLF after 24 hours of infection with CA16

后半数以上面积细胞死亡,72 h 后完整形态的细胞仅有少数可见。TSLF 感染 CA16 的细胞病变情况与 KMB-17 相似,初步观察结果表明 CA16 可感染 TSLF。

2.2 CA16 蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光观察

在初步观察到 CA16 可引起 TSLF 细胞病变的基础上,通过间接免疫荧光实验对病毒蛋白进行再确认,同时也对感染相关受体 SCARB2 蛋白的表达

情况进行检测,其中双染实验对 CA16 蛋白进行红色荧光标记,对 SCARB2 蛋白进行绿色荧光标记。在荧光显微镜下观察 CA16 感染细胞 24 h 的结果如图 2 所示,红色荧光区域代表 CA16 病毒蛋白,主要存在于细胞质中,少量分布于细胞外,这就再次确认 CA16 可感染 TSLF;同时,可见 TSLF 细胞普遍呈现绿色,表明 SCARB2 受体在 CA16 感染 TSLF 过程中有较多表达,很可能参与了 CA16 的感染进程。

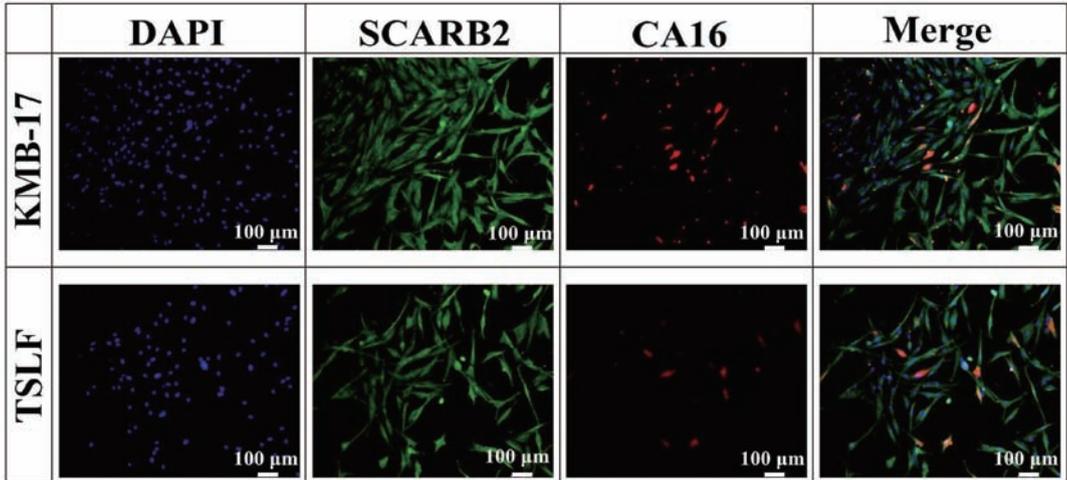


图 2 CA16 病毒蛋白和受体 SCARB2 蛋白的免疫荧光观察

Figure 2 Immunofluorescence observation of CA16 protein and receptor SCARB2 protein

2.3 CA16 病毒载量和受体 SCARB2 基因表达情况

在对 CA16 病毒感染 TSLF 的情况进行定性观察后,再通过实时荧光定量 PCR 进行定量分析。以 $100 \text{ TCID}_{50}/10^5 \text{ cells}$ 的接种密度,CA16 感染 TSLF 后的病毒载量变化如图 3 所示,病毒经过短暂的适应,在 24 h 内病毒基本呈线性增殖,之后增殖趋于缓慢,48 h 达到最高值 $9.59 \times 10^5 \text{ copies/mL}$,此后 24 h 并未出现较大变化。

此前免疫荧光实验观察到 CA16 感染 TSLF 过程中有受体 SCARB2 蛋白的普遍存在,通过相对荧光定量 PCR 对其基因表达情况进行检测,如图 3 所示,SCARB2 基因表达水平有伴随感染进程增高的趋势,前 18 h 基因表达比较活跃,8 h 出现一次小高峰,18 h 出现第二次高峰,而在 24 h 之后则基本维持一个相对较低的表达水平,结合病毒增殖曲线,可以看到在每次受体表达高峰之后都有病毒载量的快速升高,提示 SCARB2 与 CA16 的感染相关。

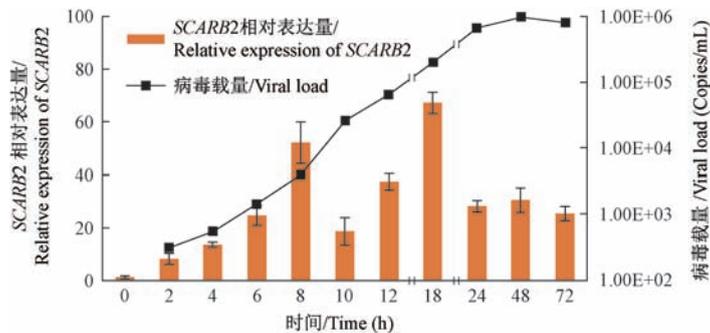


图 3 CA16 增殖曲线和受体 SCARB2 基因相对表达量

Figure 3 Proliferation curve of CA16 and relative expression of receptor SCARB2 gene

2.4 SCARB2 基因序列的同源性分析

利用 NCBI 的在线 BLAST 功能,对树鼩 SCARB2 基因预测序列 (XM_006142962.3) 进行比对,结果发现其与人和非人灵长类具有较高的同源性,其中和人 (AK313016.1)、食蟹猴 (NM_001284776.1)、猕猴 (XM_001096458.3)、绿猴 (XM_007998945.1)、土拨鼠 (XM_027939796.1)、裸鼯鼠 (XM_

004848034.2)、小鼠 (BC029073.1) 的同源性分别为 88.69%、87.27%、87.22%、87.15%、85.35%、82.87%、82.25%。选取不同物种的多个 SCARB2 序列利用 mega7 软件进行系统进化树构建,结果如图 4 所示,树鼩与食蟹猴及人的遗传距离最为接近,和啮齿类等动物相距较远。

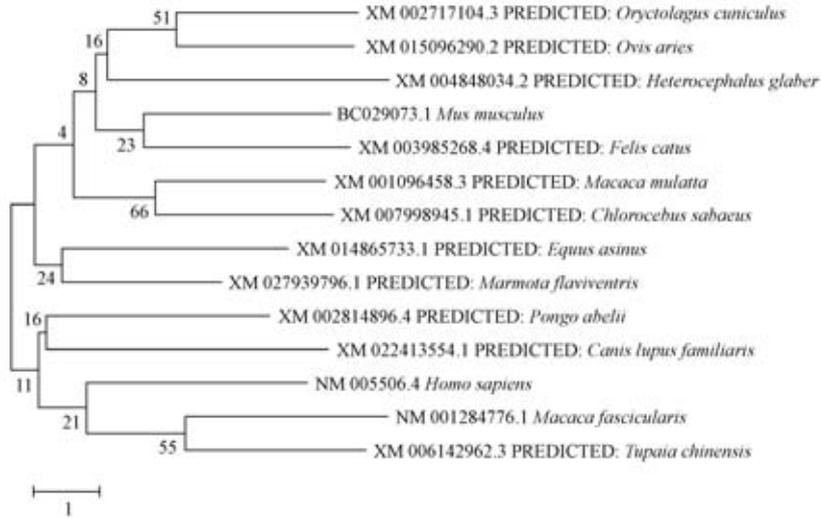


图 4 SCARB2 基因在不同物种的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of SCARB2 gene in different species

3 讨论

啮齿类动物较早和较多的应用于 CA16 的研究^[13-14],比较成功的有通过脑内或腹腔接种的乳鼠^[13]、新生小鼠^[13]以及腹腔注射的 21 d 内沙鼠^[17],均能表现出一定的症状,但由于接种年龄、感染方式以及物种差异等因素的影响,无法完全复制 CA16 的病程和病理变化,也就限制了此类动物模型的深入应用。非人灵长类动物模型亦有报道^[15],CA16 经呼吸道感染猕猴,可观察到手足口部疱疹和发热症状,可在血液和多种组织中检测到病毒载量,但其中和抗体反应和病理变化较弱,加之动物成本较高,在 CA16 的基础研究中尚不能广为应用。

除了啮齿类和非人灵长类动物模型外,新型实验动物树鼩也被用于肠道病毒相关研究,先后有人成功建立了 EV71 感染树鼩的体内^[18]和体外模型^[19],最近有研究发现树鼩对 CA16 具有易感性^[16],将 CA16 通过呼吸道感染 2 月龄树鼩,发现感染后 4~7 d,树鼩的体温和血中性粒细胞/单核细胞百分比均升高,在其粪便和包括中枢神经系统在内的多种组织中检测到高载量病毒,同时在其肺、肾

等组织中也发现细胞损伤和炎性细胞浸润等病变,提示树鼩可用来建立 CA16 感染的动物模型。

本研究实验发现,CA16 感染可引起 TSLF 出现变圆、脱落和裂解等细胞病变;免疫荧光实验可见 CA16 病毒蛋白的表达;根据实时荧光定量 PCR 数据可绘制出病毒增殖曲线,定性与定量数据均表明 CA16 可感染 TSLF,这与 CA16 体内感染可致树鼩肺组织损伤的结果一致,基本确定建立该细胞感染模型是可行的。

多项研究证明^[20-21],清道夫受体 b 亚类成员 2 (SCARB2)是 CA16 的受体,树鼩的 SCARB2 受体基因序列与人具有较高的同源性(88.69%),其进化关系比啮齿类更接近于人和非人灵长类。本研究通过免疫荧光双染实验同时观察到 CA16 病毒蛋白和 SCARB2 受体蛋白的分布,而且检测到受体基因表达水平与病毒增殖相关,基本确定树鼩的 SCARB2 参与 CA16 感染,支持 CA16 感染树鼩的模型的建立,同时也提示了树鼩对人肠道病毒易感的理论依据和先天优势。当然,SCARB2 仅仅是报道的 CA16 受体之一,如何介导感染进程尚需进一步验证,此外,还有哪些受体以及如何参与还需开展更多的实验研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Wright HT, Landing BH, Lennette EH, et al. Fatal infection in an infant associated with Cocksackie virus group A, type 16[J]. N Engl J Med, 1963, 268: 1041-1044.
- [2] Kazuna G, Masafumi S, Koichi K, et al. Rhombencephalitis and Cocksackievirus A16 [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15 (10): 1689-1691.
- [3] Wang CY, Li LF, Wu MH, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection [J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(3): 275-276.
- [4] Legay F, Lévêque N, Gacouin A, et al. Fatal coxsackievirus A16 pneumonitis in adult [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(7): 1084-1086.
- [5] Yin DQ, Wang CB, Wang CB, et al. Epidemiology characteristics of human coxsackievirus A16 and enterovirus 71 circulating in Linyi, China, from 2009 to 2017 [J]. Jpn J Infect Dis, 2018, 71(6): 470-473.
- [6] 冀天娇, 谭小华, 刘冷, 等. 广东省 2008~2015 年手足口病流行病学特征及病原学监测分析 [J]. 病毒学报, 2016, 32(6): 713-720.
- Ji TJ, Tan XH, Liu L, et al. Epidemiology characteristics and pathogen surveillance of hand, foot and mouth disease in Guangdong province, China, 2008-2015 [J]. Chin J Virol, 2016, 32(6): 713-720.
- [7] 王丹, 李法锦, 姚光海, 等. 贵州省 2009-2016 年手足口病流行病学特征研究 [J]. 中国疫苗和免疫, 2017, 23(4): 450-454.
- Wang D, Li FJ, Yao GH, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Guizhou, 2009-2016 [J]. Chin J Vaccines Immun, 2017, 23(4): 450-454.
- [8] 邓红, 张璇, 阿依古丽·伊尔哈力, 等. 新疆 2008-2013 年手足口病流行病学及病原学特征 [J]. 中国公共卫生, 2016, 32(1): 38-41.
- Deng H, Zhang X, Ayiguli·Yierhali, et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Xinjiang, 2008-2013 [J]. Chin J Public Health, 2016, 32(1): 38-41.
- [9] 李娜, 李美娜, 卢欣荣, 等. 吉林省 2012-2016 年 5 岁及以下儿童手足口病流行特征分析 [J]. 实用预防医学, 2018, 25(6): 7-10.
- Li N, Li MN, Lu XR, et al. Epidemiological characteristics of hand-foot-mouth disease among children aged 5 years and below in Jilin Province, 2012-2016 [J]. Prac Prev Med, 2018, 25(6): 7-10.
- [10] 徐艺, 关路媛, 郑媛, 等. 2009-2017 年陕西省手足口病流行特征分析 [J]. 现代预防医学, 2018, 45(20): 17-20+38.
- Xu Y, Guan LY, Zheng Y, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Shaanxi province between 2009 and 2017 [J]. Mod Prev Med, 2018, 45(20): 17-20+38.
- [11] 李志芳, 邱德志, 康万余, 等. 2015-2016 年湖北省襄阳市手足口病流行病学特征分析 [J]. 医学动物防制, 2018, 34(12): 86-88.
- Li ZF, Qiu DZ, Kang WY, et al. Analysis of epidemiological characteristics of hand-foot-mouth disease in Xiangyang city of Hubei province from 2015 to 2016 [J]. J Med Pest Contrl, 2018, 34(12): 86-88.
- [12] Mao Q, Wang Y, Yao X, et al. Cocksackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. Hum Vaccines Immunother, 2014, 10(2): 360-367.
- [13] Mao Q, Wang Y, Gao R, et al. A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. J Virol, 2012, 86(22): 11967-11976.
- [14] Liu Q, Shi J, Huang X, et al. A murine model of coxsackievirus A16 infection for anti-viral evaluation [J]. Antiviral Res, 2014, 105: 26-31.
- [15] Wang J, Zhang Y, Zhang X, et al. Pathologic and immunologic characteristics of coxsackievirus A16 infection in rhesus macaques [J]. Virology, 2017, 500: 198-208.
- [16] Li JP, Liao Y, Zhang Y, et al. Experimental infection of tree shrews (*Tupaia belangeri*) with Cocksackie virus A16 [J]. Zool Res, 2014, 35(6): 485-491.
- [17] Sun YS, Li YJ, Xia Y, et al. Cocksackievirus A16 induced neurological disorders in young gerbils which could serve as a new animal model for vaccine evaluation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 34299.
- [18] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩 [J]. 动物学研究, 2012, 33(1): 7-13.
- Wang WG, Huang XY, Xu J, et al. Experimental studies on infant *Tupaia belangeri chinensis* with EV71 infection [J]. Zool Res, 2012, 33(1): 7-13.
- [19] 杨铭, 胡晓星, 王文广, 等. EV71 病毒对树鼩原代肾上皮细胞感染模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 117-122.
- Yang M, Hu XX, Wang WG, et al. Establishment of a EV71 virus infection model of tree shrew primary renal cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(2): 117-122.
- [20] Li X, Fan P, Jin J, et al. Establishment of cell lines with increased susceptibility to EV71/CA16 by stable overexpression of SCARB2 [J]. Virol J, 2013, 10: 250.
- [21] Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71 [J]. J Virol, 2012, 86(10): 5686-5696.

[收稿日期] 2019-03-28

杜俊英,房军帆,项璇儿,等. 基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的大鼠外周痛感觉调控机制[J].中国实验动物学报, 2019,27(4): 485 - 492.

Du JY, Fang JF, Xiang XE, et al. Regulation mechanism of peripheral pain sensation in rats based on the interaction between TRPV1 and P2X3 [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):485 - 492.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.010

基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的大鼠外周痛感觉调控机制

杜俊英,房军帆,项璇儿,徐子童,方剑乔*

(浙江中医药大学第三临床医学院,浙江省针灸神经病学研究重点实验室,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察大鼠外周 TRPV1 和 P2X3 的相互关系,以期部分阐明外周痛感觉调控机制。方法 雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组、TRPV1 激动剂组、P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组。通过足底皮下注射 TRPV1 或 P2X3 激动剂和(或)抑制剂,分别观察 20 min 内各组大鼠缩足次数、抬腿/舔足持续时间;采用免疫荧光法观察 L4DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 阳性面积表达及其表达情况;采用免疫共沉淀法观察 L4DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 的相互关系。结果 P2X3 激动剂不能提升 TRPV1 激动剂诱发的痛行为学,P2X3 抑制剂能减轻 TRPV1 激动剂诱发的痛行为学;TRPV1 激动剂能增加 P2X3 激动剂诱发的痛行为学,TRPV1 抑制剂不会减轻 P2X3 激动剂诱发的痛行为学。P2X3 激动剂能增加 L4 DRG 水平 TRPV1 阳性面积表达,TRPV1 激动剂能增加 L4 DRG 水平 P2X3 阳性面积表达;TRPV1 和 P2X3 在 DRG 水平有共表达且存在共沉淀现象。结论 外周神经元水平,TRPV1 和 P2X3 之间存在一定的相互作用。两者可以相互促进对方的表达。当其中一方受到抑制时,另一方的功能也会相应的降低。

【关键词】 辣椒素受体;P2X 嘌呤受体 3;相关作用;外周;痛感觉;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0485-08

Regulation mechanism of peripheral pain sensation in rats based on the interaction between TRPV1 and P2X3

DU Junying, FANG Junfan, XIANG Xuaner, XU Zitong, FANG Jianqiao*

(the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com

【Abstract】 Objective To assess the relationship between peripheral TRPV1 and P2X3 in normal healthy rats to elucidate the regulation mechanism of peripheral pain sensation. **Methods** Healthy male SD rats were randomly divided into a control group, TRPV1 agonist group, P2X3 agonist group, TRPV1 agonist + P2X3 agonist group, TRPV1 agonist + P2X3 inhibitor group, and P2X3 agonist +TRPV1 inhibitor group. Within 20 min after subcutaneous and intraplantar

【基金项目】 国家自然科学基金(81473772,81603690),浙江省医药卫生重大科技计划(WKJ-ZJ-1419)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81473772, 81603690), Major Science and Technology Program for Medicine and Health in Zhejiang Province (WKJ-ZJ-1419).

【作者简介】 杜俊英(1984—),女,副研究员,研究方向:针灸镇痛相关机制研究。Email: dujunying0706@163.com

【通信作者】 方剑乔(1961—),男,教授,博士生导师。Email: fangjianqiao7532@163.com

injections of TRPV1 or P2X3 agonist and/or inhibitor, the number of foot contractions and the duration of leg raising/licking in each group were measured, respectively. The expression and co-expression of positive cells of L4DRG TRPV1 and P2X3 were observed using immunofluorescence. The correlation between TRPV1 and P2X3 at L4 DRG levels was observed using immunoprecipitation. **Results** The P2X3 agonist did not alleviate pain behavior induced by the TRPV1 agonist, and the P2X3 inhibitor did. The TRPV1 agonist increased pain behavior induced by P2X3 agonist, and the TRPV1 inhibitor did not reduce pain behavior induced by P2X3 agonist. The P2X3 agonist increased the positive area expression of TRPV1 in at the L4DRG level, and the TRPV1 agonist increased the positive area expression of P2X3 at the L4DRG level; TRPV1 and P2X3 were co-expressed and co-precipitated at the L4 DRG level. **Conclusions** There is an interaction between TRPV1 and P2X3 at the peripheral neuron level, whereby they promote each other's expression. When one is inhibited, the other is reduced in function.

【Keywords】 TRPV1; P2X3; interaction; periphery; pain sensation; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是感觉传入的初级神经元,是感觉冲动从外周传到中枢的第一站,具有传输、传导机体感觉和伤害性感觉的功能^[1]。大量的离子通道和受体在 DRG 中表达,如辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1)和 P2X 嘌呤受体 3(purinergic P2X3 receptor, P2X3)。TRPV1 和 P2X3 均为重要的疼痛相关受体,高度表达于 DRG 的中小直径神经元细胞中,参与不同类型疼痛的信号转导过程。已有研究报道,TRPV1 和 P2X3 在 DRG 水平有共表达^[2]。在病理状态下,动物模型和药理实验研究均发现,TRPV1 和 P2X3 存在相关作用,且不同病理状态的相互作用关系不同^[3]。在生理状态下,已有研究采用 DRG 神经元及转染细胞 HEK293,观察到 TRPV1 和 P2X3 存在相互抑制作用^[4-5]。但未在正常大鼠中观察 DRG 水平 TRPV1 与 P2X3 的相关作用关系。本研究拟通过足底注射 TRPV1 激动剂和(或)P2X3 激动剂/抑制剂、P2X3 激动剂和(或)TRPV1 激动剂/抑制剂,观察其痛行为学、DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 阳性细胞面积、TRPV1 和 P2X3 的共表达及相关关系,部分阐明基于 TRPV1 和 P2X3 交互作用的外周痛感觉调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄雄性清洁级 SD 大鼠 72 只,体重 180~200 g,由中国科学院上海实验动物中心提供【SCXK(沪)2013-0016】,浙江中医药大学实验动物中心【SYXK(浙)2013-0184】饲养及完成部分实验内容。

饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料及自由饮水,控制温度和湿度($23 \pm 2^\circ\text{C}$, 60%),12 h 循环灯光。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》,所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:ZSLL-2015-022)。

1.1.2 实验试剂

Capsaicin(Sigma, 美国),capsazepine(Sigma, 美国), $\alpha\beta$ -methylene ATP(Sigma, 美国),TNP-ATP(Sigma, 美国),兔抗大鼠 TRPV1(Abcam, 美国),豚鼠抗大鼠 P2X3(Abcam, 美国),兔抗大鼠 P2X3(Abcam, 美国),Alexa FluorR488 标记驴抗兔二抗(Invetrogen, 英国),Alexa FluorR647 标记驴抗豚鼠二抗(Invetrogen, 英国),GAPDH(SCT, 美国),琼脂糖珠(Santa Cruz, 美国),ECL 试剂盒(碧云天, 中国)。

1.1.3 实验仪器

荧光显微镜(Nikon, 日本),冰冻切片机(Thermo, 美国),抗荧光淬灭封片液(碧云天, 中国),全波长分光光度计(Molecular Devices, 美国),电泳仪(Bio-Rad 美国),半干转印仪(Bio-Rad, 美国),Image Quant LAS 4000 凝胶成像系统(GE, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

所有大鼠完全随机分为空白对照组、TRPV1 激动剂组、P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组 6 组,每组各 12 只。

1.2.2 药物处理

① TRPV1 激动剂组:足底皮下注射 capsaicin 100 μg , 体积 50 μL ; ② P2X3 激动剂组:足底皮下注射 $\alpha\beta$ -methylene ATP 600 nmol, 体积 50 μL ; ③ TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组:足底皮下同时注射 capsaicin 100 μg , $\alpha\beta$ -methylene ATP 600 nmol, 体积 50 μL ; ④ TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组:足底皮下同时注射 capsaicin 100 μg , TNP-ATP 300 nmol, 体积 50 μL 。⑤ P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组:足底皮下同时注射 $\alpha\beta$ -methylene ATP 600 nmol, capsazepine 200 μg , 体积 50 μL 。

空白对照组:注射相同剂量的生理盐水。

1.2.3 痛行为学观察

实验前,将大鼠置于铁丝网上塑料盒内 1 h 以适应环境,持续适应 5 d。实验时,先将大鼠置于铁丝网上塑料盒内 30 min 适应环境,在此过程中,采用胰岛素注射针头足底皮下注射相应药物,观察大鼠每 2 min 内的缩足次数、抬腿/舔足持续时间,持续观察 20 min。

1.2.4 免疫荧光方法观察 L4DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 阳性面积表达

观察完行为学后,每组取 5 只大鼠戊巴比妥 (40 mg/kg, bw) 腹腔注射麻醉,经心主动脉生理盐水 (4℃ 预冷) 灌注至大鼠肝变白,接着缓慢推注 4% 多聚甲醛 150 mL。快速取出注射侧 L4 DRG,置 4% 多聚甲醛溶液中后固定 3 h。然后分别置于 15%、30% 蔗糖溶液梯度脱水后,经液氮速冻后,置入 -80℃ 冰箱保存备用。

行冰冻切片 (厚度 12 μm), TBST 清洗 5 min \times 3 次, 5% 正常驴血清 37℃ 封闭 1 h 洗, 兔抗大鼠 TRPV1 (ab63104) 或 P2X3 (ab10269) 一抗 4℃ 孵育过夜 (含 5% 正常驴血清 TBST 稀释), Alexa Fluor 488 标记驴抗兔二抗 37℃ 孵育 1 h (含 5% 正常驴血清 TBST 稀释), 风干, 抗荧光淬灭封片液封片。荧光显微镜拍摄 L4DRG 处 TRPV1 或 P2X3 表达。以上步骤均避光完成。Image Pro Plus 5.0 软件分析。

1.2.5 免疫荧光方法观察 L4 DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 共表达

除采用兔抗大鼠 TRPV1 (ab63104) 和豚鼠抗大鼠 P2X3 (ab10267) 一抗 4℃ 孵育过夜, Alexa Fluor 488 标记驴抗兔二抗和 Alexa Fluor 647 标记

驴抗豚鼠二抗 37℃ 孵育 1 h 外,其余方法 1.2.4。

1.2.6 免疫共沉淀法观察 L4 DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 相互作用

观察完行为学后,每组取 7 只大鼠戊巴比妥 [40 mg/(kg·bw)] 腹腔注射麻醉大鼠,用 4℃ 生理盐水快速灌注,直至流出液为澄清液体。快速取出注射侧 L4 DRG,入预冷的 EP 管中,置入 -80℃ 冰箱中保存。取 L4 DRG,加 Western 及 IP 细胞裂解液 (碧云天) 超声粉碎,BCA 蛋白定量,取 200 μg 蛋白混合液,加入 1 μg 兔抗大鼠 TRPV1 或 1 μg 兔抗大鼠 P2X3, 4℃ 缓慢摇动孵育过夜,加入平衡好的琼脂糖珠 4℃ 摇动孵育 3 h,离心去上清,裂解液清洗后加 2 \times 上样缓冲液,95℃ 变性 5 min, SDS-PAGE 凝胶分离蛋白,半干转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,分别加入兔抗大鼠 P2X3 (ab10269) 或兔抗大鼠 TRPV1 (ab63104) 4℃ 孵育过夜;TBST 摇洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1:10000, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),室温孵育 2 h, TBST 摇洗 3 次;ECL 试剂盒显色,Image Quant LAS4000 系统拍照。采用非沉淀蛋白做对照。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件包进行统计分析。采用单因素方差分析;组间两两比较,方差齐性时采用 LSD 检验,方差不齐时,采用 Dunnett's T3 检验,均以 $P < 0.05$ 为差异显著的标准。

2 结果

2.1 生理状态下外周 P2X3 对 TRPV1 诱发的痛行为的影响

2.1.1 各组大鼠缩足、抬腿持续时间

我们观察各组大鼠药物注射后每 2 min 内的缩足、抬腿持续时间,共观察了 20 min,结果如图 1A、B 所示。TRPV1 激动剂组在观察的 20 min 内,其缩足、抬腿持续时间均显著多于正常对照组,其中在药物注射后 2 min 时达最高值,之后缩足、抬腿持续时间缓慢下降。TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组大鼠于药物注射后 8 min,其缩足、抬腿持续时间与空白对照组比较无差异,而在药物注射后 14、18、20 min 时,与空白对照组比较其缩足、抬腿持续时间增

多。TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组大鼠于药物注射后 6 min 开始至整个实验结束,其缩足、抬腿持续时间与空白对照组比较无差异。从各组大鼠缩足、抬腿总持续时间实验观察,结果发现,TRPV1 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组均能有效增加正常大鼠缩足、抬腿总持续时间;其中 TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组缩足、抬腿总持续时间显著少于 TRPV1 激动剂组。

2.1.2 各组大鼠缩足、抬腿次数

我们观察各组大鼠药物注射后每 2 min 内的缩足、抬腿次数,结果与缩足、抬腿次数相似,结果如图 1C、D 所示。TRPV1 激动剂组在观察的 20 min 内,其缩足、抬腿次数均显著多于正常对照组,其中在药物注射后 2 min 时达最高值,之后缩足、抬腿次数缓慢下降。TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组大鼠于药物注射后 8 min 缩足、抬腿次数降至最低值,与空白对照组比较无差异,而后又开始增多,于药物注射后 12、16、18、20 min 时其缩足、抬腿次数明显多于空白对照组。TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组大鼠于药物注射后 6 min 开始至整个实验结束,其缩足、抬腿次数与空白对照组比较无差异。从各组大鼠缩足、抬腿总次数实验观察,结果发现,TRPV1 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组、TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组均能有效增加正常大鼠缩足、抬腿总次数;其中 TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组缩足、抬腿总次数显著少于 TRPV1 激动剂组和 TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组。

2.2 生理状态下外周 TRPV1 对 P2X3 诱发的痛行为的影响

2.2.1 各组大鼠缩足、抬腿持续时间

我们观察各组大鼠药物注射后每 2 min 内的缩足、抬腿持续时间,共观察了 20 min,结果如图 2A、B 所示。P2X3 激动剂组在药物仅注射后 8、10 min 两个时间点其缩足、抬腿持续时间明显多于空白对照组。P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组在药物注射后 2 min 时其缩足、抬腿持续时间达最高值,而后逐渐下降,于药物注射后 8 min 降至最低,药物注射后 12 min 以后每 2 min,其缩足、抬腿持续时间多于空白对照组。P2X3 激动剂+TRPV1 抑

制剂组在造模后 2、4、6 min,其缩足、抬腿持续时间显著多于空白对照组,其他时间点与空白组比较无差异。从各组大鼠缩足、抬腿总持续时间实验观察,结果发现,P2X3 激动剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组均能有效增加正常大鼠缩足、抬腿总持续时间;其中 P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组缩足、抬腿总持续时间显著少于 P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组。

2.2.2 各组大鼠缩足、抬腿次数

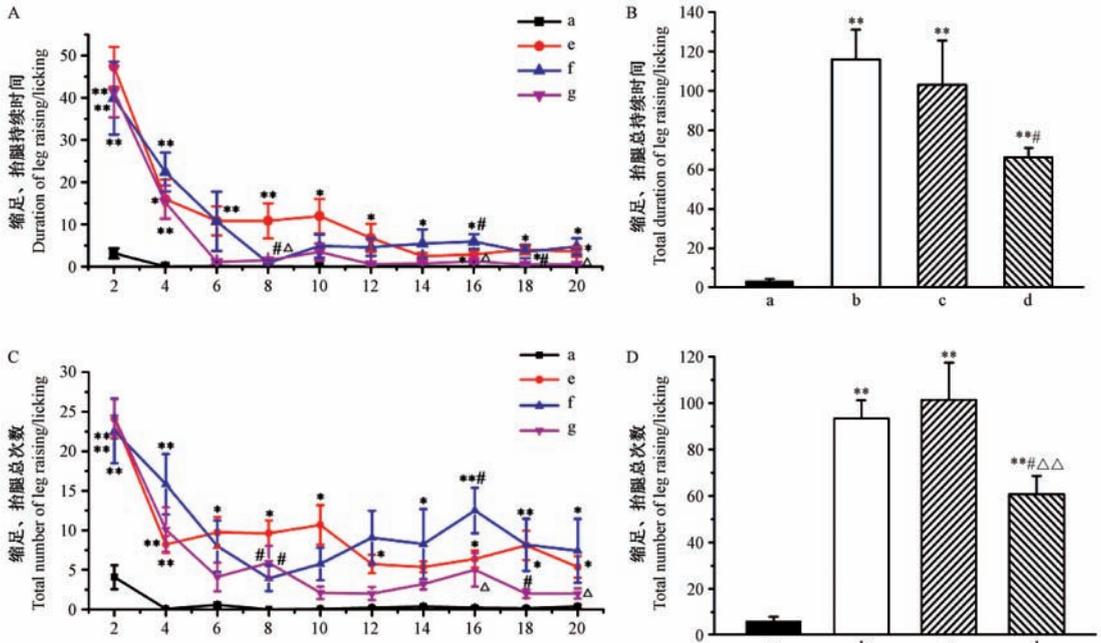
我们观察各组大鼠药物注射后每 2 min 内的缩足、抬腿次数,共观察了 20 min,结果如图 2C、D 所示。与空白对照组比较,P2X3 激动剂组药物注射后 18 min 内的每 2 min 其缩足、抬腿次数均增多;P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组于药物注射后 2 min 其缩足、抬腿次数最多,其后逐渐减少,于药物注射后 8 min 达最低值与空白对照组比较无差异,而后 10、12、14、16、18、20 min 其缩足、抬腿次数亦明显多于空白对照组;P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组仅于药物注射后 2、4、6、8 min 缩足、抬腿次数多于空白对照组。从各组大鼠缩足、抬腿总次数实验观察,结果发现,P2X3 激动剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组均能有效增加正常大鼠缩足、抬腿次数;其中 P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组缩足、抬腿总持续时间显著少于 P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组。

2.3 生理状态下外周 P2X3 对 TRPV1 阳性面积表达的影响

我们采用免疫荧光单标法观察各组大鼠 L4DRG 水平 TRPV1 阳性面积表达,结果如图 3 所示。如图 3B 所示,L4DRG 水平 TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组 TRPV1 阳性细胞面积表达明显多于空白对照组、TRPV1 激动剂组和 TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组。

2.4 生理状态下外周 TRPV1 对 P2X3 阳性面积表达的影响

我们采用免疫荧光单标法观察各组大鼠 L4DRG 水平 P2X3 阳性细胞表达,结果如图 4 所示。如图 4B 所示,L4DRG 水平,P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组 P2X3 阳性面积表达显著多于空

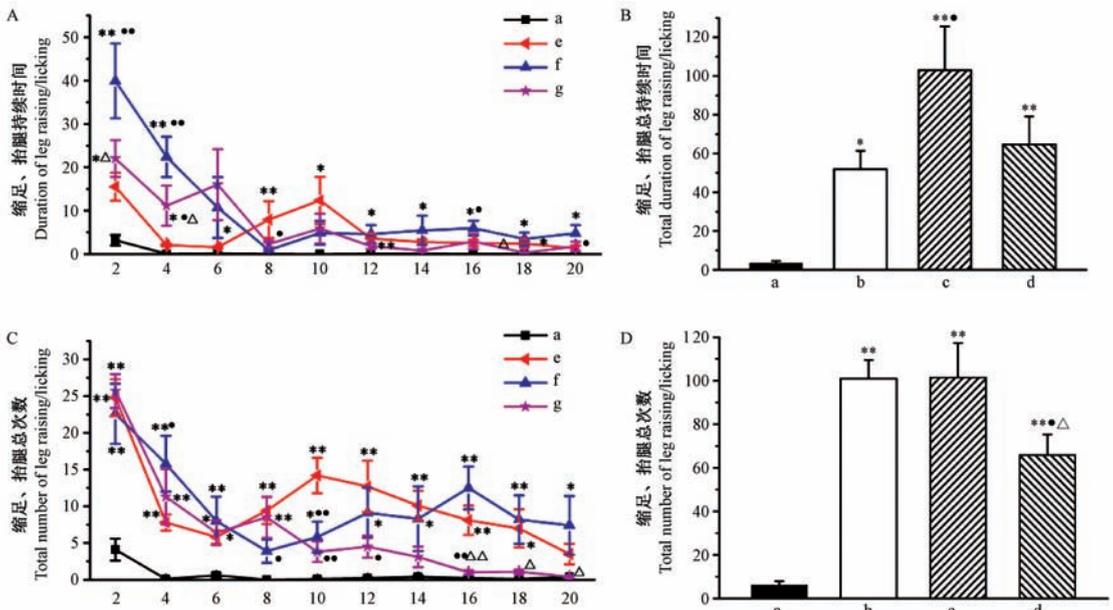


注:a:空白对照组;b:TRPV1 激动剂组;c:TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组;d:TRPV1 激动剂+P2X3 抑制剂组;e:P2X3 激动剂组;f:P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组;g:P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组。(下图同)与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 TRPV1 激动剂组比较,# $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与 TRPV1 激动剂+P2X3 激动剂组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 外周 P2X3 对 TRPV1 诱发的痛行为影响

Note. a, control group.b, TRPV1 agonist group.c, TRPV1 agonist + P2X3 agonist group.d, TRPV1 agonist + P2X3 inhibitor group.e, P2X3 agonist group.f, P2X3 agonist + TRPV1 agonist group.g, P2X3 agonist + TRPV1 inhibitor group. (The same in the following figures) Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the TRPV1 agonist group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. Compared with the TRPV1 agonist + P2X3 agonist group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 1 Effect of peripheral P2X3 on TRPV1-induced pain behavior



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 P2X3 激动剂组比较,● $P < 0.05$,●● $P < 0.01$;与 P2X3 激动剂+TRPV1 激动剂组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 2 外周 TRPV1 对 P2X3 诱发的痛行为影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the P2X3 agonist group, ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$. Compared with the P2X3 agonist group + TRPV1 agonist, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 2 Effect of peripheral TRPV1 on P2X3-induced pain behavior

白对照组、P2X3 激动剂组、P2X3 激动剂+TRPV1 抑制剂组。

2.5 生理状态下外周 TRPV1 与 P2X3 的共变达及相互关系

我们采用荧光双标法和免疫共沉淀法观察

L4DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 的相关关系。结果如图 5 所示,荧光双标法结果提示 TRPV1 和 P2X3 在 DRG 水平共表达于中小神经元细胞;免疫共沉淀结果提示 TRPV1 和 P2X3 之间有相关作用关系。

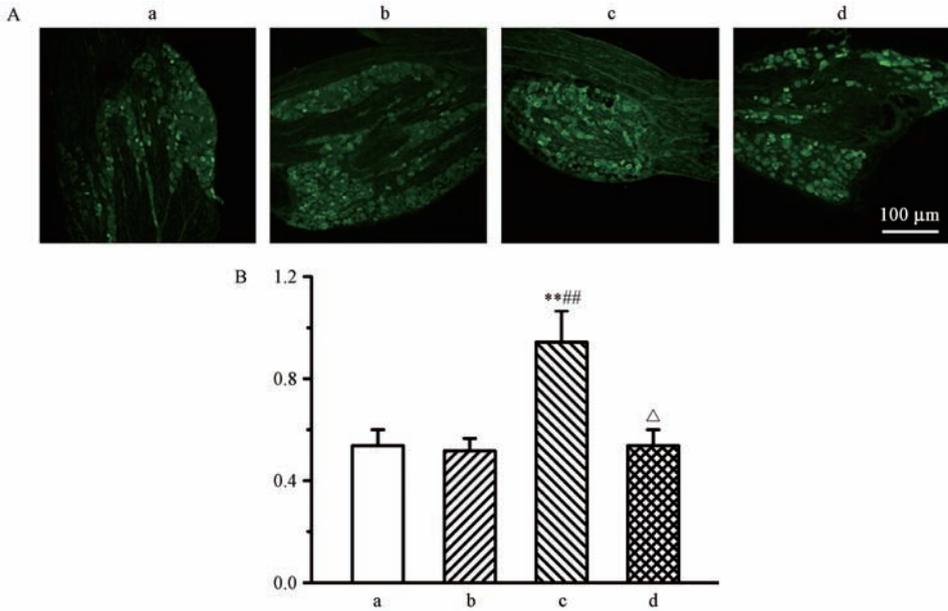


图 3 各组大鼠 L4DRG 水平 TRPV1 阳性面积表达情况

Figure 3 Expression of TRPV1 positive area at L4 DRG levels of the rats in each group

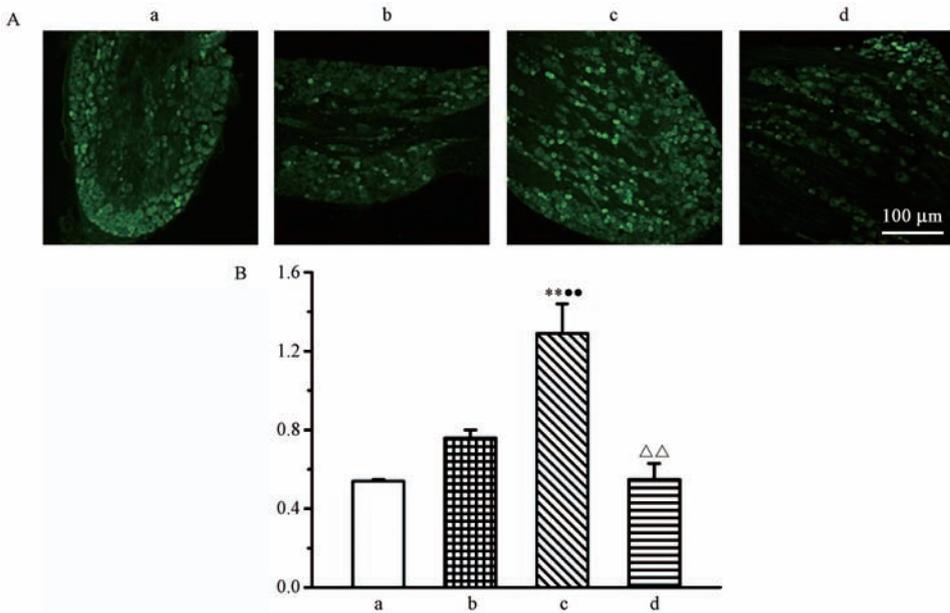
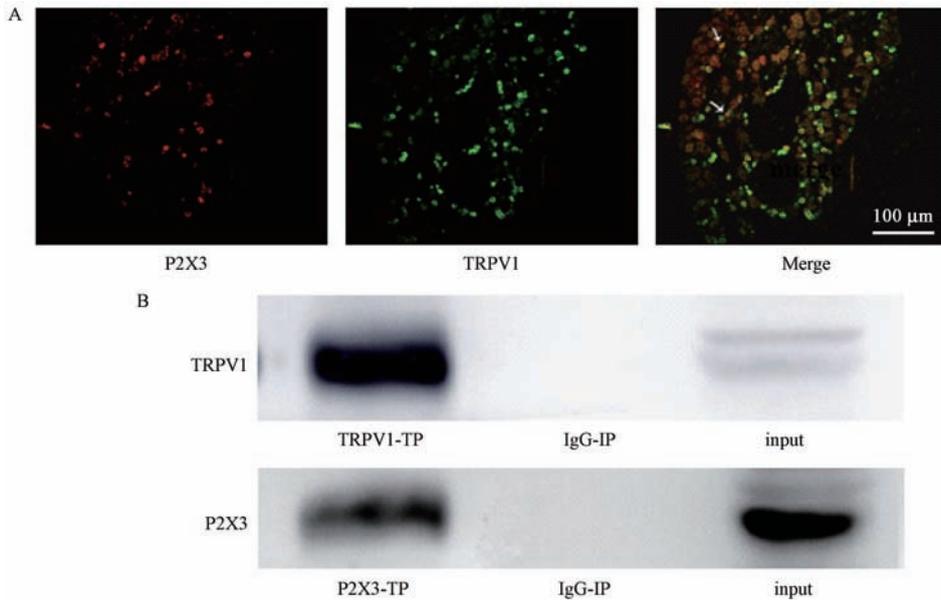


图 4 各组大鼠 L4DRG 水平 P2X3 阳性面积表达情况

Figure 4 Expression of P2X3 positive area at L4 DRG levels of rats in each group



注: A. P2X3 和 TRPV1 免疫荧光单标及双标图。 B. TRPV1 和 P2X3 免疫共沉淀图。

图 5 各组大鼠 L4DRG 水平 TRPV1 和 P2X3 共表达及共沉淀情况

Note. A. P2X3 and TRPV1 immunofluorescence diagram and double-labelling immunofluorescence diagram.

B. TRPV1 and P2X3 co-immunoprecipitation diagram.

Figure 5 Co-expression and co-immunoprecipitation of TRPV1 and P2X3 expressions at L4DRG levels of the rats in each group

3 讨论

TRPV1 和 P2X3 均是典型的配体门控非选择性阳离子通道。在被激活的情况下,能快速诱导神经元产生冲动,发放动作电位^[6]。研究表明,P2X3 在自然界的主要配体是三磷酸腺苷(ATP)^[7],而 TRPV1 的天然配体为辣椒素。但与 P2X3 不同的是,TRPV1 对辣椒素的敏感性受到 pH 值和温度的直接影响^[8]。在酸性环境和高温下,TRPV1 的敏感性明显提升,仅需要小剂量的辣椒素即刻激活 TRPV1。已有大量动物和人体研究表明,外周神经元上的 TRPV1 和 P2X3 是生物体感受外界伤害性刺激的主要受体之一^[9-11]。二者的活化参与了从生理性疼痛到病理性疼痛,从炎性痛到神经病理痛等多种疼痛的产生和维持。已有大量研究者将二者视作镇痛治疗的主要外周靶点^[12-13]。已有离体实验报道,两者在外周神经元上可能存在相互作用^[4-5]。但是,尚未有研究在在体正常动物系统探讨两者之间的相互作用,及其是否会影响机体对疼痛的感觉。

在本研究中,我们发现激动 TRPV1 或 P2X3 能明显提升 P2X3 或 TRPV1 的表达水平。但在痛觉

表现上,TRPV1 激活会明显提升 $\alpha\beta$ -meATP 诱导的自发痛,而 P2X3 对于 capsaicin 诱导的自发痛则无明显改变。课题组认为,这种变化可能与不同受体对细胞兴奋性影响的差异有关。虽然,TRPV1 和 P2X3 均为非选择性的阳离子通道。但是,两者对细胞兴奋性的影响明显不同。大量研究报道,使用 $\alpha\beta$ -meATP 激活 DRG 中小神经元表达的 P2X3,最大内向电流均在 1000 nA 左右,即 nA 级别内向电流^[14]。相应的,激活 DRG 中小神经元上的 TRPV1,即使不使用最大剂量,也可以轻易获得 pA 级别的电流^[15]。在电流钳模式下,以中间浓度激活 P2X3 获得 3 次动作电位^[16],而激活 TRPV1 可以获得 7 次动作电位^[17]。即使考虑注射药物剂量和浓度的差异,TRPV1 也可以诱导远超过 P2X3 的外周神经兴奋。因此,课题组认为,虽然 P2X3 可以促进 TRPV1 的表达,但激活正常表达水平的 TRPV1 已可诱导出外周神经的最大兴奋性。虽然 TRPV1 的表达量明显增加,但外周神经的兴奋性已饱和,因此无法观察到自发疼痛的明显增强。而 P2X3 则正好相反,激活正常表达量的 P2X3 尚不足以诱导外周神经兴奋性饱和。因此,自发痛行为随着 P2X3 表达的增多发生变化。至今,尚未有研究系统比较

两者激活后对神经元兴奋性的影响,课题组将会继续进行深入的研究。

本研究还发现,即使选择高度特异性的抑制剂,capsazepine 和 TNP-ATP 能部分抑制 P2X3 和 TRPV1 诱导的疼痛。这种作用可能源于两种抑制剂通过对相应受体功能的抑制降低了外周神经的整体兴奋性。也可能是两种受体之间存在一定的相互关系,因而表现出这种特异性抑制剂的非特异性抑制作用。课题组通过免疫沉淀证实,两种受体在分子水平存在一定的相互结合作用,提示两者可能在功能水平存在交互作用,但需要更直接的证据。

综上所述,本研究发现在外周神经元水平,TRPV1 和 P2X3 之间存在一定的相互作用。两者可以相互促进对方的表达。当其中一方受到抑制时,另一方的功能也会相应的降低。以上结果提示,在疼痛,特别是慢性痛的产生和维持过程中,外周神经元水平的相关受体可能存在相互作用。本研究结果,为进一步研究外周神经在疼痛的作用提供了一种新的角度。

参 考 文 献(References)

- [1] 刘靖芷. 背根神经节参与疼痛机制研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2018, 18(10):705-708.
Liu JZ. Progress of dorsal root ganglia in mechanism of pain [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg, 2018, 18(10):705-708.
- [2] Hermes SM, Andresen MC, Aicher SA. Localization of TRPV1 and P2X3 in unmyelinated and myelinated vagal afferents in the rat [J]. J Chem Neuroanat. 2016, 72:1-7.
- [3] 俞婕, 杜俊英, 方剑乔. P2X3 与 TRPV1 在疼痛机制中的相互作用 [J]. 医学研究生学报, 2016, 29(8): 868-871.
Yu J, Du JY, Fang JQ. Interaction between P2X3 and TRPV1 in the mechanism of pain [J]. J Med Postgrad, 2016, 29(8): 868-871.
- [4] Stanchev D, Blosa M, Milius D, et al. Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X3 receptors [J]. Pain, 2009, 143(1): 26-36.
- [5] Piper AS, Docherty RJ. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons [J]. J Physiol, 2000, 523(3): 685-696.

- [6] Vilotti S, Marchenkova A, Ntamati N, et al. B-type natriuretic peptide-induced delayed modulation of TRPV1 and P2X3 receptors of mouse trigeminal sensory neurons [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81138.
- [7] Fabbretti E. ATP-gated P2X3 receptors are specialised sensors of the extracellular environment [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1051:7-16.
- [8] Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice[J]. Mol Pain, 2010, 6:15.
- [9] Pei L, Chen H, Guo J, et al. Effect of acupuncture and its influence on visceral hypersensitivity in IBS-D patients: Study protocol for a randomized controlled trial [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(21): e10877.
- [10] Adamante G, de Almeida AS, Rigo FK, et al. Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice [J]. Life Sci, 2019, 216: 215-226.
- [11] 寿升芸, 魏骏骏, 何晓芬, 等. 低频电针对 2 型糖尿病神经痛大鼠 DRG P2X3 受体的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1):54-59.
Shou SY, Wei JJ, He XF, et al. Inhibitory effect of low frequency electroacupuncture on the P2X3 receptor in dorsal root ganglion of rats suffering from type II diabetic neuropathic pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 54-59.
- [12] Berta T, Qadri Y, Tan PH, et al. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain [J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(7): 695-703.
- [13] Bernier LP, Ase AR, Séguéla P. P2X receptor channels in chronic pain pathways [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(12): 2219-2230.
- [14] Li M, Silberberg SD, Swartz KJ. Subtype-specific control of P2X receptor channel signaling by ATP and Mg²⁺ [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(36): E3455-3463.
- [15] Pabbidi MR, Premkumar LS. Role of transient receptor potential channels Trpv1 and Trpm8 in diabetic peripheral neuropathy [J]. J Diabetes Treat, 2017, 2017(4). pii: 029.
- [16] Serrano A, Mo G, Grant R, et al. Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons [J]. J Neurosci, 2012, 32(34): 11890-11896.
- [17] Moraes ER, Kushmerick C, Naves LA. Characteristics of dorsal root ganglia neurons sensitive to substance P [J]. Mol Pain, 2014, 10: 73.

[收稿日期] 2019-01-15

常秋荣,刘丽丽,王会阳,等. 利用 CRISPR-Cas9 敲除 *Tyr* 基因制作白化 C57BL/6N 小鼠[J].中国实验动物学报, 2019,27(4): 493 - 500.

Chang QR, Liu LL, Wang HY, et al. Knockout of *Tyr* gene by CRISPR-Cas9 to produce albino C57BL/6N mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):493 - 500.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.011

利用 CRISPR-Cas9 敲除 *Tyr* 基因制作 白化 C57BL/6N 小鼠

常秋荣¹,刘丽丽¹,王会阳¹,付丽¹,邢凤英¹,李垚¹,陈学进^{1*},李善刚^{1,2*}

(1. 上海交通大学医学院实验动物科学部,上海 200025; 2. 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 为了获得白化的 C57BL/6N 小鼠,扩大其在皮肤移植和胚胎干细胞方面研究中的应用。方法 通过体外设计合成 Cas9 mRNA 和系列 sgRNA (single guide RNAs),注射到小鼠的受精卵内,破坏合成 C57BL/6N 小鼠黑色素生成必须的酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 基因序列的第 1 和第 2 外显子,产生基因突变,获得 F0 代白化的 C57BL/6N 小鼠,然后经过重复回交和自交,形成白化 C57BL/6N 小鼠近交系。结果 经过注射两对 sgRNA,成功的获得了 F0 代的白化小鼠,在 *Tyr* 基因的第 1 和第 2 外显子中均发生了缺失突变,小鼠可以将突变基因传递给后代,并在其后代中产生了纯合的白色 C57BL/6N 小鼠,最后对白化小鼠突变类型进行了分析。结论 通过 CRISPR-Cas9 技术破坏了小鼠 *Tyr* 基因,成功地建立了白化 C57BL/6N 小鼠近交系,为将来的嵌合体制作、组织移植提供了新的研究工具。

【关键词】 白化;*Tyr*;基因敲除;CRISPR-Cas9;C57BL/6N;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0493-08

Knockout of *Tyr* gene by CRISPR-Cas9 to produce albino C57BL/6N mice

CHANG Qiurong¹, LIU Lili¹, WANG Huiyang¹, FU Li¹, XING Fengying¹, LI Yao¹, CHEN Xuejin^{1*},
LI Shangang^{1,2*}

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China.

2. Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500)

Corresponding author: CHEN Xuejin. E-mail: chenxuejin@shsmu.edu.cn; LI Shangang. E-mail: lis101@163.com

【Abstract】 **Objective** To obtain albino C57BL/6N mice and expand their application in research of skin transplantation and embryonic stem cells. **Methods** Cas9 mRNA and a series of single guide RNAs (sgRNAs) were synthesized in vitro and injected into the fertilized eggs of C57BL/6N mice. The gene encoding tyrosinase (TYR), an enzyme necessary for melanin production in C57BL/6N mice, was destroyed in exon 1 and exon 2, and gene mutations were generated to obtain albino F0 generation. Albino C57BL/6N mice were then subjected to repeated backcrossing and inbreeding to produce C57BL/6N albino mouse inbreds. **Results** Two pairs of sgRNA were injected into mice, and the F0 generation of albino mice was successfully obtained. Deletions in both exon 1 and exon 2 of the *Tyr* gene were confirmed.

【基金项目】国家重点研发计划(2016YFC1304805);上海市科研计划项目(15140901700)。

Funded by National Key Research and Development Program of China (2016YFC1304805) and Shanghai Natural Science Fund (15140901700).

【作者简介】常秋荣(1993—)女,硕士研究生,研究方向:发育生物学。Email:cqrchang@163.com

【通信作者】陈学进(1960—)男,教授,博士生导师。Email:chenxuejin@shsmu.edu.cn;

李善刚(1970—)男,教授,硕士生导师。Email:lis101@163.com

* 共同通信作者

The albino mice transmitted the mutant gene to offsprings, and homozygous white C57BL/6N mice as offspring were confirmed. The mutation types of albino mice were analyzed. **Conclusions** The mouse *Tyr* gene is disrupted by CRISPR-Cas9 technology, and the C57BL/6N albino mouse inbred line is successfully established. This mouse line provides a new research tool for future chimera preparation and tissue transplantation.

[Keywords] Albino; *Tyr*; gene knockout; CRISPR-Cas9; C57BL/6N; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

C57BL/6N 小鼠是由 Little 于 1921 年建立的近交系之一。该近交系以补体活性高,各种肿瘤自发率比较低为主要特点^[1],在国内外得到了广泛应用,C57BL/6J 小鼠也是继人类之后第二个完成基因组测序的哺乳动物种类。我们国家被全部授权引进的是 C57BL/6N 小鼠,可以自主进行基因修饰。由于 C57BL/6N 的毛色为黑色,单一的毛色品种限制了 C57BL/6N 在基因敲除和皮肤组织移植等方面研究中的广泛应用。传统的基因敲除小鼠多数具有 129 的背景,而在大量的医学科学研究中,C57BL/6N 小鼠是常用的品系之一。这就产生了一个问题,生产的小鼠需要与 C57BL/6N 小鼠连续的进行回交 7~8 代,才能将小鼠变为 C57BL/6N 背景。为了克服这个困难,国内外有不少的实验室尝试建立了来源于 C57BL/6N 的胚胎干细胞^[2-3],但是这种 C57BL/6N 来源胚胎干细胞并没有大量的应用。其主要原因是 C57BL/6N 的毛色为黑色,而嵌合体试验中的受体小鼠分别是毛色为白色的 BALB/c 和 ICR,不同品系的差别降低了嵌合的效率。如果能用拥有白毛色的 C57BL/6N 作为嵌合受体,将会对提高嵌合率有帮助,也能够节省回交的时间和费用。

经典的基因打靶动物模型制作是建立在基因重组技术和大量细胞筛选的基础上,而最近几年出现的 ZFN (zinc-finger nucleases, ZFNs)^[4-5]、TALEN (TALE nucleases, TALENs)^[6-7] 和 CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 技术则为广泛的开展基因修饰制作人类重大疾病模型提供了新的选择^[8]。CRISPR-Cas9 技术通过向导 RNA (sgRNA, single guide RNA) 与基因组位点之间 20 bp 碱基的配对,再引导 Cas9 蛋白实现 DNA 切割,切断 DNA 链,然后经过细胞内在的 DNA 连接修复功能恢复双链,在这个过程中发生不同数目碱基的缺失或者插入,从而造成 DNA 编码的移码突变。由于 sgRNA 的设计简便,使得 CRISPR-Cas9 技术在近几年风靡一时。目前该技术已经在小鼠^[9-10]、大鼠^[11]、兔^[12]和猴^[13]等物种上成功获得

了突变动物,并且能够实现大片段外源基因敲入^[9]和定点突变^[14]。如在小鼠上,赵勇等利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建了 miRNA-29b1 基因敲除小鼠^[15]。在大鼠上,马云武等利用 CRISPR-Cas9 技术敲除胰岛素受体底物 1 (*Irs1*) 基因,得到稳定遗传的 *Irs1* 基因敲除大鼠^[16]。

酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 是黑色素生成的关键酶,有学者通过实时荧光定量 PCR 的方法揭示了 *Tyr* 基因在黑线仓鼠皮肤组织中的 mRNA 表达水平是其白化突变系的 2.5 倍,白化突变系 *Tyr* 基因表达量的降低,促使黑色素细胞合成与沉积的黑色素减少,进而导致白化毛色表型^[17]。通过破坏 *Tyr* 基因可以获得白化的动物。目前已经有日本学者在 C57BL/6J 小鼠上开展了 *Tyr* 基因序列点突变获得白化的 C57BL/6J 小鼠的研究^[18]。为了适应国内大量基于 C57BL/6N 小鼠的研究应用,本课题基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,以 C57BL/6N 小鼠为研究对象,通过破坏 C57BL/6N 小鼠 *Tyr* 的基因序列,获得白化的 C57BL/6N 小鼠,然后经过重复回交和自交,形成 C57BL/6N 白化小鼠近交系。为以 C57BL/6N 为基础的胚胎干细胞的应用和组织工程提供更加丰富的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6N 小鼠 6 只,饲养一周后使用;雄性 C57BL/6N 小鼠 6 只,在 8~20 周龄使用;ICR 雄鼠 10 只,结扎两周后使用;ICR 雌鼠 10 只体重在 25~35 g 之间用做胚胎移植受体。实验小鼠均购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】。上述小鼠及后代饲养在上海交通大学医学院实验动物科学部屏障环境内【SYXK(沪)2013-0050】。小鼠的麻醉、结扎、胚胎移植和取样检测均按照上海交通大学医学院实验动物管理委员会批准程序进行 (IACUC No. A-2015-002)。

1.1.2 实验试剂

胚胎操作液 M2 (Sigma, 美国); 透明质酸酶 (Sigma, 美国); 胚胎培养基 KSOM (Millipore, 德国); 孕马血清 (PMSG) 和绒毛膜促性腺激素 (HCG) 购自宁波三生药业, 分别溶于 4℃ 生理盐水, -20℃ 保存; 小鼠麻醉剂由 8 mL 生理盐水添加 2 mL 0.05 g/mL 氯胺酮 (福建古田药业, 批号 1507294) 和 16 mg xylazine (Sigma, 美国) 组成; 石蜡油 (Sigma, 美国); pT7-cas9 vector 和 pCD-CAS 购自百奥生物技术有限公司; Cas9-mRNA 体外转录试剂盒 mMACHINE T7 Ultra Transcription Kit 和 sgRNA 合成试剂盒 MEGAscript T7 high yield Transcription Kit 购自 Invitrogen 公司; 限制性核酸内切酶 *Xba* I, Premix Taq Hot start 购自 Takara 生物公司; 引物合成由 Invitrogen 公司合成; DNA 测序由上海铂尚生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 Cas9-mRNA 的体外合成

利用 pT7-cas9 质粒中 *cas9* 基因后存在的 *Xba* I 单一酶切位点, 酶切使其线性化, 在 50 μL 的酶切反应体系加入 5 μL 10×T Buffer (Takara), 5 μL 10×BSA, 2.5 μL *Xba* I, 10 μg pT7-cas9 质粒。37℃ 水浴反应 3 h 后, 通过异丙醇沉淀方法回收线性化的 pT7-cas9 质粒, 经生物分光光度计测定浓度, 调整浓度范围在 500~1000 ng/μL 为宜, 取出 2 μg 用于体外合成。

参照 mMACHINE T7 Ultra Transcription Kit 的使用说明, 在体外转录合成 Cas9-mRNA, 在室温下配置反应体系混匀后, 在 PCR 仪中 37℃ 反应 2 h。向反应体系中加入 1 μL TURBO DNase, 37℃ 反应 15 min 以去除 DNA 模板。然后对

Cas9-mRNA 添加 Poly(A) 尾, 在 PCR 仪中 37℃ 反应 45 min, 反应结束后将产物放置在冰上。采用 LiCl 沉淀法, 回收 Cas9-mRNA, 加入 40 μL RNase-free H₂O 稀释, 按照 1 μg/管分装至 RNase-free 的 PCR 管中, 放入 -80℃ 保存备用。

1.2.2 sgRNA 的体外合成

利用从 Invitrogen 公司合成的引物 P-sgF0F 和 T7R1, 以 pCD-CAS 质粒为模板, 经 PCR 反应合成 sgF0。PCR 程序为 60℃ 退火 30 s, 53℃ 退火 30 s, 产物经异丙醇回收后获得 sgF0 模板序列。根据张锋实验室在线设计程序, 针对 *Tyr* 基因的 Exon1 和 Exon2 的序列, 设计两对 sgRNA (sgTYR1F/sgTYR1R/sgTYR2F/sgTYR2R) (见表 1), 将设计好的 *Tyr* 基因 sgRNA 的四个引物分别与反向引物 T7R1 混合, 以 sgF0 为模板进行一次 PCR 反应 (60℃ 退火 30 s), 再以该产物为模板, 以引物 T7primer 和 T7R1 进行二次 PCR 反应 (61℃ 退火 30 s, 45℃ 退火 30 s), 采用异丙醇回收 DNA 的方法纯化二次 PCR 产物, 用做体外转录 sgRNA 的模板。将一次 PCR 和二次 PCR 扩增产物取出 5 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 预计长度为 120 bp 左右。该产物用于 sgRNA 的体外合成。

按照 Invitrogen 公司 MEGAscript T7 high yield Transcription Kit 说明书的操作, 进行体外 sgRNA 合成, 在 PCR 仪中, 37℃ 反应 16 h。根据 MEGAclean-96 Purification of Transcription Reactions in 96 well format 试剂盒的操作指导, 完成 sgRNA 回收, 回收产物加入 RNase-free 的 PCR 管中, 使用生物分光光度计测定浓度后, 按照 1 μg/管的使用标准将其分装至 RNase-free 的 PCR 管中, 放入 -80℃ 保存。

表 1 sgRNA 合成相关引物及基因型鉴定引物

Table 1 Primers related to sgRNA synthesis and genotype identification

| 引物名称 Primer names | 引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3') |
|----------------------|--|
| sgTYR1F | TTAATACGACTCACTATAGTGGATGACCGTGAGTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC |
| sgTYR1R | TTAATACGACTCACTATAGGTCTCCACCCCTTTGAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC |
| sgTYR2F | TTAATACGACTCACTATAGGACCACTATTACGTAATCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC |
| sgTYR2R | TTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATTACGTAATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC |
| JDTYR1F | CCTGCCAGGATATCCTTCTGTCCA |
| JDTYR1R | TTCTAATCAAGACTCGCTTCTCTG |
| JDTYR2F | TGCAATTTCAACATCTTTCTCTTG |
| JDTYR2R | AAATTGGCAGTTCTATCCATTGAT |
| T7R1 | AAAAGCACC GACTCGTGCCA |
| T7Primer | GAAATTAATACGACTCACTATA |
| P-sgF0F | GTTTTAGAGCTAGAAATAGC |

1.2.3 小鼠受精卵的获得

每只 C57BL/6N 雌小鼠腹腔注射 5 U 的 PMSG (下午 1~2 点), 46~48 h 后注射 10 U 的 HCG, 与雄小鼠合笼, 第 2 天将有阴道栓的小鼠颈椎脱臼法处死, 取出输卵管。在体式显微镜下用 1 mL 注射器针尖划破输卵管壶腹部, 释放细胞团, 放入含有 0.3% 透明质酸酶的 M2 培养液中, 3 min 后用玻璃吸管收集原核明显和有第二极体的受精卵, 移到覆盖石蜡油的 KSOM 培养液滴中。

1.2.4 小鼠受精卵的显微注射

将 Cas9-mRNA 和四种 sgRNA 按照 20 ng/ μ L 和 40 ng/ μ L 的使用浓度进行混合, 混匀后在 10 cm 培养皿盖子上做成微滴, 同时用添加 0.2% PVA 的 M2 做成 30 μ L 的操作滴。用 P97 (Sutter, 美国) 拉针仪拉制注射针, 在锻针仪上断成约 2 μ m 粗细大小的开口, 向注射针中注入 0.5 cm 左右的水银, 然后装在配有 Piezo 的显微操作仪上, 吸入 Cas9-mRNA 和 sgRNA 混合液。用持卵针将受精卵固定住, 用注射针打破透明带, 沿赤道面水平插入细胞质 2/3 的位置, 使用低的脉冲打破细胞膜, 轻微旋动注射针手柄, 使大约 5 pL 的 Cas9-mRNA 和 sgRNA 的混合液进入到受精卵胞质中。注射后的胚胎移入 KSOM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱中培养过夜。

1.2.5 注射后受精卵的胚胎移植

选自然发情的 ICR 雌鼠与结扎公鼠交配, 以见到阴道栓的作为受体鼠, 麻醉后进行胚胎移植。受精卵注射后 24 h, 选择发育到 2 细胞的胚胎进行胚胎移植。将内径 130 μ m, 经过抛光的移胚针装在显微注射器的针杆前端, 拧动螺旋, 按照顺序吸入第一个气泡, 胚胎和第二个气泡, 然后在输卵管上用 1 mL 注射器针尖扎一个小口, 将移胚针自小口处插入输卵管, 拧动螺旋将玻璃管中的胚胎和气泡注入输卵管膨大部, 以在膨大部看到气泡为移植成功。

1.2.6 新生小鼠和 F1 代小鼠的基因型鉴定

对所有新生的小鼠在一周时进行剪脚趾编号, 剪下的脚趾作为样品分别放入离心管, 加入 100 μ L 的 50 mmol/L NaOH 溶液, 98 $^{\circ}$ C 加热 30 min, 然后加入 10 μ L 浓度为 1 mol/L 的 Tris-HCl (pH=7.5), 混匀后作为 DNA 模板。根据靶基因所在位点向上下延伸 200 bp 左右, 利用 Premier 5 分别设计出两对鉴定引物 JD TYR1F/JD TYR1R 和 JD TYR 2F/JD TYR2R (见表 1)。小鼠基因组 DNA 为模板, 进行

PCR 反应扩增目的条带。针对 Exon1 的鉴定引物是 JD TYR1F/JD TYR1R (60.1 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 54.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s), 目的片段 201 bp; 针对 Exon2 的鉴定引物是 JD TYR2F/JD TYR2R (52.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s), 目的片段 258 bp。跨内含子 PCR 扩增引物是 JD TYR1F/JD TYR2R (54.5 $^{\circ}$ C 退火 30 s)。

将扩增产物取 5 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 部分产物送上海铂尚测序公司进行测序分析。

1.2.7 白化 C57BL/6N 小鼠的繁殖和种系维持

将 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6N 交配获得 F1 代小鼠; 对 F1 代的小鼠采取自交的方法, 获得 F2 代小鼠。F2 代小鼠有黑色和白色 (*Tyr*^{-/-}) 两种, 只将白的小鼠留种, 与野生型的 C57BL/6N 进行交配获得 F3 代杂合子。F3 代的黑鼠进行自交获得 F4 代, F4 代的黑鼠继续与野生型的 C57BL/6N 回交。如此周而复始直至回交 4 次后, 采用白色 C57BL/6N 进行自交繁殖以维持种系。

1.2.8 白化 C57BL/6N 小鼠的下颌骨测定

取 3 只白化 C57BL/6N 小鼠和 4 只野生型 C57BL/6N 小鼠, 分别颈椎脱臼法处死, 剪开皮肤取头骨至沸水中煮 2~3 min 后剃下右侧下颌骨, 用 2% NaOH 加热至 80~90 $^{\circ}$ C 持续 10 min 以去除下颌骨残肉并拔掉门齿, 洗净并室温干燥后^[19], 用扫描仪 (Epson, 日本) 进行扫描。对扫描图像进行重合 (Merge) 分析。

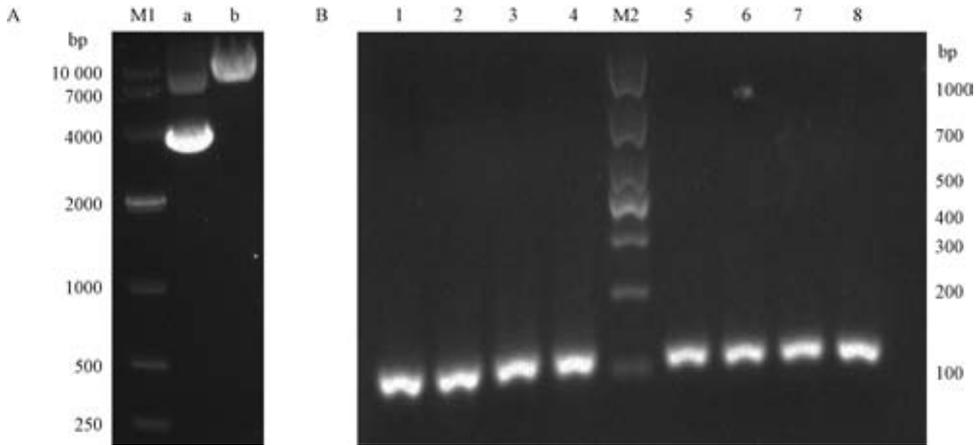
2 结果

2.1 Cas9 mRNA 和 sgRNA 的合成

pT7-Cas9 质粒经过 *Xba* I 单酶切后 (见图 1A), 将该质粒进行转录, 获得 Cas9 mRNA, 并测定其浓度为 1479 ng/ μ L。利用异丙醇回收的 sgF0 片段为模板, 经过两步 PCR 反应后获得 sgRNA 的转录模板, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析后, 得到长度约为 120 bp 的单一一条带 (见图 1B), 用作 sgRNA 的转录模板。经过转录后, 获得浓度分别为 3234、3225、3793、4455 ng/ μ L 的四个 sgRNA。

2.2 F0 代小鼠的获得和鉴定

通过显微注射的方式, 将使用浓度为 20 ng/ μ L 的 Cas9-mRNA 和使用浓度均为 10 ng/ μ L 的 sgTYR1F, sgTYR1R, sgTYR2F 和 sgTYR2R 混匀后, 将 Cas9-sgRNA 的混合液注射入原核期受精卵的胞质中。第 2 天将 35 枚发育至 2 细胞的经过基因编辑的胚胎通过胚胎移植技术移植入两只代孕受体



注:A. M1:DL10 000 DNA Marker;a: pT7-Cas9 质粒;b: *Xba*I 酶切 pT7-Cas9 质粒;B. 1-4:一次 PCR 扩增产物; M2:DL1000 DNA Marker;5-8:二次 PCR 扩增产物。

图 1 线性化的 pT7-Cas9 质粒及体外转录 sgRNA 的模板

Note. A. M1, DL10 000 DNA marker. a, pT7-Cas9 vector. b, pT7-Cas9 vector was cut by *Xba*I. B. 1-4: Products of the first PCR. M2, DL 10 000 DNA marker. 5-8, Products of the second PCR.

Figure 1 Linearized pT7-Cas9 plasmid and templates of sgRNA transcription *in vitro*



注:A. F0 代小鼠;B. F1 代小鼠;C. F2 代小鼠;D. 白化 C57BL/6N 小鼠近交系。

图 2 *Tyr* 基因敲除小鼠后代

Note: A. Offspring of F0 generation. B. Offspring of F1 generation. C. Offspring of F2 generation. D. Albino C57BL/6N mouse inbred line.

Figure 2 Offsprings of the *Tyr* knockout mice

的两侧输卵管中,20 d 妊娠期结束后生产 2 只小鼠,其中一只为白色,一只为黑色(见图 2A)。

将两只小鼠的 DNA 经过 PCR 鉴定,2%琼脂糖凝胶电泳以后(见图 3A)发现,白色小鼠 Exon1 扩出了两条带,其中一条带明显短于目的条带;Exon2 扩增的带没有差异,跨内含子的引物没有扩增出明显

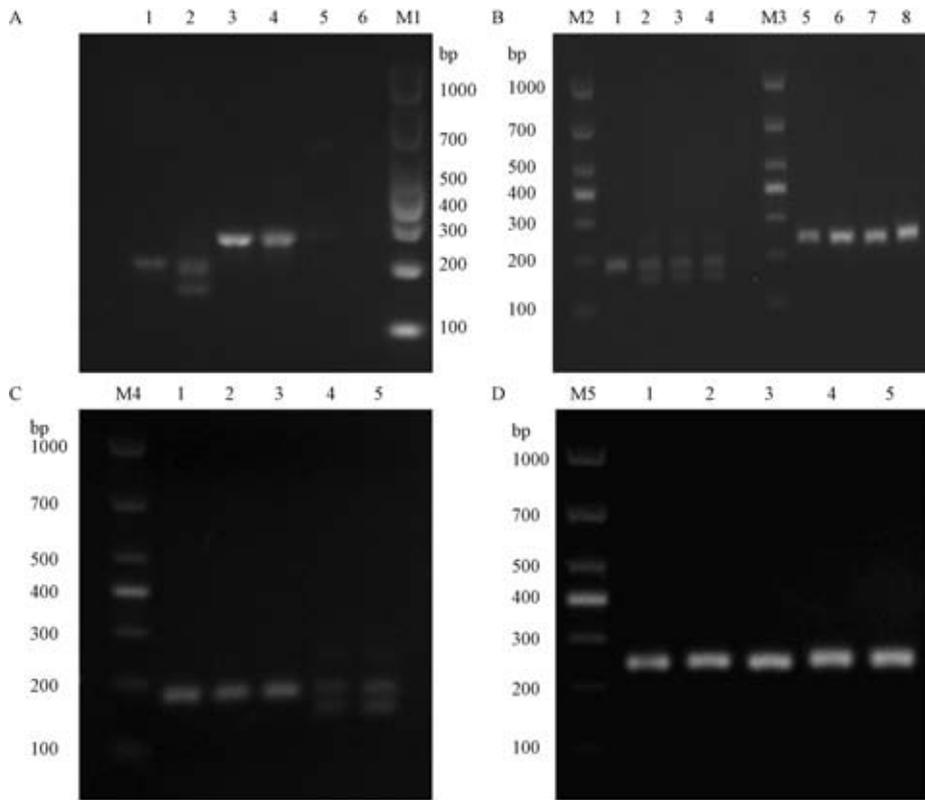
的带型。对 PCR 产物进行测序分析发现,白色小鼠的 Exon1 和 Exon2 都有移码突变,但是无法做具体分析。黑色 F0 代小鼠测序结果为野生型。

2.3 F1 代小鼠的获得和鉴定

将 F0 代白色小鼠和野生型小鼠交配,获得 4 只 F1 代小鼠(见图 2B),针对 Exon1 的 PCR 检测结果

显示1号小鼠和2,3,4号小鼠基因型不同(见图3B),1号小鼠扩出1条带,2,3,4号小鼠均扩出2

条带;针对 Exon2 的 PCR 检测结果显示 1,2,3,4 号小鼠基因带型相同(见图 3B)。



注:A, 1;F0代黑色小鼠 Exon1 PCR 扩增产物;2;F0代白色小鼠 Exon1 PCR 扩增产物;3;F0代黑色小鼠 Exon2 PCR 扩增产物;4;F0代白色小鼠 Exon2 PCR 扩增产物;5;F0代黑色小鼠跨内含子 PCR 扩增产物;6;F0代白色小鼠跨内含子 PCR 扩增产物;M1:DL1000 DNA Marker。B, M2;DL1000 DNA Marker;1-4;4只F1代黑色小鼠 Exon1 PCR 扩增产物;M3;DL1000 DNA Marker;5-8;4只F1代黑色小鼠 Exon2 PCR 扩增产物。C, M4;DL1000 DNA Marker;1-5;5只纯合代白色小鼠 Exon1 PCR 扩增产物。D, M5;DL1000 DNA Marker;1-5;5只纯合代白色小鼠 Exon2 PCR 扩增产物;

图3 F0代、F1代、纯合后代的 Exon1 和 Exon2 PCR 结果

Note. A, 1. Exon1 PCR product of black F0 generation. 2. Exon1 PCR product of white F0 generation. 3. Exon2 PCR product of black F0 generation. 4. Exon2 PCR product of white F0 generation. 5. Transintron PCR product of black F0 generation. 6. Transintron PCR product of white F0 generation. M1: DL1000 DNA marker. B, M2: DL1000 DNA marker. 1-4, Exon1 PCR products of four black offsprings of F1 generation. M3: DL1000 DNA marker. 5-8, Exon2 PCR products of four black offsprings of F1 generation. C, M4: DL1000 DNA marker. 1-5, Exon1 PCR products of five white offsprings of homozygous generation. D, M5: DL1000 DNA marker. 1-5, Exon2 PCR products of five white offsprings of homozygous generation.

Figure 3 PCR products of Exon1 and Exon2 between F0, F1 and homozygous generations

2.4 F2代小鼠的获得和持续回交

利用F1代的3号和4号小鼠交配获得了F2代(见图2C),选择F2代中的白色小鼠与野生型黑色C57BL/6N进行回交。目前已经回交4次,现在维持白化C57BL/6N小鼠近交系(见图2D)。采用全同胞兄妹交配方式维持。将白化后代的PCR产物(见图3C&D)切胶后送测序经Blast比对后发现,白色小鼠在Exon1有两种突变类型,分别缺失45bp和14bp,Exon2也有两种突变类型,分别缺失7bp

和3bp,通过纯合类型的分析发现其中E1-45和E2-3在同一条染色体上,E1-14和E2-7在同一条染色体上(见图4)。

2.5 白化C57BL/6N小鼠的下颌骨测定

通过对3只白化C57BL/6N小鼠与4只野生型C57BL/6N小鼠下颌骨扫描图像的重合比较,我们发现白化C57BL/6N小鼠的下颌骨与野生型C57BL/6N小鼠的下颌骨非常一致(见图5)。没有明显的变异发生。



注:红色字母表示 PAM,绿色字母表示 sgRNA 位点。

图 4 sgRNA 位点和纯合子小鼠的基因突变形式

Note. The red letters indicate PAM and the green letters indicate sgRNA sites.

Figure 4 sgRNA sites and mutant forms of the homozygous mice

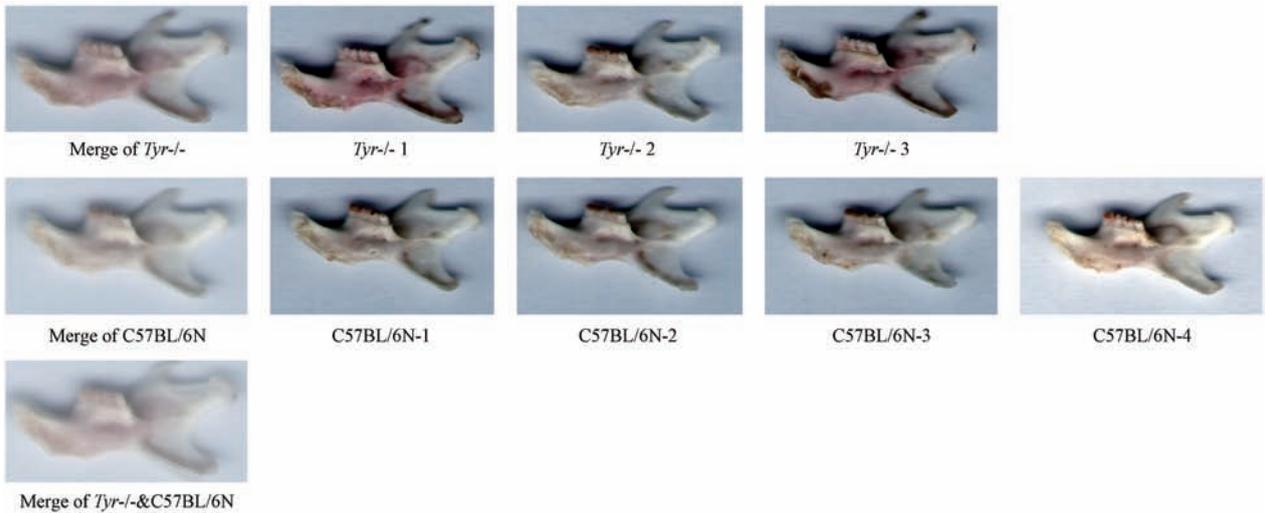


图 5 白化 C57BL/6N 小鼠与野生型 C57BL/6N 小鼠下颌骨扫描图像比较

Figure 5 Comparison of the mandibular scan images between albino C57BL/6N and wild-type C57BL/6N mice

3 结论

本研究设计了两对 sgRNA, 针对小鼠 *Tyr* 基因的两个外显子进行敲除, 通过一次胚胎注射实验, 移植两只受体就获得了白化的 C57BL/6N 小鼠, 产生突变的效率约 50%, 和 CRISPR-Cas9 在其他物种上的基因敲除结果类似^[11-12], 而且该小鼠具有繁殖能力, 顺利地产生了后代, 这也说明 CRISPR-Cas9 技术的简便高效。

在试验中简化了实验方法, 将通过引物退火后插入到酶切后的质粒中获得 sgRNA 表达载体的方法改为通过两次 PCR 的方式直接扩增 sgRNA 体外合成的模板, 这样可以将质粒构建, 抽提, 测序验证

的步骤省略, 可以节约 3~5 d 的时间和一部分实验费用。这对规模化利用 CRISPR-Cas9 技术制作小鼠模型很有帮助。

在小鼠胚胎移植的过程中, 我们在输卵管靠近膨大部移植的方法基础上做了进一步改进^[20], 将移胚针装在显微注射器上使用, 由于显微注射器操作灵敏, 可以轻松的吸入微小的气泡, 并且将移植胚胎紧密排列在移胚针内。吹入输卵管膨大部的液体较少, 而且通过油压传动和螺旋推动, 可以轻松克服输卵管内的液体压力, 保证移植的成功率。

CRISPR-Cas9 技术的一个缺点是脱靶效应, 这主要是由于基因功能序列的相似性和模糊识别造成的。所以说 CRISPR-Cas9 技术在基因突变方面

有很大的优势,但是还不能完全替代传统的 ES 细胞打靶技术。为了克服潜在的脱靶,我们对白化 C57BL/6N 小鼠的后代进行了连续的回交。下颌骨测定的结果显示白化 C57BL/6N 小鼠与野生型 C57BL/6N 小鼠没有区别。

在实验过程我们发现注射后的胚胎发育到期率比较低,这可能与注射的 sgRNA 数量较多有关,而且两个外显子同时敲除也给鉴定带来了麻烦。所以针对一个外显子设计 1~2 条 sgRNA 或许是一个好的思路,这样可以减少变异类型,方便获得基因突变小鼠后的基因型鉴定。

本研究通过 CRISPR-Cas9 技术敲除小鼠 *Tyr* 基因,成功建立了 C57BL/6N 白化小鼠近交系,为将来的嵌合体制作、组织移植提供了新的工具,本小鼠种系可以无偿提供给有需求的研究者。

参 考 文 献(References)

- [1] 胡建华,姚明,崔淑芳. 实验动物学教程[M]. 上海:上海科学技术出版社. 2009, p.55-56.
Hu JH, Yao M, Cui SF. Experimental Zoology Course [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2009: 55-56.
- [2] 颜桂军,顾正,罗金平,等. 具生殖系嵌合能力的 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞系的建立 [J]. 生殖与避孕, 2004, 26(6): 321-323.
Yan GY, Gu Z, Luo JP, et al. Establishment of a germ-line transmission using C57BL/6J embryonic stem cell lines [J]. Reprod Contracept, 2004, 26(6): 321-323.
- [3] Ledermann B, Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line [J]. Exp Cell Res, 1991, 197(2): 254-258.
- [4] Santiago Y, Chan E, Liu PQ, et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(15): 5809-5814.
- [5] Osiak A, Radecke F, Guhl E, et al. Selection-independent generation of gene knockout mouse embryonic stem cells using zinc-finger nucleases [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28911.
- [6] Hatters DM, Peters-Libeu K, Weisgraber AH. Apolipoprotein E structure; insights into function [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(8): 445-454.
- [7] Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(2): 238-251.
- [8] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. Cell Stem Cell, 2013, 13(6): 659-662.
- [9] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. Cell, 2013, 154(6): 1370-1379.
- [10] Park BM, Roh JI, Lee J, et al. Generation of knockout mouse models of cyclin-dependent kinase inhibitors by engineered nuclease-mediated genome editing [J]. Lab Anim Res, 2018, 34(4): 264-269.
- [11] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 681-683.
- [12] Yan Q, Zhang Q, Yang H, et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system [J]. Cell Regen (Lond), 2014, 3(1): 12.
- [13] Niu YY, Bin S, Cui YQ, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. Cell, 2014, 156(4): 836-843.
- [14] Jiang WH, Liu LL, Chang QR, et al. Production of Wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1332.
- [15] 赵勇, 师长宏, 赵亚, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 miRNA-29b1 基因敲除小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 1-4.
Zhao Y, Shi CH, Zhao Y, et al. Construction of miRNA-29b1 knockout mice base on CRISPR/Cas9 technology [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(12): 1-4.
- [16] 马云武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1 (*Irs1*) 基因 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3): 55-60.
Ma YW, Ma J, Lu YD, et al. Generating insulin receptor substrate 1 (*Irs1*) knockout rat using CRISPR/Cas9 [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(3): 55-60.
- [17] 赵彦斌, 孙兆增, 白杰英, 等. 黑线仓鼠及其白化突变系 TYR、TYRP1 的基因表达水平比较分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 1-4.
Zhao YB, Sun ZZ, Bai JY, et al. Comparison of gene expression levels of TYR, TYRP1 gene in *Cricetulus barabensis* and the albino mutant [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(7): 1-4.
- [18] Mizuno S, Dinh TT, Kato K, et al. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system [J]. Mamm Genome, 2014, 25(7-8): 327-334.
- [19] 陈天培, 朱福龄, 杨惠玲. 用下颌骨形态分析法进行小鼠遗传监测的初步研究 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 1983, 3(3): 122-126.
Chen TP, Zhu FL, Yang HL. Preliminary study on genetic monitoring of mice by mandibular morphology analysis [J]. Shanghai Bull Anim Vet Sci, 1983, 3(3): 122-126.
- [20] 都同功, 陈系古, 俞生, 等. 一种胚胎移植新方法的建立 [J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(1): 6-8.
Du TG, Chen XG, Yu S, et al. A new approach of embryo transfer by oviduct [J]. Chin J Comp Med, 1999, 9(1): 6-8.

李彦霖,谭思然,何丽雯,等. 莫扎特 K448 奏鸣曲高频段声波对小鼠抑郁模型干预治疗的分析[J].中国实验动物学报, 2019, 27(4):501 - 507.

Li YL, Tan SR, He LW, et al. Treatment with the high frequency of Mozart K448 in a mouse model of depression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):501 - 507.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.012

莫扎特 K448 奏鸣曲高频段声波对小鼠抑郁模型 干预治疗的分析

李彦霖[#], 谭思然[#], 何丽雯, 曹科, 张倩, 谭冬梅, 谭毅^{*}

(重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016)

【摘要】 **目的** 建立 C57BL/6 小鼠抑郁模型, 初步探究莫扎特 K448 奏鸣曲中的高频段声波改善 C57BL/6 小鼠抑郁症状的效果。**方法** (1) 慢性应激模型的建立: 小鼠依据自主活动实验结果剔除活动次数差异较大者, 其余分为空白组 ($n=10$)、模型组 ($n=36$), 模型组经历 5 周慢性温和不可预知刺激 (chronic unpredictable and mild stress, CUMS), 建立小鼠抑郁模型。(2) 治疗干预: 造模成功后, 将模型组小鼠随机均衡分为模型对照组 ($n=12$)、氟西汀组 ($n=12$) 和音乐组 ($n=12$)。氟西汀组每天腹腔注射盐酸氟西汀溶液 (10 mg/kg), 其余两组注射等量的生理盐水。音乐组每天进行 2 h 高频音乐干预, 其余两组不进行音乐干预。干预持续 2 周。(3) 效果评价: 实验前 3 d 及实验中每周称量体重并记录, 实验第 1 周、第 5 周、第 7 周进行悬尾实验 (tail suspension test, TST) 和强迫游泳实验 (forced swimming test, FST)。第 7 周行为学实验结束后, 取小鼠脑组织制备匀浆, 通过酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 含量。**结果** (1) 成功构建 CUMS 小鼠模型。第 5 周模型组小鼠悬尾不动时间明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 强迫游泳不动时间增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。(2) 氟西汀组与模型对照组相比, 悬尾实验不动时间明显缩短, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 强迫游泳实验不动时间缩短, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 音乐组与模型对照组相比, 悬尾不动时间缩短, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 强迫游泳实验不动时间无明显改变, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。模型对照组与空白组小鼠相比, 脑组织匀浆中的 BDNF 含量明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 氟西汀组与模型对照组相比, 脑组织匀浆中的 BDNF 含量明显回升, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 但音乐组与模型对照组相比, 其差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 莫扎特 K448 奏鸣曲高频段声波可一定程度优化小鼠抑郁模型的治疗作用。

【关键词】 音乐; 频率; 抑郁模型; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0501-07

Treatment with the high frequency of Mozart K448 in a mouse model of depression

LI Yanlin[#], TAN Siran[#], HE Liwen, CAO Ke, ZHANG Qian, TAN Dongmei, TAN Yi^{*}

(Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Corresponding author: TAN Yi. E-mail: tanyee66@126.com

【Abstract】 **Objective** A C57BL/6 mouse chronic unpredictable mild stress model of depression was established to investigate the effect of high frequency sound waves in Mozart's K448 Sonata on depression. **Methods** Establishment of

【基金项目】 重庆市科委社会民生项目 (csts2017shmsA00007, cstc2017shms-zdyfX0048); 重庆医科大学大学生科学研究与创新实验项目 (201711)。

Funded by Social Welfare Project of Chongqing (csts2017shmsA00007, cstc2017shms-zdyfX0048), Scientific Research and Innovation Experiment Project of Chongqing Medical University (201711)。

【作者简介】 李彦霖 (1997—), 女, 本科生。Email: yanlinleek@163.com; 谭思然 (1994—), 女, 硕士生。Email: 962078353@qq.com
[#]共同第一作者

【通信作者】 谭毅 (1966—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物模型。Email: tanyee66@126.com

a chronic stress model; Mice were divided into a blank group ($n = 10$) lived with no stress and model group ($n = 36$) established 5 weeks of chronic mild and unpredictable stimulation (CUMS). Therapeutic intervention; The mice in the model group were randomly divided into the model control group ($n = 12$), fluoxetine group ($n = 12$), and music group ($n = 12$) after 5 weeks. Fluoxetine hydrochloride solution (10 mg/kg) was injected intraperitoneally every day in the fluoxetine group, and the other two groups were injected with the same amount of saline lasted 2 weeks. The music group received a 2-hour high frequency music intervention every day lasted 2 weeks, while the other two groups did not. Outcome variables; Weight was recorded 3 days before the experiment and every week during the experiment. Tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST) were performed in weeks 1, 5, and 7. At the end of week 7, mice were sacrificed and brain homogenates were prepared. BDNF levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** At week 5, in the TST, immobility times of the model group were significantly longer than that of the blank group ($P < 0.01$). In the FST, immobility times of the model group were longer than that of the blank group ($P < 0.05$). Compared with the model control group, both the fluoxetine group and music group exhibited a significantly shorter immobility time of tail suspension ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the blank group, the model control group had a significant lower BDNF content in brain homogenates ($P < 0.01$); compared with the model control group, the fluoxetine group had a significantly higher BDNF content ($P < 0.01$), and there was no significant difference in BDNF content between the music group and the model control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Mozart K448 Sonata high frequency sound waves may optimise the therapeutic effect on depression mice models.

【Keywords】 music; frequency; depression; mouse model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

抑郁症是情感、情绪表达和调节紊乱的一类精神疾病。我国现有 5775 万抑郁障碍患者,其中每年约 25 万人死于自杀^[1]。作为现代社会生活中一种普遍存在的情绪障碍,其特征是持续的情绪低落、兴趣减退、失去快感。患者自杀率显著增高、生活质量下降和社会功能降低,给社会造成巨大的疾病负担^[2]。抑郁症治疗的预期效果是使患者的躯体症状和精神障碍尽可能得到全面协调改善,这是所有现代抗抑郁药物的追求目标^[3]。然而,迄今为止,没有一种抗抑郁药能够覆盖临床的抑郁症状谱,且长期服用会造成一系列副作用。因此,抑郁症的预防和治疗手段的优化正成为我国医疗卫生工作的重点之一。国内外已有研究显示,音乐辅助药物治疗与单纯药物治疗相比或者二者结合起来,可能对抑郁症患者具有更好的疗效^[4]。

音乐构成要素复杂,不同频率音乐刺激对动物将会产生不同的生物效应^[5]。音乐频率对人体自主神经系统具有调节作用,研究表明高频段音乐和低频段音乐相比,高频段音乐缓解女大学生焦虑的效果更好^[6]。不同频率的音乐对动物影响也存在差异,高频音乐能提高断奶仔猪的日增重量及饲料转化率,低频音乐次之,中频音乐不明显^[5]。频率这一物理特性对于音乐刺激的效果存在进一步的研究价值。目前关于不同频率音乐对小鼠抑郁模型行为学影响的研究基本处于空白。本研究选取

莫扎特 K448 奏鸣曲进行音频处理,过滤保留高频段部分,初步探究其改善小鼠抑郁症状的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重 20~25 g,来源并饲养观察于重庆医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证和使用许可证分别是【SCXK(渝)2017-0001】、【SYXK(渝)2017-0023】。实验方案已获得重庆医科大学医学伦理委员会审批通过。

1.1.2 实验仪器及试剂

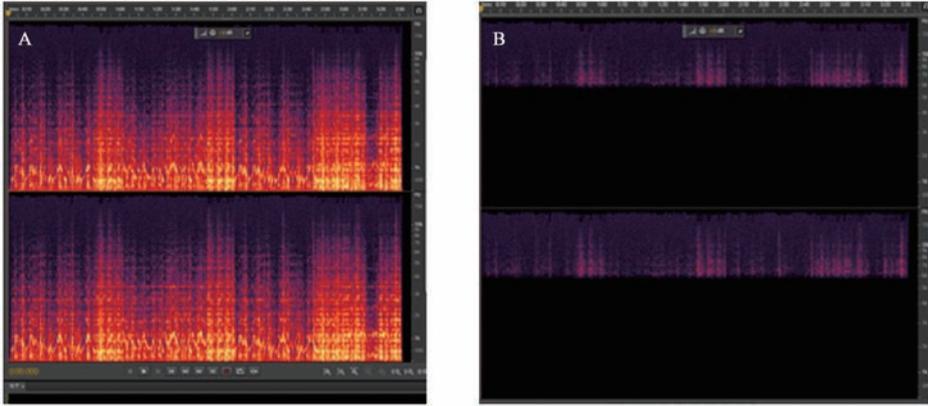
山水(SANSUI) A38S 迷你插卡小音箱(山水电子有限公司)、小鼠自主活动测试仪(成都泰盟科技有限公司)、泰仕声量计(台湾泰仕电子工业股份有限公司)、微量离心机(Thermo Scientific,美国)、酶标仪(Thermo Scientific,美国)、HDR-XR150E 数码相机(Sony,日本)、Adobe Audition CC 2014、SMART3.0 视频行为学分析软件。盐酸氟西汀(大连美仑生物制药有限公司,CAS 号:56296-78-7)、小鼠脑源性神经营养因子 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 音乐选取

将莫扎特 K448 奏鸣曲进行音频处理,按照美国音乐期刊 The Absolute Sound 与 Stereophile 所确立的标

准过滤为高频段。音频处理软件为 Adobe Audition CC 2014,处理方式为频段分离。频谱分析如图 1。



注:A,正常音乐频谱;B,过滤之后保留的高频段音乐频谱(6000 Hz 以上)。

图 1 音乐的频谱分析

Note. A. Frequency spectrum of the normal music. B. High-frequent spectrum of the music (above 6000 Hz).

Figure 1 Frequency spectrum analysis of the music

1.2.2 小鼠造模方法

C57BL/6 小鼠于实验前适应性饲养 3 d,采用自主活动测试进行初步筛选,将后 3 min 内水平活动大于 120 次或小于 30 次的予以剔除。符合要求的小鼠共分为两组,空白组和实验组,其中空白组 10 只,模型组 36 只。实验采用慢性轻度应激建立模型^[7-9],为避免小鼠对单一或有规律的应激刺激产生耐受性,本实验采取多种不可预知的刺激方式交替进行。刺激方式结合参考文献及具体实验条件确定,包括束缚(4 h)、禁食(24 h)、禁水(16 h)、昼夜颠倒、噪声刺激(1 h)、夹尾(5 min)、湿垫料(24 h)、热水游泳(5 min)、冷水游泳(5 min)、鼠笼倾斜(24 h)10 种。除空白组外,其余小鼠每天随机安排三种应激刺激,并持续 5 周。在此期间,保持每种刺激在各组内最少出现 8 次。

1.2.3 干预措施

造模成功后,模型组随机均衡分为模型对照组、氟西汀组和音乐组,每组 12 只。空白组:保持安静的生活环境,充足的饮食饮水,正常的昼夜节律。模型对照组:继续每天 8:00 时开始给予慢性温和不可预知刺激,共 2 周,同时每天腹腔注射生理盐水。氟西汀组:每天腹腔注射盐酸氟西汀溶液(10 mg/kg),同时继续慢性温和不可预知刺激。音乐组:每天 15:00~17:00 时在笼盒中播放调制好的莫扎特 K448 高频段声波,音量保持在 60~70 dB(2 h/d),同时继续慢性温和不可预知刺激并注射生理盐水。

1.2.4 体重及行为学实验

(1)体重:实验前 3 d 及实验中每周(共 7 周)称量体重并记录。称重 在 17:00~19:00 时进行。

(2)自主活动测试:自主活动测试主要用于正式实验前的动物筛选。测试环境为分离反应箱,配有相应的微电脑控制系统,每次可测试 6 只小鼠,测试时间为 5 min,统计后 3 min 中的活动以及站立次数。每次测试完毕后,用 75% 乙醇充分清洁黑箱,避免气味产生干扰。

(3)悬尾实验(tail suspension test, TST):悬尾实验能反映动物的“失望”情绪及“抑郁”状态,用于观察小鼠为克服不正常体位而进行挣扎的体力及心理疲劳程度,是较为经典的反映小鼠心理抑郁程度的行为学评定方法。实验在暗光、无噪声的环境下进行,将小鼠的尾端用胶带固定悬挂,小鼠尾尖距地面 30 cm 左右。每只小鼠单独接受悬尾实验,以防相互干扰。实验持续 6 min,用数码相机记录实验过程,使用 SMART 3.0 视频行为学分析软件统计后 4 min 内小鼠不动总时间。悬尾实验在第 1 周(造模开始前)、第 5 周末(即造模成功后)和第 7 周末(即音乐组干预完成后)进行。

(4)强迫游泳实验(forced swimming test, FST):强迫游泳实验为小鼠提供了一个不可避免的环境,让它们处于压迫状态,一段时间后,小鼠表现出“行为绝望状态”。每只小鼠在实验前 24 h 进行 15 min 的适应性游泳。泳桶高 30 cm,直径 15 cm,内装 20 cm 高的清水,水温保持在 25℃ 左右。左手托住

小鼠,右手轻轻将其放入水面。实验持续 5 min,用数码相机记录实验过程,使用 SMART 3.0 视频行为学分析软件统计后 4 min 内小鼠不动总时间。强迫游泳实验在第 1 周(造模开始前)、第 5 周末(即造模成功后)和第 7 周末(即音乐组干预完成后)进行。

1.2.5 小鼠脑组织中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)含量测定

第 7 周末行为学实验结束后,迅速将各组小鼠颈椎脱臼处死。在冰袋上剪开头皮,打开颅腔取出脑组织,剔除小脑后称重,用冰冷的生理盐水冲洗并用滤纸吸干,放入冰下的匀浆管中。按照 1:9 的比例加入冰冷的生理盐水,充分研磨,形成 10% 的组织匀浆液。将制备好的组织液放入 4℃ 离心机中以 2500 r/min 离心 10 min,取上清液,放入 -80℃ 冰箱待用。采用 ELISA 法进行 BDNF 测定,严格按照试剂盒中说明书进行操作。

1.3 统计学方法

各组实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,方法为重复测量方差分析和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性,以 $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 实验小鼠的体重变化趋势

重复测量方差结果显示(图 2),处理效应与时间的交互作用有统计学意义($F = 23.695, P < 0.01$)。处理主效应有统计学意义($F = 5.674, P < 0.01$),各组小鼠体重变化不完全相同。造模前 3 d,各组小鼠体重基本一致,差异无显著性($P > 0.05$),基线具有可比性。造模第 1 周,接受了慢性温和不可预知刺激的模型组小鼠,体重基本没变,随后有一定程度的增加,但在造模 4 周末,模型组小鼠体重明显低于空白组($P < 0.05$),在第 5 周,模型组的体重出现明显增加。治疗的第 2 周(即实验第 7 周),与模型对照组相比,氟西汀组和音乐组的体重有一定程度的增加。

2.2 慢性温和不可预知刺激(chronic unpredictable and mild stress, CUMS)模型评价

如图 3 所示,应激后小鼠表现为活动迟钝,兴趣丧失和快感缺乏。方差分析表明,第 5 周后模型组的行为学实验结果与空白组相比存在显著差异,提示造模成功。模型组和空白组的悬尾实验的不动时间分别是(147.28 ± 24.29)s、(124.37 ± 13.03)s,不

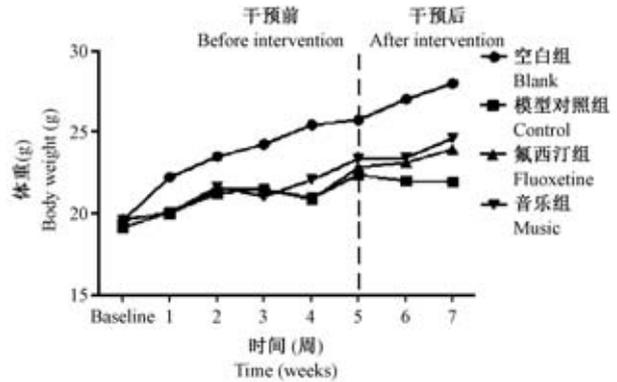


图 2 各组小鼠在造模和治疗过程中的体重变化

Figure 2 Body weight of the mice at baseline and 7 week later

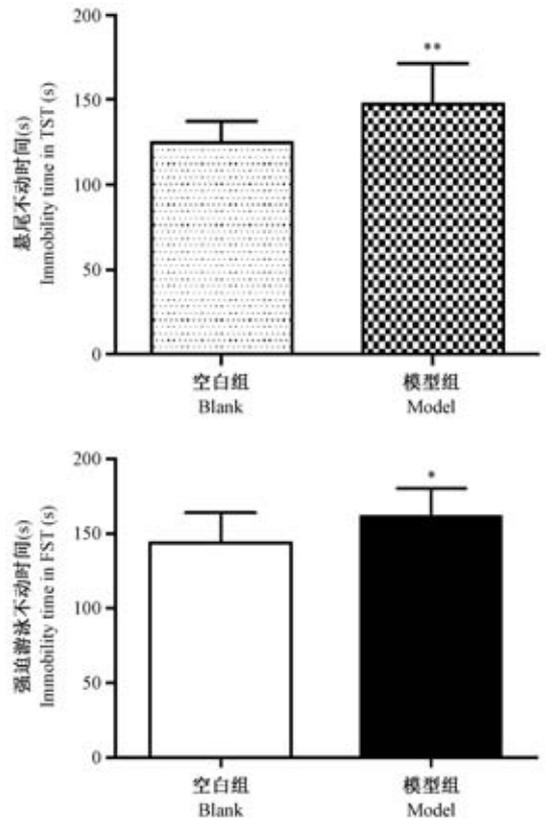


图 3 抑郁造模的行为学评价

Figure 3 Behavioral evaluation of the CUMS mouse models

动时间显著延长($P < 0.01$)。模型组和空白组的强迫游泳实验的不动时间分别是(161.47 ± 18.40)s、(143.89 ± 19.95)s,不动时间也显著延长($P < 0.05$)。

2.3 各组干预效果

如图 4 所示,模型对照组第 7 周的悬尾不动时间和强迫游泳不动时间,较第 5 周均无明显差异($P > 0.05$),提示慢性温和不可预知刺激保持了小鼠的抑郁状态。第 7 周与第 5 周相比,氟西汀组悬尾不动时间降低,差异具有显著性($P < 0.01$),强迫游泳不动时间降低,但差异不具有显著性($P > 0.05$);音

乐干预组悬尾不动时间降低,差异具有显著性($P < 0.05$),强迫游泳不动时间无明显变化。

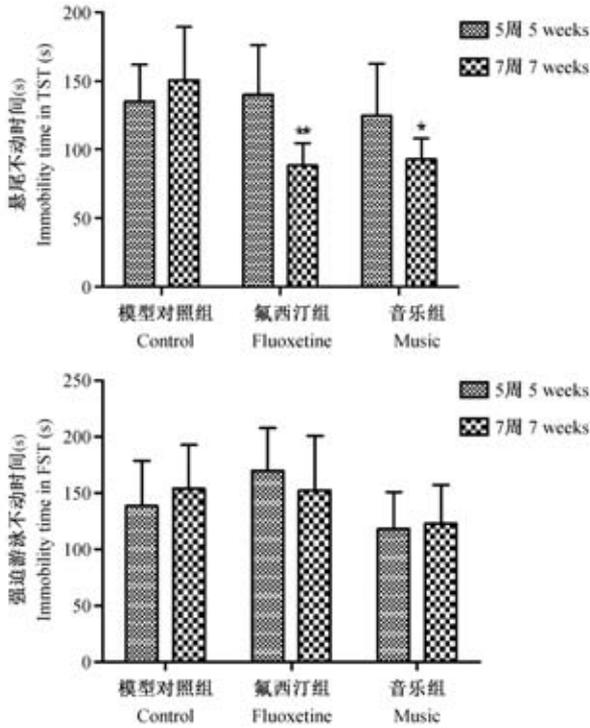


图 4 音乐干预效果的行为学评价

Figure 4 Behavioral evaluation of the music intervention

2.4 脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 含量测定结果

行为学实验结束后,通过 ELISA 法检测各组小鼠脑组织中的 BDNF 的含量,BDNF 标准品回归方程 $y = 0.0011x + 0.1035$,线性范围 31.25~500 pg/mL,相关系数 $r^2 = 0.9449$ 。结果发现(表 1),模型对照组与空白组小鼠相比,脑组织匀浆中的 BDNF 含量降低,差异具有极显著性($P < 0.01$);氟西汀组较模型对照组,BDNF 含量极明显回升($P < 0.01$),较空白组无差异($P > 0.05$);音乐组的 BDNF 含量较模型对照组有增加,但其差异无显著性。

表 1 各组脑组织匀浆 BDNF 含量检测结果与比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Table 1 Comparison of the BDNF content in brain tissue of each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

| 组别 Groups | 例数 N | 脑组织 BDNF 含量 BDNF content in brain tissue |
|-----------------|---------|---|
| 空白组 Blank | 10 | 376.36 ± 61.49 |
| 模型对照组 Control | 12 | 321.88 ± 58.26** |
| 氟西汀组 Fluoxetine | 11 | 393.44 ± 58.90## |
| 音乐组 Music | 11 | 366.82 ± 50.54 |

注: ** $P < 0.01$,与空白组相比。## $P < 0.01$,与模型对照组相比。
Note: ** $P < 0.01$ vs. the blank group. ## $P < 0.01$ vs. the control group.

3 讨论

抑郁症是一种以情绪低落为主要特征的精神障碍,涉及到多种病理生理过程。由于其复杂性,病因机制尚未明确。目前研究中抑郁症的动物模型主要分为药物诱发模型、孤养模型、转基因模型和 CUMS 模型等。1981 年, Katz 等^[10-11]模拟抑郁症诱因首次建立了 CUMS 模型,即将动物长时间置于一系列慢性温和和不可预知刺激中,从而模拟人类在长期生活中遭受的慢性低强度刺激,刺激的多样性和不可预知性是造模成功的关键。相比于其他模型, CUMS 模型的性状可以更加接近人类抑郁症,故被广泛应用于抑郁症研究中^[12]。然而,目前对刺激类型、方式、强度、持续时间及造模周期,并没有一个统一的标准,且在 CUMS 造模过程中,需要各种不同的应激方式不定时地对小鼠进行刺激,不仅过程繁琐,周期过长,耗时费力,还可能存在动物抑郁表现不稳定的情况。因此,在模型的建立和应用过程中,对模型进行评价显得至关重要。

音乐是一种不仅限于艺术欣赏和审美领域的艺术形式,经过多年发展,已经逐步渗透到医疗、心理等领域,音乐治疗也成为了一门独立学科^[13]。国内外已有很多音乐治疗的研究,在音乐选取上,多为莫扎特 K448 奏鸣曲或莫扎特钢琴曲^[14]。研究表明,成年小鼠在接受连续 30 d 的莫扎特 K448 奏鸣曲刺激后,海马、大脑皮质基因表达受到显著影响^[15]。出生后的早期音乐刺激,可增强大鼠 NMDA 受体介导的神经可塑性,使其在听觉分辨学习任务中听觉能力增强^[16]。音乐的元素多种多样,频率作为其中一种重要的组成因素,目前已成为研究音乐治疗的一个部分。但现有的研究大都体现不同曲目的不同频率的差异,混杂因素较多。本研究在前期研究的基础上^[17-18],通过频段过滤,去除了节奏、音色等因素的影响,并结合啮齿类动物 200~90 000 Hz 的声频范围^[19],选择莫扎特 K448 奏鸣曲中的高频段声波干预抑郁小鼠,初步探究其改善小鼠抑郁症状的效果。

已有动物实验证明,啮齿类动物在遭受长期应激后,会出现体重降低的现象。本实验中也发现,接受慢性应激的模型组小鼠较空白组的体重增长明显变缓。但在造模的第 4、5 周,模型组小鼠出现体重增长明显加快的短暂时期,这可能与小鼠对应激刺激的暂时适应有关,这也与我们观察到的,在

造模第4周小鼠抑郁状态出现短暂的恢复相一致。因此我们在第5周末对小鼠的抑郁状态进行了行为学评价,并给予了不同的干预。经过氟西汀和音乐干预2周后,此两组小鼠的体重较模型对照组出现上升趋势,提示药物和音乐改善了小鼠的抑郁状态。

目前,行为学评价是判定抑郁症模型的主要标准^[20]。常见的行为学实验有糖水消耗与偏好实验、旷场实验、高架迷宫实验、水迷宫实验、悬尾实验和强迫游泳实验。其中旷场实验和高架迷宫实验主要用于评价动物的焦虑状态,水迷宫实验主要用于评价空间学习记忆能力。糖水消耗与偏好实验、悬尾实验和强迫游泳实验通过表面效度(抑郁样表型改变)评价抑郁模型。本次实验中选取悬尾实验和强迫游泳实验对造模是否成功及干预是否有效进行评价,接受慢性温和和不可预知刺激的模型组小鼠与空白组相比,悬尾不动时间及强迫游泳不动时间显著延长,证实了慢性温和和不可预知刺激造模的有效性。与第5周(即造模成功后)相比,第7周(即干预结束后)氟西汀组悬尾实验及强迫游泳实验不动时间均减少,证实了药物治疗的有效性,而音乐组悬尾实验不动时间减少,说明音乐在一定程度上具有缓解抑郁作用,但强迫游泳实验不动时间变化不明显,可能与强迫游泳实验反映抑郁的敏感性或者样本数量有关。

BDNF与神经生长因子、神经营养素来源于同一基因家族^[21]。作为一种最为常见的神经营养因子,BDNF在神经细胞的生长发育、损伤修复中发挥重要作用。另外,BDNF和5-羟色胺能神经元之间可互相调节达成动态平衡。研究表明BDNF可通过5-羟色胺能神经系统与抑郁相关^[22]。BDNF免疫阳性神经元广泛分布在脑内,包括大脑皮层、海马齿状回、黑质纹状体、下丘脑、小脑、中脑顶盖区、脑干等,其中以海马齿状回和皮层的含量为最高。抑郁症患者通常会出现海马体积缩小,BDNF含量降低^[23]。实验室动物模型表明海马神经的减少和抑郁行为之间存在关联^[24]。本研究模型对照组脑组织BDNF含量明显低于空白组,可进一步说明CUMS造模有效。氟西汀组含量明显高于模型对照组,可反映药物治疗的有效性。但音乐组脑组织BDNF含量虽高于模型对照组,但差异并无显著,可能与音乐干预起效较慢、治疗时间不够长,样本数量较少和个体差异等有关,还可能是单纯的音乐干预无法达到预期效果,需要与药物配合才能更好地

发挥作用,此需要进一步的研究。

综上所述,本研究成功构建了CUMS抑郁小鼠模型,发现莫扎特K448奏鸣曲的高频段声波对改善抑郁模型小鼠行为学有积极效应,为优化抑郁症的治疗方法提供了线索,同时也为音乐在动物福利中的应用提供了思路。

参 考 文 献(References)

- [1] 陈晓鹭,曾金坤,蒙华庆,等. 伴自杀意念抑郁症患者事件相关电位的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(2): 176-180.
Chen XL, Zeng JK, Meng HQ, et al. Study of event-related potentials of non-treatment major depressive disorder patients with suicidal ideation[J]. J Chongqing Med Univ, 2018, 43(2): 176-180.
- [2] Polosan M, Lemogne C, Jardri R, et al. [Cognition — the core of major depressive disorder][J]. Encephale, 2016, 42(1 Suppl 1): 1S3-11.
- [3] 林芳波,侯德仁,唐秋萍. 抑郁症的药物治疗进展及艾氯胺酮的应用前景[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(4): 567-569.
Lin FB, Hou DR, Tang QP. Research progress of depression and the application of esketamine[J]. J Southern Med Univ, 2017, 37(4): 567-569.
- [4] Aalbers S, Fusar-Poli L, Freeman RE, et al. Music therapy for depression [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2017, 11: CD004517.
- [5] 王鹏伟. 音乐声波对玉山黑猪断奶仔猪生长影响的研究[D]. 江西农业大学, 2015.
Wang WP. The effects of music sound waves on Yushan black pigs weaned piglets' growth [D]. Jiangxi Agricultural University, 2015.
- [6] 吴耀,张春锋,林妙略,等. 抑郁症患者行非指导性音乐治疗对情绪及自动思维的影响[J]. 国际精神病学杂志, 2017, 44(2): 236-239.
Wu Y, Zhang CF, Lin ML, et al. Effects of unguided music therapy on psychological state and automatic thinking in patients with major depressive disorder [J]. J Int Psychol, 2017, 44(2): 236-239.
- [7] 赵瑞,杜冠华. 慢性温和和不可预知性刺激致大鼠抑郁症模型的病理机制研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 141-143+149.
Zhao R, Du GH. Pathological mechanism research in chronic unpredictable mild stress of rats [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(10): 141-143+149.
- [8] Han B, Wang JH, Geng Y, et al. Chronic stress contributes to cognitive dysfunction and hippocampal metabolic abnormalities in APP/PS1 mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(5): 1766-1776.
- [9] Shang X, Shang Y, Fu J, et al. Nicotine significantly improves chronic stress-induced impairments of cognition and synaptic

- plasticity in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4644-4658.
- [10] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [11] Boyko M, Kutz R, Grinshpun J, et al. Establishment of an animal model of depression contagion [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 281: 358-363.
- [12] Zhang Y, Liu L, Liu YZ, et al. NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2015, 18(8).
- [13] Muscat R, Sampson D, Willner P. Dopaminergic mechanism of imipramine action in an animal model of depression [J]. *Biol Psychiatry*, 1990, 28(3): 223-230.
- [14] Gao J, Chen S, Lin S, et al. Effect of music therapy on pain behaviors in rats with bone cancer pain[J]. *J BUON*, 2016, 21(2): 466-472.
- [15] Amagdei A, Baltes FR, Avram J, et al. Perinatal exposure to music protects spatial memory against callosal lesions [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2010, 28(1): 105-109.
- [16] Meng B, Zhu S, Li S, et al. Global view of the mechanisms of improved learning and memory capability in mice with music-exposure by microarray [J]. *Brain Res Bull*, 2009, 80(1-2): 36-44.
- [17] 范尧, 谭冬梅, 韩文莉, 等. 音乐与实验动物福利的研究进展 [J]. *实验动物科学*, 2016, 33(2): 50-53+60.
Fan Y, Tan DM, Han WL, et al. Advances on music and laboratory animal welfare [J]. *Lab Anim Sci*, 2016, 33(2): 50-53+60.
- [18] 袁徐蕾, 杨梅, 韩文莉, 等. 不同频率音乐对小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(9): 71-75.
- Yuan XL, Yang M, Han WL, et al. Impact of music of different frequencies on the spatial learning and memory ability of mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(9): 71-75.
- [19] Xu J, Yu L, Cai R, et al. Early auditory enrichment with music enhances auditory discrimination learning and alters NR2B protein expression in rat auditory cortex [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 196(1): 49-54.
- [20] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93(3): 358-364.
- [21] Carden SE, Hofer MA. Effect of a social companion on the ultrasonic vocalizations and contact responses of 3-day-old rat pups [J]. *Behav Neurosci*, 1992, 106(2): 421-426.
- [22] Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N = 9484) [J]. *Mol Psychiatry*, 2014, 19(7): 791-800.
- [23] 刘双珠, 甘景梨. 抑郁症及其自杀行为与脑源性神经营养因子研究进展[J]. *中国健康心理学杂志*, 2017, 25(6): 949-952.
Liu SZ, Gan JL. Study on the correlation between depression and suicidal behavior and brain derived neurotrophic factor [J]. *Chin J Health Psychol*, 2017, 25(6): 949-952.
- [24] Gulyaeva NV. Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2017, 82(3): 301-307.

[收稿日期] 2018-08-31

王璐,张锐虎,王晨阳,等. 中国仓鼠自发性2型糖尿病基础代谢特征及相关基因的表达差异[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4):508 - 515.

Wang L, Zhang RH, Wang CY, et al. Characteristics of basal metabolism and expression of related genes in spontaneous type 2 diabetic Chinese hamster [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):508 - 515.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.013

中国仓鼠自发性2型糖尿病基础代谢特征及相关基因的表达差异

王璐^{1,2}, 张锐虎^{1,2}, 王晨阳^{1,2}, 余婧婧^{1,2}, 宋国华^{1,2}, 王春芳^{1,2}, 陈朝阳^{1,2*}

(1. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030000; 2. 山西省实验动物与人类疾病动物模型重点实验室, 太原 030000)

【摘要】 目的 探究自发性2型糖尿病中国仓鼠糖脂代谢、体成分、昼夜运动及新陈代谢等基础代谢特征和相关基因在骨骼肌、肝中的表达情况。方法 根据中国仓鼠空腹血糖(FBG)和餐后血糖(PBG)值,选取对照组(FBG ≤ 4.5 mmol/L且PBG < 6.0 mmol/L)与糖尿病组(FBG ≥ 6.0 mmol/L且PBG > 7.0 mmol/L),测定动物体重、血糖、血脂、血清胰岛素含量及糖耐量,分析动物体成分、昼夜运动及新陈代谢特征,检测相关基因葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, *Glut4*)和过氧化物酶体增殖激活受体-γ(peroxisome proliferative activated receptor-γ, *Pparg*)在骨骼肌和肝中的表达情况。结果 与对照组相比,中国仓鼠糖尿病组血糖、血脂含量增加,血清胰岛素含量和胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)增大,体脂率降低,摄食量和白天活动量增加,热量消耗增大。PPARG在肝和骨骼肌中的mRNA和蛋白表达水平显著增加;GLUT4在骨骼肌中的mRNA和蛋白表达水平显著降低。结论 自发性2型糖尿病中国仓鼠属于糖脂代谢异常,能产生胰岛素抵抗的非肥胖型2型糖尿病动物模型,GLUT4的下调可能与骨骼肌中异常的糖代谢及胰岛素抵抗有关,而上调的PPARG可能有利于机体胰岛素抵抗状态的缓解。

【关键词】 中国仓鼠;2型糖尿病;新陈代谢;过氧化物酶体增殖激活受体-γ;葡萄糖转运蛋白4

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0508-08

Characteristics of basal metabolism and expression of related genes in spontaneous type 2 diabetic Chinese hamster

WANG Lu^{1,2}, ZHANG Ruihu^{1,2}, WANG Chenyang^{1,2}, YU Jingjing^{1,2}, SONG Guohua^{1,2}
WANG Chunfang^{1,2}, CHEN Zhaoyang^{1,2*}

(1. Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China;

2. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Diseases, Taiyuan 030000)

Corresponding author: CHEN Zhaoyang. Email: ccytycn@163.com

【Abstract】 Objective To explore the basic metabolic characteristics and expression of related genes in the skeletal muscle and liver of Chinese hamsters with spontaneous type 2 diabetes, including glucose and lipid metabolism, body composition, diurnal movement, metabolism, and the expression of relevant genes. **Methods** We regarded the

【基金项目】 山西省自然科学基金(201801D21208);山西省实验动物资源共享服务平台建设(201605D121019);山西省回国留学人员科研资助项目(2015-054)。

Funded by Natural Science Foundation of Shanxi Province (201801D21208), Construction of Sharing Service Platform for Experimental Animal Resources of Shanxi Province (201605D121019) and Research Subsidy Project for Returned Overseas Chinese Scholars, Shanxi Province (2015-054).

【作者简介】 王璐(1994—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。Email: deerxlu@163.com

【通信作者】 陈朝阳(1972—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email: ccytycn@163.com

Chinese hamster with fasting blood glucose (FBG) higher than 6.0 mmol/L and post-prandial blood glucose (PBG) higher than 7.0 mmol/L as diabetic based on the mean and 95% frequency distribution values of FBG and PBG. 12 hamsters at the age of 48 weeks in diabetic and control groups, each group was half male and female. Animal weight, blood glucose, blood lipid, serum insulin content, and glucose tolerance were measured. Animal body composition, diurnal movement, and metabolic characteristics were analyzed by InAlyzer Dual Energy X-ray Animal Body Composition Analysis System, High-throughput Behavior Analysis System, and Open Circuit Calorimetric Metabolic System, respectively. The expression of diabetes-related genes *Glut4* and *Pparg* in skeletal muscle and liver were measured by Real-time PCR and Western blotting. **Results** In the diabetic group, blood glucose and lipid, serum insulin, food intake, daytime activity, and heat consumption were significantly increased, while the percentage of body fat was significantly decreased. Compared with the control group, the mRNA and protein expressions of PPARG in the liver and skeletal muscle were significantly increased, and the mRNA and protein expressions of GLUT4 in skeletal muscle were significantly decreased in diabetic hamsters. **Conclusions** This type 2 diabetic Chinese hamster model exhibits non-obese, abnormal glucose and lipid metabolism, and insulin resistance. The down-regulation of GLUT4 may be related to abnormal glucose metabolism and insulin resistance in skeletal muscle, while the up-regulated PPARG may alleviate insulin resistance in the liver.

【Keywords】 Chinese hamsters; type 2 diabetes; metabolism; PPARG; GLUT4

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

中国仓鼠最早由 Meier 和 Yerganign 报道该群体近亲繁殖可自发产生糖尿病^[1]。山医群体近交系中国仓鼠通过选择性繁殖培育,发现其空腹血糖 (FBG) 中轻度升高,且存在胰岛素抵抗 (IR) 现象,符合糖尿病的发病特征^[2]。2 型糖尿病 (T2DM) 的发病基础主要涉及 IR 和胰岛素分泌缺乏,由 IR 引起的糖代谢紊乱会造成脂代谢异常,形成糖脂代谢恶性循环,损伤胰腺组织,影响胰岛素分泌^[3-4]。IR 与脂肪分泌的细胞因子,如瘦素、脂联素等有密切的联系^[5]。过氧化物酶体增殖体激活受体 (PPARs) 是脂肪细胞因子主要的调控子,其中 PPARs 主要参与脂肪组织中脂质摄取和脂肪形成相关基因的转录激活,*Pparg* 基因突变可引发 IR^[6]。IR 表现为外周组织 (尤其是骨骼肌、脂肪组织) 对葡萄糖摄取减少及肝葡萄糖输出作用减弱,使 T2DM 患者维持高血糖状态^[5]。跨膜糖蛋白家族 (GLUTs) 参与细胞内葡萄糖的摄取与输出,其中葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 与胰岛素敏感性关联较大,是胰岛素介导信号传导中的关键蛋白^[7]。

本研究通过测定山医群体近交系中国仓鼠 FBG、餐后血糖 (PBG)、胰岛素含量、糖脂代谢、昼夜运动及新陈代谢情况,检测糖尿病相关基因 *Glut4* 和 *Pparg* 在骨骼肌、肝中的 mRNA 及蛋白表达情况,探究山医群体近交系中国仓鼠的基本代谢特征,为该品系动物 T2DM 分子发病机制的研究提供一定的基础,有助于进一步全面了解其发病特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级山医群体近交系中国仓鼠,10~12 月龄,雌雄各半,由山西医科大学实验动物中心提供【SCXK(晋)2015-0001】,饲养于屏障环境(SYXK【晋】2015-0001),自由摄食饮水,饲料符合国家标准(GB14924.6-2001)《实验动物地鼠配合饲料》的要求。实验操作严格遵守山西医科大学实验动物管理委员会规程(IACUC2018-016)。

1.1.2 试剂与仪器

血液生化指标试剂盒(美国 Sysmex 公司);鼠 ELISA 试剂盒(美国 Millipore 公司);糖化血红蛋白(HbA1c)试剂盒(中国南京建成公司);ACCU-CHEK 活力血糖仪(德国 Roche Diagnostics GmbH 公司);全自动生化仪(日本 Hitachi 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立

从 3 月龄开始,每月一次测定 FBG 和 PBG。根据 FBG 和 PBG 的均值与 95% 频数分布值,将 $FBG \leq 4.5$ mmol/L 且 $PBG < 6.0$ mmol/L 的鼠作为对照组, $FBG \geq 6.0$ mmol/L 且 $PBG > 7.0$ mmol/L 的鼠作为糖尿病组。每组 12 只,雌雄各半。

1.2.2 体重测定

从 1 月龄开始,每月称量一次体重并记录。在第 3,6,9,12 月龄测量体长(鼻尖到肛门的长度),计算体重指数(BMI) = 体重(g)/体长平方(cm^2)。

体重和血糖值稳定后,选择 12 月龄中国仓鼠进行代谢指标检测。

1.2.3 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)

动物禁食 12 h,以 10 g/kg 体重的葡萄糖灌胃,测定灌胃开始后 0、30、60 和 120 min 时的血糖值。同时,在灌胃后 0、15、30 和 60 min 时,眼眶静脉丛取血(200 μ L),4 $^{\circ}$ C 恒温离心(2500 r/min,20 min)取上清,测定胰岛素含量。根据梯形积分法计算曲线下面积(AUC)^[8]。

1.2.4 生化指标及胰岛素含量的测定

动物禁食 12 h,眼眶静脉丛取血,4 $^{\circ}$ C 恒温离心(2500 r/min,20 min)取上清,测定生化指标和血清胰岛素(FINS)含量,计算 HOMA-IR = (FBG \times FINS)/22.5^[9]。

1.2.5 HbA1c 含量的测定

动物禁食 12 h,眼眶静脉丛取血(100 μ L),置于含 EDTA 的抗凝管中,测定血液 HbA1c 百分比含量。

1.2.6 体成分监测

动物以 50 mg/kg 体重腹腔注射戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司)麻醉,以趴卧姿势于 InAlyzer 双能 X 射线动物体成分检测仪(韩国 Medikors 公司)内,进行体成分分析,包括体重、脂肪、肌肉和骨矿物质含量,骨密度值及脂肪占组织百分比。

1.2.7 运动监测

动物放入高通量行为分析笼(荷兰 Noldus 公司),1 只/笼,设置相关测量参数,对中国仓鼠运动路程和运动速度进行 24 h(12 h/12 h 昼夜交替)测量。

1.2.8 新陈代谢监测

动物放入开路热量测定代谢笼(美国 Columbus Instruments 公司),1 只/笼,设置相关测量参数,对中国仓鼠呼吸交换率、能量消耗,摄食量及饮水量等进行 24 h(12 h/12 h 昼夜交替)测量。

1.2.9 基因 mRNA 检测

使用 Trizol(Takara 公司,日本)法提取中国仓鼠骨骼肌和肝的总 RNA,以其为模板,通过 PrimeScriptTM RT Master Mix(Perfect Real-Time)试剂盒(Takara 公司,日本)反转录合成 cDNA。使用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II(Tli RNaseH Plus)试剂盒(Takara 公司,日本),在 StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,美国)上进行 PCR 扩增。引物根据 GenBank 中国仓鼠 β -Actin、Glut4 和

Pparg 序列,用 Primer Premier 5 设计,由 TAKARA 大连宝生物公司合成,具体引物序列见表 1。

实时荧光定量 PCR 反应条件(两步法):95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,1 个循环;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。

表 1 引物序列及相应的碱基数大小

| 基因 Genes | 引物序列(5'-3') Primers (5'-3') | 碱基数(bp) Size (bp) |
|----------------|-----------------------------------|----------------------|
| β -Actin | F:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' | 20 |
| | R:5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3' | 20 |
| Glut4 | F:5'-ATCCCACAAGGCACTCTCACTAC-3' | 23 |
| | R:5'-GCCAGCATAGCCCTTTTCC-3' | 19 |
| Pparg | F:5'-GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG-3' | 25 |
| | R:5'-TGCAGCAGTTGTCTTGGATG-3' | 21 |

1.2.10 蛋白含量测定

使用博士德生物蛋白提取试剂盒提取中国仓鼠骨骼肌和肝组织中的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。样品上样量为 50 μ g,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转至 NC 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 β -actin(1:1000, Bioworld)、GLUT4(1:1000, Boster)和 PPARG(1:1000, ABclonal)4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜,二抗(anti-mouse IgG,1:4000, Bostser)室温孵育 1 h,洗膜,使用 ECL 发光液,化学发光成像系统仪(G:Box Chemi XX9,英国)显影,分析蛋白条带。

1.3 统计学分析

采用软件 SPSS 17.0 进行数据处理,结果均表示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),组间比较采用 *t* 检验,组内比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 体重及 BMI 变化

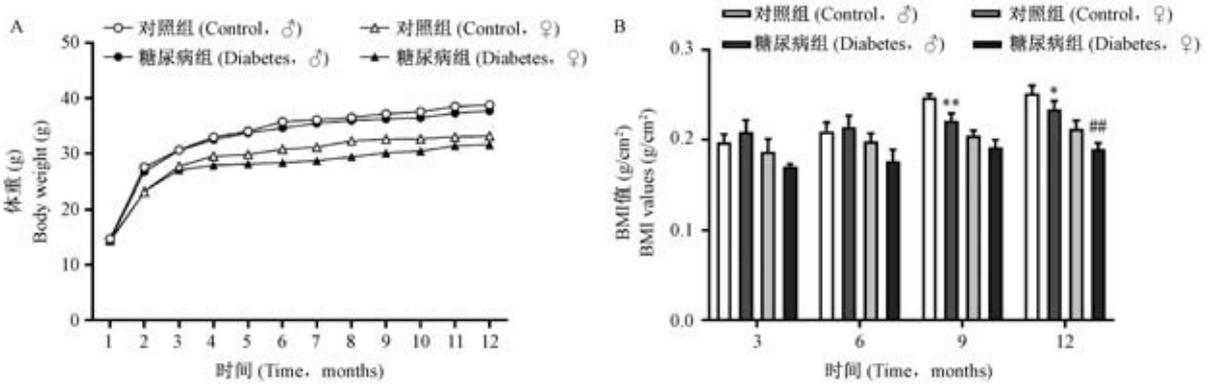
中国仓鼠体重随饲养时间的延长而逐渐增加(图 1A),1~2 月龄期间,雄性体重增长速度大于雌性。同月龄相比,对照组与糖尿病组的体重变化在相同性别间无显著差异(图 1A)。BMI 值比较发现,雄性 BMI 值高于雌性,9 月龄时,雄性糖尿病组 BMI 值显著低于对照组,而雌性糖尿病组与对照组间无显著差异(图 1B)。12 月龄时,同性别相比,糖尿病组 BMI 值显著低于对照组(图 1B)。

2.2 中国仓鼠糖尿病鼠的代谢特征

中国仓鼠糖尿病血液相关代谢指标如表 2 所

示,与对照组相比,糖尿病组 FBG、PBG、TG、胰岛素和 HOMA-IR 值明显升高,血清 TC 含量有一定程度的增加,但无统计学差异。HbA1c 作为高血

糖的标记物,糖尿病组中的含量约为对照组的 1.3 倍。这些结果表明糖尿病仓鼠存在 IR 和一定的代谢异常。



注:与对照组雄性相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与对照组雌性相比, ## $P < 0.01$ 。

图 1 中国仓鼠对照组与糖尿病组体重和 BMI 值变化

Note. Compared with the male hamsters in control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the female hamsters in control group, ## $P < 0.01$.

Figure 1 Changes in body weight and BMI of the Chinese hamsters in control and diabetes groups

表 2 中国仓鼠对照组与糖尿病组相关代谢指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Metabolic parameters of the Chinese hamsters in control and diabetes groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 Groups | 空腹血糖 (mmol/L) FBG | 餐后血糖 (mmol/L) PBG | 总胆固醇 (mmol/L) TC | 甘油三酯 (mmol/L) TG | 糖化血红蛋白 (%) HbA1c | 胰岛素 ($\mu\text{U}/\text{mL}$) Insulin | 胰岛素抵抗指数 HOMA-IR |
|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---|---------------------|
| 对照组 Control | 3.96 \pm 0.16 | 5.81 \pm 0.42 | 4.29 \pm 0.54 | 1.84 \pm 0.65 | 6.57 \pm 1.12 | 36.25 \pm 8.27 | 6.31 \pm 1.29 |
| 糖尿病组 Diabetes | 6.90 \pm 0.37*** | 7.85 \pm 0.63** | 4.58 \pm 0.55 | 2.66 \pm 0.62*** | 9.16 \pm 1.46*** | 52.15 \pm 13.05* | 14.78 \pm 3.51*** |

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.3 OGTT 实验和胰岛素含量

中国仓鼠 OGTT 实验结果如图 2A 所示,灌服葡萄糖 30 min,糖尿病鼠的血糖值与对照组相比大幅升高(图 2A),30 min 后对照组的血糖值逐渐下降并在 120 min 时接近正常水平,而糖尿病组在 120 min 时仍维持在较高水平,最终使糖尿病组 AUC 增加了 40%(图 2B),说明糖尿病鼠葡萄糖代谢已受损。

OGTT 过程中血清胰岛素变化趋势如图 2C 所示,在 0~15 min,对照组和糖尿病组血清胰岛素水平均逐渐升高,30 min 时,对照组胰岛素含量开始下降而糖尿病组仍在升高,最终使糖尿病组 AUC 明显增加(图 2D),表明糖尿病仓鼠对葡萄糖刺激的胰岛素分泌系统存在一定的缺陷。

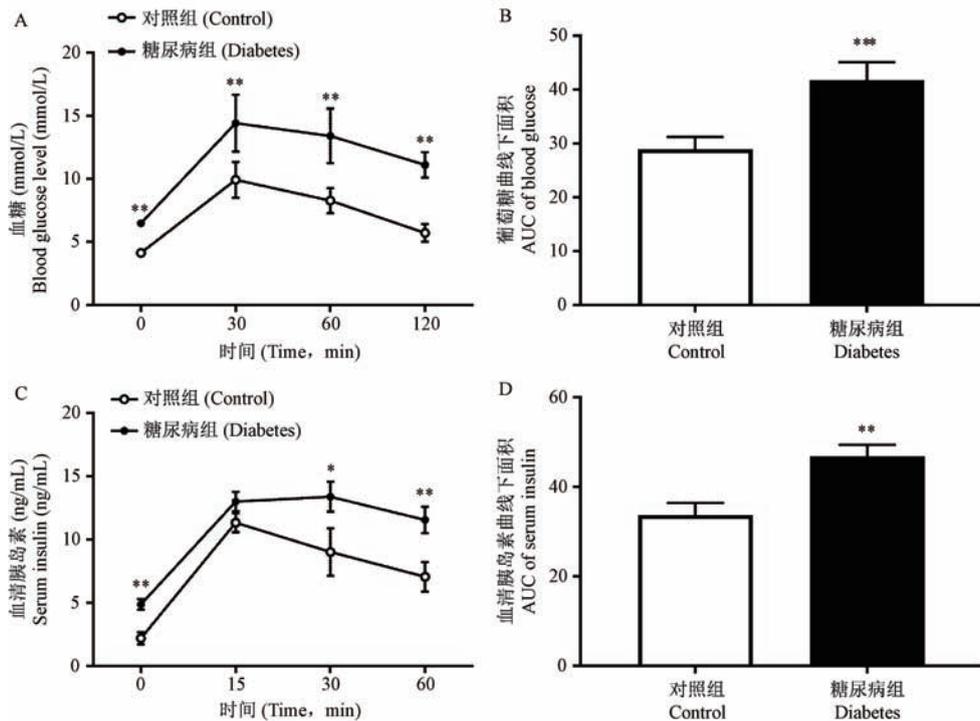
2.4 体成分含量

中国仓鼠体成分结果如表 3 所示,与对照组相比,糖尿病组脂肪含量及脂肪/组织百分比显著降

低,脂肪/组织百分比约下降 37%,相反,肌肉含量百分比明显高于对照组,说明该模型为非肥胖型糖尿病动物模型。此外,骨矿物质含量、骨面积和骨体积,糖尿病组略高于对照组,但无统计学差异。

2.5 运动及呼吸代谢分析

中国仓鼠昼夜运动变化如表 4 所示,同组昼夜间活动量差异显著,且夜晚运动路程长。与对照组相比,糖尿病组白天活动量明显增加($P < 0.05$),夜晚活动量略有减少,但未达到统计学差异。饮水量,对照组夜晚明显多于白天($P < 0.001$),糖尿病组夜晚比白天多,但无统计学差异。同组间摄食量夜晚明显多于白天,且与对照组相比,糖尿病组白天摄食量显著增加,约为对照组的 3.5 倍。糖尿病组 RER 值夜晚明显低于对照组($P < 0.05$)。热量消耗,同组间白天比夜晚少,与对照组相比,糖尿病组夜晚热量消耗明显增加。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 中国仓鼠对照组和糖尿病组 OGTT 实验及胰岛素含量结果

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin secretion of the Chinese hamsters in control and diabetes groups

表3 中国仓鼠对照组与糖尿病组体成分含量($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Body composition of the Chinese hamsters in control and diabetes groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 Groups | 脂肪含量 百分比(%) Percentage of body fat mass (%) | 肌肉含量 百分比(%) Percentage of body lean mass (%) | 骨矿物质含量 百分比(%) Percentage of bone mineral content (%) | 脂肪/组织 百分比(%) Fat/tissue ratio (%) | 骨密度(g/cm^2) Bone mineral density (BMD, g/cm^2) | 骨面积(cm^2) Bone area (cm^2) | 骨体积(cm^3) Bone volume (cm^3) |
|------------------|---|--|--|--|---|--|--|
| 对照组 Control | 19.39 \pm 0.82 | 78.13 \pm 1.11 | 2.86 \pm 0.25 | 19.93 \pm 0.84 | 0.92 \pm 0.01 | 10.05 \pm 0.79 | 0.52 \pm 0.04 |
| 糖尿病组 Diabetes | 12.28 \pm 1.49*** | 84.67 \pm 1.23*** | 2.99 \pm 0.39 | 12.67 \pm 1.50*** | 0.86 \pm 0.05 | 11.02 \pm 0.99 | 0.61 \pm 0.08 |

注:与对照组相比, *** $P < 0.001$ 。

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

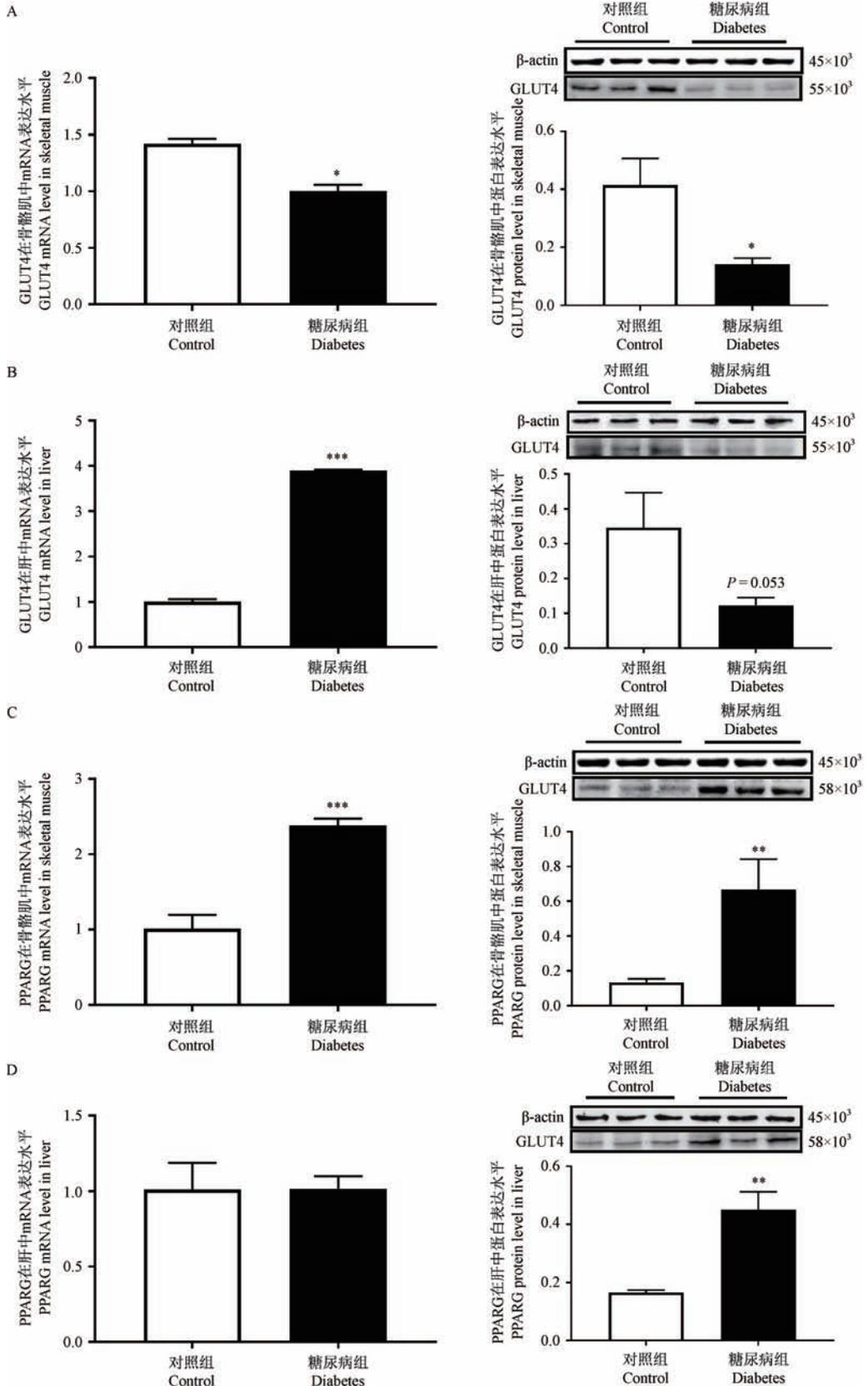
2.6 候选基因的表达

中国仓鼠糖尿病组 GLUT4 在不同组织中的表达不同,骨骼肌中 GLUT4 在 mRNA 和蛋白表达水平明显降低(图 3A);肝中, GLUT4 在 mRNA 水平表达增加,而在蛋白水平有下降的趋势,但无统计学意义($P = 0.053$,图 3B)。此外,与对照组相比,糖尿病组 PPAR γ 在骨骼肌 mRNA 和蛋白水平(图 3C),以及肝蛋白水平(图 3D)的表达均明显增加。

3 讨论

T2DM 是一种复杂的代谢性疾病,常伴随着糖脂代谢、呼吸代谢及身体组分等一系列异常变化。

近交系中国仓鼠具有自发性糖尿病倾向,FBG 和 PBG 呈中轻度增高,糖耐量曲线下面积增大,糖耐量受损。糖耐量受损被认为是人类 T2DM 发生的先兆^[10],机体由葡萄糖耐受不良发展为糖尿病的过程,与胰岛素分泌不足或胰岛素对葡萄糖的敏感性有关^[11]。糖尿病仓鼠血清胰岛素含量和 HOMA-IR 值增大,存在胰岛素抵抗,在糖耐量过程中胰岛素分泌异常,葡萄糖摄入 30 min 后血清胰岛素含量仍在增加,而对照组胰岛素含量已经开始下降。这些结果表明糖尿病鼠产生胰岛素抵抗可能是由胰岛素敏感性下降引起,体内持续的高血糖状态导致胰岛 B 细胞过度刺激,最终影响机体糖代谢。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 中国仓鼠对照组和糖尿病组中 GLUT4 和 PPARG 在骨骼肌和肝中的表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Expression of GLUT4 and PPARG in the skeletal muscle and liver tissues of Chinese hamsters in control and diabetes groups

表 4 中国仓鼠对照组与糖尿病组的运动和呼吸代谢水平(白天 12 h/夜晚 12 h) ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Exercise and respiratory metabolism levels of the Chinese hamsters in control and diabetes groups (Day 12 h/Night 12 h) ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 Groups | 运动路程(m) Distance (m) | 运动速度(cm/s) Velocity (cm/s) | 摄食量(g/天) Food intake (g/day) | 饮水量(mL/天) Water intake (mL/day) | 呼吸交换率(RER) Respiratory exchange rate (RER) | 热量消耗 (kcal/min) Heat consumption (kcal/min) | |
|------------------|-------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|--|-----------------------------|
| 对照组 Control | 白天 Day | 286.67 ± 55.83 | 1.06 ± 0.21 | 0.525 ± 0.286 | 0.157 ± 0.089 | 0.987 ± 0.054 | 0.035 ± 0.002 |
| | 夜晚 Night | 524.12 ± 44.81 ^{***} | 1.36 ± 0.093 | 2.911 ± 0.736 [*] | 1.726 ± 0.109 ^{***} | 1.025 ± 0.074 | 0.048 ± 0.003 ^{**} |
| 糖尿病组 Diabetes | 白天 Day | 361.07 ± 30.73 [*] | 1.07 ± 0.096 | 1.963 ± 0.160 ^{**} | 0.167 ± 0.117 | 0.942 ± 0.061 | 0.049 ± 0.002 ^{**} |
| | 夜晚 Night | 466.34 ± 45.83 [#] | 1.32 ± 0.19 | 4.187 ± 0.468 [#] | 2.624 ± 0.436 | 0.929 ± 0.098 ^a | 0.057 ± 0.003 ^a |

注:与对照组白天相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。与模型组白天相比,[#] $P < 0.01$ 。与对照组夜晚相比,^a $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group during the day, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. Compared with the diabetic group during the day, [#] $P < 0.01$. Compared with the control group during the night, ^a $P < 0.05$.

体重和能量代谢的生理调节是小型哺乳动物应对环境变化的主要策略,对增强适应能力,提高生存机会具有重要意义^[12-13]。中国仓鼠体重随饲养时间的延长而逐渐增加,12月龄时,同性别间糖尿病组与对照组的体重无显著差异,BMI值降低,体脂率下降,说明中国仓鼠属于非肥胖型糖尿病动物模型。现有的糖尿病动物模型中,GK大鼠^[14]为非肥胖型,而NSY小鼠^[15]、TH小鼠^[16]及长爪沙鼠^[17]均存在一定程度的肥胖,暗示不同动物在应对环境变化时,体重调节策略和脂质代谢机制存在一定的差异。动物机体自身具备各自的脂代谢系统,血浆中的脂类含量是临床了解患者脂类代谢是否正常的重要指标^[18]。中国仓鼠糖尿病组空腹血清TG和TC含量增加,脂质代谢发生异常。Roden等^[19]报道,健康个体静脉注射甘油三酯乳剂可降低肌肉糖原合成和葡萄糖摄取速率。因此,严重高甘油三酯血症可能先于高血糖的发生,从而促进中国仓鼠自发性糖尿病的发生。

机体常用的供能方式为糖代谢供能和脂肪氧化供能,RER值可以间接反应机体的供能物质,RER值越接近1,主要通过利用碳水化合物供能,越接近0.7,以脂肪氧化供能为主^[20]。对照组中国仓鼠夜晚RER>1,摄食量、饮水量、运动量和热量消耗明显高于白天,可能夜晚进食阶段机体利用碳水化合物合成脂肪或夜晚剧烈运动消耗能量。糖尿病组昼夜RER值降低,且夜晚RER值显著低于对照组,表明动物部分供能方式由碳水化合物供能转向脂肪氧化供能,结果可能会造成机体脂质过氧化物的增加。卢镜宇等^[21]研究发现,高脂饮食诱发T2DM大鼠可致RER降低,偏向于依靠脂肪氧化提供能量,与本研究结果一致。

啮齿动物有昼伏夜出的生物规律,本研究发现,中国仓鼠昼夜间活动量差异显著,且夜晚运动路程长。与对照组相比,糖尿病组白天活动量明显增加,夜晚活动量略有减少,说明仓鼠的高血糖状态会对生物的活动规律产生一定的影响。此外,糖尿病组摄食量增加,热量消耗增大,但体脂率较低。Shi等^[22]研究发现,黑线仓鼠在低温环境脂肪含量下降,但摄食量增加,说明动物能量摄取并不总是与肥胖的发展呈正相关。可能是糖尿病动物试图通过增加运动和热量消耗来平衡过多的能量摄入和过高的血糖对机体带来的不利影响,具体机制有待进一步研究。

为进一步探索中国地鼠T2DM表型的分子代谢特征,我们测定了肝和骨骼肌中PPARG和GLUT4的mRNA和蛋白表达情况。PPARG是脂肪细胞分化、脂质和碳水化合物代谢的关键调控因子,可增加靶组织对胰岛素的敏感性^[23]。糖尿病鼠中,PPARG在肝和骨骼肌中的表达显著增加。Anandharajan等^[24]研究发现,PPARG可增强胰岛素的敏感性,促进GLUT4的表达,增强对葡萄糖的摄取。糖尿病鼠中,GLUT4在骨骼肌中表达显著降低,但在肝中蛋白表达无明显差异。正常条件下,GLUT4储存于细胞内的特化小泡中^[25]。当餐后血糖升高时,胰岛素信号转导激活,GLUT4转移至质膜,完成葡萄糖转运,降低血糖浓度^[11,25]。这些结果表明机体为适应高血糖、胰岛素抵抗等环境,不同组织中存在自我调控,骨骼肌中可能由于GLUT4的表达降低导致机体产生胰岛素抵抗,肝中高水平的PPARG有助于提高胰岛素的敏感性,适度减缓胰岛素抵抗。

综上所述,山医群体近交系中国仓鼠FBG、PBG中轻度增高,糖脂代谢异常,存在胰岛素抵抗,体脂

率降低,属于非肥胖型自发性糖尿病模型。其糖代谢异常及胰岛素抵抗的产生可能与骨骼肌 GLUT4 表达降低有关,而肝中 PPAR γ 表达的增加,可以适度缓解机体的胰岛素抵抗,有助于维持正常生活,但具体的作用机制仍需进一步探索。

参 考 文 献(References)

[1] Meier H, Yerganian G. Spontaneous diabetes mellitus in the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Findings in the offspring of diabetic parents [J]. *Diabetes*, 1961, 10: 12-18.

[2] 王济, 薄家璐. 山医群体中国地鼠自发的遗传性糖尿病模型 [J]. *中国病理生理杂志*, 1988, 4(5): 262-266.

Wang J, Bo JL. Spontaneous hereditary diabetes mellitus in the Shanyi colony of Chinese hamster [J]. *Chin J Pathophys*, 1988, 4(5): 262-266.

[3] Lu SY, Qi SD, Zhao Y, et al. Type 2 diabetes mellitus non-genetic Rhesus monkey model induced by high fat and high sucrose diet [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2015, 123(1): 19-26.

[4] De Rosa S, Arcidiacono B, Chiefari E, et al. Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease: genetic and epigenetic links [J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9:2.

[5] 施平, 何珂, 胡蕴, 等. 脂肪因子在胰岛素抵抗中的作用 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(26): 167-169.

Shi P, He K, Hu Y, et al. Effect of adipocytokines in insulin resistance [J]. *Chin Med Herald*, 2014, 11(26): 167-169.

[6] 陈永熙, 王伟铭, 周同, 等. PPAR- γ 作用及其相关信号转导途径 [J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(3): 382-386.

Chen YX, Wang WM, Zhou T, et al. Function of PPAR- γ and related signaling pathways [J]. *Chin J Cell Biol*, 2006, 28(3): 382-386.

[7] Miura T, Suzuki W, Ishihara E, et al. Impairment of insulin-stimulated GLUT4 translocation in skeletal muscle and adipose tissue in the Tsumura Suzuki obese diabetic mouse: a new genetic animal model of type 2 diabetes [J]. *Eur J Endocrinol*, 2001, 145(6): 785-790.

[8] Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, et al. Evaluating the glucose tolerance test in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(6): E1323-1332.

[9] 马毅超, 潘永明, 陈亮, 等. 胰岛素抵抗动脉粥样硬化小型猪模型的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(1): 12-17.

Ma YC, Pan YM, Chen L, et al. The research of the insulin resistance atherosclerosis model of mini-swine [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(1): 12-17.

[10] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 840-846.

[11] Kim JH, Stewart TP, Soltanl-Bejnood M, et al. Phenotypic characterization of polygenic type 2 diabetes in TALLYHO/JngJ mice [J]. *J Endocrinol*, 2006, 191(2): 437-446.

[12] 高文荣, 曹能, 朱万龙, 等. 冷驯化对中缅树鼯褐色脂肪组织适应性产热的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 567-572.

Gao WR, Cao N, Zhu WL, et al. Adaptive thermogenesis of the

brown adipose tissue in tree shrews (*Tupaia belangeri*) during cold acclimation [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(6): 567-572.

[13] 赵志军, 曹静, 陈可新. 黑线仓鼠体重和能量代谢的季节性变化 [J]. *兽类学报*, 2014, 34(2): 149-157.

Zhao ZJ, Cao J, Chen KX. Seasonal changes in body mass and energy budget in striped hamsters [J]. *Acta Theriol Sin*, 2014, 34(2): 149-157.

[14] Kimura K, Toyota T, Kakizaki M, et al. Impaired insulin secretion in the spontaneous diabetes rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 1982, 137(4): 453-459.

[15] Ueda H, Ikegami H, Yamato E, et al. The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity [J]. *Diabetologia*, 1995, 38(5): 503-508.

[16] Kim JH, Saxton AM. The TALLYHO mouse as a model of human type 2 diabetes [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 933: 75-87.

[17] Boquist L. Obesity and pancreatic islet hyperplasia in the Mongolian gerbil [J]. *Diabetologia*, 1972, 8(4): 274-282.

[18] 黄丽霞, 赵焱, 汪庆安, 等. 宁夏回族及汉族超重、肥胖人群甘油三酯及甘油三酯与高密度脂蛋白胆固醇的比值和胰岛素抵抗的关系 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(7): 582-586.

Huang LX, Zhao Y, Wang QA, et al. Relationship between triglyceride or ratio of triglyceride to HDL-C and insulin resistance in Hui and Han population with overweight and obesity of Ningxia [J]. *Chin J Diabetes*, 2017, 25(7): 582-586.

[19] Roden M, Price TB, Perseghin G, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(12): 2859-2865.

[20] Nakagata T, Yamada Y, Naito H. Energy expenditure, recovery oxygen consumption, and substrate oxidation during and after body weight resistance exercise with slow movement compared to treadmill walking [J]. *Physiol Int*, 2018, 105(4): 371-385.

[21] 卢镜宇, 李秀, 商可心, 等. II 型糖尿病大鼠模型的建立及其活体代谢的改变 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2018, 218(4): 6-9.

Lu JY, Li X, Shang KX, et al. Establishment and the change of metabolism in type II diabetes rats model [J]. *Shanghai Anim Husb Vet News*, 2018, 218(4): 6-9.

[22] Shi LL, Fan WJ, Zhang JY, et al. The roles of metabolic thermogenesis in body fat regulation in striped hamsters fed high-fat diet at different temperatures [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2017, 212: 35-44.

[23] Raj R, Bhatti JS, Bhadada SK, et al. Association of polymorphisms of peroxisome proliferator activated receptors in early and late onset of type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11 Suppl 1: S287-S293.

[24] Anandharajan R, Pathmanathan K, Shankernarayanan NP, et al. Upregulation of Glut-4 and PPAR gamma by an isoflavone from *Pterocarpus marsupium* on L6 myotubes: a possible mechanism of action [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 97(2): 253-260.

[25] Zhou X, Shentu P. Spatiotemporal regulators for insulin-stimulated GLUT4 vesicle exocytosis [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 1683678.

郭冷秋,郭壮丽,朱霄,等. 利用正交试验优化建立大鼠条件恐惧记忆模型[J].中国实验动物学报,2019,27(4):516-520.
Guo LQ, Guo ZL, Zhu X, et al. Optimization of a rat model of conditioned fear memory using an orthogonal design [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):516-520.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.014

利用正交试验优化建立大鼠条件恐惧记忆模型

郭冷秋^{1*}, 郭壮丽², 朱霄¹, 周蕾¹, 王梦楠¹, 张立光¹, 周扬¹

(1. 苏州卫生职业技术学院药学院, 苏州 215009; 2. 青岛大学附属医院康复医学科, 青岛 266003)

【摘要】目的 利用正交试验,优化建立大鼠条件恐惧记忆模型的最佳实验参数,寻找最佳试验条件。**方法** 利用巴普洛夫条件恐惧原理,建立大鼠条件恐惧记忆模型;采用3因素3水平的正交试验设计,以模型建立24 h后大鼠木僵反应时间为指标,观察不同参数条件下恐惧记忆的表达情况,确定最佳试验条件。以优选的实验条件建立条件恐惧记忆模型,并于24 h、1周、2周、4周和8周后进行恐惧记忆保持检测。**结果** 直观分析结果表明,各因素影响能力依次为声音强度=循环次数>电击强度;方差分析结果表明,循环次数对实验结果有显著影响($P < 0.05$),声音强度和电击强度影响不显著($P > 0.05$)。确定最优实验条件为:声音75 dB,电击0.8 mA,循环15次。在模型建立24 h和1周时,大鼠恐惧记忆保持良好,与对照组比较差异有显著性($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$);第2周后恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 本实验明确了大鼠条件恐惧记忆模型影响因素的主次,优化了实验条件,为模型的标准化、规范化及后续研究提供了可借鉴的实验的依据。

【关键词】 条件恐惧记忆;动物模型;正交试验;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0516-05

Optimization of a rat model of conditioned fear memory using an orthogonal design

GUO Lengqiu^{1*}, GUO Zhuangli², ZHU Xiao¹, ZHOU Lei¹, WANG Mengnan¹, ZHANG Liguang¹, ZHOU Yang¹

(1. Department of Pharmacy, Suzhou Vocational Health College, Suzhou 215009, China.

2. Department of Rehabilitation, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003)

Corresponding author: GUO Lengqiu. E-mail: glq3@sina.com

【Abstract】 Objective An orthogonal design was used to optimize the experimental parameters for the establishment of a rat model of conditioned fear memory and to identify the optimal experimental conditions. **Methods** The model of conditioned fear memory in rats was established based on pavlovian conditioned fear theory. Three factors, namely sound intensity, cycle times and electric shock intensity, were adopted, and each factor was set at 3 levels. Orthogonal test was carried out, and the freezing time ratio of rat was taken as the index to observe the changes in different parameters of expression of fear memory and determine the best experimental conditions. The conditioned fear memory model was established again under the optimal conditions of the previous experiment, and the fear memory retention test was conducted 24 h, 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks later. The rats without fear training were used as the control group. **Results** The intuitive analysis results showed that the effects of various factors on the duration of fear memory of rats was sound intensity=cycle times > electric shock intensity in turn. The ANOVA test showed that the cycle times had a significant impact on freezing time ratio ($P < 0.05$), but the sound intensity and electric shock intensity had no significant impact (P

【基金项目】江苏省高校自然科学研究面上项目(17KJB360013);江苏省卫生职业技术教育研究项目(JZ201701);苏州高职高专院校优秀科技创新服务团队(SZGZTD201704);江苏省‘青蓝工程’资助。

Funded by Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions (17KJB360013), Jiangsu Province Teaching and Research Section Funds (JZ201701), Suzhou Science and Technology Innovation Team (SZGZTD201704), Qing Lan Project of Jiangsu Province.

【通信作者】郭冷秋(1975—)女,副教授,博士。研究方向:中药神经药理学。Email:glq3@sina.com

> 0.05). The optimal experimental conditions were as follows: 75 dB sound, 0.8 mA electric shock, and 15 cycles. Fear memory was maintained at 24 h and 1 week after the establishment of the model, which was significantly different from that of the control group ($P < 0.001$ and $P < 0.05$). Fear memory had faded 2 weeks later, at which point there was no significant difference in freezing time ratio between the model and control groups ($P > 0.05$). **Conclusions** This experiment clarifies the primary and secondary factors that influence the establishment of a rat model of conditioned fear memory. The optimal experimental method for model establishment are identified. This study lays a foundation for the standardization and normalization of fear memory model.

【Keywords】 conditioned fear memory; animal model; orthogonal experiment; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着经济的发展和社会的进步,情绪障碍性疾病(如焦虑、失眠、创伤后应激障碍等)的发病率呈现日益增高的趋势。负性情绪(尤其是恐惧)记忆消除障碍是本类疾病发生发展的关键^[1],探讨如何有效消退由创伤经历引起的恐惧记忆、消除和降低病人的恐惧反应,具有重要的意义^[2]。恐惧记忆动物模型的建立是本类疾病发病机制研究和药物研发的关键。基于巴甫洛夫条件反射原理的条件恐惧(fear conditioning)模型是目前公认的和应用最为广泛的恐惧记忆动物模型^[3]。该模型将条件刺激(中性刺激,CS,如:声音)与非条件刺激(恐惧刺激,US,如:电击)进行多次匹配联结(CS-US)训练后,即使单独呈现CS也可引发动物的恐惧反应^[4]。CS-US 联结训练是形成动物恐惧反应和建立恐惧记忆的关键。然而目前缺乏统一可循的标准和参考,不同的研究者往往采用不同的参数条件,导致模型的重复性和可借鉴性差,进而影响实验结果的可靠性。本研究利用正交实验设计,优选建立条件恐惧记忆模型的最佳实验参数;并对所建立的模型进行恐惧记忆保持的短期(24 h)和长期(1周、2周、4周和8周)水平检测,以考察优选条件下建立的模型的可靠性和稳定性,为相关研究提供可借鉴的实验的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

6~8 周龄清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 160~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2012-2002】,饲养在苏州大学实验动物中心的 SPF 级实验室【SYXK(苏)2016-0049】。明暗周期为 12 h/12 h(光照时间 7:00~19:00)、室温 22~26℃ 条件,自由摄食和饮水。适应 7 d,期间每天由实验者抚摸大鼠 3 min,并放入条件恐惧箱适应 5

min,取出后用 75%酒精擦拭箱体以去除遗留气味。所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:SWAE201902)。

分组:(1)正交试验:大鼠随机分为 9 组,每组 7~8 只,按照正交试验表 $L_9(3^4)$ 安排实验,三个因素分别为声音强度(因素 A)、电击强度(因素 B)和 CS-US 配对循环次数(因素 C),每个因素各取三个水平,因素水平见表 1,9 个实验组具体参数安排见表 2。(2)恐惧记忆保持测试:大鼠随机分为模型组和对照组,每组 9 只,模型组以实验(1)所确定的试验参数进行训练,对照组不进行条件恐惧训练,其他条件同实验组。

1.1.2 仪器设备

Panlab 条件恐惧与惊跳结合系统(Startle and Fear Combined System,美国 Harvard 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠正常行为模式检测

实验大鼠在条件恐惧箱内适应 3 min 后,记录 20 min 内的活动情况,计算木僵反应时间占总测试时间的百分比(freezing time ratio)。连续记录 3 d,取 3 d 的平均值进行统计分析。

1.2.2 大鼠对声音(CS)的基础反应

实验大鼠在条件恐惧箱内适应 3 min 后,不同组别大鼠按照正交试验设计表(见表 2)分别给予相应强度的 CS,每次持续 10 s,共 10 次,间隔 90~150 s(平均 120 s,随机出现)。记录大鼠在 CS 持续时间内的 freezing time ratio。

1.2.3 条件恐惧记忆模型的建立

实验大鼠在条件恐惧箱适应 3 min 后,按照正交试验设计表(见表 2),进行 CS-US 配对训练(CS 持续 10 s,结束之前 0.5 s 给予电击(US),声音电击同时结束),此为一个循环(trial);此后每间隔 90~150 s(平均 120 s,随机出现)1 个 trial。统计大鼠在 10 个 trial 中的 freezing time ratio。

表1 实验因素与水平

Table 1 Experimental factors and levels

| 水平 Levels | 因素 Factors | | |
|--------------|----------------------|-------------------------------|-------------|
| | A 声音强度 | B 电击强度 | C 循环次数 |
| | Sound intensity (dB) | Electric shock intensity (mA) | Cycle times |
| 1 | 70 (A1) | 0.5 (B1) | 5 (C1) |
| 2 | 75 (A2) | 0.8 (B2) | 10 (C2) |
| 3 | 80 (A3) | 1.0 (B3) | 15 (C3) |

1.2.4 恐惧记忆表达检测

条件恐惧记忆建立 24 h 后,再次将大鼠放入条件恐惧箱,3 min 后给予训练时的 CS(不给予 US),共 10 次,每次持续 10 s,间隔时间为 120 s。统计大鼠在 CS 持续时间内的 freezing time ratio。对实验结果进行直观分析和方差分析,明确影响恐惧记忆形成的因素主次,确定最优试验条件。

1.2.5 恐惧记忆保持检测

利用上述实验确定的最优试验条件,建立大鼠恐惧记忆模型,并对大鼠进行短时(24 h)和长时(1周、2周、4周和8周)恐惧记忆的保持检测。方法同 1.2.4。

1.3 统计学方法

实验结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。正交试验数据使用 Minitab17 进行方差分析;其他行为学数据计算及统计图由 GraphPad Prism 5.0 软件生成。

2 结果

2.1 大鼠正常活动模式

各组大鼠在条件恐惧建立前正常活动的 freezing time ratio 见图 1,单因素方差分析结果表明,各组之间差异无显著性($P = 0.9996$, $F = 0.07885$)。

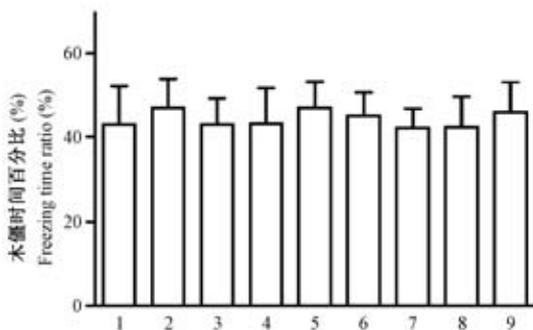


图1 各组大鼠正常活动时木僵反应时间百分比
Figure 1 Freezing time ratio of the rats in each group during normal activities

2.2 大鼠对 CS 的基础反应

各组大鼠在 CS 持续时间内 freezing time ratio 见图 2,单因素方差分析结果表明,各组之间差异无显著性($P = 0.9998$, $F = 0.06774$)。

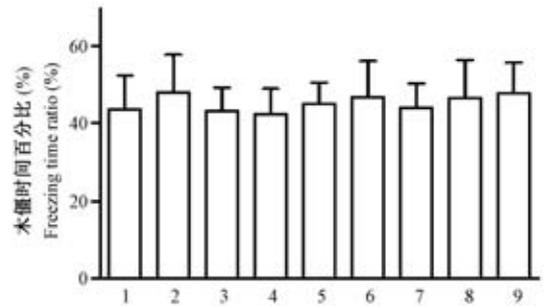


图2 各组大鼠对 CS 的基础反应

Figure 2 Basic response of the rats to CS in each group

2.3 恐惧记忆的表达

条件恐惧记忆建立后 24 h 各组大鼠 freezing time ratio 见表 2。比较各因素的极差 R,发现各因素影响能力排序为 $A = C > B$ 。其中 5 号实验($A_2B_2C_3$)结果最好,木僵时间达到 82%,故建立大鼠条件恐惧模型最佳条件为 $A_2B_2C_3$,即声音 75 dB,电击强度 0.8 mA,循环 15 次;方差分析结果(表 3)表明,因素 C 对实验结果有显著影响($P < 0.05$),因素 A,B 对实验结果影响不显著($P > 0.05$)。因此 C 为主要因素,A、B 为次要因素。按照方差分析观点,只需对有显著影响的因素选择最佳水平,而其他对试验结果影响较小的因素,可按实际需要选择适当的水平。因此实验中最优条件是 $A_2B_2C_3$,与直观分析结果一致。

2.4 恐惧记忆的保持

利用优化后的实验参数建立条件恐惧记忆模型,在建模后的第 24 h 和 1 周时,模型组大鼠 freezing time ratio 与对照组比较差异具有显著性($P < 0.001$ 和 $P < 0.05$)。第 2 周后,恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。实验结果见图 3。

表 2 正交试验设计及直观分析结果

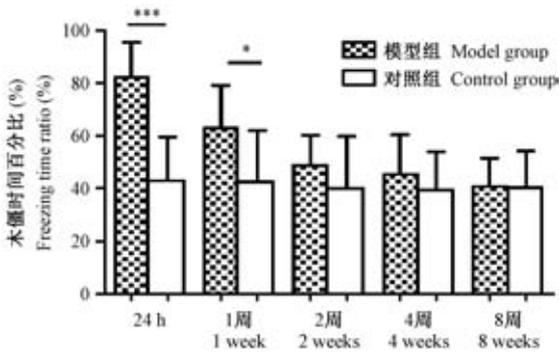
Table 2 Design of the orthogonal test and results of intuitive analysis

| 试验号 Test No. | 动物数(n) Number of animals | 声音强度(A) Sound intensity | 电击强度(B) Electric shock intensity | 循环次数(C) Cycle times | 木僵时间(%) Freezing time ratio |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 1 | 8 | 70 | 0.5 | 5 | 63 |
| 2 | 7 | 70 | 0.8 | 10 | 75 |
| 3 | 7 | 70 | 1.0 | 15 | 77 |
| 4 | 8 | 75 | 0.5 | 10 | 77 |
| 5 | 8 | 75 | 0.8 | 15 | 82 |
| 6 | 8 | 75 | 1.0 | 5 | 75 |
| 7 | 8 | 80 | 0.5 | 15 | 69 |
| 8 | 8 | 80 | 0.8 | 5 | 59 |
| 9 | 8 | 80 | 1.0 | 10 | 75 |
| K ₁ | | 215 | 209 | 197 | |
| K ₂ | | 234 | 216 | 227 | |
| K ₃ | | 203 | 227 | 228 | |
| K ₁ | | 72 | 70 | 66 | |
| K ₂ | | 78 | 72 | 76 | |
| K ₃ | | 68 | 76 | 76 | |
| R | | 10 | 6 | 10 | |
| 因素主次 | | | A=C>B | | |

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

| 方差来源 Variance | 偏差平方和 SS | 自由度 df | F | P |
|------------------|-------------|-----------|-------|--------|
| 声音(A) | 0.0162889 | 2 | 17.05 | > 0.05 |
| 电击(B) | 0.0054889 | 2 | 5.74 | > 0.05 |
| 循环次数(C) | 0.0206889 | 2 | 21.65 | < 0.05 |



注:恐惧记忆建立后不同时间点检测,与对照组比较, *P< 0.05, *** P< 0.001。

图 3 恐惧记忆保持测试结果

Note. Compared with the control group at different times after fear memories built up, *P< 0.05, *** P< 0.001.

Figure 3 Results of the fear memory retention test

3 讨论

建立具有较好的稳定性和可重复性的动物模型是研究疾病发病机制和治疗药物的前提和基础。基于巴普洛夫条件反射原理的条件恐惧记忆动物

模型,广泛用于恐惧症、PTSD 等恐惧相关性疾病的研究^[5]。然而模型建立的成功与否受到诸多因素的影响,如电击(US)的强度、声音刺激(CS)强度及CS-US 配对训练次数等。成功的模型以既能引起动物产生明确的恐惧反应,且又不对动物造成生理性的伤害为目标^[6]。目前各研究室采用的实验条件不尽相同,虽然都能在一定程度上反映动物的恐惧记忆,但是不同条件建立的模型的稳定性和持续性往往存在差异,因而难以保证实验结果的一致性和可靠性。宋海滨等^[7]曾比较和评价了 KM 和 C57BL/6 小鼠在用不同电击强度进行训练时恐惧性记忆建立的差异;郭呈斌等^[8]报道了足底电击诱导树鼯条件恐惧记忆模型的建立及抹除方法。但目前关于大鼠恐惧记忆建立的方法学评价,尚未见报道。本研究在文献研究的基础上^[9-12],利用正交试验,考察和评价了电击(US)强度、声音(CS)强度和CS-US 配对训练次数3个因素在3个不同水平上对实验结果影响的。正交试验直观分析表明,各因素影响能力依次为声音强度=循环次数>电击强度(表2);方差分析表明,循环次数对实验结果有显著

性影响($P < 0.05$),声音强度和电击强度影响不显著($P > 0.05$)(表 3)。因此确定最优实验条件为:声音 75 dB,电击强度 0.8 mA,CS-US 配对循环训练 15 次。模型稳定性测试结果表明,大鼠在 1 周内恐惧记忆保持良好,与对照组比较差异显著;2 周后,恐惧记忆逐渐消退,与对照组比较差异不显著(图 3)。

因 CS-US 配对训练次数是影响实验结果的显著因素,提示我们,若要建立稳定表达的恐惧记忆动物模型,可以适当增加训练的次数或训练周期。表 3 可见,电击强度为 1 mA 时 freezing time ratio 最高为 77%,而 0.8 mA 的结果为 82%,提示并非电击强度越大恐惧记忆表达越好,这种现象可能反映了应激反应的程度对记忆固化过程的影响,此结果与 Anagnostaras 等^[13]的研究一致。此外,模型建立前我们还检测了大鼠正常的活动模式以及对 CS 的基础恐惧反应,考察模型的可靠性。结果可见,大鼠在条件恐惧建立后的 freezing time ratio(表 2)与正常活动模式(图 1)相比较有明显提高;大鼠对 CS 的基础反应(图 2)与正常活动模式(图 1)比,无明显变化。这些结果表明,CS-US 配对训练后 freezing time ratio 的增加并非是对声音的恐惧所导致的,而是条件恐惧记忆建立的结果。

综上所述,本研究明确了建立大鼠条件恐惧记忆模型影响因素的主次,优化了实验条件,并考察和评价了模型的稳定性和可靠性,为条件恐惧记忆模型的标准化、规范化及后续研究提供了可借鉴的实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] Yue J, Shi L, Lin X, et al. Behavioral interventions to eliminate fear responses [J]. *Life Sciences*, 2018, 61(6): 625-632.
- [2] Young MB, Andero R, Ressler KJ, et al. 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine facilitates fear extinction learning [J]. *Trans Psychiatry*, 2015, 5: e634.
- [3] VanElzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, et al. From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and in anxiety disorders [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2014, 113: 3-18.
- [4] Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 897-931.
- [5] Pace-Schott EF, Germain A, Milad MR. Effects of sleep on memory for conditioned fear and fear extinction [J]. *Psychol Bull*, 2015, 141(4): 835-857.
- [6] Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(7): 1773-1802.
- [7] 宋海滨,李春林,金毅,等.两种小鼠恐惧记忆模型建立的比较研究 [J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(12): 1076-1077. Song HB, Li CL, Jin Y, et al. Strain-dependent difference in fear conditioning mouse model [J]. *Chin J Behav Med Sci*, 2006, 15(12): 1076-1077.
- [8] 郭呈斌,张晨,王烈成.足底电击诱导树鼠句条件恐惧记忆模型的建立及抹除 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(10): 1426-1430. Guo CB, Zhang C, Wang LC. A novel fear conditioning memory model formation and erasing by foot-shock in tree shrew [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2015, 50(10): 1426-1430.
- [9] 刘佳佳,潘霄,严进,等.大鼠恐惧应激模型的建立及指标筛选 [J]. *实用医药杂志*, 2011, 28(5): 447-450. Liu JJ, Pan X, Yan J, et al. Fear stress model in rats and index selection [J]. *Pract J Med Pharm*, 2011, 28(5): 447-450.
- [10] 张钰,李敏. D-环丝氨酸促进大鼠条件性恐惧消退记忆的长期保持 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(9): 951-953. Zhang Y, Li M. Promotion effect of D-cycloserine on long-term retention of rat extinction memory of conditioned fear [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2011, 33(9): 951-953.
- [11] 韩要武,赵乐章,刘巧琼,等.条件恐惧训练对 F344 大鼠行为活动的影响 [J]. *中国行为医学科学*, 2004, 13(6): 26-27. Han YW, Zhao LZ, Liu QQ, et al. Effect of conditioned fear training on behavioral activity in F344 rats [J]. *Chin J Behav Med Sci*, 2004, 13(6): 26-27.
- [12] 杨娇娇,孙晓茹,张慧,等.右美托咪定对创伤后应激障碍大鼠焦虑状态和认知功能的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(8): 797-800. Yang JJ, Sun XR, Zhang H, et al. Influence of dexmedetomidine on the state of anxiety and cognitive function in rats with PTSD [J]. *J Clin Anesthesiol*, 2015, 31(8): 797-800.
- [13] Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(3): 1106-1114.

[收稿日期] 2019-01-05

朱华,郭亚茜,杜晓鹏,等. 无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* 双转基因小鼠模型建立及脑内斑块变化初步观察[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 521 - 526.

Zhu H, Guo YP, Du XP, et al. Establishment of germ free *APP^{swe}/PS1 Δ E9* transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 521 - 526.

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2019. 04. 015

无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* 双转基因小鼠模型建立及 脑内斑块变化初步观察

朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 李卓, 秦川*

(卫健委人类疾病比较医学重点实验室, 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, 北京 100021)

【摘要】 目的 使用剖宫产净化方法建立无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* (PAP) 双转基因小鼠模型并对动物脑内斑块沉积情况进行初步观察, 为研究肠道菌群与阿尔茨海默症关系提供新的动物模型。方法 选择阳性 PAP 雄性杂合子鼠与经产的 C57 野生型雌鼠 1:2 进行交配。怀孕母鼠在超净工作台内进行剖宫产手术, 用无菌 ICR 小鼠代乳。术后每个月进行无菌状态检测; PCR 方法检测剖宫产所得 PAP 仔鼠的基因型; 免疫组化方法定量检测 9 月龄 PAP 小鼠脑内斑块变化情况。结果 实施剖宫产手术 12 例, 获仔鼠 66 只, 剖宫产存活率及离乳存活率分别为 95. 45% (63/66) 和 95. 24% (60/63), 净化后按国标检测无菌状态均为合格。免疫组化结果显示 9 月龄无菌 PAP 小鼠海马内斑块较同月龄 SPF 级动物减少。结论 通过剖宫产净化技术去除了 PAP 小鼠携带的菌群, 9 月龄无菌 PAP 小鼠脑内斑块减少。

【关键词】 转基因小鼠; 无菌动物; 剖宫产; 淀粉样斑块

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0521-06

Establishment of germ free *APP^{swe}/PS1 Δ E9* transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain

ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LI Zhuo, QIN Chuan*

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

Corresponding author: QIN Chuan. E-mail: qinc@cnilas.org

【Abstract】 Objective To establish a germ-free mouse strain to provide a new animal model for studies on the relationship between gut flora and Alzheimer's disease and the changes of amyloid plaques in the brain, by establishing a *APP^{swe}/PS1 Δ E9* (PAP) transgenic mouse model using a cesarean section decontamination technique. **Methods** Cesarean section was performed on pregnant PAP mice to obtain pups under a SPF barrier environment, and the pups were then transferred to female germ-free ICR mice that served as foster mothers. Survival rates of the pups were calculated at 7 days of age and after weaning. Pathogens were tested each month according to the national standards. The newborn PAP mice were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). The deposition of A β plaques in brain tissue were observed using

【基金项目】 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005, 2016-12M-2-006)。

Funded by CAMS Innovation Foundation for Medical Sciences (CIFMS) Grant (2017-12M-2-005, 2016-12M-2-006)。

【作者简介】 朱华, 主任技师, 研究方向: 疾病与肠道微生态。Email: zhuh@cnilas.org

【通信作者】 秦川, 教授, 博士生导师。研究方向: 病理与病理生理学。Email: qinc@cnilas.org

immunohistochemical staining. **Result** 12 cesarean sections were performed on pregnant PAP mice, and a total of 63 pups were collected and transferred to a foster mother. The survival rate of pups after cesarean section and weaning was 95.45% (63/66) and 95.24% (60/63), respectively. Pathogens were tested after decontamination, and all the pups were pathogen-negative, thus met the requirement of germ-free mice. The deposition of A β plaques was lower in the germ-free PAP mice than in SPF mice of the same age. **Conclusions** A germ-free PAP mouse model is established by cesarean section and foster mother technique. This new animal model can be used for studies on the relationship between gut flora and Alzheimer's disease and the changes of amyloid plaques in the brain tissue.

【Keywords】 transgenic mice; germ-free mice; cesarean section; amyloid plaques; Alzheimer's disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以记忆丧失和认知减退为主要临床症状的大脑神经退行性疾病。特征性的病理学表现有: β 淀粉样肽 (β amyloid peptides, A β) 沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结^[1-2]。目前有关 AD 的病因仍然不明确且临床上无有效的防治措施。随着对脑-肠-微生物菌群 (brain-gut-microbiota axis, BGM) 概念的提出, 肠道菌群对 AD 的调控作用越来越受到关注^[3], 但目前缺乏菌群与特定基因关系研究的动物模型。APP^{swede}/PS1 Δ E9 (PAP) 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型由中国医学科学院医学实验动物研究所比较医学重点实验室构建培育。该模型以 C57BL/6J 小鼠为背景, 含有人 APP^{swedish} 突变位点和人 PS1 Δ E9 突变位点。其在 3 月龄出现学习和记忆缺陷, 4.5 月龄开始出现老年斑, 12 月龄出现大量老年斑, 具有和 AD 患者相似的病理表型。是目前常用的 AD 动物模型^[4]。本研究采用剖宫产技术对 PAP 小鼠进行无菌化, 并对其病理表型进行初步观察, 为研究肠道菌群与 AD 间关系提供一种新的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

用于繁殖的 PAP 阳性雄鼠和野生型 C57BL/6J 雌鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2014-0004】。体重 (20 \pm 2) g, 无菌带乳 ICR 母鼠由本实验室繁育。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所隔离设施内进行【SYXK-(京)2018-0004】。本实验中动物的使用已获得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 (IACUC) 批准, 批准号: ZH17003。

1.1.2 试剂与仪器

RIPA 裂解液购自江苏碧云天公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (APS)、Tris-HCl、甘氨酸、TEMED、Tween-20 购自美国 Sigma 公司; N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺购自美国 Bio-Rad 公司; 磷酸酶抑制剂购自美国 Thermo 公司; GAPDH、超敏二步法免疫组化检测试剂盒及含有 DAPI 的水溶性封片剂均购自北京中杉金桥公司。使用的主要仪器有: ZHJH-C1118C 型超净台、凝胶成像系统 (上海天能公司)、组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica)、IQ5PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠的准备

选择 10~16 周龄经检测为阳性的健康 PAP 雄性杂合子鼠 10 只, 与经产的 10~16 周龄 C57BL/6J 雌鼠野生型小鼠 1:2 进行交配, 记录交配日期。隔离器内无菌代乳鼠提前 48 h 交配。每日上下午检查一次母鼠阴道口是否有阴栓。见有阴栓作为 0 天, 开始计算孕期。已确诊受孕的母鼠与雄鼠分开单独饲养。

1.2.2 剖宫产净化

小鼠受孕 17 d 开始密切观察动物, 当受孕小鼠食欲突然下降, 烦躁不安, 有作窝行为, 经触诊其耻骨已打开 5 mm 左右, 外阴潮红并处于开口状态, 此时受孕小鼠已临产, 可进行子宫摘除术。剖宫产手术在 36~38 $^{\circ}$ C 环境中进行: 牺牲母鼠, 快速分离子宫, 连同止血钳一起迅速转入装有 2% 过氧乙酸的渡槽, 停留 30 s, 传入隔离器内。传入隔离器内的子宫用 5% NaHCO₃ 溶液中和子宫表面残留的过氧乙酸后摊在纱布上, 用带齿镊子将子宫及羊膜撕破, 取出胎仔。迅速擦去胎仔鼻和口部的羊膜及羊水。健康的仔鼠开始张口呼吸, 没有呼吸的要轻轻触压胸部促其呼吸, 必要时用镊子轻夹尾根, 使其发出

叫声,引发呼吸。开始呼吸的仔鼠将由紫红色渐渐变为鲜红色。

将呼吸正常的剖宫产仔鼠,放入代乳母鼠的原盒内。用代乳母鼠亲仔的粪便连同垫料涂抹代乳仔鼠,使失去原气味。此时留一部分亲仔共同哺乳,待母鼠接受代乳后,可除去亲仔。代乳仔鼠 20~25 d 离乳。

1.2.3 无菌状态维持及检测

离乳的小鼠转移至其他隔离器饲养。每个月取隔离器内饲料、垫料、饮水、小鼠粪便送卫健委实验动物质量检测中心进行无菌状态检测并出具正式报告。

1.2.4 转基因阳性动物的鉴定

子代小鼠出生 9~14 d 内剪趾法标记,收集剪下的组织按照文献^[4]的方法进行基因型鉴定。

1.2.5 脑内斑块染色

小鼠脱颈椎处死后取左半脑固定于福尔马林溶液中 24 h、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,制作厚度为 5 μm 横断面石蜡切片,隔 3 取 1。切片贴到经多聚赖氨酸处理过的玻片上,按照文

献^[4]的方法对 9 月龄无菌 PAP 转基因阳性小鼠及同月龄 SPF 级小鼠海马和皮层内斑块进行免疫组化染色,观察斑块数量变化。切片光镜下观察后用 Aperio 切片扫描系统对切片进行扫描,随机截取 5 个高倍视野(400 \times),采用 Image-Pro PLUS 图像分析系统对阳性细胞数和光密度值(IOD)进行分析。每只动物计数 3 张切片,取平均值。

1.3 统计学方法

实验结果用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,SPSS22.0 软件进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 剖宫产手术及代乳情况

用来交配的 20 只母鼠中,13 只观察到有阴栓,其中一例母鼠在 18.5 d 自然分娩,其余 12 例实施剖宫产手术,剖得仔鼠 66 只(表 1)。其中有 3 只为死胎 ICR 无菌母鼠不予代乳,其余 63 只用母鼠成功代乳至离乳。到离乳时存活 60 只,剖宫产存活率和例如存活率分别为 95.45% 和 95.24%。

表 1 PAP 小鼠剖宫产手术及代乳情况

Table 1 Caesarean section and fostering results of the PAP mice

| 孕鼠编号 ID No. | 剖得仔鼠数(只) Number of pups been collected | 予以代乳数(只) Number of pups been fostered | 剖宫产成活率(%) Survival rate of caesarean section (%) | 离乳只数(只) Survival number of weaning pups | 离乳成活率(%) Survival rate of weaning pups (%) |
|----------------|--|---|--|---|--|
| PAP1 | 5 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| PAP2 | 6 | 5 | 83.33 | 5 | 100 |
| PAP3 | 5 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| PAP4 | 4 | 3 | 75 | 1 | 33.33 |
| PAP5 | 6 | 5 | 83.33 | 5 | 100 |
| PAP6 | 6 | 6 | 100 | 6 | 100 |
| PAP7 | 5 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| PAP8 | 7 | 6 | 85.71 | 6 | 100 |
| PAP9 | 6 | 6 | 100 | 6 | 100 |
| PAP10 | 5 | 5 | 100 | 4 | 80 |
| PAP11 | 5 | 5 | 100 | 5 | 100 |
| PAP12 | 6 | 6 | 100 | 6 | 100 |

2.2 转基因阳性动物的鉴定

部分无菌 PAP 小鼠基因鉴定结果见图 1,携带 *APP^{swe}/PS1* 基因的阳性鼠可见清晰 PCR 扩增条带,与目的片段大小相符,阴性鼠无条带(图 1)。剖出的阳性鼠在 9 月龄、12 月龄安乐时可见盲肠巨大,符合无菌动物的生物学特性(图 2)。

2.3 无菌状态维持及检测

按照 GB/T14926.41、43-2001, GB14922.2-2011 进行无菌状态检测。检测结果合格(图 3)。

2.4 脑内斑块检测

9 月龄无菌化 PAP 小鼠(图 4A)及 SPF 级(图 4B)脑内斑块含量免疫组化结果。无菌 PAP 小鼠海马内斑块减少,皮层内斑块数量未见显著性差异(表 2)。

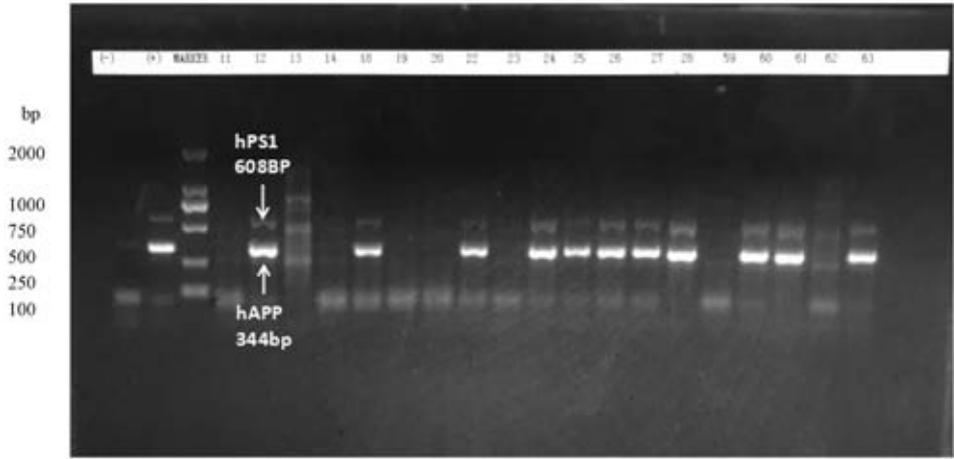


图 1 部分 PAP 小鼠 PCR 鉴定凝胶电泳图

Figure 1 PCR identification of a part of PAP mice by gel electrophoresis

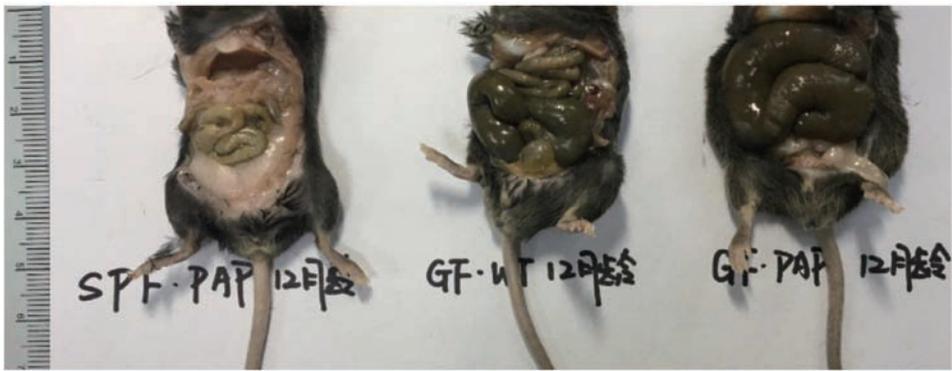


图 2 无菌 PAP 小鼠的盲肠

Figure 2 Cecum of the germ-free PAP mice

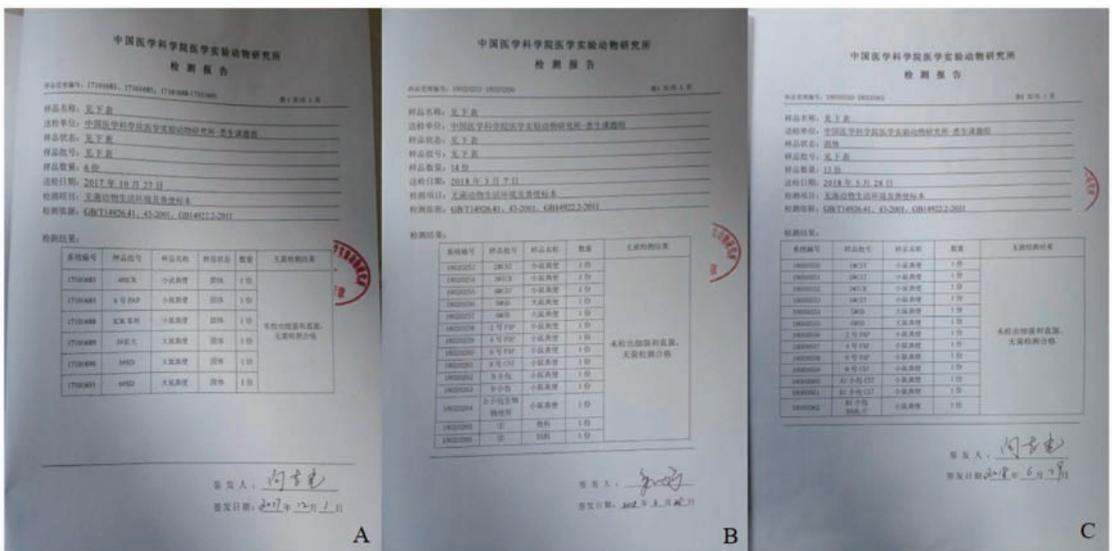


图 3 PAP 小鼠剖宫产净化后无菌检测结果

Figure 3 Pathogen test results after caesarian section in the PAP mice

表 2 PAP 小鼠脑内斑块沉积情况及细胞光密度值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 2 Senile plaques deposition and IOD in brain tissues of the PAP mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

| 组别 Groups | 海马 Hippocampus | | 皮层 Cortex | |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | 阳性细胞数 Number of positive cells | 光密度值 IOD | 阳性细胞数 Number of positive cells | 光密度值 IOD |
| 无菌 PAP 小鼠 Germ-free PAP mice | 11.32 ± 3.73* | 1987.64 ± 79.62* | 8.57 ± 2.88 | 1431.62 ± 132.113 |
| SPF 级 PAP 小鼠 SPF PAP mice | 17.46 ± 3.78 | 2864.37 ± 198.45 | 9.24 ± 2.62 | 1716.71 ± 159.71 |

注:与 SPF 级 PAP 小鼠相比, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the SPF PAP mice, * $P < 0.05$.

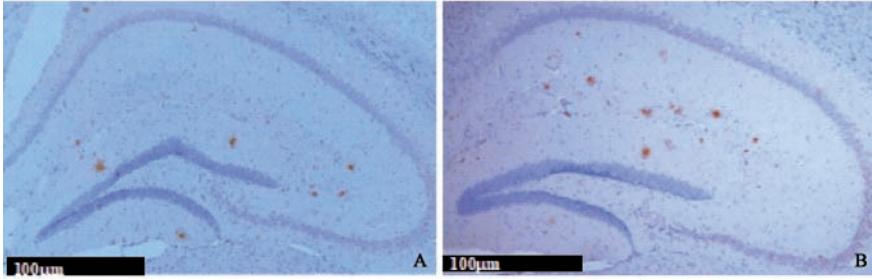


图 4 PAP 小鼠脑内斑块检测结果

Figure 4 IHC staining of senile plaques in brain tissues of the PAP mice

3 讨论

无菌动物是指通过无菌剖宫产手术或无菌胚胎移植进行无菌化获得的动物,利用无菌饲养方法维持于无菌隔离器,利用现有方法检测不到活的微生物和寄生虫的动物^[5]。作为微生物背景最清晰的动物,可对菌群、基因及饮食等环境因素进行有效控制,是研究肠道菌群(gut microbiota, GM)对人类疾病及健康影响的最有效动物模型之一^[6-7]。遗传工程动物是研究是研究特定基因功能的重要工具,将无菌动物技术与遗传工程动物结合建立无菌化小鼠人类疾病动物模型,可揭示某种特定基因引起的表型变化与肠道菌群之间的关系,为研究肠道菌群与疾病关系提供了更多的模型选择。

无菌动物有自己的生物学特点:发育和体重增长缓慢,每窝产仔数减少^[8]。PAP 双转小鼠作为基因工程动物,由于基因组经过人工改造,繁殖力和免疫力都受到影响。因此与其他常规品系小鼠剖腹净化及动物相比,剖宫产及动物繁育过程中有更多需要注意的操作细节:①微生物质量控制:剖宫产净化的一个缺点是不能去除可通过胎盘垂直传播的病原体,因此在选择用来交配的转基因和野生型小鼠时就要进行严格的微生物质量控制:选用符合 SPF 级动物标准的 PAP 雄鼠和野生型雌鼠;孕鼠的交配在 SPF 级设施内进行;尽量避免由动物本身

带来的污染。②严格无菌操作:剖宫产手术在超净台内完成,手术中严格执行无菌操作:超净台除紫外灯照射消毒外,还要用酒精擦拭台面。高压灭菌的手术器械在超净台内才能打开,保证每只孕鼠一套手术器械,连续手术时两个手术之间也要对台面进行消毒。因超净台内有气流,剖宫产手术在电热毯上进行以保证适宜温度。③剖宫产时机的选择:经产鼠的孕期较初产鼠的准确,但仍不宜以见栓后天数为主要剖宫产指征,必需结合动物的表现进行判断。实施剖宫产手术 12 只动物的孕期从 17.5 d 到 21 d 不等,差异很大。我们的经验是在 17 d 左右开始仔细观察动物,当受孕小鼠食欲突然下降,烦躁不安,有作窝行为,外阴潮红并处于开口状态,结合触诊判断趾骨已打开 5 mm 左右时为最佳剖宫产时机。

本研究中由于技术人员剖宫产技术操作熟练、注重操作细节及无菌动物每窝产仔数少但成活率高生物学特性等原因,剖宫产存活率(95.45%)与离乳存活率(95.24%)均较高,但孕鼠每胎产仔数低于封闭群及单转基因小鼠剖宫产净化相关文献^[9-11],可能与双转基因动物繁殖能力降低有关。无菌动物的体重增长较缓慢,为模型小鼠后期的正常发育,我们延长了小鼠离乳的时间。经剖宫产净化的 PAP 小鼠脑内斑块含量发生改变,提示肠道菌群可能与斑块形成有关,相关研究正在进行中。

本研究将无菌技术应用于研究阿尔茨海默症常用的 APP^{swe}/PS1 双转基因小鼠,建立了无菌化 PAP 小鼠模型,为研究肠道菌群与阿尔茨海默症之间的关系提供一种新的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Hong SY, Jeong WS, Jun M. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Molecules*, 2012, 17 (9): 10831-10845.
- [2] Shih PH, Chan, YC, Liao JW, et al. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21 (7): 598-605.
- [3] Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, et al. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior [J]. *J Psychiatr Res*, 2015, 63: 1-9.
- [4] Song N, Zhang L, Qin C. et al. Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside activates peroxisome proliferator-activated receptor - γ and alleviates cognitive impairment in the APP^{swe}/PS1 Δ E9 mouse model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 9(9):1786-1800.
- [5] Wostmann BS, Pleasants JR. The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991, 198(1): 539-546.
- [6] Faith JJ, Rey FE, O' Donnell D, et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice [J]. *ISME J*, 2010, 4(9): 1094-1908.
- [7] Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(4):1157-1170.
- [8] 王荫槐, 王钜. 悉生动物学 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2003.
Wang YH, Wang J. Gnotobiotic animals [M]. Shenyang: Liaoning University Press, 2003.
- [9] 张辰子, 杨林, 夏冠玲, 等. APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因小鼠的剖宫产净化技术研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(7): 50-54.
Zhang CZ, Yang L, Xia GL, et al. Study of decontamination technique among APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mice using caesarian section [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(7):50-54.
- [10] 乔欣, 李胜利, 焦昆, 等. ICR 母鼠代乳在长爪沙鼠剖宫产净化中的应用 [J]. *实验动物科学*, 2011, 28(2):37-43.
Qiao X, Li SL, Jiao K, et al. Foster nursing by ICR mice in the cleaning of gerbils through cesarotomy [J]. *Lab Ani Sci*, 2011, 28(2):37-43.
- [11] 卢笑丛, 徐国景, 戴涌, 等. 使用超净工作台实施子宫摘除术净化 KM 小鼠的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(4): 208-210.
Lu XC, Xu GJ, Dai Y, et al. Study on the purification of Kunming mouse strain by hysterectomy in the situation of bacteria free [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2003, 11(4): 208-210.

[收稿日期] 2019-02-26

俞发荣,李建军,连秀珍,等. 精神依赖物海洛因对大鼠胚胎发育和脑组织 Bax 表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4):527 - 531.

Yu FR, Li JJ, Lian XZ, et al. Effects of heroin on embryonic development and Bax expression in embryonic rat brain tissue [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):527 - 531.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.016

精神依赖物海洛因对大鼠胚胎发育和脑组织 Bax 表达的影响

俞发荣, 李建军, 连秀珍, 李登楼, 谢明仁*

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室(甘肃政法大学), 兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨精神依赖物海洛因对胚胎大鼠发育和大脑 Bax 表达的影响。**方法** 将受孕后的 Wistar 大鼠随机分为对照组和海洛因给药组(分为海洛因低、中、高剂量组)。第7天,分别给予 16、32 和 64 mg/kg 的海洛因,连续给予海洛因 9 d,观察精神依赖物海洛因对胚胎大鼠形态结构发育的影响,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测胚胎大脑组织 Bax 表达水平。**结果** 胚胎观察发现,海洛因低、中、高剂量组活胚胎总数比对照组分别减少了 27.27%、37.12% 和 48.48%;海洛因低剂量组胚胎枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形;海洛因中剂量组胚胎枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显;海洛因高剂量组胚胎枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显。ELISA 检测发现,海洛因低、中、高剂量组胚胎大脑组织中 Bax 表达水平比对照组分别增加了 11.41%、47.06%、83.74%,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$);胚胎小脑组织中 Bax 表达水平比对照组增加了 17.16%、52.96% 和 90.01%,差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 精神依赖物海洛因具有明显抑制胚胎大鼠形态结构发育的作用,抑制作用随给予海洛因剂量的增加而增强,其作用机制可能与海洛因诱导胚胎组织器官 Bax 表达上调有关。

【关键词】 海洛因;胚胎发育;Bax 表达;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0527-05

Effects of heroin on embryonic development and Bax expression in embryonic rat brain tissue

YU Farong, LI Jianjun, LIAN Xiuzhen, LI Denglou, XIE Mingren*

(Gansu University of Political Science and Law, Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application, Lanzhou 730070, China)

Corresponding author: XIE Mingren. E-mail: xmr6700@gsli.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of heroin on the development and brain Bax expression in embryonic rat brain tissues. **Methods** Wistar rats were randomly divided into a control group or heroin administration groups (low, medium, and high dose groups). On the 7th day, 16, 32, and 64 mg/kg of heroin were administered to the low, medium, and high dose groups, respectively, and heroin was continuously administered for 9 days. The effects of heroin on morphological development of embryonic rats were measured, and the expression levels of Bax in embryonic brain tissues was detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The total numbers of living embryos in the

【基金项目】 甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA158);甘肃省高校科技创新团队项目(2016C-09);兰州市科技计划项目(2015-3-80);兰州市人才创新创业项目(2016-RC-85);西北民族地区侦查理论与实务研究中心项目。

Funded by Gansu Natural Science Foundation Project (17JR5RA158), Gansu University Science and Technology Innovation Team Project (2016C-09), Lanzhou City Science and Technology Plan Project (2015-3-80), Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2016-RC-85), and Northwest Ethnic Region Detection Theory and Practice Research Center Funding.

【作者简介】 俞发荣(1959—)男,研究员,博士,硕士生导师。研究方向:法医毒物毒理学及实验动物学。Email: tim9898@163.com

【通信作者】 谢明仁(1977—),男,副教授,硕士生导师。研究方向:证据科学技术。Email: Xmr6700@gsli.edu.cn

low, medium, and high dose heroin groups were decreased by 27.27%, 37.12%, and 48.48%, respectively, compared with the control group ($P < 0.01$). Bax expression levels in embryonic cerebral tissues of the low, medium, and high dose heroin groups were increased by 11.41%, 47.06%, and 83.74%, respectively, compared with the control group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). Bax expression levels in the embryonic cerebellar tissue were increased by 17.16%, 52.96%, and 90.01%, respectively, compared with the control group ($P < 0.05$; $P < 0.01$). **Conclusions** Heroin inhibits morphological development in embryonic rats, and this inhibitory effect increases with increasing doses of heroin. This effect may be caused by the heroin-induced upregulation of Bax expression in embryonic tissues and organs.

【Keywords】 heroin; embryonic development; Bax expression; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

统计结果表明,精神依赖物海洛因滥用是目前滥用最严重,危害最大的毒品之一^[1]。近年来,在精神依赖物海洛因滥用的人群中,女性滥用人数明显上升^[2],其中育龄妇女约占1/5~1/3。动物实验结果表明,精神依赖物海洛因在引起母体损伤^[3]的同时,可迅速通过胎盘屏障和胚胎血-脑脊液屏障,对胎儿产生毒性作用^[4]。孕妇吸毒1 h后,在胎儿体内测出有海洛因代谢产物吗啡存在。海洛因可直接作用于胚胎发育的各个时期,导致胚胎组织器官发育不全或畸形^[5]。前期研究发现,海洛因成瘾大鼠中脑腹侧被盖区(VAT)Bax基因表达水平明显升高^[6]。刘学红等^[7]应用免疫组织化学法研究发现,在人胚胎舌上皮组织细胞中均有Bax蛋白阳性表达,说明Bax基因参与调控人胚胎组织细胞的分化发育。Bax基因属于Bcl-2基因家族,Bax基因表达不仅拮抗Bcl-2的抑制凋亡作用,而且具有促进细胞凋亡的功能。若Bax基因表达异常,将导致胚胎组织器官发育畸形^[8]。本文在前期研究的基础上,以Wistar大鼠为实验对象,建立海洛因孕鼠模型,在大鼠胚胎发育期给予不同剂量的海洛因,观察海洛因对胚胎发育及脑组织中Bax表达的影响,为研究精神依赖物海洛因的遗传毒性机制积累参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级Wistar大鼠90只(雌60只,雄30只),体重200~210 g,来源于甘肃中医药大学科研实验中心【SCXK(甘)2015-0001】。实验在甘肃政法大学SPF级动物实验室进行【SYXK(甘)2015-0006】。实验按3R原则给予实验动物人文关怀。伦理委员会审批号:GZF-2019-002。

1.1.2 试剂与仪器

海洛因,含量86.8%,兰州市公安局提供;Bax

ELISA kit,上海将来实业股份有限公司提供;酶标仪,Thermo MK3公司提供。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠分组、给药

全部大鼠在SPF级实验室IVC饲养盒饲养7 d,雌:雄按2:1合笼饲养。合笼第2天用光学显微镜观察阴道拭子涂片,有精子者视为交配“受孕”。将“孕鼠”随机分为:①对照组,10只孕鼠,肌肉注射生理盐水2 mL/(kg·bw);②海洛因组高剂量组,肌肉注射海洛因64 mg/(kg·bw);③海洛因中剂量组,肌肉注射海洛因32 mg/(kg·bw);④海洛因低剂量组,肌肉注射海洛因16 mg/(kg·bw),每组10只孕鼠。各组均从受孕第7天开始给药,连续给药9 d。

1.2.2 胚胎子鼠发育观察

受孕第20天,乙醚麻醉孕鼠,无痛解剖开腹部,全切取子宫检查吸收胎、死胎及活胎数,并对胎鼠进行体表形态检查。

1.2.3 胚胎子鼠脑组织Bax水平检测

剥取各组胚胎子鼠大脑额叶皮质和小脑皮层,各称取500 mg,用匀浆研磨器研磨,离心机2000 r/min,离心15 min,取上清,用ELISA法检测Bax水平。

1.2.4 标准曲线和标准曲线的直线回归方程制作

以Bax标准品浓度为横坐标,吸光度(OD)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。

1.3 统计学方法

用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计学分析。组间用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,海洛因对胚胎脑组织Bax水平的影响程度用%表示, $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

2.1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

受孕第20天,解剖开腹部,全切取子宫检查胚胎数、死胎及活胎数。结果发现,海洛因高、中、低

剂量组活胚胎总数比对照组减少了 48.48%、37.12%和 27.27%。(表 1)

活体检查看出,海洛因低剂量组胚胎枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形;海洛因中剂量组胚

胎枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显;海洛因高剂量组胚胎枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显,部分胚胎出现四肢及指骨发育不全。(图 1)

表 1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

Table 1 Effect of heroin on the embryonic development of rats

| | 对照组 Control group | 低剂量组 Low-dose group | 中剂量组 Medium-dose group | 高剂量组 High-dose group |
|--|----------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 受孕大鼠总数 Total number of pregnant rats | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 胚胎总数 Total number of embryos | 132 | 126 | 128 | 124 |
| 活胚胎总数 Total number of live embryos | 132 | 96 | 83 | 68 |
| 活胚胎率% Viable embryo rate% | 100 | 76.19 | 64.84 | 54.84 |
| 未发育胚胎数 Number of undeveloped embryos | 0 | 30 | 45 | 56 |
| 畸形胚胎总数 Total number of malformed embryos | 0 | 32 | 46 | 54 |



注 A:对照组胚胎。B:海洛因低剂量组胚胎;枕骨发育不全,胚胎出现脑膨出畸形。C:海洛因中剂量组胚胎;枕骨、顶骨发育不全,胚胎脑膨出明显。D:海洛因高剂量组胚胎;枕骨、顶骨、颞骨发育不全,胚胎脑膨出更为明显。

图 1 海洛因对大鼠胚胎发育的影响

Note. A, Embryos in the control group. B, Occipital bone hypoplasia, embryonic encephalocele deformity in the low dose heroin group. C, Embryos in the medium-dose heroin group; occipital and parietal bone hypoplasia, obvious embryonic encephalocele. D, Embryos in the high-dose heroin group; occipital, parietal and temporal bone hypoplasia, and more obvious embryonal encephalocele.

Figure 1 Effect of heroin on embryonic development of the rats

2.2 海洛因对胚胎子鼠大脑额叶皮层 Bax 表达水平的影响

以 Bax 标准液浓度为横坐标,吸光度(OD)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。(图 2)

将胚胎子鼠大脑额叶皮层 OD 代入直线回归方程,海洛因低、中、高剂量组胚胎子鼠大脑额叶皮层中 Bax 水平比对照组增加了 11.41%、47.06%和 83.74% ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(图 3)

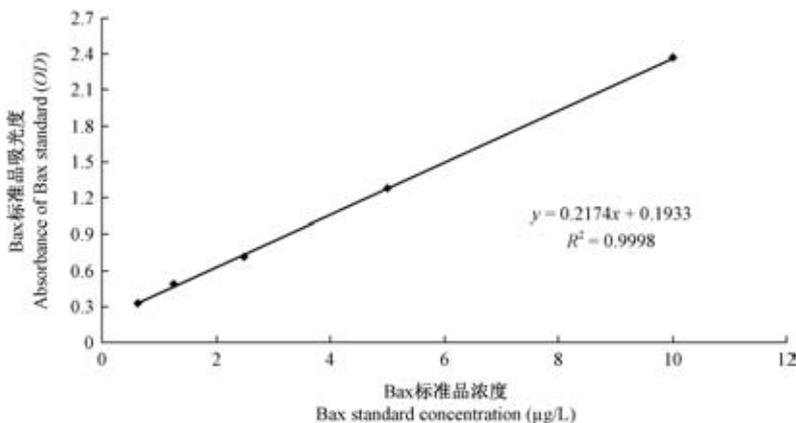
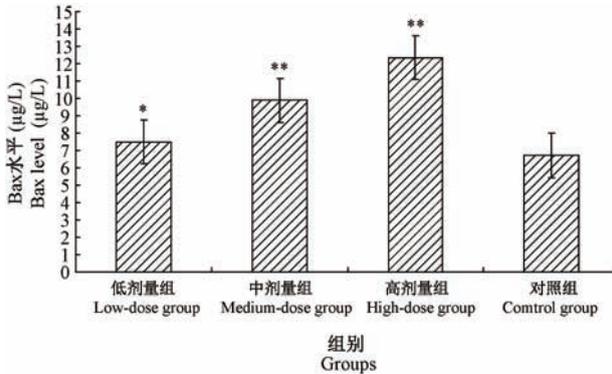


图 2 Bax 标准曲线和标准曲线的直线回归方程

Figure 2 Bax standard curve and linear regression equation of the standard curve

2.3 海洛因对胚胎子鼠小脑组织 Bax 表达水平的影响

将小脑组织 OD 代入上述 Bax 直线回归方程,海洛因低、中、高剂量组胚胎小脑组织中 Bax 表达水平比对照组增加了 17.16%、52.96% 和 90.01% ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(图 4)



注:与对照组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下图同。

图 3 海洛因对胚胎子鼠大脑额叶皮层 Bax 表达水平的影响
Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of heroin on Bax expression level in the rat embryonic brain tissue

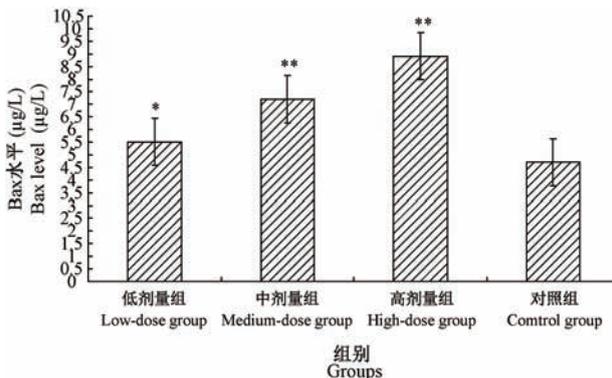


图 4 海洛因对胚胎子鼠小脑组织 Bax 表达水平的影响
Figure 4 Effects of heroin on Bax expression level in the rat embryonic cerebellar tissue

3 讨论

近年研究表明,精神依赖物海洛因滥用严重影响母体健康^[9],直接损害脑组织神经元^[10]、星形胶质细胞^[11]、颗粒细胞^[12]和免疫系统^[13],使血-脑脊液屏障的通透性发生改变,从而诱导大脑损伤和脑功能异常^[14],引起周围神经损伤^[15],导致神经发生退行性病变^[16]。王园园等^[17]报道,孕妇滥用海洛因将影响胚胎大脑正常发育,影响子代的学习记忆

能力^[18]。李重阳等^[19]给小鼠仔鼠注射海洛因 20 d,仔鼠下丘脑和海马凋亡细胞及 Bax 蛋白阳性表达细胞的数明显高于对照组,并随着海洛因剂量的递增阳性表达细胞的数量呈增多趋势。许梓枫等^[20]报道,海洛因滥用不仅影响胚胎正常发育,出现宫内死胎、流产、早产,增加新生儿及婴儿死亡的概率,还使子代表观遗传性发生改变^[21]。胚胎解剖发现,给予孕鼠海洛因后,活胎率明显降低,胚胎表型发育受到干扰。由于胚胎颅骨发育受到干扰,脑膨出畸形胚胎数显著增加,实验结果与许梓枫等报道结果相一致。ELISA 法检测发现,胚胎大脑组织细胞 Bax 表达水平随给予海洛因剂量的增加而升高。结果提示,Bax 基因是促进细胞凋亡的主要基因,Bax 基因表达的蛋白可能抑制胚胎发育和组织器官的形成,或破坏胚胎新形成组织器官,出现畸形胚胎或死胎。海洛因通过母体干扰胚胎表型和组织器官的发育,诱导胚胎组织细胞 Bax 基因表达的分子生物学机制有待进一步实验研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 杨黎华,任周阳.阿片类物质依赖治疗综述[J].云南警官学院学报,2018,(1):24-27.
Yang LH, Ren ZY. A review of opioids dependence therapy [J]. J Yunnan Police College, 2018, (1): 24-27.
- [2] Kovatsi L, Fragou D, Samanidou V, et al. Drugs of abuse: epigenetic mechanisms in toxicity and addiction [J]. Cur Med Chem, 2011, 18 (12): 1765-1774.
- [3] 俞诗源,王悦,郭婷婷,等.海洛因对母鼠体重、行为及肺中相关活性物质表达的影响[J].西北师范大学学报(自然科学版),2010,46(2):94-100.
Yu SY, Wang Y, Guo TT, et al. Effects of heroin on weight, behaviour and expression of related interrelated polypeptide in the lungs of female rats [J]. J Nort Norm Univ (Nat Sci), 2010, 46 (2): 94-100.
- [4] 王昱,李重阳,俞诗源,等.孕小鼠注射海洛因对仔鼠大脑额叶皮层结构及 ADA、SDH、NOS、GSH 活性的影响[J].解剖学报,2009,40(2):175-182.
Wang Y, Li CY, Yu SY, et al. Effects on the structure of cerebral temporal lobe cortex and activities of ADA, SDH, NOS and GSH of filial mice after injecting heroin in pregnant mice [J]. Acta Anat Sin, 2009, 40(2):175-182.
- [5] 潘波,黄绍强.阿片类镇痛药对发育期大脑神经毒性作用的研究进展[J].复旦学报(医学版),2015,42(5):670-674.
Pan Bo, Huang SQ. The neurotoxicity effect of opioids on developing brain: articles review [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2015,42(5):670-674.
- [6] 俞发荣,连秀珍,谢明仁,等.海洛因成瘾模型建立及中脑腹侧盖区 Bax 的表达[J].中国实验动物学报,2012,20(6):82-84.

- Yu FR, Lian XZ, Xie MR, et al. Effect of heroin on Bax expression in the brain ventral tegmental area and establishment of a rat model of heroin addiction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20 (6): 82-84.
- [7] 刘学红, 张泳. 增殖性细胞核抗原、c-fos 和 Bax 蛋白在人胚胎舌组织中的表达 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42 (5): 517-522.
- Liu XH, Zhang Y. Expression of PCNA c-fos and Bax proteins in human embryonic tongue tissues [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2013, 42(5): 517-522.
- [8] 张海兰, 安东, 唐晓冰, 等. Bcl-2 和 Bax 基因在肛门直肠畸形胎鼠泄殖腔胚胎发育中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(5): 399-401, 405.
- Zhang HL, An D, Tang XB, et al. Gene expression patterns of Bcl-2 and Bax during the cloacal embryonic development of anorectal malformation [J]. J Chin Med Univ, 2013, 42(5): 399-401, 405.
- [9] 刘柳, 段慧娟. 中国女性吸毒者的群体异同研究 [J]. 江苏社会科学, 2017, (4): 57-65.
- Liu L, Duan HJ. Study on the similarities and differences of female drug users in China [J]. Jiangsu Soc Sci, 2017, (4): 57-65.
- [10] Quick SL, Pyszczynski AD, Colston KA, et al. Loss of alternative non-drug reinforcement induces relapse of cocaine-seeking in rats; role of dopamine D1 receptors [J]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36: 1015-1020.
- [11] 乐凯, 文若剑. 阿片成瘾中的神经免疫机制 [J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 241-246.
- Le K, Wen RJ. Neuroimmune mechanism of opiates addiction [J]. J Jiangnan Univ (Nat Sci Edit), 2017, 45(3): 241-246.
- [12] 胡夏韵, 苏天园, 刘丽, 等. C-Jun 和 Bcl-2 在海洛因所致大鼠小脑颗粒细胞凋亡中的作用 [J]. 新疆医科大学学报, 2017, 49(12): 1549-1554.
- Hu XY, Su TY, Liu L, et al. Effects of c-Jun and Bcl-2 in diacetylmorphine-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells [J]. J Xinjiang Med Univ, 2017, 49(12): 1549-1554.
- [13] 阳初玉, 李飞, 陈万. 浅谈海洛因对海洛因成瘾者神经系统和免疫系统功能的影响 [J]. 当代医药论丛, 2017, 15(18): 170-171.
- Yang CY, Li F, Chen W. Effects of heroin on nervous system and immune system of heroin addicts [J]. Contempor Med Forum, 2017, 15(18): 170-171.
- [14] 张浩林, 王学伟, 崔彩莲. 阿片类药物对成体神经发生的影响 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2015, 24(3): 87-92.
- Zhang HL, Wang XW, Cui CL. Effects of opioids on adult neurogenesis [J]. Chin J Drug Dep, 2015, 24(3): 87-92.
- [15] 雷俊杰, 刘汉伟, 莫志怀, 等. 选择性累及脊髓前角的海洛因中毒性脊髓病 1 例 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 43(9): 559-561.
- Lei JJ, Liu HW, Mo ZH, et al. A case of heroin toxic myelopathy involving the anterior horn of the spinal cord [J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2017, 43(9): 559-561.
- [16] 张朋, 徐星, 毛紫娟, 等. MicroRNAs 在甲基苯丙胺滥用诱导神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2017, 26(6): 411-417.
- Zhang P, Xu X, Mao ZJ, et al. Progress of microRNAs in the study of neurodegenerative diseases induced by methamphetamine abuse [J]. Chin J Drug Dep, 2017, 26(6): 411-417.
- [17] 王园园, 王冬梅, 隋南. 胚胎期可卡因、吗啡暴露影响子代成瘾相关行为的神经发育机制 [J]. 心理科学进展, 2013, 21 (6): 999-1006.
- Wang YY, Wang DM, Sui N. Neurodevelopmental mechanisms of prenatal cocaine or morphine exposure on addiction-related behaviors in offsprings [J]. Adv Psych Sci, 2013, 21(6): 999-1006.
- [18] 张克, 段颖, 杜秀敏. 亲代孕前成瘾药物暴露对子代行为的影响及其表观遗传机制 [J]. 心理科学进展, 2017, 25(10): 1791-1798.
- Zhang K, Duan Y, Du XM. The impact of the parental preconception exposure to addictive drugs on the offsprings' behavior and the epigenetic mechanism [J]. Adv Psych Sci, 2017, 25(10): 1791-1798.
- [19] 李重阳, 高先军, 王昱, 等. 海洛因、麻黄素对小鼠仔鼠下丘脑、海马组织结构及胆碱乙酰基转移酶活性的影响 [J]. 解剖学报, 2009, 40(6): 862-868.
- Li CY, Gao XJ, Wang Y, et al. Effects of heroin and ephedrine on the histological structure and ChAT activity of hypothalamus and hippocampus of filial mice [J]. Acta Anat Sin, 2009, 40 (6): 862-868.
- [20] 许梓枫, 丁之德. 毒品对生殖系统及胚胎发育的影响 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2016, 35(1): 56-60.
- Xu ZF, Ding ZD. Effects of drugs on reproductive system and embryonic development [J]. J Intern Reprod Heal/Fam Plan, 2016, 35(1): 56-60.
- [21] 徐文锦, 陈为升, 刘惠芬. 药物成瘾的表观遗传学机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 20(3): 248-257.
- Xu WJ, Chen WS, Liu HF. Progress in research of epigenetic mechanisms of drug addiction [J]. Chin J Pharm Toxic, 2016, 20(3): 248-257.

[收稿日期] 2019-02-26

赵晨,赵娇,赵晓波,等.复方太子参止咳益气散治疗大鼠哮喘的机制探讨[J].中国实验动物学报,2019,27(4):532-539.
Zhao C,Zhao J,Zhao XB, et al. Exploration of the mechanism of Taizishen Zhike Yiqi Powder in the treatment of asthma in rats [J].
Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):532-539.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.017

复方太子参止咳益气散治疗大鼠哮喘的机制探讨

赵晨,赵娇,赵晓波,白燕*,金润铭

(华中科技大学同济医学院附属协和医院儿科,武汉 430022)

【摘要】 目的 探究复方太子参止咳益气散(TZY)改善支气管哮喘大鼠症状的作用及机制。**方法** 大鼠随机分为7组,分别为对照组,哮喘模型(OVA诱导)组,TZY低、中、高剂量灌胃+哮喘模型组,普米克令舒雾化+哮喘模型组,普米克令舒雾化+TZY灌胃+哮喘模型组。HE染色检测各组大鼠支气管黏膜下炎症细胞浸润;采用流式细胞术检测各组Th1/Th2细胞比例;ELISA检测各组肺泡盥洗液(BALF)中IL-4、IL-5、IgE、IFN- γ 水平;生化检测各组BALF中SOD、MDA、GSH和T-AOC的水平。**结果** 与哮喘组比较,TZY中高剂量组及联用普米克令舒组Th1/Th2细胞比例显著上升,IL-4、IL-5、IgE水平显著下降,同时IFN- γ 水平显著升高($P<0.05$),且呈剂量依赖性;与哮喘组相比,TZY中高剂量组及联用组GSH、T-AOC、SOD水平显著升高,MDA水平显著降低($P<0.05$)。与单用普米克令舒雾化相比,TZY及普米克令舒联用组各项检测指标有明显差异($P<0.05$)。**结论** TZY可缓解大鼠支气管黏膜炎症状态,其机制可能与上调Th1/Th2细胞比例,调控炎症因子及氧化应激有关。

【关键词】 复方太子参止咳益气散;哮喘;Th细胞;细胞因子;氧化应激;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)04-0532-08

Exploration of the mechanism of Taizishen Zhike Yiqi Powder in the treatment of asthma in rats

ZHAO Chen, ZHAO Jiao, ZHAO Xiaobo, BAI Yan*, JIN Runming

(Pediatric Department, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Corresponding author: BAI Yan. E-mail: yanbaixh@hust.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of formula TaizishenZhikeYiqi Powder (TZY) on improving the symptoms of bronchial asthma rats. **Methods** Rats were randomly divided into 7 groups: control group, asthma model (OVA induced), low dose group of traditional Chinese medicine, medium dose group of traditional Chinese medicine, high dose group of traditional Chinese medicine, Pulmicort respules group, group of Pulmicort respules and traditional Chinese medicine. HE staining was used to detect the submucosal inflammatory cell infiltration in the bronchial mucosa. Flow cytometry was used to detect the ratio of Th1 to Th2 cells in each group. The levels of IL-4, IL-5, IgE and IFN- γ in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of each group were detected by ELISA. The levels of SOD, MDA, GSH and T-AOC in BALF of each group were detected by biochemistry. **Results** TZY reduced airway inflammation exhibiting a therapeutic effect on asthma in the rats. Compared with the asthma group, the ratio of Th1 to Th2 cells in the TZY group and joint use group increased significantly, the levels of IL-4, IL-5 and IgE decreased significantly, but the level of IFN- γ increased significantly ($P<0.05$) in a dose-dependent manner. Compared with the asthma group, the levels of GSH, T-

【基金项目】湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB745)。

Funded by Hubei Natural Science Foundation Project (2018CFB745).

【作者简介】赵晨(1989—),女,硕士,主治医师,主要从事儿科呼吸系统疾病的诊治工作。Email:zhaochen2015@hust.edu.cn

【通信作者】白燕(1977—),女,博士,副主任医师,主要从事儿科呼吸系统疾病的诊治工作。Email:yanbaixh@hust.edu.cn

AOC and SOD in the TZY groups and joint drug use group were significantly increased, and the level of MDA was significantly decreased. The TZY and Pulmicort respules combination group exerted similar or better effects than the Pulmicort respules atomization. **Conclusions** TZY can alleviate the inflammatory state of bronchial mucosa in rats. The mechanism may be related to up-regulating the ratio of Th1 to Th2 cells, regulating inflammatory factors and oxidative stress.

[Keywords] Taizishen Zhike Yiqi powder; asthma; T helper cell; cytokine; oxidative stress; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

支气管哮喘是由多种细胞如嗜酸性粒细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病^[1]。是环境因素作用于遗传易感个体,在炎症细胞、细胞因子炎症介质的相互作用下所导致的气道炎症和气道高反应性。大量研究表明哮喘的炎症反应与气道一系列炎症细胞浸润有关,而这些炎症细胞在很大程度上受 Th2 型淋巴细胞活化的驱动。有研究表明在支气管哮喘病人的呼吸道中, Th1 和 Th2 细胞比例是失衡^[2]。Th2 主要分泌的 IL-4、IL-5 细胞因子, IL-4 对于 IgE 的产生发挥重要作用。Th1 细胞分泌 IFN- γ 抑制嗜碱性粒细胞,肥大细胞和嗜酸性粒细胞的增殖和分化。

另外,研究显示氧化应激在哮喘的发病机制中发挥重要作用^[3-5],如气道“自由基损伤”、“氧化/抗氧化失衡”学说。过度的活性氧自由基/活性氮自由基的产生会造成气道炎症、气道高反应性、气道微血管高通透性和气道黏液高分泌,以及组织损伤和形态的改变^[6]。减轻氧化应激或增加抗氧化能够减轻气道嗜酸粒细胞浸润,减少黏液分泌,从而缓解支气管哮喘^[7-8]。

复方太子参止咳益气散(TZY)能够缓解支气管哮喘^[9],其是否是通过抗炎和抗氧化机制来改善支气管哮喘症状尚不为人所知。本文通过给予支气管哮喘动物模型不同剂量的 TZY,探讨其缓解症状的机制,为 TZY 在临床的使用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄雄性 SD 大鼠 70 只,购于辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK(辽)2015-0001】,实验动物均饲养于华中科技大学同济医学院动物实验中心 SPF 级环境【SYXK(鄂)2015-0035】,实验动物伦理编号为安评中心动(福)第 HK2018001 号。

1.1.2 试剂与仪器

卵白蛋白(OVA,美国 Sigma 公司);普米克令舒

(批号:1010429850,规格:2 mL:1 mg, AstraZeneca Pty 公司);TZY(批准文号:国药准字 B20170004,武汉贝参药业股份有限公司)。致敏液配制:将 OVA 溶于新鲜配制的 10% Al(OH)₃ 溶液中,充分搅拌均匀,使 OVA 的终浓度为 0.2%。注意混悬液制备后为保证致敏效果应于 1 h 内使用。雾化液配制:将 OVA 与 0.9% NaCl 溶液搅拌使其混合均匀,使 OVA 的终浓度为 1%。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

将 SD 雄性大鼠随机分为 7 组,分别为对照组,哮喘模型(OVA 诱导)组,低剂量 TZY 灌胃+哮喘模型组,中剂量 TZY 灌胃+哮喘模型组,高剂量 TZY 灌胃+哮喘模型组,普米克令舒雾化+哮喘模型组,普米克令舒雾化+TZY 灌胃+哮喘模型组。

1.2.2 哮喘模型的建立

通过卵白蛋白(OAV)致敏并激发建立哮喘模型。致敏:第 1 和 8 天采用传统的十点致敏法^[10],包括两前后足趾 4 点,两侧腹股沟 2 点,颈部 1 点,背部左、中、右 3 点,每点皮下注射 0.05 mL OVA 凝胶,另腹腔注射 0.5 mL OVA 凝胶,OVA 致敏总体积为 1 mL/只。激发:第 14 天至第 21 天,将大鼠置于密闭容器中并以 1% OVA 溶液雾化 30 min/d。(对照组给予生理盐水做对照,其余各组制备哮喘模型)。

1.2.3 各组给药方式

各组均在激发前 1~2 h 进行干预。TZY:小剂量 1.25 g/kg,中剂量为 2.5 g/kg,大剂量为 5 g/kg。用生理盐水配置成 2~3 mL,每天一次灌胃。普米克令舒组给予普米克令舒雾化,1 mg/只,每天一次。对照组给予生理盐水,每天一次。所有干预均于激发前 30 min 完成。

1.2.4 标本的获取

将大鼠进行颈椎脱臼处死。用 0.5 mL 盐水灌洗大鼠支气管肺泡 4 次,肺泡灌洗液(BALF)1200 r/min 离心 5 min,4℃,上清液保存在-20℃保存

备用。

1.2.5 病理学观察

取大鼠近肺门处的左肺组织,在 4% 的多聚甲醛中进行固定约 4~6 h,进行常规的石蜡包埋及切片,以行染色检测。将制备好的切片常规固定、脱水,以进行 HE 染色,用来观察气道的病理学改变。

1.2.6 流式细胞术

收集大鼠主动脉外周血,制备单个核细胞悬液后,加入流式抗体,Th1 细胞用 CD4/IFN- γ 标记,Th2 细胞用 CD4/IL-4 标记。CD4 抗体带有 APC 标记 (APC Mouse anti-rat CD4, 货号 17-0040-82, Invitrogen 厂家提供),IFN- γ 抗体带有 FITC 标记 (FITC Mouse anti-rat IFN- γ , 货号 559498, BD 厂家提供),IL-4 抗体带有 PE (PE) 标记 (PE Mouse anti-rat IL-4, 货号 555082, BD 厂家提供)。充分混匀后室温避光孵育 30 min,上机检测大鼠外周血中淋巴细胞的百分率。

1.2.7 生化检测

试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,购得 GSH 试剂盒 (货号 A006-2)、T-AOC 试剂盒 (货号 A015-2)、MDA 试剂盒 (货号 A003-1)、SOD 试剂盒 (货号 A001-3),按照试剂盒说明书进行操作。根据标准曲线计算 GSH、T-AOC、MDA、SOD 的浓度。

1.2.8 ELISA 检测

将获取的每组大鼠 BALF 使用 IL-4、IL-5、IgE、IFN- γ ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 来测定各组细胞因子的浓度,按照说明书进行操作。根据标准曲线计算各组细胞因子的蛋白浓度。

1.3 统计学方法

所有实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计学分析采用 SPSS 22.0 软件完成,One-way ANOVA 方差分析用于多组之间单因素的比较。 $P < 0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 病理观察结果

病理切片经 HE 染色后,对照组可观察到肺泡结构正常,肺泡腔内无渗出液,间隔无增宽,肺泡上皮细胞排列有序,肺泡壁厚度正常,无炎性细胞浸润。哮喘模型组光镜下可观察到肺泡壁结构受损,肺泡壁增厚,支气管腔狭窄,大量黏膜上皮细胞脱落,支气管与血管周边疏松水肿及纤维化形成,支气管上皮杯状细胞化生,支气管与血管周围重度炎

性细胞浸润,可见增生的淋巴滤泡。TZY 中剂量组可见肺泡腔较模型组变大,支气管腔未见脱落的上皮细胞,支气管壁水肿程度减轻,炎性细胞浸润程度明显降低,可见部分增生的淋巴滤泡,腔内出血,较多渗出物红染。TZY 高剂量组可见部分肺泡壁增厚,支气管腔狭窄程度有所减轻,部分支气管与血管周边疏松水肿及纤维化形成,炎性细胞浸润区域明显减少。TZY 和普米克令舒联用组可见支气管管腔未见明显狭窄,肺泡间隔较薄,肺泡腔变大,肺泡区炎性细胞浸润明显减少 (图 1)。

2.2 Th 淋巴细胞的比例比较

由图 2、图 3 可知,通过对不同组别的分析,我们发现给予哮喘大鼠 TZY 中剂量组和高剂量组灌胃,均可以明显提高外周血 Th1 细胞比例,降低 Th2 细胞比例 ($P < 0.05$),其中 TZY 中、高剂量组与普米克令舒雾化组相比较,Th1/Th2 细胞比例上调,两组无显著差异 ($P > 0.05$)。联用普米克令舒雾化和 TZY 灌胃,Th1 细胞上升,Th2 细胞下降,Th1/Th2 细胞比例上调作用与单用低剂量 TZY 灌胃或单用普米克令舒雾化相比,都更为显著 ($P < 0.05$),说明 TZY 和普米克令舒雾化有叠加作用。

2.3 细胞因子水平的变化

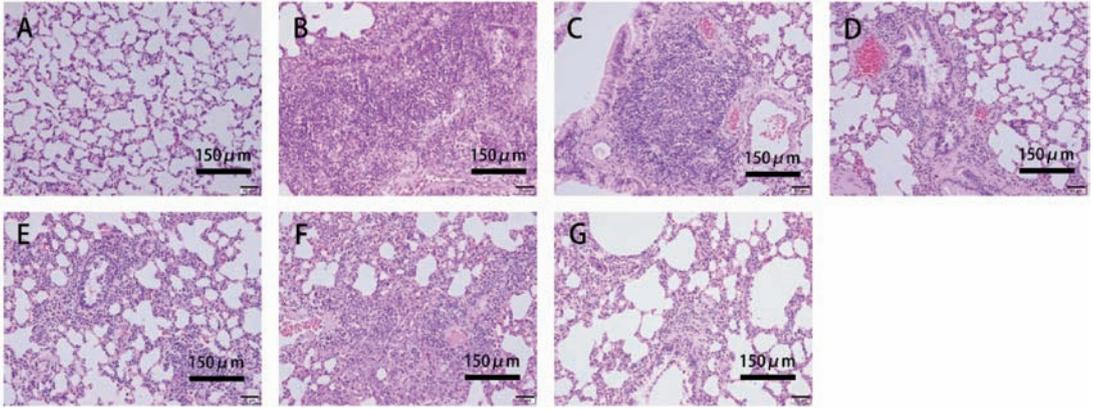
与对照组相比,哮喘组 BALF IL-4、IL-5、IgE 水平明显增加 ($P < 0.05$);与哮喘组比较,中药组 BALF IL-4、IL-5、IgE 的蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),且随着中药浓度的增加,其蛋白水平降低更显著。普米克令舒组和高剂量中药组 BALF IL-4、IL-5、IgE 的蛋白水平无显著差异。

与对照组相比,哮喘组 BALF IFN- γ 水平明显减少 ($P < 0.05$);与哮喘组相比,中药组 BALF IFN- γ 水平显著增加 ($P < 0.05$),且随着中药浓度的增加,其蛋白水平上升幅度更显著。普米克令舒组和高剂量中药组 BALF IFN- γ 的蛋白水平无显著差异。(图 4)

2.4 氧化应激水平

相对于对照组,哮喘组 GSH、T-AOC、SOD 含量显著降低 ($P < 0.05$);相对哮喘组,中剂量 TZY、高剂量 TZYGSH、T-AOC、SOD 含量显著增加 ($P < 0.05$)。高剂量组和普米克令舒组之间 GSH、T-AOC、SOD 含量无显著性差异 ($P < 0.05$)。

相对于对照组,哮喘组 MDA 含量显著增加 ($P < 0.05$);相对于哮喘组,中剂量 TZY、高剂量 TZYMDA 显著减少 ($P < 0.05$)。高剂量组和普米克

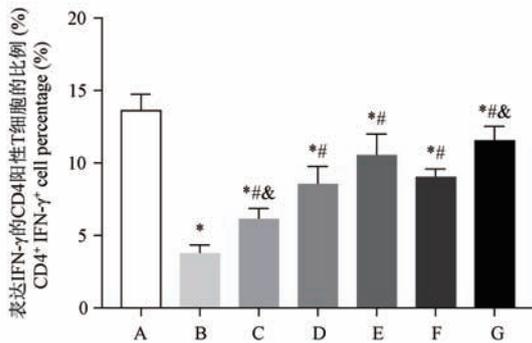
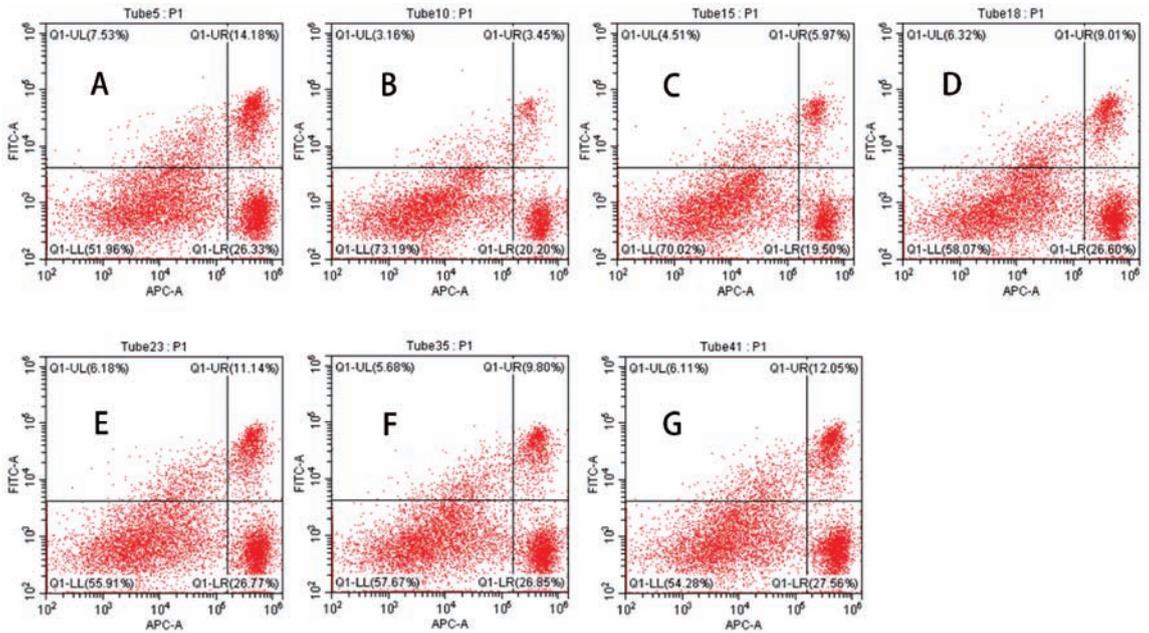


注:A.对照组;B.哮喘组;C.TZY 低剂量组;D.TZY 中剂量组;E.TZY 高剂量组;F.普米克令舒组;G.普米克令舒+TZY 组。(下图同)

图 1 TZY 对哮喘大鼠支气管肺组织病理的影响 (×200)

Note. (A) control group (B) asthma group (C) low dose group of TZY (D) medium dose group of TZY (E) high dose group of TZY (F) Pulmicort respules group (G) group of Pulmicort respules and TZY. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of TZY on bronchial histopathology in the asthmatic rats (×200)

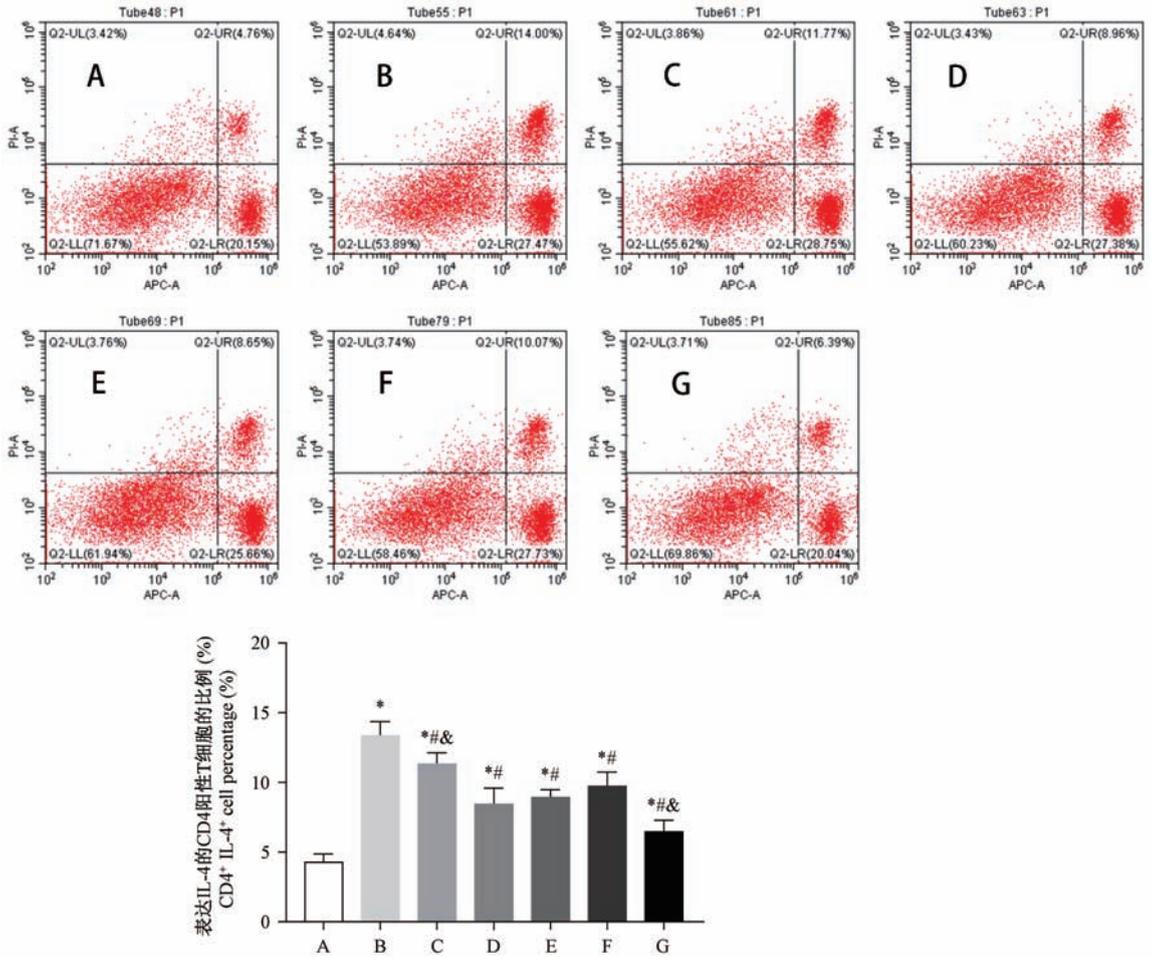


注:与对照组相比差异有显著性,* $P < 0.05$;与哮喘组相比差异有显著性,# $P < 0.05$;与普米克令舒组相比差异有显著性,& $P < 0.05$ 。

图 2 TZY 对 CD4⁺ IFN-γ⁺ 的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the asthma group, # $P < 0.05$. Compared with the Pulmicort respules group, & $P < 0.05$.

Figure 2 Effect of TZY on CD4⁺ IFN-γ⁺ cells



注:与对照组相比差异有显著性,* $P < 0.05$;与哮喘组相比差异有显著性,# $P < 0.05$;与普米克令舒组相比差异有显著性,& $P < 0.05$ 。

图3 TZY对 $CD4^+ IL-4^+$ 细胞水平的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the asthma group, # $P < 0.05$. Compared with the Pulmicort respules group, & $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of the drugs on $CD4^+ IL-4^+$ cells

令舒组之间MDA含量无显著性差异($P < 0.05$)。(图5)

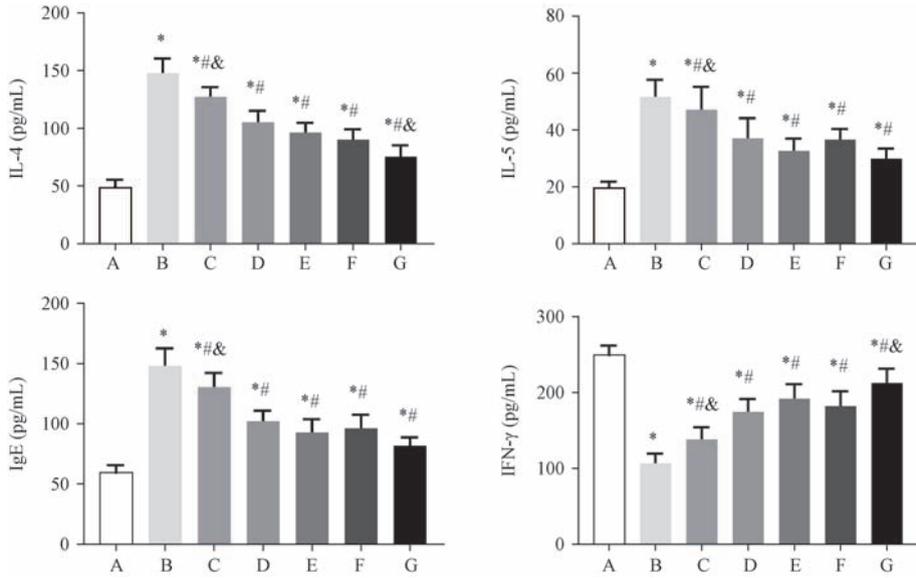
3 讨论

支气管哮喘是一种以慢性气道炎症和气道高反应性为特征的异质性疾病^[1],是儿童常见的喘息性疾病之一。由于儿童气道解剖结构、生理及免疫的特殊性,支气管哮喘在儿童中发生率较高。研究表明,约34%的儿童在3周岁之前出现过至少1次喘息,将近一半的儿童在6岁前会出现喘息^[11]。支气管哮喘的发病机制主要包括气道炎症、气道高反应性、支气管痉挛和气道重塑几个方面。治疗支气管哮喘常用药物包括糖皮质激素、白三烯调节剂、支气管舒张剂、抗组胺药物等^[12]。其中,吸入性糖皮质激素(ICS)是目前最强的气道局部抗炎药物,

其通过对炎症反应相关的细胞和分子产生影响而发挥抗炎作用。

中医学理论将支气管哮喘归纳为“哮病”,该病属“吼病”、“痰饮”的范围,从中医外治法角度探究儿童哮喘的防治方法已成为国内众多学者的研究方向。目前常用的中医方法包括针灸治疗、穴位敷贴、穴位注射、敷脐治疗、推拿治疗、耳压治疗、灌肠治疗、雾化吸入治疗等,这些方法在治疗儿童哮喘方面均取得了较好的疗效^[13]。

TZY是由太子参、冬虫夏草、浙贝母、天花粉、槟榔、白及、甘草等7味纯原植物药整体组方。中医角度,TZY从根本上针对肾、脾两虚加以治疗。临床上治疗哮喘已得到广泛认可^[5]。鉴于此,本文开展TZY治疗大鼠哮喘的作用研究。结果发现,与哮喘模型组相比,TZY可降低气道支气管细胞的炎

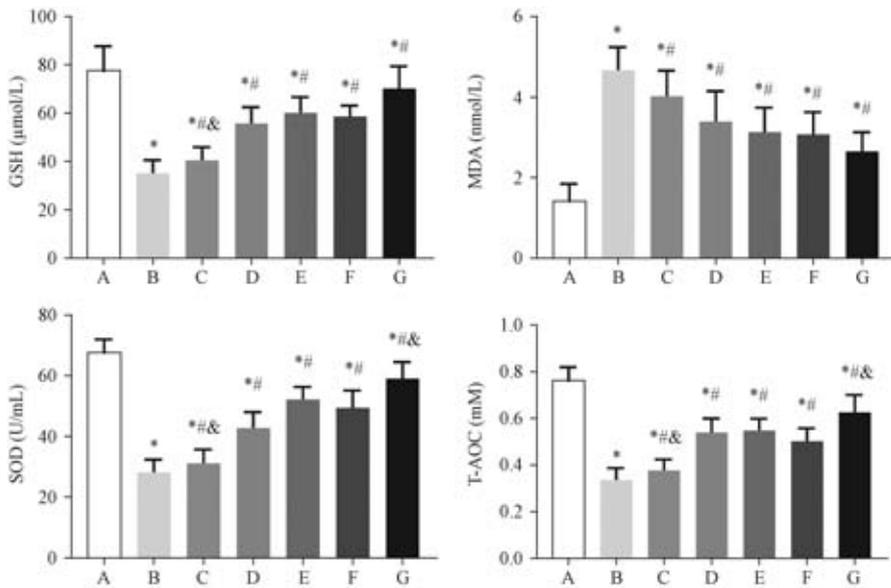


注:与对照组相比差异有显著性, * $P < 0.05$;与哮喘组相比差异有显著性, # $P < 0.05$;与普米克令舒组相比差异有显著性, & $P < 0.05$ 。

图 4 TZY 对细胞因子表达的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the asthma group, # $P < 0.05$. Compared with the Pulmicort respules group, & $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of TZY on the expression of inflammatory cytokines



注:与对照组相比差异有显著性, * $P < 0.05$;与哮喘组相比差异有显著性, # $P < 0.05$;与普米克令舒组相比差异有显著性, & $P < 0.05$ 。

图 5 TZY 对氧化应激相关因子水平的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the asthma group, # $P < 0.05$. Compared with the Pulmicort respules group, & $P < 0.05$.

Figure 5 Effect of TZY on the levels of oxidative stress related factors

性浸润,提示其具有良好的治疗哮喘作用。

炎症反应被认为是哮喘的可能发病机制之一,在哮喘发生和进展中发挥着重要作用^[14-15]。IgE 类

抗体是引起支气管哮喘的主要效应分子之一。当变应原初次进入机体后,刺激 B 细胞增殖并分化为浆细胞,产生 IgE 类抗体,IgE 可与嗜酸性粒细胞或

肥大细胞表面的 IgE Fc 受体高亲和力结合,使机体致敏;当机体受到相同变应原再次刺激后,其与连接在嗜酸性粒细胞或肥大细胞表面的 IgE 交叉结合,导致受体交联,启动激活信号,从而导致嗜酸性粒细胞或肥大细胞活化和脱颗粒,释放多种组胺、活性介质等引发 I 型变态反应^[16-18]。同时有报道显示炎症因子 IL-4、IL-5、IFN- γ 可用于研究哮喘所致的炎症反应,与本文结果一致^[19-20]。本文结果显示,TZY 组 IL-4、IL-5、IgE 水平显著降低,但 IFN- γ 水平显著升高 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性,提示 TZY 可以调节炎症细胞因子。此外,氧化应激是哮喘炎症发生发展的另一重要机制^[21-22]。本文检测了哮喘大鼠 TZY 治疗后 GSH、T-AOC、SOD 及 MDA 表达,考察其氧化应激水平。结果发现,与哮喘组相比,TZY 组 GSH、T-AOC、SOD 水平显著升高,MDA 水平显著降低,提示该复方具有调节氧化应激的作用。

本文进一步研究了大鼠外周血不同 Th 细胞比例,Th1、Th2 细胞是参与哮喘发生发展的主要免疫细胞,Th1/Th2 比例可反应哮喘个体免疫紊乱程度及功能^[23-24]。结果显示,TZY 可下调 Th2 (CD4⁺IL-4⁺) 细胞水平、上调 Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) 细胞水平及 Th1/Th2 比例,提示 TZY 能调节哮喘大鼠免疫紊乱,提高免疫功能。

综上,TZY 可通过调节炎症反应及氧化应激,提高机体免疫功能从而治疗大鼠哮喘,本文结果为进一步临床推广该复方(或和激素联合应用)治疗支气管哮喘奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华医学会儿科学分会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会.儿童支气管哮喘诊断与防治指南(2016年版)[J].中华儿科杂志,2016,54(3):167-181.
The Subspecialty Group of Respiratory Diseases, The Society of Pediatrics, Chinese Medical Association, The Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics. Guideline for the diagnosis and optimal management of asthma in children (2016) [J]. Chin J Pediatr, 2016, 54(3): 167-181.
- [2] Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma[J]. N Engl J Med, 1992, 326(5): 298-304.
- [3] McGovern T, Goldberger M, Chen M, et al. CysLT1 receptor is protective against oxidative stress in a model of irritant-induced asthma[J]. J Immunol, 2016, 197(1): 266-277.
- [4] Kleniewska P, Pawliczak R. The participation of oxidative stress in the pathogenesis of bronchial asthma [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94: 100-108.
- [5] Janssen-Heininger Y, Ckless K, Reynaert N, et al. SOD inactivation in asthma: bad or no news? [J]. Am J Pathol, 2005, 166(3): 649-652.
- [6] 李俊棠,贾鹏.穴位贴敷联合穴位注射对哮喘患者免疫功能及炎症因子水平的影响[J].吉林中医药,2019,39(3):393-396.
Li W, Jia P. Effect of acupoint sticking combined with acupoint injection on immune function and inflammatory factor of asthma patients [J]. Jilin J Tradit Chin Med, 2019, 39(3): 393-396.
- [7] Sugiura H, Ichinose M. Role of oxidative stress in aggravation of asthma[J]. Arerugi, 2017, 66(7): 931-935.
- [8] Comhair SA, Ricci KS, Arroliga M, et al. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(3): 306-313.
- [9] 周志荣.复方太子参止咳益气散治疗支气管哮喘 2180 例疗效观察[J].中国民族医药杂志,2005(5):14.
Zhou ZR. Therapeutic effect of compound Taizishen Zhike Yiqi Powder on 2180 cases of bronchial asthma [J]. Chin J Tradit Med, 2005(5): 14.
- [10] Cheng Z, Wang X, Dai LL, et al. Thymic stromal lymphopoietin signaling pathway inhibition attenuates airway inflammation and remodeling in rats with asthma[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(4): 1482-1496.
- [11] Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, et al. Asthma and wheezing in the first six years of life[J]. N Engl J Med, 1995, 332(3):133-138.
- [12] 国家卫生计生委儿童用药专家委员会,中华医学会儿科学分会呼吸学组,中国医师协会儿科医师分会儿童呼吸专业委员会,等.儿童喘息性疾病合理用药指南[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(19):1460-1472.
The Expert Committee on Pediatric Medicine of National Health and Commission, National Health and Family Planning Commission of The People's Republic of China, Respiratory Group, Pediatric Section of Chinese Medical Association, Committee of Respiratory Disease, Pediatric Society of Chinese Physicians' Association, Committee of Pediatric, Chinese Medicine Education Association. Guidelines for rational drug use in children with wheezing disorders [J]. Chin J Appl Clin Pediatr, 2018,33(19): 1460-1472.
- [13] 陈赛男,于盼,方旭鹏,等.儿童支气管哮喘常用中医外治法研究现状[J].世界科学技术-中医药现代化,2018,20(5):728-733.
Chen SN, Yu P, Fang XP, et al. Research status of traditional Chinese medicine external treatment on bronchial asthma in children [J]. Moder Tradit Chin Med Mater Med-Wor Sci Tech, 2018, 20(5): 728-733.
- [14] Farah CS, Keulers LA, Hardaker KM, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma [J]. Respirology, 2015, 20 (6): 975-981.
- [15] 徐凤,肖韩艳,周淑芬,等.柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):104-109.

- Xu F, Xiao HY, Zhou SF, et al. Effect of Chaipu decoction on airway inflammation and ERK/p38 MAPK signal pathway in rats with asthma [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2018, 24(2): 104-109.
- [16] 任佳羽, 杨贵方, 胡松岩, 等. 越婢加半夏汤降低过敏性哮喘小鼠的血清 IgE 和升高肺组织中 SOD 的活力 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 18-21.
- Ren YJ, Yang GF, Hu SY, et al. Yueqi Banxia decoction inhibits serum IgE and increases SOD activity in lung tissue in the mouse model of allergic asthma [J]. Chin J of Comp Med, 2015, 25(9): 18-21.
- [17] 刘家齐, 赵正晓, 魏颖, 等. 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 460-464.
- Liu Q, Zhao ZX, Wei Y, et al. Inhibitory effect of paeoniflorin on inflammatory chemokines and their receptor in a mouse model of asthma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(5): 460-464.
- [18] 杨兴嫒, 史锁芳, 周奎龙, 等. 甘草及其组分治疗支气管哮喘作用机理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(5): 933-935.
- [10] Yi X, Shi SF, Zhou FL, et al. Mechanism of licorice and its components in the treatment of bronchial asthma [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2013, 29(5): 933-935.
- [19] 刘莉萍, 王艳丽. 补肾纳气汤对哮喘缓解期患儿炎症因子和肺功能的影响 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(6): 666-669.
- Liu LP, Wang YL. Influence of tonifying kidney and activatingqi decoction on inflammatory factors and lung function in children with asthma at remission stage [J]. Jilin J Tradi Chin Med, 2018, 38(6): 666-669.
- [20] Kupeczyk M, Kuna P. Benralizumab: an anti-IL-5 receptor α monoclonal antibody in the treatment of asthma [J]. Immunotherapy, 2018, 10(5): 349-359.
- [21] 冉琴, 张雷, 张运, 等. 白藜芦醇对中性粒细胞性哮喘小鼠肺组织炎症的抑制作用及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(5): 897-902+1115.
- Ran Q, Zhang L, Zhang Y, et al. Inhibitory effect of resveratrol on pulmonary inflammation in mice with neutrophilic asthma and its mechanism [J]. J Jilin Univ (Med Edit), 2018, 44(5): 897-902+1115.
- [22] 宋冬梅, 牛英豪, 于磊, 等. 乌司他丁通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径在 OVA 诱导的支气管哮喘小鼠中发挥治疗作用 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1713-1720.
- Song DM, Niu YH, Yu L, et al. Ulinastatin induces Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress in ovalbumin-induced murine asthma model [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(12): 1713-1720.
- [23] 曹敏, 向钦, 刘阳, 等. CBA/CaJ 小鼠脏器重量、血液生理生化指标及免疫细胞的比例 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 418-423.
- Cao M, Xiang Q, Liu Y, et al. Organ weight, blood physiological and biochemical indexes and proportion of immune cells in CBA/CaJ mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 418-423.
- [24] Comhair SA, Erzurum SC. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(1): 93-124.

[收稿日期] 2019-04-17

杜凯然,邓强,张彦军,等. 治疗脊髓损伤之建立星形胶质细胞模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 540 - 544.

Du KR, Deng Q, Zhang YJ, et al. Advances in research of the establishment of astrocyte models for treatment of spinal cord injury[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 540 - 544.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.018

治疗脊髓损伤之建立星形胶质细胞模型的研究进展

杜凯然¹, 邓强^{2*}, 张彦军², 朱宝², 马同¹, 彭冉东², 李军杰¹, 徐浩军¹
王雨榕¹, 郭挺²

(1. 甘肃中医药大学, 中医临床学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 脊柱骨二科, 兰州 730050)

【摘要】 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种极为复杂的破坏性疾病,一旦脊髓损伤发生,治疗棘手,对患者家庭、国家带来巨大的经济、社会负担。近年来,通过建立大鼠脊髓损伤细胞相关模型,对于脊髓损伤的病因病机治疗等方面有了进一步的认识,而星形胶质细胞模型的建立对脊髓损伤治疗有深远意义。研究发现,星形胶质细胞作为靶细胞通过血-脑脊液屏障直接或间接对脊髓损伤有双向调控作用。本文通过对近年来星形胶质细胞模型培养制备方案等研究进行总结,以期建立一个客观化、量化、可模拟化的星形胶质细胞模型提供指导对脊髓损伤的治疗提供新的思路。

【关键词】 脊髓损伤;星形胶质细胞;细胞造模;血-脑脊液屏障;小胶质细胞

【中图分类号】 **【文献标识码】** **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0540-05

Advances in research of the establishment of astrocyte models for treatment of spinal cord injury

DU Kairan¹, DENG Qiang^{2*}, ZHANG Yanjun², ZHU Bao², MA Tong¹, PENG Randong²
LI Junjie¹, XU Haojun², WANG Yurong², GUO Ting¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Clinical College of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

2. Gansu Provincial Hospital of TCM, Division 2 of the Spinal Column, Lanzhou 730050)

Corresponding author: DENG Qiang. E-mail:18093188800@163.com

【Abstract】 Spinal cord injury is an extremely complex and debilitating condition. Once spinal cord injury occurs, it is difficult to treat, and thus poses a great economic and social burden to both caregivers and healthcare resources. In recent years, the establishment of rat spinal cord injury cell models has contributed to our understanding of the etiology and pathogenesis of spinal cord injury, in particular, the establishment of an astrocyte model has a profound significance for the treatment of spinal cord injury. Studies have found that astrocytes, as target cells that can effectively promote tissue protection and functional repair after spinal cord injury, directly or indirectly regulate spinal cord injury through blood-brain barrier barrier. This paper reviews the recent studies on the preparation of astrocyte culture models to provide guidance for the establishment of an objective, quantitative, and simulative astrocyte model, and presents new ideas for the treatment of spinal cord injury.

【Keywords】 spinal cord injury; astrocytes; cell modeling; blood-brain barrier; microglia

【基金项目】 国家自然科学基金(8186150544)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(8186150544).

【作者简介】 杜凯然(1993—),男,硕士研究生在读,主要从事脊髓损伤防治及治疗。Email: 616361469@qq.com

【通信作者】 邓强,男,硕士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事中医药防治脊柱相关疾病。Email: dengqiang11576@sohu.com

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是由各种原因引起的脊髓结构和功能损害,造成损伤水平以下脊髓神经功能 (运动、感觉、括约肌和自主神经功能) 障碍^[1]。SCI 作为脊柱损伤最常见且最严重的并发症,呈逐年上升的趋势^[2]。因此,脊髓损伤是一种高发病率、高致残率、高致死率、低治愈率的疾病。由于 SCI 发病累及人体多个系统、并发症复杂而多,治疗周期长、治疗方式繁杂、花费高且疗效不明显,目前临床尚无有效的治疗方法使得 SCI 后运动功能的恢复。目前,围绕脊髓损伤的研究模型主要为构建脊髓损伤动物模型和损伤模型的修复治疗。近年来的研究发现,胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、一氧化氮 (NO) 和活化的星形胶质细胞能够有效地促进脊髓损伤后的组织和功能修复,起到组织保护作用,成为治疗脊髓损伤的干预靶点,促进神经细胞的功能恢复和再生^[3-4],但这种促进修复的作用机制尚不明确。为了深入研究这个问题,首先需要建立一个理想的星形胶质细胞模型。本文就建立一个客观、定量、可模拟的星形胶质细胞模型的问题,对近年来国内外的研究进展作一综述,为指导今后脊髓损伤治疗的研究提供参考^[5]。

1 星形胶质细胞经损伤的独特作用

星形胶质细胞广泛存在于神经系统中,其形态可以分为三种类型:原浆性、纤维性、放射状^[6]。其作用主要表现在以下几个方面:①神经递质传递的维持和建立血-脑脊液屏障。②星形胶质细胞可以对神经元的修复、提供神经的营养因子发挥重要作用^[7-8]。有科学家发现,在额叶神经元和海马神经元附近的星形胶质细胞能够储存和释放糖原,在神经元葡萄糖糖元消耗不足的情况下能够给予及时的补充^[9-10]。③星形胶质细胞在构建血-脑脊液屏障与维持中枢神经系统稳态中发挥巨大的作用^[9]。④星形胶质细胞也对于神经系统的发育、突触传递、以及神经系统内环境的稳定起着至关重要的作用^[11]。但过度的反应性胶质细胞增生也会导致一些不利于神经恢复的改变^[12-13]。如过多的星形胶质细胞增生在脊髓损伤的周围形成瘢痕组织,阻碍新生的神经元的生长。因此,星形胶质细胞对于脊髓损伤的恢复形成是最主要的影响因素。国外一些学者提出移植未成熟的星形胶质细胞有利于较

小瘢痕组织的形成,能够大大提高脊髓损伤的后期修复功能^[14-15]。鉴于星形胶质细胞对于神经元的恢复起到的独特作用,我们应该重视对于星形胶质细胞的研究。

2 星形胶质细胞模型的建立

关于星形胶质细胞的分离,最初由国外科学家建立的啮齿类动物的星形胶质细胞分离培养模型^[16-17]。起初由于技术条件限制,分离细胞要经过多次化学消化,对于细胞的结构破坏性大。后来的学者们在此基础上不断的改进细胞造模的方法,虽然取得显著的成效,但是造模方法种类颇杂,缺乏一种便捷、有效、重复率高的造模方法。以下是总结一些相对效率较高的造模方式,为今后建立一种更具优势的造模方法提供参考。

2.1 24 h 之内新生 SD 大鼠的星胶质细胞模型的制备

龙根等^[18]选取 24 h 内的新生 SD 大鼠脑组织,用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍,在冰块上去除脑膜及血管,取皮层组织细胞置于无血清的 DMEM/F12 中,用眼科剪剪碎,然后在 0.125% 胰酶中放置温度 37℃ 消化 2 min,200 目筛网过滤后,放置在恒温的培养箱中一天,除掉死亡细胞后使用第二代细胞。有研究表明取 24 h 新生大鼠的脑组织,较 1~2 d 大鼠的脑组织易于剥离,并且能够减少一些组织的混杂而影响细胞的纯度,影响实验模型建立的准确性。单纯使用胰蛋白酶消化,能够减少细胞培养所需要的仪器、溶液,降低对于实验室条件的要求,但是此法也存在不可忽视的缺陷,如:实验单纯使用胰蛋白酶剔除细胞杂质并不能够达到实验所要求的细胞纯度,从而影响最终的实验结果。

2.2 新生 1~3 d 新生 SD 大鼠的星胶质细胞模型的制备方法

靳辉等^[19]在建立星胶质细胞培养的过程中选取 1~2 d SD 大鼠,借鉴 McCarthy^[20]的混合胶质细胞的培养及分离方法,将新生大鼠消毒后取出脑组织,在冷的 D-Hanks 液中放入分离脑组织,剪碎后放入离心管中,使用胰蛋白酶进行消化 20 min,尽量轻微地将上清液吸除,使用吸管反复吹打所制成的悬浮液后经过 200 目的筛网滤过,将过滤后的悬液放置在培养瓶中,将培养瓶放置在 37℃、50 mL/L

CO₂ 培养箱中 15 min 进行差速黏附处理,最终将其接种在 L-多聚赖氨酸瓶中,放置在培养箱中,每隔 3 d 更换培养液。实验者采用使用 1~3 d 的新生 SD 大鼠的脑组织用于建立细胞模型,在培养的过程中将常规的恒温摇床与差速贴壁法相结合,利用成纤维细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞贴壁的牢固程度、时间差,避免化学成分造成细胞的破坏,较传统仅仅使用蛋白酶溶液所获得的细胞纯度更高。

2.3 新生大鼠星形胶质细胞的原代培养

查雨锋等^[21]在选取新生 1~2 d 的 SD 大鼠取其大脑灰质放置冷 DMEM 培养液中培养,用 D-Hanks 液清洗 3 次使用眼科剪剪碎后在 37℃、0.25% 的消化酶液中消化震荡 15~20 min,加入 10% FBS 的高糖 DMEM 终止消化后离心 5 min,去掉其上清液后将其沉淀和终止液混匀后放入 200 目滤网,将细胞接种于未包被的细胞培养瓶中培养。首次 12 h 后取出培养液之后每隔 2~3 d 更换一次。王建斌等^[22]在星形胶质细胞的原代培养的过程中发现在显微镜下星形胶质细胞的纯度平均仅为 1.94%,培养的细胞中含有寡突胶质细胞、小胶质细胞及成纤维细胞等。此种方法最大的优势在于操作简单、快捷、复制简单,对于初学者易于掌握且成功率高,减少实验的成本且还能达到实验的目的,但是对于培养皿中的星形胶质细胞的纯度低、破坏严重从而严重影响实验的科学性,导致实验数据的真实性降低,对于要求精确的实验,此种实验模型就略显粗糙。

2.4 新生大鼠星形胶质细胞的隔代培养

2.4.1 胰蛋白酶消化法

黎天尊等^[23]在建立星形胶质细胞模型时选取第三代细胞用于实验。取新生 1 日龄 SD 大鼠,剖开脊髓组织,剥离组织和血管,使用眼科剪将组织剪为 0.5~1.0 mm 小块,0.25% 胰蛋白酶消化 15 min 后继续用 DMEM/F-12 培养基进行消化、过滤、离心后去掉上清液后,加入新的培养液装进一次性的塑料培养瓶中,将此瓶放置在恒温 37℃ 含有 5% CO₂ 的培养箱中,每隔 24 h 后换液待细胞长约 80% 融合后,使用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代,最终取第三代细胞。此种方法比原代星形胶质细胞在制作的过程中所存在的血细胞、小胶质细胞、成纤维细胞的数量明显降低,利用胰蛋白酶剔除与本实验无关的杂质,此种方式虽然比原代培养具有一定的优势,但是建立细胞模型的同时需要胰蛋白酶的多次

消化,从而对于星形胶质细胞的本身也有很大的损害,因而此法也有其局限性。

2.4.2 恒温摇床震荡法与差速贴壁法相结合

恒温摇床震荡法最初由国外学者提出^[24-25],靳辉等^[19]在此方法的基础上进行改良,运用其他技术如倒置相差显微镜、HE 染色、GFAP 免疫荧光等技术 and 恒温摇床震荡法与差速贴壁法相结合,充分利用成纤维细胞的贴壁能力强、速度快等特点,先采取震荡摇床的方法剔除成纤维细胞后,再同时利用小胶质细胞贴壁速度慢、贴壁周期长等特点利用震荡摇床的方法去除残余。此种方法充分利用成纤维细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞的特点,在传统的技术手段上与一些新的提取模式相结合。此种方法优势在于:①提高了星形胶质细胞的纯度并且减少化学溶液、物理机械等方法对于细胞的损伤;②避免了一些初学者在分离脑膜时未能把脑膜剔除干净,从而为成纤维细胞的繁殖提供温床,有研究证实脑膜残留能够增加成纤维细胞的繁殖^[26]。但是此种方法缺点:①并未彻底清除成纤维细胞与小胶质细胞,真正能用于实验的星形胶质细胞的纯度未能达到实验所预设的结果;②需要 37℃ 恒温摇床,而许多实验室尚未配备此种仪器,故此方法目前仍存在一些缺陷。

2.4.3 差速贴壁、梯度血清、十字手摇法相结合

丁娟等^[27]在现有的星形胶质细胞模型的基础上改进一种培养方法,主要采取逐步递增的三个步骤:首先使用常规差速贴壁法,利用成纤维细胞贴壁快、小胶质细胞贴壁速度慢、周期长的特点,先剔除一部分成纤维细胞与小胶质细胞。再利用成纤维细胞对于血清的依赖程度,通过“梯度血清”的方法再次剔除成纤维细胞与小胶质细胞。在实验的 1~2 d 使用 20% DMEM 以促使星形胶质细胞快速生长,然后以 10% DMEM 培养 2 d 以控制细胞的生长;最后不使用 DMEM 溶液培养 2 d。此种方法培养 7 d 后,一部分成纤维细胞由于缺少血清而死亡;第三步利用成纤维细胞与小胶质细胞比星形胶质细胞的贴壁能力差,在培养第 7 天后使用“十字手摇法”震荡 5 min,贴壁不牢固的成纤维细胞和小胶质细胞就会脱落^[28]。该方法最大的优势在于:①逐层递增的方法剔除细胞的杂质,较传统方法的效率更高,得到的星形胶质细胞的纯度更高;②比较“恒温摇床法”所需 37℃ 恒温摇床相比,“十字手摇法”为没有恒温摇床的实验室提供新的解决方法,

大大增加此种方法的适用范围^[29]。上述各种方案均有自身的优势与局限性,在星形胶质细胞造模过程中,一定要尽量有效规避其劣势,各方法之间有效结合、优化配置,为今后建立星形胶质细胞模型提供一种完整有效的方案。

3 结语

目前,脊髓损伤的治疗尚缺乏切实有效的办法,是国内外的脊柱研究领域一个急需解决的问题。有大量的研究证实,脊髓损伤中血-脑脊液屏障损伤导致星形胶质细胞膜上水通道蛋白-4 的表达改变,是血管源性水肿、细胞毒性水肿的重要因素^[30]。因此,星形胶质细胞在脊髓损伤的修复中扮演重要角色,星形胶质细胞的体外培养模型在病理、生理及药理学研究中方面都具有重要意义^[31]。然而,建立任何一个脊髓损伤细胞模型都应尽可能接近人体脊髓损伤的实际情况,制作脊髓损伤细胞模型也要尽量模拟人体脊髓损伤的发生机制,并将在脊髓损伤细胞模型制备中的发现应用于临床实践。迄今已经取得的许多进展,可为临床治疗脊髓损伤提供理论指导^[32]。目前建立星形胶质细胞模型时,选取新生 SD 大鼠的优势明显大于猴、狗、猫等一些动物。例如:①大鼠成本低;②大鼠的操作方便,易于获取,也减少了研究人员在实验过程中被动物咬伤的机会;③最为重要的是大鼠脊髓的星形胶质细胞模型很接近人体的损伤模型,更有利于还原实验的数据的科学性。而上文中讲述的造模方法各有优缺点,大多数学者倾向于差速贴壁、梯度血清、十字手摇法相结合,该方法利用化学、物理等方法相结合,层层剔除细胞的杂质,相比较于其他方法,能够获得较高纯度的星形胶质细胞。但至今尚没有完全规范化、统一性、量化的标准应用于此,建立一种量化星形胶质细胞模型的方法,仍是今后努力研究的方向。

参 考 文 献(References)

[1] 王亚芳,兰婧,刘福,等. A 型肉毒素重链干预对大鼠脊髓损伤后生长相关蛋白表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 12-19.
Wang YF, Lan J, Liu F, et al. Effect of botulinum neurotoxin type A heavy chain on the growth-related proteins after spinal cord injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 12-19.

[2] 齐英娜,谭明生. 脊髓损伤动物模型的研究现状[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(10): 927-929.
Qi YN, Tan MS. Current research on animal model of spinal cord

injury: a review of the literature [J]. Orthop J Chin, 2018, 26(10): 927-929.

[3] 李强,郑苏林,冯瑜菲,等. 水温改变对斑马鱼脊髓损伤修复的影响[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 1-7.
Li Q, Zheng SL, Feng YF, et al. Effect of water temperature on the recovery of spinal cord injury in zebrafish [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 1-7.

[4] 袁一旻. 星形胶质细胞活化在脊髓损伤修复中的作用及其调控[D]. 第二军医大学, 2012.
Yuan YM. Reactive astrocytes as a target for treatment of spinal cord injury [D]. Second Military Medical University, 2012.

[5] Schuld C, Franz S, Brüggemann K, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury: impact of the revised worksheet (revision 02/13) on classification performance [J]. J Spinal Cord Med, 2016, 39(5): 504-512.

[6] 黄潇,谷亚坤,程雪燕,等. 星形胶质细胞作为脊髓损伤治疗靶细胞的研究进展[J]. 生理学报, 2017, 69(6): 794-804.
Huang X, Gu YK, Cheng XY, et al. Astrocytes as therapeutic targets after spinal cord injury [J]. Acta Physiol Sin, 2017, 69(6): 794-804.

[7] 李建国,初同伟. 脊髓损伤后星形胶质细胞的病理变化及相关治疗措施的进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(8): 632-634.
Li JM, Chu TW. The pathological changes of astrocytes after spinal cord injury and the progress of related treatment [J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2007, 17(8): 632-634.

[8] Giménez y Ribotta M, Menet V, Privat A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS [J]. Prog Brain Res, 2001, 132(132): 587-610.

[9] Weber B, Barros LF. The Astrocyte: Powerhouse and recycling center [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(12): pii: a020396.

[10] Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism [J]. Glia, 2007, 55(12): 1263-1271.

[11] 师思,王晓良. 星形胶质细胞在糖尿病脑病中的变化及作用[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 56-61.
Shi S, Wang XL. Roles and functional changes of astrocytes in diabetic brain encephalopathy [J]. J Int Pharm Res, 2016, 43(1): 56-61.

[12] Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho) physiology [J]. J Neurochem, 2012, 121(1): 4-27.

[13] 王超,邢喜春,李文志. 星形胶质细胞活化增殖在脊髓损伤修复中作用研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(9): 837-839.
Wang C, Xing XC, Li WZ. Research progress of astrocyte activation and proliferation in repairing spinal cord injury [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2015, 29(9): 837-839.

[14] Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system [J]. Nature, 2016, 407(6807): 963-970.

[15] Joosten EA, Veldhuis WB, Hamers FP. Collagen containing neonatal astrocytes stimulates regrowth of injured fibers and

- promotes modest locomotor recovery after spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77(1): 127-142.
- [16] Wang JJ, Chuah MI, Yew DT, et al. Effects of astrocyte implantation into the hemisectioned adult rat spinal cord [J]. *Neuroscience*, 1995, 65(4): 973-981.
- [17] Zhang S, Zeng X, Yang H, et al. Mast cell tryptase induces microglia activation via protease-activated receptor 2 signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 29(5-6): 931-940.
- [18] 龙根, 谢敏杰, 王伟, 等. RNA 干扰技术沉默星形胶质细胞 Cdk5 模型的建立[J]. *生物医学工程与临床*, 2018, 22(3): 315-319.
- Long G, Xie MJ, Wang W, et al. Model establishment of cyclin-dependent kinase 5 silence in astrocytes by RNA interference [J]. *Biomed Eng Clin Med*, 2018, 22(3): 315-319.
- [19] 靳辉, 冯改丰, 杨蓬勃, 等. 大鼠脑皮质星形胶质细胞的体外优化培养及鉴定[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2015, 36(6): 849-853.
- Ji H, Feng GF, Yang PB, et al. The optimized culture and identification of astrocytes from rat cortical tissue [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (MedSci)*, 2015, 36(6): 849-853.
- [20] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. *J Cell Biol*, 1980, 85(3): 890-902.
- [21] 查雨锋, 傅晓钟, 张顺, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞与周细胞、星形胶质细胞共培养建立体外血脑屏障模型 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 730-735.
- Cha YF, Fu XZ, Zhang S, et al. Establishment of an in vitro blood-brain barrier model by co-culturing rat brain microvascular endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(5): 730-735.
- [22] 王建斌, 冯敏, 廖芸, 等. 恒河猴大脑皮质星形胶质细胞的原代培养及鉴定 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2017, 39(1): 58-64.
- Wang JB, Feng M, Liao Y, et al. Primary culture and identification of astrocytes from cerebral cortex of rhesus macaque [J]. *Chin J Cell Biol*, 2017, 39(1): 58-64.
- [23] 黎天尊, 夏永智, 刘强, 等. PAR2 在损伤的大鼠脊髓星形胶质细胞增生中的作用研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(5): 656-661.
- Li TZ, Xia YZ, Liu Q, et al. Role of PAR2 in proliferation of injured spinal cord astrocytes of rats [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2015, 40(5): 656-661.
- [24] Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, et al. Control of synapse number by glia [J]. *Science*, 2001, 291(5504): 657-661.
- [25] Woo J, Lee J, Kim MS, et al. The effect of aquaporin 5 overexpression on the Ras signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(2): 291-298.
- [26] 丁冬, 郝铁成, 曹军, 等. 嗅鞘细胞的不同纯化方法及结果 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(19): 3766-3769.
- Ding D, Hao TC, Cao J, et al. The results of olfactory ensheathing cells from different purification methods [J]. *Prog Mod Biomed*, 2014, 14(19): 3766-3769.
- [27] 丁娟, 丁敬宾, 马小虎, 等. 一种改进的大鼠大脑皮质星形胶质细胞的培养方法 [J]. *神经解剖学杂志*, 2017, 33(3): 349-353.
- Ding J, Ding JB, Ma XH, et al. An improved culture method of astrocytes in cerebral cortical of rats [J]. *Chin J Neuroanat*, 2017, 33(3): 349-353.
- [28] 刘犇, 陈清, 郭江. 大鼠脑皮质星形胶质细胞体外培养方法的改进 [J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(5): 570-572.
- Liu B, Chen Q, Guo J. An improved method for the in vitro cultivation of astrocytes from cerebral cortex of SD rats [J]. *J Trop Med*, 2011, 11(5): 570-572.
- [29] 刘建峰, 丁艳平, 王建林, 等. 脑水通道蛋白的分布、功能及调控机制研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(2): 1827-1803.
- Liu JF, Ding YP, Wang JL, et al. Distribution, function and regulation mechanism of aquaporin in the brain [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2014, 18(2): 1827-1803.
- [30] Aparicio-Blanco J, Martín-Sabroso C, Torres-Suárez AI. In vitro screening of nanomedicines through the blood brain barrier: A critical review [J]. *Biomaterials*, 2016, 103: 229-255.
- [31] 李兵奎, 常巍, 宋跃明. 脊髓损伤动物模型制备的研究进展 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2012, 22(10): 947-950.
- Li BK, Chang W, Song YM. Progress of animal model establishment with spinal cord injury [J]. *Chin J Spine Spinal Cord*, 2012, 22(10): 947-950.
- [32] 秦峰, 董大明. 脊髓损伤模型进展 [J]. *疑难病杂志*, 2015, 14(4): 436-439.
- Qin F, Dong DM. Progress in spinal cord injury models [J]. *Chin J Difficult Compl Cases*, 2015, 14(4): 436-439.

乔大伟,李玉芳,张蕾,等. 结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4):545 - 548.

Qiao DW, Li YF, Zhang L, et al. Progress in research on animal models of colorectal cancer with liver metastasis generated by patient-derived tumor xenograft [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):545 - 548.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.019

结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植 动物模型的研究进展

乔大伟^{1,2}, 李玉芳^{1,2}, 张蕾^{1,2}, 姜礼双^{1,2}, 孔桂美¹, 卜平^{1,2*}

(1. 扬州大学临床医学院消化内科, 江苏 扬州 225001; 2. 江苏省中西医结合老年病重点防治实验室, 江苏 扬州 225001)

【摘要】 肝是结直肠癌转移主要的靶器官, 结直肠癌肝转移也是结直肠癌患者死亡的主要原因。近年来研究显示, 结直肠癌肝转移原代肿瘤组织的异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)动物模型能较好的复制临床肿瘤患者的特征, 其建模方法主要分为异种原位与异种异位种植模型。本文综述结直肠癌肝转移 PDX 动物模型造模方法及其应用范围, 以期为实验建模提供参考。

【关键词】 结直肠癌; 结直肠癌肝转移; 原代肿瘤组织的异种移植; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0545-04

Progress in research on animal models of colorectal cancer with liver metastasis generated by patient-derived tumor xenograft

QIAO Dawei^{1,2}, LI Yufang^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, JIANG Lishuang^{1,2}, KONG Guimei¹, BO Ping^{1,2*}

(1. Department of Gastroenterology, Clinical Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu, China.

2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu)

Corresponding author: BO Ping. E-mail: boping@yzu.edu.cn

【Abstract】 Liver is the main target organ for colorectal cancer metastasis. Liver metastasis is also the main cause of death in patients with colorectal cancer. Recent studies have shown that liver metastasis of colorectal cancer patient-derived tumor xenograft (PDX) can better replicate the clinical characteristics of clinical tumors colon cancer. At present, the primary models used are the orthotopic tumor xenograft model and ectopic tumor xenograft model. To provide a reference for experimental modeling, this paper reviews PDX animal models for colorectal cancer liver metastasis and their application range.

【Keywords】 colorectal cancer; liver metastasis; patient-derived tumor xenograft; PDX; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大癌症和癌症死亡的第四大原因^[1]。近年来由于生活方式和饮食习惯的变化,我国结直肠癌发病率和死亡率呈逐步上升趋势,结直肠恶性肿瘤在肿瘤

发病率中占据第5位^[2]。肝是CRC最常见的远处转移部位,CRC患者中约有一半会发生肝转移。结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases, CRLM)也是CRC患者死亡的主要原因。尽管经过

【基金项目】 国家自然科学基金(81673736);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX18_0808)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81673736) and Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX18_0808).

【作者简介】 乔大伟(1993—),男,硕士,主要从事消化道肿瘤研究。Email: qiao_dawei@126.com

【通信作者】 卜平,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事消化系统疾病研究。Email: boping@yzu.edu.cn

化疗后,患者存活率有所提高,但手术切除仍被认为是肝转移患者的唯一治疗选择。虽然根治性手术是标准治疗方式,但只有 10%~20% 的患者被认为有资格进行切除。即使在成功切除后,大多数患者仍然会复发^[3]。近年来,由于免疫缺陷小鼠的广泛应用,以及患者的个性化治疗越来越受到关注,源于患者原代肿瘤组织的异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)的临床前模型研究火热。PDX 模型是指将手术期间获得患者肿瘤部分组织或者人源肿瘤细胞植入免疫缺陷小鼠。用于 PDX 模型的小鼠类型包括裸鼠, SCID 小鼠, NOD/SCID 小鼠和 NSG 小鼠^[4]。本文就目前常用的 CRLM-PDX 动物模型进行综述。

1 异种原位种植模型

异种原位植入,即在小鼠中与人类患者原始肿瘤部位相对应的部位植入人源肿瘤细胞,使小鼠肿瘤发生与发展的行为与临床患者相似。1984 年, Wang 等首次采用异种原位种植建模^[5],他们将人 CRC 细胞 Co115 注入裸鼠的降结肠,肿瘤在注射部位生长繁殖并发生转移。随后有学者^[6]利用裸鼠建立了首例人体肿瘤组织异种原位种植的模式(patient-derived orthotopic xenograft, PDOX)。从那时起, PDOX 模型被用于肿瘤微环境研究,探索肿瘤发生发展的机制,包括自发转移形成^[7]。这些模型使研究人员能够研究药物疗效,如用各种化疗方案以预测患者的临床反应^[8],还用于研究新的肿瘤标志物抗性和易感性,并检测新的药物方案以克服抗性。Wang 等^[9]采用自制接种器将 0.1 mL 细胞浓度为 2×10^7 /mL 的人结肠癌细胞 HCT116 接种于 BALB/c 裸鼠直肠,成功建立异种原位种植模型,直肠原位接种组 18 只成瘤率为 100%,未发现肝转移。此法转移发生时间较长。Hite 等^[10]模拟了结直肠癌患者中原发肿瘤生长和自发性肝转移的模式,使用荧光素酶标记的 HT-29 细胞建立了异种原位小鼠直肠种植模型,结果发现直肠内注射的死亡率为 4.0%(1/25),60% 的小鼠有肝转移,56% 发生肺转移,证实直肠内注射建立异种原位种植模型能准确地模拟肠癌原发性肿瘤生长和自发转移的过程,具有安全性,可重复性及高模拟性。原位种植方法操作简单,能更好地模拟结直肠癌的临床生物学行为,比如肿瘤的局部生长、肿瘤的浸润、癌细胞原位脱落穿过血管壁进入门静脉循环血运转移等过程。但是因直肠壁较薄故种植成功率较低,远处转移时间较长,因此,为了能够监测转移的发生,该模型成像技术是必不可少的。

2 异种异位种植模型

异种异位种植模型按植入位置不同可以分为皮下种植、脾种植、门静脉/肠系膜种植、肝种植、腹腔扩散种植及尾静脉种植。

2.1 皮下种植模型

皮下植入模型可以直接测量肿瘤大小,发展成类似于人类肿瘤的结直肠癌,但几乎不会产生转移。Blomme 等^[11]收集患者手术时新鲜肿瘤样品,切成 60 mm^3 的细小片段并皮下移植到 NOD-SCID 小鼠的皮肤中。利用 MALDI 成像技术,对 6 名患者肿瘤组织与 PDX 第 4 代的肿瘤组织进行了代谢比较分析。首次研究发现 CRC/CRC-LM PDX 模型在代谢水平能够维持功能稳定性。证明人类癌细胞在 PDX 模型上,不仅能产生类似人类的肿瘤组织,且能对患者肿瘤组织保持高度的遗传性和转录的保真度。这将为新药物应用于临床前进行实验研究提供一个非常好的实验平台。Brown 等^[12]收集 16 名肠癌肝转移患者肝转移灶组织,并将肿瘤移植到 NOD.CB17-Prkdcscid/Arc 小鼠皮下。结果植入率达 81%,患者与 PDX 化疗敏感性概况之间的阳性匹配率为 67%。该试验研究证明了使用 CRLM 的 PDX 模型作为评估 PDX 化疗敏感性的平台的可行性。Lu 等^[13]将患者肿瘤组织约 2 mm 大小的碎片并植入 8~10 周龄 JAX.NOD.CB17-PrkdcSCID-J 小鼠的侧腹。使用基于基因的方法与结直肠癌的临床前模型的结合来鉴定可用于治疗结肠直肠癌肝转移的协同药物,即奥沙利铂和 mTOR 抑制剂联合应用可有效治疗结肠直肠癌肝转移患者。此法操作简单,植入成功率高,便于观察,重复性好。但是因皮下生长的肿瘤常易被纤维膜所包绕,不易表现恶性肿瘤浸润和转移的特性,故常常用于评价单纯针对原发灶或转移灶组织的保真性,化疗敏感性及治疗的有效性。

2.2 脾种植模型

脾种植法是目前大肠癌肝转移模型公认的最佳模式之一。由于肿瘤细胞从脾内种植细胞,植入的细胞逃逸大量免疫细胞的攻击,主要通过血管浸润发生肝转移。因此,能够更好模拟人体内 CRC 切除后的肝转移。根据是否切除脾分为脾保留法和脾切除法。

2.2.1 脾保留法

脾保留是指将人 CRC 细胞从脾上极或下极注入动物脾内,脾送回体内,瘤细胞经脾静脉进入肝。Fleten 等^[14]通过脾注射 HT 细胞株 HT29 和 HCT116,在裸鼠中建立肠癌肝转移模型。注射后,

HCT116 和 HT29 细胞在所有动物中产生肝肿瘤。Kawaguchi 等^[15]将人 HT29-RFP 细胞(5×10^5)注射到裸鼠的脾上极和下极。注射后 3 周,成功建立结肠癌肝转移模型。此法成功率高,应用最为广泛。最近, Kim 等^[16]在使用 CRC-PDXTX 以及 CRLM-PDXTX 模型基础上,证明了 CCSP-2 靶向探针可以鉴定结肠外 CCSP-2 阳性结肠肿瘤。这表明 CCSP-2 靶向分子成像能够检测转移性疾病。对于结肠癌的治疗,早期转移或复发检测,有望通过在疾病早期检测病变来挽救更多患者,延长生存期。此法保留了脾的部分免疫功能,保存宿主固有的抗肿瘤免疫力,且操作简单,易于实施。但是肝转移瘤形成的同时发生脾肿瘤,转移灶常为巨大癌结节,影响小鼠的存活时间,并且脾肿瘤通常在肝转移瘤前发生,会影响实验的准确性,不适于验证周期较长的药物实验。

2.2.2 脾切除术

脾切除是指将人 CRC 细胞从脾上极或下极注入实验动物脾内,待瘤细胞经脾静脉进入肝,切除脾。Oshima 等^[17]制作了用荧光素酶和 tdTomato 稳定标记的具有不同的生长特性的人结直肠癌 HCT116 细胞的单克隆衍生物,经脾注射入 6~8 周龄无胸腺裸鼠后,将脾切除,使用体内成像系统 (IVIS),可以通过体内发光和离体荧光成像,监视转移的发生发展,结果大部分能够产生肝转移。由于该模型与临床观察到的肝转移灶相似,因此它可作检测与肝转移相关基因,并用于肝转移灶局部消融或辅助治疗研究。此法虽然不能模拟肿瘤分泌降解酶降解细胞外基质,伪足形成,侵及血管,进入血液等关键步骤,而且在一定程度上令免疫系统受损,术后动物病死率高,操作较复杂,对试验者技术要求较高。但是很好地模拟了大肠癌根治术后因血行转移而发生肝转移的过程,肝转移率高,模型稳定,转移瘤向各个肝叶呈弥漫性转移。可以满足各种检测方法的取材需要。是研究肿瘤形成和分析新的治疗效果的理想模型。

2.2.3 半脾模型

半脾模型为脾保留和脾全切的改良造模方法,利用脾的解剖特点,将人 CRC 细胞注入脾下极,待瘤细胞经脾静脉进入肝,切除脾下极,保留脾上极,具有一定的创新性。Bai 等^[18]利用裸鼠脾的特殊解剖,建成半脾模型。脾中央利用一次性钛夹夹闭并切断,分成两个带血管蒂的半脾。将人 HT29 结直肠癌细胞接种于近端半脾被膜下,远端半脾埋入皮下备治疗所需,共分 6 组观察制模 30 d 后的肝转移评分、淋巴结

转移及血性腹水情况。结果人 HT29 结直肠癌细胞建立的肝转移半脾模型成瘤率为 100%。此法既保留了脾的部分免疫功能,又大大降低模型建立时脾肿瘤的干扰率。且此模型可以经静脉给药,更加贴近于临床,可应用于预防性肝转移治疗的实验设计。但是相比脾保留与脾全切,动物实验手术操作复杂,对试验者技术要求极高。该模型为研究结直肠癌肝转移的生物学机制和抗转移治疗提供了较为理想的实验模型,且该模型能应用于抗肿瘤药物的筛选,因此是目前造模的最有效方法之一。

2.3 门静脉/肠系膜种植模型

此法是将人 CRC 细胞注入门静脉/肠系膜静脉,经血流入肝。Thalheimer 等^[19]使用荧光素酶标记的人结肠癌细胞系 HCT-116Luc(pos) 的细胞(2.5×10^6),通过门静脉注射到免疫功能不全的裸鼠中。使用生物发光体内成像 (BLI) 技术,分析动物的肿瘤生长。注射后 4 d,即产生肝转移。该模型利用荧光素酶活性,通过非侵入性地成像技术,提供了关于肿瘤负荷和治疗有效性的有价值的信息。因此,所呈现的基于 HCT-116Luc(pos) 细胞生长的肝内转移模型适用于不同癌症治疗策略的体内测试。此法相比脾种植,肿瘤转移速度更快,肝转移率更高,适用于肿瘤药物的筛选。但是手术难度更大,存在一定风险,死亡率更高,而且不能模拟肿瘤转移的全过程,减少了原发瘤最初侵袭周围组织和穿入血管等步骤。

2.4 肝种植模型

肝种植是将人 CRC 细胞注射到肝中或者将临床上肿瘤组织直接植入肝发展转移性肿瘤。Roque-Lima 等^[20]将新鲜肿瘤组织磨成碎片,直接植入裸小鼠肝上,成功建立 PDXTX 临床前模型,该模型准确地复制肿瘤内异质性,有望为 CRLM 患者测试各种治疗方案,包括疾病进展生物标志物和治疗反应性研究。此法肿瘤生长速度快,转移率较高。操作简单,易于实施,且相对廉价,重复性好。但是仅仅涉及转移的晚期过程,没有涉及结肠癌原位生长的演进过程,故与人体内结肠癌转移观察模拟度较差,不适合结肠癌这种通过血道及淋巴道为主要转移途径的肿瘤模型制作。而且大部分仅在实验部位成瘤,周围很少有转移的卫星结节,不符合临床上结肠癌肝转移常为多发转移的特点。此模型适用于个体肿瘤基础上测试各种化疗剂以帮助临床。

2.5 腹腔扩散种植模型

腹腔扩散种植是将人 CRC 细胞通过微型注射器直接注射入动物腹腔内,使其播散性生长,引起

腹水(含有大量瘤细胞)。解剖小鼠后观察肝转移或其他脏器转移。如果再将这种带瘤腹水移植至下一代动物,便建立腹水瘤模型。Miyoshi 等^[21]用 miR-139-5p 转染的 3×10^6 个人 Caco-2 细胞腹膜内注射到裸小鼠中,建立 CRC 腹膜转移的小鼠模型,具有较高的肝及腹膜转移率。此法操作简单,肝转移率高。转移周期短,短期内可复制大量模型。但是没有专一性器官转移,仅仅模拟晚期肿瘤患者转移途径,对于淋巴转移及血行转移意义不大。该模型常用于 CRC 术后腹腔种植播散和癌症晚期腹腔广泛转移的病理生理研究。

3 展望

随着模拟癌症发生的免疫缺陷的动物模型不断升级,最近开发的 CRLM-PDIX 模型,为 CRC 及 CRLM 的研究增添了新的内容。研究人员已经开发出非常准确的临床前模型。在更好地了解疾病过程以及未来研究人员可用的改进技术的同时,我们可以预期这些 CRLM-PDIX 模型会有更多进展。这将有助于确保临床前动物研究结果与其临床对人结果保持一致。CRLM-PDIX 模型主要用于生物标志物,药物,肿瘤生物学等研究。尽管存在可变的基质和缺乏合适的免疫系统的缺点,但该模型已经证明具有优异的预测能力,可以被认为是外部有效性的量度。这为 CRC 及 CRLM 患者带来了福音。

参 考 文 献(References)

- [1] Gong C, Long Z, Yu Y, et al. Dietary factors and polymorphisms in vitamin D metabolism genes: the risk and prognosis of colorectal cancer in northeast China [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 8827.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [3] Al Bandar MH, Kim NK. Current status and future perspectives on treatment of liver metastasis in colorectal cancer (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5): 2553-2564.
- [4] Roque-Lima B, Roque CCTA, Begnami MD, et al. Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice [J]. *J Drug Target*, 2018, 1-7.
- [5] Wang W, Sordat B, Paquet D, et al. Human colon tumors in nude mice: implantation site and expression of the invasive phenotype 1. In: Sordat B, editor. *Immune-deficient animals* [C]. 4th International Workshop on Immune-Deficient Animals in Experimental Research, Chexbres, October-November 1982; Sessions I-VI. Basel: Karger; 1984. p 239-245.
- [6] Fu XY, Besterman JM, Monosov A, et al. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(20): 9345-9349.
- [7] Byrne AT, Alferez DG, Amant F, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(4): 254 - 268.
- [8] Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(5): 462 - 477.
- [9] Wang J, Ren L, Yan L, et al. Establishment of animal model of transplanted human colorectal cancer [J]. *Cancer Res Clinic*, 2017, 29 (4): 223-226.
- [10] Hite N, Klinger A, Hellmers L, et al. An optimal orthotopic mouse model for human colorectal cancer primary tumor growth and spontaneous metastasis [J]. *Dis Colon Rectum*, 2018, 61 (6): 698-705.
- [11] Blomme A, Van Simaey G, Doumont G, et al. Murine stroma adopts a human-like metabolic phenotype in the PDX model of colorectal cancer and liver metastases [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (9): 1237-1250.
- [12] Brown KM, Xue A, Julovi SM, et al. Using patient-derived xenograft models of colorectal liver metastases to predict chemosensitivity [J]. *J Surg Res*, 2018, 227: 158-167.
- [13] Lu M, Zessin AS, Glover W, et al. Activation of the mTOR pathway by oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer liver metastasis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169439.
- [14] Fleten KG, Bakke KM, Maelandsmo GM, et al. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2017, 34(1): 51-62.
- [15] Kawaguchi K, Murakami T, Suetsugu A, et al. High-efficacy targeting of colon-cancer liver metastasis with Salmonella typhimurium A1-R via intra-portal-vein injection in orthotopic nude-mouse models [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (12): 19065 -19073.
- [16] Kim J, Do EJ, Moinova H, et al. Molecular imaging of colorectal tumors by targeting colon cancer secreted protein-2 (CCSP-2) [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(10): 805-816.
- [17] Oshima G, Stack ME, Wightman SC, et al. Advanced animal model of colorectal metastasis in liver; imaging techniques and properties of metastatic clones [J]. *J Vis Exp*, 2016, (117): e54657.
- [18] Bai JS, Wang J, Zhao XF. Nude mice hemispleen method in hepatic metastases of colon cancer model [J]. *J Dalian Med Univ*, 2015, 37(5): 447-450.
- [19] Thalheimer A, Korb D, Bönicke L, et al. Noninvasive visualization of tumor growth in a human colorectal liver metastases xenograft model using bioluminescence in vivo imaging [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 143-151.
- [20] Roque-Lima B, Roque CCTA, Begnami MD, et al. Development of patient-derived orthotopic xenografts from metastatic colorectal cancer in nude mice [J]. *J Drug Target*, 2018, 5: 1-7.
- [21] Miyoshi J, Toden S, Yoshida K, et al. MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43393.

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”。