

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

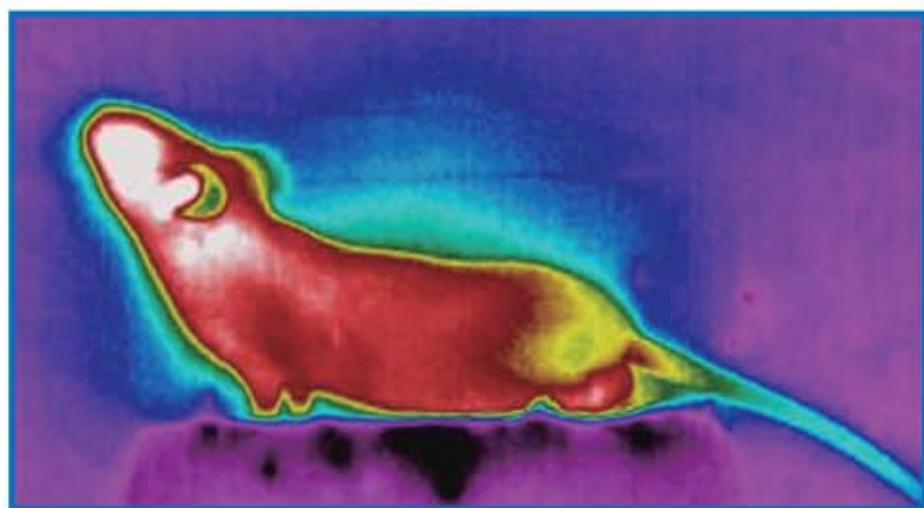


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第27卷 第6期 / Vol.27 No.6



钱宏梁：红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系

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

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

ISSN 1005-4847



2019

6

目次

研究报告

紫苏籽提取物在 ApoE ^{-/-} 小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用	
..... 郑双, 谭伟江, 李想, 马俊峰, 任学聪, 郑凌云, 王丽京, 杨丰华, 黄韧 (683)	
慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型	张晶, 许凯, 梁洁, 陈强, 马群英, 梁丽娜 (692)
湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究	彭晓婷, 马琪, 张晓松, 华永丽, 纪鹏, 姚万玲, 魏彦明 (700)
p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用	
..... 郭军雄, 汪斌, 马丽, 康万荣, 许小敏, 徐生刚 (709)	
冠心病来源肠道菌群小鼠模型的建立及评价	朱华, 李卓, 苏磊, 郭亚茜, 杜晓鹏, 袁建松, 秦川 (716)
三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究	
..... 苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 闫菲, 王晓梅, 韩福国, 刘清飞, 史云 (725)	
红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系	钱宏梁, 潘志强, 方肇勤 (733)
PM _{2.5} 短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制	张丰泉, 董恩恒, 薛玉雪 (740)
大鼠高尿酸血症模型的建立与研究	李媛媛, 周海燕, 吴绿英, 莫贤炜, 李晶 (747)
静脉注射针与自制 PE-50 管针头用于大鼠阴茎海绵体内压测定的比较	
..... 叶妙勇, 赵凡, 马轲, 张利棕, 方明笋, 寿旗扬, 马寅锋, 黄文杰, 吕伯东 (753)	
青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 TRH mRNA 的原位杂交	梁志康, 冯静雯, 谢保胜 (760)
子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏形态学特征的比较	袁江玲, 徐晓辉, 史深, 张燕, 徐艺玫 (765)
巨噬细胞条件性 Atg5 基因敲除小鼠的构建及鉴定	
..... 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 杨陈, 汤济鑫, 安宁, 刘建兴, 刘华锋 (770)	
改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型	黄文亭, 曾子纯, 王冬菊, 肖小敏 (776)
天麻芍药止眩片对自发性与肾性高血压模型大鼠影响的比较研究	
..... 刘林, 李弘, 王宇红, 任卫琼, 蔺晓源, 李苏, 柏正平 (781)	

CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式的比较 周凌, 宣伟军, 丁大连 (790)

研究进展

激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价 蒋玮, 曹林忠, 邬明峻, 张琪 (799)

血管性痴呆大鼠模型的研究进展 刘伟, 胡鹏, 冯波 (805)

脂肪间充质干细胞在动物模型中的应用进展 杜珍珍, 徐郑美, 司琳清, 曹立明, 刘庆, 鲁文康 (810)

不同染毒方式构建镍损伤动物模型的研究进展 杨晶晶, 陈慧 (815)

人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展 朱丽茹, 赵德善 (821)

《中国实验动物学报》2019 年总目次 (826)

广告 (彩插 1-5)

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

CONTENTS

Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice ZHENG Shuang, TAN Weijiang, LI Xiang, MA Junfeng, REN Xuecong, ZHENG Lingyun, WANG Lijing, YANG Fenghua, HUANG Ren (683)

A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone ZHANG Jing, XU Kai, LIANG Jie, CHEN Qiang, MA Qunying, LIANG Lina (692)

Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea PENG Xiaoting, MA Qi, ZHANG Xiaosong, HUA Yongli, JI Peng, YAO Wanling, WEI Yanming (700)

Immunoregulatory effects of the p38 MAPK-signaling pathway in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome GUO Junxiong, WANG Bin, MA Li, KANG Wanrong, XU Xiaomin, XU Shenggang (709)

Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease ZHU Hua, LI Zhuo, SU Lei, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, YUAN Jiansong, QIN Chuan (716)

Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency SU Xianzhi, LIU Yifei, KONG Wenjuan, YAN Fei, WANG Xiaomei, HAN Fuguo, LIU Qingfei, SHI Yun (725)

Application of infrared thermography in the evaluation of mouse Yangxu Syndrome and its evaluation criteria QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang, FANG Zhaoqin (733)

Effect and mechanism of short-term exposure to PM_{2.5} on the rat uterine injury ZHANG Fengquan, DONG Enheng, XUE Yuxue (740)

Establishment and study of a hyperuricemia rat model LI Yuanyuan, ZHOU Haiyan, WU Lyuying, MO Xianwei, LI Jing (747)

Comparison of the use of intravenous infusion needle and self-made PE-50 tube needle in the measurement of intracavernosal pressure in rat penis YE Miaoyong, ZHAO Fan, MA Ke, ZHANG Lizong, FANG Mingsun, SHOU Qiyang, MA Yinfeng, HUANG Wenjie, LYU Bodong (753)

In situ hybridization of TRH mRNA at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii* LIANG Zhikang, FENG Jing wen, XIE Baosheng (760)

Morphological comparison of kidneys between *Meriones meridianus* and SD rats YUAN Jiangling, XU Xiaohui, SHI Shen, ZHANG Yan, XU Yimei (765)

Construction and identification of macrophage-conditional Atg5-knockout mice HUANG Xiaorong, HUANG Yanheng, YE Lin, YANG Chen, TANG Jixin, AN Ning, LIU Jianxing, LIU Huafeng(770)

Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure HUANG Wenting, ZENG Zichun, WANG Dongju, XIAO Xiaomin(776)

Comparison of the effects of Tianma Xiongling Zhixuan Tablet on the blood pressure in spontaneously and renal hypertensive rats LIU lin, LI Hong, WANG Yuhong, REN Weiqiong, LIN Xiaoyuan, LI Su, BAI Zhengping(781)

Effect of Zhengqingfengtongning on the expression of aggrecanase-1 (ADAMTs-4) and aggrecanase-2 (ADAMTs-5) in the cartilage tissue of knee joint in rabbit models of osteoarthritis ZHOU Ling, XUAN Weijun, DING Dalian(790)

Establishment and evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head JIANG Wei, CAO Linzhong, WU Mingjun, ZHANG Qi(799)

Research progress of rat models of vascular dementia LIU Wei, HU Peng, FENG Bo(805)

Progress in the application of adipose-derived mesenchymal stem cells in animal models DU Zhenzhen, XU Zhengmei, SI Linqing, CAO Liming, LIU Qing, LU Wengeng(810)

Research progress on animal models of nickel-induced damages constructed using different poisoning methods YANG Jingjing, CHEN Hui(815)

Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid-cancer cell lines ZHU Liru, ZHAO Deshan(821)

Responsible Institution China Association for Science and Technology	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://zgsydw.cnjournals.com/sydwbybjyx/ch/index.aspx
Sponsor Chinese Association for Laboratory Animal Sciences Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences	CSSN ISSN 1005-4847 CN 11-2986/Q
Editor-in-Chief QIN Chuan(秦川)	Copyright 2019 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Managing Editor LI Jiping(李继平)	
Editing Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica	
Publishing Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica	

郑双,谭伟江,李想,等. 紫苏籽提取物在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 683–691.

Zheng S, Tan WJ, Li X, et al. Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 683–691.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.001

紫苏籽提取物在 ApoE^{-/-}小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用

郑双^{1,2}, 谭伟江², 李想², 马俊峰², 任学聪², 郑凌云¹, 王丽京¹, 杨丰华^{2*}, 黄韧^{1,2*}

(1. 广东药科大学, 生命科学与生物制药学院, 血管生物学研究所, 广州 510006;

2. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510633)

【摘要】 目的 应用 ApoE^{-/-}小鼠研究紫苏籽油性提取物(PSO)减少斑块形成和心脏保护的作用及分子机制。**方法** 3月龄 ApoE^{-/-}小鼠随机分为 ApoE^{-/-}组(无药物处理)、PSO 低剂量组、PSO 高剂量组和阿托伐他汀组, B6 小鼠为对照(WT 组), 给予常规饮食。连续治疗 8 周后, 进行生化检测、HE 染色病理学检测、超声检测、qPCR 检测、ATP 检测、Pro-Q Diamond 染色。**结果** 与 WT 组相比, ApoE^{-/-}小鼠出现心脏结构与功能异常。PSO 治疗后, 斑块面积减少, 心脏结构和功能改善; ANP、BNP、 β -MHC 的 mRNA 表达下调, PPAR α 和 PGC-1 α 的 mRNA 表达上调, 胞内 ATP 含量增加, TnI 的磷酸化水平增加。**结论** PSO 抑制 ApoE^{-/-}小鼠动脉斑块形成、维持正常心脏结构和功能, 其可能通过调节 PPAR α /PCG-1 α /NRF-1 轴增加 ATP 和肌丝蛋白磷酸化、改善能量代谢、发挥心脏保护的作用。

【关键词】 紫苏籽油性提取物; ApoE^{-/-}小鼠; 动脉粥样硬化; 心脏保护

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0683-09

Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE^{-/-} mice

ZHENG Shuang^{1,2}, TAN Weijiang², LI Xiang², MA Junfeng², REN Xuecong², ZHENG Lingyun¹, WANG Lijing¹, YANG Fenghua^{2*}, HUANG Ren^{1,2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University, School of Life Sciences and Biopharmaceuticals, the Vascular Biology Institute, Guangzhou 510006, China. 2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangzhou 510633)

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com; YANG Fenghua. E-mail: fenghua.yang@gdlami.com

【Abstract】 Objective To study the role and molecular mechanism of perilla seed oil extract (PSO) in reducing arterial plaque formation and providing cardioprotection in ApoE^{-/-} mice. **Methods** Three-month-old ApoE^{-/-} mice were randomly divided into ApoE^{-/-} (no drug treatment), low-dose PSO, high-dose PSO and atorvastatin groups. B6 mice of the

【基金项目】 国家自然科学基金-面上项目(31672376); 广东省科技专项(2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2017A020215076); 广州市科技计划项目(201804010206); 广东省实验动物重点实验室(2017B030314171)。

Funded by National Natural Science Foundation of China - Surface Projects (31672376), Guangdong Provincial Science and Technology Project (2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2017A020215076), Guangzhou Science and Technology Project (201804010206), Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals (2017B030314171).

【作者简介】 郑双(1995—), 女, 研究方向: 转基因动物疾病模型与新药筛选研究。Email: 1976308532@qq.com

【通信作者】 黄韧(1959—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。Email: labking@sohu.com;

杨丰华(1970—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdlami.com。

* 共同通信作者

same age were used as controls (WT group); they were fed a regular diet. After 8 weeks of treatment, biochemical tests, H&E staining, echocardiography, qPCR, ATP detection and Pro-Q Diamond staining were performed. **Results** Compared with the WT group, ApoE^{-/-} mice showed abnormal cardiac structure and function. After PSO treatment, the plaque area was reduced, and cardiac structure and function improved. mRNA expression of ANP, BNP and β -MHC was down-regulated, mRNA expression of PPAR α and PGC-1 α was up-regulated, and the intracellular content of ATP and the phosphorylation level of TnI were increased. **Conclusions** PSO inhibits arterial plaque formation and maintains normal cardiac structure and function in ApoE^{-/-} mice. It may regulate the PPAR α /PCG-1 α /NRF-1 axis to increase ATP and myofilament phosphorylation, improve energy metabolism, and exert cardioprotective action.

【Keywords】 perilla seed extract; ApoE^{-/-} mice; atherosclerosis; cardioprotection

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

高胆固醇血症是心血管疾病的主要原因,与全球死亡率增加密切相关。研究表明,高胆固醇血症可诱发左心室质量增加和心脏病理性重构^[1-3],其为不可逆转的疾病,最终转归为心脏收缩功能损伤和心衰^[4]。有研究表明其与能量生成障碍^[5]和肌丝收缩调控相关^[6]。

紫苏籽油性提取物(PSO)含有丰富的 α -亚麻酸(ALA)^[7]。ALA为n-3多不饱和脂肪酸的一种,流行病学研究显示从饮食中摄入的ALA具有显著的心脏保护作用^[8-9]。目前少有研究探索PSO对高胆固醇血症患者心脏功能的影响,探究PSO对心脏的保护和作用机制具有重要意义。

载脂蛋白E敲除(ApoE^{-/-})小鼠具有高胆固醇水平,可发展类似于人类的动脉粥样硬化病变^[10],另外有报道ApoE^{-/-}小鼠心脏出现肥大性重构^[11-12]、纤维化^[13]和功能障碍^[14],是一个适宜用于药物治疗研究的模型。本研究旨在利用ApoE^{-/-}小鼠探索PSO在抗动脉粥样硬化和保护心脏功能的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40只3月龄ApoE^{-/-}雄性小鼠(B6背景),体重20~25g,广东药科大学合作实验室馈赠;10只3月龄B6雄性小鼠体重20~25g,购于广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】,所有小鼠均饲养于广东省实验动物监测所SPF环境中【SYXK(粤)2016-0122】,温度:22℃~25℃,湿度:50%~70%,昼夜明暗交替时间为12h/12h。所有操作符合广东省实验动物监测所动物保护和使用委员会(IACUC)的要求。

1.1.2 试剂与仪器

阿托伐他汀(浙江新东港药业,中国),羧甲基纤维素钠(阿拉丁,美国),甲醇(阿拉丁,美国),ATP试剂盒(南京建成,中国),Takara试剂盒(Takara,日本),引物(生工,中国),Triton X-100(Sigma,美国),Pro-Q Diamond磷酸化蛋白凝胶染色试剂(赛默飞,美国),气相色谱(安捷伦GC-7820A,美国),全自动生化分析仪(日立7080型,日本),Vevo2100高分辨率超声系统(Visual Sonics,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

PSO成人剂量为每人4.5g/d,小鼠剂量按体表面积折算,约为1000mg/(kg·d),经预实验确定使用剂量。将ApoE^{-/-}小鼠随机分为4组,分别为ApoE^{-/-}:0.5%羧甲基纤维素钠;ApoE^{-/-}+0.5g/kg PSO;0.5g/(kg·d) PSO;ApoE^{-/-}+1.0g/kg PSO;1.0g/(kg·d) PSO;ApoE^{-/-}+Ato;2.1mg/(kg·d)阿托伐他汀(Ato),PSO口服给药8周。B6小鼠作为对照(WT组),接受正常饮食,给予与ApoE^{-/-}相同剂量的溶媒。

1.2.2 PSO的制备和组成

使用二氧化碳超临界流体萃取(SFE-CO₂)获得PSO^[15]。萃取压力、温度和CO₂流速分别为20MPa、40℃和30L/h。使用气相色谱分析PSO的脂肪酸组成^[16]。PSO用甲醇酯化后提取脂肪酸甲酯,使用气相色谱-火焰离子化检测器(GC-FID)进行分析,确定PSO的碘值、皂化值、非皂化物质的量和酸值。

1.2.3 血清生化指标测定

治疗8周后动物禁食12h,眼眶静脉采血,经3500r/min、离心20min取上清液,采用全自动生化分析仪及匹配试剂盒测量血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)和高密度脂

蛋白 (HDL-C)。

1. 2. 4 超声心动图和脉冲波多普勒测量

治疗 8 周后使用 Vevo2100 高分辨率超声系统和 MS-550D 探头以左室短轴切面探测,采集 B 型和 M 型超声图;取心脏长轴切面,采用脉冲波多普勒测定经主动脉血流压力。测量舒张末期左室后壁厚度 (LVPW;d)、收缩末期左室后壁厚度 (LVPW;s)、收缩末期室间隔厚度 (IVS;s)、舒张末期室间隔厚度 (LVS;d)、收缩末期左室内径 (LVID;s)、舒张末期左室内径 (LVID;d),计算射血分数 (EF) 和短轴缩短率 (FS)。

1. 2. 5 组织学分析

治疗结束后处死小鼠,取心脏和主动脉,用 4% 多聚甲醛固定,HE 染色后观察主动脉根部和心肌,使用 ImagJ 软件测量斑块面积,使用公式计算斑块

面积百分比:斑块面积% = 动脉粥样硬化病变面积/管壁面积。

1. 2. 6 ATP 含量测定

50 mg 心肌组织匀浆后经 3500 r/min、4℃ 离心 10 min,取上清液使用试剂盒测定 ATP 含量。

1. 2. 7 qPCR 分析

采用 Trizol 法提取心脏组织总 RNA,用逆转录酶 PrimeScript™ RT 合成 cDNA 后进行 PCR 扩增,检测心脏重塑标记基因 (心钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP)、β 肌球蛋白重链 (β-MHC))^[17-19] 和心肌能量代谢相关基因^[20] (过氧化物酶体增殖物激活受体 α/γ (PPARα/γ)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 (PGC-1α)、核呼吸因子 (NRF-1)) 的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。数据标准化后使用 2^{-ΔΔCt} 比较法进行分析。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 PCR primers

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primers (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primers (5'-3')
ANP	ACAGCCAAGGAGGAAAAGGC	CCACAGTGGCAATGTGACCA
BNP	GAGGTCACCTCCTATCCTCTGG	GCCATTTCTCCGACTTTTCTC
β-MHC	ACCGTCTTGCCATTCTCCG	GATGTTTTGTGCCCGATGA
NRF-1	TTACTGTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCGTCTCT
PGC-1α	ATGCACTGACAGATGCAGACGTGAC	GTTCCTATACCATAGTCATGCATTG
PPARα	ATGCCAGTACTGCCGTTTTC	GGCCTTGACCTTGTTTCATGT
PPARγ	TCCGAAGAACCATCCGATTGAA	CATACAAATGCTTTGCCAGGGC
β-action	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1. 2. 8 心肌丝磷酸化分析

心脏收缩是消耗 ATP 并由肌丝蛋白实施的一种活动,肌丝磷酸化水平可评估其活性状态。本实验使用匀浆器将心肌组织匀浆,经 12 000 r/min 离心后去除上清液。沉淀物重悬于含有 1% Triton X-100 的裂解液裂解后离心获得心肌丝,定量和变性后使用 12% 凝胶电泳分离肌球蛋白结合蛋白 C (MyBP-C)、肌钙蛋白 T (TnT)、肌钙蛋白 I (TnI)、肌球蛋白轻链 2 (MLC2),使用 Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白染色试剂检测肌丝蛋白的磷酸化水平,评估其活性状态,考马斯亮蓝染料检测上样量,用激光扫描仪器扫描。使用 Image J 软件分析条带强度。

1. 3 统计学分析

数据以平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA) 和 Dunnett's 检验比较组间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2. 1 PSO 的成分

PSO 的成分见图 1。ALA 是 PSO 中最丰富的脂肪酸,其次是油酸、亚油酸、棕榈酸和硬脂酸。PSO 的脂肪酸谱包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸 (表 2)。

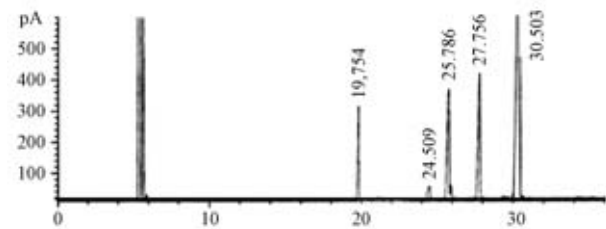


图 1 PSO 成分分析

Figure 1 The PSO component analysis

表 2 PSO 的理化特征

Table 2 The physicochemical characteristics of PSO		
种类 Items	值 Value	
碘吸附值 Iodine adsorption value (g/100 g substance)	193	
皂化值 Saponification value (mg KOH /g fat)	194	
非皂化物 Unsaponifiable matter%	1. 2	
酸值 Acid value (mg KOH/g)	3. 8	
脂肪 Lipids%	44. 7	
饱和脂肪酸 Saturated fatty acids		
棕榈酸 Palmitic acid (C16:0) %	6. 5 (19. 754 ^a)	
硬脂酸 Stearic acid (C18:0) %	2. 0 (24. 509 ^a)	
不饱和脂肪酸 Unsaturated fatty acids		
油酸 Oleic acid (C18:1) %	15. 4 (25. 786 ^a)	
亚油酸 Linoleic acid (C18:2) %	13. 5 (27. 758 ^a)	
α-亚麻酸 α-linolenic acid (C18:3) %	60. 1 (30. 503 ^a)	
n-6/n-3 的比例 n-6/n-3 ratio	0. 22	

2.2 PSO 对血脂水平的影响

治疗结束时,与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组血清 TC、HDL-C 和 LDL-C 水平显著升高,PSO 治疗后与 ApoE^{-/-} 组比较 LDL-C 和 HDL-C 水平有改善趋势,但未见显著差异。与 ApoE^{-/-} 组相比,Ato 组显示小鼠血清脂质水平均显著降低(表 3)。

2.3 PSO 对主动脉压的影响

主动脉血管弹性纤维 HE 染色显示 WT 组中弹性内膜的平滑肌细胞排列整齐,结构完整,而 ApoE^{-/-} 组管壁有斑块沉积,泡沫细胞浸润。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组和 Ato 组主动脉斑块显著减少,血管结构相对完整(图 2A,B)。脉冲多普勒结果显示,ApoE^{-/-} 组主动脉压显著高于 WT 组,PSO 和 Ato 治疗后,升高的主动脉压恢复到 WT 组的水平(图 2C)。

2.4 心肌组织的病理学观察

HE 染色显示 WT 组心肌结构正常,ApoE^{-/-} 组心肌纤维的解体、碎裂或丢失。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 和 Ato 治疗后心肌结构显著改善,心肌纤维整齐排列并且没有显著碎裂(图 3)。

2.5 PSO 对心脏结构与功能的影响

与 WT 组小鼠相比,ApoE^{-/-} 组小鼠 IVS; s 和 LVPW; s 显著降低,LVID; s 和 LVID; d 显著增加,表明心脏结构异常(图 4A-E),EF(57.93 ± 2.62% vs 71.27 ± 2.66%,*P* < 0.001)和 FS(30.05 ± 1.65% vs 41.53 ± 2.14%,*P* < 0.001)显著降低(图 4A,F-G),表明心脏功能障碍。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组的 IVS; s 和 LVPW; s 均显著增高,LVID; s 和 LVID; d 均显著减小(图 4A,B-E),EF(0.5 g/kg PSO:68.08 ± 1.63% vs 57.93 ± 2.62%,*P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO: 71.27 ± 2.56% vs 57.93 ± 2.62%,*P* < 0.001)和 FS(0.5 g/kg PSO,37.09 ± 1.23% vs 30.05 ± 1.65%,*P* < 0.001; 1.0 g/kg PSO,39.84 ± 2.02% vs 30.05 ± 1.65%,*P* < 0.001)均显著增加,并恢复到与 WT 组接近水平(图 4A,F,G)。另外,Ato 组与 PSO 组的各项指标一致,表示 PSO 治疗显著保护了心脏结构和功能,具有效果。

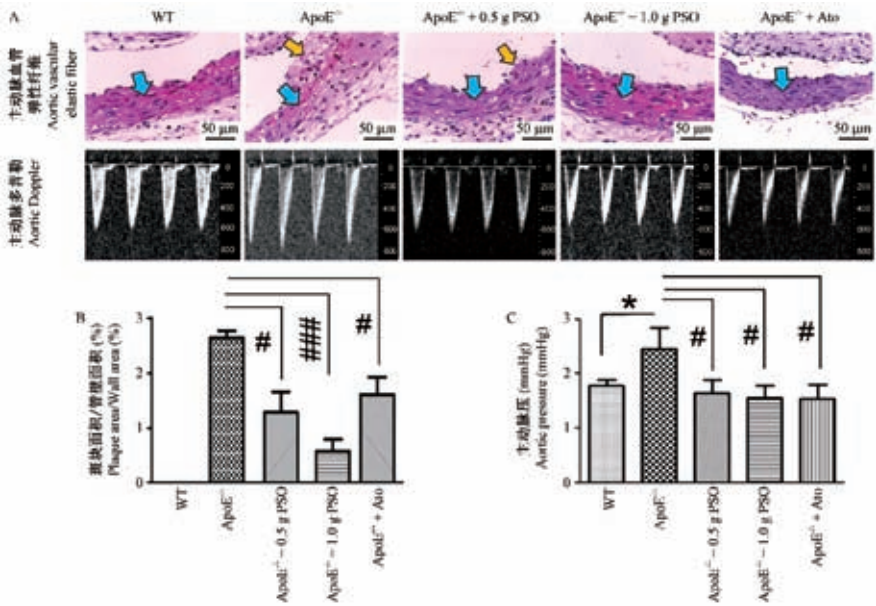
2.6 PSO 对细胞内 ATP 含量和基因表达的影响

与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组的 ATP 含量显著降低,与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组的 ATP 水平得到恢复,Ato 组的 ATP 含量无显著差异(图 5A)。与 WT 组相比,ApoE^{-/-} 组小鼠 ANP,BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达水平增加。与 ApoE^{-/-} 组相比,PSO 组 BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达显著降低,并且接近 WT,但 ANP 无显著改变,Ato 组中 ANP,BNP 和 β-MHC 的 mRNA 表达水平也显著降低(图 5B-D)。以上结果表明 PSO 减少 ApoE^{-/-} 心脏重塑。与 WT

表 3 血清脂质水平($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Serum lipid levels ($\bar{x} \pm s, n = 10$)				
组别 Groups	总胆固醇 TC (mmol/L)	甘油三酯 TG (mmol/L)	高密度脂蛋白 HDL-C (mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL-C (mmol/L)
WT	4.02 ± 0.15	1.78 ± 0.12	2.65 ± 0.10	0.57 ± 0.02
ApoE ^{-/-}	16.62 ± 1.21 ^{**}	1.71 ± 0.17	6.36 ± 0.82 ^{**}	4.03 ± 0.43 ^{**}
ApoE ^{-/-} + 0.5 g/kg PSO	15.80 ± 1.03	1.48 ± 0.18	7.36 ± 0.49	2.72 ± 0.56
ApoE ^{-/-} + 1.0 g/kg PSO	16.45 ± 0.72	2.27 ± 0.38	7.56 ± 0.39	3.18 ± 0.59
ApoE ^{-/-} + Ato	13.59 ± 0.85 [#]	1.24 ± 0.14 [#]	4.49 ± 0.82 [#]	3.22 ± 0.21 [#]

注: ***P* < 0.01, vs WT group; [#]*P* < 0.05, vs ApoE^{-/-}。
Note. ***P* < 0.01, vs WT group; [#]*P* < 0.05, vs ApoE^{-/-}.



注:A:主动脉血管弹性纤维与主动脉血流多普勒;B:斑块面积与管壁面积的比值;C:主动脉压。蓝色箭头表示弹性纤维,黄色箭头表示斑块。^{*}*P* < 0.05 vs WT 组;[#] *P* < 0.05, ^{###} *P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} 组。

图 2 小鼠主动脉压的检测

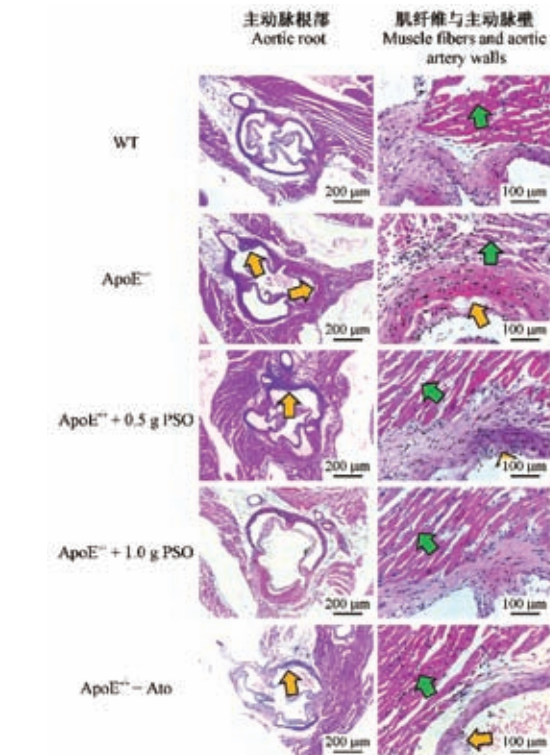
Note. A, Aortic vascular elastic fiber and aortic Doppler images. B, Ratio of plaque area to wall area. C, Aortic pressure. The blue arrow indicates elastic fiber and the yellow arrow indicates plaque. ^{*}*P* < 0.05 vs WT group; [#] *P* < 0.05, ^{###} *P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} group.

Figure 2 Detection of the mouse aortic pressure

组相比, ApoE^{-/-} 组 PPAR α , PPAR γ 和 NRF-1 的 mRNA 表达降低, PCG-1 α 的 mRNA 表达升高(图 5E-H)。与 ApoE^{-/-} 组相比, PSO 组 PPAR α 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 1.65 $\pm$ 0.35 vs 0.62 $\pm$ 0.11, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 1.87 $\pm$ 0.34 vs 0.62 $\pm$ 0.11, *P* < 0.01), NRF-1 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 0.59 $\pm$ 0.03 vs 0.28 $\pm$ 0.08, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 0.66 $\pm$ 0.12 vs 0.28 $\pm$ 0.08, *P* < 0.05), PGC-1 α 的 mRNA(0.5 g/kg PSO, 4.58 $\pm$ 0.36 vs 0.97 $\pm$ 0.11, *P* < 0.01; 1.0 g/kg PSO, 5.89 $\pm$ 0.6 vs 0.97 $\pm$ 0.11, *P* < 0.01) 表达显著增加(图 5F-H)。PPAR γ 的 mRNA 表达没有显著差异(图 5E)。与 ApoE^{-/-} 组相比, Ato 组 PPAR α , NRF-1 的 mRNA 表达均得到恢复(图 5F-G), 但 PGC-1 α 的 mRNA 水平降低(图 5H)。以上结果表明 PSO 有助恢复 ApoE^{-/-} 心脏的能量供给。

2.7 PSO 对肌丝蛋白磷酸化的影响

Pro-Q Diamond 染色结果见图 6A。统计显示 ApoE^{-/-} 组中 MyBP-C、TnT、TnI 和 MLC2 的磷酸化水平显著低于 WT 组(图 6A-E); 与 ApoE^{-/-} 组相比 PSO 治疗后 MyBP-C、TnT、TnI 和 MLC2 得到一定程度的恢复(图 6A-E), 其中 1.0 g/kg PSO 组和 Ato 组 TnI 的磷酸化水平恢复显著, 接近 WT 组水平(图 6D), 表明心肌丝活性状态得到改善。

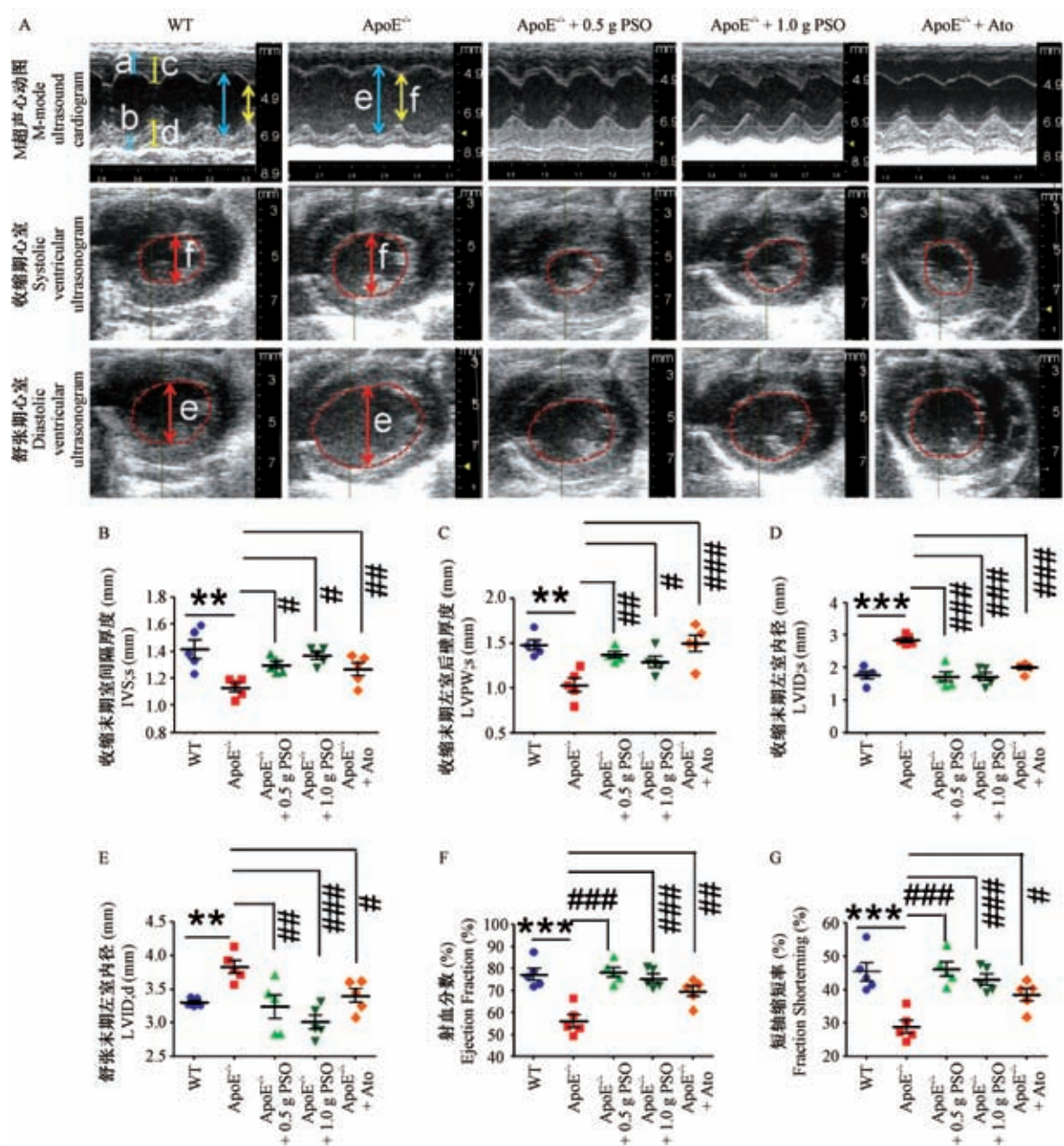


注:光学显微镜下的小鼠主动脉根部, 以及肌纤维和主动脉壁。绿色箭头表示心肌纤维, 黄色箭头表示斑块。

图 3 心肌组织 HE 染色

Note. Mouse aortic root, and aortic wall and cardiac muscle fiber. The green arrows indicate myocardial fibers and the yellow arrows indicate plaques.

Figure 3 Histological changes of the mouse myocardial tissues (HE staining)

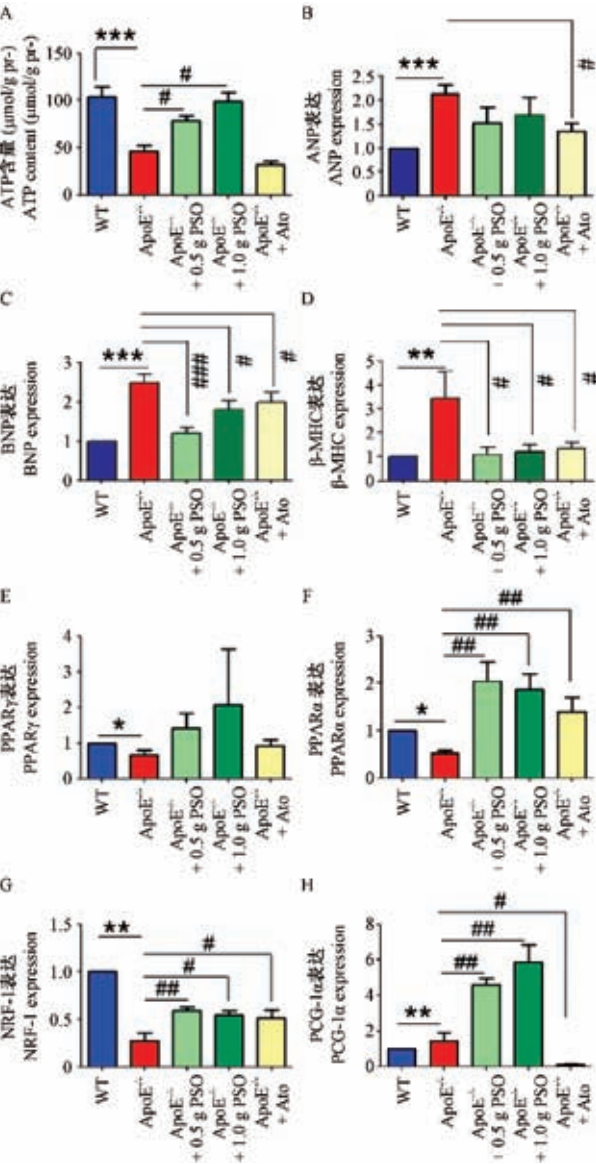


注:A:超声显示小鼠心脏的M型和B型图;B:收缩末期室间隔厚度;C:收缩末期左室后壁厚度;D:收缩末期左室内径;E:舒张末期左室内径;F:射血分数;G:短轴缩短率。a:舒张末期室间隔厚度;b:舒张末期左室后壁厚度;c:收缩末期室间隔厚度;d:收缩末期左室后壁厚度;e:舒张末期左室内径;f:收缩末期左室内径。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs WT 组; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs ApoE^{-/-}组。

图4 小鼠心功能检测

Note. A, Typical B-mode and M-mode ultrasound images of the mouse heart. B, Internal ventricular septum thickness at end-systole. C, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. D, Left ventricular internal dimension at systole. E, Left ventricular internal dimension at diastole. F, Ejection fraction. G, Short axis shortening rate. a, Internal ventricular septum thickness at diastole. b, Left ventricular posterior wall thickness at diastole. c, Internal ventricular septum thickness at end-systole. d, Left ventricular posterior wall thickness at end-systole. e, Left ventricular internal dimension at diastole. F, Left ventricular internal dimension at systole. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs WT group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs ApoE^{-/-} group.

Figure 4 Measurements of cardiac function of the mice



注: A:ATP 含量;B:ANP 的表达;C:BNP 的表达;D:β-MHC 的表达;E:PPARγ 的表达;F:PPARα 的表达;G:NRF-1 的表达;H:PCG-1α 的表达。**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs WT 组;#*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} 组。

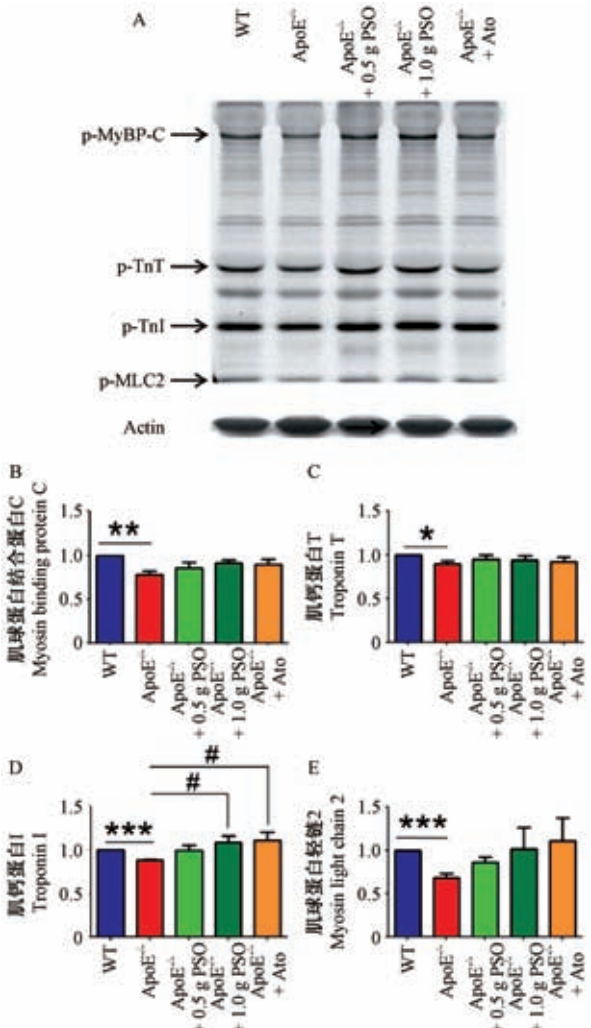
图 5 ATP 含量和基因表达水平

Note. A, Content of ATP. B, Expression of ANP. C, Expression of BNP. D, Expression of β-MHC. E, Expression of PPARγ. F, Expression of PPARα. G, Expression of NRF-1. H, Expression of PCG-1α. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs WT group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs ApoE^{-/-} group.

Figure 5 The content of ATP and gene expression levels

3 讨论

本实验中, ApoE^{-/-} 小鼠可检测到心脏扩张、心功能障碍和心肌结构损伤, 与其他报道结果一致, 例如肥大性心脏重构^[21-23] 和内皮功能障碍^[21]。但



A:Pro-Q Diamond 染色;B:肌球蛋白结合蛋白 C 磷酸化水平;C:肌钙蛋白 T 磷酸化水平;D:肌钙蛋白 I 磷酸化水平;E:肌球蛋白轻链 2 磷酸化表达水平。**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs WT 组;#*P* < 0.05 vs ApoE^{-/-} 组。

图 6 肌丝蛋白磷酸化水平

Note. A, Pro-Q Diamond staining. B, Phosphorylation levels of MyBP-C. C, Phosphorylation levels of TnT. D, Phosphorylation levels of TnI. E, Phosphorylation levels of MLC₂. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs WT group; #*P* < 0.05 vs ApoE^{-/-} group.

Figure 6 Phosphorylation level of myofilaments

是我们的小鼠出现的时间较早, 约为 5 个月, 其它文献报道出现症状的时间有长于或短于此时间的, 如正常饮食的 ApoE^{-/-} 小鼠 7.5 个月出现显著的心脏重构和内皮功能障碍^[21], 13 个月大的 ApoE^{-/-} 小鼠出现明显的肥大性心脏重构^[22], 较短时间的则显示正常饮食 4 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠已出现左室肥大性重构^[23]。ApoE^{-/-} 病理表型出现时间不一致可能与饲养管理情况和实验时间点有关。另外, 研究表明动脉粥样硬化病变与巨噬细胞能量代谢异常^[22]、线

粒体功能损伤引起的能量代谢障碍^[23]密切相关,本研究中 PSO 没有显著降低血脂但却减少动脉粥样硬化斑块,可能与能量代谢的机制相关,本研究中的基因表达检测结果也支持这个观点,具体机制有待于进一步研究。

哺乳动物需要大量的 ATP 来维持正常的心脏收缩功能,能量代谢异常与心功能失常密切相关。PGC-1 α 是线粒体合成的“主控制器”,与 PPARs 和 NRF-1 共激活起作用^[24]。研究表明多不饱和脂肪酸能激活 PPARs 与 PGC-1 α 调节心脏代谢^[25-26],而 PPAR α 的激活可改善心肌能量代谢、延缓心力衰竭^[27]。我们的结果显示,PSO 治疗改善了 ApoE^{-/-}小鼠心功能,提高了 PPAR α ,PCG-1 α 和 NRF-1 的 mRNA 表达水平,表明这些基因表达在 PSO 治疗机制中起到关键作用。PSO 治疗后 PPAR γ 的 mRNA 表达水平没有显著差异,这可能是由于 PPAR γ 的激活主要受 n-6 脂肪酸调控^[28],并且其激活未参与左心室重构^[29]。同时,心肌丝磷酸化结果提示 PSO 可通过调节心肌丝活性状态改善心脏功能收缩,但其如何与能量代谢相互协调保护心脏的机制仍有待探索阐明。

ApoE^{-/-}小鼠发生心脏结构和功能异常,PSO 可抑制其动脉斑块形成、维持正常心脏结构和功能。PSO 可能通过调节 PPAR α /PCG-1 α /NRF-1 轴增加 ATP 和肌丝蛋白磷酸化、改善能量代谢、发挥心脏保护作用。

参 考 文 献(References)

- [1] Opadijo OG, Omotoso AB, Akande AA. Relation of electrocardiographic left ventricular hypertrophy to blood pressure, body mass index, serum lipids and blood sugar levels in adult Nigerians [J]. Afr J Med Med Sci, 2003, 32(4): 395-399.
- [2] 武文峰, 温文慧, 吴月, 等. 家族性高胆固醇血症患者心血管系统病变临床特点的分析 [J]. 心肺血管病杂志, 2018, 37(7): 635-638.
Wu WF, Wen WH, Wu Y, et al. The clinical characteristics of cardiovascular involvement in patients with familial hypercholesterolemia [J]. J Cardiovasc Pulmon Dis, 2018, 37(7): 635-638.
- [3] Celentano A, Crivaro M, Roman MJ, et al. Left ventricular geometry and arterial function in hypercholesterolemia [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2001, 11(5): 312-319.
- [4] Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Rev Cardiol, 2018; 15(7): 387-407.
- [5] Ingwall JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 412-419.
- [6] Sequeira V, Bertero E, Maack C. Energetic drain driving hypertrophic cardiomyopathy [J]. FEBS Lett, 2019, 593(13): 1616-1626.
- [7] 解现星, 张涛, 赵爽, 等. 苏子油对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌胰岛素敏感性相关基因表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 1-5.
Xie XX, Zhang T, Zhao S, et al. Effects of perilla oil on the insulin sensitivity-related gene expression in skeletal muscle in insulin resistant rats [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 1-5.
- [8] Rodriguez-Leyva D, Bassett CM, McCullough R, et al. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid [J]. Can J Cardiol, 2010, 26(9): 489-96.
- [9] Han H, Yan P, Chen L, et al. Flaxseed oil containing α -linolenic acid ester of plant sterol improved atherosclerosis in ApoE deficient mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 1-17.
- [10] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.
- [11] Wu JH, Hagaman J, Kim S, et al. Aortic constriction exacerbates atherosclerosis and induces cardiac dysfunction in mice lacking apolipoprotein E [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(3): 469-475.
- [12] Mishra S, Bedja D, Amuzie C, et al. Prevention of cardiac hypertrophy by the use of a glycosphingolipid synthesis inhibitor in ApoE^{-/-} mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 465(1): 159-164.
- [13] Qin YW, Ye P, He JQ, et al. Simvastatin inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a “Western-style diet” by increasing PPAR α and γ expression and reducing TC, MMP-9, and Cat S levels [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(10): 1350-1358.
- [14] Vincelette J, Martin-McNulty B, Vergona R, et al. Reduced cardiac functional reserve in apolipoprotein E knockout mice [J]. Transl Res, 2006, 148(1): 30-36.
- [15] 马尧, 庄云, 张瑶. 超临界 CO₂ 萃取紫苏油的工艺优化研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(33): 14577-14592.
Yao MA, Zhuang Y, Zhang Y. Study on optimization of technology for extracting perilla oil by supercritical CO₂ extraction [J]. J Anhui Agr Sci, 2008, 36(33): 14577-14592.
- [16] Jung MY, Choi NJ, Chan HO, et al. Selectively hydrogenated soybean oil exerts strong anti-prostate cancer activities [J]. Lipids, 2011, 46(3): 287-295.
- [17] 王晓建, 王继征, 王长鑫, 等. 跑步训练诱导小鼠生理性心

- 脏肥厚模型 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 301-305.
- Wang XJ, Wang JZ, Wang CX, et al. A mouse model of physiological cardiac hypertrophy induced by exercise-training on treadmill [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(4): 301-305.
- [18] 严雪瑜, 蒋钦杨, 吴延军, 等. 广西巴马小型猪 2 型糖尿病模型骨骼肌糖代谢及能量代谢相关基因的表达差异 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 470-474.
- Yan XY, Jang QY, Wu YJ, et al. Expression of skeletal muscle glucose and energy metabolism-related genes in Guangxi Bama minipigs with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(05): 470-474.
- [19] Yang R, Powellbraxton L, Ogaoawara AK, et al. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(11): 2762.
- [20] Wang YX. Cardiovascular functional phenotypes and pharmacological responses in apolipoprotein E deficient mice [J]. Neurobiol Aging, 2005, 26(3): 309-316.
- [21] Ulasova E, Perez J, Hill BG, et al. Quercetin prevents left ventricular hypertrophy in the ApoE knockout mouse [J]. Redox Biol, 2013, 1(1): 381-386.
- [22] Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism [J]. Cell Immunol, 2018, 330: 27-42.
- [23] Dong Y, Fernandes C, Liu Y, et al. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis [J]. Diab Vasc Dis Res, 2017, 14(1): 14-23.
- [24] Mohagheghi F, Ahmadiani A, Rahmani B, et al. Gemfibrozil pretreatment resulted in a sexually dimorphic outcome in the rat models of global cerebral ischemia-reperfusion via modulation of mitochondrial pro-survival and apoptotic cell death factors as well as MAPKs [J]. J Mol Neurosci, 2013, 50(3): 379-393.
- [25] Wang YX. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases [J]. Cell Res, 2010, 20(2): 124-137.
- [26] Duncan JG, Finck BN. PPAR/PGC-1 regulation of metabolism in cardiac disease [M]. Humana Press, 2012.
- [27] Yang Y, Zhang H, Li X, et al. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2435-2442.
- [28] Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma [J]. Cell, 1995, 83(5): 803-812.
- [29] Weiss CS, Hagenmüller M, Pichler M, et al. Activation of PPARgamma by pioglitazone does not attenuate left ventricular hypertrophy following aortic banding in rats [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2010, 381(4): 285-295.

[收稿日期] 2019-06-19

张晶,许凯,梁洁,等. 慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 692-699.
Zhang J, Xu K, Liang J, et al. A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 692-699.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.002

慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型

张晶,许凯,梁洁,陈强,马群英,梁丽娜*

(中国中医科学院眼科医院,北京 100040)

【摘要】 目的 采用慢性光照联合氢醌喂食的方法诱导建立小鼠年龄相关性黄斑变性(AMD)模型,观察其病理特征、超微结构及视网膜功能改变,为 AMD 发病机制及防治研究提供新模型。**方法** 4 月龄 C57BL/6 小鼠 20 只随机分为模型组和正常组,每组 10 只。模型组小鼠被喂以基于基础纯净合成的含 8 g/(kg·bw)氢醌的饮食,同时每日接受 12 h,强度 2500 lx 的光照。正常组小鼠被喂以不含氢醌的同配方饮食,正常光照明,饲养 3.5 个月。采用视网膜电图(ERG)、光镜及电子显微镜技术观察两组小鼠视网膜功能和结构改变,TUNEL 方法观察视网膜细胞凋亡情况,免疫荧光法检测视网膜、脉络膜血管内皮生长因子(VEGF)及 CD31 的表达和分布。**结果** ERG 检测结果显示模型组小鼠视网膜功能较正常组下降;光镜观察显示模型组小鼠视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜结构破坏,可见新生血管样组织细胞长入,感光细胞计数模型组小鼠为(164.67±34.37),正常组为(243.33±15.23),模型组感光细胞数较正常组显著减少,差异有统计学意义($t=-9.77, P<0.05$);透射电子显微镜显示,模型组视网膜的感光细胞的膜盘结构松散变形,部分碎裂,RPE 细胞微绒毛变短,Bruch 膜不规则增厚,外胶原层见层状沉积物,内皮细胞突入 Bruch 膜内。TUNEL 结果显示正常组几乎没有凋亡细胞,模型组视网膜色素上皮细胞(RPE)层及感光细胞层出现了大量凋亡细胞,感光细胞凋亡率(43±2.73)%,两组差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫荧光结果显示,正常组外丛状层、神经纤维层可见散在 VEGF 弱阳性表达,模型组除上述细胞外,在 RPE 细胞层亦可见强阳性染色。正常组视网膜各层细胞未见明确 CD31 阳性染色,模型组 RPE 细胞层可见较强 CD31 表达,提示 RPE 层新生血管发生。**结论** 慢性光照联合氢醌饲料喂养的小鼠非常接近人 AMD 的发病进程及特点,可为进一步探讨 AMD 发病机制及防治研究提供可靠的动物模型。

【关键词】 年龄相关性黄斑变性;小鼠模型;光照;氢醌
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0692-08

A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone

ZHANG Jing, XU Kai, LIANG Jie, CHEN Qiang, MA Qunying, LIANG Lina*

(Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

Corresponding author: LIANG Lina. E-mail: lianglina163@163.com

【Abstract】 Objective To develop a murine model of age-related macular degeneration (AMD), using combined chronic exposure to light and hydroquinone, and to characterize the pathological and ultrastructural changes, and retinal

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81674033);中国中医科学院中医药“一带一路”合作项目(GH2017-04-02);中国-挪威中医药中心项目(GZYYGJ2018023)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81674033), TCM “Belt and Road Initiative” Cooperative Project Funded by China Academy of Chinese Medical Sciences(GH2017-04-02), Traditional Chinese Medicine Center for China-Norway Project (GZYYGJ2018023).

【作者简介】张晶(1982—),女,助理研究员,眼科学博士,研究方向:干细胞的眼科学应用,视网膜变性类疾病的视神经保护。Email: qdzhangjing@126.com

【通信作者】梁丽娜,研究员,博士生导师。Email: lianglina163@163.com

function, thus to provide a more suitable model for AMD pathogenesis and treatment research. **Methods** Twenty 4-month-old C57BL/6 mice were randomly divided into a model group and a normal group, with 10 mice in each. The mice in the model group were fed a diet containing 8 g/(kg·bw) hydroquinone and received 12 h light exposure daily with an intensity of 2500 lx. Mice in the normal group were fed with the same diet without hydroquinone, and were exposed to conventional illumination. After 3.5 months, light and electron microscopy and electroretinograms (ERGs) were used to detect structural and functional changes in the retina. Photoreceptor apoptosis was evaluated with TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining, and vascular endothelial growth factor (VEGF) and cluster of differentiation 31 (CD31) expression and distribution were detected by immunofluorescence. **Results** ERGs showed that retinal function of the mice in the model group was lower than that of mice in the normal group. Light microscopy showed atrophic changes in the retinal pigment epithelium (RPE) layer in the model group, and a reduced number of photoreceptor cells (164.67 ± 34.37 versus 243.33 ± 15.23 in the normal group). There were significantly fewer photoreceptor cells in the model group than in the normal group ($t = -9.77$, $P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed that the photoreceptor outer segments of the mice in the model group were loose, deformed and partially fragmented. In addition, the RPE-cell microvilli were shortened; the Bruch's membrane became irregularly thickened; and endothelial cells from the choroidal capillary basement membrane penetrated into the Bruch's membrane. Apoptosis was rarely found in the normal group. TUNEL staining showed that there were many positive cells in the RPE and photoreceptor layers in the model group. The apoptosis rate was $(43 \pm 2.73)\%$ ($P < 0.01$). Immunofluorescence showed marked VEGF-positive staining in the RPE layer in the model group, whereas no specific staining was found in the normal group. Immunofluorescence of CD31 showed scattered positive staining in the outer plexiform layer and ganglion cell layer in the normal group, whereas it could also be found in the RPE layer in the model group, which indicated the development of neovascularization. **Conclusions** The retinas of mice treated with combined hydroquinone and chronic light damage closely mimic the development and characteristics of human AMD, this may provide a reliable animal model for further studies of AMD pathogenesis and management.

[Keywords] age related macular degeneration; mouse model; light exposure; hydroquinone

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

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是 55 岁以上人群主要的致盲眼病之一。随着中国老龄化问题的日益严重, 其患病率逐年升高, 其发病机制和防治成为研究的热点, 合适的动物模型是相关研究工作的重要工具。近年来国内外建立了各种 AMD 动物模型^[1], 不同的动物模型各有其优缺点, 理想的动物模型应该更经济和更接近于人类 AMD 自然病程。AMD 的病因和发病机制仍然存在很大的争议, 目前得到公认的是受年龄、基因和环境的影响, 其中吸烟和光暴露是 AMD 发生的重要环境危险因素, 既往大量报道以吸烟、光照诱导出部分 AMD 病理改变动物模型^[2-3], 而人类 AMD 是一个多因素作用、光感受器细胞、RPE 细胞和脉络膜毛细血管之间相互影响形成的复杂“系统”的表现。因此, 联合多种发病诱因, 尽可能模拟 AMD 发生的环境因素, 可能会建立更接近人 AMD 发病机制的动物模型。本研究, 我们采用慢性光照联合氢醌饲料喂养的方法诱导出类似晚期 AMD 病变模型, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 20 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (京) 2016-0006】。实验动物饲养于中国中医科学院眼科医院实验动物中心屏障级动物房内【SYXK (京) 2014-0019】。温度 (22 ± 5) °C, 湿度 (50 ± 5) %。所有实验操作遵循眼科技视觉研究动物 ARVO 宣言, 并按实验动物 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 试剂与仪器

氢醌 (Sigma-Aldrich, H9003); TUNEL 细胞原位凋亡试剂盒 (Roche Life Science, 12156792910); HE 染色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司, C02-04004); 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染色液 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, BD PharmingenTM, 564907); 抗荧光淬灭剂 (北京博奥森生物技术有限公司, C-101); DNA 酶 I (大连 TaKaRa 公司, D2270 A); 冰冻包埋剂 (optimal cutting temperature compound, O.C.T, 美国 Sakura 公司, 4583); 4% 多聚

甲醛(北京 Unique 生物科技有限公司, P1110); VEGF(Abcam, ab52917); CD31(Abcam, ab28364); 罗丹明标记的山羊抗兔二抗(北京博奥森生物技术有限公司, AE042337); 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA, 北京博奥森生物技术有限公司, bs-2315)。光学显微镜(DM2500, Leica, 德国), 透射电子显微镜(JEM-1400, 日本电子株式会社, 日本), 冰冻切片机(CM1850, Leica, 德国), 光照度计(北京师范大学光电仪器厂, ST-85, 中国), 大鼠 SPF 级生长繁育饲料(北京科奥协力饲料有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立

动物按照随机数字表法分为模型组 10 只, 正常对照组 10 只。模型组小鼠置于自主设计的 LED 光照装置中(专利号: 2017210439226) 波长 400~750 nm, 光照度计测量, 保证在动物头部水平测量光照强度可达 2500 lx, 每日接受 12 h 光照; 同时被喂以基于基础纯净合成的含 8 g/(kg·bw) 的饮食; 正常组小鼠被喂以不含氢醌的同配方饮食, 正常昼夜节律饲养。两组动物饲养 3.5 个月后进行模型评价。

1.2.2 视网膜电图(ERG)检测

各组小鼠于检测前暗适应 24 h, 复方托吡卡胺滴眼液点双眼常规散瞳 20 min; 采用盐酸氯胺酮-盐酸塞拉嗪混合麻醉剂($v:v=1:7$) 肌注(0.01 mL/kg) 麻醉小鼠。检测操作全程均在弱红光灯下进行。将参考电极和接地电极分别置于小鼠正中头皮下及双下肢皮下。将双侧角膜电极置于大鼠双侧眼睑内, 保持各电极间阻抗始终 $<5\text{ k}\Omega$ 。以 Ganzfeld 全视野刺激器进行刺激, 根据国际临床视觉电生理协会(ISCEV) 制定的最新国际标准^[4], 依次选定暗适应 0.01 ERG, 暗适应 3.0 ERG, 暗适应 3.0 震荡电位, (自动明适应 10 min) 明适应 3.0 ERG, 闪烁光反应进行检测。依次记录各组 a 波、b 波的峰时值(ms) 和振幅值(μV)。

1.2.3 视网膜光镜观察

颈椎脱臼法处死小鼠, 快速摘取眼球, 1 mL 注射器角膜穿刺置于 4% 多聚甲醛固定 20 min, 解剖显微镜下小心去除眼前节和部分玻璃体, 余下组织继续固定 24 h, 梯度酒精脱水、二甲苯透明后浸蜡包埋。连续 4 μm 切片, 切片常规脱蜡至水后行 HE 染色, 光学显微镜观察视网膜各层病理改变。

1.2.4 视网膜透射电镜检测

颈椎脱臼法处死小鼠, 快速摘取眼球, 立刻置于 4℃, 2.5% 戊二醛中固定 0.5 h, 显微镜下去除眼前节组织及部分玻璃体, 保留视杯, 解剖显微镜下

切取视乳头颞侧 1 mm 上方全层眼球壁, 大小 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 2 mm。戊二醛固定、梯度酒精脱水、环氧树脂浸透包埋组织, 制作 900 nm 超薄切片, 醋酸双氧铀、枸橼酸铅避光染色、风干, 透射电子显微镜观察视网膜超微结构。

1.2.5 TUNEL 检测视网膜细胞凋亡

动物眼球取材固定同 HE 染色, 4% 多聚甲醛液中 4℃ 固定 24 h 后, 冰冻包埋剂 OCT 包埋后液氮冷冻。冰冻切片机-23℃ 下行垂直视网膜的 8 μm 冰冻切片。冰冻切片磷酸缓冲液(PBS) 室温 15 min $\times$ 3 次洗脱包埋剂, 进行 TUNEL 检测, 具体操作参见试剂盒说明, 完成后进行 DAPI 复染细胞核, 抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。每组随机选取 10 张片子, 每张切片计数一个高倍视野下调亡的感光细胞数及感光细胞总数, 计算凋亡率。

1.2.6 免疫荧光检测 VEGF 及 CD31 表达

将冰冻切片置于磷酸缓冲液(PBS) 室温 10 min $\times$ 3 次, 然后置于 1% Triton X-100 溶液 30 min, 2% 牛血清白蛋白的室温封闭 2 h 后依组别分别滴加一抗 VEGF, CD31, 4℃ 孵育过夜。PBS 溶液室温洗涤 10 min $\times$ 3 次, 滴加罗丹明标记的山羊抗小鼠二抗, 室温下孵育 1 h, PBS 清洗 10 min $\times$ 3 次, DAPI 复染细胞核 5 min。抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件包进行分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜电图(ERG)检测

暗适应 0.01 ERG 正常组视网膜 b 波振幅(234.00 ± 20.95) μV , 模型组 b 波振幅(113.00 ± 16.13) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 暗适应 3.0 ERG 正常组 b 波振幅(355.50 ± 61.08) μV , 模型组(129.00 ± 18.05) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。暗适应 3.0 震荡电位正常组 b 波振幅(575.00 ± 115.11) μV , 模型组(284.25 ± 55.25) μV , 两组差异有统计学意义($P<0.05$); 明适应 3.0 ERG 正常组 b 波振幅(138.00 ± 17.53) μV , 模型组(44.50 ± 7.59) μV , 较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 闪烁光反应正常组 b 波振幅(163.00 ± 30.27), 模型组(50.50 ± 11.03) μV , 模型组较正常组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 见表 1。

表 1 正常组及模型组视网膜电图检测结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Electroretinogram (ERG) test between the normal and model groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Groups	暗适应 0.01 ERG Scotopic 0.01 ERG (μV)	暗适应 3.0 ERG Scotopic 3.0 ERG (μV)	暗适应 3.0 震荡电位 Scotopic 3.0 oscillatory potentials(μV)	明适应 3.0 ERG Photopic 3.0 ERG (μV)	闪烁光反应 Photopic 3.0 flicker (μV)
正常组 Normal group	234.00±20.95	355.50±61.08	575.00±115.11	138.00±17.53	163.00±30.27
模型组 Model group	113.00±16.13	129.00±18.05	284.25±55.25	44.50±7.59	50.50±11.03
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	11.04	9.91	10.21	34.03	30.44
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000

2.2 视网膜结构光镜观察

正常组视网膜各层结构排列规整,细胞形态均一,视网膜色素上皮层连续整齐,与正常组相比,模型组视网膜各层结构排列较为疏松,感光细胞较正常组减少,视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜结构破坏,可见血管样组织长入,部分区域增厚,部分区域变薄,感光细胞计数正常组为(243.33±15.231),模型组(164.67±34.37),模型组感光细胞数目明显低于正常组,差异有统计学意义($t=-9.77, P<0.05$),见图 1。

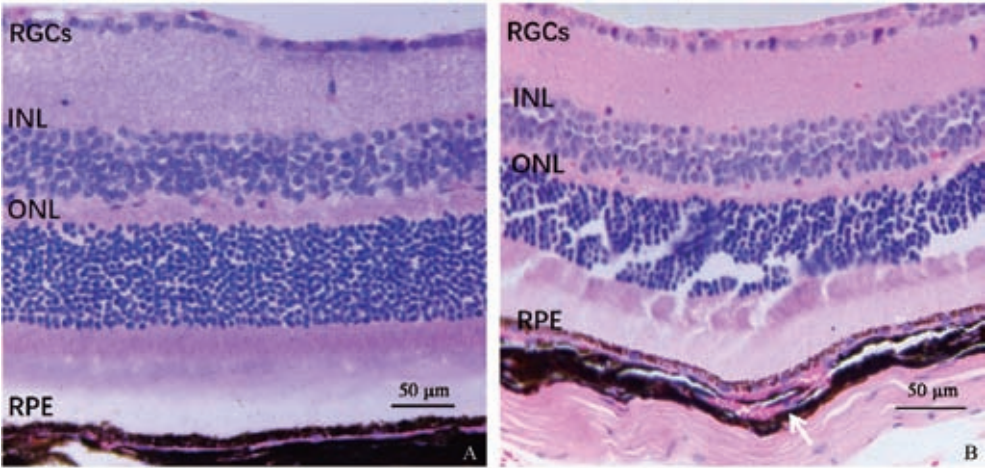
2.3 视网膜电镜观察

正常组小鼠视网膜感光细胞膜盘结构清晰,排

列整齐,色素上皮细胞线粒体丰富,顶部微绒毛数量多而且长,Bruch 膜结构规整,厚度均匀。模型组小鼠感光细胞膜盘结构松散变形,出现分离、碎解,固缩等改变。视网膜色素上皮细胞内色素粒减少,顶部微绒毛较正常组稀疏变短,RPE 下可见沉积物,Bruch 膜结构不规整,厚度不均匀,部分出现中断,内皮细胞长入,见图 2。

2.4 视网膜细胞凋亡情况

正常组视网膜各层细胞核排列规整,几乎未见凋亡细胞,模型组感光细胞层细胞核较正常组减少,可发现明显的凋亡现象,感光细胞凋亡率(43.00±2.73)%。见图 3。

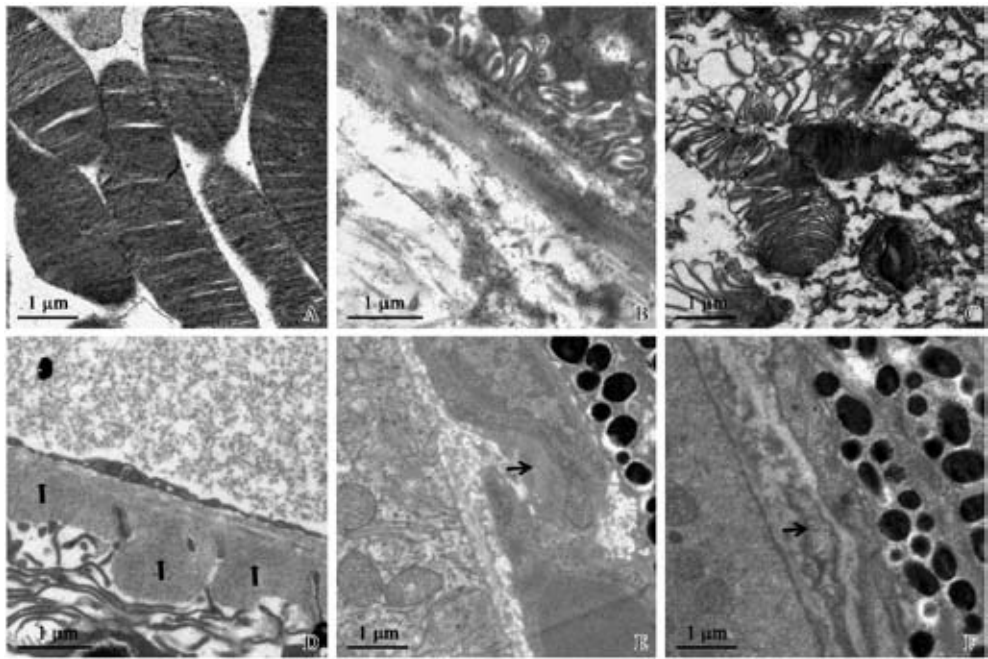


注:A:正常组,视网膜各层结构排列规整,细胞形态均一,视网膜色素上皮层连续整齐。B:模型组,视网膜各层结构排列较为疏松,感光细胞较正常组减少,视网膜色素上皮层呈现萎缩样改变,Bruch 膜可见中断,血管样组织长入(白色箭头)。RGCs:视网膜神经节细胞;INL:内核层;ONL:外核层;RPE:视网膜色素上皮层。

图 1 正常组及模型组视网膜病理图像(HE 染色,×400)

Note.A, Normal group, the retina layers were arranged regularly, the cell morphology was uniform, and the retinal pigment epithelium layers were continuous and orderly. B, Model group, the arrangement of retinal layers was looser, the number of photoreceptor cells was less than which in normal group, the RPE layer showed atrophic changes, Bruch membrane was interrupted, and vascular-like tissue grew into (white arrow). RGCs:Retinal ganglion cells. INL:Inner nuclear layer. ONL: Outer nuclear layer. RPE:Retinal pigment epithelium layer.

Figure 1 Pathological changes of the retinas in the normal and model groups(HE staining,×400)

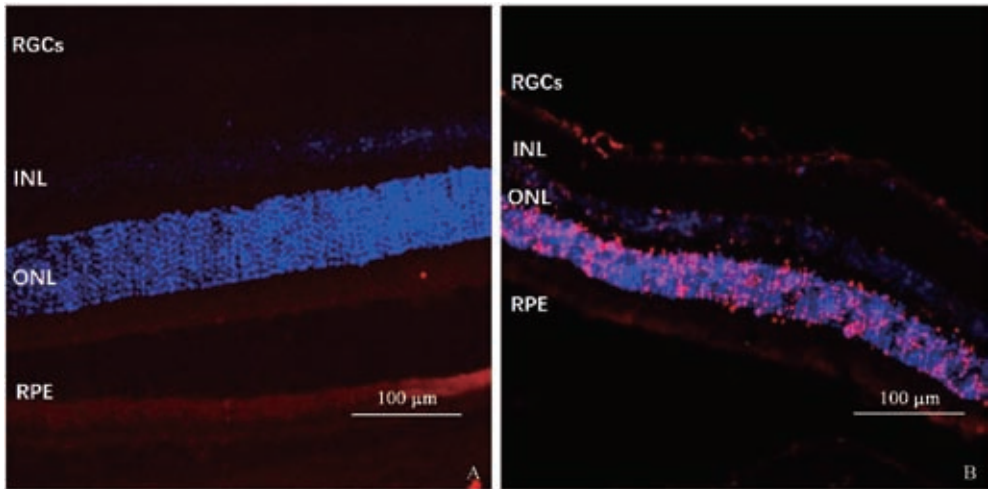


注：A、B 正常组，A 图示膜盘结构，B 图示 Bruch 膜及周围结构。C-F 模型组，C 图可见盘膜结构散乱变形，D-F 图色素上皮细胞顶部微绒毛稀疏变短，RPE 下沉积物（箭头），Bruch 膜不规则，可见中断，内皮细胞长入（黑色箭头）。

图 2 小鼠视网膜透射电子显微镜图

Note. A, B. Normal group. A, Structure of the rod outer segment. B, Bruch membrane and its surrounding structures. C-F. Model groups. C. The disc membrane structure was disorganized and deformed. D-F. the microvilli at the top of the pigment epithelial cells were sparse and shorter, the deposits under RPE (arrow), the Bruch membrane was irregular, and the endothelial cells grew in (black arrow).

Figure 2 Transmission electron micrographs of the mouse retinas



注：A：正常组，未见凋亡细胞；B：模型组，视网膜感光细胞层可见大量凋亡细胞，凋亡细胞呈红色，蓝色为 DAPI 复染细胞核。RGCs：视网膜神经节细胞；INL：内核层；ONL：外核层；RPE：视网膜色素上皮层。

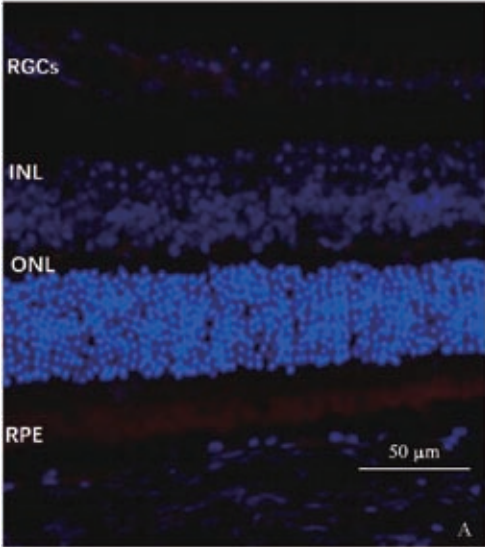
图 3 TUNEL 检测正常组及模型组视网膜感光细胞凋亡情况

Note. A, Normal group, showing no apoptotic cells. B, Model group, showing a large amount of apoptotic cells (red) in the photoreceptor layer of the retina. The cell nuclei were stained as blue by DAPI. (RGCs: Retinal ganglion cells; INL: Inner nuclear layer; ONL: Outer nuclear layer; RPE: Retinal pigment epithelium layer)

Figure 3 Apoptosis in photoreceptor cells of the normal and model groups (TUNEL staining)

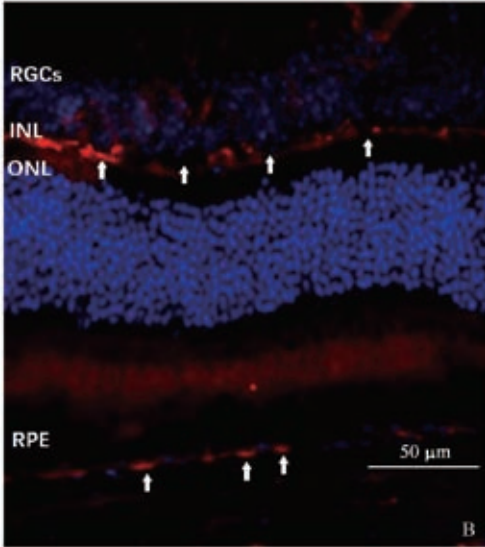
2.5 视网膜 VEGF 表达情况

正常组视网膜未见明确的 VEGF 表达,模型组视网膜色素上皮层及内核细胞层可见较强的 VEGF 阳性染色。见图 4。



2.6 视网膜 CD31 表达情况

正常组视网膜未见明确的 CD31 表达,模型组视网膜色素上皮层可见较强的 CD31 阳性染色。见图 5。

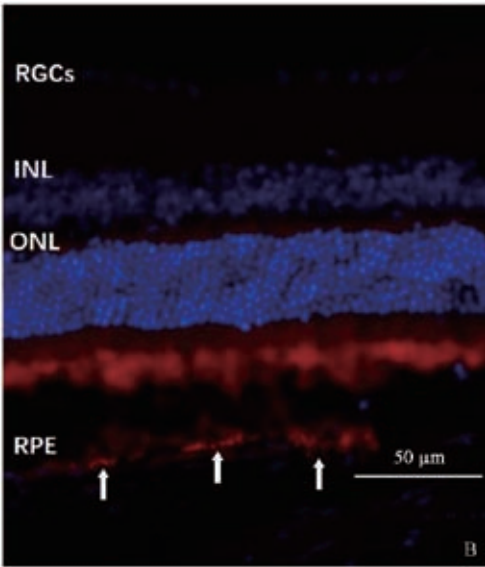
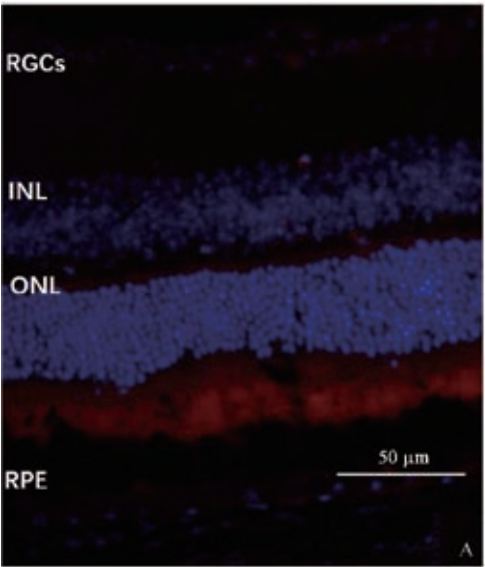


注:A:正常组,未见明确 VEGF 染色;B:模型组,视网膜色素上皮层及内核层可见 VEGF 阳性染色呈红色(白箭),蓝色信号为 DAPI 复染的细胞核。RGCs;视网膜神经节细胞;INL;内核层;ONL;外核层;RPE;视网膜色素上皮层。

图 4 免疫荧光检测正常组及模型组视网膜 VEGF 表达情况

Note. A, Normal group, showing no VEGF-stained cells. B, Model group, showing VEGF-positive cells in both RPE layer and the inner nuclear layer (white arrow), and all the cell nuclei were stained as blue by DAPI. RGCs; Retinal ganglion cells; INL; Inner nuclear layer; ONL; Outter nuclear layer; RPE; Retinal pigment epithelium layer.

Figure 4 VEGF expression in the retina tissues of normal and model groups(Immunofluorescence staining)



注:A:正常组,未见明确 CD31 染色;B:模型组,视网膜色素上皮层可见 CD31 阳性染色呈红色(白箭),蓝色信号为 DAPI 复染的细胞核。RGCs;视网膜神经节细胞;INL;内核层;ONL;外核层;RPE;视网膜色素上皮层。

图 5 免疫荧光检测正常组及模型组视网膜 CD31 表达情况

Note. A, Normal group, showing no significant CD31-stained cells. B, Model group, showing numerous CD31-positive cells in the retinal pigment epithelium (white Arrows), and all the cell nuclei were stained as blue by DAPI. RGCS; Retinal ganglion cells; INL; Inner nuclear layer; ONL; Outter nuclear layer; RPE; Retinal pigment epithelium layer.

Figure 5 CD31 expression in the retinas of the normal and model groups(Immunofluorescence staining)

3 讨论

目前用于 AMD 研究的动物模型种类较多,如 AMD 易感基因工程动物模型^[5];激光诱导脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型,玻璃体腔注射生长因子诱发脉络膜视网膜新生血管模型,静脉注射碘酸钠诱导视网膜损伤模型,光致视网膜损伤模型等^[6]。模型各有特点,但大多偏重于 AMD 某种病理特征。部分基因工程小鼠模型虽可以呈现人类 AMD 的特征性变化,但模型建立费用高昂,动物因免疫缺陷及代谢异常存活率低,不易于普及利用。理想动物模型应更近似于临床 AMD 发病过程,大量研究证实衰老、吸烟^[7-8]及持续可见光暴露^[9-11]与 AMD 发生的关系密切。故本研究选择氢醌饲料喂养及慢性可见光暴露模拟 AMD 发病的环境危险因素。氢醌是香烟中的主要有害物质,具有极强的氧化性,既往研究证实,置于吸烟环境中的小鼠可出现视网膜色素上皮层下沉积物、Bruch 膜变薄及 RPE 细胞凋亡等改变,与人类 AMD 早期改变类玻璃膜疣形成相似^[12]。体外实验证实,氢醌处理体外培养的 ARPE-19 细胞系,可观察到细胞出现过氧化损伤,大量亲电子化合物细胞内蓄积并诱发内质网应激反应,引起细胞系列损伤^[13-16]。本课题组前期实验利用含 0.8 g/(kg·bw) 氢醌饲料喂养小鼠 3.5 月后,观察到视网膜色素上皮-脉络膜下出现类玻璃膜疣状物沉积,但光感受器细胞病变并不明显^[3]。光损伤是 AMD 另一个重要的环境危险因素,AMD 发病与长期低强度光损伤有关。研究发现可见光通过光毒性和化学毒性导致视网膜感光细胞及 RPE 损伤^[17],实验证实,应用光照强度为 2500 lx 的白色光源照射 2 月龄小型猪 3 个月后,视网膜发生慢性损伤,以视网膜 RPE 细胞及感光细胞凋亡为特点,内核层细胞数量减少,视网膜厚度降低^[18-19]。此外研究证实,吸烟与可见光暴露对于视网膜细胞损伤还存在交互作用,Zinfflou 等^[20]实验发现香烟烟雾成分可导致 RPE 细胞对于蓝光呈现较高的吸收率,导致 RPE 细胞光损伤加剧。因此,将吸烟与光照两种 AMD 发病诱因相联合,有可能建立与 AMD 自然病程及病理特点更接近的动物模型。

人类 AMD 是涉及光感受器细胞、RPE 细胞以及脉络膜血管病变的复杂病理过程。早期病变为视网膜黄斑区出现玻璃膜疣状沉积物 drusen,直径

65~125 μm , RPE 细胞无异常改变;进入中期,黄斑区可见直径 125 μm 以上 drusen 形成,同时伴有 RPE 细胞色素紊乱;随着病情进展,视网膜 RPE 局灶性脱离,内层视网膜细胞萎缩;晚期可见脉络膜新生血管长入 Bruch 膜或视网膜地图状萎缩,前者又被称为湿性 AMD,后者为干性 AMD^[21]。本实验选择 C57BL/6 近交系小鼠为观察对象,尽管小鼠视网膜缺乏确切的黄斑结构,但其视网膜光感受器细胞、RPE 细胞、Bruch 膜及脉络膜血管等结构与人类视网膜结构极为类似,因此观察小鼠视网膜各结构在 AMD 重要发病因素作用下的病理变化,可为研究人类 AMD 的发生提供客观的基础数据。本实验将 AMD 发病的重要危险因素相联合,4 月龄 C57BL/6 小鼠依据发育周期已属于中年^[22],历经 3.5 个月实验周期恰好进入老年期;每日以含有 0.8 g/(kg·bw) 氢醌饲料喂养小鼠模拟吸烟环境;采用自主设计的 LED 冷光源灯架,光源波长范围为 400~750 nm 模拟人眼可感知的光波范围,以光照强度 2500 lx 每日光照小鼠 12 h,进行慢性光诱导视网膜损伤,既保持动物正常的昼夜节律,又模拟人类随着时间进展视网膜细胞不断发生变化的特点,进而对模型组动物视网膜进行功能学和形态学评价。模型组动物 ERG 结果暗适应 0.01 ERG,暗适应 3.0 ERG 以及明适应 3.0 ERG 的 b 波振幅降低,提示视网膜光感受器细胞以及内层视网膜细胞发生损伤,与人类视网膜变性类疾病 ERG 呈现类似的变化趋势;电镜观察到模型组视网膜感光细胞膜盘结构松散变形,碎解,RPE 细胞内色素粒减少,下方可见沉积物;上述变化与本课题组前期实验单纯氢醌喂养小鼠结果一致^[3],此外视网膜还出现 Bruch 膜结构及厚度均欠规整,部分出现中断,内皮细胞长入等变化。光镜下不但观察到模型组视网膜内、外核层细胞数量显著减少($t=-9.77$, $P<0.05$),RPE 细胞呈现萎缩状态,还可见血管样组织由脉络膜层向内长入,破坏 Bruch 膜结构,经免疫荧光检测该区域内与血管生长密切相关的因子 VEGF、CD31 呈阳性表达,提示病变向中晚期进展。

本研究选择 AMD 发病的高危因素:衰老、吸烟以及持续可见光暴露建立动物模型,实验动物不但出现类似于玻璃膜疣的视网膜下沉积物,还可观察到 Bruch 膜破坏,血管样结构由脉络膜向内长入等更类似于临床晚期 AMD 的病理特征。实验动物选择遗传背景清晰的近交系小鼠,个体差异小,模型

建立过程操作难度适中,可重复性高,为进一步研究 AMD 发病、预防及治疗提供了较好的研究工具。本次研究未发现突破 RPE 层的典型脉络膜新生血管组织,可能与观察时间较短有关,在今后的研究中延长造模时间,同时增加脉络膜铺片等观察方法进一步明确 CNV 的生长和发展。

参 考 文 献(References)

- [1] Shah M, Cabrera-Ghayouri S, Christie L, et al. Translational preclinical pharmacologic disease models for ophthalmic drug development [J]. *Pharm Res*, 2019, 36(4): 36-58.
- [2] 孟昭君,陈晓勇,张晶,等. 三种不同辐照度的 460~480 nm 波长光对 SD 大鼠视网膜组织结构的影响 [J]. *中华眼科杂志*, 2013, 49(5): 438-446.
Meng ZJ, Chen XY, Zhang J, et al. Influence of 460-480 nm light at three different irradiance in retina tissue of SD rats [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2013, 49(5): 438-446.
- [3] 安娜,陈强,梁丽娜,等. 氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型的建立 [J]. *眼科新进展*, 2016, 36(7): 605-608.
An N, Chen Q, Liang LN, et al. Establishment of hydroquinone induced age-related macular degeneration model in mice [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(7): 605-608.
- [4] McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update) [J]. *Doc Ophthalmol*, 2015, 130(1): 1-12.
- [5] Chan C, Ross RJ, Shen D, et al. *Ccl2/Cx3cr1* deficient Mice: An animal model for age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Res*, 2008, 40(3-4): 124-128.
- [6] 许竹青,魏伟. 老年黄斑变性的动物模型研究进展 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2015, 25(1): 62-65.
Xu ZQ, Wei W. Reserch progress of animal models for age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2015, 25(1): 62-65.
- [7] Al-Zamil W, Yassin S. Recent developments in age-related macular degeneration: A review [J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 8(12): 1313-1330.
- [8] Bellezza I. Oxidative stress in age-related macular degeneration: Nrf2 as therapeutic target [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 11(9): 1280-1287.
- [9] Schick T, Ersoy L, Lechanteur YT, et al. History of sunlight exposure is a risk factor for age-related macular degeneration [J]. *Retina*, 2016, 36(4): 787-790.
- [10] Singh N, Srinivasan S, Muralidharan V, et al. Prevention of age-related macular degeneration [J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2017, 6(6): 520-526.
- [11] Lambert NG, Singh MK, ElShelmani H, et al. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 9(54): 64-102.
- [12] Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M, et al. Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration [J]. *Vision Res*, 2010, 50(7): 652-664.
- [13] Forest DL, Johnson LV, Clegg DO. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(5): 421-427.
- [14] Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, et al. Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of VEGF gene [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2015, 4(2): 123-131.
- [15] Huang C, Wang JJ, Ma JH, et al. Activation of the UPR protects against cigarette smoke-induced RPE apoptosis through up-regulation of Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5367-5380.
- [16] Satoh T, Stalder R, Mckercher SR, et al. Nrf2 and HSF-1 pathway activation *via* hydroquinone-based proelectrophilic small molecules is regulated by electrochemical oxidation potential [J]. *ASN Neuro*, 2015, 7(4): 1-13.
- [17] Alaimo A, Linares GG, Bujjamer JM, et al. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: implications for age-related macular degeneration [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 2(18): 6-19.
- [18] 陈少军,阴正勤,李世迎,等. 慢性光诱导建立微型猪视网膜变性模型的研究 [J]. *眼科研究*, 2008, 26(10): 735-738.
Chen SJ, Yin ZQ, Li SY, et al. The study of a chronic light-induced retinal degeneration model in miniature pigs [J]. *Chin Ophthal Res*, 2008, 26(10): 735-738.
- [19] 刘俊,徐海伟,李世迎,等. 可见光诱导广西巴马小型猪视网膜变性的实验研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(24): 2614-2618.
Liu J, Xu HW, Li SY, et al. Experimental study of light-induced retinal degeneration in Guangxi Bama miniature pigs [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2013, 35(24): 2614-2618.
- [20] Zinlou C, Rochette PJ. Absorption of blue light by cigarette smoke components is highly toxic for retinal pigmented epithelial cells [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(2): 453-465.
- [21] 李筱荣. “中国老年性黄斑变性临床诊断治疗路径”解读 [J]. *实用老年医学*, 2014, 28(10): 877-880.
Li YR. Interpretation of the path of clinical diagnosis and treatment of age-related macular degeneration in China [J]. *Pract Geriatr*, 2014, 28(10): 877-880.
- [22] 秦川. 医学实验动物学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2015.
Qin C. Medical laboratory animal science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.

[收稿日期] 2019-03-07

彭晓婷,马琪,张晓松,等. 湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 700–708.

Peng XT, Ma Q, Zhang XS, et al. Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 700–708.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.003

湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究

彭晓婷¹, 马琪², 张晓松¹, 华永丽^{1*}, 纪鹏¹, 姚万玲¹, 魏彦明^{1*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 西南大学动物科学学院, 重庆 402460)

【摘要】 目的 应用基于超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间二级质谱联用(UPLC-Q/TOF-MS/MS)尿液代谢组学方法筛选湿热泄泻潜在代谢标志物,探讨大鼠湿热泄泻发病机制。**方法** 采取高糖高脂(HF)+高温高湿(HH)+腹腔注射产肠毒性大肠杆菌(EC)建立大鼠湿热泄泻模型,采集大鼠造模各阶段(高糖高脂,高温高湿,攻毒)尿液样本,应用尿液代谢组学技术分析样本,多元统计分析方法分析代谢数据。**结果** 筛选出左旋谷酰基-左旋半胱氨酸、左旋甲酰犬尿氨酸、5-羧基-N-甲酰犬尿氨酸、核黄素-5-磷酸、亚油酸、左旋色氨酸和褪黑素等7个潜在代谢标志物。**结论** 湿热泄泻涉及色氨酸代谢、核黄素代谢与亚油酸代谢等代谢通路,表明大鼠体内出现能量、氨基酸及脂类代谢紊乱,本研究结果为揭示中(兽)医湿热泄发病机制提供了参考依据。

【关键词】 湿热泄泻;超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间二级质谱联用;尿液;代谢组学;生物标志物;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0700-09

Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea

PENG Xiaoting¹, MA Qi², ZHANG Xiaosong¹, HUA Yongli^{1*}, JI Peng¹, YAO Wanling¹, WEI Yanming^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China.

2. Institute of Animal Science, Southwest University, Chongqing 402460)

Corresponding author: HUA Yongli. E-mail: huayongli2004@163.com; WEI Yanming. E-mail: weiyim@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective The ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass/mass spectrometry (UPLC-Q/TOF-MS/MS) urine metabolomics method was used to screen for potential metabolic markers of rat model of damp-heat diarrhea and to explore the pathogenesis. **Methods** The rat model of damp-heat diarrhea was established using a high-sugar and high-fat diet (HF), a high-temperature and high-humidity environment (HH), and intraperitoneal injection of *Escherichia coli* (EC). Urine samples were collected from rats at different stages of modeling (HF, HH, and EC) and analyzed using UPLC-Q/TOF-MS/MS. The data were analyzed by multivariate statistical analysis. **Results** Seven potential endogenous biomarkers were screened, namely, L-glutamic acid-L-cysteine, L-formyl kynurenine, 5-hydroxy-N-formylkynurenine, riboflavin-5-phosphate, linoleic acid, L-tryptophan and melatonin. **Conclusions** The metabolic pathways involved in damp heat diarrhea include metabolic pathways such as tryptophan metabolism, riboflavin metabolism, and linoleic acid metabolism. The results suggest that energy-, amino acid- and lipid-metabolism disorders occur in rats with damp-heat diarrhea which provide a scientific basis for elucidating the mechanism of pathogenesis of Chinese medicine and traditional Chinese veterinary medicine damp-heat diarrhea.

【Keywords】 damp-heat diarrhea; UPLC-Q/TOF-MS/MS; urine; metabolomics; biomarkers; rat

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

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31560709,31860717);国家肉牛/牦牛产业技术体系(CARS-37)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(31560709,31860717),China Agriculture Research System-37(CARS-37).

【作者简介】 彭晓婷(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中兽医。Email: 1131703147@qq.com

【通信作者】 华永丽,女,副教授。Email: huayongli2004@163.com;魏彦明,教授,博士生导师。Email: weiyim@gsau.edu.cn。

* 共同通信作者

湿热泄泻 (dampness-heat diarrhea, DHD) 是中(兽)医泄泻疾病常见证型之一, 症见腹痛泄泻, 泻下急迫; 泄而不爽, 粪黏腻恶臭; 烦渴, 尿色黄无力, 舌苔黄腻, 脉濡数或滑数^[1-3]。DHD 四季发病, 病因复杂, 多有外感湿热毒邪、饮食不洁、外感疫疔、喜食肥甘厚腻等^[4-5]。DHD 缠绵难治易复发, 每年可造成巨大经济损失, 因此 DHD 发病机制的研究意义重大。

代谢组学技术应用广泛, 利用代谢组学技术可研究疾病发病机制、发现疾病生物标记物及监测疾病等^[6-7]。本研究采用高糖高脂+高温高湿+产肠毒性大肠杆菌复制大鼠湿热泄泻模型, 分析湿热泄泻潜在代谢标志物与发病机制的关系, 为研究湿热泄泻发病机制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 20 只, 雌雄各半, 5~6 周龄, 180~220 g, 由兰州大学实验动物中心提供【SCXK(甘) 2015-0006】, 饲养条件: 温度 (22±2)℃、湿度 50%±5%、12 h 光照 12 h 黑暗, 代谢笼中适应 3 d。动物实验程序与福利均符合实验动物伦理学要求(伦理批准编号: GSAU-AEW-2018-0618)。

1.1.2 菌种

产毒性大肠杆菌标准株(O101), 由中国微生物菌种保藏管理中心(北京)提供, 菌号: CVCC231。

1.1.3 实验试剂与仪器

色谱级甲醇 (Tedia, 17115181); 色谱级甲酸 (Merck, H6070170); 色谱级乙腈 (Merck, 10900830); 56 度红星二锅头 (北京红星股份有限公司); 蜂蜜 (上海冠生园蜂制品有限公司, GB14963); 市售猪油; 戊巴比妥钠 (Sigma-Aldrich, P3761); 白细胞介素 6(IL-6)、白介素 1β(IL-1β)、白细胞介素 2(IL-2) 及肿瘤坏死因子 α(TNF-α) ELISA 检测试剂盒 (北京奇松生物科技有限公司, QS20180329、QS20180413、QS20180426、QS20180411)。

质谱仪 (SYNAPT G2 XS QTOF, Waters, 美国); 超高效液相色谱仪 (2777C UPLC system, Waters, 美国); 大鼠代谢笼; 酶标仪 (iMark, BIO-RAD, 美国); 全自动五分类动物血液细胞分析仪 (BC-5300Vet, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验

按本实验室前期建立的湿热泄泻模型复制方法建立湿热泄泻大鼠模型^[8]。20 只大鼠随机分为对照组 (control) 与 DHD 模型组 (model), 每组各 10 只。模型复制分三个阶段, 共 18 d。第一阶段: 高糖高脂 (HF), 10 d, 双日禁食, 单日饲喂普通饲料, 按体重 4 mL/200 g 灌胃猪油一次。第二阶段: 高温高湿 (HH), 5 d, 每天按体重 2 mL/200 g 灌胃白酒一次, 置于高温高湿仓 8 h, 温度 (33±2)℃, 湿度 (93±2)%。第三阶段: 攻毒 (EC), 3 d, 产毒性大肠杆菌 (1.06×10⁹ CFU/mL) 按体重 0.2 mL/200 g 间隔 24 h 腹腔注射两次, 正常饲养 1 d。实验中, 模型组大鼠自由饮用蜂蜜水 (30%), 正常饲养对照组大鼠, 灌胃、腹腔注射等体积生理盐水。

1.2.2 样本采集与制备

观察记录大鼠一般行为学变化, 包括精神状态、被毛、体温、饮食、尿液与粪便等。

实验结束用 1% 戊巴比妥钠按体重 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉采血。回肠与结肠各采 1 cm, 用 4% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色, 显微照相系统采集照片。

容器内加 0.5 mL 防腐剂 (2% NaN₃), 收集第 10 天、第 15 天、第 18 天 (各阶段末天) 对照组和模型组大鼠的尿液, -80℃ 保存。

尿液样本的制备: 各取 100 μL 尿液样本混合制作 QC 样本。从所有样本 (含 QC) 各取 100 μL 加入 300 μL 甲醇混匀, 涡旋 30 s, 静置 1 min 后 4℃ 25 000 r/min 离心 10 min, 取 20 μL 上清液与 180 μL 复溶液混匀, 0.22 μm 滤膜滤过备用。

1.2.3 指标检测

检测血常规: WBC、RBC、PCV、MO、PLT、LY、HGB。

严格按说明书要求检测细胞因子 IL-6、IL-1β、IL-2 及 TNF-α。

采用 SPSS 21.0, 组间数据差异显著性采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

1.2.4 UPLC-Q/TOF-MS/MS 分析条件

色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters, 美国); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B); 梯度洗脱条件: 0~1 min: 99% A; 1~3 min: 1%~15% B; 3~6 min: 15%~50% B; 6~9 min: 50%~95% B; 9~10 min: 95% B; 10~12 min: 99% A。柱温: 40℃; 流速:

0.5 mL/min;进样量:10 μL。

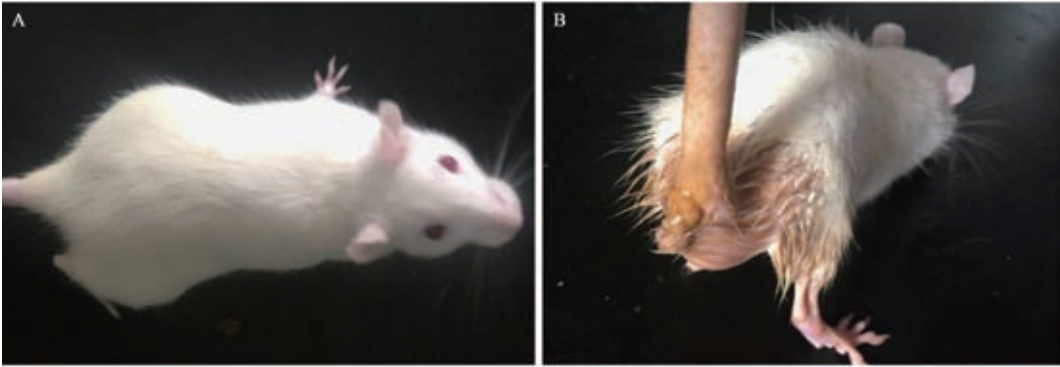
质谱条件 正离子与负离子模式应用高分辨串联质谱 SYNAPT G2-XS QTOF 进行样本分析和数据采集。正离子模式采集条件:毛细管电压 0.25 kV, 锥孔电压 40 V。负离子模式采集条件:毛细管电压 2 kV, 锥孔电压 40 V。数据采集: MSE 模式 centroid,一级扫描范围: 50 ~ 1200 Da, 扫描时间: 0.2 s, 20~40 eV 能量碎裂母离子采集碎片信息, 采集过程中每 3 s 对 LE 信号进行实时质量校正, 使用 QC 样品进行控制。

1.3 统计学分析

用 Progenesis QI 软件对原始质谱数据进行峰提取、对齐、匹配和强度校正等处理, 将得到的数据导入 MetaboAnalyst 在线软件进行多元分析, 单变量分析采用 *t* 检验和变异倍数分析 (Fold change, FC), 多变量分析采用正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least-squares discriminant analysis, OPLS-DA)。差异代谢物筛选条件: FC ≥ 1.2 或 FC ≤ 0.8, *q* < 0.05, VIP ≥ 1.0。

2 结果

2.1 大鼠临床表现及模型评价



注: A: 对照组; B: DHD 模型组。

图 1 大鼠临床症状

Note: A: Control group; B: DHD group.

Figure 1 Clinical symptoms of the rats

表 1 血常规检测

Table 1 Results of blood routine test								
组别 Groups	白细胞 WBC(10 ⁹ /L)	嗜中性粒细胞 NE(10 ⁹ /L)	单核细胞 MO(10 ⁹ /L)	淋巴细胞 LY(10 ⁹ /L)	红细胞 RBC(10 ¹² /L)	血红蛋白浓度 HGB(g/L)	红细胞压积 PCV(%)	血小板 PLT(10 ⁹ /L)
对照组 Control group	14.961±4.064	4.470±1.895	1.710±0.998	4.750±0.673	6.980±1.327	137.640±10.586	40.050±7.166	1154.910±120.102
模型组 Model group	36.740±12.073 *	16.540±1.969 *	8.890±4.803 *	10.780±1.886 *	11.740±0.987 *	222.220±24.793 *	62.880±3.772 *	635.110±232.382 *

注: 与对照组相比, **P* < 0.05。
Note. Compared with the control group, **P* < 0.05.

2.1.1 临床表现

实验中, 对照组大鼠未表现明显临床症状。HF 阶段: DHD 大鼠在禁食当日饮水量增加, 尿液淡黄色增加; 灌服猪油当日尿量减少, 拉稀。HH 阶段: 大鼠移入高温仓后出现精神沉郁、食欲下降、被毛杂乱; 移出高温仓后精神明显恢复, 粪便湿润成型, 色偏黄, 部分稀软。EC 阶段: 大鼠食欲下降、嗜睡、扎堆、体温升高、眼睑红肿、眼部黄白分泌物增多, 继而腹泻, 大便稀薄色黄、黏腻发臭, 肛门红肿、肛周附着粪便, 部分大鼠出现黏脓血便, 见图 1。DHD 大鼠临床症状与中(兽)医湿热泄泻临床特征基本相符, 通过血常规、炎症细胞因子以及组织病理切片做进一步模型评价。

2.1.2 血常规

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠 WBC、NE、MO、LY、RBC、HGB、PCV 等指标均升高, PLT 降低 (*P* < 0.05), 见表 1。

2.1.3 细胞因子

与对照组相比, 模型组大鼠 IL-1β、IL-2、IL-6、TNF-α 水平均显著升高 (*P* < 0.05), 见图 2, 结合血常规检测结果表明 DHD 模型大鼠体内有严重炎症反应。

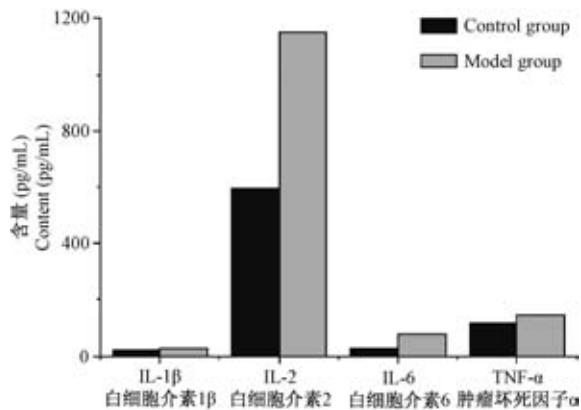


图 2 促炎细胞因子含量
Figure 2 Serum inflammatory cytokines levels of the rats

2.1.4 组织病理学

DHD 模型大鼠回肠和结肠部分粘膜上皮细胞坏死脱落,偶见中性粒细胞浸润。如图 3 所示,对照组大鼠肠粘膜上皮完整性较好,模型大鼠回肠肠绒毛部分上皮脱落,隐窝中有中性粒细胞浸润,结肠上皮细胞部分坏死脱落,粘膜下层结缔组织结构消失,小肠腺周围有中性淋巴细胞浸润。

2.2 代谢轮廓分析

如图 4 所示,与对照组相比,模型组大鼠尿液样

本峰强和峰型在 HF、HH 和 EC 三个阶段都有一定差异,提示 DHD 模型大鼠尿液中的代谢物在实验中均发生紊乱。

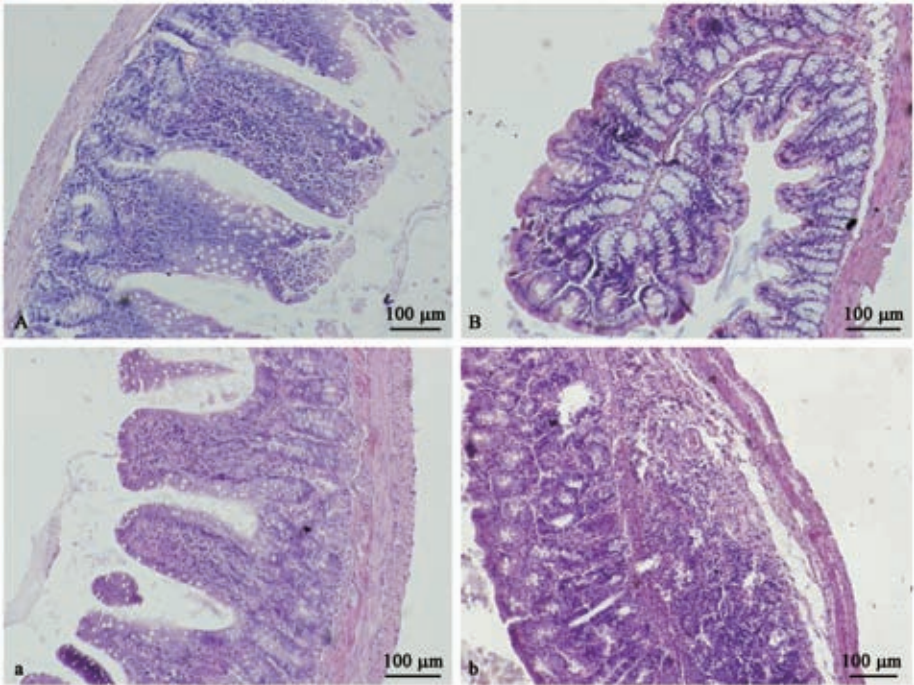
2.3 模式识别分析

代谢数据 PLS-DA 分析见图 5,在正离子模式与负离子模式,对照组大鼠与模型组大鼠尿液样本点在不同阶段分离良好。DHD 模型大鼠尿液代谢物变化趋势在 HF、HH 和 EC 三个阶段都有差异,表明模型大鼠体内代谢水平因造模因素的影响而发生改变。

进一步进行 OPLS-DA 分析,见图 6。正离子模式 R2Y 是 0.956、0.877、0.931,Q2 是 0.925、0.843、0.896,负离子模式 R2Y 是 0.930、0.871、0.928,Q2 是 0.895、0.834、0.914。模型组大鼠尿液样本点在不同阶段均表现明显分离聚类,说明 DHD 模型大鼠代谢谱发生改变。利用 KEGG、METLIN、HMDB 等数据库共筛选出 102 个差异代谢物。

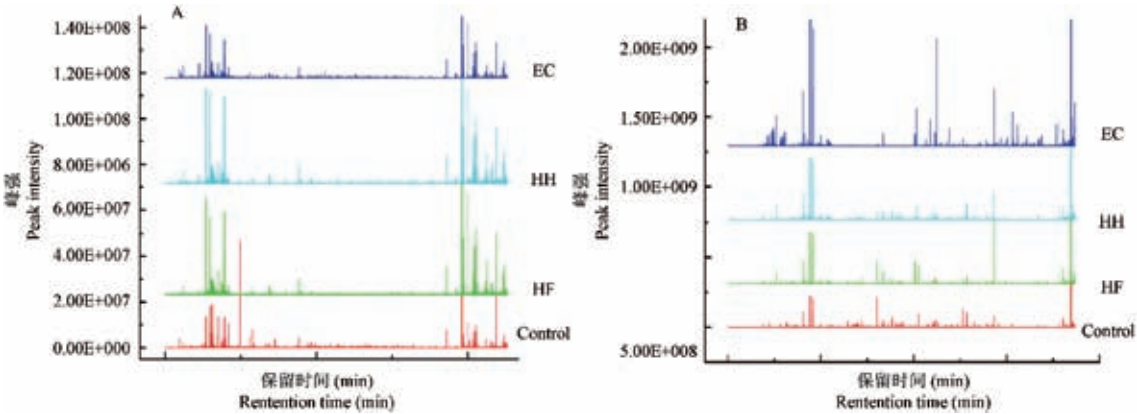
2.4 差异代谢物鉴定

对代谢数据进行样本点间层次聚类分离,如图 7 所示,与对照组相比,模型组大鼠不同阶段尿液代谢状态在正离子模式和负离子模式均明显偏离。



注:A.对照组回肠。a.模型组回肠。B.对照组结肠。b.模型组结肠。
图 3 回肠与结肠组织的病理变化
Note.A, Ileum of a control rat. a, Ileum of a dampness-heat diarrhea (DHD) rat. B, Colon of a control rat. b, Colon of a DHD rat.

Figure 3 Histopathological changes of the rat ileum and colon tissues

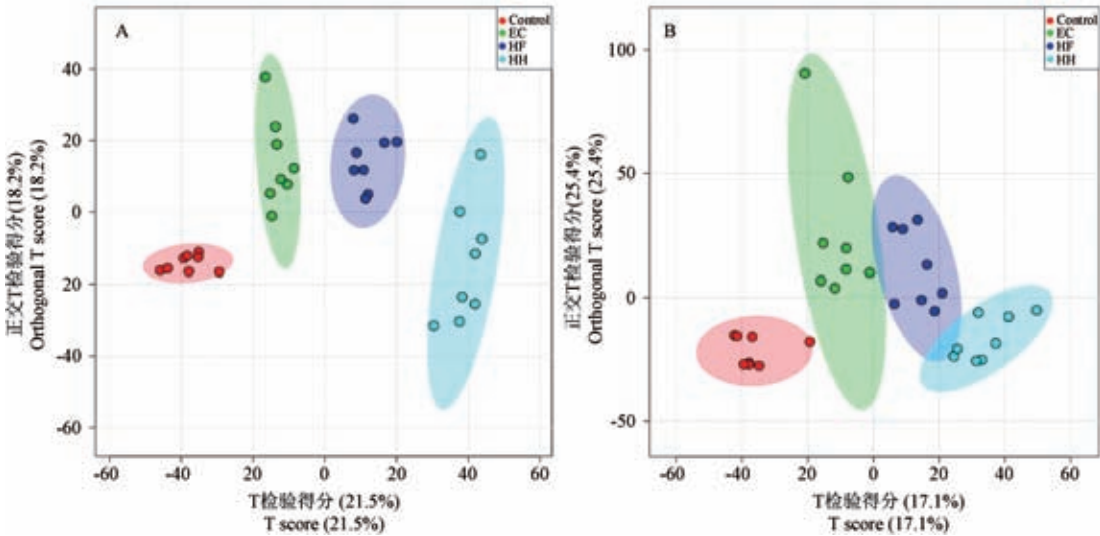


注:A.正离子模式。B.负离子模式。

图 4 总离子流图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 4 The total ions chromatograms (TIC) showing the urine changes of the rats



注:A: 正离子模式。B: 负离子模式。

图 5 PLS-DA 得分图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 5 The PLS-DA scores

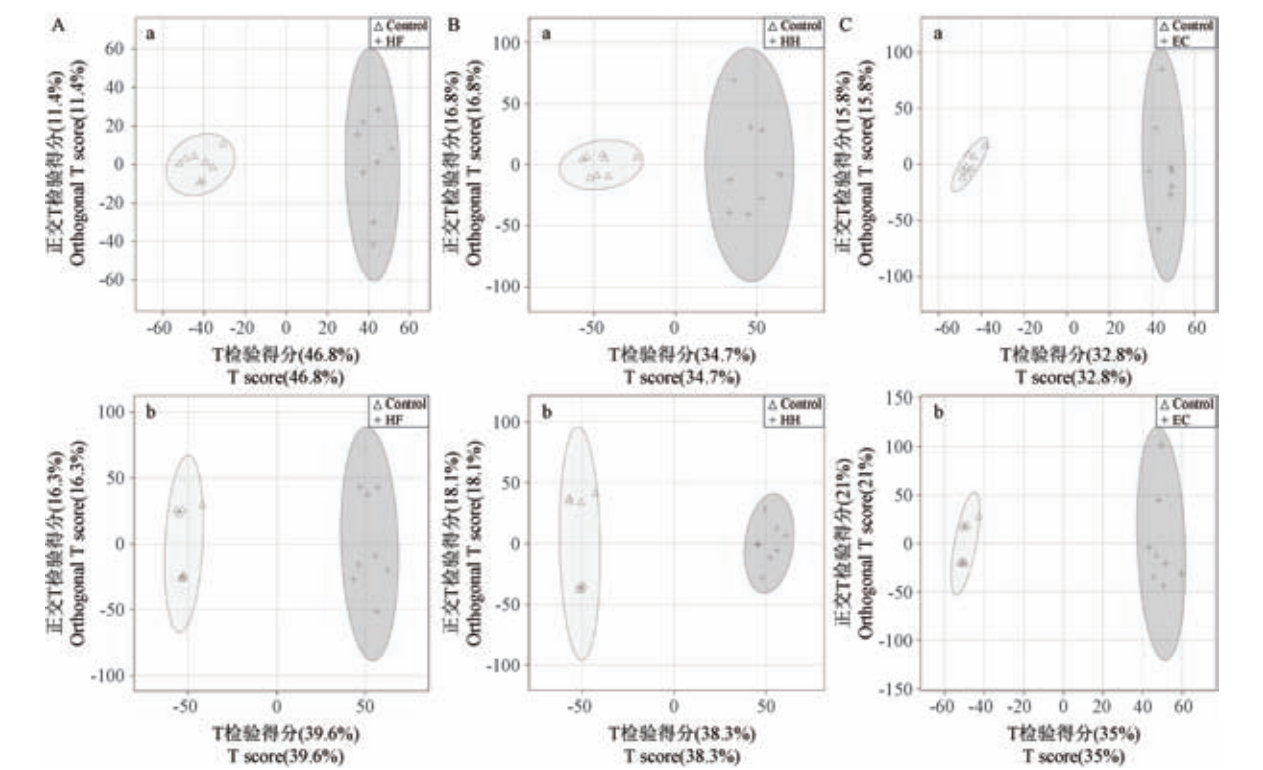
不同阶段尿液差异代谢物 Venn 分析见图 8,正离子模式鉴定出差异代谢物 57 个,14 个为两个或三个阶段共有;负离子模式鉴定出差异代谢物 20 个,5 个为两个或三个阶段共有。如表 2,有 7 种差异代谢物为三个阶段共有可作为潜在代谢标志物,分别是 5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋谷酰基-左旋半胱氨酸、左旋甲酰犬尿氨酸、亚油酸、褪黑素、核黄素-5-磷酸和左旋色氨酸。

2.5 代谢通路分析

应用 MetaboloAnalyst 构建代谢通路,见图 9,DHD 模型大鼠体内亚油酸代谢、核黄素代谢和色氨酸代谢等代谢通路均发生改变,涉及脂类、能量和氨基酸代谢。

2.6 潜在代谢标志物含量差异分析

将数据归一化处理,以峰强度比较不同阶段潜在代谢标志物相对含量变化,如图 10,相较对照组,模型组大鼠尿液样本中褪黑素、亚油酸、左旋甲酰犬尿氨酸和 5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸含量明显降低($P < 0.05$),左旋色氨酸、核黄素-5-磷酸和左旋谷酰基-左旋半胱氨酸含量明显升高($P < 0.05$)。左旋色氨酸、核黄素-5-磷酸和左旋谷酰基-左旋半胱氨酸的含量在实验三个阶段表现明显的升高、降低和再升高变化;5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、褪黑素、亚油酸和左旋甲酰犬尿氨酸的含量呈现明显的下降、升高和再下降变化。提示模型复制过程中,内源性代谢物相对含量随造模因素改变而改变。

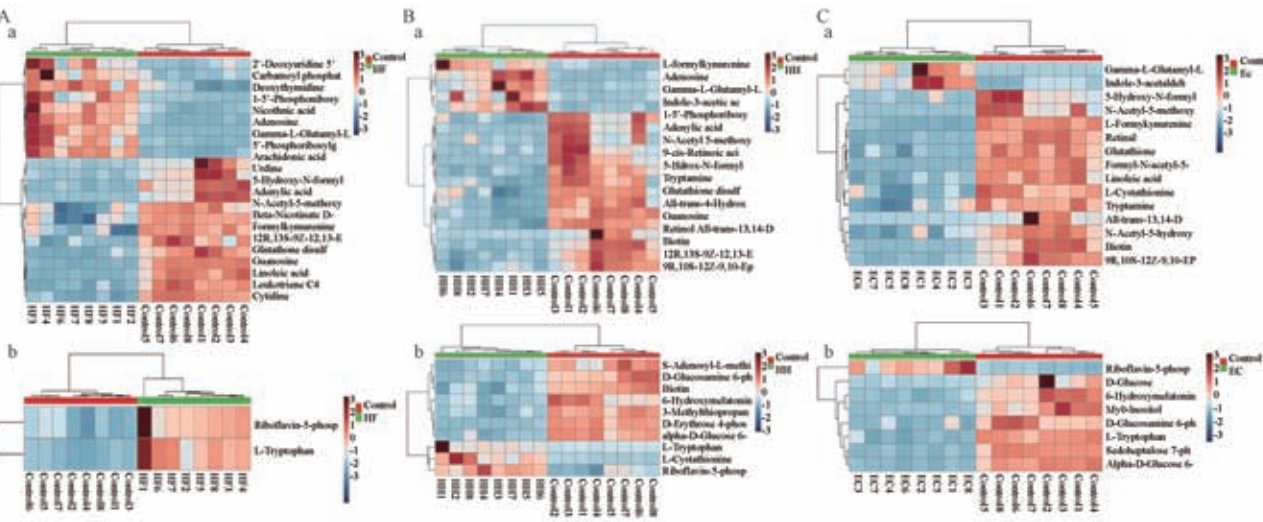


注:A:对照组与高糖高脂组。B:对照组与高温高湿组。C:对照组与攻毒组。a:正离子模式。b:负离子模式。

图 6 OPLS-DA 得分图

Note. A, Control and HF. B, Control and HH. C, Control and EC. a, ESI+ mode. b, ESI- mode.

Figure 6 The OPLS-DA scores



注:A:对照组与高糖高脂组。B:对照组与高温高湿组。C:对照组与攻毒组。a:正离子模式。b:负离子模式。

图 7 差异代谢物热图

Note. A, Control and HF. B, Control and HH. C, Control and EC. a, ESI+ mode. b, ESI- mode.

Figure 7 The heatmap of differential metabolites

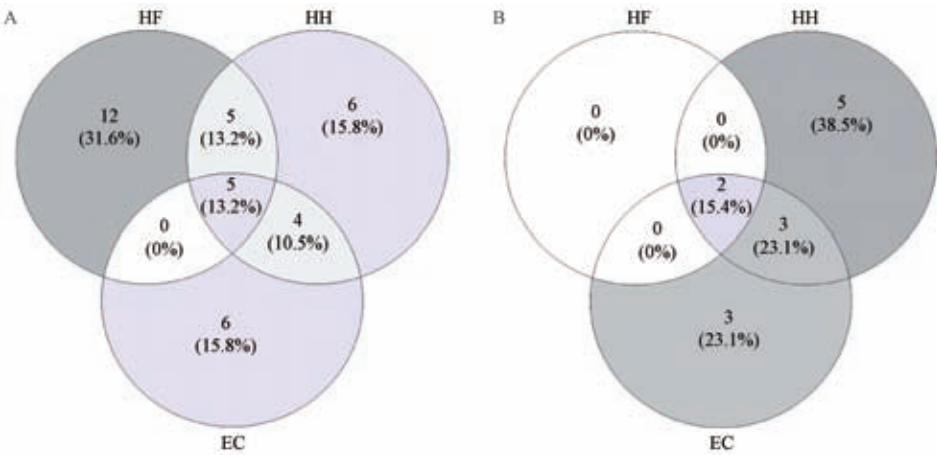
3 讨论

湿热泄泻病因复杂,有外感湿热致内生湿热、饮食不洁、喜食肥甘厚腻或外感疫疠等,病位多在大肠,

本实验模型大鼠回肠和结肠粘膜上皮完整性被破坏,表明湿热泄泻可造成肠道损伤,与中医理论一致。现代研究认为“外湿+内湿+生物致病因子”能理想的模拟湿热泄泻的复杂病因及病程^[9]。尿液比其他体液

易获取,蛋白质、脂质含量较少,基本包含机体各种代谢物及代谢过程,是较为理想的代谢组学研究样本^[10]。本实验各阶段模拟不同致病因素,应用尿液代谢组学技术,筛选出核黄素-5-磷酸、左旋甲酰犬尿

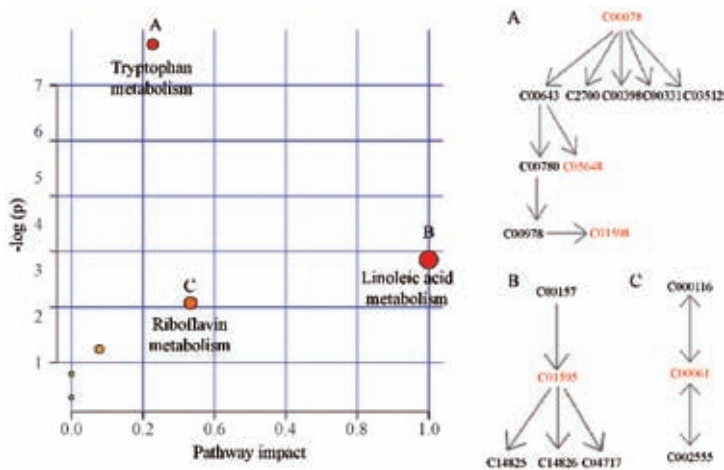
氨酸、5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋色氨酸、褪黑素、左旋谷氨酰基-左旋半胱氨酸和亚油酸等 7 个潜在代谢标志物,涉及核黄素代谢、色氨酸代谢、亚油酸代谢等代谢通路。



注:A:正离子模式。B:负离子模式。
图 8 差异代谢物 Venny 图

Note. A, ESI+ mode. B, ESI- mode.

Figure 8 The Venn diagram of differential metabolites



注:A:色氨酸代谢。B:亚油酸代谢。C:核黄素代谢。

图 9 相关代谢通路

Note. A, Tryptophan metabolism. B, Linoleic acid metabolism. C, Riboflavin metabolism.

Figure 9 The relevant metabolic pathways

表 2 DHD 尿液潜在生物标记物

Table 2 The potential urine biomarkers of dampness-heat diarrhea

质子数/电荷数	变异倍数	P 值	变量影响重要性因子	名称	编号
m/z	FC	P value	VIP	Description	KEGG.ID
270. 1079	0. 2409	0. 000474	1. 6382	5-Hydroxy-N-formylkynurenine	C05648
250. 0615	8. 6343	0. 000006	2. 3394	gamma-L-Glutamyl-L-cysteine	C00669
275. 0436	0. 4444	0. 015793	1. 0034	L-Formylkynurenine	C02700
271. 0828	0. 0528	0. 000020	2. 6819	N-Acetyl-5-methoxytryptamine	C01598
239. 0582	2. 7867	0. 000000	1. 1523	L-Tryptophan	C00078
303. 2295	0. 1279	0. 000040	2. 0437	Linoleic acid	C01595
455. 0952	2. 8492	0. 001579	1. 1831	Riboflavin-5-phosphate	C00061

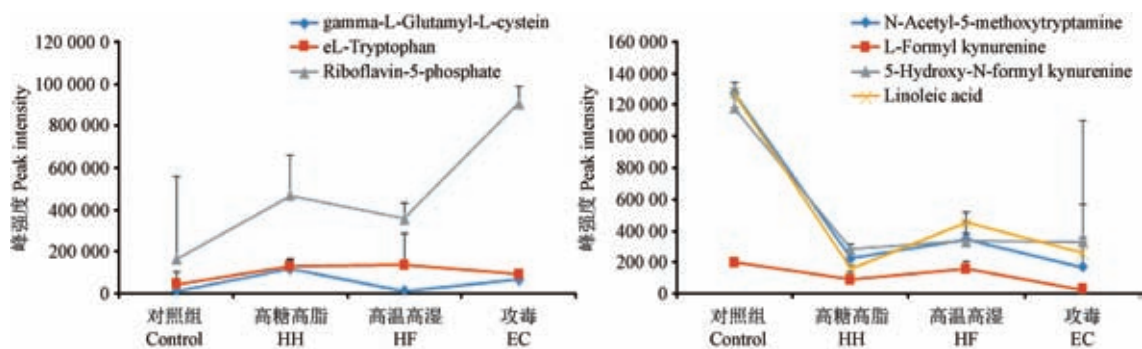


图 10 潜在代谢标志物含量变化

Figure 10 Changes in the content of potential metabolic markers

3.1 核黄素代谢

核黄素-5-磷酸是体内核黄素存在形式,其含量变化提示核黄素代谢改变。核黄素即 VB2,是 FMN 和 FAD 两种辅酶的主要活性基因,FMN 和 FAD 参与机体蛋白质、脂质、糖类和核酸代谢^[11]。核黄素代谢异常与多种疾病有关,如发热、炎症,研究发现核黄素-5-磷酸含量升高可能是机体发生强烈氧化代谢^[12-14]。本研究 DHD 大鼠尿液核黄素-5-磷酸含量在 HF、EC 阶段明显上升,表明高糖高脂与攻毒使大鼠发生强氧化代谢。

3.2 色氨酸代谢

左旋甲酰犬尿氨酸、5-羟基-N-甲酰甲酰犬尿氨酸、左旋色氨酸和褪黑素的含量变化反映色氨酸代谢改变。色氨酸是血清素前体,其代谢主要发生在炎症组织,研究表明抗原递呈细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和炎性细胞因子通过释放活化的免疫细胞,促进吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO) 的活化及表达加速色氨酸降解^[15-16]。色氨酸代谢与炎症性肠病密切相关,其在胃肠道代谢有三种主要途径^[17]。(1) 肠道微生物将色氨酸转化为几种分子,包括芳烃受体 (AhR) 的配体,AhR 信号传导被认为是屏障部位免疫反应的关键组成部分,通过作用于上皮细胞更新影响屏障完整性和免疫细胞增殖,对肠内稳态至关重要^[18]。(2) IDO 在免疫细胞和上皮细胞中的犬尿氨酸途径 (KP),通过肠道中 KP 进行色氨酸代谢由限速酶 IDO1 介导,产生犬尿氨酸 (Kyn) 和下游产物,犬尿氨酸代谢产物浓度随胃肠道增加,通过 G 蛋白偶联受体 GPR35 表现粘膜保护和免疫调节作用^[19-20]。(3) 色氨酸羟化酶 1 (TpH1) 在肠嗜铬细胞中的 5-羟色胺 (5-HT) 途径。5-HT 是影响肠道信号传导的重要信号分子,间接影响肠道蠕动、分泌、血管舒张和吸收^[21]。DHD 大鼠尿液色氨酸水平显

著降低,三种关键的色氨酸代谢物 (Kyn, 5-HT 和 5-HTP) 的水平显著增加,表明大鼠肠道蠕动、舒张和吸收均受到影响。

3.3 亚油酸代谢

亚油酸参与细胞生长、凋亡及免疫调控,有降胆固醇和降低心血管疾病与乳腺癌风险的作用^[22-23]。亚油酸可生成花生四烯酸,花生四烯酸是某些促炎类物质前体,如 PGE2、LTB4、TXA2,促炎类花生酸可促进 IL-6、TNF- α 、CRP 的生成^[24-25]。本试验 IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 四种促炎细胞因子均升高,结合血常规检测结果提示机体发生炎症反应。DHD 大鼠尿液中亚油酸含量明显降低,可能是由于机体炎症反应消耗能量降低亚油酸水平^[26]。尿液中亚油酸浓度降低意味着能量供需不平衡,与所致炎症不良结果相关。

DHD 可能是动物受外界致病因素影响,体内免疫细胞通过某些途径诱导炎症因子活化,造成体内色氨酸代谢、核黄素代谢与亚油酸代谢等代谢通路发生改变,进而使机体整个代谢系统发生紊乱,从而引起 DHD 的发病。

参 考 文 献 (References)

[1] 夏春霞,童佳.枫蓼肠胃康胶囊治疗湿热泄泻的临床观察 [J].吉林中医药,2010,30(2):138-139.
Xia CX, Tong J. Clinical observation of Fengqi Changweikang capsule in treating damp heat diarrhea [J].Jilin J Chin Med, 2010, 30(2): 138-139.

[2] 王涛.两种不同方法建立大鼠湿热泄泻模型的比较研究 [D].兰州:甘肃农业大学,2016.
Wang T. Competitive study of damp heat diarrhea rat model established with different methods [D]. Lanzhou: Gansu Agr Univ, 2016.

[3] 李文龙,彭芝配,张金慧,等.建立湿热泄泻大鼠模型初探 [J].中国医药指南,2012,10(11):108-109.
Li WL, Peng ZP, Zhang JH, et al. Establishment of a rat model

- of damp heat and diarrhea [J]. Guide Chin Med, 2012, 10 (11): 108-109.
- [4] 刘玲, 王晓燕, 李晶. 清肠止泻煎剂结肠滴注治疗小儿湿热泄泻临床观察 [J]. 中医临床研究 2016, 8(19): 86-88.
- Liu L, Wang XY, Li J. Clinical observation on treating infantile diarrhea of the Shi're type with the Qingchang Zhixie decoction [J]. Clin J Chin Med, 2016, 8(19): 86-88.
- [5] 张芳, 王会丽, 王莉. 黄连解毒汤配合贴敷治疗湿热泄泻 60 例 [J]. 江西中医药, 2001, 32(6): 27.
- Zhang F, Wang HL, Wang L. Treating 60 cases of damp-heat and diarrhea with Huanglian Jiedu Decoction and Adhesive [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2001, 32(6): 27.
- [6] 邹忠杰, 谢媛媛, 龚梦鹃, 等. 巴戟天补肾阳作用的尿液代谢组学研究 [J]. 药科学报, 2013, 48(11): 1733-1737.
- Zou ZJ, Xie YY, Gong MJ, et al. Urine metabolomic study of intervention effects of *Morinda officinalis* How. on 'Kidney-yang deficiency syndrome [J]. Acta Pharm Sin, 2013, 48 (11): 1733-1737.
- [7] 张晓松, 马琪, 文艳巧, 等. 苦草治疗大肠湿热证大鼠血清代谢组学研究 [J]. 药科学报, 2018, 53(1): 111-120.
- Zhang XS, Ma Q, Wen YQ, et al. Sophora alopecuroides ameliorates large intestine dampness-heat syndrome in rats by serum metabolomic approach based on UHPLC-Q/TOF-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(1): 111-120.
- [8] Yao WL, Yang CX, Wen YQ, et al. Treatment effects and mechanisms of Yujin Powder on rat model of large intestine dampness-heat syndrome [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 202: 265-280.
- [9] 李文龙. 秦香止泻方对湿热泄泻的临床疗效观察及作用机制研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- Li WL. Study on clinical curative effects and mechanism of damp-heat diarrhea with QinXiang Anti-diarrhea [D]. Changsha: Hunan Univ Chin Med, 2011.
- [10] Emwas AH, Luchinat C, Turano P, et al. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review [J]. Metabolomics, 2015, 11(4): 872-894.
- [11] 仪宏, 朱文众, 张华峰. 核黄素的产业现状及其对策 [J]. 中国食品添加剂, 2003, 14(3): 10-12, 20.
- Yi H, Zhu WZ, Zhang HF. Industrial situations on riboflavin production and strategy [J]. Chin Food Addit, 2003, 14(3): 10-12, 20.
- [12] Guo XY, Guo MX, Li Q, et al. Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e10001.
- [13] Olex AL, Turkett WH, Fetrow JS, et al. Integration of gene expression data with network-based analysis to identify signaling and metabolic pathways regulated during the development of osteoarthritis [J]. Gene, 2014, 542(1): 38-45.
- [14] Jia X, Hildrum KI, Westad F, et al. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics [J]. J Proteome Res, 2006, 5(7): 1763-1769.
- [15] Harden JL, Lewis SM, Lish SR, et al. The tryptophan metabolism enzyme L-kynureninase is a novel inflammatory factor in psoriasis and other inflammatory diseases [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(6): 1830-1840.
- [16] Zou MH. Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation and immune activation [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2015, 20(7): 1116-1143.
- [17] Qu C, Yuan ZW, Yu XT, et al. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism [J]. Pharmacol Res, 2017, 121: 70-82.
- [18] Zelante T, Iannitti R, Cunha C, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 [J]. Immunity, 2013, 39 (2): 372-385.
- [19] Clarke G, Grenham S, Scully P, et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner [J]. Mol Psychiatry, 2012, 18(6): 666-673.
- [20] Guo J, Xu K, Liu HG, et al. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 13.
- [21] Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(6): 716-724.
- [22] Jandacek RJ. Linoleic acid: A nutritional quandary [J]. Healthcare (Basel), 2017, 5(2): E25.
- [23] 张春娥, 张惠, 刘楚怡, 等. 亚油酸的研究进展 [J]. 粮油加工, 2010, 41(5): 18-21.
- Zhang CE, Zhang H, Liu CY, et al. Research progress of linoleic acid [J]. Cereals Oils Process, 2010, 41(5): 18-21.
- [24] Vangaveti VN, Holger J, Lee KR, et al. Hydroxyoctadecadienoic acids: Oxidised derivatives of linoleic acid and their role in inflammation associated with metabolic syndrome and cancer [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 785: 70-76.
- [25] Fritsche KL. Linoleic acid, vegetable oils & inflammation [J]. Mo Med, 2014, 111(1): 41-43.
- [26] Mathers L, Bailey MJ. Enzyme deletions and essential fatty acid metabolism in cultured cells [J]. J Biol Chem, 1975, 250(3): 1152-1153.

郭军雄,汪斌,马丽,等. p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27 (6): 709–715.

Guo JX, Wang B, Ma L, et al. Immunoregulatory effects of the p38 MAPK-signaling pathway in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 709–715.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.004

p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用

郭军雄^{1*},汪斌¹,马丽¹,康万荣²,许小敏¹,徐生刚¹

(1. 河西学院医学院,河西学院丝绸之路中医药研究中心,河西学院中西医结合研究所,甘肃 张掖 734000;
2. 甘肃中医药大学,兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨 p38 MAPK 信号在腹泻型肠易激综合征大鼠中的免疫调控作用。**方法** 将 40 只 SPF 级 Wistar 大鼠(雌雄各半),随机分为 D-IBS 模型 I (造模 7 d)组、II (造模 14 d)、III (造模 21 d)组及空白对照组,每组 10 只。模型组采用慢性束缚联合番泻叶灌胃法建模,空白对照组灌服同等体积的纯净水。D-IBS 大鼠分别于建模第 7 天、第 14 天和第 21 天剖杀,空白对照组于第 21 天剖杀。心脏采血,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量;剖取结肠组织,HE 染色观察大鼠结肠组织形态学,免疫组化法测大鼠结肠组织中 p38 MAPK 的蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,模型组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量和结肠 p38 MAPK 蛋白表达阳性率增高($P<0.05$, $P<0.01$),且 p38 MAPK 的表达与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平呈正相关。**结论** 慢性束缚联合番泻叶灌胃法复建的 D-IBS 大鼠模型,可能存在通过激活 p38 MAPK 信号通路,可上调 p38 MAPK 的表达,促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的释放,诱发肠黏膜低度炎症反应。

【关键词】 肠易激综合征;腹泻型;p38 MAPK 信号通路;白细胞介素 1 β ;白细胞介素 6;肿瘤坏死因子 α ;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0709-07

Immunoregulatory effects of the p38 MAPK-signaling pathway in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

GUO Junxiong^{1*}, WANG Bin¹, MA Li¹, KANG Wanrong², XU Xiaomin¹, XU Shenggang¹

(1. Medicine College of Hexi University, Silk Road Chinese Medicine Research Center of Hexi University, Institute of Integrated Chinese and Western Medicine of Hexi University, Zhangye Gansu 734000, China.
2. Gansu Univesity of Chinese Medicine, Lanzhou 730000)
Corresponding author: GUO Junxiong. E-mail: gjxiong1124@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the immunoregulatory effect of P38 mitogen activated protease (p38 MAPK) signals in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS). **Methods** Forty SPF Wistar rats (half male and half female) were randomly divided into a control group, and D-IBS model I (7 d), II (14 d) and III (21 d) groups, with 10 rats in each group. Rats in the model groups were developed through chronic restraint and senna decoction gavage, whereas the control rats were gavaged with the same volume of pure water. The D-IBS rates were killed on the seventh, fourteenth and twenty-first days, respectively. Rats in the control group were killed on the twenty-first day. The

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660759)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81660759).

[通信作者] 郭军雄(1977—),男,副教授,医学硕士,研究方向:中医药防治肠道疾病的基础及临床研究。Email: gjxiong1124@126.com

serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were measured by ELISA. The pathological changes in colon tissue were observed with hematoxylin and eosin (H&E) staining, and the p38 MAPK protein expression in the colon tissue was assessed with immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in serum, and the p38 MAPK protein expression in colon tissue of the model groups were significantly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of p38 MAPK was positively correlated with IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Conclusions** The D-IBS rat model, developed through chronic restraint and senna decoction gavage, may have upregulation of the expression of p38 MAPK, promoting the release of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and inducing mild inflammation of the intestinal mucosa by activating the p38 MAPK signal pathway.

【Keywords】 irritable bowel syndrome; diarrhea-predominant; p38 MAPK signaling pathway; IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; rats

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适并常伴排便习惯改变为特征的慢性肠功能紊乱性疾病,胃肠动力和内脏感知异常是 IBS 发病的主要病理生理学特征,迄今具体发病机制尚无完全定论^[1-2]。近年来,随着生活节奏增快和压力增大,发病率有上升的趋势^[3]。而免疫系统作为 D-IBS 精神-肠道因素互动的关键纽带,其平衡对 D-IBS 内脏敏感性有重要影响^[4]。前期研究表明^[5]:慢性束缚(S)联合番泻叶(F)灌服法复建的大鼠 Th1 促炎因子 IL-12 的含量升高,Th2 抑炎因子 IL-10 的含量降低,可能存在 Th1/Th2 平衡漂移。p38 MAPK 是 MAPK 家族中最重要的成员之一,其作为细胞信号传递的交汇点,能被应激、氧化反应以及炎性细胞因子等多种因素所激活。有研究表明^[6-7]:p38 MAPK 信号通路系统在疼痛感知、胃肠动力紊乱和免疫炎症异常激活中均有重要作用。本研究旨在通过观察 D-IBS 模型大鼠结肠组织中 p38 MAPK 蛋白的表达和血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的变化及其相关性,探讨 p38 MAPK 通路在 S+F 灌服法诱发的 D-IBS“肝郁脾虚证”大鼠模型中的免疫作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 40 只(雌雄各半),8~10 周龄,体重(180 $\pm$ 20)g,购自甘肃中医药大学科研实验中心【SCXK(甘)2015-0002】。饲养于甘肃中医药大学科研实验动物中心 SPF 级环境中【SYXK(甘)2015-0005】。实验动物所有操作取得了甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批号:

2016-025)。

1.1.2 主要试剂和仪器

大鼠 IL-1 β ELISA 检测试剂盒(货号:MM-0047R1)、大鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒(货号:MM-0190R1)、大鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒(货号:MM-0180R1),均购自江苏酶免实业有限公司。p38MAPK 抗体试剂盒(批号:40100),购自 GeneTex 公司;SP-9001 生物素标记山羊抗兔 IgG 免疫组化检测试剂盒(批号:K186613C),DNA 显色试剂盒(批号:K186916P)。以上试剂盒均购自北京中杉金桥公司。番泻叶中药饮片,由康美药业股份有限公司(批号:170302511)。

酶标仪(iMark, Bio-Rad, 美国);台式高速离心机(18R, Dynamica Velocity, 德国);显微镜(BX43, Olympus, 日本);自动真空组织脱水机(ASP200S, Leica, 德国);图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 复建 D-IBS“肝郁脾虚证”大鼠模型

实验时先将番泻叶水浸泡 5 h,煎煮 8 min、纱布两层过滤取上清液,常规浓缩,最终浓度相当于含生药 0.4 g/mL 药液,待用。

40 只雌雄各半 SPF 级 Wistar 大鼠称重后,随机分为 D-IBS 模型 I(造模 7 d)、II(造模 14 d)、III(造模 21 d)组及空白对照组,每组 10 只。参考文献方法^[8-9],采用慢性束缚应激加番泻叶水煎剂灌服二因素法复建 D-IBS“肝郁脾虚证”大鼠模型。模型各组大鼠实验前 10 h 禁食不禁水,予以番泻叶水煎剂 4 g/(kg·d)灌服,每日 1 次,灌服番泻叶水煎剂后用宽透明胶带束缚大鼠肩部及前肢和胸腹部,使大鼠无法用前肢抓搔头面,每天定时约 1 h,分别连续建

模 7、14、21 d。空白对照组大鼠予等体积蒸馏水灌服 21 d。

1.2.2 血清/结肠组织的处理

分别于建模结束后第 2 天,大鼠称重麻醉,仰卧并铺巾,沿大鼠腋窝下皱襞做一垂直于左腋前线与前正中线的连线,在连线中点处行心脏采血约 5 mL,室温静置 20 min,3000 r/min 离心 15 min,取上层血清,-80℃ 保存;剖腹截取距肛门 5~8 cm 处结肠组织,生理盐水洗净肠内容物,4%多聚甲醛固定,常规切片染色,并行免疫组化检测。空白对照组和模型 III 组同时取材。

1.2.3 ELISA 法检测大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平

取原倍标准品稀释、加样、37℃ 温育 30 min、洗板 5 次,加入酶标试剂,37℃ 温育 30 min,洗板 5 次,加入显色液,37℃ 显色 10 min,加入终止液,15 min 内读 OD 值。

1.2.4 免疫组化法观察大鼠结肠 p38 MAPK 蛋白表达

常规切片,二甲苯脱蜡,10 min $\times$ 2 次,(梯度乙醇脱水)而后依次置于无水乙醇 I、II、95%、80%酒精中各 5 min,置于 H₂O₂ 室温 20 min,以灭活内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 3 min $\times$ 3 次,枸橼酸钠高压锅热修复后冷却,PBS 洗 3 min $\times$ 3 次。滴加一抗 p38 MAPK (1:100) 于湿盒中 4℃ 过夜,37℃ 复温 1 h;PBS 洗 3 min $\times$ 3 次后加二抗,室温 30 min;PBS 洗 3 min $\times$ 3 次。滴加 SP(链霉亲和素-过氧化物酶),37℃ 孵育 20 min;PBS 洗 3 min $\times$ 3 次,滴加 DAB 显色剂;自来水冲洗、苏木素复染、盐酸酒精分化、脱水、透明、中性树胶封片。每组选取 8 张切片,在显微镜高倍视野(10 $\times$ 20 倍)下每张切片选取 6 个视野,采用 Imagine-Pro-Plus 分析系统进行图像采集和定量分析,计算所选择区域内的平均吸光度,平均吸光度=累积吸光度/有效统计区域面积,并取平均值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理和分析,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析检验,组间整体均数比较采用方差分析,进一步多重比较采用 LSD 法,方差不齐时,采用

Dennett's T3 法;相关性分析用单样本 K-S 检验数据分布的正态性,如符合双变量正态分布,则选用积矩相关系数(Pearson)相关分析;反之则采用秩和检验法,选用等级相关系数(Spearman)相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠黏膜组织病理学观察

空白对照组结肠黏膜上皮较完整,细胞排列规整,未见肠黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体亦无萎缩,黏膜下层未见明显改变。模型 I、II 组黏膜上皮细胞部分坏死脱落,固有层腺体萎缩,可见血管充血,间质水肿,有少量炎性细胞浸润;模型 III 组黏膜上皮细胞坏死脱落,固有层腺体萎缩减少,黏膜下层结构疏松水肿充血,有较多炎性细胞浸润,见图 1。

2.2 各组大鼠结肠组织 p38 MAPK 免疫组化染色

显微镜下观察结肠中 p38 MAPK 蛋白表达,呈现棕黄色者为阳性表达,无着色则为阴性表达。研究表明,p38 MAPK 蛋白在肌层、黏膜层、黏膜下层均有不同程度的表达。与空白对照组相比,模型各组大鼠结肠 p38 MAPK 蛋白表达 IOD 值显著升高($P<0.05$),尤以造模 14 d 和 21 d 最为显著($P<0.01$),见图 2 和图 3。

2.3 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的检测结果

与空白对照组比较,模型 I 组、模型 II 组、模型 III 组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),见表 1,图 4。

2.4 各组大鼠 p38 MAPK 与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 相关性分析

Pearson 相关系数均为正值,提示 p38 MAPK 与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 呈正相关,尤以 D-IBS 大鼠模型 II、III 组最为显著($P<0.05$),见表 2,图 5。

3 讨论

IBS 临床症状多样,病因及发病机制复杂。但应激在 IBS 发病发展中的作用越来越受到人们的重视。应激可通过塑造内脏高敏感性、促进肠道低度炎症等参与 IBS 的发生与发展^[10]。有文献证实^[11],

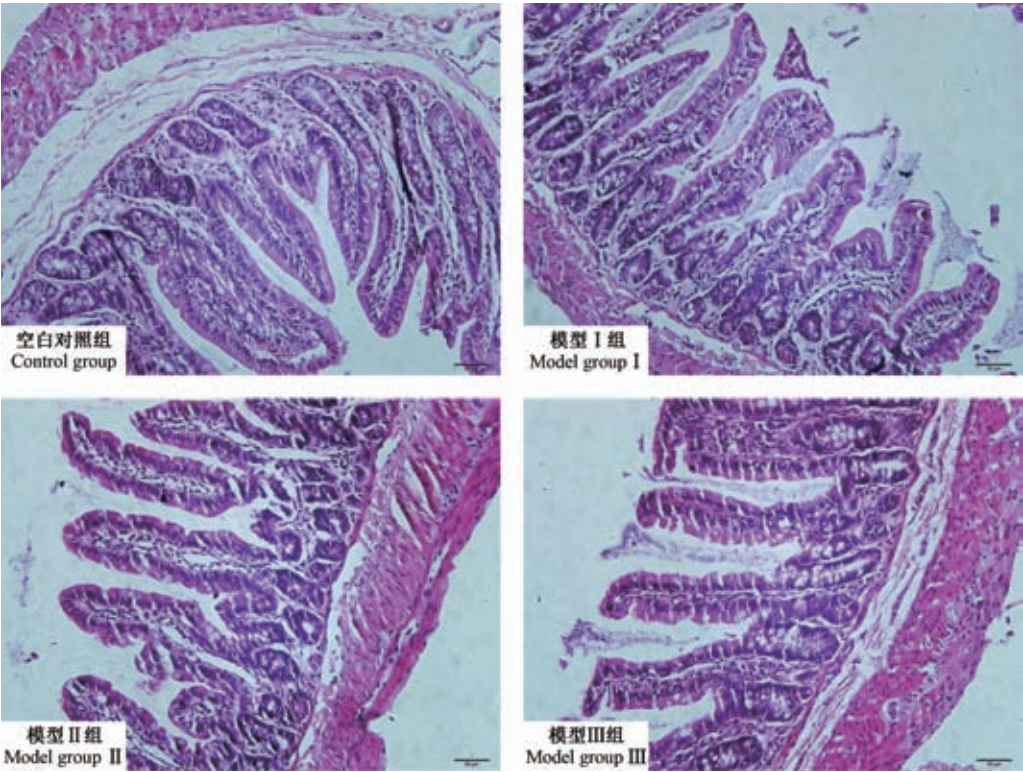


图 1 各组大鼠结肠组织病理学变化(HE 染色,标尺=50 μm)

Figure 1 Pathological changes of colon tissue in the rats of each group (HE staining, Bar=50 μm)

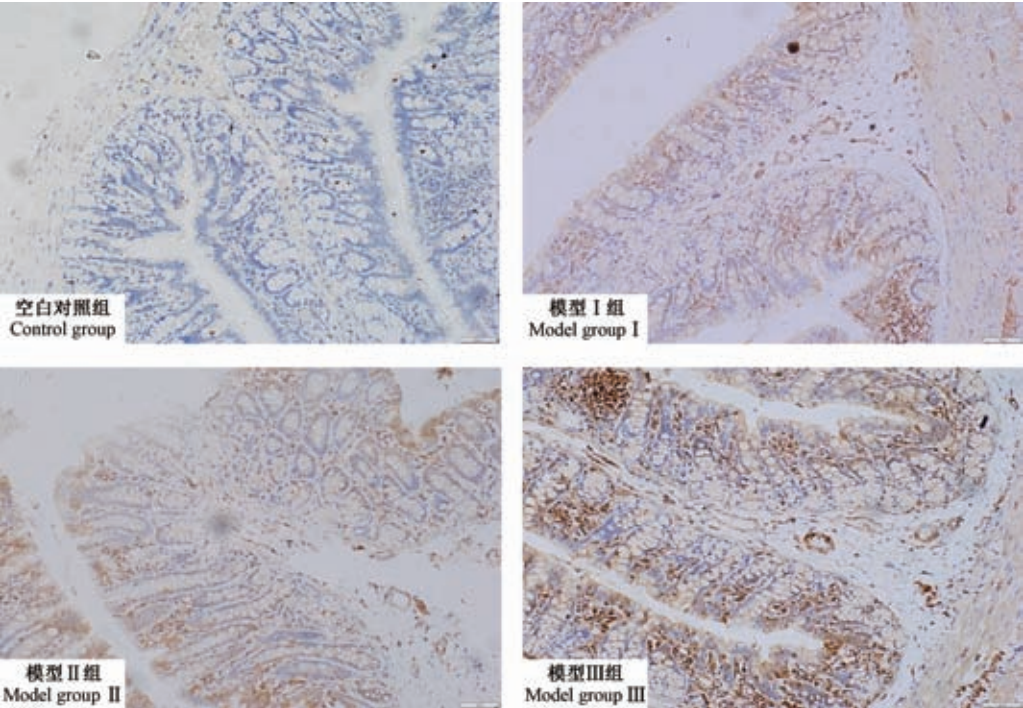


图 2 各组大鼠结肠组织中 p38 MAPK 的表达(免疫组化染色,标尺=50 μm)

Figure 2 p38 MAPK expression in colon tissue of the rats in each group (Immunohistochemical staining, Bar=50 μm)

表 1 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of serum expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α in the rats of each group($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	例数 n	IL-1β (ng/L)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (ng/L)
空白对照组 Control group	10	126.02±14.07	246.77±21.71	210.23±26.42
模型 I 组 Model group I	10	147.12±16.46 [*]	288.43±28.90 [*]	375.51±46.44 [*]
模型 II 组 Model group II	10	164.78±19.28 [*]	322.75±36.62 ^{★△}	459.31±52.64 ^{★▲}
模型 III 组 Model group III	9 [#]	171.94±22.69 ^{★△}	342.11±34.81 ^{★▲}	475.05±65.42 ^{★▲}

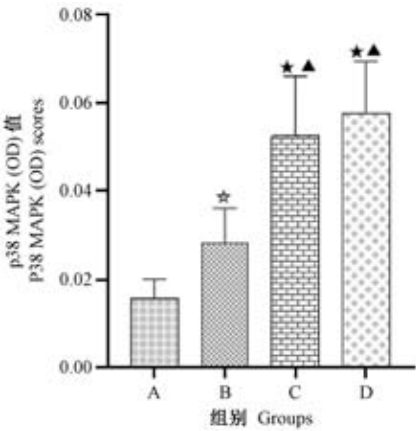
注:与空白对照组对比, ^{*} $P<0.05$, ^{*} $P<0.01$;与模型 I 组对比, [△] $P<0.05$, [▲] $P<0.01$; [#]造模第 17 天大鼠死亡 1 只。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{*} $P<0.01$. Compared with the model group I, [△] $P<0.05$, [▲] $P<0.01$. [#]One rat died on the 17th day.

表 2 各组大鼠 p38 MAPK 与 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的相关性分析

Table 2 Correlation analysis between p38 MAPK and IL-1β, IL-6, TNF-α in the rats

组 别 Groups	p38 MAPK		
	IL-1β	IL-6	TNF-α
空白对照组 Control group	0.178	0.236	0.257
模型 I 组 Model group I	0.219	0.652	0.734 [*]
模型 II 组 Model group II	0.731 [*]	0.715 [*]	0.780 [*]
模型 III 组 Model group III	0.779 [*]	0.772 [*]	0.799 [*]

注:与同组 p38 MAPK 的相关性, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Correlation with p38 MAPK in the same group, ^{*} $P<0.05$.



注:A:空白对照组;B:模型 I 组;C:模型 II 组;D:模型 III 组。
与空白对照组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{*} $P<0.01$;与模型 I 组相比, [△] $P<0.05$, [▲] $P<0.01$ 。下同。

图 3 各组大鼠结肠组织中 p38 MAPK 表达 OD 值

Note. A, Control group; B, Model group I; C, Model group II; D, Model group III. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$, ^{*} $P<0.01$. Compared with the model group I, [△] $P<0.05$, [▲] $P<0.01$. The same in the following figures.

Figure 3 OD value of p38 MAPK expression in colon tissues of the rats in each group

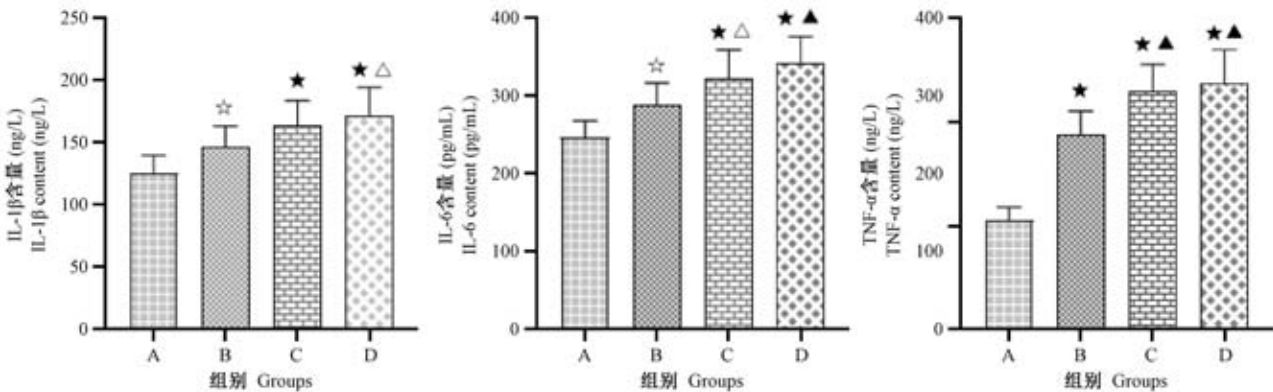


图 4 各组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量

Figure 4 Contents of IL-1β, IL-6 and TNF-α expression in the serum of each group

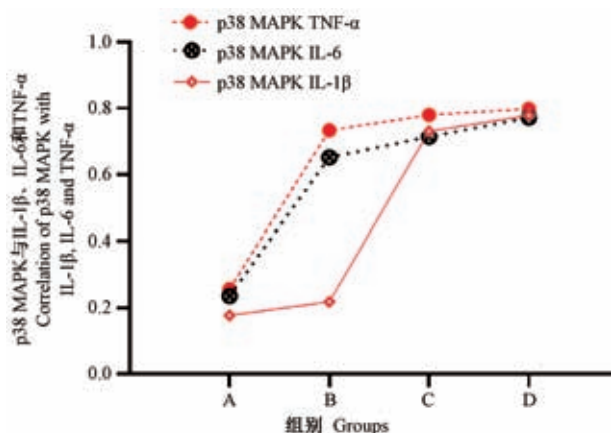


图5 p38 MAPK 与 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的相关性

Figure 5 Correlation of p38 MAPK with IL-1β, IL-6 and TNF-α

物、紫外线照射、细胞外高渗等刺激均可激活 p38 MAPK,所有被激活的 p38 MAPK 成员都具有苏氨酸-酪氨酸-酪氨酸(Thr-Gly-Tyr, TGY) 双位点磷酸化模块,即 p38 MAPK 需在 Thr180 和酪氨酸 182 两个位点经过两步磷酸化实现激活。活化后 p38 MAPK 调控下游多种酶及转录因子的基因表达活性,进而调节细胞功能,释放炎症因子,而炎症因子又对细胞形成新的刺激,导致 MAPK 信号通路的再次激活,从而形成正反馈调节,最终导致炎症因子的过量表达。研究表明^[13-16],用细菌内毒素脂多糖刺激大鼠巨噬细胞后,可致巨噬细胞内 p38 MAPK 磷酸化,而抑制此阶段的 p38 MAPK 磷酸化可减轻甚至完全阻断巨噬细胞内 TNF-α 的产生,说明炎症反应中 TNF-α 的产生与 p38 MAPK 激活密切相关,而且 p38 MAPK 的激活除能促进单核巨噬细胞产生 TNF-α、IL-1、IL-6 等炎症因子,影响炎症进程。所以,在调控细胞因子产生的机制中,p38 MAPK 起着类似“开关”的作用。IL-1β 是由激活的单核巨噬细胞和上皮细胞分泌产生的炎症介质,可引发一系列的肠道炎症和黏膜损伤。IL-1β 还能增加肠上皮细胞紧密结合部的通透性,抑制钠-钾-ATP 酶活性,进而导致水、钠的吸收障碍,产生腹泻及肠道运动功能紊乱^[17]。IL-6 是一种多功能复杂的细胞因子,在炎症过程中,IL-6 可以促进中性粒细胞和单核细胞在炎症及感染部位的聚集,防止组织的过度损伤,IL-6 还可通过神经内分泌调节作用于肠道神经元和平滑肌细胞,导致胃肠道动力系统的变化,引起肠道运动和感知的改变^[18-19]。TNF-α 具有广谱生理和病理效应的炎症细胞因子,被认为是肠黏膜屏障损伤

的重要启动因子^[20]。已有研究阐明^[21-22],TNF-α 一方面可改变肠道组织紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的表达和分布、重组肌动蛋白骨架;另一方面可通过激活 NF-κB,诱导产生多种炎症因子如 IL-1β、IL-6 等,进而加重对肠黏膜屏障的损伤。

制备符合人类 D-IBS 发病机制的动物模型是研究 D-IBS 发病机制、病理生理和探索新型治疗策略的工作基础,而现有的文献报道的造模方法中,新生母子分离联合慢性束缚加番泻叶灌胃模型耗时长,死亡率高,乙酸灌肠合并束缚模型肠道黏膜损伤,基因模型技术高,费用贵,且不易获得。唯有番泻叶联合传统束缚应激法能更好得模拟人的 D-IBS 发病,番泻叶提取物灌服小鼠后无可见的光镜变化,慢性束缚应激过程为非损伤刺激且更接近人的心理应激^[5,23],符合 D-IBS 的发病机制。

本研究结果显示,以番泻叶联合传统束缚应激法复建的 D-IBS“肝郁脾虚证”大鼠模型结肠组织中 p38 MAPK 蛋白表达和血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 的显著含量升高($P<0.05$, $P<0.01$),尤以模型 II、III 组最为显著($P<0.01$),表明番泻叶灌胃联合传统束缚应激法复建 D-IBS“肝郁脾虚证”大鼠模型存在一定的时效关系。HE 染色表明各组大鼠结肠组织黏膜未见糜烂或溃疡,结肠组织形态学无明显病理变化,符合 D-IBS 属于功能性肠紊乱性疾病的特征。本研究进一步通过相关性分析发现,D-IBS 大鼠中 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量与 p38 MAPK 的表达呈正相关性,且以模型 II、III 组尤为显著($P<0.05$),从一定程度上说明这些免疫指标异常与 p38 MAPK 通路有关,这将对探索 D-IBS 发生的作用机制具有一定的意义。然由于实验条件所限,本研究仅选择了免疫组化测定结肠组织中 p38 MAPK 的蛋白阳性表达,未能结合 real-time PCR 和 Western blot 方法对 p38 MAPK 的基因和蛋白作进一步细致评估,这是本研究的局限之处,p38 MAPK 从哪一个上游靶点,促进 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的释放都尚待进一步研究探索。

参 考 文 献(References)

- [1] 张声生. 中医临床诊疗指南释义·脾胃病分册 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015.
Zhang SS. Interpretation of Clinical Diagnosis and Treatment Guidelines of Traditional Chinese Medicine, Fascicle: Spleen and Stomach Disease [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [2] 舒圆月,肖小芹,邓桂明,等. 腹泻型肠易激综合征肝郁脾虚

- 病证结合动物模型研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 134-136.
- Shu YY, Xiao XQ, Deng GM, et al. Research progress in animal models of IBS-D disease combined with liver stagnation and spleen deficiency [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2017, 24(6): 134-136.
- [3] 郭军雄, 马丽, 许小敏. 风药论治腹泻型肠易激综合征探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(2): 166-167+190.
- Guo JX, Ma L, Xu XM. Exploration of diarrhea predominant irritable bowel syndrome with wind drugs [J]. Chin J Basic Chin Tradit Med, 2019, 25(2): 166-167+190.
- [4] 柴玉娜, 唐洪梅, 黄育生, 等. 腹泻型肠易激综合征大鼠 SCF/C-kit 信号的变化及其与免疫功能的关系 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(1): 68-72.
- Chai YN, Tang HM, Huang YS, et al. Abnormal SCF-C-kit system in IBS-D rat and the correlation between SCF-C-kit system and immune function [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(1): 68-72.
- [5] 郭军雄, 许小敏, 刘雨娟, 等. 腹泻型肠易激综合征“肝郁脾虚证”病证结合大鼠模型的动态评估 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 2590-2592.
- Guo JX, Xu XM, Liu YJ, et al. Dynamic assessing diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats with liver stagnation and spleen deficiency syndrome [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2018, 36(11): 2590-2592.
- [6] 张涛, 杨承祥, 王汉兵. p38 MAPK 信号通路 with 疼痛的关系 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18(3): 177-180.
- Zhang T, Yang CX, Wang HB. p38 MAPK signaling pathway and pain [J]. Chin J Pain Med, 2012, 18(3): 177-180.
- [7] 伍宁波, 孙宏翔, 杨晓东, 等. MAPK 信号通路 with 肠道疾病靶向应用前景 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(3): 299-306.
- Wu NB, Sun HX, Yang XD, et al. Application prospects of MAPK signaling pathway and intestinal disease targeting [J]. Chin J Immun, 2016, 32(3): 299-306.
- [8] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, et al. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology, 1988, 94(3): 611-621.
- [9] 唐洪梅, 廖小红, 房财富, 等. 肝郁脾虚型大鼠肠易激综合征模型的建立及评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 138-140.
- Tang HM, Liao XH, Fang CF, et al. The establish and evaluating of irritable bowel syndrome of hepatic stagnation and spleen deficiency type [J]. Chin J Exp Tradit Med Forum, 2012, 18(6): 138-140.
- [10] 刘通, 左秀丽. 应激与肠易激综合征相关性研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(4): 383-386.
- Liu T, Zuo XL. Relationship between stress and irritable bowel syndrome [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2019, 28(4): 383-386.
- [11] 李珊, 方秀才. 肠道炎症在肠易激综合征发病中的作用 [J]. 中华消化杂志, 2010, 30(10): 788-790.
- Li S, Fang XC. The role of intestinal inflammation in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. Chin J Digest, 2010, 30(10): 788-790.
- [12] 胡彩虹, 栾兆双, 傅振宇. p38 MAPK 在断奶应激致仔猪肠黏膜屏障损伤中的作用 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33(2): 302-306.
- Hu CH, Luan ZS, Fu ZN, et al. Role of p38 MAPK in damage of intestinal barrier induced by weaning in piglets [J]. Chin J Vet Sci, 2013, 33(2): 302-306.
- [13] Cheng C, Qin Y, Shao X, et al. Induction of TNF-alpha by LPS in Schwann cell is regulated by MAPK activation signals [J]. Cell Mol Neurobiol, 2007, 27(7): 909-921.
- [14] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(8): 537-549.
- [15] Ananieva O, Darragh J, Johansen C, et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling [J]. Nat Immunol, 2008, 9(9): 1028-1036.
- [16] 韦斌丽, 唐宏亮, 王雄将, 等. 推拿对神经病理性疼痛大鼠脊髓磷酸化 P38MAPK 表达及炎症因子 IL-1 β 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5): 1245-1248.
- Wei BL, Tang HL, Wang XJ, et al. Effects of massage on phosphorylated P38 MAPK expression and inflammatory factor IL-1beta in spinal cord of rats with neuropathic pain [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(5): 1245-1248.

[收稿日期] 2019-04-12

朱华,李卓,苏磊,等. 冠心病源肠道菌群小鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 716-724.

Zhu H, Li Z, Su L, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 716-724.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.005

冠心病源肠道菌群小鼠模型的建立及评价

朱华¹, 李卓¹, 苏磊¹, 郭亚茜¹, 杜晓鹏¹, 袁建松^{2*}, 秦川^{1*}

(1. 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; 2. 中国医学科学院阜外心血管医院, 北京 100037)

【摘要】 目的 通过粪菌移植方法建立冠心病源肠道菌群(human flora-associated, HFA)小鼠模型并对模型进行评价。**方法** 28只无菌雌性C57BL/6J小鼠分为对照(CON)组和模型(CAD)组,分别接种健康志愿者和冠心病患者新鲜粪便悬液,移植后6周和10周每组安乐7只动物,取粪便、血液、主动脉进行16S rDNA、血脂、细胞因子和组织病理学检查。**结果** 从第5周开始CAD组动物体重增长加快($P<0.05$)。 α -多样性分析,CAD组的Simpson指数在两个时间点的数值均升高($P<0.05, P<0.01$),Shannon指数($P<0.05, P<0.01$)、ACE($P<0.05$)和Chao1指数均降低($P<0.05$)。CON组reads主要分布在厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)。造模6周时,CAD组厚壁菌门、软壁菌门丰度降低($P<0.05$),拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$);造模10周时,CAD组厚壁菌门丰度降低($P<0.01$),拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$)。 β -多样性分析,CAD组、CON组的肠型分布在不同区域,同一组的不同阶段则分布在相同区域。CAD组与CON组在微生物物种构成方面存在显著性差异($P<0.05$)。CAD组小鼠在建模6周和10周时血液中甘油三酯(TG)($P<0.05, P<0.01$),胆固醇(TC)($P<0.05$),乳酸脱氢酶(LDH)($P<0.01, P<0.0001$)和磷酸激酶(CK)($P<0.01, P<0.05$)值均升高。低密度脂蛋白(LDL-C)在建模6周时升高($P<0.05$)。细胞因子检测,IL-6在建模6周时浓度升高($P<0.05$),10周时减低($P<0.00001$);IL-10在建模10周时浓度降低($P<0.05$);IL-2、IL-4、IL-5、IL-1 β 在建模10周时浓度升高($P<0.0001, P<0.05, P<0.0001, P<0.01$)。IL-12p70、TNF- α 、INF- γ 在两个时间点差异无统计学意义。CAD组及CON组小鼠的冠状动脉苏木素-伊红(H.E)染色在建模后两个时间点均未见泡沫细胞形成等动脉粥样硬化改变。**结论** 本研究利用粪菌移植方法获得冠心病源菌群小鼠,肠道菌群结构丰度、体重、血脂、细胞因子含量等指标出现了与临床类似的改变。

【关键词】 冠心病;肠道菌群;无菌小鼠;菌群人源化动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0716-09

Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease

ZHU Hua¹, LI Zhuo¹, SU Lei¹, GUO Yaxi¹, DU Xiaopeng¹, YUAN Jiansong^{2*}, QIN Chuan^{1*}

(1. 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.

2. Fuwai Hospital, Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100037)

Corresponding author: YUAN Jiansong. E-mail: yuanjiansong@fuwaihospital.org; QIN Chuan. E-mail: chuanqin@vip.sina.com

【基金项目】 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science (CIFMS, 2017-12M-2-005).

【作者简介】 朱华,主任技师,研究方向:疾病与肠道微生态。Email: zhuhua0226@vip.sina.com;

【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: chuanqin@vip.sina.com。

袁建松,副主任医师,硕士生导师。研究方向:冠心病介入治疗。Email: yuanjiansong@fuwaihospital.org。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To establish and evaluate a mouse model of human flora-associated (HFA) from patients of coronary heart disease via fecal microbiota transplantation. **Methods** Twenty-eight female germ-free (GF) C57BL/6J mice were divided into the healthy control (CON) and coronary heart disease (CAD) groups. Eight-week-old mice were orally inoculated with 0.4 mL of stool suspension from healthy participants or CAD patients to build the HFA mouse model. At 6 and 10 weeks post-inoculation, fresh fecal samples were collected and examined for the V3 region of the 16S rDNA gene. Blood sera were collected and examined for blood lipid, cholesterol, myocardial enzymes and cytokine levels. Coronary arteries were collected, processed and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for pathological examination. **Results** The average body weight of the CAD group was significantly higher than that of the CON group ($P < 0.05$) from 5 weeks post-inoculation. α -diversity analysis showed that the Simpson ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Chao1 ($P < 0.05$) and ACE indices ($P < 0.05$) were significantly lower in the CAD group than that in the CON group. The Shannon index ($P < 0.05$, $P < 0.01$) was higher in the CAD group than in the CON group at 6 and 10 weeks post-inoculation. The intestinal floras were mainly comprised of the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* and *Tenericutes*. At six weeks post-inoculation, the relative abundances of *Firmicutes* and *Tenericutes* were lower ($P < 0.05$), and those of *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* were higher ($P < 0.01$) in the CAD group than in the CON group. At ten weeks post-inoculation, the relative abundance of *Firmicutes* ($P < 0.01$) was lower, and the relative abundances of *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* ($P < 0.01$) were higher in the CAD group than in the CON group. β -diversity analysis showed that the CON and CAD groups were distributed in different quadrants, but the same groups at different stages were distributed in the same quadrants, with a significant difference between the groups ($P < 0.05$). The serum levels of TG ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TC ($P < 0.05$), LDH ($P < 0.01$, $P < 0.0001$) and CK ($P < 0.01$, $P < 0.05$) were significantly higher in the CAD group than in the CON group at 6 and 10 weeks post-inoculation. LDL-C levels were significantly higher ($P < 0.05$) in the CAD group than in the CON group at 10 weeks post-inoculation. IL-6 levels were higher at 6 weeks ($P < 0.05$) and lower at 10 weeks ($P < 0.01$) post-inoculation in the CAD group than in the CON group. The IL-2, IL-4, IL-5 and IL-1 β levels were significantly higher ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.0001$, $P < 0.01$, respectively) in the CAD group than in the CON group at 10 weeks post-inoculation. IL-12p70, TNF- α and INF- γ levels did not differ between the CAD and CON groups. Pathological examination using HE staining of the coronary arteries showed no obvious atherosclerotic changes (e.g., foam cell infiltration). **Conclusions** A mouse model of HFA from CAD patients was established via fecal microbiota transplantation. The main advantages of using bacteria from CAD patients are that the GF mice were well colonized, and the animals have similar body weights and serum levels of blood lipid, cholesterol and cytokines.

[Keywords] coronary heart disease; intestinal flora; germ-free mice; human flora-associated animal

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

冠状动脉粥样硬化性心脏病简称冠心病,是一种非常常见的心血管疾病。截止到 2016 年的数据显示,我国城乡居民因冠心病死亡 173.6 万例^[1]。冠心病是一种遗传因素与环境因素共同作用导致的慢性复杂性疾病。在遗传因素方面,有文献报道通过全基因组关联研究发现了 46 个与冠心病相关的危险基因,占冠心病遗传因素的 10.6%,并且这些因素只与脂质和血压相关且稳定性高,不易受饮食、性别、年龄和药物的影响^[2],从而使危险基因较难成为预防治疗冠心病的靶点。肠道菌群作为环境因素的重要组成部分越来越受到研究者重视。直接利用人进行肠道菌群研究存在伦理学限制,动

物模型是研究肠道菌群与宿主健康与疾病关系是必不可少的手段。由于实验动物肠道菌群组成及代谢活性与人存在显著差异,因此将动物体内实验结果外推到人不是完全可靠的。以无菌(germ free mice, GF)小鼠为研究对象通过粪菌移植方式建立人源菌群(human flora-associated, HFA)动物模型,其微生物背景清晰,可有效控制遗传基因、肠道微生物、饮食、性别年龄等因素造成的混杂性偏倚^[3-4]。本研究通过灌胃方式给无菌小鼠接种冠心病患者的新鲜粪便悬液建立冠心病 HFA 动物模型,为探索肠道菌群在冠心病发生发展过程中的作用机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验室自己繁育的无菌雌性 C57BL/6J 小鼠 28 只,饲养于专用无菌隔离器,设施合格证号:【SYXK(京)2018-0019】。饲养环境:温度 21~25℃,湿度 40%~70%,光照周期明暗比 12 h:12 h。动物自由摄入经 50 kGy ⁶⁰Co γ 射线辐照消毒的定制无菌小鼠饲料。实验中使用的饮水、垫料、鼠盒、水瓶、灌胃针等均经过 126℃,30 min 的高温高压灭菌处理。本实验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:ZH17001。

1.1.2 试剂与仪器

抗体芯片检测试剂:仪器校准试剂盒 Bio-Plex Validation Kit (Bio-Rad); Bio-Plex Calibration Kit

(Bio-Rad)。检测试剂盒 Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Grp I Panel 23-plex(货号 M60009RDPD)。主要仪器:悬液微珠芯片平台, Bio-Plex MAGPIX System (Bio-Rad)。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 志愿者信息

采集 2 位冠心病患者、1 位健康志愿者的新鲜粪便用于建立 HFA 模型(表 1)。冠心病及健康志愿者均来自北京,为典型非素食中国饮食,体检、血相正常;健康志愿者及冠心病患者的消化系统无其它器质性疾病;消化道未进行过手术;无酗酒史、糖尿病及其它影响肠道菌群的问题;取样前 8 周末服用处方药、益生菌、抗生素、非甾体类药物。冠心病患者符合世界卫生组织/国际心脏病学会制定的冠心病诊断标准^[5]。

表 1 实验志愿者信息

Table 1 General information of the volunteers

项目 Items	健康对照 Healthy control	冠心病患者 1 CAD patient 1	冠心病患者 2 CAD patient 2
性别 Gender	男 Male	男 Male	男 Male
年龄 Age	48	46	49
舒张压(mmHg) Diastolic Pressure	109	130	140
收缩压(mmHg) Systolic Pressure	68	80	80
体质量指数 BMI(kg/m ²)	20.94	32.85	33.63
胆固醇 TC(mmol/L)	3.79	5.97	5.07
甘油三酯 TG(mmol/L)	0.62	1.93	2.08
高密度脂蛋白 HDL(mmol/L)	0.89	1.80	1.41
低密度脂蛋白 LDL(mmol/L)	2.21	3.71	3.14

1.2.2 模型建立

8 周龄雌性无菌 C57BL/6J 28 只,分为健康对照组(CON)与冠心病(CAD)组,每组 14 只。收集 3 位志愿者清晨第 1 次排出的新鲜粪便,无菌、厌氧条件下称量 1 g 加入 100 mL 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 缓冲液,振荡混匀,制成粪便菌悬液待用。分别向 2 组的每只无菌小鼠体内经口灌喂 0.4 mL 粪便悬液,建立冠心病源菌群动物模型。

1.3 检测指标

动物每周称体重,在粪菌移植 6 周、10 周后每组分别安乐 7 只动物,进行以下指标的检测:

1.3.1 肠道菌群 16S rDNA 的检测

动物安乐死前在隔离器内采集粪便,-80℃冰箱冷冻保存。按参考文献^[6]的方法进行基因组

DNA 提取和 PCR 扩增文库构建、测序及生物信息学分析。

1.3.2 血液学指标:

动物用舒泰(25 mg/kg)麻醉后腹主动脉取血,取血结束剪断腹主动脉放血将动物安乐死。血液 3000 r/min 离心 10 min 取上清,样品送北京中同蓝博临床检测有限公司,采用比色法进行 TG、TC、LDL-C、高密度脂蛋白(HDL-C)、LDH、CK 的检测。

1.3.3 细胞因子检测

血液用 10 000 r/min 离心 10 min,取上清。使用 Luminex 抗体芯片技术检测血清中与粥样硬化斑块形成相关的细胞因子:IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、INF-γ、IL-10、IL-12p70、TNF-α 的浓度变化。

1.3.4 组织病理学

动物安乐死后,打开胸腔,取出心脏,自升主动脉处将心脏与主动脉分离并切除心脏的下半部分,用 PBS 洗净残血后 4% 中性甲醛固定进行 HE 染色。

1.4 统计学分析

所有实验数据均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析,组间比较使用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物一般情况

在整个动物实验过程中,模型组和对照组动物小鼠精神良好、毛色光滑、摄食饮水正常,体重平稳增长。从第 5 周开始,CAD 组动物体重增长加快,与 CON 组比较差异有显著性($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 肠道菌群 16S rDNA 检测结果

2.2.1 肠道菌群多样性分析

根据 OTUs 代表序列与数据库注释文件对比,在 97%(种)水平上进行 OTUs 划分,CAD 组在造模后 6 周和 10 周时所获得的 OTUs 数均减少,与 CON 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。Shannon 指数大、Simpson 指数小表示肠道菌群的多样性强,CAD 组的 Shannon 指数在造模后两个时间点均降低($P < 0.05, P < 0.01$),Simpson 指数均升高($P < 0.05, P <$

0.01),与 CON 组比较差异有显著性。ACE 和 Chao1 指数大表示菌群丰度高,CAD 组的 ACE 和 Chao1 指数在造模后两个时间点的数值均降低($P < 0.05$),与 CON 组比较差异有显著性(表 2)。

2.2.2 肠道菌群在门和属水平上的构成

在造模 6 周和 10 周两个时间点 CON 组 reads 主要分布在以下 8 个门:厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)。

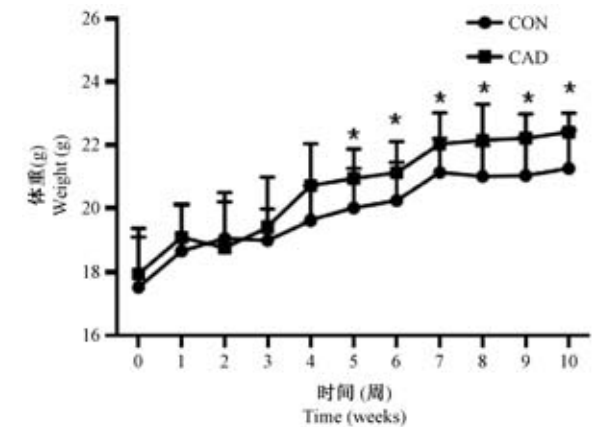


图 1 体重变化
Figure 1 Body weight change in CON groups and CAD groups

表 2 模型组与对照组肠道菌群 α-多样性分析指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the α-diversity indexes of gut microbiota between CON groups and CAD groups($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	OUTs		Chao1		Shannon	
	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage
对照组 Control group	123.00±17.50	131.30±12.70	231.28±32.15	224.37±21.04	3.37±0.78	3.39±0.71
模型组 CAD group	110.20±15.10	107.80±14.22	189.24±16.39	179.55±19.41	2.31±0.45	2.39±0.65
P 值 P value	0.0146 *	0.0396 *	0.0142 *	0.0387 *	0.0114 *	0.0000 **

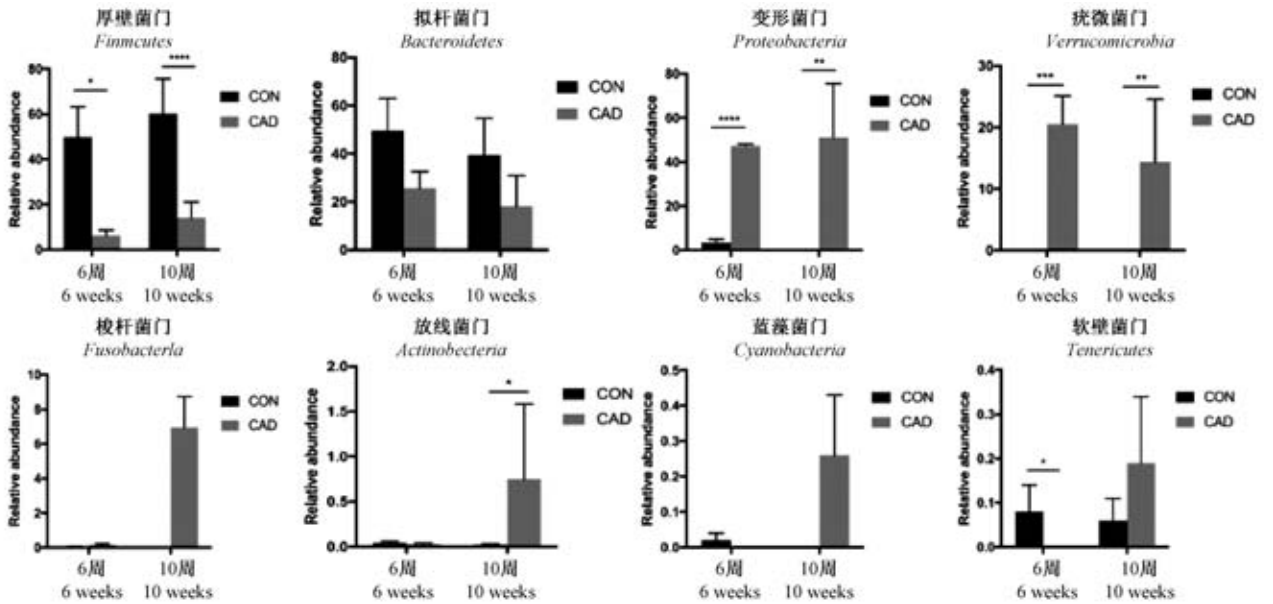
组别 Groups	Simpson		ACE	
	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage
对照组 Control group	130.00±17.20	128.70±12.20	219.33±22.29	209.37±35.24
模型组 CAD group	1114.20±12.50	101.60±11.04	177.31±16.42	171.24±19.17
P 值 P value	0.0470 *	0.0000 **	0.0132 *	0.0124 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

造模 6 周时,CAD 组厚壁菌门、软壁菌门丰度降低($P<0.05$),与对照组比较差异有显著性。拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$),与对照组比较差异有显著性。造模 10 周时,CAD 组厚壁菌门丰度降低($P<0.01$),与对照组比较差异有显著性。拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$),与对照组比较差异有显著性(图 2)。

在属水平,对相对丰度较高的菌株进行分析,

造模 6 周时拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Akkermansia* 菌属相对丰度增高 ($P < 0.01$), *Blautia* 菌属、*Parasutterella* 菌属相对丰度降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),与对照组比较差异有显著性。造模 10 周时拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Akkermansia* 菌属相对丰度增高($P<0.01$),肠杆菌属(*Lactobacillus*)、*Blautia* 菌属、*Parasutterella* 菌属相对丰度降低 ($P<0.05$, $P < 0.01$),与对照组比较差异有显著性(图 3)。

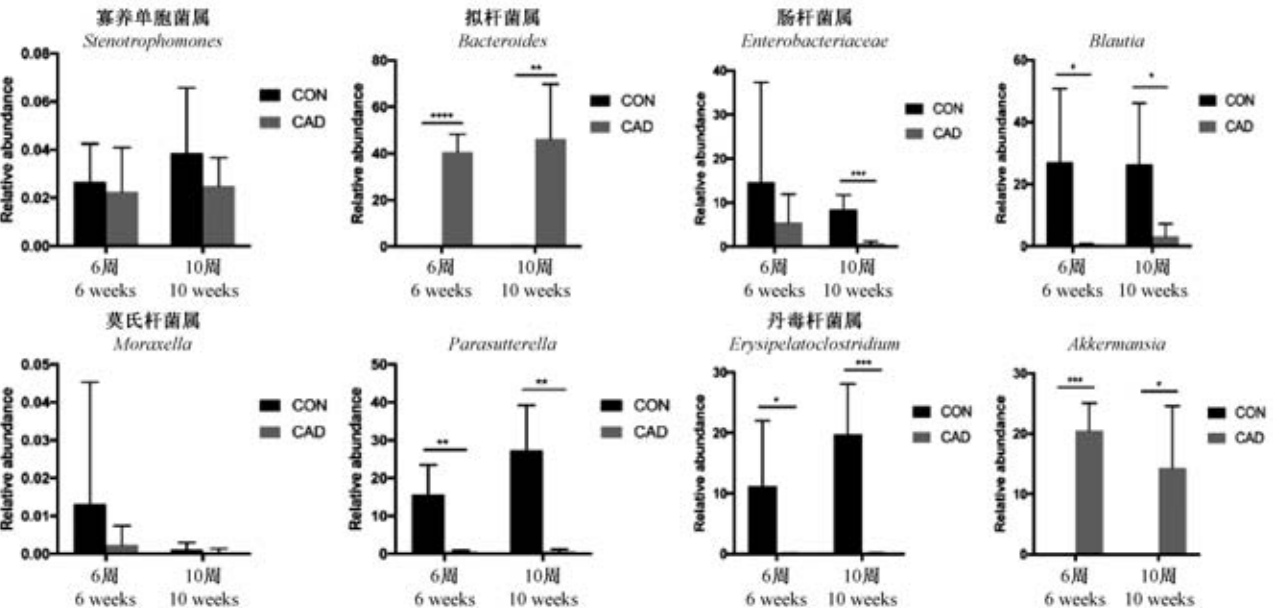


注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 2 肠道菌群在门水平上的构成

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at phylum level in the CON and CAD groups



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 3 肠道菌群在属水平上的构成

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at genus level in the CON and CAD groups

2.2.3 β -多样性分析

β -多样性研究是使用 Weighted Unifrac 距离来衡量组间相异系数,此系数越大表示组间物种多样性的差异越大。分析结果显示,CAD 组在建模 6 周、10 周时的 Weighted Unifrac 距离分别为 0.658、0.681。表明 CAD 组与 CON 组在微生物物种构成方面存在显著性差异($P<0.05$),差异有统计学意义(图 4A)。CAD 组、CON 组的肠型分布在不同区域,同一组的不同阶段则分布在相同区域(图 4B)。

2.3 血液学指标

CAD 组小鼠在建模 6 周和 10 周时,血液中 TG ($P<0.05$, $P<0.01$, 图 5A), TC ($P<0.05$, 图 5B), LDH ($P<0.01$, $P<0.0001$, 图 5E) 和 CK ($P<0.01$, $P<0.05$, 图 5F) 值均升高,与 CON 组比较差异有显著性。LDL-C 在建模 6 周时升高 ($P<0.05$),与 CON 组比较差异有显著性,10 周时未见差异有显著性(图 5D)。HDL-C 在两个时间点均未见差异有显著性(图 5C)。

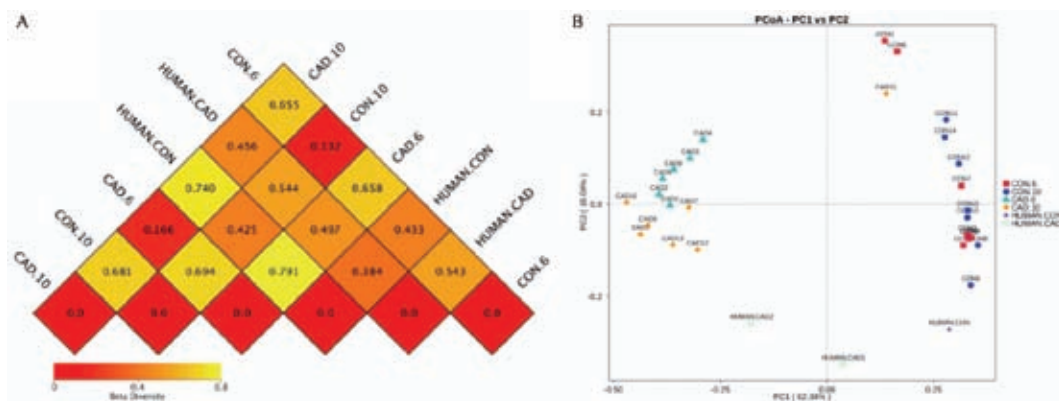
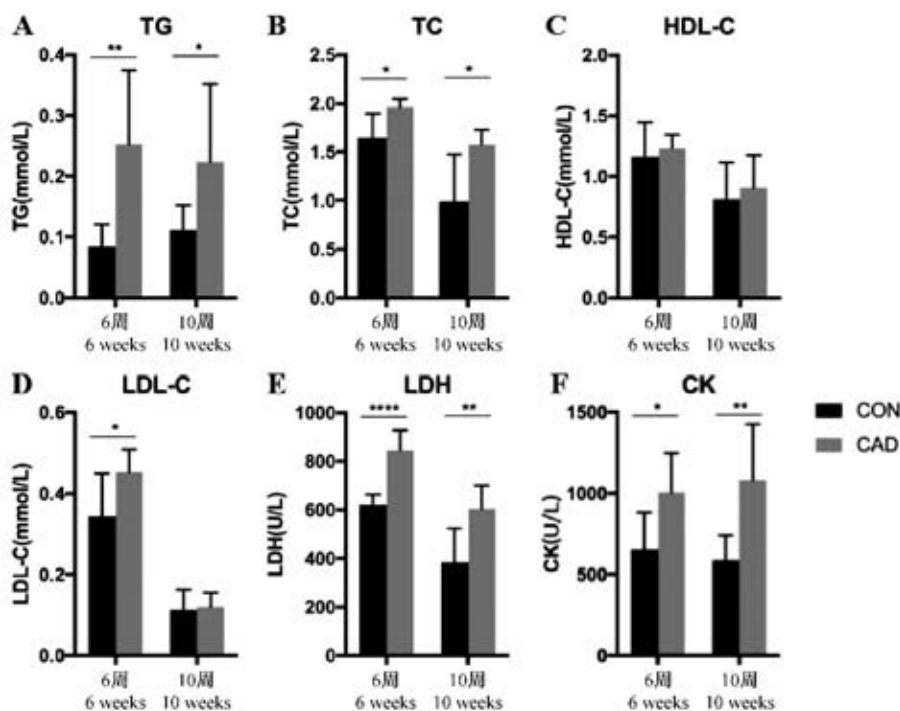


图 4 β -多样性分析结果

Figure 4 β -diversity analysis of the CON and CAD groups



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.0001$.

图 5 血脂和心肌酶标检测结果

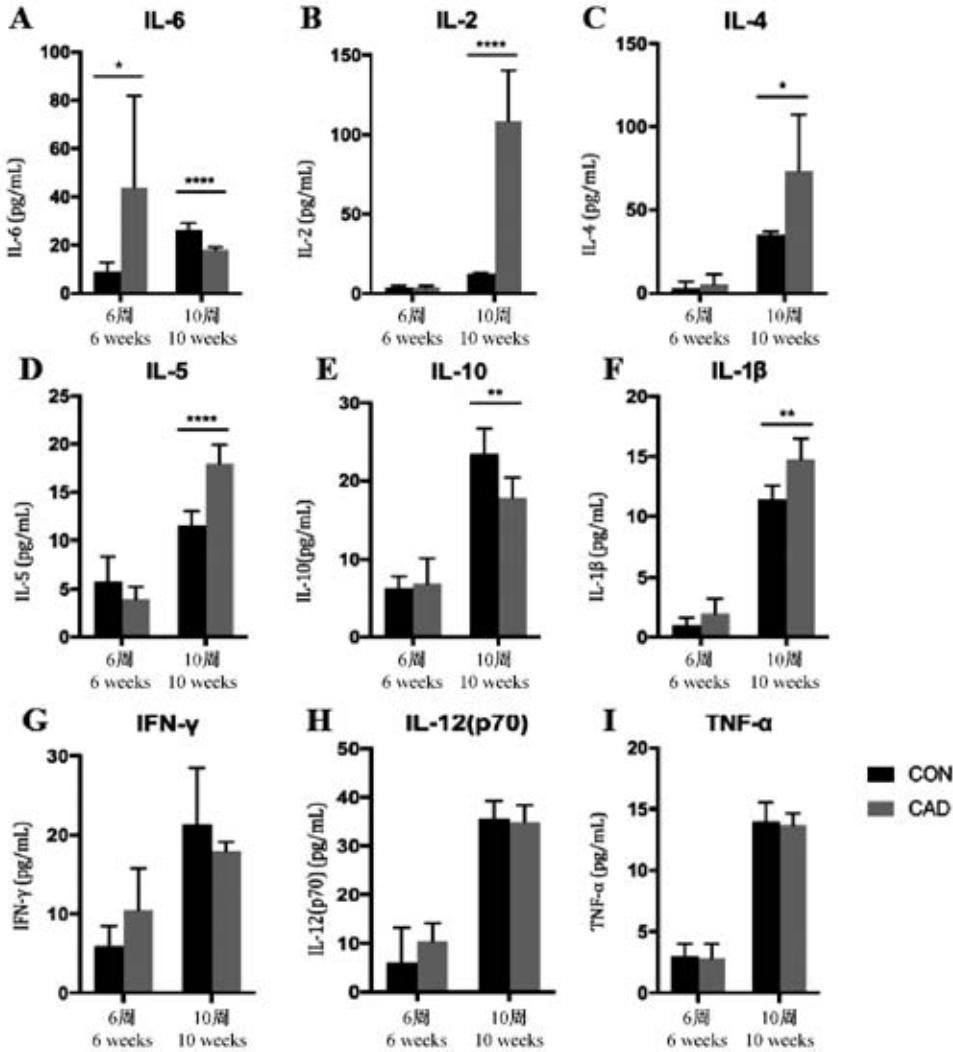
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 5 Detection of the serum lipid levels and myocardial enzymes in the CON and CAD groups

2.4 细胞因子检测

结果显示,与斑块形成、进展相关的细胞因子中,IL-6 在建模 6 周时浓度升高($P<0.05$),10 周时减低($P<0.0001$,图 6A);IL-10 在建模 10 周时浓度降低($P<0.05$,图 6E); IL-2、IL-4、IL-5、IL-

1 β 在建模 10 周时浓度升高($P<0.0001$, $P<0.05$, $P<0.0001$, $P<0.01$,图 6B, C, D, F),与 CON 组比较差异有统计学意义。IL-12p70、TNF- α 、INF- γ 在建模 6 周和 10 周时差异均无统计



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 6 细胞因子检测结果

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 6 The serum levels of cytokines in the CON and CAD groups

2.5 心脏组织病理学

在建模 6 周(图 7A,B)和 10 周(图 7C,D)时,CON 组及 CAD 组小鼠胸主动脉无斑块形成,血管内膜平滑,未见断裂增厚,内皮细胞排列整齐,中膜厚度正常,平滑肌细胞排列整齐,均未见泡沫细胞形成等动脉粥样硬化改变。

3 讨论

根据 Hazenberg 等^[7]、Che 等^[8]的研究结果,在

接种人肠道菌群 2 周后,HFA 动物肠道内菌群结构丰度与志愿者菌群几乎完全一致,并且至少保持 5 周稳定不变。所以本研究选择在灌胃接种志愿者粪便菌悬液 6 周和 10 周后,收集 CON 组和 CAD 组小鼠的新鲜粪便、血液、组织样品进行检测。通过对肠道菌群 β -多样性进行分析,CON 组小鼠与健康志愿者分布在同一象限、CAD 组小鼠与冠心病患者分布在同一象限,而健康志愿者及接种了健康志愿者肠道菌群的小鼠与冠心病患者及接种了患者菌

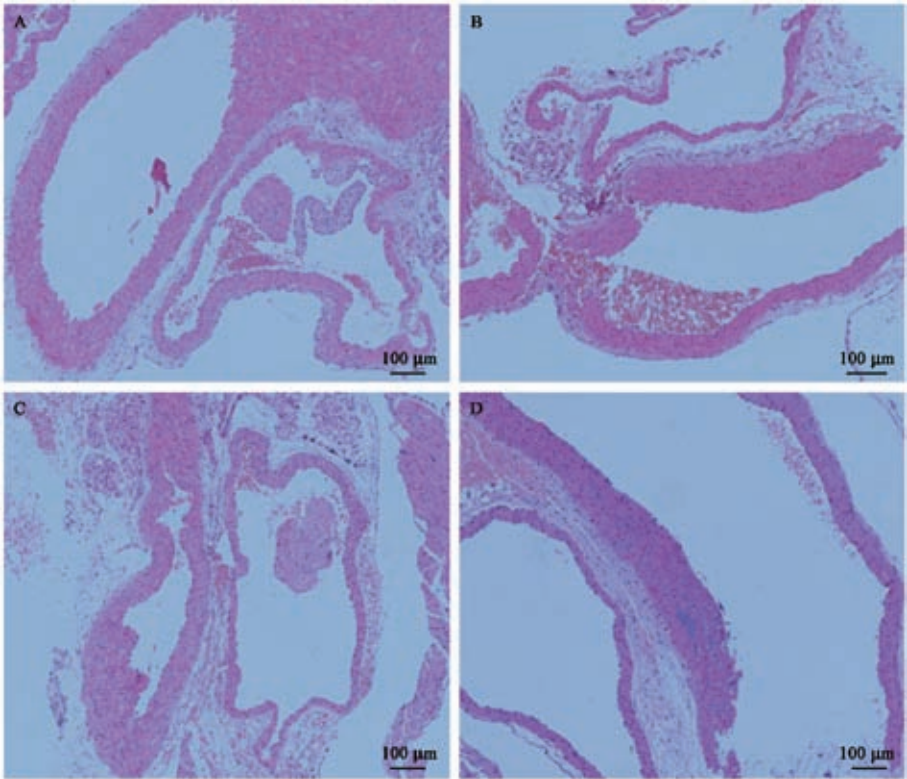


图 7 心脏组织的病理学改变

Figure 7 Histopathological changes in the mouse myocardial tissues of the CON and the CAD groups

群的小鼠分布在不同区域,且 Weighted Unifrac 距离差异有显著性。 α -多样性分析结果, CAD 组的 Shannon 指数在两个时间点均降低, Simpson 指数均升高, ACE 和 Chao1 指数在造模后 6 周和 10 周两个时间点的数值均降低,与 CON 组比较差异有显著性。表明志愿者肠道菌群在无菌小鼠体内成功定植,并可形成复杂且与志愿者菌群相似的微生物区系,且 CON 组、CAD 组小鼠肠道菌群结构与丰度差异显著。

血脂是动脉血管壁发生病变的基础物质,高血脂既是冠心病的独立危险因素,也是其病理表现,其机理可能与心肌受损后泵血功能下降导致的血液流变学改变相关^[9-11]。Fu 等^[12]的研究发现厚壁菌门和拟杆菌门的丰度与体质量指数、甘油水平、高密度脂蛋白水平呈有相关性。Velagapudi 等^[13]通过动物实验证实肠道菌群可影响小鼠的能量代谢和血脂水平。我们的实验中,2 名冠心病志愿者的体质量指数、血脂均高于正常值。粪菌液接种到无菌小鼠肠道后, CAD 组动物体重在移植后 5 周上升幅度增加,小鼠血清中的 TG、TC、LDL-C 与 CON 比较显著升高。厚壁菌门和拟杆菌门是 CON 组与 CAD 组肠道菌群中丰度差异最大的两个门,结果与

已有的研究报道相符。

动脉粥样硬化是一个慢性的炎症发展过程^[14],其机制目前较为认同的是损伤反应学说及在此基础上发展出的炎症学说,在这个过程里始终存在各种炎症细胞和大量炎症介质参与^[15-16]。IL-6 作为心脏不良事件的独立危险因素标志物参与易损斑块的炎症全程^[17]。IL-10 的作用主要是在免疫应答进行负调节,它可以通过直接抑制免疫细胞的功能实现免疫抑制^[18],也可以通过控制 IL-1 β 产生的炎症反应避免组织过度损伤^[19]。IL-2 与 IL-2 受体 α 亚基结合后可调节 T 淋巴细胞的活化,而活化的 T 淋巴细胞能分泌趋化因子增强炎症反应,从而促进动脉粥样硬化斑块的形成及进展^[20]。实验结果显示,移植冠心病患者的肠道菌群后,小鼠血清中 IL-6、IL-2 升高, IL-10 降低而被 IL-10 调节的 IL-1 β 升高,验证了上述研究结果。IL-4 参与粥样硬化的机制比较复杂,目前尚无定论。我们的结果显示移植 6 周时 IL-4 已经升高但无显著性差异, 10 周时显著升高,说明 IL-4 参与的体液免疫可能促进动脉粥样硬化的发展。

上述实验结果证明移植冠心病患者肠道菌群 10 周后 HFA 小鼠的心肌细胞和血管内皮细胞已发

生功能上的损伤,导致血脂、细胞因子的含量发生变化。但由于斑块形成是一个复杂且缓慢的过程,移植 10 周时心肌细胞和血管内皮细胞还未发生器质性改变,故 HE 染色中未发现泡沫细胞浸润等斑块形成的病理学变化。

理想的动物模型应具备以下特点:发病过程和机制尽量接近临床情况;能够对相关药物或治疗手段作出客观评价;模型的制备应操作简便、经济、可重复性高^[21]。本研究利用粪菌移植方法建立了冠心病 HFA 小鼠模型,除肠道菌群的结构与丰度与人类类似外,体重、血脂、细胞因子含量也出现了与临床类似的改变,为研究肠道菌群与冠心病关系研究提供了更多可选择的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国心血管病风险评估和管理指南编写联合委员会. 中国心血管病风险评估和管理指南[J]. 中国循环杂志, 2019, 13(1): 7-29.
The Joint Task Force for Guideline on the Assessment and Management of Cardiovascular Risk in China. Guideline on the Assessment and Management of Cardiovascular Risk in China [J]. Chin Circul J. 2019, 11(1): 7-29.
- [2] Van't HF, Ruigrok YM, Baas AF, et al. Impact of inherited genetic variants associated with profile, hypertension, and coronary artery disease on the risk of intracranial and abdominal aortic aneurysms [J]. Circ Cardiovasc Gene, 2013, 6(3): 264-270.
- [3] 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): 1094-1098.
- [4] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice [J]. Sci Transl Med, 2009, 1(6): 6ra14.
- [5] 江一清, 刘朝中, 朱国英. 现代冠心病学 [M]. 北京: 人民军医出版社. 2001.
Jiang YZ, Liu CZ, Zhu GY. Coronary Heart Disease [M]. Beijing: People's Military Medical Press; 2001.
- [6] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 等. 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型肠道菌群变化 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 349-356.
Zhu H, Guo YX, Du XP, et al. Analysis of gut microbiota in SD rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 349-356.
- [7] Hazenberg MP. Effects of the human intestinal flora on germ-free mice [J]. J App Bacteriol, 1981, 50(1): 95-106.
- [8] Che C, Pang X, Hua X, et al. Effects of human fecal flora on intestinal morphology and mucosal immunity in human flora-associated piglet [J]. Scand J Immunol, 2009, 69(4): 223-233.
- [9] Chen Y, Ba L, Huang W, et al. Role of carvacral in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/EPK and Akt/eNOS signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 796: 90-100.
- [10] Brittan M, Hnuter A, Boulberdaa M, et al. Impaired vascular function and repair in patients with premature coronary artery disease [J]. Eur J Prev Cardiol, 2015, 22(12): 1557-1566.
- [11] Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: An analysis of primary and secondary prevention trials [J]. Lancet, 2015, 385(9984): 2264-2267.
- [12] Fu J, Bonder MJ, Cenit MC, et al. The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids [J]. Circ Res, 2015, 117(9): 817-824.
- [13] Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigestad CS, et al. The gut microbiota modulate host energy and lipid metabolism in mice [J]. J Lipid Res, 2010, 51(5): 1101-1112.
- [14] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis — a matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193.
- [15] Talas I. 2016 Russell Ross Memorial Lecture in vascular biology molecular-cellular mechanisms in the progression of atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(2): 183-189.
- [16] Lin M, Zhao L, Zhao W, et al. Dissecting the mechanism of carotid atherosclerosis from the perspective of regulation [J]. Int Mol Med, 2014, 34(6): 1458-1466.
- [17] Janssen H, Wanger CS, Demmer P, et al. Acute perioperative-stress-induced increase of atherosclerotic plaque volume and vulnerability to rupture in apolipoprotein-E-deficient mice is amenable to statin treatment and IL-6 inhibition [J]. Dis Model Mech, 2015, 8(9): 1071-1080.
- [18] Brauner S, Jiang X, Thorlacius GE, et al. Augmented Th17 differentiation in Trim21 deficiency promotes a stable phenotype of atherosclerotic plaques with high collagen content [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(1): 158-167.
- [19] Janik M, Hejna P, Ublova, et al. Multiple giant coronary artery aneurysms: a rare cause of sudden cardiac death [J]. J Forens Sci, 2017, 62(2): 515-518.
- [20] Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again [J]. EMBO Rep, 2007, 8(12): 1142-1148.
- [21] Bernbom N, Norrung B, Saasbe P, et al. Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender [J]. J Microbiol Methods, 2006, 66(1): 87-95.

[收稿日期] 2019-07-09

苏先芝,刘一斐,孔文娟,等. 三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 725-732.
Su XZ, Liu YF, Kong WJ, et al. Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 725-732.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.006

三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究

苏先芝¹, 刘一斐¹, 孔文娟¹, 闫菲¹, 王晓梅¹, 韩福国², 刘清飞^{2*}, 史云^{3*},

(1. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京 100029; 2. 清华大学药学院, 北京 100084;
3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

【摘要】 目的 对比分析早发性卵巢功能不全 (POI) 小鼠模型三种常用造模方法的差异, 探索符合 POI 临床特征的造模方法。**方法** 将 96 只动情周期规律的 ICR 小鼠随机分为 4 组: A 对照组、B 雷公藤组、C 二氧化乙烯基环己烯 (VCD) 组、D 半乳糖组。适应性喂养后, 分别给予不同造模干预, 分别于干预后第 16、46 和 76 天随机处死各组 8 只小鼠, 检测小鼠血清性激素、观察卵巢和子宫病理改变等。**结果** 各模型组小鼠 E₂、卵泡数与对照组有显著差异; 各模型组均出现动情周期紊乱, 对照组则阴性。**结论** VCD 腹腔注射法可损伤小鼠卵巢功能, 造成小鼠 POI 模型; 此造模方法简便易行、成功率高, 在三种造模方法中成模更为理想, 可推广。

【关键词】 早发性卵巢功能不全; 二氧化乙烯基环己烯; 造模方法; 雷公藤; 半乳糖; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0725-08

Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency

SU Xianzhi¹, LIU Yifei¹, KONG Wenjuan¹, YAN Fei¹, WANG Xiaomei¹, HAN Fuguo², LIU Qingfei^{2*}, SHI Yun^{3*}

(1. the First Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China.

2. School of Pharmaceutical Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084.

3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

Corresponding author: LIU Qingfei. E-mail: liuqf@tsinghua.edu.cn; SHI Yun. E-mail: zysyun@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the differences between three commonly used methods for establishing mouse models of premature ovarian insufficiency (POI), and to determine the method that is most accordant with the clinical features of POI. **Methods** Ninety-six ICR mice with regular estrous cycles were randomly divided into 4 groups: the control group (A), the tripterygium glycosides (TG) group (B), the 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) group (C), and the D-(+)-galactose (D-gal) group (D). After intervention with the different chemicals, eight mice in each group were sacrificed, the serum sex hormone levels were measured, and the pathological changes of uterus and ovaries were examined. **Results** The level of E₂ and the number of follicles differed significantly between mice in the model groups and those in the control group ($P < 0.01$). And the estrous cycles in mice of the model groups were significantly irregular whereas those of the control group were regular. **Conclusions** Mouse models of POI can be successfully established with VCD via intraperitoneal injection. This method has the advantages of being an easier operation and having a higher success

【基金项目】 国家自然科学基金(81202717); 科技部国际合作重点项目(2016YFE0113700)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81202717) and Key International Cooperation Projects of the Ministry of Science and Technology (2016YFE0113700).

【作者简介】 苏先芝 (1994—) 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治女性生殖衰老和不孕不育。Email: 784829714@qq.com

【通信作者】 刘清飞 (1971—), 男, 副教授。Email: liuqf@tsinghua.edu.cn;

史云 (1975—) 女, 主任医师, 硕士生导师。Email: zysyun@163.com。

* 共同通信作者

rate, as compared with the other two models method. It is the ideal one of the three establishing method and is suitable for popular use.

[Keywords] premature ovarian insufficiency (POI); vinylcyclohexene dioxide (VCD); mouse models; establishing method; tripterygium glycosides (TG); D-(+)-galactose (D-gal)

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

早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI), 是指 40 岁之前出现卵巢功能减退, 主要表现为月经异常 (闭经、月经稀发或频发)、促性腺激素水平升高 ($\text{FSH} > 25 \text{ IU/L}$) 和雌激素水平波动性下降^[1]。由于卵巢功能的减退导致女性生育力的丧失和低雌激素状态, POI 已成为影响女性生殖健康和社会稳定性的不可忽视的因素, 因此对 POI 的病因学和诊疗的研究日益受到重视。POI 的病因和病理机制尚不明确, 自身免疫、遗传、环境、药物和应激因素等都可能引起卵巢功能的减退。目前临床缺乏疗效确切的药物, 原因之一就在于建立适宜的 POI 动物模型存在一定的困难。目前 POI 的动物模型的制备主要依据不同的发病机制, 有化疗药物造模法、半乳糖代谢造模法、化学损伤物质造模法、基因敲除造模法等^[2], 本文针对目前常用的三种造模方法: 雷公藤造模法、化学物质二氧化乙烯基环己烯 (4-vinylcyclohexenediepoide, VCD) 造模法、半乳糖代谢造模法进行对比性研究, 力求找到更理想的 POI 动物模型, 为临床和实验研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 ICR 小鼠 100 只, 8 周龄, 体重 (28 ± 3) g, 购于北京维通利华实验技术有限公司【SCXK (京) 2016-0011】, 饲养和取材均于北京中医药大学教育部中医内科学重点实验室屏障动物实验设施内进行【SYXK (京) 2015-0001】, 实验经过北京中医药大学东直门医院实验动物福利与伦理委员会批准 (编号: 17-23)。小鼠分笼饲养, 实验室温度 (20 ± 4) °C, 相对湿度 60% ~ 70%, 光照和黑暗 12 h 更替, 自由进食及饮水。

1.1.2 试剂与仪器

雷公藤多苷片 (湖南千金协力药业, 20160502), 二氧化乙烯基环己烯 (Sigma, BCBV1352, 美国)。芝麻油 (Spectrum, 2GC0155, 美国)。D-(+)-半乳糖 (Sigma, WXBC4726 V, 美国)。血清促

卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH)、雌二醇 (E_2)、抗苗勒管激素 (AMH) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (北京易科拜德科技有限公司)。本实验所及仪器均为实验室常规仪器。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

适应性喂养 3 d 后, 每日早 8:00 起对小鼠进行阴道脱落细胞学检测, 连续 10 d 光镜下观察, 筛选出有规律动情周期的健康雌性小鼠 96 只进入正式实验。按随机数字表法随机分为 4 组: 对照组、雷公藤多苷片组 (tripterygium glycosides, TG)、VCD 组和半乳糖组 (D-(+)-galactose, D-gal), 每组 24 只。干预当天设为 0 d, 干预后第 16、46 和 76 天处死随机处死各组 8 只小鼠, 分别设为各组的 I、II 和 III 亚组。取血并处死, 取小鼠双侧子宫和卵巢, 生理盐水清洗后擦干, 称重, 分组置于 4% 多聚甲醛中固定。

1.2.2 POI 模型的建立

TG 组以雷公藤多苷片混悬液按 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 连续 15 d。VCD 组以 VCD 溶液按 $160 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量腹腔注射, 连续 15 d。半乳糖组以半乳糖溶液按 $500 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量颈背部皮下注射, 连续 75 d。

1.2.3 观测指标

(一) 造模前后一般情况观察

观察并记录动物皮毛、活动情况、进食、大小便和体重等改变, 若有动物死亡, 记录死亡数量及原因。

(二) 动情周期观察

自干预日起, 各组小鼠每日 8:00 起进行阴道涂片, 观察动情周期。取细棉签蘸取 0.9% 生理盐水后, 在小鼠阴道内轻轻旋转一周, 在玻片上轻轻滚动, 使分泌物均匀地涂布于玻片上, 于光学显微镜下直接观察小鼠动情周期变化。观察标准: ①动情前期: 椭圆形有核上皮细胞占大多数, 偶有少量角化细胞和白细胞; ②动情期: 片状无核角化上皮细胞占绝大多数或间有少量有核上皮细胞和白细胞; ③动情后期: 白细胞、片状角化上皮细胞、有核上皮细胞均有, 且比例无明显差异; ④动情间期: 有大量白细胞及少量粘液^[3]。

(三) 血清性激素水平

血液标本于血清管 (VACUETTE, #D1703343) 中静置 1 h 后, 以 4200 r/min 离心 15 min, 取上清液, 严格按照试剂盒操作, ELISA 法测定血清 FSH、LH、E₂、AMH 水平。

(四) 子宫、卵巢指数测定

取双侧子宫和卵巢, 剔除脂肪组织后称重, 按以下公式计算子宫指数和卵巢指数: 卵巢指数 = 卵巢湿重 (mg) / 体重 (g) × 100%; 子宫指数 = 子宫湿重 (mg) / 体重 (g) × 100%。

(五) 卵巢、子宫组织学观察

称重后将卵巢、子宫分组浸入 4% 多聚甲醛中固定, 常规石蜡切片与 HE 染色, 在光学显微镜下阅片, 计数卵巢中各级卵泡和黄体的数量, 测量子宫内膜和子宫肌壁厚度。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析各组间的比较, 以 $\alpha=0.05$ 的标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

各造模组小鼠在干预期间均出现不同程度的一过性活动减少、摄食减少、皮毛光泽度下降等变化, 体重无明显下降; 干预结束后, 雷公藤组小鼠活动和摄食逐渐恢复, 皮毛光泽度亦于第 46 天时恢复正常, VCD 组小鼠皮毛光泽度仍较差。对照组小鼠食欲、皮毛、活动度等均较干预前无明显变化。

2.2 小鼠动情周期变化

对照组小鼠均有规律的动情周期, 表现为 6~7 d 出现一次规律动情周期。干预当天记为 0 d, 与每组结果比较。结果见图 1。

2.3 血清性激素水平变化

干预后第 16 天, 各组 E₂ 值较对照组均下降, 有十分显著性差异 ($P<0.01$), 雷公藤组和 VCD 组 AMH 均明显下降, VCD 组 FSH 值及 FSH/LH 比值升高半乳糖组 AMH 值降低, 差异均有显著性 ($P<0.05$)。第 46 天, 雷公藤组、VCD 组 E₂ 值较对照组仍明显降低, 差异有显著性 ($P<0.05$); VCD 组 AMH 值较第 16 天及同期对照组降低, 差异有显著性 ($P<0.05$); 半乳糖组与同期对照组相比, E₂ 值降低, 差异十分显著 ($P<0.01$), AMH 值明显降低 ($P<$

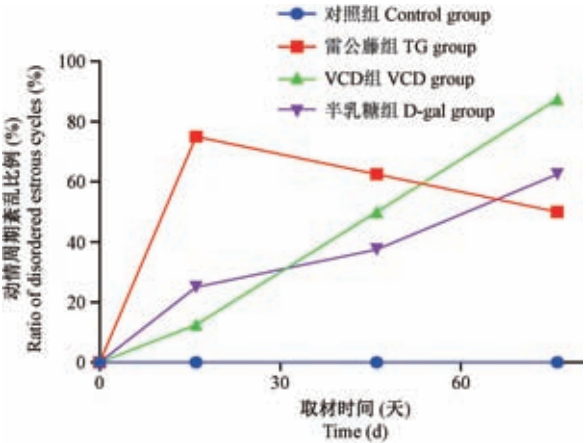


图 1 小鼠动情周期紊乱比例 (%)

Figure 1 Ratio of disordered estrous cycle (%)

0.05)。第 76 天, 雷公藤组 E₂ 值较对照组仍降低 ($P<0.05$), 其余各值均无显著差异; VCD 组 AMH、LH、E₂ 值较对照组降低, FSH/LH 比值升高, 均有显著性差异 ($P<0.05$); 半乳糖组 AMH、E₂ 值较对照组降低, 有显著性差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。雷公藤组小鼠 AMH 值在第 76 天时较第 16 天时显著升高 ($P<0.01$), VCD 组和半乳糖组小鼠 E₂ 水平持续性降低, 较前有显著性差异 ($P<0.05$)。结果见图 2。

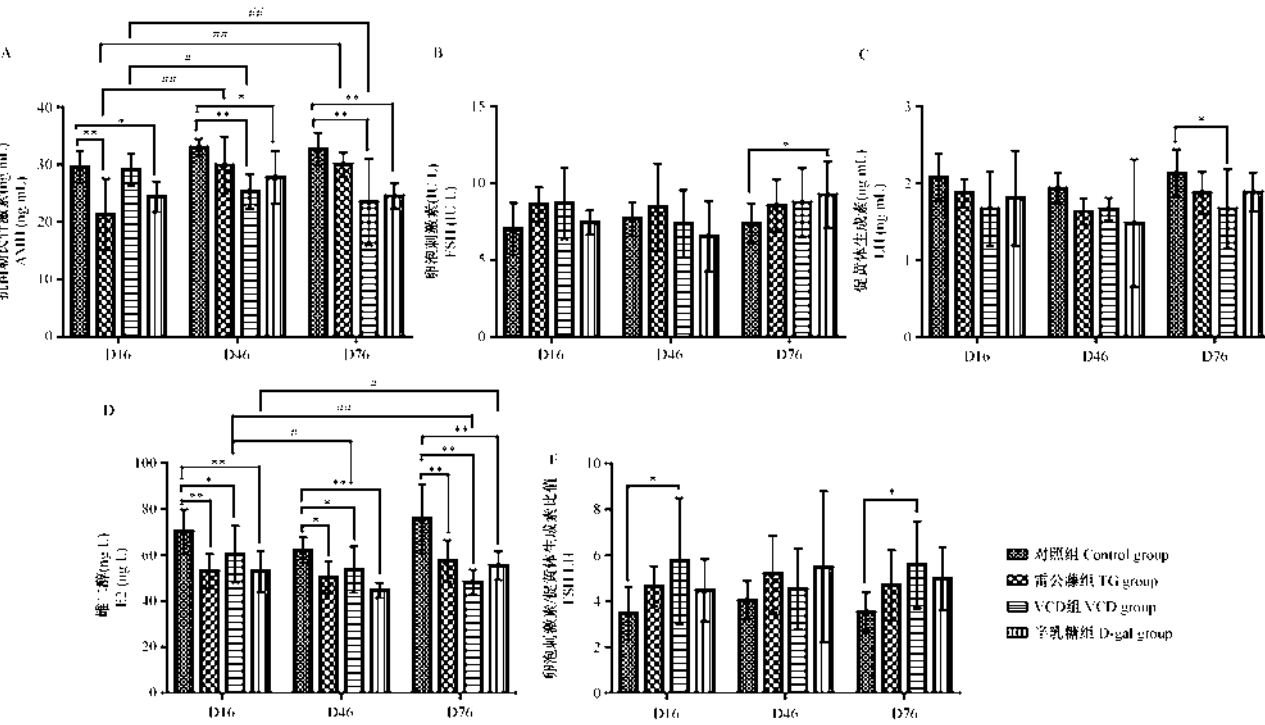
2.4 卵巢、子宫湿重指数

小鼠给药前称重, 各组小鼠体重差异无显著性。第 16 天, 雷公藤组小鼠体重明显减轻, VCD 组卵巢湿重、卵巢指数均明显减少, 半乳糖组卵巢指数明显减少, 差异均有显著性 ($P<0.05$); 第 46 天, 半乳糖组卵巢湿重、卵巢指数均较同期空白对照组明显减少, 差异有显著性 ($P<0.05$)。第 76 天各组卵巢指数无显著性差异 ($P>0.05$)。各组子宫指数与同期空白对照组相比均未产生显著性差异 ($P>0.05$)。结果见表 1。

2.5 卵巢与子宫组织结构变化

2.5.1 卵泡计数及子宫厚度测量

第 16 天, 雷公藤组发育中卵泡数、成熟卵泡数、子宫内膜厚度较对照组减少, VCD 组子宫肌壁厚度明显减小, 半乳糖组子宫内膜厚度明显减小, 差异均有显著性 ($P<0.05$, $P<0.01$); 第 46 天, 雷公藤组、VCD 组、半乳糖组发育中卵泡数、黄体数较对照组明显减少, 差异有显著性 ($P<0.01$, $P<0.05$); 第 76 天, VCD 组成熟卵泡数、子宫内膜厚度、子宫肌壁厚度较对照组均明显减小, 半乳糖组子宫内膜厚度明显减小, 差异均有显著性, ($P<0.05$, $P<0.01$)。结果见图 3。



注:与同期空白对照组相比, * $P<0.05$;与同期空白对照组相比, ** $P<0.01$;与同组第 16 天相比, # $P<0.05$;与同组第 16 天比较, ### $P<0.01$ 。

图 2 三种早发性卵巢功能不全小鼠模型的血清性激素比较

Note. Compared with the control group at the same period, * $P<0.05$. Compared with the control group at the same period, ** $P<0.01$. Compared with the same treatment group at day 16, # $P<0.05$. Compared with the same treatment group at day 16, ### $P<0.01$.

Figure 2 Comparison of the changes of serum hormone levels in the three POI mouse models with premature ovarian dysfunction

表 1 三种 POI 小鼠模型的体重和卵巢、子宫指数变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of ovarian and uterine indexes in the three mouse models of premature ovarian dysfunction ($\bar{x} \pm s$)					
组别 Groups	时间 Time	例数 <i>n</i>	体重(g) Weight (g)	卵巢指数(mg/g) Ovarian index (mg/g)	子宫指数(mg/g) Uterine index (mg/g)
对照组 Control	16 天 16 days	8	30.74±1.53	1.06±0.15	4.12±1.64
雷公藤组 TG		8	28.11±1.63 *	0.85±0.31	5.27±2.02
VCD 组 VCD		8	29.75±0.85	0.63±0.27 *	3.96±1.98
半乳糖组 D-gal		8	30.05±1.27	0.79±0.25 *	3.49±1.85
对照组 Control	46 天 46 days	8	31.91±1.80	1.17±0.18	4.39±1.23
雷公藤组 TG		8	32.31±2.43	1.07±0.51	4.88±1.23
VCD 组 VCD		8	32.63±1.46	0.96±0.20	4.25±1.87
半乳糖组 D-gal		8	30.90±2.25	0.81±0.16 *	4.34±2.19
对照组 Control	76 天 76 days	8	34.46±1.61	0.54±0.10	3.74±1.29
雷公藤组 TG		8	34.36±1.47	0.54±0.18	3.27±1.07
VCD 组 VCD		8	36.56±2.42 *	0.49±0.13	4.67±2.02
半乳糖组 D-gal		8	34.29±2.32	0.43±0.14	2.77±0.42

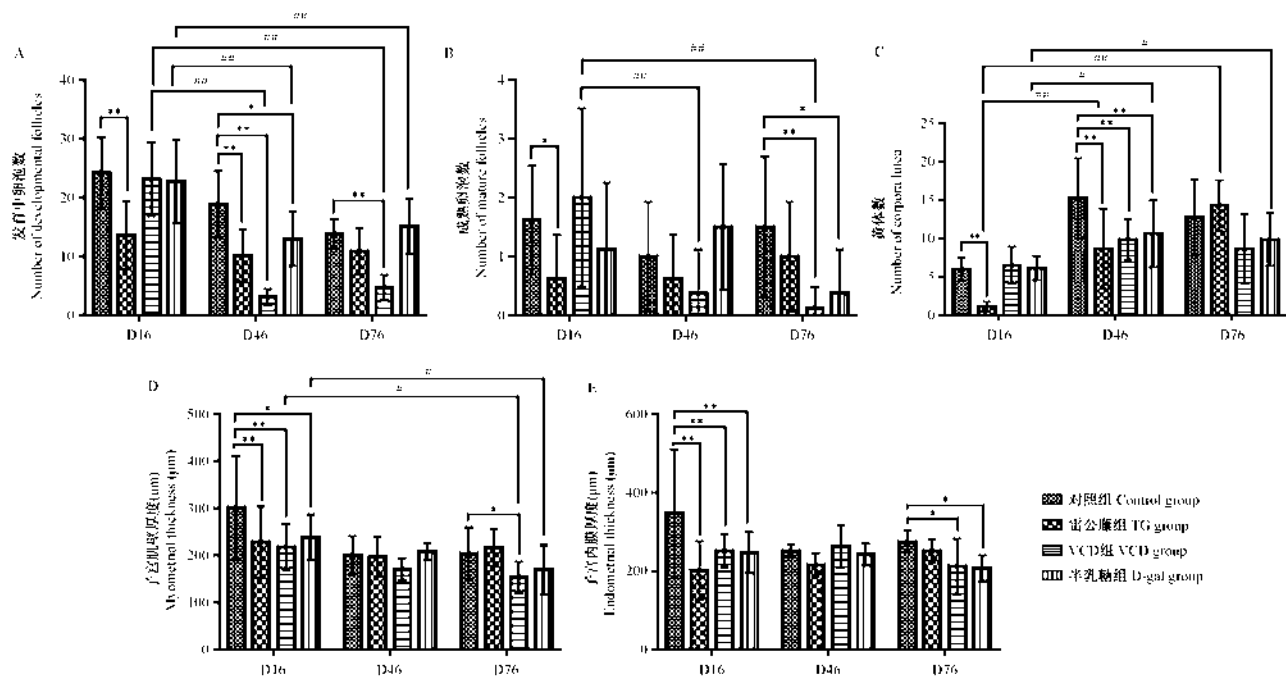
注:与同期对照组相比, * $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group at the same period, * $P<0.05$.

2.5.2 卵巢、子宫形态学观察

对照组小鼠卵巢表现为体积大,皮质区可见各阶段的卵泡,包括发育中的卵泡(初级卵泡、次级卵泡)、成熟卵泡和黄体相间分布,在位子宫内膜无明

显增厚或变薄,腺体无扩张或萎缩。与对照组相比,雷公藤组第 16 天和第 46 天各级卵泡及黄体所占比例下降,子宫内膜变薄,腺体萎缩,但这一现象在第 76 天时较前恢复;VCD 组发育中的卵泡和黄



注:与同期空白对照组相比, * $P<0.05$;与同期空白对照组相比, ** $P<0.01$;与同组第 16 天相比, # $P<0.05$; 与同组第 16 天比较, ## $P<0.01$ 。

图 3 三种早发性卵巢功能不全小鼠模型的卵泡计数及子宫厚度测量

Note. Compared with the control group at the same period, * $P<0.05$. Compared with the control group at the same period, ** $P<0.01$. Compared with the same treatment group at day 16, # $P<0.05$. Compared with the same treatment group at day 16, ## $P<0.01$.

Figure 3 Ovarian follicle counts and uterine wall thickness measurements in the three mouse POI models

体所占比例明显下降,腺体和间质萎缩,子宫内膜上皮呈低柱状或立方状,子宫内膜和子宫肌壁变薄,并与时间呈反比;半乳糖组发育中的卵泡和黄体所占比例逐渐下降,子宫内膜厚度变薄。结果见图 4、图 5。

3 讨论

疾病动物模型的最终目的在于能够解析疾病发生的生理病理机制和服务于疾病预防和治疗药物的研发两个方面^[4]。然而 POI 的发病机制尚不明确,制备理想的动物模型有很多难点,包括致病途径及过程与人类相似,患病后的病理结果与人类一致,模型的自我修复可能,是否具有可重复性等。根据病因的不同,目前有多种方式可以造成 POI 的动物模型,如雷公藤多苷片造模法、半乳糖代谢造模法、环境化学物质造模法、化疗药物造模法等^[5]。

本文选取了目前应用较多也较具代表性的雷公藤多苷片灌胃造模法、VCD 溶液腹腔注射造模法和半乳糖溶液皮下注射造模法进入研究,主要针对药物性、环境性和代谢性 POI 作为研究对象。雷公藤多苷提取自传统中药雷公藤,临床发现雷公藤多苷会导致卵巢功能减退和衰竭,高慧等^[6]用雷公藤

多苷片给 12 周龄 SD 大鼠连续灌胃 14 d 后,建立较为理想的 POI 动物模型,然而梁爽等^[7]的研究发现,雷公藤致 POI 动物模型中,停药 10 d 后,卵巢功能可自然修复。半乳糖血症与 POI 发病相关,由于半乳糖在体内堆积可导致卵母细胞的过早耗竭,女性卵巢功能对半乳糖血症异常敏感^[8],患半乳糖血症的妇女 POI 的发病率很高^[9]。Bandyopadhyay 等^[10]通过给怀孕雌鼠饲料中添加半乳糖成功建立 POI 动物模型。然而半乳糖血症导致的 POI 临床病例很少,缺乏实际研究意义。工业化学品 VCD 是制造杀虫剂、灭火剂、橡胶、塑料等的副产品^[11],可以选择性地损伤雌鼠和灵长类动物卵巢储备池中的原始卵泡及初级卵泡,加速卵泡凋亡,诱导卵巢功能逐步衰竭^[12-13],可较好地模拟自然状态下卵巢功能衰竭的进程^[14]。有文献报道,连续腹腔注射 160 mg/(kg·d) VCD 15 d,待停止注射后(70±5) d 时,啮齿类动物的卵巢接近 POI 的临床特征^[12, 15]。

本研究发现,雷公藤组小鼠在第 16 天时出现体重减轻,多数动物出现动情周期紊乱,AMH 和 E₂ 值显著降低,发育中卵泡数和成熟卵泡数减少,子宫内膜变薄,提示雷公藤多苷片造模法 15 d 确可造成小鼠卵巢功能的减退。第 46 天时小鼠体重恢复,E₂

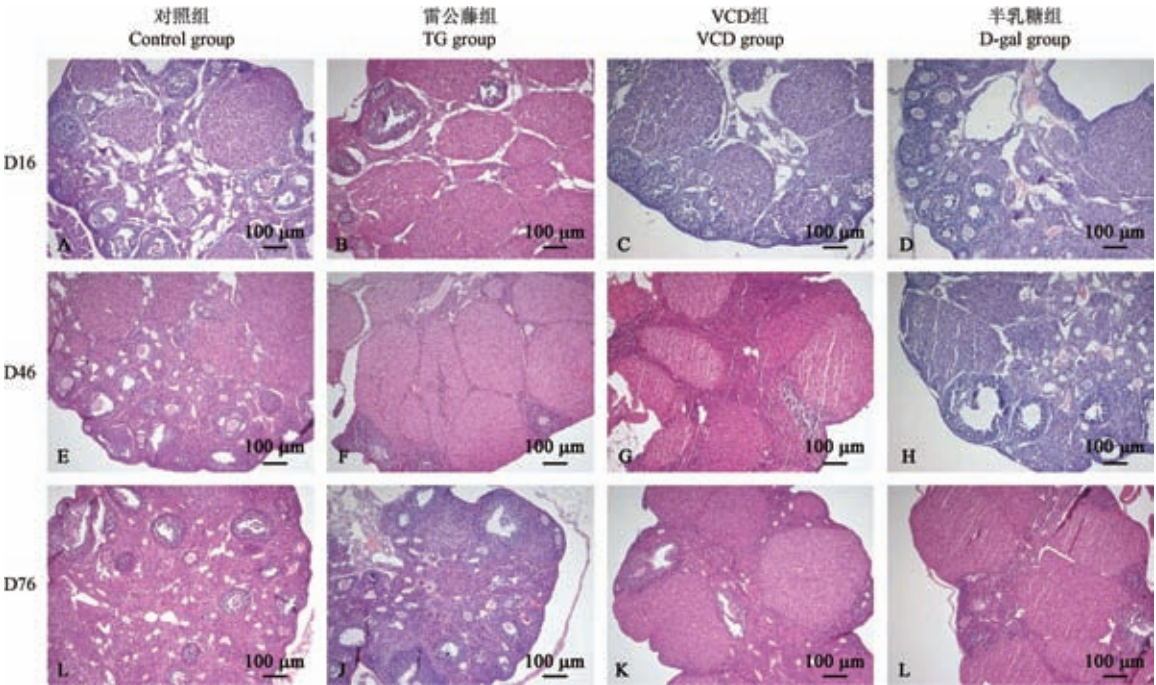


图 4 各组卵巢病理图片(HE 染色)

Figure 4 Pathological changes of the mouse ovarian tissues(HE staining)

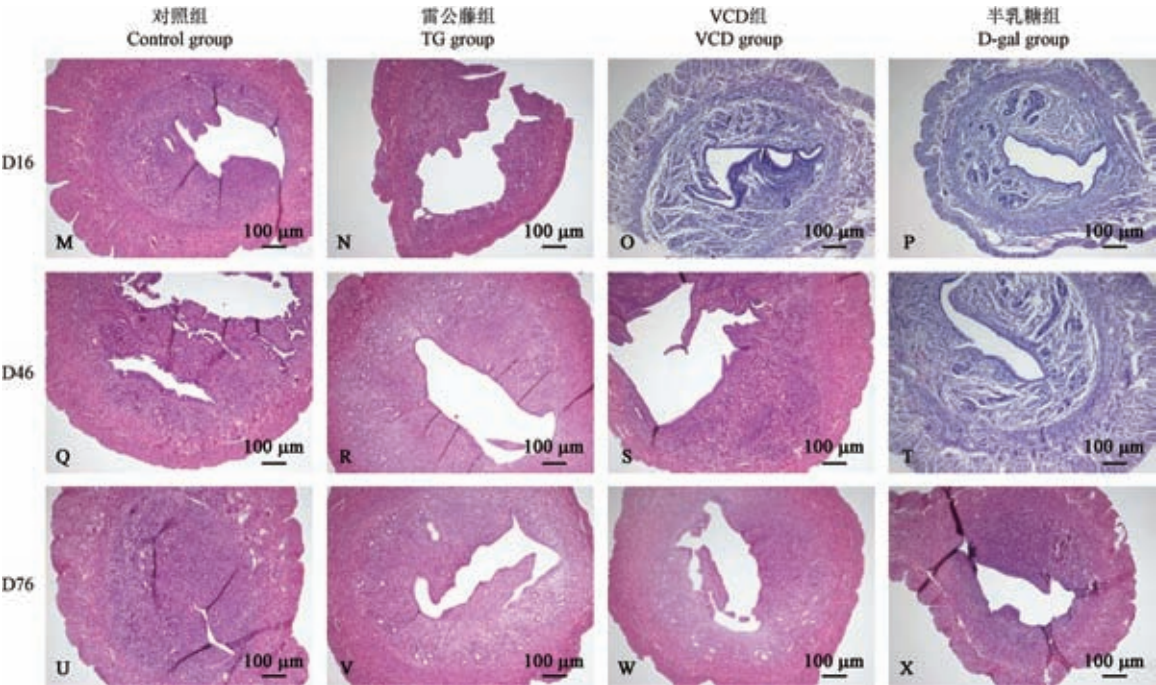


图 5 各组子宫病理图片

Figure 5 Pathological changes of mouse uterine tissues(HE staining)

值仍降低,发育中卵泡数和黄体数显著减少,提示停药 1 个月后,雷公藤多苷片对卵巢功能的损害仍然存在。但第 46 天时,除 E_2 值仍持续偏低外,雷公藤组小鼠体重、血清性激素值及卵巢、子宫组织结构均与同期空白对照组无显著差异,表明雷公藤混

悬液灌胃 15 d 即能造成小鼠生殖功能的损伤,出现体重下降、动情周期紊乱、卵巢组织病理学变化等现象,但停药 1~2 个月左右,小鼠动情周期即逐渐恢复,其他各指标逐渐恢复到正常水平,这与文献表述一致^[7]。由此说明采用雷公藤多苷造模研究

治疗 POI 药效学方法尚需要探讨。

半乳糖组小鼠在第 16 天时出现卵巢指数减低, AMH 和 E_2 值均减低, 子宫内膜厚度减小, 提示半乳糖造模法确实能够对卵巢功能造成损害, 第 46 天时 E_2 仍持续减低, 发育中的卵泡数、黄体数减低, 提示给药 46 d 后, 卵巢功能仍处于损害中。第 76 天时 AMH 和 E_2 值减低, 子宫内膜厚度减小, 半数以上动物出现动情周期紊乱, 提示给药 75 d 后卵巢功能仍在逐步下降, 表明半乳糖造模法也是制备 POI 小鼠模型的较理想造模方法。但与 VCD 造模相比, 半乳糖制造 POI 模型具有造模时间长, 成模率不高 (62.5%) 等缺点, 其造模方法仍需商榷。

VCD 组小鼠在第 16 天时出现卵巢湿重及卵巢指数减低, AMH 和 E_2 值显著降低减低, FSH 值和 FSH/LH 升高, 提示 VCD 造模法给药 15 d 后, 已经对卵巢功能造成了损害, 但尚未引起动情周期紊乱等表现。第 46 天时小鼠体重、血清性激素与前无差异, 发育中的卵泡数和黄体数较前进一步减少, 提示停药 1 个月后, VCD 对卵巢功能的损害持续存在。第 76 天时小鼠 AMH、LH、 E_2 仍明显降低, FSH/LH 比值升高, 绝大多数小鼠出现动情周期紊乱, 发育中卵泡数、成熟卵泡数均减少, 子宫内膜和子宫肌壁厚度均减小, 提示停药 2 个月后, VCD 对卵巢功能仍产生持久损害, 引起 POI 的临床征象, 且这种影响并未发现自然修复, 可能对卵巢功能造成不可逆的损伤, 表明 VCD 造模法效果确切, 是制备 POI 小鼠模型的良好造模方法。

环境内分泌干扰物 (endocrine-disrupting chemicals, EDCs) 可影响机体的激素分泌, 长期暴露于 EDCs 可引起青春期提前、生育力降低、妊娠期并发症发生率增加及绝经期提前等^[16-17], 是诱发女性 POI 的因素之一^[18]。VCD 是 VCH (4-vinylcyclohexene) 的代谢产物, VCH 产生于香烟、矿物或塑料燃烧氧化过程中, 可由吸烟、接触农药等方式进入人体, 是诱发 POI 的重要因素之一^[19-20]。良好的 POI 模型应包含以下几个因素: (1) 动情周期的改变; (2) 血清雌激素明显降低; (3) 卵泡数显著减少; (4) 生育试验证实产仔数明显减少^[21]。综上所述, VCD 溶液腹腔注射法致 POI 造模法致病途径及过程与人类相似, 动物卵巢和子宫病理结果与人类一致 (如卵巢萎缩, 各级卵泡减少, 子宫内膜和子宫肌壁厚度减小等), 动情周期明显改变, 血清雌激素明显降低, 卵泡数显著减少, 未观察到自然修

复。因此, 本实验证实化学毒性物质 VCD 能诱导小鼠卵巢功能减退, 模拟 POI 的病理过程, 在三种造模方法中最为优选, 可作为探讨 POI 发病机理和用药研究的动物模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] 陈子江, 田秦杰, 乔杰, 等. 早发性卵巢功能不全的临床诊疗中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(9): 577-581. Chen ZJ, Tian QJ, Qiao J. Chinese expert consensus on premature ovarian insufficiency [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2017, 52(9): 577-581.
- [2] 严大为, 周莉, 孙祖越. 卵巢功能早衰动物模型的建立及其评价指标的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(3): 486-492. Yan DW, Zhou L, Sun ZY. Research progress in establishing animal models of premature ovarian failure and its evaluation indexes [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2015, 29(3): 486-492.
- [3] Kang X, Jia L, Shen XY. Manifestation of hyperandrogenism in the continuous light exposure-induced PCOS rat model [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 1-9.
- [4] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(9): 851-860. Xue LX, Zhang FZ, Sun RJ, et al. Research status and perspective of disease animal models in China [J]. Sci Sin Vitae, 2014, 44(9): 851-860.
- [5] 刘澜, 姚广涛, 李瑞霞, 等. 卵巢功能早衰动物模型建立方法的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(5): 386-389. Xiang L, Yao GT, Li RX, et al. Review of the establishing methods of premature ovarian failure's animal model [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(5): 386-389.
- [6] 高慧, 杨涓, 韩冰, 等. 药物型卵巢早衰动物模型的研究 [J]. 国医论坛, 2007, 22(3): 22-26. Gao H, Yang J, Han B, et al. Animal model research on drug premature ovarian failure [J]. Forum Trad Clin Med, 2007, 22(3): 22-26.
- [7] 梁爽, 田舸, 田燕, 等. 雷公藤多苷致小鼠卵巢早衰后的自然修复时间探讨 [J]. 大连医科大学学报, 2010, 32(2): 146-150. Liang S, Tian G, Tian Y, et al. Tripterygium wifordii induced premature ovarian failure after the natural rehabilitation [J]. J Dalian Med Univ, 2010, 32(2): 147-150.
- [8] Rubio-Gozalbo ME, Gubbels CS, Bakker JA, et al. Gonadal function in male and female patients with classic galactosemia [J]. Hum Reprod Update, 2010, 16(2): 177-188.
- [9] Fridovich-Keil JL, Gubbels CS, Spencer JB, et al. Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia [J]. J Inherit Metab Dis, 2011, 34(2): 357-366.
- [10] Bandyopadhyay S, Chakrabarti J, Banerjee S, et al. Galactose toxicity in the rat as a model for premature ovarian failure: an experimental approach readdressed [J]. Hum Reprod, 2003, 18

- (10): 2031–2038.
- [11] 钟惠仪, 杨洪艳. 去氧乙烯基环己烯致卵巢早衰动物模型的研究进展 [J]. 广东医学, 2013, 34(11): 1787–1790.
Zhong HY, Yang HY. The research progress of premature ovarian failure mode I established by 4-vinylcyclohexene [J]. Guangdong Med J, 2013, 34(11): 1787–1790
- [12] Van Kempen TA, Milner TA, Waters EM. Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause [J]. Brain Res, 2011, 1379: 176–187.
- [13] Kappeler CJ, Hoyer PB. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity [J]. Syst Biol Reprod Med, 2012, 58(1): 57–62.
- [14] Reis FM, Pestana-Oliveira N, Leite CM, et al. Hormonal changes and increased anxiety-like behavior in a perimenopause-animal model induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) in female rats [J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 49(1): 130–140.
- [15] Shin D, Ha J, Hong SB, et al. Schisandrae fructus reduces symptoms of 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian failure in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 2564787.
- [16] Grindler NM, Allsworth JE, Macones GA, et al. Persistent organic pollutants and early menopause in U.S. women [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116057.
- [17] Minguez-Alarcon L, Gaskins AJ. Female exposure to endocrine disrupting chemicals and fecundity: a review [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017, 29(4): 202–211.
- [18] Ho SM, Cheong A, Adgent MA, et al. Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders [J]. Reprod Toxicol, 2017, 68: 85–104.
- [19] Bhattacharya P, Keating AF. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 261(3): 227–235.
- [20] 黄莉萍, 陈建, 何淑宁, 等. 环境内分泌干扰物 4-乙烯基环己烯与女性卵巢早衰的相关性分析 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(11): 69–71.
Huang LP, Chen J, He SN, et al. Correlation analysis of 4-vinylcyclohexene in environmental endocrine disruptors and women with premature ovarian failure [J]. Chin Mod Med, 2016, 23(11): 69–71.
- [21] 成杰, 丁利军, 胡娅莉. 卵巢早衰动物模型制备研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 66–70.
Cheng J, Ding LJ, Hu YL. Research progress of the establishment of animal models of premature ovarian failure [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(4): 66–70.

[收稿日期] 2019-04-25

钱宏梁,潘志强,方肇勤. 红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 733-739.
Qian HL, Pan ZQ, Fang ZQ. Application of infrared thermography in the evaluation of mouse Yangxu Syndrome and its evaluation criteria[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 733-739.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.007

红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系

钱宏梁,潘志强*,方肇勤

(上海中医药大学基础医学院,上海 201203)

【摘要】 目的 运用红外热像技术评估糖皮质激素药源性证候小鼠“阳”盛衰程度。**方法** 将 120 只 ICR 小鼠分 3 次实验依次开展,每次实验分成正常对照组以及 4 个不同剂量糖皮质激素(氢化可的松、泼尼松龙、地塞米松)用药组,在给药第 14 天拍摄各组小鼠的红外热像图,并尝试分析小鼠头部、侧腹部、尾根部共三个区域的温度情况。**结果** 氢化可的松和地塞米松给药后小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度均出现不同程度的下降。泼尼松龙给药后仅极低剂量组小鼠头部最高温度出现显著下降。**结论** 红外热像技术可以评估实验小鼠“阳”盛衰程度;氢化可的松和地塞米松可诱发药源性虚证小鼠类似阳虚的外寒征象。

【关键词】 红外热像技术;药源性证候;糖皮质激素;证候评估;实验动物;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0733-07

Application of infrared thermography in the evaluation of mouse Yangxu Syndrome and its evaluation criteria

QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang*, FANG Zhaoqin

(School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Corresponding author: PAN Zhiqiang. E-mail: pzq527@163.com

【Abstract】 Objective Using infrared thermography to evaluate the rise and fall of Yang in mice with a glucocorticoid drug-induced syndrome. **Methods** One hundred and twenty SPF male ICR mice were tested in three experiments; each experiment included a normal control group and four groups of different doses of glucocorticoid (hydrocortisone, prednisolone, or dexamethasone), 8 mice in each group. Infrared thermal images of the mice in each group were taken on the fourteenth day of drug administration, and the temperatures at the head, the lateral abdomen and the tail root were analyzed. **Results** After administration of hydrocortisone and dexamethasone, all the maximum head temperature, the mean trunk temperature and the minimum tail temperature of the mice were decreased to different degrees. After prednisolone administration, the maximum head temperature of mice in the very-low-dose glucocorticoid group showed a significant decrease. **Conclusions** Infrared thermography can be used to evaluate the degree of “Yang” in experimental mice. Hydrocortisone and dexamethasone can induce cold signs similar to Yang deficiency in mice with drug-induced deficiency syndromes.

【Keywords】 infrared thermography; drug-induced syndrome; glucocorticoid; syndrome evaluation; experimental animal; mice

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

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81873212),上海市科委实验动物专项(19140905000)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81873212) and Scientific Research Program of Shanghai Science and Technology Commission (19140905000).

【作者简介】钱宏梁(1992—),男,硕士。研究方向:中医证候实验研究。

【通信作者】潘志强(1977—),男,教授,博士,博士生导师,主要从事实验中医教学与中医基础实验研究及中医内科杂病诊治工作。

Email: pzq527@163.com

中医证候表征的量化研究是学术界探索的重要领域,其中,寒热属性是中医辨别病邪性质、机体的阴阳盛衰及病属外感或内伤的重要依据。寒即畏寒怕冷,临床肾阳不足者可能会出现手足、腰部、膝盖等部位的发凉或怕冷;热即身热感或体温升高,临床阴虚内热者颜面部易出现潮红、烘热或手足心发热。由此可见,中医证候属热性时既有主观性肌肤发热感觉,也会出现客观上体温升高体征,体温升高可以通过温度计准确刻画,然而主观上的肌肤热感则主要通过患者的陈述获得,其模糊性不利于证候的准确判别。

随着红外热像技术的成熟与运用,医学上已有大量红外测温的研究,陈振相等^[1]红外热像仪对健康人的面部进行了观测,倪金霞等^[2]用红外热成像仪研究健康人各脏腑的温度范围和能量分布。这些探索给中医证候实验研究提供有益的借鉴,有助于寒热信息在证候判别中的定量化。当机体处于热量不足或功能衰减状态下,红外辐射少可能表现出寒证;一旦热量过剩或代谢旺盛时,红外辐射多则可能呈现类似热证。如“阳虚则外寒,阴虚则内热,阳盛则外热,阴盛则内寒”(《素问·调经论》)所言,红外热像技术可以很好地量化检测体表寒热情况作为评价中医“阳”盛衰程度的手段非常契合,但在实验动物证候模型的研究方面鲜有报道。基于本课题组长期对于实验小鼠的诊法和辨证论治方法学的研究^[3-5],本实验围绕小鼠的“阳”盛衰程度开展了对典型的糖皮质激素诱发的药源性证候模型小鼠的探索,通过红外热像技术对小鼠体表头部最高温度、体表尾部最低温度和躯干平均温度 3 个温度指标进行了研究,兹报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

雄性 ICR 小鼠,SPF 级,120 只,体质量(18~20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK(沪)2014-0008】。实验动物伦理审批号:SZY201803012。

1.1.2 试剂与仪器

氢化可的松(hydrocortisone, HY),白色结晶粉末,分子量 362.46,购自国药集团化学试剂有限公司产品(批号 66003632)。醋酸泼尼松龙片

(prednisolone)(国药准字 H31020771)、醋酸地塞米松片(dexamethasone)(国药准字 H31020793)均购自上海上药信谊药厂有限公司。

ThermaCAM P30 型红外热像仪器(购自美国 FLIR 公司)用于检测体表红外温度。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

小鼠适应性饲养,当小鼠体质量稳定至 30 g 左右,开始实验。

第一批实验:40 只分为正常对照组、极低剂量(0.33 mg/(kg·bw))氢化可的松组、低剂量(0.66 mg/(kg·bw))氢化可的松组、中剂量(3.3 mg/(kg·bw))氢化可的松组和高剂量(12.5 mg/(kg·bw))氢化可的松组,每组 8 只。

第二批实验:40 只分为正常对照组、极低剂量(0.25 mg/(kg·bw))泼尼松龙组、低剂量(0.5 mg/(kg·bw))泼尼松龙组、中剂量(2.5 mg/(kg·bw))泼尼松龙组和高剂量(12.5 mg/(kg·bw))泼尼松龙组,每组 8 只。

第三批实验:40 只分为正常对照组、极低剂量(0.0125 mg/(kg·bw))地塞米松组、低剂量(0.05 mg/(kg·bw))地塞米松组、中剂量(0.25 mg/(kg·bw))地塞米松组和高剂量(1.25 mg/(kg·bw))地塞米松组,每组 8 只。

各组按照相应的药物剂量灌胃,每天 1 次,连续 14 d;正常对照组灌胃等体积的灭菌水。

1.2.2 红外热像仪检测小鼠体表温度的标准化方法

在实验第 14 天,检测各组小鼠体表红外温度,具体方法如下:

1)将被检测的实验小鼠与红外热像仪至于环境温度 22℃的室内,室内移除其他干扰红外热像仪的设备或仪器。

2)开启红外热像仪,设定以下相关参数:FOV 视场 23(单位:角秒),调色板以红色为主,发射率 ϵ 为 0.97,相对湿度 65%,镜头为 200 μm 近焦镜头,手动聚焦。

3)准备一个 10 cm $\times$ 6 cm 面积的泡沫塑料材质平台供小鼠站立。

4)调整红外热像仪镜头中心与小鼠侧腹部在同一水平,且距离 60 cm。

5)将小鼠置于泡沫塑料材质平台上。

6)调整焦距使得小鼠侧面轮廓清晰并使其处

于红外热像仪图像中心区域。

7) 等待小鼠调整到较好的姿势时, 拍摄小鼠红外热像图, 并保存图片。

1.2.3 小鼠体表红外温度的评价指标建立

采用 ThermoCAM Reporter 2000 专业版软件对小鼠红外热像图进行数据分析。通过软件采集三个温度指标进行分析:

- 1) 头部最高温度 (即为图 1 中 A 小鼠头部区域中的温度最大值)
- 2) 躯干平均温度 (即为图 1 中 B 小鼠躯干区域的平均值)
- 3) 尾部最低温度 (即图 1 中 C 小鼠尾根部区域可以选取到的最小值)。

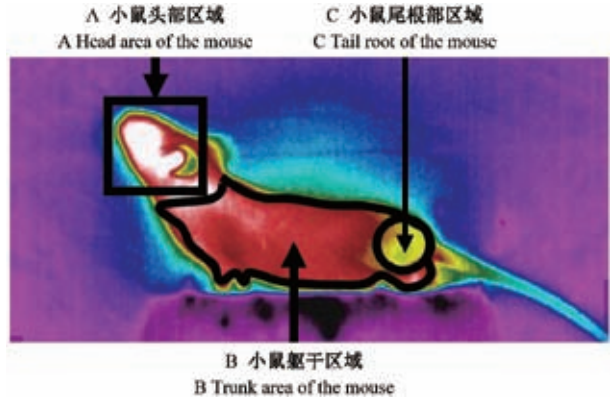


图 1 小鼠红外热像图分析数据示意图

Figure 1 Schematic diagram indicating the three sites of infrared thermogram analysis data of a mouse

1.3 统计学分析

本文统计数据类型均为平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用 GraphPadPrism 7.0 专业软件进行作图、及统计分析, 采用 One-way ANOVA 方差分析和 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 氢化可的松对小鼠不同部位红外温度影响 (阳盛衰程度)

与正常对照组比较, 氢化可的松给药 14 d 后, 不同剂量氢化可的松组小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度均出现不同程度的下降。其中极低、低、中、高剂量组小鼠头部最高温度出现显著下降 ($P < 0.01$); 极低、低、中、高剂量组小鼠躯干平均温度出现显著下降 ($P < 0.01$); 极低、低、中、高剂量组小鼠尾部最低温度出现显著下降 ($P < 0.01$), 见图 2。

2.2 泼尼松龙对小鼠不同部位红外温度影响 (阳盛衰程度)

与正常对照组比较, 泼尼松龙给药 14 d 后, 极低剂量泼尼松龙组小鼠头部最高温度出现显著下降 ($P < 0.05$), 躯干平均温度和尾部最低温度未出现显著差异; 低、中、高剂量泼尼松龙组小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度均未出现显著差异, 见图 3。

2.3 地塞米松对小鼠不同部位红外温度影响 (阳盛衰程度)

与正常对照组比较, 地塞米松给药 14 d 后, 不同剂量地塞米松组小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度均出现不同程度的下降。其中低、中、高剂量小鼠头部最高温度出现显著下降 ($P < 0.01$); 低、中、高剂量组小鼠躯干平均温度出现显著下降 ($P < 0.01$); 低、中、高剂量组小鼠尾部最低温度出现显著下降 ($P < 0.01$), 见图 4。

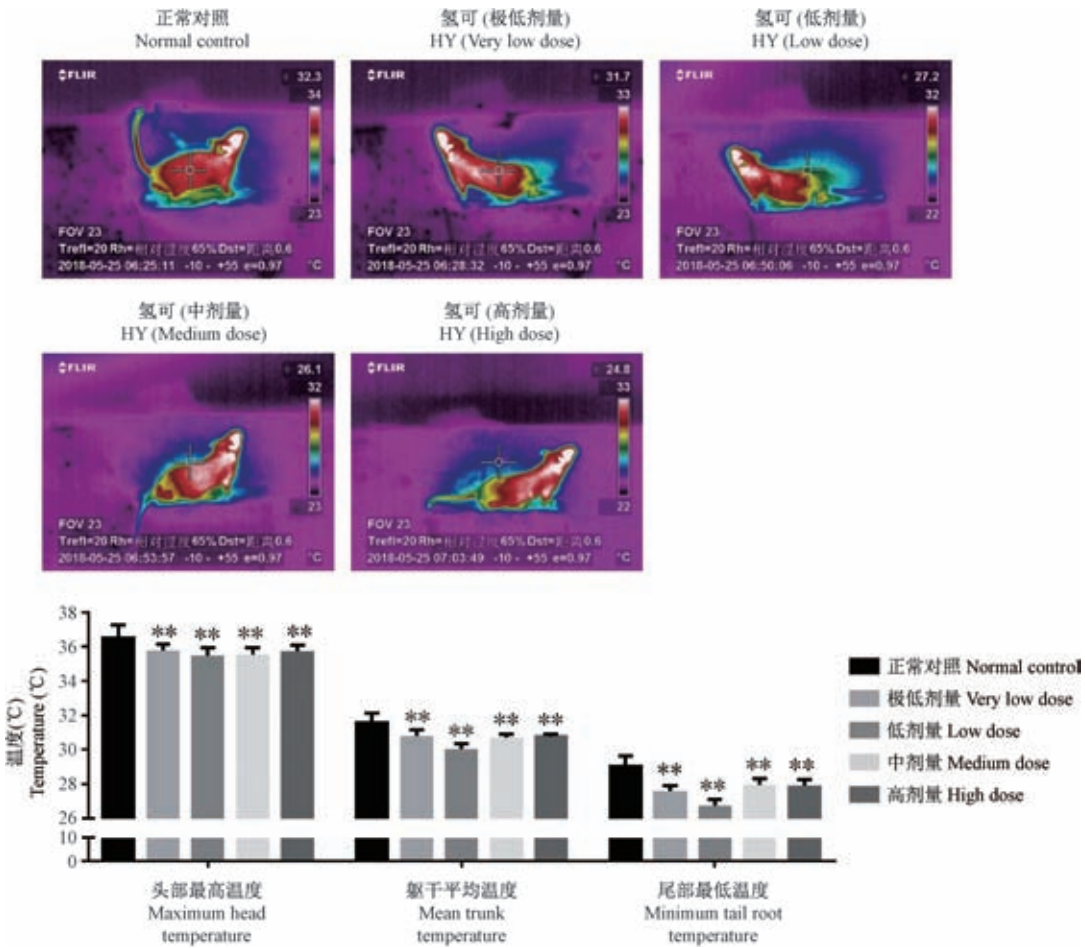
3 讨论

3.1 红外热像技术简介

红外热像仪利用物体的红外辐射把热能转换成电信号, 再扫描成像, 然后通过软件可以实现对图像任何点或区域的温度精确分析。由于红外热像技术具有非接触性测温、测温速度快、以热分布图像直观呈现等诸多优点^[6], 其在军事领域、高压电网工业及农业等领域被广泛运用^[7]。近几十年来, 红外热像技术在医疗诊断、肿瘤研究、疼痛研究、神经定位、针刺效应及人体异常信息的无创监测等领域得到广泛的应用。

3.2 红外热像技术在中医药证候研究中的实践

由于寒热属性是中医证候的重要特性, 虽然临床表现并非所有的“阳”盛衰证候都有体表温度的变化, 但体表温度下降是阳虚的基础见证。近年来, 有报道红外热像仪在中医证候的量化研究方面进行了尝试, 陈振相等^[1]用红外热像仪对健康人的面部进行了观测, 发现面部诸脏腑面部反映区的红外辐射量有所差异。刘黎青等^[8]应用红外热像技术观察不同中医辨证分型的红外舌图特征及冷热温度负荷变化规律。周娴等^[9]运用红外热像技术研究中医五脏寒热证素特征与红外热像图之间的关系。李洪娟等^[10]则详细论述中医证候理论与热力学理论的内在关联性, 阐述采用热力学方法研究中医证候的基本原则、方法、技术、手段, 以及热力



注:不同剂量氢化可的松:极低剂量(0.33 mg/(kg·bw))、低剂量(0.66 mg/(kg·bw))、中剂量(3.3 mg/(kg·bw))和高剂量(12.5 mg/(kg·bw))。与正常对照组比较,* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。另“氢可”即氢化可的松。

图2 氢化可的松小鼠红外热图以及数据柱状图

Note. Different doses of hydrocortisone: very low dose (0.33 mg/(kg·bw)), low dose (0.66 mg/(kg·bw)), medium dose (3.3 mg/(kg·bw)) and high dose (12.5 mg/(kg·bw)). Compared with the normal control group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$. “HY” means hydrocortisone.

Figure 2 Infrared heat map and data histogram of the hydrocortisone-treated mice

学方法研究中医证候的特点和优势等,提出证候热力学研究概念。

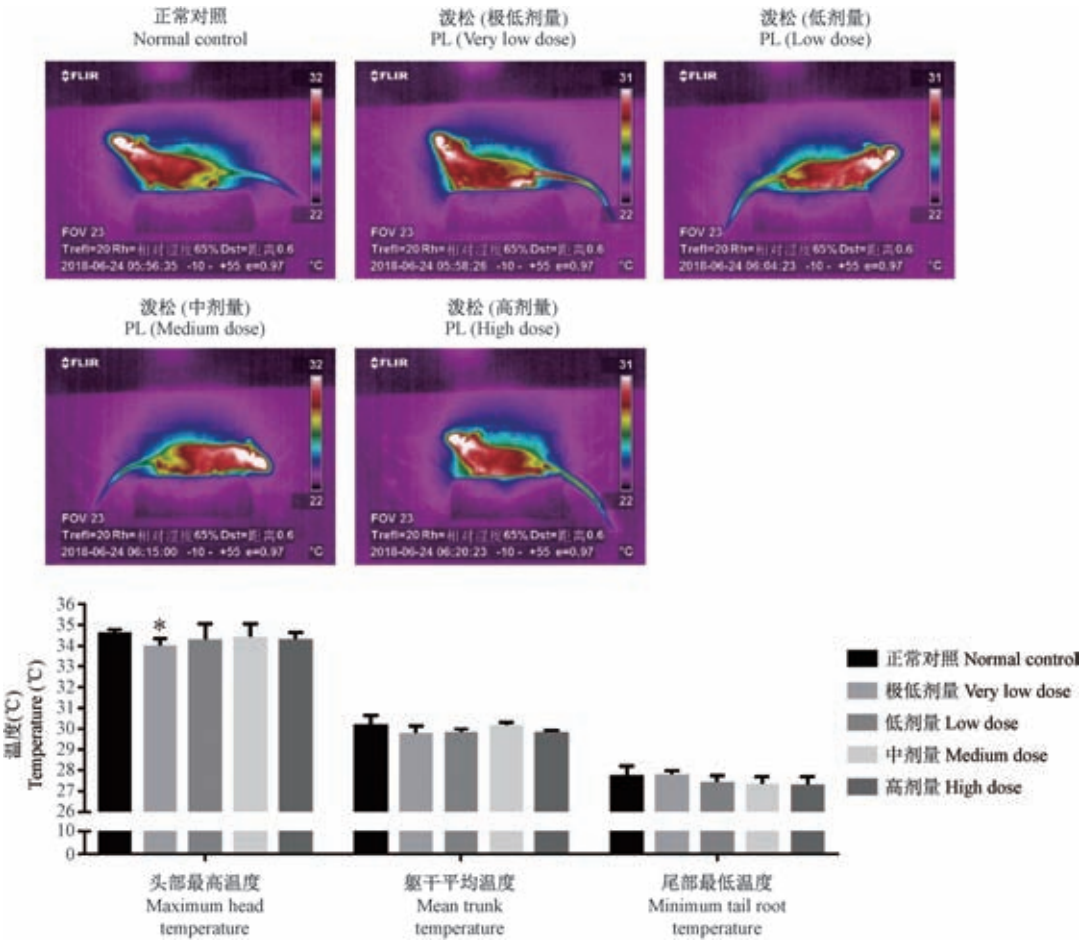
在动物实验方面也有部分红外热像技术运用的报道,袁永明等^[11]对寒证热证大鼠模型的红外热图进行了研究。马小鑫^[12]通过红外热像技术在大鼠上的实践建立了中药寒热药性的研究方法。孙丽斌等^[13]对红外热图与肿瘤中医证候相关性作了研究。提示红外热像技术是研究中医证候属性的一种有益技术手段。

3.3 本研究采用红外热像技术对糖皮质激素药源性虚证小鼠体表温度的分析

本课题前期做过多次探索,短期(4 d内)使用糖皮质激素药物体重显著下降阴虚见证显著。长期(7 d以上)使用糖皮质激素药物体重下降减缓,体表

温度下降等。两周为糖皮质激素影响的主要变化周期,两周后趋于稳定变化不大。实验中三个药物极低剂量即为临床药物参考用量按体重折算到小鼠所得,高剂量参考文献该药物造模常用量。低、中剂量则选取极低剂量和高剂量之间地合适剂量。

本研究运用红外热像技术检测了三种糖皮质激素造模后小鼠的体表温度变化。考虑到所采集图像信息能尽可能全面反映小鼠的体表温度差异,我们选择了拍摄小鼠自然站立状态下侧腹部整体轮廓图像,包括小鼠头面部、颈项部、侧腹部、全尾等区域温度,且背部与腹部的切缘温度可以有效显示。其中,小鼠头部的眼睛区域温度最高、尾部温度通常最低,而侧腹部温度从头到尾逐步降低。根据以上现象,我们选取了头部最高温度、躯干平均



注:不同剂量泼尼松龙:极低剂量(0.25 mg/(kg·bw))、低剂量(0.5 mg/(kg·bw))、中剂量(2.5 mg/(kg·bw))和高剂量(12.5 mg/(kg·bw))。另“泼松”即泼尼松龙。

图3 泼尼松龙小鼠红外热图以及数据柱状图

Note. Different doses of prednisolone; very low dose (0.25 mg/(kg·bw)), low dose (0.5 mg/(kg·bw)), medium dose (2.5 mg/(kg·bw)) and high dose (12.5 mg/(kg·bw)). “PL” means prednisolone.

Figure 3 Infrared heat map and data histogram of the prednisolone-treated mice

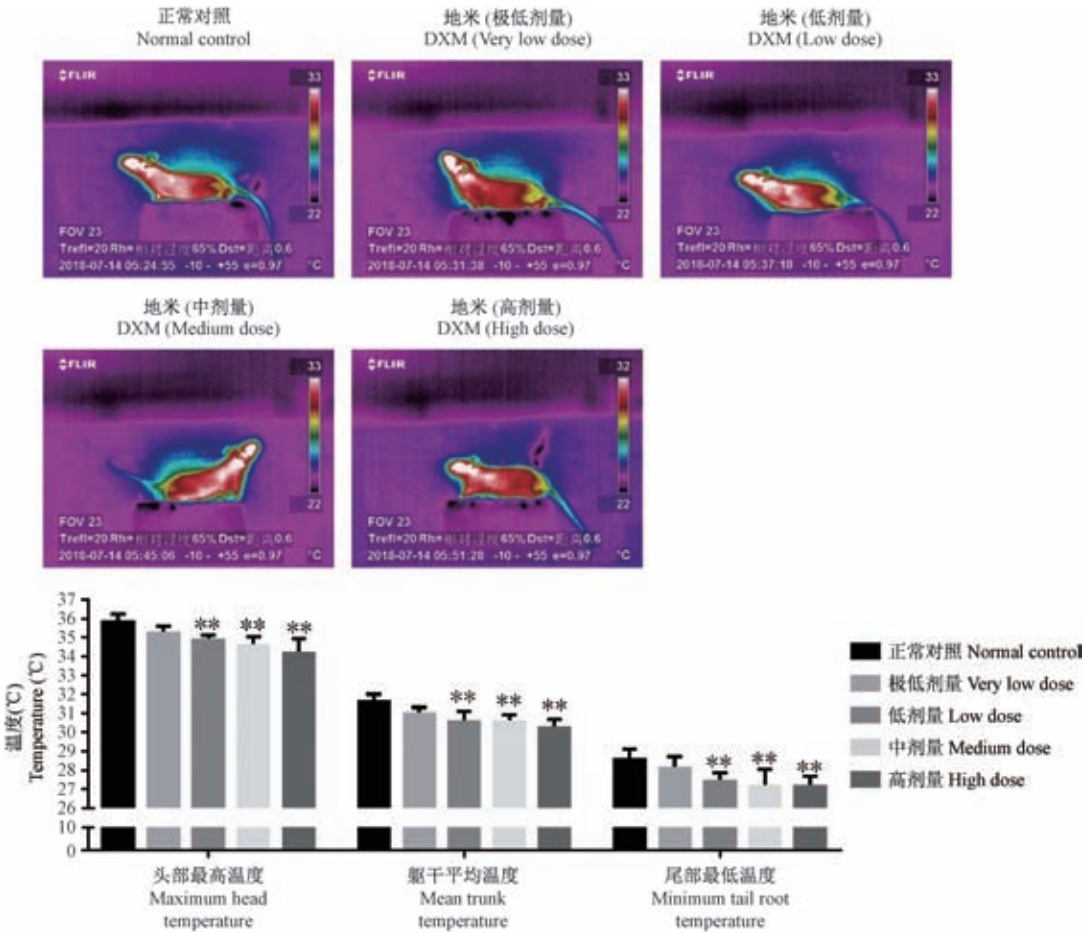
温度和尾根部最低温度三个指标进行分析。

结果表明,给予氢化可的松和地塞米松后小鼠头部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度均出现下降,而泼尼松龙对小鼠体表温度影响不明显。另外三批实验中我们也同步检测了小鼠的腋温、旷场活动度、体重等,腋温变化不显著,(故未给出具体数据),旷场活动度有一定程度的下降,体重在给药后下降7 d后下降减缓。另外由于糖皮质激素药理作用复杂,直接作用机体可能造成类似阴虚阳亢征兆,长期使用造成机体出现阳虚见证,具有直接和间接双重影响。中、高剂量下小鼠体表温度略有升高可能是由于氢化可的松直接作用机体造成,但是用药14 d后氢化可的松各剂量组体表温度均显著低于正常对照组是明确的。

基于本研究大量的实验数据,我们认为小鼠头

部最高温度、躯干平均温度和尾部最低温度三个指标可以反映出小鼠整体体表温度的变化,且这三个温度指标的变化具有一致性。其中,头部最高温度能更好反映小鼠是否有阳亢见证(是否头部温度过高),中医认为头为诸阳之会,所有的阳经都汇集到头部,小鼠头部体表温度最高符合中医理论;而尾根部最低温度反映小鼠的阳虚见证(是否尾根部温度过低);躯干平均温度则更加反映小鼠整体上的体表温度变化。此外,小鼠的体表最高与最低体温的温差、或头部温度高于平均温度的比值等相关转化指标也有助于深刻揭示温度变化的灵敏性,有待于深入探索。

由此得出结论(1)红外热像技术可以评估实验小鼠“阳”盛衰程度。(2)氢化可的松和地塞米松可诱发药源性虚证小鼠类似阳虚的外寒征象,且随



注:不同剂量地塞米松:极低剂量(0.0125 mg/(kg·bw))、低剂量(0.05 mg/(kg·bw))、中剂量(0.25 mg/(kg·bw))和高剂量(1.25 mg/(kg·bw))。另“地米”即地塞米松。

图 4 地塞米松小鼠红外热图以及数据柱状图

Note. Different doses of dexamethasone: very low dose (0.0125 mg/(kg·bw)), low dose (0.05 mg/(kg·bw)), medium dose (0.25 mg/(kg·bw)) and high dose (1.25 mg/(kg·bw)). “DXM” means dexamethasone.

Figure 4 Infrared heat map and data histogram of the dexamethasone-treated mice

着用药时间和剂量的增加而小鼠阳虚外寒征象越显著。

参 考 文 献(References)

[1] 陈振相,魏满良,殷风云. 对正常人面部红外线图的观察 [J]. 中国医药学报, 1991, 6(4): 8-9.
Chen ZX, Wei ML, Yin FY. The observation of infrared curve of normal people's face [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 1991, 6(4): 8-9.

[2] 倪金霞,高思华,田甜,等. 基于红外热像技术的健康人脏腑功能的可视化研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(10): 666-669.
Ni JX, Gao SH, Tian T, et al. Visualized study on functions of viscera and bowels in health people based on infrared thermal imaging technology [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(10): 666-669.

[3] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠/小鼠证候及辨证论治方法的探索与发展 [J]. 上海中医药大学学报, 2008, 22(4): 12-16.
Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Research and development on syndromes and methodology of syndromes differentiation and treatment in rats and mice [J]. J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2008, 22(4): 12-16.

[4] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠、小鼠辨证的思路与方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 53-59, 85.
Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Thoughts and methods of syndrome differentiation on rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(10): 53-59, 85.

[5] 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证方法的建立及其评价 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 502-505.
Fang ZQ, Pan ZQ, Lu WL, et al. Establishment and evaluation of quantitative syndrome differentiation method of common witness in rats and mice [J]. Chin J Basic Chin Tradit Med, 2007, 13(7): 502-505.

[6] 李国华,吴立新,吴森,等. 红外热像技术及其应用的研究进

- 展 [J]. 红外与激光工程, 2004, 33(3): 227-230.
- Li GH, Wu LX, Wu M, et al. Current status and applications of infrared thermography[J]. J Infrared Laser Eng, 2004, 33(3): 227-230.
- [7] 张城. 红外热成像技术原理及应用前景 [J]. 数字通信世界, 2017, 13(2): 126-127.
- Zhang C. Principle and application prospect of infrared thermal imaging technology [J]. J Digit Commun World, 2017, 13(2): 126-127.
- [8] 刘黎青, 周盛年, 刘斌. 中医辨证分型与红外热像舌图特征及温度负荷变化关系的研究 [J]. 中医杂志, 2002, 52(11): 851-852.
- Liu LQ, Zhou SN, Liu B. Study on relation of TCM syndrome types with characteristics and temperature load changes of infrared thermogram of the tongue [J]. J Tradit Chin Med, 2002, 52(11): 851-852.
- [9] 周娴, 黄碧群, 许艳巧, 等. 中医五脏寒热证素特征的红外热像图识别方法初探 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(11): 4849-4851.
- Zhou X, Huang BQ, Xu YQ, et al. Study on infrared thermogram recognizing methods of TCM five zang viscera cold and heat syndrome element characteristics [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(11): 4849-4851.
- [10] 李洪娟, 董继鹏, 沙莎, 等. 证候热力学研究初探 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(1): 42-45, 77.
- Li HJ, Dong JP, Sa S, et al. Syndrome thermodynamics research [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(1): 42-45, 77.
- [11] 袁永明, 陈晓, 潘志强, 等. 寒证 热证大鼠模型的红外热图研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2008, 51(5): 785-787.
- Yuan YM, Chen X, Pan ZQ, et al. Study on infrared heat map of rat model with cold syndrome and heat syndrome [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2008, 51(5): 785-787.
- [12] 马小鑫. 基于红外热成像技术对中药寒热药性研究的方法建立 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- Ma XX. Based on infrared thermal imaging technology for the study of cold and hot Chinese medicine [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2012.
- [13] 孙丽斌. 红外热图与肿瘤中医证候相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- Sun LB. Study on correlation between infrared heat map and TCM syndromes of tumors [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2006.

[收稿日期] 2019-03-21

张丰泉,董恩恒,薛玉雪. PM_{2.5}短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 740-746.
Zhang FQ, Dong EH, Xue YX. Effect and mechanism of short-term exposure to PM_{2.5} on the rat uterine injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 740-746.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.008

PM_{2.5} 短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制

张丰泉,董恩恒*,薛玉雪

(新乡医学院 公共卫生学院 新乡市大气污染健康效应与干预重点实验室,河南 新乡 453000)

【摘要】 目的 为研究 PM_{2.5}(空气动力学直径 $\leq 2.5\ \mu\text{m}$ 的颗粒物)短期暴露对大鼠子宫的损伤作用及可能的分子机制。**方法** 30只雌性SD大鼠随机分为生理盐水对照组、1.5 mg/(kg·bw)PM_{2.5}低剂量暴露组和6 mg/(kg·bw)PM_{2.5}高剂量暴露组,连续暴露30 d。HE染色病理学检查观察PM_{2.5}暴露后子宫组织损伤情况。采用TUNEL法和检测cleaved caspase-3蛋白表达量的方法观察各组大鼠子宫组织细胞凋亡情况。荧光定量PCR法检测子宫中葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、真核翻译起始因子2 α (eIF2 α)和C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA表达水平。Western blot检测子宫内质网应激相关蛋白表达水平。**结果** PM_{2.5}短期暴露后,子宫内膜上皮细胞萎缩,细胞间隙增大,且细胞出现空泡化;同时腺体也出现萎缩。TUNEL检测结果显示,对照组大鼠子宫组织细胞的凋亡率为(9.93 $\pm$ 1.66)%,低剂量和高剂量暴露组子宫组织细胞凋亡率分别为(29.40 $\pm$ 6.96)%和(43.58 $\pm$ 8.23)%,暴露组细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,暴露组子宫中GRP78、PERK、eIF2 α 和CHOP基因和蛋白表达水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。暴露组子宫cleaved caspase-3蛋白表达量明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** PM_{2.5}短期暴露可损伤大鼠子宫组织形态,其作用机制可能与PERK-eIF2 α -CHOP信号通路介导子宫组织发生内质网应激反应,进而诱导子宫组织细胞凋亡有关。

【关键词】 PM_{2.5};内质网应激;TUNEL;凋亡

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0740-07

Effect and mechanism of short-term exposure to PM_{2.5} on the rat uterine injury

ZHANG Fengquan, DONG Enheng*, XUE Yuxue

(Key Laboratory for Air Pollution Health Effects and Intervention of Xinxiang, School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China)

Corresponding author: DONG Enheng. E-mail: dongphmu@163.com

【Abstract】 Objective This study was designed to evaluate the effect of short-term exposure to the particulate matter with diameters that are generally 2.5 μm and smaller (PM_{2.5}) on the rat uterine injury, and to determine its mechanism. **Methods** Thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into: a control group, a 1.5 mg/kg body-weight (bw) low-dose PM_{2.5} exposure group and a 6 mg/(kg·bw) high-dose PM_{2.5} exposure group, all of which were followed for 30 days. The pathological uterine changes were observed with hematoxylin-eosin staining (HE staining). Uterine apoptosis was evaluated with the TUNEL method, and the expression levels of cleaved caspase-3 were measured. In addition, the mRNA expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), PER-like ER kinase (PERK), eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) and C/EBP homologous protein (CHOP) were measured with quantitative real-time PCR, and the protein levels involved in the PERK-eIF2 α -CHOP signal pathway were tested using western blot assay. **Results** After

[基金项目] 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN017)。
Funded by Support Program for Henan University Scientific and Technological Innovation Team (14IRTSTHN017).
[作者简介] 张丰泉(1985—),男,硕士,研究方向:颗粒物对健康的影响。Email: zhangfengquan29@126.com
[通信作者] 董恩恒(1978—),男,博士,研究方向:空气污染物生物效应、机制及干预措施。Email: dongphmu@163.com

short-term exposure, $PM_{2.5}$ resulted in atrophy and vacuolization of endometrial epithelial cells and glands. The apoptosis rates were $(9.93 \pm 1.66)\%$, $(29.40 \pm 6.96)\%$ and $(43.58 \pm 8.23)\%$ in the uteruses in the control, low-dose exposure and high-dose exposure groups, respectively. Furthermore, the apoptosis rate was significantly higher ($P < 0.05$) in the two exposure groups than in the control group. At the same time, the cleaved caspase-3 protein expression levels in the two exposure groups were significantly increased ($P < 0.05$). The results of qPCR and western blot showed that the mRNA and protein levels of GRP78, PERK, eIF2 α and CHOP in the two exposure groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** After short-term exposure to $PM_{2.5}$, the uterine structure of the rats is damaged, possibly as a consequence of $PM_{2.5}$ inducing uterine cell apoptosis via ERs, mediated by the PERK-eIF2 α -CHOP pathway.

【Keywords】 $PM_{2.5}$; endoplasmic reticulum stress; TUNEL; apoptosis

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

颗粒物(particulate matter, PM)是空气污染物的重要组成成分,按粒径分为总悬浮颗粒物(TSP)、可吸入颗粒物(PM_{10})、细颗粒物($PM_{2.5}$)和超细颗粒物($PM_{0.1}$)。研究证实 $PM_{2.5}$ 是多种疾病的重要危险因素,可诱发呼吸系统、心血管系统和代谢性疾病。流行病学调查结果显示, $PM_{2.5}$ 能够抑制胎儿发育,导致不良妊娠结局^[1-2],因而 $PM_{2.5}$ 被认为是生殖系统的危害因素之一。我们前期实验结果证实, $PM_{2.5}$ 急性暴露能影响妊娠结局,使雌鼠的不良妊娠率明显升高^[3]。但目前 $PM_{2.5}$ 生殖损伤的研究主要集中于流行病学调查方面,而其生殖损伤致病机理的研究还非常有限。

内质网不仅是细胞内蛋白质、脂类和糖类合成的基地,而且是细胞内重要的物质传输和信号传导通路。已有研究证实内质网应激与多种疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病、糖尿病等)的发生、发展相关^[4]。另有研究发现,内质网应激在 $PM_{2.5}$ 诱发肺、肝损伤中被激活,是 $PM_{2.5}$ 致肺脏和肝脏损伤的重要作用机制^[5]。最新的研究发现,内质网应激同样在 $PM_{2.5}$ 的斑马鱼胚胎发育损伤中起重要作用^[6]。内质网应激能够激活促凋亡基因 caspase-3 进而诱发细胞凋亡。已有研究证实凋亡是子宫细胞死亡的重要方式,对子宫起重要调节作用^[7-8]。本研究中将雌鼠暴露 $PM_{2.5}$ 后,检测子宫组织内质网应激信号通路相关蛋白及其下游凋亡调控蛋白 caspase-3 的表达情况,进而阐述内质网应激在 $PM_{2.5}$ 生殖毒性中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

30 只 8 周龄清洁级雌性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司

【SCXK(京)2012-0001】,饲养于新乡医学院屏障动物房**【SYXK(豫)2014-0005】**,室温 22 ~ 24℃,12 h/12 h 昼夜交替,相对湿度 50% ~ 60%,适应性喂养 1 周。所有操作均符合实验动物福利和伦理委员会的要求(XXMU-2015-0021)。

1.1.2 主要仪器和试剂

荧光定量 PCR 仪(LightCycler 96, Roche, 瑞士),蛋白垂直电泳系统(Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, 美国),凝胶成像分析系统(FluorChem R, ProteinSimple, 美国),显微镜(AE2000, 麦克奥迪, 中国),TUNEL 原位染色试剂盒(TACS·XL DAB Kit, Trevigen, 美国),TRIzol 和荧光定量 PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司,GRP78、PERK、CHOP、eIF2 α 和 cleaved caspase-3 一抗购于 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组

参考已有研究设计本次实验 $PM_{2.5}$ 暴露剂量。将 30 只雌鼠随机分为生理盐水对照组(Con)、1.5 mg/(kg·bw) $PM_{2.5}$ 低剂量暴露组(L-Exp)和 6 mg/(kg·bw) $PM_{2.5}$ 高剂量暴露组(H-Exp)^[9],每组 10 只。

1.2.2 $PM_{2.5}$ 染毒

将收集的 $PM_{2.5}$ 配置成 3 mg/mL 低浓度和 12 mg/mL 高浓度悬液,配置方法参照我们前期的实验^[3]。将制备的 $PM_{2.5}$ 悬液复温重悬后,参照晋乐飞等^[10]吸入式气管暴露法进行 $PM_{2.5}$ 染毒。大鼠麻醉后,用棉线绳挂住大鼠上切牙将大鼠垂直悬挂,镊子拉出大鼠舌头,吸取 50 μ L/100(g·bw) $PM_{2.5}$ 悬液注入大鼠舌根部,并快速捏紧大鼠鼻腔,迫使大鼠经口腔将 $PM_{2.5}$ 液吸入肺内,当听到肺部湿罗音表示吸入成功。染毒后,大鼠自由活动,连续染毒 30 d。对照组采用同样的方法吸入 50 μ L/100(g·bw)的生理盐水。

1.2.3 子宫组织病理学观察

取新鲜组织用生理盐水漂洗,4%多聚甲醛固定,酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切成 5~6 μm 厚的切片,常规 HE 染色,显微镜下观察子宫组织病理学变化。

1.2.4 子宫组织细胞凋亡检测

采用 TUNEL 原位染色法检测子宫组织细胞凋亡情况。常规方法将子宫组织石蜡切片脱蜡、复水处理,然后严格按照试剂盒说明进行组织切片标记染色。滴加 2%蛋白酶 K(V/V),室温孵育 15 min,去离子水漂洗 2 次(每次 5 min)。3% H₂O₂(V/V)浸润 5 min 以灭活组织中的过氧化氢酶,去离子水漂洗 1 min。滴加 50 μL 混合标记试剂,湿盒中 37℃ 孵育 1 h,然后加入 100 μL 反应终止液,PBS 漂洗 2 次,每次 2 min。切片上滴加 50 μL 抗液体,湿盒中 37℃ 孵育 30 min,PBS 漂洗 2 次。滴加 50 μL

Strep-HRP 液,湿盒中室温孵育 10 min,PBS 漂洗 2 次,然后加入 100 μL DAB 液显色 3 min,去离子水漂洗 2 次,每次 2 min。1%甲基绿复染 30 s,然后梯度酒精脱水、二甲苯浸润透明、封片,显微镜下观察计数凋亡细胞。在×200 镜下每张切片随机选择 5 个视野,计数细胞总数和凋亡细胞数,计算细胞的凋亡率,每组计数 6 个样本。

1.2.5 子宫组织中内质网应激相关基因和 caspase-3 mRNA 表达检测

TRIzol 试剂盒提取子宫组织总 RNA,反转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 法检测 GRP78、PERK、CHOP 和 eIF2α mRNA 表达水平。目的基因引物序列见表 1。扩增反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 20 s,45 个循环。用 2^{-ΔΔCT} 值计算目的基因的相对表达量。每组检测 6 个样本。

表 1 荧光定量 PCR 目的基因引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes for Real-Time PCR

基因 Gene	上游引物 Forward	下游引物 Reverse
GRP78	CCTGTTGCTGGA	GAATACACCGACGAGGAAT
PERK	AGGAACATCGTAGGGCTTT	GAGTTGCAGACCCGAGCTAC
CHOP	GAGAAGGAGCAGGAGAAC	GACAGACAGGAGGTGATG
eIF2α	TTTAAGGGAGTGGCTTGATT	AGGTTGGGATTGTTGCTGTC
β-actin	GATCTGGCACCACCTTCT	GGGGTGTGAAGGCTCTCAA

1.2.6 子宫组织中内质网应激相关蛋白和 cleaved caspase-3 蛋白表达检测

提取子宫组织中的总蛋白,并用 BCA 试剂盒测定样品蛋白含量。取 25 μg 蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,将目的蛋白分别转膜至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1.5 h,加入 GRP78 一抗(1:200)、PERK 一抗(1:500)、eIF2α 一抗(1:500)、CHOP 一抗(1:300)、cleaved caspase-3 一抗(1:500)、β-actin 一抗(1:3000),4℃ 孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5000)室温孵育 90 min,ECL 发光,凝胶成像系统成像并分析。每组检测 6 个样本。

1.3 统计学分析

SPSS 19.0 进行统计学分析,实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较时,方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Tamhane's T2 法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 子宫组织病理学改变

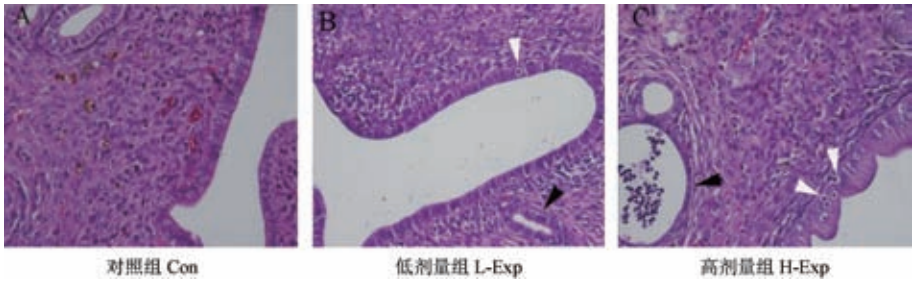
不同剂量 PM_{2.5} 暴露后,雌鼠子宫组织的病理

学改变见图 1。对照组可观察到正常的子宫内膜单层柱状上皮细胞,且排列比较紧密和结构完整的腺体;同时固有层中含有丰富的基质细胞(图 1A)。低剂量暴露组子宫内膜上皮细胞发生不同程度的萎缩,细胞间隙增大,且少数细胞出现空泡化;腺体细胞同样发生萎缩变薄(图 1B)。高剂量组子宫内膜上皮进一步萎缩,空泡化细胞增多;腺体细胞萎缩更严重(图 1C)。

2.2 子宫组织细胞凋亡检测结果

镜下观察组织细胞如发生凋亡会被 TUNEL 染成深褐色(见图 2)。对照组大鼠子宫组织细胞的凋亡率为(9.93±1.66)%,低剂量暴露组子宫组织细胞凋亡率为(29.40±6.96)%。与对照组相比,低剂量暴露组细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。高剂量暴露组细胞凋亡率为(43.58±8.23)%,其凋亡率明显高于对照组($P < 0.01$)和低剂量组($P < 0.05$)。

2.3 PM_{2.5} 对子宫组织 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP mRNA 表达水平的影响

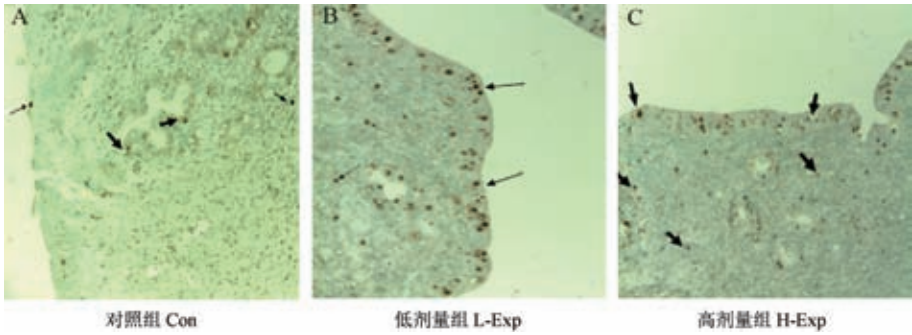


注:白色箭头:空泡化的上皮细胞;黑色箭头:萎缩的腺体。

图 1 子宫组织病理学改变(×400)

Note. White arrow, vacuolated epithelial cells. Black arrow, atrophic glands.

Figure 1 Pathological changes in the uterine tissues(×400)



注:黑色箭头:凋亡细胞。

图 2 TUNEL 凋亡检测结果(×200)

Note. Black arrows, apoptotic cells.

Figure 2 Detection of apoptosis in the uterine tissues(TUNEL staining,×200)

子宫内质网应激相关基因 mRNA 相对表达量见图 3。与对照相比,低剂量和高剂量 PM_{2.5}暴露组大鼠子宫 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP mRNA 表达量均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

与低剂量暴露组相比,高剂量暴露组中 GRP78、PERK mRNA 的相对表达量明显升高($P<0.05$);CHOP 和 eIF2α 表达量虽高于低剂量暴露组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 PM_{2.5}对子宫组织内质网应激相关蛋白和cleaved caspase-3 蛋白表达水平的影响

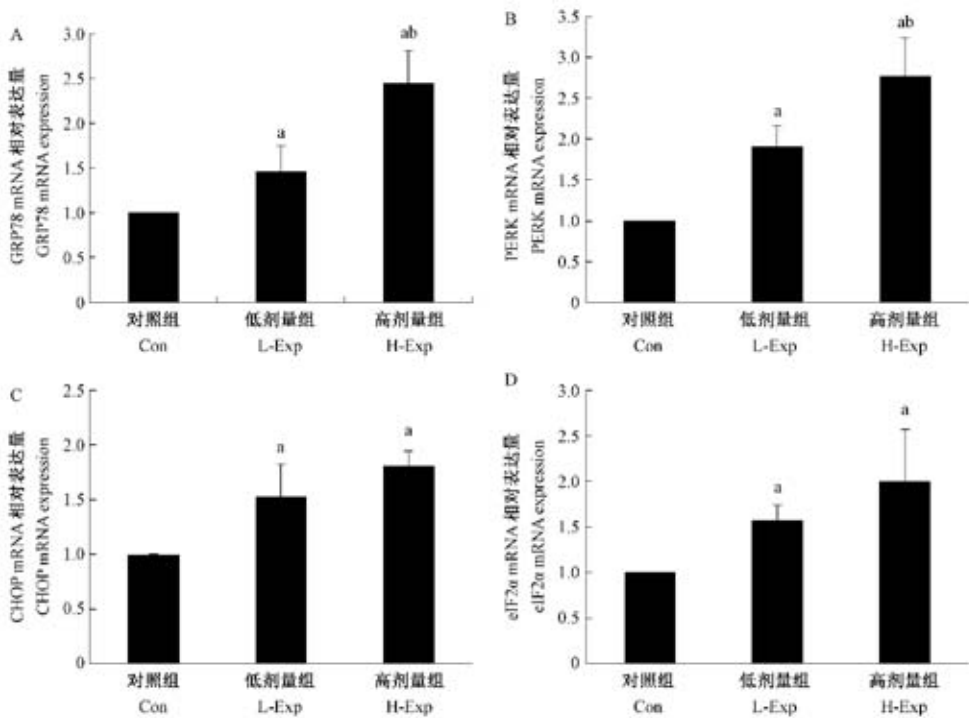
短期 PM_{2.5}暴露后,低剂量和高剂量暴露组大鼠子宫中内质网应激相关蛋白 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP 的蛋白表达量均明显高于对照组($P<0.05$)(图 4A-D)。与低剂量暴露组相比,高剂量暴露组中 GRP78、PERK 和 eIF2α 蛋白表达量明显升高($P<0.05$);CHOP 表达量虽高于低剂量暴露组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

与对照组相比,低剂量和高剂量暴露组子宫中cleaved caspase-3 蛋白的表达量均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4E)。

3 讨论

研究指出,随着空气污染的持续,空气污染相关疾病的发病率和死亡率将不断升高,到 2050 年时每年将有 660 万人死于空气污染相关疾病^[11]。越来越多的研究显示,孕期暴露 PM_{2.5}对胎儿的发育和分娩产生不良的影响^[1-2,12-13]。Son 等^[14]的研究指出,PM_{2.5}暴露可使新生儿死亡率升高 2.66 倍。另有研究结果显示,妊娠期暴露 PM_{2.5}仅对新生儿出生体重有明显影响,但对妊娠周期没有影响,不会造成新生儿早产($OR = 0.86$)^[15]。但也有研究结果却显示 PM_{2.5}对妊娠结局没有影响^[16]或影响非常有限^[17]。目前 PM_{2.5}的生殖毒性以及其对妊娠结局影响的研究结果存在差异性和不一致性的原因可能与调查对象所处妊娠时期、暴露 PM_{2.5}浓度和时长以及不同地区 PM_{2.5}所含化学成分不同等有关。虽然我们早期的实验证实,PM_{2.5}暴露对妊娠结局有不良影响^[3],但目前 PM_{2.5}生殖毒性的作用机制还不太清楚。

目前关于空气中 PM_{2.5}对机体损伤效应的实验大多是急性毒性实验,为了研究更长时间 PM_{2.5}暴

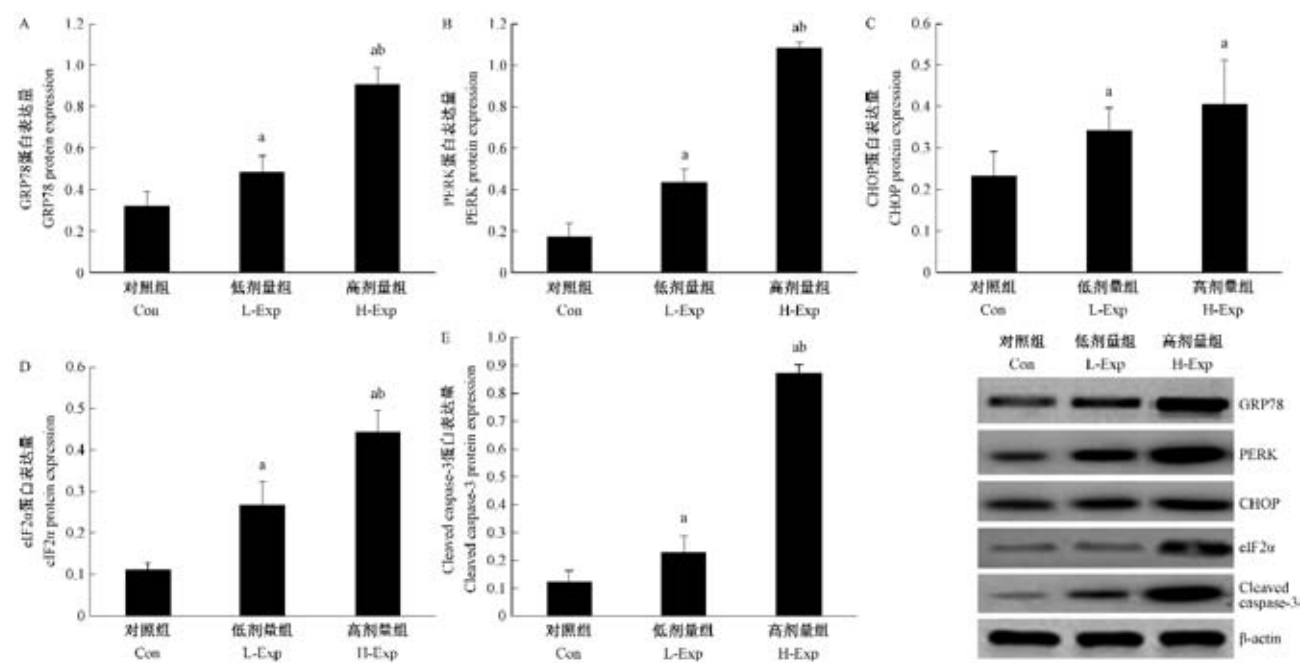


注：与对照组相比，^a*P* < 0.05；与低剂量暴露组相比，^b*P* < 0.05。

图 3 PM_{2.5}对 GRP78、PERK、CHOP 和 eIF2α mRNA 表达的影响

Note. Compared with the control group, ^a*P* < 0.05. Compared with the L-Exp group, ^b*P* < 0.05.

Figure 3 Effects of PM_{2.5} on the mRNA expressions of GRP78, PERK, CHOP and eIF2α



注：与对照组相比，^a*P* < 0.05；与低剂量暴露组相比，^b*P* < 0.05。

图 4 PM_{2.5}对子宫内质网应激相关蛋白和 cleaved caspase-3 蛋白表达的影响

Note. Compared with the control group, ^a*P* < 0.05. Compared with the L-Exp group, ^b*P* < 0.05.

Figure 4 Effects of PM_{2.5} on the expression of protein of endoplasmic reticulum stress and cleaved caspase-3

露的毒性作用,本次实验将 SD 雌鼠的暴露时间延长为 30 d 的短期暴露,从而观察 $PM_{2.5}$ 对雌鼠子宫损伤效应。 $PM_{2.5}$ 短期暴露后,雌鼠子宫组织结构发生了明显的病理损伤变化,造成子宫内膜上皮细胞萎缩,细胞间隙增大,且细胞出现空泡化;同时腺体也出现萎缩现象(见图 1),由此结果可见空气中 $PM_{2.5}$ 短期暴露对子宫组织结构有损伤, $PM_{2.5}$ 具有生殖毒性。

已有研究证实 $PM_{2.5}$ 可通过活化 T-细胞免疫蛋白和 TIM 蛋白,进而诱发肺组织凋亡^[18]。Yang 等^[19]的研究发现,心肌细胞暴露 $PM_{2.5}$ 后,细胞中的氧化应激水平升高,触发 bcl-2-bax-caspase-3 凋亡信号,进而诱发心肌细胞凋亡。由此可见 $PM_{2.5}$ 可通过多途径诱导组织细胞发生凋亡。本次研究中我们采用 TUNEL 法检测雌鼠短期暴露 $PM_{2.5}$ 后子宫组织细胞凋亡情况。实验结果表明,低剂量和高剂量 $PM_{2.5}$ 暴露组细胞凋亡率均明显高于对照组。caspase-3 是 caspase 家族中具有重用凋亡调控重用的蛋白,也是内质网应激信号通路下游重要的凋亡调节蛋白,而 cleaved caspase-3 蛋白是反映凋亡的标志蛋白。本实验中为了验证子宫细胞凋亡的发生,我们同时检测了子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达水平。实验结果表明,低剂量和高剂量 $PM_{2.5}$ 暴露组子宫 cleaved caspase-3 蛋白表达量明显高于对照组(结果见图 4E),与 TUNEL 检测结果相一致。由以上结果可知短期暴露 $PM_{2.5}$ 可诱导子宫细胞发生凋亡,进而推测 $PM_{2.5}$ 生殖损伤作用可能与其诱发的细胞凋亡有关。

内质网不仅是合成和分泌蛋白的场所,同时还可介导细胞的凋亡信号通路^[20]。内质网功能混乱会使未折叠或错误折叠的蛋白堆积于细胞内,并诱发内质网应激反应。过强的内质网应激导致细胞发生未折叠蛋白质应答反应(UPR),进而触发细胞内的凋亡信号传导通路,诱发细胞凋亡。UPR 主要受到跨膜蛋白如 PERK、肌醇酶 1(IRE1)和活化转录因子 6(ATF6)调控。这些跨膜蛋白通常是以与 GRP78 结合的复合形态存在于内质网膜上。当未折叠蛋白过度堆积时,GRP78 会与跨膜蛋白分离后与未折叠蛋白结合,进而导致内质网应激和 UPR^[21]。PERK 是内质网膜上的一种感受蛋白,在 UPR 初期可以调控蛋白的合成减轻内质网应激。在内质网应激过程中,PERK 与 GRP78 分离后,进而增加促凋亡蛋白 CHOP 的表达,最终活化

caspase-3 从而激活细胞凋亡信号通路,促使细胞发生凋亡^[22]。PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路是重要的内质网应激反应通路。Laing 等^[5]研究发现 $PM_{2.5}$ 通过 PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路介导的内质网应激诱发肺和肝脏组织细胞凋亡。为了探究内质网应激在 $PM_{2.5}$ 诱导子宫组织凋亡中的作用,本实验中我们检测了 PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路中的关键蛋白的表达情况。雌鼠暴露 $PM_{2.5}$ 后,子宫中 GRP78、PERK、eIF2 α 和 CHOP 在 mRNA 和蛋白水平的表达水平均明显升高(结果见图 2 和 3),由此实验结果可知短期暴露 $PM_{2.5}$ 可使内质网应激信号通路中 GRP78、PERK、eIF2 α 和 CHOP 蛋白表达水平升高,激活 PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路。

综合本次实验结果,我们推测短期暴露 $PM_{2.5}$ 对子宫的损伤作用可能与 PERK-eIF2 α -CHOP 信号通路介导子宫组织发生内质网应激反应,并诱导子宫组织细胞发生凋亡有关。但本次实验中未对内质网应激中其他信号通路中的关键蛋白进行检测,不能确定短期暴露 $PM_{2.5}$ 是否会通过其他信号通路诱发内质网应激,因而在之后的实验中还需进一步验证。

参 考 文 献(References)

- [1] Zhu X, Liu Y, Chen YY, et al. Maternal exposure to fine particulate matter ($PM_{2.5}$) and pregnancy outcomes: a meta-analysis [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22 (5): 3383-3396.
- [2] Malley CS, Kuylensstierna JC, Vallack HW, et al. Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment [J]. Environ Int, 2017, 101: 173-182.
- [3] 张丰泉,董恩恒,王茂,等. $PM_{2.5}$ 对雌鼠生殖内分泌水平和妊娠结局的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25 (4): 455-460.
Zhang FQ, Dong EH, Wang M, et al. Effects of $PM_{2.5}$ on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in female rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4): 455-460.
- [4] Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease [J]. J Clin Invest, 2002, 110(10): 1389-1398.
- [5] Laing S, Wang G, Briazova T, et al. Airborne particulate matter selectively activates endoplasmic reticulum stress response in the lung and liver tissues [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(4): C736-749.
- [6] Zhang Y, Li S, Li J, et al. Developmental toxicity induced by $PM_{2.5}$ through endoplasmic reticulum stress and autophagy pathway in zebrafish embryos [J]. Chemosphere. 2018, 197: 611-621.

- [7] Burroughs KD, FuchsYoung R, Davis B, et al. Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development of uterine leiomyomas in the rat [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(5):1322-1330.
- [8] Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez Md Mde L, et al. Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(4): 445-452.
- [9] Li R, Kou X, Geng H, et al. Effect of ambient PM_{2.5} on lung mitochondrial damage and fusion/fission gene expression in rats [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(3):408-418.
- [10] 晋乐飞, 吴卫东, 张巧, 等. 吸入式气管滴注法的建立 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015, 50(1):75-78.
- Jin Y, Wu W, Zhang Q, et al. Establishment of an inhalable intratracheal instillation [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2015, 50(1): 75-78.
- [11] Lelieveld J, Evans JS, Fnais M, et al. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale [J]. *Nature*, 2015, 525 (7569): 367-371.
- [12] Stillerman KP, Mattison DR, Giudice LC, et al. Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: a review of the science [J]. *Reprod Sci*, 2008, 15(7): 631-650.
- [13] Goyal N, Canning D. Exposure to ambient fine particulate air pollution in utero as a risk factor for child stunting in Bangladesh [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 15(1): 22.
- [14] Son JY, Lee HJ, Koutrakis P, et al. Pregnancy and lifetime exposure to fine particulate matter and infant mortality in Massachusetts, 2001-2007 [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 186(11):1268-1276.
- [15] Kingsley SL, Eliot MN, Glazer K, et al. Maternal ambient air pollution, preterm birth and markers of fetal growth in Rhode Island: results of a hospital-based linkage study [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2017, 71(12):1131-1136.
- [16] Maisonet M, Correa A, Misra D, et al. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth [J]. *Environ Res*, 2004, 95(1): 106-115.
- [17] Gehring U, Wijga AH, Fischer P, et al. Traffic-related air pollution, preterm birth and term birth weight in the PIAMA birth cohort study [J]. *Environ Res*, 2011, 111(1):125-135.
- [18] Zhao YX, Zhang HR, Yang XN, et al. Fine particulate matter-induced exacerbation of allergic asthma via activation of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131(20): 2461-2473.
- [19] Yang X, Feng L, Zhang Y, et al. Cytotoxicity induced by fine particulate matter (PM_{2.5}) via mitochondria-mediated apoptosis pathway in human cardiomyocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 161: 198-207.
- [20] Hawes C, Kiviniemi P, Kriechbaumer V. The endoplasmic reticulum: a dynamic and well-connected organelle [J]. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(1): 50-62.
- [21] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102.
- [22] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1071-1082.

[收稿日期] 2019-05-06

李媛媛,周海燕,吴绿英,等.大鼠高尿酸血症模型的建立与研究[J].中国实验动物学报,2019,27(6):747-752.

Li YY, Zhou HY, Wu LY, et al. Establishment and study of a hyperuricemia rat model[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 747-752.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.009

大鼠高尿酸血症模型的建立与研究

李媛媛,周海燕,吴绿英,莫贤炜,李晶*

(华南理工大学生物科学与工程学院,广州 510006)

【摘要】 目的 建立一种大鼠高尿酸血症模型,并探讨高尿酸血症是否会产生继发性心血管疾病。**方法** 将SPF级雄性SD大鼠32只随机分成正常对照组(Group C),氧嗪酸钾模型组(Group M1),氧嗪酸钾联合高糖高脂饲料模型组(Group M2),氧嗪酸钾联合酵母膏饲料模型组(Group M3),每组8只,连续造模3周。通过比较大鼠的血清尿酸(uric acid,UA),尿素氮(blood urea nitrogen,BUN),肌酐酸(creatinine,Cr),胰岛素(insulin,INS),血糖(blood glucose,GLU),甘油三酯(triglyceride,TG)等指标,并辅以病理学检查结果来对大鼠高尿酸血症模型进行研究。**结果** 给予750 mg/kg体重氧嗪酸钾灌胃联合酵母膏饲料复制出的高尿酸血症模型大鼠,具有UA水平显著升高($P<0.01$)、维持时间长、3/8大鼠的肾发生病变的特点,在产生高尿酸血症的同时还伴有GLU、INS和TG水平改变及3/8大鼠心脏的病变,提示继发性心血管病变的发生。**结论** 氧嗪酸钾灌胃联合酵母膏饲料造模方法较单纯氧嗪酸钾造模更适用于大鼠长期高尿酸血症模型的建立,同时还伴随着继发性血糖紊乱的发生,因此该造模方案可用于高尿酸血症与心血管疾病的相互干预机制研究的动物模型,并进一步应用于高尿酸血症的治疗药物的临床前药效学综合评价。

【关键词】 氧嗪酸钾;高尿酸血症;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0747-06

Establishment and study of a hyperuricemia rat model

LI Yuanyuan, ZHOU Haiyan, WU Lyuying, MO Xianwei, LI Jing*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Corresponding author: LI Jing. E-mail: lij@scut.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a rat model of hyperuricemia, and explore the possible secondary cardiovascular disease that could be induced by hyperuricemia in the model rats. **Methods** 32 male SD rats were randomly divided into control group (Group C), potassium oxonate model group (Group M1), potassium oxonate combined with high-sugar model group (Group M2), potassium oxonate combined with yeast extract feed model group (Group M3), 8 rats were treated in each group for 3 weeks. At the end of the experiment, the serum levels of uric acid (UA), blood urea nitrogen, creatinine, insulin (INS), blood glucose (GLU) and triglyceride (TG) were measured, and histopathological examination of liver, renal, and heart tissue was performed. **Results** Compared with the control group, a significant increase in serum levels of UA ($P<0.01$) and the number of rats showing renal lesions was found in the experimental group (3/8, 37.5%) after oral administration of potassium oxonate at a dose of 750 mg/kg, combined with yeast extract feed (Group M3). Also, the changes in GLU, INS, TG and the histopathology of heart tissue (3/8, 37.5%) suggesting that rats in this group had secondary cardiovascular alterations. **Conclusions** Compared with the basic potassium oxonate model, the model of potassium oxonate combined with yeast extract feed is more suitable for the study of rat chronic hyperuricemia, accompanied by glucose metabolic impairment. It can also be used in rat models to establish mutual

【基金项目】广州市科技计划项目资助(201704020036),中央高校基本科研业务费项目(2019MS090)。

Funded by Guangzhou Science Technology and Innovation Commission (201704020036), and Fundamental Research Funds for the Central Universities (2019MS090).

【作者简介】李媛媛(1994—)女,硕士研究生,研究方向:药理学与药代动力学研究。Email: 670267110@qq.com

【通信作者】李晶(1980—)女,副教授,硕士生导师,研究方向:新药设计与活性评价。Email: lij@scut.edu.cn

intervention mechanisms between hyperuricemia and cardiovascular disorders, and be applied in comprehensive preclinical pharmacodynamic evaluation of therapeutic drugs for hyperuricemia.

【Keywords】 potassium oxonate; hyperuricemia; animal model; rat

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

高尿酸血症(hyperuricemia)是嘌呤代谢紊乱和(或)尿酸排泄减少,致血液中尿酸浓度不正常升高的现象,一般认为人类体内血尿酸盐达到 $416\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时应考虑高尿酸血症^[1]。高尿酸血症为嘌呤代谢紊乱性疾病^[2-3],过量糖、脂肪、蛋白质、盐的摄入及大量饮酒与患病率增加有重要关系。

近年来,随着人们生活水平的不断提高,饮食结构和生活习惯的改变,高尿酸血症的发病率呈逐年上升趋势,发病年龄呈现低龄化^[4]。一些研究结果表明,血尿酸升高与肾疾病、高血压、动脉粥样硬化程度、脑卒中、心血管事件的发生率和死亡率等呈独立正相关,同时,一些心血管病患者的尿酸也随着病情的发展相应增加^[5-6]。有学者对西班牙1564名健康男性进行研究,多因素回归分析结果显示,高尿酸血症与血糖、肥胖明显相关,比值分别为2.69和2.5^[7]。目前国内外已经有许多学者进行高尿酸血症动物模型的造模研究,但有关高尿酸血症是否影响心血管系统并进而引发继发性病变的造模研究尚少。

本文采用氧嗪酸钾联合高糖高脂饲料及氧嗪酸钾联合酵母膏饲料进行造模,通过血清尿酸(uric acid,UA)、尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、肌酐酸(creatinine,Cr)水平的检测来考察与评价其建立持续、稳定的大鼠高尿酸实验动物模型的可行性,并同时采用胰岛素(insulin,INS),血糖(glucose,GLU),甘油三酯(triglyceride,TG),低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)等指标来比较不同高尿酸血症造模法对心血管的继发性损害的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠32只,7~9周龄,体重(180 ± 20)g,购自广州中医药大学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0034】。动物模型的指标及标本的采集均在广东药科大学实验动物中心SPF级鼠类实验室进行【SYXK(粤)2017-0125】,且经广东药科大学实验动物中心伦理委员会审批(受理编号:

SPF2017097)。标准鼠笼饲养温度 $20\sim 26^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\%\sim 70\%$,以普通饲料适应性喂养一周。

普通饲料由广东药科大学实验动物中心提供,高糖高脂饲料(63.0%大小鼠维持饲料、20.0%蔗糖、15.0%猪油、1.2%胆固醇、0.2%胆酸钠,适量的酪蛋白、磷酸氢钙、石粉等)购自南通特洛菲饲料科技有限公司,酵母菌饲料为酵母膏按照1:4均匀拌入粉碎的普通饲料中混匀而成,压制成颗粒,辐射灭菌,由南通特洛菲饲料科技有限公司制作。

1.1.2 试剂与仪器

酵母膏购自北京奥博星生物科技有限公司,氧嗪酸钾购自上海源叶生物科技有限公司。UA、Cr、BUN、GLU、INS等指标均由广州市第十二人民医院检验科进行检测(UA、Cr、BUN、GLU:全自动生化分析仪,西门子ADVIA2400;INS:罗氏电发光分析仪,COBAS602);大鼠心脏、肾、肝等组织委托武汉赛维尔生物科技有限公司进行HE染色。

1.2 方法

将32只SPF级雄性SD大鼠随机分成正常对照组(Group C),氧嗪酸钾模型组(Group M1),氧嗪酸钾联合高糖高脂饲料模型组(Group M2),氧嗪酸钾联合酵母膏饲料模型组(Group M3),每组8只,连续造模3周。三个模型组每日按照 750 mg/kg 体重给予氧嗪酸钾灌胃,C组按同体积溶媒(0.5%CMC-Na)灌胃。同时,C组及M1组给予普通饲料喂养,M2组给予高糖高脂饲料喂养,M3组给予酵母膏饲料喂养,实验连续21d。每7天大鼠禁食不禁水12h,经乙醚麻醉后进行眼内眦取血2mL,室温静置2h后离心分离(4000 r/min ,10min, 4°C),取上层血清 -80°C 保存待测。第21天实验前动物禁食不禁水12h后,各组大鼠经腹腔麻醉后,经腹主动脉取血,室温静置2h后离心分离(4000 r/min ,10min, 4°C),取上层血清 -80°C 保存待测。取血后,立即取大鼠心脏、肾、肝置于福尔马林杯,加入4%甲醛溶液浸泡,待测。

1.3 统计学分析

计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。所有的数据均采用SPSS 19.0统计软件进行处理,以

$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

4 组大鼠实验开始时(第 0 天)体重无统计学意义($P>0.05$)。实验第 10 天开始,M3 组动物毛发光滑性较其他三组较差,且粪便明显增多(更换垫料次数增多),并伴有刺鼻的酸臭味,同时各模型组大鼠均有表现精神萎靡,食欲不振,且敏感易怒。在整个实验周期里,4 组大鼠体重同步增加,组间无明显差异($P>0.05$,表 1)。

2.2 UA、BUN 及 Cr 的变化情况

如表 2 所示,与正常对照组相比,其他三组自实验第 7 天测得的血尿酸水平较正常组明显升高,提示本实验采用的氧嗪酸钾灌胃法造模成功($P<0.05$)。此外,随着实验进行,造模组的血尿酸水平持续升高,在实验终点(第 21 天),所有造模组的血

尿酸水平较正常组提高约 2 倍,且模型三组组间比较无显著性差异。但造模三组大鼠的 Cr 及 BUN 在整个实验中均未表现出较正常对照组的明显改变($P>0.05$,见表 3,4)。

2.3 血糖血脂相关血清指标的变化

实验终点日取血测定大鼠的 GLU、INS、TG 及 LDL-C 水平,结果如表 5 所示。与正常组相比,虽无显著性差异,但造模三组均表现出不同程度的 GLU 水平升高和相应的 INS 水平降低趋势,其中 M2 和 M3 组的 INS 水平与 C 组相比有明显差异($P<0.05$),而三个模型组之间无显著性差异;与正常组相比,造模三组均表现出不同程度的 TG 水平提高,其中 M2 组的差异最具显著性($P<0.01$),M3 组的 TG 水平明显高于 M1 组,但在本实验中,仅有 M2 组能观察到 LDL-C 水平的明显升高($P<0.01$)。其他三组两两相比均无显著性差异。

表 1 4 组大鼠不同时间体重的变化($g, \bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Changes in body weight of the 4 groups of rats at different times ($g, \bar{x} \pm s, n=8$)							
组别 Groups	0 天 Day 0	3 天 Day 3	7 天 Day 7	11 天 Day 11	15 天 Day 15	18 天 Day 18	21 天 Day 21
C 组 Group C	214.6 $\pm$ 7.6	246.0 $\pm$ 8.7	269.0 $\pm$ 11.6	293.3 $\pm$ 14.7	313.5 $\pm$ 12.5	325.3 $\pm$ 12.8	338.8 $\pm$ 15.6
M1 组 Group M1	212.2 $\pm$ 9.4	246.2 $\pm$ 18.7	267.2 $\pm$ 21.8	291.6 $\pm$ 30.6	307.2 $\pm$ 37.6	316.4 $\pm$ 38.8	321.6 $\pm$ 45.1
M2 组 Group M2	214.0 $\pm$ 9.6	238.2 $\pm$ 10.4	264.4 $\pm$ 16.9	296.2 $\pm$ 18.9	320.6 $\pm$ 20.5	330.8 $\pm$ 22.3	338.8 $\pm$ 21.9
M3 组 Group M3	210.8 $\pm$ 9.2	256.0 $\pm$ 17.0	270.4 $\pm$ 5.2	292.4 $\pm$ 2.7	318.4 $\pm$ 4.8	324.3 $\pm$ 5.0	332.0 $\pm$ 8.2

表 2 4 组大鼠不同时间的尿酸水平($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Uric acid levels of the 4 groups of rats at different times ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)				
组别 Groups	0 天 Day 0	7 天 Day 7	14 天 Day 14	21 天 Day 21
C 组 Group C	99.5 $\pm$ 0.7	91.8 $\pm$ 16.4	85.6 $\pm$ 10.1	88.0 $\pm$ 14.1
M1 组 Group M1	93.5 $\pm$ 13.4	160.0 $\pm$ 55.7 *	151.0 $\pm$ 17.9 **	255.0 $\pm$ 61.1 **
M2 组 Group M2	100.1 $\pm$ 12.7	134.6 $\pm$ 10.4 *	186.4 $\pm$ 36.3 **	265.0 $\pm$ 32.4 **
M3 组 Group M3	95.5 $\pm$ 12.0	187.6 $\pm$ 37.2 **	232.6 $\pm$ 27.8 **	254.6 $\pm$ 23.7 **

注:和对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

表 3 4 组大鼠不同时间的肌酐酸水平($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Creatinine levels of the 4 groups of rats at different times ($\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)				
组别 Groups	0 天 Day 0	7 天 Day 7	14 天 Day 14	21 天 Day 21
C 组 Group C	29.9 $\pm$ 5.7	27.5 $\pm$ 3.7	25.3 $\pm$ 2.8	27.5 $\pm$ 0.4
M1 组 Group M1	24.5 $\pm$ 2.7	26.2 $\pm$ 4.2	26.6 $\pm$ 3.5	28.1 $\pm$ 2.5
M2 组 Group M2	28.5 $\pm$ 5.7	21.6 $\pm$ 2.0	22.9 $\pm$ 2.2	27.7 $\pm$ 1.1
M3 组 Group M3	22.9 $\pm$ 1.8	23.1 $\pm$ 3.2	25.1 $\pm$ 5.5	23.9 $\pm$ 1.4

表 4 4 组大鼠不同时间的尿素氮水平($\text{mmol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Blood urea nitrogen levels of the 4 groups of rats at different times ($\text{mmol/L}, \bar{x} \pm s, n=8$)				
组别 Groups	0 天 Day 0	7 天 Day 7	14 天 Day 14	21 天 Day 21
C 组 Group C	5.9 $\pm$ 0.7	6.9 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.6	6.4 $\pm$ 0.5
M1 组 Group M1	5.4 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.3
M2 组 Group M2	6.6 $\pm$ 2.0	6.2 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 0.9	5.8 $\pm$ 0.5
M3 组 Group M3	5.5 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.7

表 5 4 组大鼠在实验终点时血糖及血脂相关血清指标的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Comparison of blood glucose and blood lipid related serum indexes in the 4 groups of rats at the end of the experiment ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	GLU (mmol/L)	INS (pmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
C 组 Group C	9.4±0.3	3.5±0.2	0.41±0.1	0.3±0.01
M1 组 Group M1	10.6±1.4	2.9±0.4	0.53±0.1	0.3±0.05
M2 组 Group M2	12.2±0.9	2.7±0.3*	0.78±0.2**	1.8±0.47**
M3 组 Group M3	11.8±0.9	2.8±0.2*	0.67±0.2*	0.3±0.05

注:和对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

2.4 肾组织的病理改变

如图 1 所示,C 组的大鼠组织染色均匀,肾小球形态结构正常,肾小管上皮细胞排列紧密,未见明显炎症。造模三组大鼠肾组织皮质内均有不同程度病理性改变,表现为少量肾小管上皮细胞脱落,可见肾小管扩张。此处挑选出损伤程度较严重的大鼠肾切片进行展示。

2.5 肝组织的病理改变

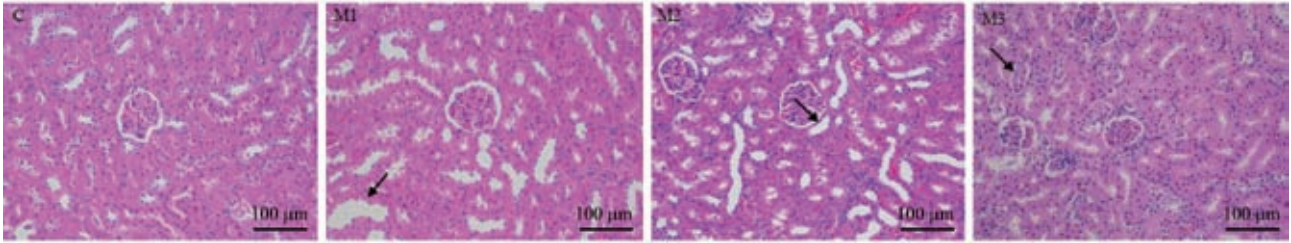
如图 2 所示,C 组肝索结构清晰,排列整齐,肝细胞胞质丰富、形态结构正常,肝窦未见明显扩张或挤压,未见明显炎症。与 C 组相比,M1 组和 M3 组无显著性区别,仍表现为正常态的肝组织结构。但 M2 组大鼠肝组织发生较明显病变,表现为中央静脉周围可见少量肝细胞脂肪变性,胞质中可见大小不一的圆形空泡,肝窦变窄,肝细胞索不明显。

2.6 心脏组织的病理改变

如图 3 所示,C 组、M1 组及 M2 组的心脏组织形态组织染色均匀,心肌纤维形态结构正常、排列规则、分界清晰,间质未见明显异常,未见明显炎症。而 3/8 的 M3 组大鼠的心脏组织发生病变,表现在可见少量心肌纤维水肿,胞质疏松淡染,此处挑选病变程度最为严重的 M3 组大鼠进行展示。

3 讨论

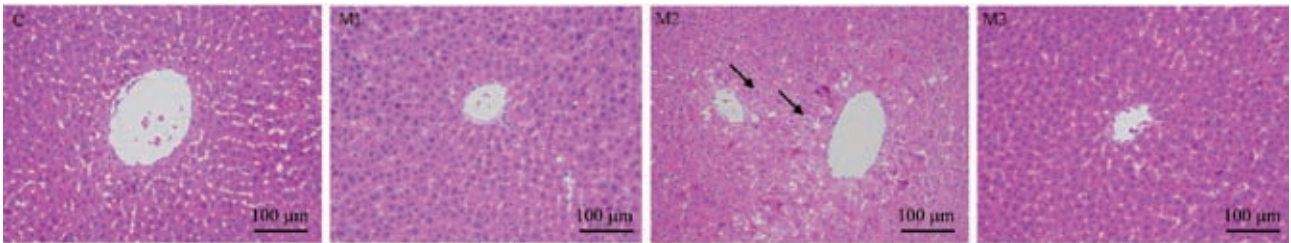
高尿酸血症的发生,主要由于尿酸生成增多或排泄较少所致,所以复制动物模型,应该主要从这两个途径入手。氧嗪酸钾是一种尿酸酶抑制剂,作为化学诱导剂可以抑制尿酸分解,加强血清中尿酸水平,造成高尿酸血症动物模型^[8-9]。有文献报道^[10],腹腔注射氧嗪酸钾会使大鼠长期处于应激状



注:黑色箭头标示肾小管及其上皮细胞病变部位。
图 1 各组大鼠肾组织病理染色示意图(HE 染色)

Note. The black arrows point to the renal tubules and their epithelial cell lesions.

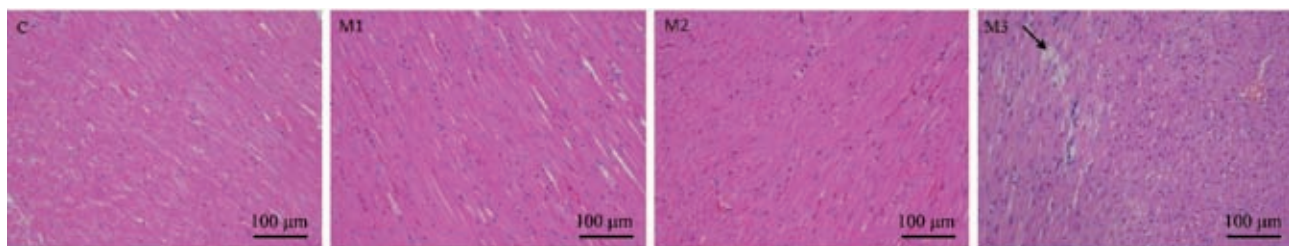
Figure 1 Comparison of the pathological changes of renal tissues in each group of rats (HE staining)



注:黑色箭头标示肝细胞脂肪病变部位。
图 2 各组大鼠肝组织病理染色示意图(HE 染色)

Note. The black arrows point to the hepatocyte lesions.

Figure 2 Comparison of the pathological changes of liver tissues in each group of the rats (HE staining)



注:黑色箭头标示心肌纤维病变部位。

图 3 各组大鼠心脏组织病理 HE 染色示意图(HE 染色)

Note. The black arrow points to the myocardial fiber lesion.

Figure 3 Comparison of the pathological changes of heart tissues in each group of the rats (HE staining)

态下,且易造成腹腔积水、腹膜硬化等不良后果,有悖于动物伦理,而饲喂法相对稳定性欠佳;氧嗪酸钾灌胃法稳定性较好,可用于制作长期高尿酸血症大鼠模型。故本次实验,笔者采用氧嗪酸钾灌胃法。而酵母膏无毒,属于高嘌呤类食物,酵母在体内充分水解产生含氮的有机碱(包括嘌呤碱类、嘧啶碱类等),引起嘌呤代谢紊乱,使尿酸增多^[11]。

有研究表明,高尿酸血症与高血糖、高血脂等心血管疾病的发生是呈显著的正相关^[12-13],有部分学者已成功复制高尿酸血症模型,并且对高尿酸血症与心血管病变之间的关系进行系列研究^[14-15]。

经过查阅文献^[16-17],笔者决定采用氧嗪酸钾联合酵母膏建立高尿酸血症模型,同时研究大鼠是否伴随着产生心血管病变。采用酵母膏饲料可模拟人服用高嘌呤类食物时引起嘌呤代谢紊乱导致尿酸升高,同时给予氧嗪酸钾主要是抑制大鼠体内的尿酸酶,排除尿酸酶的干扰,二者联合造模可以最大程度模拟人类产生高尿酸血症的病发原因。由于饲料中含有易被氧化的脂肪成分,因此严格控制大鼠每日给予饲料每只 35 g,同时次日更换新鲜饲料以确保实验规范性,在本实验中未出现大鼠死亡现象。由于造模后大鼠会出现一个短暂性的尿酸升高随后降低的现象,为了验证是否出建立一种尿酸值高、维持时间长、模型稳定特点的大鼠模型,因此本实验采用禁食不禁水 12 h 后采血。此外,空腹 INS 水平和血清 TG 含量等均可作为血糖、血脂代谢指标,因此本实验中统一在禁食不禁水 12 h 后采血^[18-19]。

本次实验为每 7 天进行一次大鼠眼内眦取血,所得血清量较少,故仅测定 UA、BUN、Cr 等三个指标,用于检测高尿酸血症是否造模成功;而实验最后一天,采用大鼠腹主动脉取血,所得血清量较多,因此增加了检测的指标,比较 GLU、INS、TG、LDL-C 等水平的差异用于判定大鼠在患有高尿酸血症的同时是否伴随着产生血糖、血脂代谢异常。本实验三个模型组都

是氧嗪酸钾灌胃给药,但给予饲料不同,M1 组给予普通饲料,M2 组给予高糖高脂饲料,M3 组给予酵母膏饲料。通过 M1 组及 M3 组可比较氧嗪酸钾联合酵母膏造模相比氧嗪酸钾单独造模的优势,比较模型三组间的 GLU、INS、TG 等水平,可检测 M1 组及 M3 组大鼠是否伴随着血糖、血脂代谢紊乱。

实验结果表明,各模型组的 UA 水平显著升高,实验第 7 天时 M1 及 M2 组与正常组比较 UA 明显升高($P < 0.05$),而 M3 组 UA 则显著性地升高($P < 0.01$);实验第 14 天时,M1 组与第 7 天相比,尿酸呈现下降趋势,由此可看出受到大鼠体内尿酸酶的影响,氧嗪酸钾单独造模表现出模型不稳定的现象,而 M3 组 UA 则呈现稳定上升趋势;实验第 21 天时,各模型组的 UA 与正常组对比均显著性地升高($P < 0.01$),但 M1 组大鼠的 UA 整体偏差较大,而 M3 组相对而言偏差较小,进一步说明了氧嗪酸钾及酵母膏联合造模可建立一种尿酸升高、维持时间长、模型稳定等特点的大鼠长期高尿酸血症模型。而在整个实验周期,各组大鼠的 Cr、BUN 水平无明显改变,目前已有文献报道和临床证据显示^[20],UA 和 Cr、BUN 并无明显相关性,临床上有大量高尿酸血症患者,其 Cr 和 BUN 与正常人相当。造模三组都表现出 GLU 水平有不同程度的升高趋势,且 M3 组表现出与 M2 组相当的 INS 水平降低,提示 M2 与 M3 组存在血糖代谢紊乱。此外,M2 组 LDL-C 含量显著地升高,LDL-C 的增高不利于脂质代谢故引发 M2 组 TG 增高,形成高脂血症,说明了 M2 组大鼠通过高脂饮食诱导了高脂状态,而 M1 组及 M3 组大鼠没有明显的高脂状态,且比较这四组大鼠的肝 HE 染色结果,也仅仅有 M2 组大鼠发生了明显的脂肪肝病现象,进一步表明只有 M2 组大鼠出现了血脂紊乱。

本实验选择了氧嗪酸钾联合不同饲料制备大鼠高尿酸血症模型,与“氧嗪酸钾+普通饲料”的 M1 组相比,“氧嗪酸钾+高糖高脂饲料”的 M2 组表现为明

确的高尿酸血症合并血糖血脂代谢紊乱,“氧嗪酸钾+酵母膏饲料”的 M3 组表现为明确的高尿酸血症合并血糖代谢紊乱,且该组部分大鼠的肾、心脏等器官发生病变,提示该造模方法可用于“尿酸升高-继发性血糖紊乱”相关的心血管疾病的大鼠模型研究,而本组在本实验中未检测出血脂异常,可能与实验周期略短相关,需要后期进一步优化与探讨。

参 考 文 献(References)

- [1] 金沈锐, 秦旭华. 痛风及高尿酸血症动物模型的研究现状和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(1): 55-58.
Jin SR, Qin XH. Overview of experimental animal model of gout and hyperuricemia [J]. Acta Lab Ani Sci Sin, 2005, 13(1): 55-58.
- [2] Zhou Y, Wang XH, Jiang L, et al. Uric acid increases fibronectin synthesis through upregulation of lysyl oxidase expression in rat renal tubular epithelial cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(2): 336-346.
- [3] 崔博, 黄国伟, 王璇, 等. 氧嗪酸钾联合酵母粉对 SD 大鼠血尿酸及其他相关指标的影响 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(10): 773-775.
Cui B, Huang WG, Wang X, et al. Effect of potassium oxonate combined with yeast powder on serum uric acid and other related indexes in rats [J]. Chin J Prev Con Chronic Dis, 2016, 24(10): 773-775.
- [4] Wijnands JM, Viechtbauer W, Thevissen K, et al. Determinants of the prevalence of gout in the general population: a systematic review and meta-regression [J]. Eur J Epidemiol, 2015, 30(1): 19-33.
- [5] Riegersperger M, Covic A, Goldsmith D. Allopurinol, uric acid, and oxidative stress in cardiorenal disease [J]. Int Urol Nephrol, 2011, 43(2): 441-449.
- [6] Okuda C, Koyama H, Tsutsumi Z, et al. Serum CRP in patients with gout and effects of benzbromarone [J]. Int J Clin Pharm Ther, 2011, 49(3): 191-197.
- [7] Corella D, Silla J, Ordovás J, et al. Association of blood uric acid with other cardiovascular risk factors in the male working population in Valencia [J]. Rev Clin Esp, 1999, 199(199): 806-812.
- [8] 沈桂芹, 于世家. 尿酸排泄不良型高尿酸血症动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 55-59.
Shen GQ, Yu SJ. Establishment of a rat model of hyperuricemia associated with uric acid excretion disorder [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 55-59.
- [9] Wang CP, Wang Y, Wang X, et al. Mulberroside A possesses potent uricosuric and nephroprotective effects in hyperuricemic mice [J]. Planta Med, 2010, 77(8): 786-794.
- [10] 吴燕升, 万强, 史丽强, 等. 多种方法探索高尿酸血症大鼠模型的建立 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19(1): 7-10.
Wu YS, Wan Q, Shi LQ, et al. To explore the establishment of hyperuricemia rat models induced by a variety of methods [J]. Chin J Int Trad West Neph, 2018, 19(1): 7-10.
- [11] 裴忆雪, 刘永杰, 张笛, 等. 建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 46-54.
Pei YX, Liu YJ, Zhang D, et al. Establishment of a hyperuricemia mouse model with renal damage [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9): 46-54.
- [12] Whelton A. Current and future therapeutic options for the management of gout [J]. Am J Ther, 2010, 17(4): 402-417.
- [13] 徐厚兰, 糜怀英. 高血压与高脂血症、高尿酸血症、高血糖的相关性分析及健康教育 [J]. 护士进修杂志, 2007, 22(10): 931-932.
Xu HL, Mi HY. Correlation analysis of hypertension and hyperlipidemia, hyperuricemia and hyperglycemia and health education [J]. J Nur Trai, 2007, 22(10): 931-932.
- [14] 迪丽达尔·希力甫, 赵平, 宋丽娟, 等. 酵母膏联合氧嗪酸钾构建高尿酸血症模型大鼠继发的心血管病变 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(11): 1994-1998.
Dilidaer XLP, Zhang P, Song LJ, et al. Development of secondary cardiovascular disease in hyperuricemia model rats induced by yeast extract combined with oteracil potassium [J]. Chin J Tiss Engin Res, 2012, 16(11): 1994-1998.
- [15] 康洁. 高尿酸血症合并高脂高糖大鼠模型中医证候特点的实验研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2010.
Kang J. Study on characteristics of TCM syndrome in rat model of hyperuricemia combined high fat and high sugar [D]. Fuzhou: Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 2010.
- [16] Sanchez-lozada LG, Soto V, Tapia E, et al. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(4): 1134-1141.
- [17] Cristobalgarci M, Garciaarroyo FE, Tapia E, et al. Renal oxidative stress induced by long-term hyperuricemia alters mitochondrial function and maintains systemic hypertension [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015(47): 1-8.
- [18] 张培, 苗志敏, 李长贵, 等. 慢性高尿酸血症大鼠模型建立方法的探讨 [J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(3): 219-221.
Zhang P, Miao ZM, Li CG, et al. The method of creating a model of chronic hyperuricemia in rats [J]. Acta Acad Med Qingdao Univ, 2010, 46(3): 219-221.
- [19] 张燕, 马菱菱, Sarah Wambui Amadi, 等. 高脂高嘌呤饮食联合氧嗪酸钾诱导鹌鹑糖脂代谢紊乱及其并发症 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 58-64.
Zhang Y, Ma LM, Sarah WA, et al. High fat high purine diet combined oteracil potassium induced quail glucose and lipid metabolic disorders and complications [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(1): 58-64.
- [20] 丁畅, 吴晓馥, 汤涌. 别嘌醇对合并高尿酸血症的慢性心力衰竭患者心功能的影响 [J]. 黑龙江医学, 2009, 33(1): 19-20.
Ding C, Wu XK, Tang Y. Effects of allopurinol on cardiac function in hyperuricemic patients with chronic heart failure [J]. Heilongjiang Med J, 2009, 33(1): 19-20.

叶妙勇,赵凡,马轲,等. 静脉注射针与自制 PE-50 管针头用于大鼠阴茎海绵体内压测定的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 753-759.

Ye MY, Zhao F, Ma K, et al. Comparison of the use of intravenous infusion needle and self-made PE-50 tube needle in the measurement of intracavernosal pressure in rat penis[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 753-759.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.010

静脉注射针与自制 PE-50 管针头用于大鼠阴茎海绵体内压测定的比较

叶妙勇¹,赵凡²,马轲¹,张利棕³,方明笋³,寿旗扬⁴,马寅锋⁵,黄文杰⁵,吕伯东^{5,6*}

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院,杭州 310053; 2. 南通大学附属医院泌尿男科,江苏 南通 226001; 3. 浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053; 4. 浙江中医药大学附属第二医院中心实验室,杭州 310005; 5. 浙江中医药大学附属第二医院泌尿外科,杭州 310005; 6. 浙江中医药大学泌尿男科研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 探讨电刺激阴茎海绵体神经检测海绵体内压方案,并主要比较两种置管材料(PE-50 管针头与静脉输注针)用于检测阴茎海绵体内压(intracavernous pressure, ICP)的差异。**方法** 选取 SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 36 只,随机选择 16 只作为对照组,余 20 只为实验组,予腹腔注射链脲佐菌素 60 mg/kg,饲养 8 周后筛选出 16 只 I 型糖尿病大鼠。对照组与糖尿病组再分为使用 PE-50 管针与静脉输注针组记录 ICP 各 8 只。Masson 三色染色与阿扑吗啡实验证实糖尿病 ED 大鼠模型造模成功。证实模型建立成功后,进行阴茎海绵体内压检测,比较 PE-50 管针与静脉输注针记录的相关勃起功能数据。**结果** Masson 三色染色显示糖尿病模型组较对照组阴茎海绵体平滑肌面积减少、胶原面积增多、阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。糖尿病模型组较对照组勃起次数明显减少($P < 0.01$)。正常组和糖尿病组使用 PE-50 管针与静脉输注针记录的峰值 ICP、ICP/平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、曲线下面积(area under curve, AUC)无统计学意义($P > 0.05$),而起峰速率(slope)有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 电刺激阴茎海绵体神经记录海绵体内压时,PE-50 管针头与静脉输注针头均适用于阴茎海绵体内压测定。

【关键词】 海绵体内压;勃起功能障碍;海绵体神经;电刺激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0753-07

Comparison of the use of intravenous infusion needle and self-made PE-50 tube needle in the measurement of intracavernosal pressure in rat penis

YE Miaoyong¹, ZHAO Fan², MA Ke¹, ZHANG Lizong³, FANG Mingsun³, SHOU Qiyang⁴, MA Yinfeng⁵, HUANG Wenjie⁵, LYU Bodong^{5,6*}

(1. the Second Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.
2. Department of Urology and Andrology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001.
3. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053.
4. Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005.
5. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005.
6. Institute of Urology and Andrology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

Corresponding author: LYU Bodong. E-mail: lbd168@126.com

【基金项目】国家自然科学基金(81571431);浙江省自然科学基金(LY19H270011, LY18H270002);浙江省中医药重大研究项目(2018ZY007);浙江省“新苗人才计划”项目(2018R410048)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81571431), Natural Science Foundation of Zhejiang Province(LY19H270011, LY18H270002), the Major Research Projects of Traditional Chinese Medicine in Zhejiang Province(2018ZY007), and the Zhejiang “New Seeding Talent Plan” Project(2018R410048).

【作者简介】叶妙勇(1993—),男,研究生,研究方向:泌尿外科及男科基础与临床研究。Email: yemiao Yong1993@163.com

【通信作者】吕伯东(1966—)男,主任医师,博士生导师,研究方向:泌尿外科及男科学方向。Email: lbd168@126.com

[Abstract] Objective To explore the method for detecting intracavernosal pressure (ICP) under electro-stimulation of the cavernous nerve, and to compare the difference between two catheter materials (PE-50 tube needle and intravenous infusion needle) for measurement of ICP. **Methods** Thirty-six male Sprague-Dawley rats were randomly selected; 16 were randomly selected as the control group, and the remaining 20 were used as the experimental group. Intraperitoneal injections of streptozotocin (60 mg/kg) were given. After 8 weeks, 16 mice of type 1 diabetes were screened. The control and diabetic groups were further divided into two subgroups, with eight rats in each subgroup. ICP was evaluated using PE-50 tube needles and other eight rats with intravenous infusion needles. Masson trichrome staining and apomorphine experiment confirmed that the diabetic erectile dysfunction (ED) rat model was successfully developed. After confirming the successful establishment of the model, the ICP tests of the penis were performed, and the erectile function data recorded using the PE-50 tube needle and the intravenous infusion needle were compared. **Results** Masson trichrome staining showed that the diabetic model group had a smaller area of corpus cavernosum smooth muscle, increased collagen area, and decreased ratio of corpus cavernosum smooth muscle area/collagen area, all of which were statistically significant ($P < 0.05$). The number of erections in the diabetic model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.01$). Maximum ICP, ICP/mean arterial pressure, and the area under the curve recorded in the normal and diabetic groups using PE-50 tube needles and intravenous infusion needles were not statistically significantly different ($P > 0.05$), but the slopes were significantly different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Both the PE-50 tube needle and intravenous infusion needle can be used in the measurement of ICP during electrostimulation of the cavernous nerve.

[Keywords] cavernous nerve stimulation; erection dysfunction; intracavernosal pressure; telemetric recording
Conflicts of Interest; The authors declare no conflict of interest

勃起功能障碍(erection dysfunction, ED)是男性常见性功能障碍疾病之一,指男性患者难以持续性的达到或保持足够的阴茎勃起以完成令人满意的性表现^[1],当男性患者长期无法完成满意的性生活,将会影响家庭的和睦,并对身心造成难以避免的伤害。随着年龄的增长及众多基础疾病发生、发展将会损害勃起功能,二十世纪末期,全球超过 1.52 亿男性患者罹患 ED,预估在 2025 年,将会新增 1.7 亿男性患者受到 ED 困扰^[2]。

阴茎勃起受到神经血管复杂的调控作用,根据各类型 ED 的病因,国内外学者们构建了常见的相关 ED 的动物模型(包括神经源性 ED、血管源性 ED、内分泌源性 ED 等)用于阴茎勃起功能的研究^[3]。啮齿类动物 ED 模型与兔、猫、狗及灵长类动物 ED 模型比较,具有易饲养、易操作、经济实惠等优势,是目前 ED 动物模型中首选的实验动物。

阴茎海绵体内压(intracavernosal pressure, ICP)测定实验是目前评估啮齿类动物 ED 模型勃起功能生理指标的首选检测方式^[4-8],其主要过程包括阴茎海绵体置管、电刺激海绵体神经、生理信号经换能器向电信号转换等^[9]。阴茎海绵体置管过程中,研究者主要采用自制聚乙烯(polyethylene, PE)管针和静脉输注针(venoclysis needle, VN)两种材料,ICP 经上述材料传递到生理信号换能器进行生理信号的转换。糖尿病患者日益增多并且半数以上男性

糖尿病患者遭受到 ED 困扰^[10],因此本文采用糖尿病 ED 大鼠模型。目前尚无文献比较两种材料对 ICP 测量数据结果的影响进行比较,结合糖尿病 ED 大鼠模型对换能过程中的两种材料进行比较,以讨论其中哪种阴茎海绵体置管材料更适用于测定 ICP。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

成年雄性 SPF 级 SD 大鼠 36 只,7~8 周龄,体重(180 ± 200)g,购于由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2013-0016】,饲养于浙江中医药大学医学实验动物中心【SYXK(浙)2013-0184】,浙江中医药大学实验动物伦理审查委员会通过(伦理审批号:2018-145),室温 20℃ 左右。照明/黑暗为 12 h/12 h 恒温环境下圈养,标准饲料,自由饮水,直至试验的当天。所有涉及到实验动物的使用与操作均遵循 3R 原则。

1.1.2 仪器和耗材

MP160 型 16 通道生理记录分析系统购于美国 BIOPAC 公司;Master-8 可编程刺激器购于以色列 AMPI;阿扑吗啡(apomorphine, APO)购于美国 APEX-BIO 公司(批号:B6936);生理盐水购于山东齐鲁制药有限公司;Masson 三色染色试剂盒购于南京

建成科技有限公司(批号:D026-1-3);聚乙烯 PE50 导管购于英国 Smith Medical 公司;25-G 静脉输注针购于江西洪达医疗器械集团有限公司。外科及显微外科常规手术器械。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立

36 只正常 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,随机抽取其中 16 只作为正常对照组(normal control group, NC),其余 20 只归为糖尿病 ED 组(diabetes mellitus group, DM),DM 组大鼠腹腔注射硫脲佐菌素(streptozotocin, STZ) 60 mg/kg 溶液构建糖尿病 ED 模型。8 周后,连续 3 d 抽尾静脉血检测大鼠血糖,筛选出 16 只随机血糖均超过 16.7 mmol/L 的大鼠行阿扑吗啡(apomorphine, APO)实验。APO 实验在 ICP 测定实验前两天进行,筛选 DM 模型大鼠,使用 100 μ g/kg APO (50 μ g/mL) 一次性注射施用大鼠皮下颈部区域。APO 实验时,观察并记录两组大鼠的勃起次数进行数据统计分析。

1.2.2 ICP 测定及海绵体神经刺激

造模结束后,使用 3% 戊巴比妥钠对大鼠进行麻醉,麻醉后仰卧位固定动物于手术板。对大鼠行腹部正中切口,大小约 5 cm,逐层剪开并分离腹部皮肤及肌肉,暴露腹腔后使用棉花签进行逐层剥离前列腺组织和粘膜。盆神经节(major pelvic ganglia, MPG)贴附于前列腺左、右侧叶前外侧表面,MPG 发出的海绵体神经(cavernous nerve, CN)血管束贴附前列腺向下走行经尿道支配阴茎(图 1a、b)。眼科镊分离 CN 后,取一小段 PE-10 管置于分离空隙处^[11](图 1b、c),定位 CN 并且便于后续电刺激。电刺激参数:5 V, 15 Hz, 5 ms, 60 s, 刺激持续时间 1 min, 每次刺激间隔 5 min。

阴茎海绵体插管:阴茎皮肤行纵切口暴露阴茎头部,分离皮肤与白膜,暴露双侧阴茎海绵体后,分别使用自制 PE50 管(10 mL 注射器针头折断,前后两端连接 PE-50 管)以及 25-G 静脉输注针刺入阴茎海绵体,针头内压力经过两种材质传导后连入压力换能器。

1.2.3 平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)测定

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg),取颈部正中切口,使用镊子逐层钝性分离颈部肌肉,暴露出左侧颈总动脉,眼科剪剪小口后置入 PE-50 管,

并连接到压力换能器记录数据。

1.2.4 Masson 三色染色

大鼠勃起功能测定实验结束后,取大鼠阴茎组织, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m 切片分为两组, 一组用于 HE 染色, 另一组用于 Masson 染色。Masson 染色前先用蒸馏水润湿玻片 30 s, 核染液染色 60 s, 丢弃, 冲洗液冲洗 30 s。浆染液染色 30 s, 丢弃, 冲洗液冲洗 30 s。黄色分色液分色 8 min 左右弃去分色液, 直接用蓝色复染液染色 5 min 左右, 丢弃, 使用无水乙醇冲洗干净, 载玻片吹干后使用封片剂封片, 显微镜下观察。

1.2.5 阿扑吗啡实验

阿扑吗啡评估勃起功能实验参照 Yang 等^[12]报道的方法, ICP 测定实验前 2 d, 大鼠喂食后置于环境安静房间的观察笼中, 观察房间的灯光亮度调暗至可以肉眼观察的, 等待 10 min 使大鼠适应新环境。于大鼠颈部皮下注射阿扑吗啡(100 μ g/kg), 注射后 30 min 内观察并记录阴茎勃起情况, 阴茎末端出现充血的阴茎头部记录为一次勃起。正常组的大鼠与糖尿病模型组大鼠进行统计比较。

1.3 统计学分析

计量资料均为均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$), 并采用 SPSS 20.0 软件分析数据。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

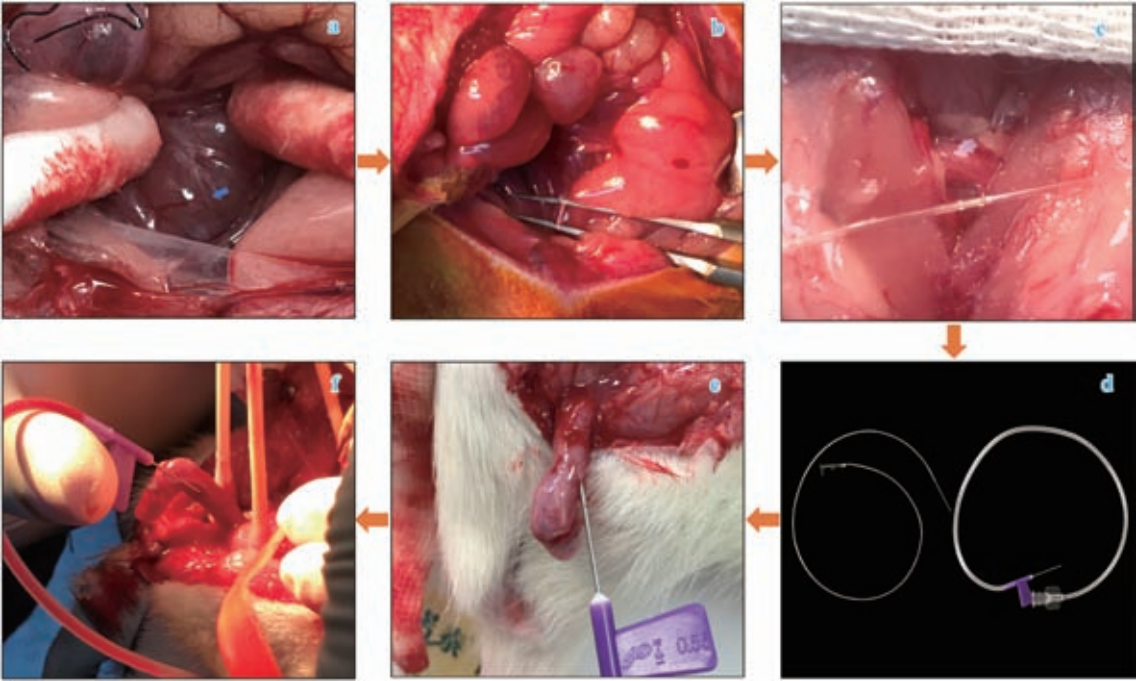
2 结果

2.1 阴茎海绵体内压检测主要流程及海绵体神经解剖位置

海绵体神经分支向尿道方向走行(图 1a), 使用眼科镊分离出海绵体神经并套如 PE-10 管(图 1b、c), 分别用两种置管材料进行插针(图 1d、e), 刺激海绵体神经后可见压力换能管内有明显血液回流(图 1f)。

2.2 大鼠阴茎海绵体组织 Masson 三色染色

DM 组与 NC 组大鼠阴茎海绵体组织 Masson 三色染色, DM 组中海绵窦内平滑肌厚度和含量明显减少(图 2A; 红色箭头)。此外, DM 组中大鼠阴茎海绵体中胶原纤维含量显著增加, 纤维密度致密(图 2A)。如图 2B 所示, DM 组与 NC 组比较, 平滑肌百分比面积明显减少($P < 0.01$), 胶原纤维百分比面积增加($P < 0.05$), 平滑肌与胶原纤维百分比显著减少($P < 0.001$)。

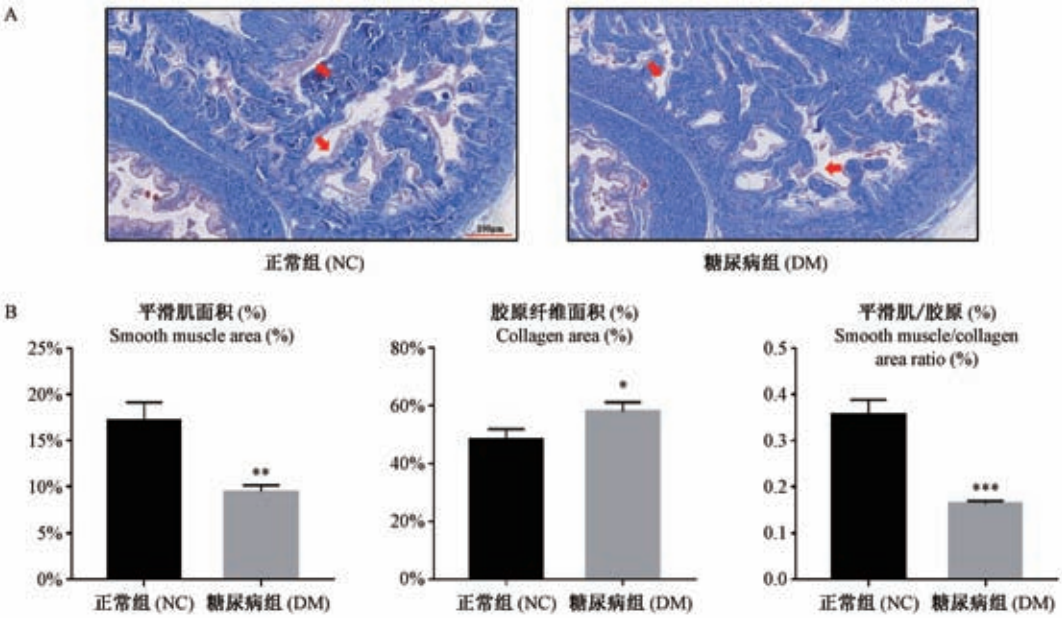


注:a、b:海绵体神经定位;c:PE-10 分离海绵体神经;e、f:阴茎海绵体置管。

图 1 ICP 检测流程及海绵体神经解剖位置

Note. a, b, Localization of cavernous nerve. c, PE-10 separation of cavernous nerve. e, f, Pin insert into the cavernosum.

Figure 1 Operation process of ICP detection and anatomical site of the cavernous nerve



注:红色箭头:平滑肌厚度。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 Masson 三色染色显示大鼠阴茎海绵体组织中平滑肌和胶原纤维含量($n = 5$)

Note. Red arrow: thickness of smooth muscle. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

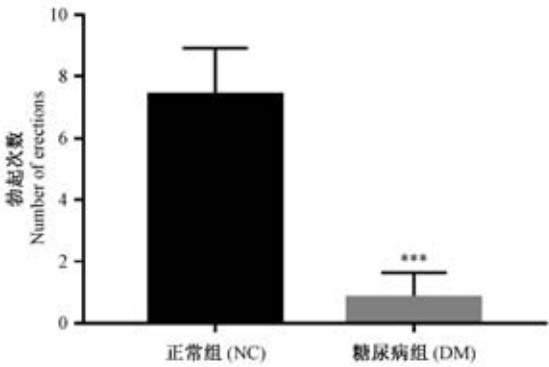
Figure 2 Smooth muscle and collagen contents in the cavernous tissues of rat penises showed by Masson's trichrome staining ($n = 5$)

2.3 阿扑吗啡实验

对 DM 组大鼠造模情况使用 APO 实验进行验证。两组大鼠在注射 APO 后均出现打哈欠、躁动、骨盆前推、包皮后退和阴茎勃起等生理活动现象。结果显示,DM 组大鼠勃起次数与正常对照组相比具有显著差异($P < 0.05$) (图 3)。

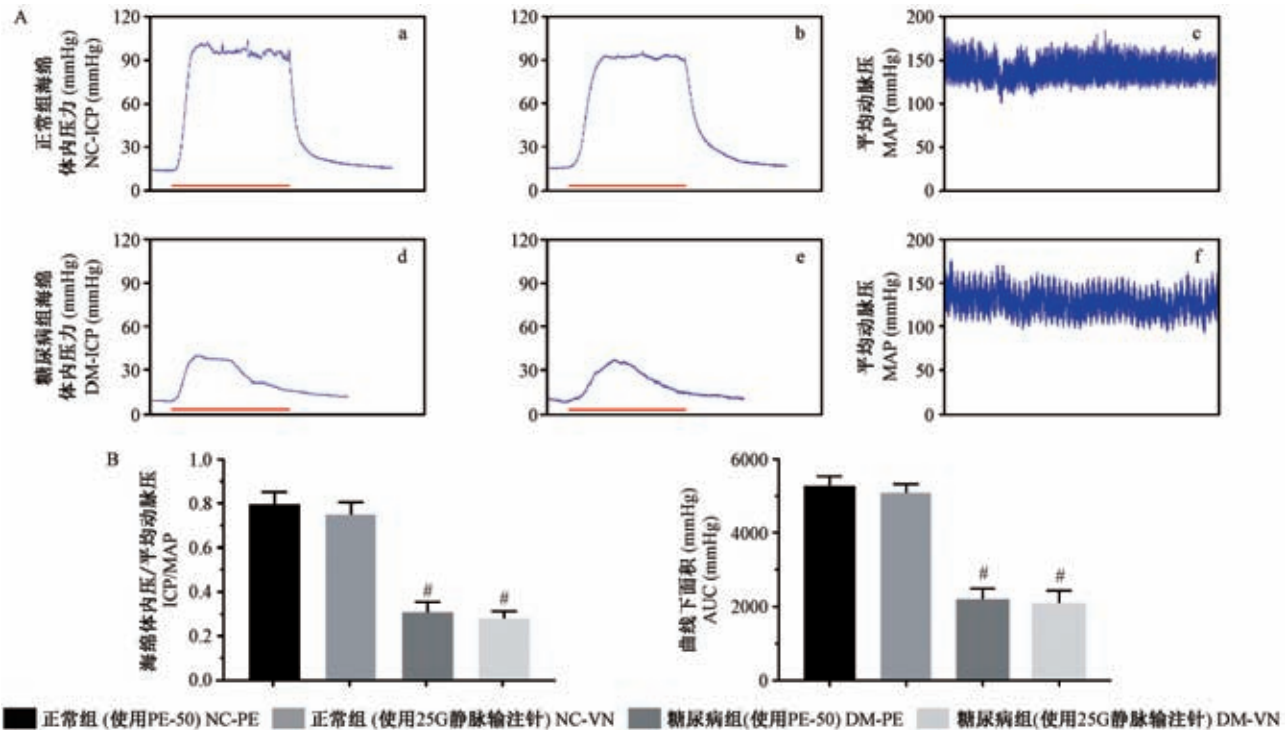
2.4 大鼠阴茎海绵体内压评估勃起功能

NC 组与 DM 组使用海绵体内压插管记录勃起功能相关数据,同 NC 组相比,DM 组大鼠 ICP/MAP 与曲线下面积 (AUC) 具有显著统计学差异 ($P < 0.01$),表明大鼠糖尿病模型造模成功,与阿扑吗啡实验结果相一致。正常组大鼠使用 PE 与 VN 记录的 ICP/MAP 与 AUC 差异无显著性 ($P = 0.1386, P = 0.0692$)。DM 组 ED 大鼠使用 PE 与 VN 记录的 ICP/MAP 与 AUC 差异无显著性 ($P = 0.1386, P = 0.2121$) (图 4)。



注:与正常组相比,*** $P < 0.001$ 。
图 3 阿扑吗啡实验评估两组大鼠勃起功能($n = 8$)
Note. Compared with the normal control group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Apomorphine experiments are performed to evaluate the erectile function in the two groups ($n = 8$)



注:A:a,b,d,e 代表各组 ICP,c,f 代表各组 MAP;B: ICP、MAP、AUC 比较。与 NC-PE 组、NC-VN 组比较,[#] $P < 0.01$;NC-PE=正常组 (使用 PE-50),NC-VN=正常组 (使用 25G 静脉输注针),DM-PE=糖尿病组 (使用 PE-50),DM-VN=糖尿病组 (使用 25G 静脉输注针)。

图 4 阴茎海绵体内压测定评估各组大鼠勃起功能($n = 8$)

Note. A: a, b, d, e represent the ICP of each group, c, f, represent the MAP of each group; B: comparison of ICP, MAP, AUC of the rats. Compared with the NC-PE group and NC-VN group, [#] $P < 0.01$; NC-PE=normal control group intracavernosal pressure detected by PE-50. NC-VN=normal control group intracavernosal pressure detected by 25G intravenous infusion needle. DM-PE=diabetes mellitus group intracavernosal pressure detected by PE-50 tube needle, DM-VN=diabetes mellitus group intracavernosal pressure detected by 25G intravenous infusion needle.

Figure 4 Evaluation of the rat erectile function by intracavernosal pressure measurement($n = 8$)

表 1 两组大鼠中使用 PE-50 与 VN 记录数据比较

Table 1 Comparison of PE-50 and VN recorded data in the two groups of rats

组别 Groups		最大值海绵体内压 Maximum ICP (mmHg)	平均动脉压 MAP (mmHg)	海绵体内压/ 平均动脉压 ICP/MAP	曲线下面积 AUC (mmHg)	斜率 Slop (mmHg)
正常组 Control groups	自制 PE-50 组 Home made PE-50 tube needle group	101. 72±6. 01	128. 01±4. 74	0. 79±0. 05	5271. 23±247. 70	7. 58±1. 46
	静脉注射针组 25G intravenous needle	97. 96±4. 40	130. 43±5. 30	0. 75±0. 05	5092. 31±215. 70	5. 20±0. 74 *
糖尿病组 Model groups	自制 PE-50 组 Home made PE-50 tube needle group	42. 88±5. 75	138. 15±5. 90	0. 31±0. 04	2184. 59±278. 90	3. 53±0. 55
	静脉注射针组 25G intravenous needle	38. 33±4. 27	136. 32±6. 17	0. 28±0. 03	2018. 67±359. 50	2. 55±0. 38 **

注:和相应分组里对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note.Compared with the control group in the same grouping, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

1863 年 Eckhardt 首次在犬类动物模型中证实了盆神经节支配勃起生理反应,而 1968 年 Lewist 等首次对公牛进行阴茎海绵体测压,结合上述的生理功能测试以及动物的生理解剖,继而,更多的学者将实验动物模型转向啮齿类动物^[12-14]。主要是由于大鼠勃起生理反应和人类具有许多相似性,并且大鼠饲养及操作性等方面具有显著的优势,20 世纪末 Quinlan 等^[14]首次提出了啮齿类动物模型作为研究勃起功能的模型,通过选取适当的频率电刺激 CN 诱发勃起,途经换能装置处理并记录 ICP 变化,奠定了大鼠模型作为研究勃起功能动物模型和电刺激 CN 时记录 ICP 差异作为评估勃起功能生理指标的实验基础^[15-16]。电刺激 ICP 测定与交配实验、直接性行为观察、生理遥测等测定方法相比,具有压力测定装置低廉、实验结果主观性少且结果可重复等优势^[3,8-9]。因此,在一定程度上将电刺激 ICP 测定视作 ED 实验研究中的首选评估方案对治疗方法及药物进行评估分析,建立具有可操作性、重复性、客观性的 ICP 测定实验方法,对于深层次研究治疗勃起功能障碍相关生理药理具有重要意义。

测量 ICP 时,连接刺入阴茎海绵体针头的材料通常有 PE 管和 VN^[9,11]。VN 在其持针处具有蝶形捏持处,因此在进行插管时操作的便利性相较于自制 PE 管具有优势。VN 在临床上使用普遍,其获取方便并且价格低廉。而 PE 管是由高密度聚乙烯构成,在测量血压等生理数据时对血流有良好的抗冲击性,是动物实验中连接压力换能装置的首选材料。本研究比较两种材质对 ICP 测量数据结果的影响以及实验的便捷性进行初步探讨。勃起功能数

据显示使用 PE-50 管针头与 VN 针头记录的数据(表 1),最大值 ICP、ICP/MAP 和 AUC 作为评估勃起功能障碍最常用的指标^[17],在 NC 组及 DM 组中使用两种材质统计得出数据均无显著统计学差异($P > 0.05$),而在使用 VN 在 NC 组和 DM 组中测得的起峰斜率指标与 PE-50 管测得指标具有统计学差异($P < 0.05$ 与 $P < 0.01$)。VN 的起峰斜率指标与 PE-50 管的相比具有差异性,由于材质密度没有 PE 管材质致密,对于压力的升高存在缓冲作用。因此若将起勃时间作为评估勃起功能障碍的一项指标,应当首选 PE-50 管针材质的传导材料。

结合实验过程,本课题组对 ICP 测定过程提出以下建议:①电刺激环节,可由操作者手持双极电刺激钩,轻微提拉暴露充分的 CN 处于悬空状态 1 min,同时记录 ICP 数据。②双极电刺激钩刺激时需注意不能触碰到盆腔肌肉,以避免肌肉收缩对 ICP 的影响。主要是由于电刺激电压与频率过高时会诱发盆底肌肉收缩,而盆底肌肉的收缩会导致勃起反应时最大值 ICP 的异常增加^[17]。若直接放置双极刺激头于刺激部位进行刺激,势必直接接触并刺激到盆底肌肉进而影响测量结果。③双极电刺激钩刺激神经多次后,电刺激钩顶端会有血凝块包裹刺激钩,需及时对电钩顶端进行清理,保证释放出的电刺激参数不受干扰。④针对阴茎海绵体插管实验不熟练的操作者,建议使用具有握柄的静脉输注针操作测量 ICP,能进一步提高置管的成功率。⑤使用眼科镊分离出 CN 后,采用材质较软的 PE-10 管进行定位,避免大鼠肌肉意外抽动时崩断 CN。

综上所述,基于前面研究者们的 ICP 检测步骤并结合自己的实验步骤对实验操作过程提出优化,以为更多从事 ED 方向研究的研究者提供经验,

同时对 PE 管和 VN 两种置管材质测量数据比较后, 两者均可用于 ICP 的检测。

参 考 文 献(References)

- [1] NIH Consensus Conference. Impotence. NIH consensus development panel on impotence [J]. JAMA, 1993, 270(1): 83-90.
- [2] Ayta IA, Mckinlay JB, Krane RJ. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences [J]. BJU Int, 1999, 84(1): 50-56.
- [3] 燕浩, 王琼, 肖冬冬, 等. 勃起功能障碍的动物模型建立及检测评价 [J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(11): 1032-1037. Yan H, Wang Q, Xiao DD, et al. Animal models of erectile dysfunction: Establishment and evaluation [J]. Natl J Androl, 2017, 23(11): 1032-1037.
- [4] Zhang H, Zhang S, Jia L, et al. MyD88 overexpression deteriorates Ang-II-induced ED via upregulating MPO and COX2 and downregulating eNOS in the corpus cavernosum of rats [J]. J Cell Biochem, 2018, 28: 1-14.
- [5] Zhu GQ, Jeon SH, Bae WJ, et al. Efficient promotion of autophagy and angiogenesis using mesenchymal stem cell therapy enhanced by the low-energy shock waves in the treatment of erectile dysfunction [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 1302672.
- [6] Cho MC, Lee J, Park J, et al. The effects of single versus combined therapy using LIM-kinase 2 inhibitor and type 5 phosphodiesterase inhibitor on erectile function in a rat model of cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction [J]. Asian J Androl, 2019, 21(5): 1-8.
- [7] Sun X, Luo LH, Feng L, et al. Down-regulation of lncRNA MEG3 promotes endothelial differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in repairing erectile dysfunction [J]. Life Sci, 2018, 208: 246-252.
- [8] 颜俊锋, 吕伯东. 阴茎海绵体内压测定技术在阴茎勃起功能障碍动物模型中的应用 [J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(4): 352-355. Yan JF, Lv BD. Intracavernosal pressure measurement technology in the animal model of erectile dysfunction [J]. Natl J Androl, 2016, 22(4): 352-355.
- [9] 桂士良, 崔大伟, 腾飞, 等. 电刺激阴茎海绵体神经海绵体内压测定法在评价 2 型糖尿病大鼠模型勃起功能中的探讨 [J]. 牡丹江医学院学报, 2016, 37(1): 16-19. Gui SL, Cui DW, Ten F, et al. Evaluation of the erectile dysfunction of Type 2 diabetic rats through electrical stimulation of the cavernous nerve to monitor intracavernous pressure [J]. J Mudanjiang Med Coll, 2016, 37(1): 16-19.
- [10] Koudrat Y, Pizzol D. High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies [J]. Diabet Med, 2017, 34(9): 1185-1192.
- [11] Zhao S, Kang R, Deng T, et al. Comparison of two cannulation methods for assessment of intracavernosal pressure in a rat model [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0193543.
- [12] Burnett AL, Wessellmann U. History of the neurobiology of the pelvis [J]. Urology, 1999, 53(6): 1082-1089.
- [13] Lewis JE, Walker DF, Beckett SD, et al. Blood pressure within the corpus cavernosum penis of the bull [J]. J Reprod Fertil, 1968, 17(1): 155-156.
- [14] Yang F, Zhao JF, Shou QY, et al. Phenotypic modulation of corpus cavernosum smooth muscle cells in a rat model of cavernous neurectomy [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105186.
- [15] Quinlan DM, Nelson RJ, Partin AW, et al. The rat as a model for the study of penile erection [J]. J Urol, 1989, 141(3): 656-661.
- [16] Martinez-Pineiro L, Brock G, Trigo-Rocha F, et al. Rat model for the study of penile erection: pharmacologic and electrical-stimulation parameters [J]. Eur Urol, 1994, 25(1): 62-70.
- [17] Celtek S, Bivalacqua TJ, Burnett AL, et al. Common pitfalls in some of the experimental studies in erectile function and dysfunction: a consensus article [J]. J Sex Med, 2012, 9(11): 2770-2784.

[收稿日期] 2019-05-05

梁志康,冯静雯,谢保胜. 青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 *TRH* mRNA 的原位杂交[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 760-764.

Liang ZK, Feng JW, Xie BS. In situ hybridization of *TRH* mRNA at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 760-764.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.011

青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 *TRH* mRNA 的原位杂交

梁志康¹, 冯静雯¹, 谢保胜^{2*}

(1. 青海大学昆仑学院, 西宁 810016;
2. 高原生态与农业国家重点实验室, 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016)

【摘要】 目的 本试验旨在观察和分析青海湖裸鲤的不同发育时期胚胎促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin-releasing hormone) *TRH* 基因的表达情况。方法 提取青海湖裸鲤的总 RNA 制备地高辛标记的反义 *TRH* 基因的 mRNA 探针, 用体视显微镜观察原位杂交的 *TRH* 基因表达情况。结果 显微观察显示青海湖裸鲤胚胎发育第 6~8 天在间脑出现了 *TRH* 基因的阳性杂交信号; 第 9~11 天的胚胎的间脑、中脑、后脑和髓脑多处出现阳性杂交信号, 间脑的表达量比其他脑组织的表达量高。结论 原位杂交表明 *TRH* 基因在青海湖裸鲤 6~11 d 胚胎中表达, 提示促甲状腺激素释放激素可能对青海湖裸鲤脑部的发育和成熟有重要的作用。

【关键词】 青海湖裸鲤; 胚胎发育期; 原位杂交; 促甲状腺激素释放激素

【中图分类号】 Q95-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1005-4847(2019) 06-0760-05

In situ hybridization of *TRH* mRNA at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii*

LIANG Zhikang¹, FENG Jingwen¹, XIE Baosheng^{2*}

(1. Kunlun College, Qinghai University, Xi'ning 810016, China. 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, College of Ecol-Environmental Engineering, Qinghai University, Xi'ning 810016)
Corresponding author: XIE Baosheng. E-mail: xbsjhch@qhu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** This experiment is aimed to analyze the expression state of the thyrotropin releasing hormone (*TRH*) gene at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii* ("Przewalskii's naked carp") embryos. **Methods** The total RNA of *G. przewalskii* was extracted to make digoxin-labelled antisense mRNA of the *TRH* gene. *In situ* hybridization technology and stereomicroscopy were used to observe the expression status of the *TRH* gene in the *G. przewalskii* embryos. **Results** Microscopy showed that positive hybridization signals of the *TRH* gene appeared in the diencephalon in the 6-8-day embryo, and appeared in the diencephalon, midbrain, hindbrain and medulla in the 9-11-day embryo. The expression level in the diencephalon was higher than that in other brain areas. **Conclusions** *In situ* hybridization shows that the *TRH* gene is expressed in 6-11-day embryos of *G. przewalskii*, suggesting that *TRH* may play an important role in the brain development and maturation in *G. przewalskii*.

【Keywords】 *Gymnocypris Przewalskii*; embryonic development period; hybridization; *TRH*

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

[基金项目] 国家自然科学基金 (30360632)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (30360632).

[作者简介] 梁志康 (1995—) 男, 本科, 研究方向: 细胞生物学。Email: 2272674301@qq.com

[通信作者] 谢保胜 (1965—) 男, 教授。Email: xbsjhch@qhu.edu.cn

70 年代, Giulilemin 和 Schall 先后在绵羊和猪的下丘脑中分离提纯促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH), 该激素是由焦谷氨酸-组氨酸-脯氨酸组成的一类神经多肽分子^[1]。促甲状腺激素释放激素在中枢神经系统的脑部、垂体、脊髓和甲状腺等均有表达, 且该基因序列在脊椎动物中具有保守性^[1]。除了对脑垂体的调节作用外, 对神经系统具有保护和促进生长的作用^[2]、对皮肤的新皮生成和抑制肠道胃酸的分泌等均有作用^[3]; 此外, 在器官和组织上生长、分化和代谢方面也有影响^[4]。而促甲状腺激素释放激素在青海湖裸鲤的研究尚未发现报道, 尤其是在裸鲤胚胎发育中的 *TRH* 基因表达水平的研究更未提及。为此, 对青海湖裸鲤胚胎的 *TRH* 基因的原位杂交进行了研究, 分析其表达部位和表达时期的时空特点, 获得 *TRH* 基因在青海湖裸鲤的发育相关表达的初步研究, 为以后进一步研究青海湖裸鲤的细胞与发育生物学提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验用青海湖裸鲤及其胚胎由青海湖裸鲤救护中心刚察县孵化站提供(青海, 刚察)。亲鱼采自沙柳河野生健康的成年青海湖裸鲤, 室外人工授精, 孵化车间进行孵化, 孵化水温 11~13℃。1~11 d 胚胎用 4% 的多聚甲醛固定 48 h, 置于 -20℃ 保存, 用于整胚原位杂交, 参照文献^[5-6]进行操作。成年鱼麻醉取脑组织至于冻存管后, 立刻放液氮中保存备用。

1.1.2 试剂与仪器

Takara MiniBest Universal RNA Extraction Kit 试剂盒(Takara)、primerscrit™ II 1st strand cDNA synthesis kit 试剂盒(Takara)、Green Taq mix 试剂盒(Vazyme)、DNA 纯化试剂盒(Takara)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(Sangon Biotech)、T 载体 PCR 产物快速连接试剂盒(Promega)、HM(-)、HM(+)、脱色液、封闭液、显色液、终止液等。

尼康体视显微镜(Nikon SMZ18, 日本)、核酸检测仪(Implen N60, 德国)、循环浴槽(PolyScience, 美国)、凝胶成像仪(Uvitec Essential V6, 英国)、高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国)、梯度 PCR 仪(Eppendorf, 德国)、离心机(Sigma, 德国)、BG-

Power300 电泳仪(Baygene, 中国)等。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

从青海大学生态环境工程学院青海湖裸鲤转录组测序结果得到的 *TRH* 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计引物, 扩增基因片段长度为 552 bp, 引物序列为 TRH-F: 5'-GCAGGA CCGAGGT TGTTCATGAG-3'; TRH-R: 5'-TCCAGTCCTCGCAC AGTCTCTTC-3'。引物合成由生工生物工程(上海)公司完成。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

从液氮中取出脑组织, 用组织研磨器(Tiagen)进行研磨, 使用 Takara MiniBest Universal RNA Extraction Kit 提取总 RNA, 核酸微量仪检测提取的 RNA 浓度和纯度。

1.2.3 PCR 扩增与纯化

使用 Green Taq mix 试剂盒, 常规 PCR 扩增。回收扩增产物并用 DNA 纯化试剂盒纯化, 检测回收条带。

1.2.4 连接、转化和测序

目的片段与 PGEM-T 载体链接并转化至 DH5α 大肠杆菌。LB 培养基 37℃ 培养, 经菌液 PCR 菌液验证后测序。

1.2.5 提取质粒

利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒 DNA, 检测质粒的浓度和纯度。

1.2.6 制备探针

分析测序结果: *TRH* 基因插入方向为正向, 上游引物在 T7 端, 选择的酶切位点在 T7 端。将上述提取的重组质粒用 Sac II 酶酶切, 用地高辛抗体和 SP6 RNA 聚合酶制备 RNA 探针^[7]。

1.2.7 原位杂交

杂交第 1 天: 取 1~11 d 的青海湖裸鲤胚胎各五个至 EP 管中; 复水处理; 胰蛋白酶处理胚胎, 1~3 d 的胚胎不做处理, 4~11 d 的胚胎蛋白酶 K 处理时间依次为 20、25、30、35、40、45、50、60 min。脱色处理, 1~11 d 的胚胎脱色液处理时间依次为 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、14、16 min。将胚胎放入杂交槽中, 加入 400 μL 预热的 HM(-), 70℃ 水浴 2 h。弃 HM(-), 加入 500 μL HM(+) 与 *TRH* 探针混合液。杂交槽避光, 70℃ 水浴过夜。

杂交第 2 天: 回收探针; HM(-) 和 SSC(柠檬酸钠缓冲液)处理 70℃ 水浴, 避光。在如下梯度洗涤:

100% HM(-), 15 min; 75% HM(-)+25% 2 × SSC, 15 min; 50% HM(-)+50% 2 × SSC, 15 min; 25% HM(-)+75% 2 × SSC, 15 min; 2 × SSC, 15 min; 0.2 × SSC, 30 min, 2 次。

室温下在慢速摇晃的摇床上进行以下梯度洗涤:

75% 0.2 × SSC+25% PBST, 10 min; 50% 0.2 × SSC + 50% PBST, 10 min; 25% 0.2 × SSC + 75% PBST, 10 min; 100% PBST, 10 min;

各杂交槽中加入封闭液 500 μL, 2 h 后弃封闭液。在杂交槽中加入抗体+封闭液 500 μL, 摇床 1 h, 4℃ 冰箱过夜。

杂交第 3 天: 吸出抗体+封闭液, 快速加入 500 mL PBST, 摇床 10 min; 加入 500 mL PBST, 摇床避光 6×15 min; 加入 500 μL staining buffer, 3×5 min 显色; 显色完成后, 加入 Stopping staining, 停止显色; 采集图像。

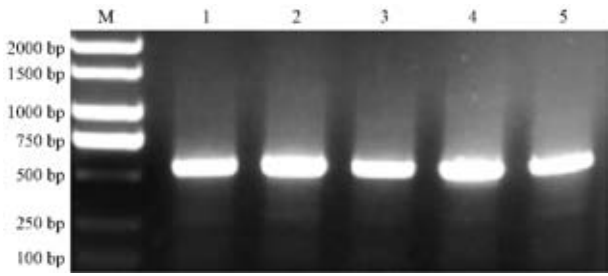
2 结果

2.1 PCR 扩增 TRH 基因

电泳条带清晰明亮, 与预期条带 552 bp 的长度一致。(图 1)

2.2 质粒 DNA 酶切鉴定结果

用 sac II 酶酶切 TRH 基因的质粒后得到的 DNA 序列, 结果显示条带单一, 检测浓度满足制作探针的要求。



注: M; 2000 marker; 1, 2, 3, 4, 5 均为相同的 TRH 基因 PCR 产物。

图 1 青海湖裸鲤 TRH 基因的 PCR 扩增片段

Note: M: 2000 marker; 1, 2, 3, 4, 5 are PCR products of the same TRH gene.

Figure 1 PCR amplification fragments of the TRH gene in *Gymnocypris przewalskii*

2.3 TRH 基因的 CDS 区分析与同源性比较

DNAstar 软件分析 TRH 基因 CDS 为 606 bp, 编码 201 个氨基酸(见图 2)。在 NCBI 网上比对其与其他鱼类氨基酸的同源性, 并用 Clustal X2.1 和 GeneDoc 软件做同源性比对图。如图 2 所示, 裸鲤 TRH 基因编码的氨基酸序列与鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, XP_018964823.1)、鲫鱼 (*Carassius auratus*, XP_026126278.1)、犀角金线鲃 (*Sinocyclocheilus rhinoceros*, XP_016394563.1)、滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus graham* XP_016106118.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NM_001012365.2) 的同源性分别为 144/187 (77%)、139/187 (74%)、129/187 (69%)、117/189 (62%)、105/189 (56%)。提示青海湖裸

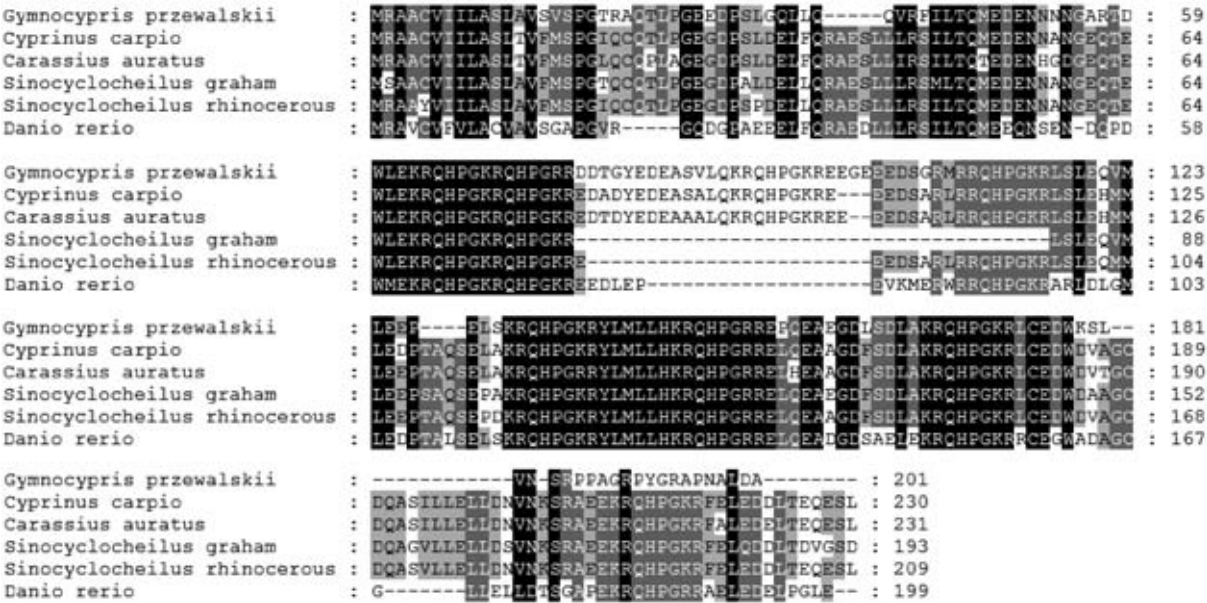


图 2 青海湖裸鲤与其他鱼类的 TRH 的氨基酸序列同源性比较

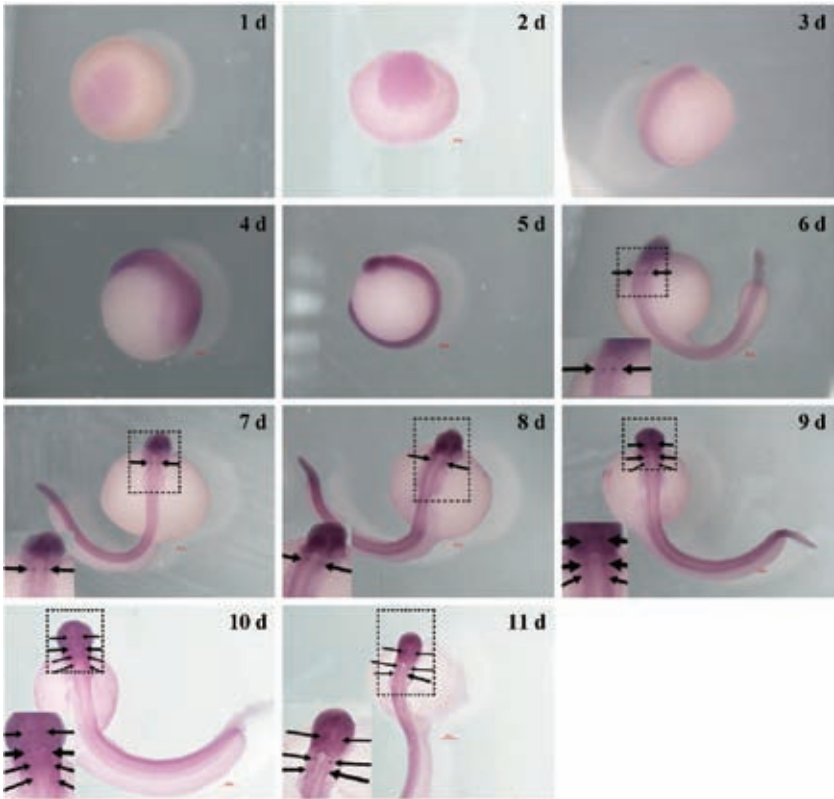
Figure 2 Comparison of the homologous alignments of the amino acid sequences of TRH of *Gymnocypris przewalskii* with that of other Fishes

鲤与鲤鱼、鲫鱼、犀角金线鲃和金鱼的同源性较高;与斑马鱼的同源性较低。

2.4 原位杂交结果

为更准确地证明实验的反义探针的特异性,用 T7 制备质粒 DNA 正义探针,1~11 d 的胚胎原位杂交实验结果显示大脑和脊髓以及其他各组织均未发现杂交信号,胚胎浅层和组织深处的颜色均一,

无明显的标记。表明阴性探针不与靶基因产生特异性杂交。用 SP6 制作反义探针,胚胎原位杂交显示其间脑、中脑、后脑和髓脑出现阳性杂交信号,且随着胚胎的发育,表达点不断增多,间脑表达效果明显。表明阳性探针与胚胎的靶基因产生特异性结合,以及 *TRH* 基因表达具有时间特异性和空间特异性。(见图 3)



注:1 d: 2 细胞期;2 d: 低囊胚期;3 d: 原肠晚期;4 d: 神经胚期;5 d: 视泡形成期;6 d: 尾芽期;7 d: 肌肉效应期 1;8 d: 肌肉效应期 2;9 d: 心脏搏动期 1;10 d: 心脏搏动期 2;11 d: 嗅板期。

图 3 原位杂交阳性探针图(×2)

Note. 1 d, Two-cells stage. 2 d, Low blastula stage. 3 d, Late gastrula stage. 4 d, Neurula stage. 5 d, Optic vesicle stage. 6 d, Tail bud stage. 7 d, Somites stage 1. 8 d, Somites stage 2. 9 d, Heart beating stage 1. 10 d, Heart beating stage 2. 11 d, Olfactory placode stage.

Figure 3 Positive probe in situ hybridization(×2)

3 讨论

青海湖裸鲤胚胎发育至视泡期之前,没有观察到 *TRH* 基因杂交信号,可能是由于该时期中枢神经系统尚未发育完善,处于神经管至脑泡脑的发育阶段。肌肉效应期阶段观察到 *TRH* 基因在脑泡脑的间脑部位有较清晰的杂交信号,而在中脑、后脑、髓脑和脊髓处没有观察到杂交信号。心脏搏动期至嗅板期阶段,间脑、中脑、后脑和髓脑检测到 *TRH* 基

因均有表达,间脑的表达量明显高于其他脑部位。提示 *TRH* 基因表达最早时期出现于肌肉效应期,且主要表达部位在间脑,此后在脑组织广泛区域均有表达。提示 *TRH* 除对垂体有促进作用之外,对其他脑区可能发挥神经调质的作用。

TRH 作为下丘脑-垂体-甲状腺(hypothalamus-pituitary-thyroid, HPT)轴的关键神经信息分子^[8-9],能够促进垂体前叶释放促甲状腺激素(TSH),而 TSH 可促使甲状腺泡释放甲状腺激素(THs),从而

加强机体的基础代谢。有报道,促甲状腺激素释放激素具有广泛的生物学功能,能够促进生长激素的分泌,进而促进肌肉的生长以及长骨的生长^[10]。张晓娜等^[11]也证实了鱼类甲状腺激素对鱼类胚胎发育、仔鱼的变态发育、提高存活率和促进生长等方面均有作用。青海湖裸鲤在高盐碱,寒冷的生境中得以生存、生长和繁殖,TRH 发挥着极其重要的调节作用,该基因在裸鲤胚胎期就得以表达,这更有力地验证了这一推测。另外,TRH 基因在裸鲤中枢神经系统具有时空特异性表达的特点,表明该基因是可作为中枢神经发育的分子标记物,对进一步研究该基因在裸鲤发育生物学的特殊作用具有重要意义。青海湖裸鲤与其他鲤科鱼类 TRH 同源性比较得出,TRH 蛋白具有一定的保守性。从进化的角度看,青海湖裸鲤的 TRH 基因突变的程度相对较低,是否存着另外特殊的作用,有待进一步研究。此外,利用 RISPR/Cas9 技术对青海湖裸鲤 TRH 基因进行编辑^[12],来进一步验证该基因对裸鲤生物学功能影响将是我们未来的研究方向。

参 考 文 献(References)

- [1] 王国良. 促甲状腺激素释放激素的分布及生理作用 [J]. 生理科学进展, 1990, 21(3): 275-278.
Wang GL. Distribution and physiological effects of thyrotropic hormone releasing hormone [J]. Prog Physiol Sci, 1990, 21(3): 275-278.
- [2] 王磊, 吕刚, 曹阳, 等. 静脉注射 TRH 治疗损伤神经的实验研究 [J]. 中国医学工程, 2012, 20(9): 36-37.
Wang L, Lv G, Cao Y, et al. Experimental study on the treatment of nerve injury by intravenous TRH [J]. Chin Med Eng, 2012, 20(9): 36-37.
- [3] Fröhlich E, Wahl R. The forgotten effects of thyrotropin-releasing hormone: metabolic functions and medical applications [J]. Front Neuroendocrinol, 2018, 52(6): 29-43.
- [4] Galas L, Raoult E, Tonon MC, et al. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates [J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 164(1): 40-50.
- [5] 张春霞, 刘峰. 斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程 [J]. 遗传, 2013, 35(4): 422-428.
Zhang CX, Liu F. A brief protocol for high-resolution whole mount in situ hybridization in zebrafish [J]. Heredities, 2013, 35(4): 422-428.
- [6] Chitramuthu BP, Bennett HP. High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function [J]. J Vis Exp, 2013, 80: e50644.
- [7] 范沛, 陈丽颖, 赵瑞丽, 等. 地高辛标记探针原位杂交组织化学技术及其应用 [J]. 科技创新导报, 2007, 4(35): 25.
Fan P, Chen LY, Zhao RL, et al. In situ hybridization histochemistry of digoxin labeled probe and its application [J]. Sci Technol Innov Herald, 2007, 4(35): 25.
- [8] 左卫星, 张志飞, 刘志民, 等. 参与下丘脑-垂体-甲状腺轴负反馈调控的分子元件研究进展 [J]. 生物技术进展, 2017, 7(6): 601-607.
Zuo WX, Zhang ZF, Liu ZM, et al. Review on molecular components participating negative feedback regulation in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis [J]. Curr Biotechnol, 2017, 7(6): 601-607.
- [9] Blanton ML, Specker JL. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction [J]. Crit Rev Toxicol, 2007, 37(1-2): 97-115.
- [10] 夏冰, 王钢, 王捷. 促甲状腺激素释放激素的广泛生物学作用 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30(22): 3669-3670.
Xia B, Wang G, Wang J. Extensive biological effects of thyroid stimulating hormone releasing hormone [J]. J Pract Med, 2014, 30(22): 3669-3670.
- [11] 张晓娜, 田华, 汝少国. 鱼类甲状腺轴对胚胎发育、仔鱼变态及性别分化的调控作用研究进展 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2012, 42(S1): 94-101.
Zhang XN, Tian H, Ru SG. Research progress on the regulation of thyroid axis on embryo development, larval metamorphosis and sex differentiation [J]. Period Ocean Univ Chin, 2012, 42(S1): 94-101.
- [12] Lin CY, Oulhen N, Wessel G, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in sea urchins [J]. Methods Cell Biol, 2019, 151: 305-321.

[收稿日期] 2019-05-30

袁江玲,徐晓辉,史深,等. 子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏形态学特征的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 765-769.

Yuan JL, Xu XH, Shi S, et al. Morphological comparison of kidneys between *Meriones meridianus* and SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 765-769.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.012

子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏形态学特征的比较

袁江玲,徐晓辉,史深,张燕,徐艺玫*

(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 为子午沙鼠种群研究奠定基础,为以子午沙鼠作为研究对象开发动物模型的研究者提供数据支持。**方法** 本研究以野生子午沙鼠和实验用 SD 大鼠为研究对象,观察了两者肾脏组织形态学特点,并对其肾脏组织形态学指标、肾体比、肾单位密度等参数进行了比较。**结果** 两种大鼠相比:肾脏髓质与皮质面积之比、内髓质与皮质面积之比、内髓质面积与肾脏切面面积之比、单位面积内近曲与远曲小管数之比的差异均有统计学意义;两者的肾体比、肾单位密度亦有极显著性种间差异。**结论** 肾脏形态和组织学特征表明野生子午沙鼠肾脏组织形态结构与其浓缩尿液的能力具有较大相关性,符合耐干旱哺乳动物的肾脏特点。

【关键词】 子午沙鼠;SD 大鼠;肾脏;组织形态学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0765-05

Morphological comparison of kidneys between *Meriones meridianus* and SD rats

YUAN Jiangling, XU Xiaohui, SHI Shen, ZHANG Yan, XU Yimei*

(the Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: XU Yimei. E-mail: xyymeimei@163.com

【Abstract】 Objective To lay a foundation for the study of Meridian gerbils and provide data support for researchers who develop animal models using *Meriones meridianus*. **Methods** The morphological indexes, nephron densities and histological characteristics of the kidneys of wild *M. meridianus* and laboratory Sprague Dawley (SD) rats were compared. **Results** Comparison of the wild *M. meridianus* and laboratory SD rats showed that the ratios of medullary to cortical area, inner medullary to cortical area and inner medullary to renal section area were significantly different. In addition, the ratio of proximal and distal tubules per unit area, the kidney/body weight ratio and nephron density also showed significant interspecies differences. **Conclusions** The renal morphology and histological characteristics of wild *M. meridianus* show a significant correlation with their ability to concentrate urine, and are consistent with the characteristics of the kidneys of other drought-tolerant mammals.

【Keywords】 *Meriones meridianus*; SD rat; kidney; tissue morphology

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

子午沙鼠 (*Meriones meridianus*) 属啮齿目 (*Rodentia*), 仓鼠科 (*Cricetidae*), 沙鼠亚科 (*Gerbillinae*), 沙鼠属 (*Meriones*) 动物, 抗病力强, 繁殖快^[1-2]。该鼠具有体积小、性情温和、繁殖力强、性成熟早、易驯眠和易饲养、有胆囊等特点, 符合实验动物的优选条件。子午沙鼠作为待开发的新的实验动物资源, 已受到国内外研究者的关注, 在脑神经外科及寄生虫学等^[3-5]许多领域具有广泛的应

[基金项目] 国家自然科学基金(31460579)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (31460579).

[作者简介] 袁江玲(1977—), 女, 助理研究员, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物病理。Email: xjzgyuan@126.com

[通信作者] 徐艺玫(1973—), 女, 正高级实验师, 研究方向: 实验动物管理研究。Email: xyymeimei@163.com

用前景。野生子午沙鼠靠食用耐旱的灌丛植物的茎叶或者尚未掉落的种子补充体内水分,肾脏的结构与尿浓缩能力相适应,因此其肾脏也具有一定的特征性^[6]。本研究运用光学显微镜技术研究了野生子午沙鼠肾脏的形态和组织学特点并与 SD 大鼠进行比较,旨在揭示其肾组织结构的特殊性,为子午沙鼠在生物学方面的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取成年野生子午沙鼠和 SPF 级 SD 大鼠各 20 只,雌雄各半,用于解剖学及组织形态学数据分析及比较,12 周龄的 SD 大鼠和体重 72 g 以上的子午沙鼠为成年鼠^[7]。野生子午沙鼠于 2015 年 5 月捕获自新疆轮台地区,体重在 60~110 g 之间,属子午沙鼠塔里木亚种,在室温 22~26℃、自然光照的普通实验室环境下适应性饲养。SD 大鼠购自新疆实验动物研究中心,实验动物生产许可证号:【SCXK(新)2011-0001】,实验动物使用许可证号:【SYXK(新)2011-0002】。

1.1.2 试剂与仪器

HE 染色液(自配)、Masson 染色试剂盒及 PAS 染色试剂盒(Baso, 中国)、电子天平(BS323S, Sartorius, 德国)、立体解剖镜(XTC-I, Olympus, 日本)、石蜡旋转式切片机(HM325, Thermo, 德国)、生物组织自动脱水机(TS-12H, 亚鹏, 中国)、生物组织冷冻包埋机(BM-VI, 亚鹏, 中国)、显微成像系统(5000B, Leica, 德国)、数字切片扫描仪(Pannoramic SCAN, 3DHISTECH, 匈牙利)。

1.2 方法

动物经 CO₂ 过量处死,称重后进行大体解剖观察,然后摘取两侧肾脏,去除肾周脂肪和结缔组织,以吸水纸吸去表面液体后称重,然后将肾脏置于 4% 甲醛溶液中固定。48 h 后取出组织以流水去除甲醛,沿冠状切面将肾脏切开观察解剖学差异;保留最中间约 0.2 cm 厚度的肾脏组织,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、制作石蜡切片,蜡块组织修切至接近最大面积处时连续切片 3 张,分别进行 HE 染色、Masson 染色和 PAS 染色。HE 染色切片用数字切片扫描仪进行切片扫描,用其自带看图软件 Pannoramic Viewer 测量切片中肾脏皮质厚度(cortical thickness, CT)、外髓质厚度(outer medullar

thickness, OMT)、皮质面积(cortical area, CA)、外髓质面积(outer medullar area, OMA)、内髓质面积(inner medullar area, IMA)、肾脏切面面积(renal area, RA)、计数整个切面内的肾小球个数。PAS 染色切片在 20 倍物镜下随机选择肾脏皮质(cortical)和近髓质(near medulla)处 10 个视野计数近曲小管(proximal convoluted tubules, PCT)与远曲小管(distal convoluted tubules, DCT)的数量。Masson 染色切片观察动物肾脏内纤维组织的分布情况。

1.3 统计学分析

数据处理使用 SPSS 19.0 软件包。采用 *t* 检验比较两种实验动物的外髓质厚度与皮质厚度之比(OMT/CT)、外髓质面积与皮质面积之比(OMA/CA)、外髓质面积与肾脏切面面积之比(OMA/RA)、内髓质面积与皮质面积之比(IMA/CA)、内髓质面积与肾脏切面面积之比(IMA/RA)、髓质面积与皮质面积之比(MA/CA)、肾指数(kidney index)(肾重/体重)、肾单位密度(nephron density)(肾小球数/肾脏切面面积)、皮质部近曲小管数/远曲小管数(cortical proximal tubules/cortical distal tubules, CPT/CDT)、近髓质部近曲小管数/远曲小管数(near medullary proximal tubules/near medullary distal tubules, NMPT/NMDT)^[8-12],所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏解剖学差异种间比较

如图 1 所见,成年 SD 大鼠与子午沙鼠肾脏冠状剖面图,可以看到子午沙鼠具有较长的、突出于肾盂的肾乳头。



图 1 SD 大鼠与子午沙鼠肾脏冠状剖面图

Figure 1 Coronal profile of kidneys of SD rats and *M. meridianus*

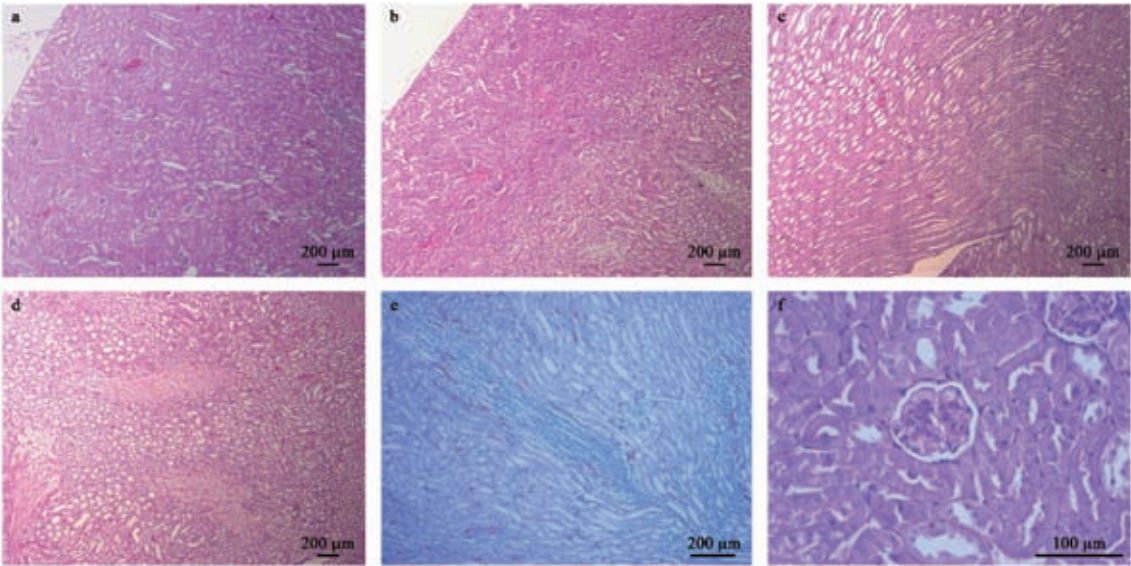
2.2 肾脏组织形态学观察

肾脏组织切片镜检结果,如图 2 所示,HE 染色切片中 SD 大鼠与子午沙鼠肾脏皮质部无明显差异,而子午沙鼠的髓质部散在分布多量的形似纤维组织的成份,经 Masson 染色可确认为纤维组织;PAS 染色可清楚的显示近曲小管的刷状缘,便于计数肾脏组织切片中近曲小管及远曲小管的切面数量,用于进行统计学分析。

2.3 肾脏组织形态学参数种间比较

子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏的外髓质厚度与皮质

厚度之比(OMT/CT)、外髓质面积与皮质面积之比(OMA/CA)、外髓质面积与肾脏面积之比(OMA/RA)无显著的种间差异;子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏皮质部近曲与远曲小管数之比(CPT/CDT)有显著的种间差异($P<0.05$);内髓质面积与皮质面积之比(IMA/CA)、内髓质面积与肾脏面积之比(IMA/RA)、髓质面积与皮质面积之比(MA/CA)、肾指数(Kidney index)、肾单位密度(Nephron density)以及近髓部近曲与远曲小管数之比(NMPT/NMDT)在两种实验动物间均有极显著的种间差异($P<0.01$)(见表 1)。



注:a;SD 大鼠肾脏皮质(HE 染色,×50);b:子午沙鼠肾脏皮质(HE 染色,×50);c:SD 大鼠肾脏髓质(HE 染色,×50);d:子午沙鼠肾脏髓质(HE 染色,×50);e:子午沙鼠肾脏髓质(Masson 染色,×100);f:子午沙鼠肾脏(PAS 染色,×400)。

图 2 SD 大鼠与子午沙鼠肾脏组织学图像

Note. a, SD rat kidney cortex (H&E staining,×50). b, *Meriones meridianus* kidney cortex (HE staining,×50). c: SD rat kidney medulla (HE staining,×50). d, *Meriones meridianus* kidney medulla (HE staining,×50). e: *Meriones meridianus* kidney medulla (Masson staining,×100). f: *Meriones meridianus* kidney (PAS staining,×400).

Figure 2 Histological images of kidneys in the SD rats and *Meriones meridianus*

表 1 肾脏组织形态学参数比较(̄x±s)

组别 Groups	SD 大鼠 SD Rat	子午沙鼠 <i>M. meridianus</i>
外髓质厚/皮质厚 OMT/CT	0.75±0.19	0.79±0.17
外髓质面积/皮质面积 OMA/CA	0.36±0.14	0.40±0.12
外髓质面积/肾脏面积 OMA/RA	0.23±0.06	0.23±0.05
内髓质面积/皮质面积 IMA/CA	0.18±0.04	0.35±0.05**
内髓质面积/肾脏面积 IMA/RA	0.12±0.01	0.20±0.02**
髓质面积/皮质面积 MA/CA	0.54±0.18	0.76±0.15**
肾指数 Kidney index(%)	0.65±0.09	0.84±0.07**
肾单位密度 Nephron density	2.96±0.29	5.14±0.32**
皮质部近曲小管数/远曲小管数 CPT/CDT	2.67±0.21	3.04±0.45*
近髓质部近曲小管数/远曲小管数 NMPT/NMDT	2.61±0.40	3.20±0.51**

注:和 SD 大鼠比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the SD rat, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

研究表明,哺乳动物肾脏内髓质参与尿液浓缩过程,是尿素循环累积的场所,更大面积的内髓质表示更强的尿素累积能力,通过测定内髓质面积与肾脏面积、髓质面积与皮质面积的比值,可以评估肾脏对水环境的适应能力^[13-15]。生活于干旱地区的小型哺乳动物,其肾脏形态学的各种指标均较高^[16]。本研究中子午沙鼠与 SD 大鼠相比,内髓质面积与皮质和肾脏切面面积之比均存在极显著性差异,而外髓质与皮质的厚度和面积比,以及外髓质面积与肾脏切面面积之比则无明显的种间差异。

动物的节水能力表现了其对栖息地环境中水分条件的适应性,生活于干旱地区动物应具备更长的近曲小管,而生活于水源充足地区动物的近曲小管较短^[17]。子午沙鼠与 SD 大鼠相比,单位面积内近曲小管数与远曲小管数之比有极显著的种间差异,组织切片中子午沙鼠的近曲小管截面数更多说明它有比 SD 大鼠更长的近曲小管,近曲小管具有重吸收水分的功能,因此,子午沙鼠的尿浓缩能力与其更长的近曲小管有较大相关性。此外,子午沙鼠的肾单位密度较 SD 大鼠高,相对多的肾小球数量使尿液滤过率也相对增加,浓缩尿液的功能也相应增强^[18]。

子午沙鼠因其独特的解剖学、生理学和行为学特征在营养代谢病、脑血管疾病、寄生虫病,自发性肿瘤等诸多研究中应用广泛^[19]。经过多次解剖子午沙鼠,研究人员还发现子午沙鼠的输尿管相较于 SD 大鼠的要粗一些;子午沙鼠的脑大致为菱形,而 SD 大鼠的则为椭圆形。此外,子午沙鼠的听觉十分灵敏,通过解剖发现它的听泡非常发达,体积是 SD 大鼠的几倍,因此研究小组认为子午沙鼠在实验动物研究领域会有更大的空间。有研究表明^[20],不同地区的子午沙鼠有较高的遗传多样性,研究小组对新疆子午沙鼠的叶氏亚种(吐鲁番地区)和塔里木亚种(轮台地区)进行了室内繁殖实验,据研究人员初步观察发现两地的子午沙鼠在形体及外观上均有较大差异,叶氏亚种的平均体重仅为塔里木亚种的 3/5 左右。因此,子午沙鼠的实验化研究具有一定的科学意义。

参 考 文 献(References)

- [1] Liao LF. Laboratory breeding of the midday gerbils (*Meriones meridianus*) and biological characteristics [C]. Wild Rodents in the Xinjiang Uygur Autonomous Region of China: For Investigation of Infectious Disease Models (1998-1999) Mamoru ITO. Sun-Ei Press, Yokohama, Japan, 2000, 53-56.
- [2] 廖力夫,王诚,黎唯,等. 子午沙鼠某些生物学特征的研究 [C]. 中国实验动物学会第六届学术年会论文集 [A]. 北京: 2004.
- Liao LF, Wang C, Li W, et al. Study on some biological parameters of midday gerbils (*Meriones meridianus*) [C]. The 6th Conference Symposiums of Chinese Association of Laboratory Animal Science [A]. Beijing: 2004.
- [3] 林皓,吴敏. 沙鼠脑缺血耐受的组织学变化及 HSP 在其中的作用 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2001, 9(3): 137-140.
- Lin H, Wu M. Histological findings and HSP analysis of ischemic tolerance in gerbil [J]. J Brain Nerv Dis, 2001, 9(3): 137-140.
- [4] 徐艺玫,王新国,史深,等. 封闭群子午沙鼠的寄生虫感染及药物净化效果 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 10(24): 499-502.
- Xu YM, Wang XG, Shi S, et al. Parasitic infection in a closed group of outbred *Meriones meridianus* and results of parasite eradication [J]. Acta Lab Ani Sci Sinic, 2016, 10(24): 499-502.
- [5] 徐艺玫,廖力夫,史深,等. 子午沙鼠的室内繁殖特征 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 67-70.
- Xu YM, Wang XG, Shi S, et al. Reproductive performance of indoor-housed *Meriones meridianus* [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(2): 67-70.
- [6] 张春燕,侯天德,程防,等. 子午沙鼠子鼠肾中水通道蛋白 1、2 的表达 [J]. 动物学杂志, 2014, 49(2): 162-169.
- Zhang CY, Hou TD, Chen F, et al. Expression of AQP 1, 2 proteins in kidney of filial *Meriones meridianus* [J]. Chin J Zoo, 2014, 49(2): 162-169.
- [7] 林纪春,楚定成,雷刚,等. 塔里木盆地子午沙鼠年龄鉴定及种群年龄组成的研究 [J]. 地方病通报, 2004, 19(4): 1-4.
- Lin JC, Chu DC, Lei G, et al. Studies on age estimation and constitution of population age of *Meriones meridianus* in the Tarim basin [J]. End Dis Bull, 2004, 19(4): 1-4.
- [8] Heisinger JF, Breitenbach RP. Renal structural characteristics as indexes of renal adaptation for water conservation in the genus *Sylvilagus* [J]. Physiol Zool, 1969, 42(2): 160-172.
- [9] Brownfield MS, Wunder BA. Relative medullary area: a new structural index for estimating urinary concentrating capacity of mammals [J]. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol, 1976, 55(1): 69-75.
- [10] Tejo Riquelme PA, Diaz Isenrath GB, Andino N, et al. Renal intraspecific variation along an aridity gradient detected by new renal indices in a desert herbivorous rodent [J]. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2014, 321(6): 348-356.
- [11] Zervanos SM, Naveh S. Renal structural flexibility in response to environmental water stress in feral hogs [J]. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 1988, 247(3): 285-288.
- [12] Beliveau R, Brunette MG. The renal brush border membrane in man. Protein pattern, inorganic phosphate binding and transport;

[1] Liao LF. Laboratory breeding of the midday gerbils (*Meriones meridianus*) and biological characteristics [C]. Wild Rodents in the Xinjiang Uygur Autonomous Region of China: For

comparison with other species [J]. Ren Physiol, 1984, 7(2): 65-71.

[13] Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney [J]. Am J Physiol, 1961, 200(6): 1119-1124.

[14] Yang BX, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: new insights from studies in mice [J]. Am J Physiol, 2005, 288(5): 881-896.

[15] 张梦,王德华. 内蒙古草原五种啮齿动物肾脏形态学特征比较 [J]. 兽类学报, 2018, 38(1): 36-45.

Zhang M, Wang DH. Comparison of renal morphology in five rodent species from Inner Mongolia grassland [J]. Acta Theri Sinica, 2018, 38(1): 36-45.

[16] AL-Kahtani MA, Zuleta C, Caviedes-Vidal E, et al. Kidney mass and relative medullary thickness of rodents in relation to habitat, body size, and phylogeny [J]. Physi Biochem Zool, 2004, 77(3): 346-365.

[17] Valtin H. Structural and functional heterogeneity of mammalian nephrons [J]. Am J Physiol, 1977, 233(6): 491-501.

[18] 张春燕,侯天德,程昉,等. 子午沙鼠子鼠肾脏肾单位的发育 [J]. 四川动物, 2014, 33(3): 403-408.

Zhang CY, Hou TD, Chen F, et al. The development of nephron in kidney of fetal *Meriones meridianus* [J]. Sichuan J Zoo, 2014, 33(3): 403-408.

[19] 逯晓龙. 新疆子午沙鼠尿液生化指标测定分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.

Lu XL. Analysis of urine biological parameter Of *Meriones meridianus* In Xinjiang [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015.

[20] 黄翔,周立志. 蒙新区子午沙鼠种群的遗传多样性和遗传结构 [J]. 兽类学报, 2012, 32(3): 179-187.

Huang X, Zhou LZ. Genetic diversity and genetic structure of the mid-day gerbil population in Inner Mongolia-Xinjiang Plateau [J]. Acta Theri Sinica, 2012, 32(3): 179-187.

[收稿日期] 2019-05-18

黄小荣,黄衍恒,叶霖,等. 巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的构建及鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 770-775.
Huang XR, Huang YH, Ye L, et al. Construction and identification of macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 770-775.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.013

巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的构建及鉴定

黄小荣[#],黄衍恒[#],叶霖[#],杨陈,汤济鑫,安宁,刘建兴,刘华锋^{*}

(广东医科大学附属医院肾病研究所,湛江市慢性肾脏病防控重点实验室,湛江 524001)

【摘要】 目的 构建并鉴定巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠,为研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供动物模型。**方法** 将引进 LysM-Cre 小鼠与 *Atg5*^{fllox/+} 小鼠进行杂交,*Atg5*^{fllox/+} 小鼠自交,分别获得基因型为 *Atg5*^{fllox/+} *Cre*^{+/-} 和 *Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{-/-} 的子代小鼠;将上述两种基因型的子代小鼠杂交,得到巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠 (*Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{+/-}, *Atg5*^{-/-}) 和对照小鼠 (*Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{-/-}, *Atg5*^{+/+})。提取小鼠鼠尾组织基因组 DNA,经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳后,在 DNA 水平判断小鼠基因型;提取小鼠骨髓来源巨噬细胞 RNA 和蛋白,利用基因测序和 Western blot 技术检验 *Atg5* 基因的敲除效果。**结果** 成功建立巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型,该小鼠存活并且可育。在基因及蛋白水平上,巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除成功;且与 *Atg5*^{+/+} 小鼠相比,*Atg5*^{-/-} 小鼠自噬基础水平低下 (p62 明显增多,LC3 II 明显减少),对于自噬激活剂雷帕霉素刺激不能恢复到正常基础水平。**结论** 利用 Cre/loxP 系统,本研究成功构建并鉴定出条件性巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除小鼠,为在动物水平研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供研究平台。

【关键词】 巨噬细胞;*Atg5* 基因;基因敲除;自噬;基因型鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0770-06

Construction and identification of macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice

HUANG Xiaorong[#], HUANG Yanheng[#], YE Lin[#], YANG Chen, TANG Jixin, AN Ning, LIU Jianxing, LIU Huafeng^{*}

(Institute of Nephrology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, and Key Laboratory of Prevention and Management of Chronic Kidney Disease of Zhanjiang City, Zhanjiang 524001, China)

Corresponding author: LIU Huafeng.E-mail: hf-liu@263.net

【Abstract】 Objective To construct and identify macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice to provide an animal model for studying the role of macrophage autophagy in the pathogenesis of renal diseases. **Methods** LysM-Cre mice were hybridized with *Atg5*^{fllox/+} mice, and *Atg5*^{fllox/+} mice were self-crossbred to obtain progeny mice with *Atg5*^{fllox/+} *Cre*^{+/-} and *Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{-/-}. The progeny mice of the above two genotypes were then hybridized to obtain macrophage-conditional *Atg5* gene-knockout mice (*Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{+/-}, *Atg5*^{-/-}) and control mice (*Atg5*^{fllox/fllox} *Cre*^{-/-}, *Atg5*^{+/+}). The phenotypes of the mice were determined via electrophoresis of DNA that had been extracted from mouse tail tissue and amplified via PCR. Mouse bone marrow-derived macrophage RNA and protein were extracted, and *Atg5* gene expression was tested via sequencing and

【基金项目】 国家自然科学基金(81470959, 81670654, 81700627);广东省科技创新战略专项资金(2018A030313231);湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2018A01034, 2018A01040)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81470959, 81670654, 81700627), Science and Technology Innovation Strategy Special Fund of Guangdong Province (2018A030313231), Science and Technology Development Special Fund Competitive Distribution Project of Zhanjiang City (2018A01034, 2018A01040).

【作者简介】 黄小荣(1993—),女,硕士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 1028781793@qq.com;

黄衍恒(1993—),男,硕士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 396852647@qq.com;

叶霖(1990—),女,博士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 471775761@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 刘华锋,博士,教授,从事肾小管-间质损伤及防治研究。Email: hf-liu@263.net

Western blotting. **Results** A macrophage-conditional *Atg5*-knockout mouse model was established; these mice survived and were fertile. The macrophage *Atg5* gene was successfully knocked out at both the gene and protein levels. The basic macrophage autophagy level in the *Atg5*^{-/-} mice was much lower than that in the *Atg5*^{+/+} mice (p62 was significantly increased, and LC3II was significantly reduced) and could not be restored to the basic level without deleting *Atg5* after stimulation with the autophagy activator rapamycin. **Conclusions** Macrophage-conditional *Atg5* - knockout mice are successfully constructed and identified via the Cre/loxP system, providing a research platform for studying the role of macrophage autophagy in renal disease pathogenesis at the animal level.

【Keywords】 macrophage; *Atg5* gene; gene knockout; autophagy; genotype identification

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

巨噬细胞属于单核吞噬细胞家族成员, 既在固有免疫中起重要作用, 也可通过招募其他免疫细胞如淋巴细胞产生适应性免疫反应, 进而在机体免疫反应、组织损伤和修复中起关键作用^[1]。根据表型和功能不同, 巨噬细胞可分为不同的亚类, 一般可分为经典活化型 M1 促炎巨噬细胞 (M1) 和替代活化型 M2 抗炎巨噬细胞 (M2)。M1 可大量分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-23、活性氧簇 (ROS) 等促炎细胞因子; 而 M2 则可分泌 IL-4、IL-13、IL-10、TGF- β 1 等炎症抑制因子, 及成纤维细胞生长因子及血小板衍生因子等促纤维化因子^[2-3]。几乎所有类型的急性肾损伤和进行性慢性肾脏病都可在肾小球及肾间质中检测到巨噬细胞浸润^[4], 且根据肾脏微环境变化, 巨噬细胞可在促炎表型和抗炎促纤维化表型之间进行转化^[5], 从而在肾小管-间质损伤、修复和纤维化各阶段中发挥着不同作用^[4, 6-8], 显著影响肾小管-间质损伤的最终转归。

近年来, 自噬通路在肾小管-间质损伤进程中的作用越来越受关注; 而目前对自噬的研究主要集中在 TECs 上^[9-10], 免疫细胞自噬在肾脏疾病的作用研究尚涉及甚少。现研究认为, 自噬可影响免疫细胞的增殖、凋亡、迁徙、分化、活化以及炎症因子分泌^[11]。有研究表明在眼色素层炎^[12]、高脂饮食诱导肥胖小鼠^[13]、半乳糖胺联合 LPS 诱导的急性肝损伤^[14]等诸多炎症模型中, 特异性阻断巨噬细胞自噬通路, 可引起巨噬细胞炎症体降解受阻而分泌大量炎症因子 IL-1 阻和 IL-18, 加剧疾病相关器官的炎症反应及损伤严重程度^[12]。因此巨噬细胞自噬很可能参与调节机体炎症免疫反应, 影响疾病进展。然而在肾脏疾病发生发展过程中, 自噬如何调节巨噬细胞功能, 进而影响肾脏疾病进展尚未知晓。

ATG5 是自噬通路中的关键蛋白, 对于自噬泡形成及降解是必不可少的^[15]。ATG12-ATG/ATG16 复合物通过参与 LC3-PE 偶联途径或直接与膜结合两种方式形成自噬体膜^[16]; 并且 ATG5 可通

过与自噬体膜上的 TECRP 结合, 促进自噬体与溶酶体融合^[17-18], 形成自噬溶酶体, 最终降解其所包裹的内容物。敲低或敲除 ATG5 可导致自噬下调或完全抑制, 表明 ATG5 在自噬通路中起关键作用^[19]。因此, 巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型的构建, 为在动物水平上研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发生发展中的作用是可行且非常必要的。在本实验中我们将探讨最佳繁殖方案、繁育小鼠基因型鉴定及 *Atg5* 敲除效果分析, 为研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄 SPF 级 C57BL/6J-*Atg5*^{em2(flox)/SMOC} 小鼠共 6 只, 雌雄各 3 只; LysM-Cre JAX stock No. 004781 小鼠共 4 只, 雌雄各 2 只, 体重 20 ~ 25 g, 购于上海南方模式生物科技股份有限公司【SCXK (沪) 2017-0010】, 饲养于广东医科大学实验动物中心【SYXK (粤) 2015-0147】。所有小鼠饲养于 12 h/12 h 光照/黑暗条件下, 自由采食和饮水, 所有操作均符合实验动物伦理学要求 (GDY1801016)。

1.1.2 试剂与仪器

Premix Tag 2.0 plus (TaKaRa, 日本); BIOWEST AGAROSE, Gel red 核酸凝胶染料 (联硕科技有限公司, 中国); TAE 缓冲液 (广州锐科生物有限公司, 中国); 雷帕霉素 (Sigma, 美国), 氯喹 (Sigma, 美国), anti-LC3 II antibody (Sigma, 美国); anti-SQSTM1/p62 antibody (MBL, 日本); anti-*Atg5* antibody, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (Abcam, 英国); anti-GAPDH antibody (上海碧云天生物技术有限公司, 中国)。

凝胶电泳仪 (Bio-Rad, 美国); Azure biosystems c500 双激光近红外成像分析仪 (Azure biosystems, 美国); ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Applied

Biosystems, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠尾部组织基因组 DNA 的提取、扩增及鉴定

(1) DNA 提取:采用碱裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA。待新生小鼠达 3~4 周龄打耳标后,剪取小鼠鼠尾约 3 mm,置于 1.5 mL EP 管中;加入 50 mmol/L NaOH 溶液 90 μ L,置恒温水浴锅中 95 $^{\circ}$ C 加热 30 min。待 EP 管冷却后,加入 1 mol/L Tris 溶液 (pH 8.0) 10 μ L 充分震荡混匀,以 12 000 r/min 离心 2 min。取上清置于新 1.5 mL EP 管中, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(2) PCR 扩增: *Flox* 基因的上游引物: 5'-TTCAGTGTACCCTGTGTATTGG-3', 下游引物: 5'-GGGAAACAGTTGTGTTCTTTGT-3' 和 *Cre* 基因的上游引物: 5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3', 下游引物: 5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3', 5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'; 反应体系 25 μ L; 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

(3) PCR 产物鉴定: PCR 产物使用 1.5% (质量浓度) 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像分析系统观察分析条带位置。琼脂糖凝胶上的 PCR 条带出现与 *Flox* 基因、*Cre* 基因 PCR 产物大小一致的条带为阳性结果, 否则为阴性结果。

1.2.2 巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除效果验证

将已进行基因型鉴定的小鼠, 进行敲除效果鉴定。待小鼠 8 周龄后, 取 *Atg5*^{+/+} 小鼠及 *Atg5*^{-/-} 小鼠骨髓细胞, 使用 M-CSF 刺激 7 d, 诱导为成熟巨噬细胞, 提取其 RNA 及蛋白质。将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 后, 进行 PCR 扩增, 上游引物序列: 5'-TTCAGTGTACCCTGTG TATTGG-3', 下游引物序列: 5'-GGGAAACAGTTGTGTTCTTTGT-3', 然后将 PCR 产物送天一辉远生物科技有限公司进行测序。

用 RIPA 裂解液提取巨噬细胞蛋白, BCA 法测定蛋白含量; 按每孔 30 μ g 总蛋白上样, 行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后将蛋白转移至 0.22 μ m PVDF 膜上; 20 mL 含 5% BSA 封闭液室温封闭 1 h; 分别加入 1 $\times$ PBST 稀释的抗 ATG5 多克隆抗体 (1:1000)、抗 LC3 多克隆抗体 (1:1000)、抗 P62 多克隆抗体 (1:1000) 和抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 20 mL 1 $\times$ PBST 缓冲液中洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入 1 $\times$ PBST 缓冲液稀释的二抗辣根酶标

记山羊抗兔 IgG (1:1000), 置摇床室温孵育 1 h; 20 mL 1 $\times$ PBST 缓冲液中洗膜 3 次, 每次 5 min; 在 Azure biosystems c500 双激光近红外成像分析仪曝光成像。通过检测自噬相关蛋白 (如 LC3 II、p62 等), 观察雷帕霉素 (Rapamycin, 10 μ mol/L) 及氯喹 (Chloroquine, 10 μ mol/L) 刺激 24 h 后, 是否能够激活/抑制 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬, 进一步确定 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬功能缺陷。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况

为挑选出最佳繁殖方案, 我们在得到 F2 代小鼠后, 采用了 2 种配种方式进行繁殖 (图 1); 结果为若按 F2a 得到实验小鼠 (*Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{+/-} 或 *Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{-/-}) 共 5 只, 占 50% (5/10), 若按 F2b 得到实验小鼠 (*Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{+/-} 或 *Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{-/-}) 共 3 只, 占 25% (3/12); 以上两种繁育方案的分离比例均符合基本孟德尔遗传定律, 表明巨噬细胞条件性敲除 *Atg5* 基因后对小鼠繁殖能力无明显影响, 且 F2 代采用 F2a 繁殖方式, 获得巨噬细胞条件性敲除 *Atg5* 基因小鼠及对照小鼠的效率更高。

2.2 小鼠基因型鉴定结果

将鼠尾组织基因组 DNA 进行扩增后电泳, 结果见图 2。其中小鼠 *Flox* 基因型鉴定结果见图 2A, 其中 1 为 *Flox*/*Flox* 纯合小鼠 (469 bp), 2、3 和 5 为 *Flox*/+ 杂合子 (469 bp 和 411 bp), 4 为野生型 (411 bp)。 *Cre* 基因型鉴定结果见图 2B, 其中 1、2、4、5 为 *Cre*^{+/-} (700 bp 和 350 bp), 3 和 6 为 *Cre*^{-/-} (350 bp)。

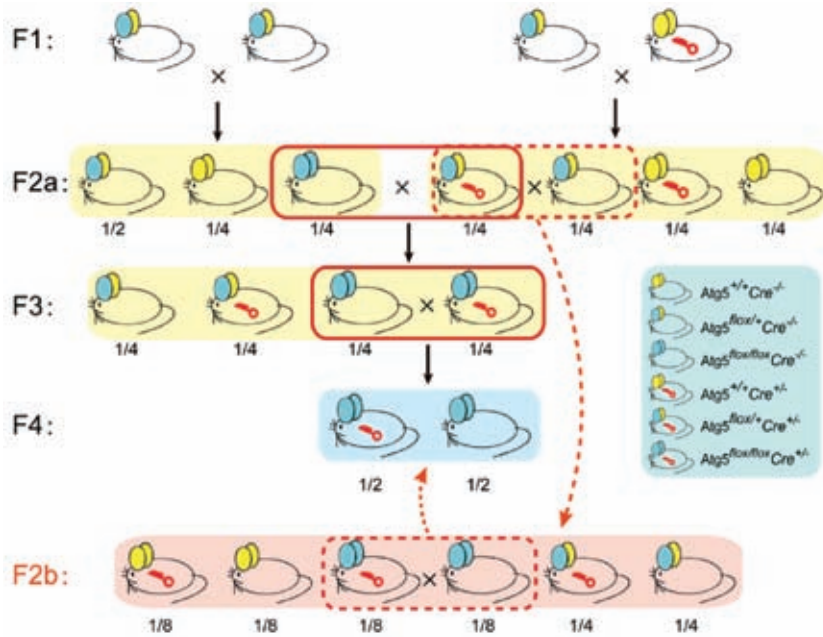
2.3 *Atg5* 基因敲除效果鉴定

分别提取 *Atg5*^{-/-} 小鼠和 *Atg5*^{+/+} 小鼠骨髓细胞, 诱导成巨噬细胞;

(1) 基因水平敲除效果鉴定: 提取该骨髓来源的巨噬细胞 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 使用特异性引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物进行测序, 结果显示 *Atg5*^{-/-} 小鼠编码区 Exon3 (约 128 bp) 被敲除 (图 3A-D)。

(2) 蛋白水平敲除效果鉴定: 提取两组小鼠骨髓来源巨噬细胞蛋白进行 Western blotting 检测, 结果显示: 与 *Atg5*^{+/+} 小鼠相比, *Atg5*^{-/-} 小鼠 ATG5 蛋白表达水平明显减少 (图 3E); 且 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞内 p62 明显增多, 而 LC3II 明显减少 (图 3F), 提示 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞内自噬水平低下。

(3) 功能水平敲除效果鉴定: 使用雷帕霉素

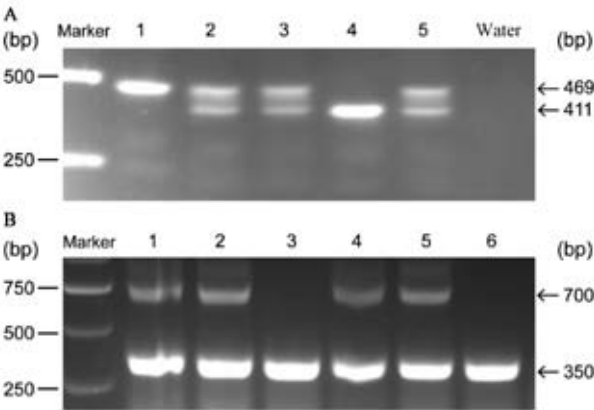


注：“→”为 F2a 繁殖方式，“--->”为 F2b 繁殖方式。

图 1 小鼠繁殖方案

Note. “→” is the propagation mode of F2a and “--->” is the propagation mode of F2b.

Figure 1 Mice breeding program



注:A 为小鼠 Flox 基因型鉴定结果,其中 1 为 Flox/Flox 纯合小鼠,2、3 和 5 为 Flox/+ 杂合子,4 为野生型。B 为 Cre 基因型鉴定结果,其中 1、2、4、5 为 Cre^{+/+},3 和 6 为 Cre^{-/-}。

图 2 部分小鼠基因型 PCR 鉴定

Note: A shows the identification results of Flox genotype in mice, in which 1 is Flox/Flox homozygous mouse, 2, 3 and 5 are Flox/+ heterozygotes, and 4 is wild type. B shows the identification result of Cre genotype in mice, in which 1, 2, 4, 5 were Cre^{+/+}, and 3 and 6 were Cre^{-/-}.

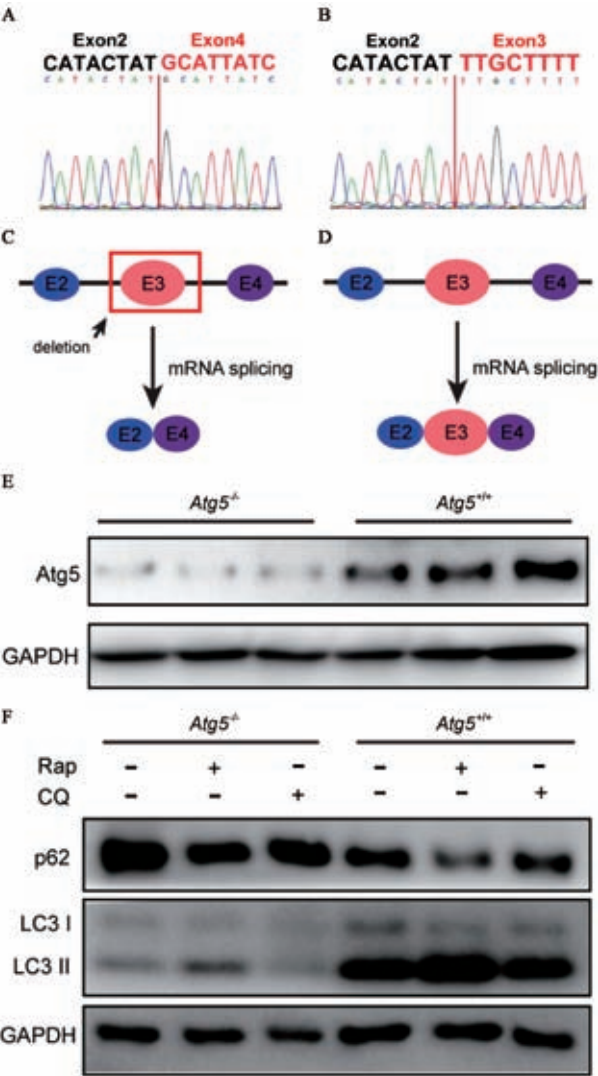
Figure 2 Results of genotype identification of some mice by PCR

(Rap) 诱导自噬后, *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬不能恢复到正常基础水平,提示 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬缺陷;综上,巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠构建成功。

3 讨论

基因敲除技术是利用一定的生物技术手段,使特定的目的基因缺失或者失活,从而排除其他因素对实验结果的干扰,使实验结果变得更可靠和直观。基因敲除包括全身性基因敲除及条件性基因敲除两种方法,其中全身性基因敲除是指在小鼠所有组织细胞中,将靶基因敲除掉,从而使靶基因的表达缺失。本文所提及的基因条件性敲除是利用 Cre-Loxp 重组系统,将 Cre 基因插入特定的启动子序列后面,即可人为地控制 Cre 基因在某些细胞谱系或者在机体发育的特定时间段亦或在外源性药物诱导下表达,表达的 CRE 蛋白识别特定的 DNA 序列(如 Loxp 位点),并进行 Loxp 位点之间的靶基因剪切,从而实现目的基因在特定细胞类型中功能性缺失^[20]。本研究中,我们选用了条件性 *Atg5* 基因敲除方案,一方面是出于实验目的的考虑,另一方面也是为了避免全身性敲除 *Atg5* 基因导致小鼠胚胎期死亡或出生期死亡的劣势^[21],我们引入的 LysM-Cre 小鼠是将 Cre cDNA 靶向插入其内源性 M 溶菌酶基因座,从而使 CRE 重组酶特异性表达在包括巨噬细胞在内的髓样细胞中。

由于巨噬细胞具有高度异质性,而且其基因表达谱和单核细胞、粒细胞及树突状细胞之间有很大



注:A、B 分别为 $Atg5^{-/-}$ (实验组小鼠) 和 $Atg5^{+/+}$ (对照组小鼠) 骨髓来源巨噬细胞 $Atg5$ mRNA 逆转录为 cDNA 的测序结果。C、D 为两组小鼠 $Atg5$ mRNA 改变示意图。E 为两组小鼠骨髓来源巨噬细胞 ATG5 蛋白表达情况。F 为使用雷帕霉素 (Rap) 和氯喹 (CQ) 调控自噬后, 两组小鼠骨髓来源巨噬细胞对该调控的反应情况。

图 3 $Atg5$ 基因敲除效果鉴定

Note. A and B are the sequencing results of $Atg5^{-/-}$ (experimental group) and $Atg5^{+/+}$ (control group), respectively. C and D show the changes of $Atg5$ mRNA in mice of the two groups. E shows the expression of ATG5 protein in mouse bone marrow derived macrophages in the two groups. F shows the response of bone marrow derived macrophages of mice in the two groups to the regulation of autophagy by rapamycin (Rap) and chloroquine (CQ).

Figure 3 Identification of the efficiency of gene $Atg5$ knockout

的重叠^[22];因此,一个完全针对巨噬细胞的转基因 Cre 小鼠在本质上是并不存在的。目前靶向巨噬细胞的 Cre 小鼠主要是基于单核细胞/巨噬细胞标志物,如 $LysM$ 、 $CSF1R$ 、 $CD11b$ 和 $CX3CR1$ 等。其中 $Csf1r$ -

Cre 小鼠可用于研究巨噬细胞发育的命运图谱分析,虽然该转基因小鼠巨噬细胞基因敲除效率较高,但特异性很低,因 $Csf1r$ - Cre 可表达于所有白细胞^[23]。 $CD11b$ - Cre 小鼠对巨噬细胞基因敲除效率较低,而且 $CD11b$ - Cre 不仅表达在单核细胞和巨噬细胞,在中性粒细胞和树突状细胞也具有一定的活性。 $Cx3cr1$ - Cre 小鼠主要针对单核/巨噬细胞和树突细胞,对中性粒细胞的影响较小,但其在脾巨噬细胞以及外周血单核细胞基因的敲除效率相对较低^[24]。虽然 $LysM$ 也在大多数粒细胞和少数 $CD11c$ + 树突状细胞中表达,但 $LysM$ - Cre 小鼠对成熟巨噬细胞基因的敲除效率非常高^[20]。因此,即使 $LysM$ - Cre 小鼠对组织常驻巨噬细胞基因的敲除效率不高^[24],但其仍是研究巨噬细胞最常用的工具鼠。

为了研究自噬生物学功能,目前几种自噬相关基因缺失小鼠已被报道构建成功,包括 $Atg5^{-/-}$ 、 $Atg7^{-/-}$ 和 $Beclin 1^{-/-}$ 小鼠^[21, 25-26];其中 $BECLIN 1$ 通过与 $VPS34$ 结合,调控吞噬泡的形成及成熟;而 $ATG5$ 是自噬通路的上游蛋白,启动自噬体形成,并与 $ATG12$ 和 $ATG16$ 结合,促进 $LC3$ 与 PE 结合,使 $LC3$ 沉积在自噬体膜上; $ATG7$ 是 $ATG12$ 与 $ATG5$ 结合所必需的一种类似 $E1$ 的酶^[19]。因此,敲除 $Atg5$ 、 $Atg7$ 或者 $Beclin 1$ 都可以达到自噬抑制的作用。然而 $Beclin 1$ 在细胞凋亡途径起到重要的作用,而且 $Beclin 1^{-/-}$ 突变小鼠发生自发性肿瘤的几率较高^[26],所以 $Beclin1$ 并不是研究自噬的特异基因。虽然有研究表明 $Atg5$ 或 $Atg7$ 缺失小鼠的细胞仍然可以形成自噬体/自噬溶酶体,并在受到一定应激时可进行自噬介导的蛋白降解^[27],但由于 $ATG5$ 不仅参与自噬泡形成,而且通过与 $TECRP$ 结合,促进自噬体与溶酶体的融合^[19],所以 $Atg5^{-/-}$ 小鼠仍是目前用于研究自噬相关功能最常用的小鼠。

基因敲除小鼠的靶基因敲除后可能影响小鼠生殖功能^[28],我们实验结果表明巨噬细胞条件性敲除 $Atg5$ 后并不影响小鼠的生殖能力;在本实验中,我们探讨总结了最佳繁育方案,该繁育方案可在较短时间、较高概率获得实验所需基因型小鼠,为后续研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供小鼠数量保障。

基因型鉴定是进行基因敲除小鼠繁育保种的重要环节^[29]。本研究采用碱裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA,参照上海南方模式生物科技股份有限公司提供的引物序列,通过普通的 PCR 扩增凝胶电泳成功鉴定巨噬细胞条件性 $Atg5$ 基因敲除小鼠的基因型;与用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA 相

比,两种方法的检测结果一致,但碱裂解法耗时更短、费用更低(结果未展示),说明该方法可以作为检测巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的基因型的一种快速可靠方法。

综上,本研究成功建立了巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型且能正常繁殖。该小鼠模型为研究巨噬细胞自噬(*Atg5*)在肾脏疾病发病机制中的作用机制提供了可靠的体内实验模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(4): 259-270.
- [2] Meng XM, Tang PM, Li J, et al. Macrophage phenotype in kidney injury and repair [J]. Kidney Dis (Basel), 2015, 1(2): 138-146.
- [3] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.
- [4] Kinsey GR. Macrophage dynamics in AKI to CKD progression [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(2): 209-211.
- [5] Mills CD. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease [J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(6): 463-488.
- [6] Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury [J]. Pediatr Nephrol, 2015, 30(2): 199-209.
- [7] Guiteras R, Flaquer M, Cruzado JM. Macrophage in chronic kidney disease [J]. Clin Kidney J, 2016, 9(6): 765-771.
- [8] Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis [J]. Physiology (Bethesda), 2015, 30(3): 183-194.
- [9] Livingston MJ, Ding HF, Huang S, et al. Persistent activation of autophagy in kidney tubular cells promotes renal interstitial fibrosis during unilateral ureteral obstruction [J]. Autophagy, 2016, 12(6): 976-998.
- [10] Cheng H, Fan X, Lawson WE, et al. Telomerase deficiency delays renal recovery in mice after ischemia-reperfusion injury by impairing autophagy [J]. Kidney Int, 2015, 88(1): 85-94.
- [11] Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer [J]. Autophagy, 2014, 10(2): 192-200.
- [12] Santeford A, Wiley LA, Park S, et al. Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease [J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1876-1885.
- [13] Liu K, Zhao E, Ilyas G, et al. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization [J]. Autophagy, 2015, 11(2): 271-284.
- [14] Ilyas G, Zhao E, Liu K, et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β [J]. J Hepatol, 2016, 64(1): 118-127.
- [15] Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(24): 4721-4757.
- [16] Chen D, Zhong Q. A tethering coherent protein in autophagosome maturation [J]. Autophagy, 2012, 8(6): 985-986.
- [17] Chen D, Fan W, Lu Y, et al. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate [J]. Mol Cell, 2012, 45(5): 629-641.
- [18] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes [J]. Cell, 2012, 151(6): 1256-1269.
- [19] Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2334.
- [20] Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, et al. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice [J]. Transgenic Res, 1999, 8(4): 265-277.
- [21] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. Nature, 2004, 432(7020): 1032-1036.
- [22] Lever JM, Yang Z, Boddu R, et al. Parabiosis reveals leukocyte dynamics in the kidney [J]. Lab Invest, 2018, 98(3): 391-402.
- [23] McCubrey AL, Allison KC, Lee-Sherick AB, et al. Promoter specificity and efficacy in conditional and inducible transgenic targeting of lung macrophages [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1618.
- [24] Abram CL, Roberge GL, Hu Y, et al. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice [J]. J Immunol Methods, 2014, 408: 89-100.
- [25] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice [J]. J Cell Biol, 2005, 169(3): 425-434.
- [26] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [27] Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy [J]. Nature, 2009, 461(7264): 654-658.
- [28] 赵家荣, 刘欢, 张涛, 等. 维生素 D 受体基因敲除小鼠品系的建立与鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 766-772.
- [29] Zhao JR, Liu H, Zhang T, et al. Strain establishment and identification of vitamin D receptor gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 766-772.
- [29] 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等. Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 228-232.
- [29] Zhou SQ, Luo D, Huang SF, et al. Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(3): 228-232.

黄文亭,曾子纯,王冬菊,等. 改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 776-780.

Huang WT, Zeng ZC, Wang DJ, et al. Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 776-780.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.014

改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型

黄文亭[#], 曾子纯[#], 王冬菊, 肖小敏^{*}

(暨南大学 附属第一医院, 广州 510632)

【摘要】 目的 探讨子痫前期(PE)大鼠模型的建立方法。**方法** SPF级妊娠Wistar大鼠39只,其中减少子宫血流灌注(RUPP)组16例、RUPP+灌水组10例、假手术组13例。分别孕14 d实施RUPP手术或假手术,孕18 d监测血压、尿蛋白及仔鼠状态。**结果** (1)RUPP手术对孕鼠的影响:与假手术组比较,RUPP组及RUPP+灌水组孕鼠收缩压、舒张压及平均动脉压均有不同程度上升,但单纯RUPP组血压上升不稳定,舒张压与假手术组差异无统计学意义;RUPP+灌水组血压稳定上升,且显著高于单纯RUPP组;RUPP组较假手术组孕18 d,24 h尿蛋白定量显著增高。(2)RUPP手术对仔鼠的影响:RUPP手术使孕20 d活产率及成仔率显著降低;RUPP手术使胎仔体重及胎盘湿重显著低于假手术组,其中RUPP+灌水组最明显。**结论** RUPP+灌水方法可诱发大鼠产生稳定的PE临床表现,推荐成为改良的RUPP造模方法。

【关键词】 先兆子痫;建模;动物模型;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0776-05

Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure

HUANG Wenting[#], ZENG Zichun[#], WANG Dongju, XIAO Xiaomin^{*}

(Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Corresponding author: XIAO Xiaomin. E-mail: xiaoxiaomin55@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish a rat model of pre-eclampsia. **Methods** Thirty-nine specific pathogen-free pregnant Wistar rats were divided into 3 groups, with 16 in the reduced-uterine perfusion pressure (RUPP) group, 10 in the RUPP+H₂O group and 13 in the sham-operation group. RUPP or sham surgery were performed on the 14th gestational day (G14). Blood pressure, urine protein and fetal status were measured on G18. **Results** (1) Compared with the sham-operation group, the systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean arterial pressure in the RUPP and RUPP+H₂O groups were increased to different degrees in the pregnant rats, but the blood pressure in the RUPP group was unstable. The diastolic blood pressure did not significantly differ between the RUPP and sham-operation groups. The blood pressure of the RUPP+H₂O group increased steadily and was significantly higher than that of the RUPP group. The 24-hour urine protein levels were significantly higher in the RUPP group than in the sham-operation group on G18. (2) RUPP surgery significantly reduced the live birth and formation rates on G20. The RUPP operation significantly reduced the fetal weight and placental wet weight compared with those of the sham-operation group, and these effects were the strongest in the

【基金项目】 广东省中医药管理局项目(34015011)。

Funded by Project of Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province of China (34015011).

【作者简介】 曾子纯(1995—),女,暨南大学附属第一医院研究生,研究方向:围产医学。Email:857392133@qq.com;

黄文亭(1990—),女,暨南大学附属第一医院研究生,研究方向:围产医学。Email:1415430421@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 肖小敏(1962—),女,教授,博士,博士研究生导师,研究方向:围产医学与高危妊娠。Email: xiaoxiaomin55@hotmail.com

RUPP+H₂O group. **Conclusions** The RUPP+H₂O method induces a stable clinical manifestation of pre-eclampsia in rats and is recommended as a modified method for modeling RUPP.

【Keywords】 pre-eclampsia; modeling; animal model; rat

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

子痫前期(pre-eclampsia, PE)是妊娠期特有的多系统疾病,临床表现以由全身血管内皮系统广泛损伤为主要病理基础的高血压、蛋白尿为主,是导致围产期母婴死亡的主要产科并发症之一^[1]。为了研究妊娠高血压疾病的发病机制及探索诊治方法,目前国内外有多种方法可建立妊娠期高血压模型。其中传统的减少子宫血流灌注(reduced-uterine perfusion pressure, RUPP)手术建立 PE 模型,由于能较针对性地引起由于胎盘缺血缺氧导致的妊娠高血压,接近临床上 PE 的发生机制,加上未使用药物建模,可减少建模药物对实验结果的影响,相比其他建模方式为多人选择^[2]。本实验对 RUPP 手术建模方法进行改良,比较了 RUPP+灌水法与传统 RUPP 法建立子痫前期模型的效果差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 39 只,由广州中医药大学动物实验中心提供【SCXK(粤)2013-0034】,体重(250±20)g,饲养于暨南大学动物实验中心【SYXK(粤)2017-0174】。每晚将雌鼠与性成熟雄性大鼠按雌雄比 2:1~3:1 合笼过夜,次日取雌鼠阴道分泌物涂片后在显微镜下观察,见精子者定为孕 0 d,妊娠后常规喂养。该实验已通过暨南大学实验动物伦理委员会伦理审查(受理号 20150205001)。

1.2 方法

1.2.1 孕 14 d

开腹手术,同时观察妊娠仔鼠数将已孕 14 d 的雌性大鼠随机分为三组:(1)RUPP 组 16 例:观察并记录孕仔数后实施 RUPP 手术,关腹后不给予任何干预。(2)RUPP+灌水组 10 例:实施 RUPP 手术后每日给予双蒸水 2 mL 灌胃。(3)假手术组 13 例:开腹暴露腹主动脉及双侧卵巢动脉,不钳夹血管。观察并记录孕仔数后即关腹,关腹后不给予任何干预。

RUPP 手术方法:孕 14 d 大鼠异氟烷诱导麻醉后,3%戊巴比妥钠按 4 mL/kg 腹腔注射麻醉,沿下腹正中线开腹,暴露腹主动脉下端、子宫及卵巢动脉,于腹主动脉下段近髂动脉分叉起始处置银夹 1

枚钳夹血管,左右两侧子宫动脉第一分叉前分别置银夹 1 枚,该法可使子宫血流灌注减少到 40%,胎盘处于缺血缺氧状态,常规关腹^[2]。

1.2.2 孕 18~20 d

观察血压、尿蛋白及妊娠结局(1)血压测量:于孕 19 d 当天 12:00 前完成有创颈动脉插管,晚间 20:00-21:00 及第二天 8:00-9:00 清醒状态下测量有创动脉血压 2 次取平均值。(2)尿蛋白:于孕 18 d 放 DXL-10 不锈钢标准大鼠代谢笼,留取 24 h 尿液,测量 24 h 尿蛋白定量。(3)仔鼠状态的判断:孕 20 d 测压结束后腹腔注射麻醉下行剖宫产,观察记录仔鼠死亡、畸形情况。成仔鼠为活产与死、畸胎仔总和。分别对活胎及死胎统一称重,再除以其胎数取平均值。分别对活胎胎盘及死胎胎盘称重,取其均数。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,对所有计量数据进行正态检验,正态计量数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态则以中位数[M(P₂₅, P₇₅)]表示。正态数据使用 *t* 检验,非正态数据使用秩和检验或 Kruskal-Wallis H 检验, *P*<0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 孕鼠一般情况

实验过程中发生了孕鼠死亡及仔鼠全部吸收的情况,其中假手术组、RUPP 组、RUPP+灌水组纳入实验孕鼠总数分别为 13 例、16 例、10 例,死亡孕鼠分别为 0 例、2 例、0 例,胎仔全吸收孕鼠分别为 0 例、4 例、1 例。经 χ^2 检验,三组间死亡率及吸收率差异均无显著性(*P*=0.785, *P*=0.110),因此将死亡孕鼠及胎仔全吸收鼠剔除实验,纳入后续研究孕鼠数量分别是:假手术组 13 例、RUPP 组 10 例及 RUPP+灌水组 9 例。

2.2 三组孕鼠建模效果比较

2.2.1 三组孕鼠孕 19~20 d 血压比较

建模后孕鼠收缩压、舒张压及平均动脉压均有不同程度上升,差异有显著性(*P*<0.05);其中 RUPP+灌水组血压上升明显,三项指标较其余两组

差异均有显著性($P<0.05$);RUPP 组舒张压与假手术相比差异无显著性($P=0.122$)。(表 1)

2.2.2 三组孕鼠孕 18 d,24 h 尿蛋白比较

假手术组 18 d,24 h 尿蛋白为(3.47 ± 1.32)mg, RUPP 组为(4.96 ± 0.85)mg, RUPP+灌水组为(4.14 ± 1.05)mg, 三组差异有显著性($P=0.013$),其中 RUPP 组与假手术组相比显著增高,差异有显著性($P<0.05$),RUPP+灌水组与 RUPP 组及假手术组组间比较差异均无显著性($P=0.103,P=0.183$)。

2.2.3 三组孕鼠孕 14 d 及孕 20 d 胎仔数比较

各组孕鼠其孕 20 d 活仔率、成仔(活仔与死畸胎数之和)率为非正态,故使用中位数(M)进行检验,多组检验方法为 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较使用 Mann-Whitney 检验。如表 2 所示,造模前孕 14 d 时各组孕仔差异无显著性($P>0.05$),手术后,三组孕 20 d 活仔率及成仔率差异有显著性($P=0.000$);组间比较,假手术组孕 20 d 活仔率及成仔率明显高于 RUPP 组及 RUPP+灌水组,差异有显著性(均 $P=0.000$),RUPP 组与 RUPP+灌水组间比较差异无显著性($P=0.968,P=0.549$)。

表 1 三组孕鼠孕 20 d 血压比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of blood pressure of the pregnant rats on G20 day among the three groups ($\bar{x}\pm s$)				
组别 Groups	例数 <i>n</i>	收缩压 Systolic blood pressure (mmHg)	舒张压 Diastolic blood pressure (mmHg)	平均动脉压 Mean arterial pressure (mmHg)
假手术组 Sham operation group	13	86.78±12.53	78.46±15.01	81.21±14.17
RUPP 组 RUPP group	10	103.01±7.19 ^a	90.01±21.38	94.34±16.39 ^a
RUPP+灌水组 RUPP+H ² O group	9	125.97±10.37 ^{ab}	110.27±11.81 ^{ab}	115.50±11.07 ^{ab}
<i>P</i>		0.000	0.001	0.000

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$ 。与与 RUPP 组相比,^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with the sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with the RUPP group, ^a $P<0.05$.

表 2 三组孕鼠孕 14 d 孕仔数及孕 20 d 胎仔数比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of the numbers of fetuses on G14 day and litters on G20 day among the three groups ($\bar{x}\pm s$)				
组别 Groups	例数 <i>n</i>	孕 14 d 孕仔数 Fetuses on G14 day (<i>n</i>)	孕 20 d 活仔数 Live birth rate on G20 day (%)	孕 20 d 成仔数 Formed fetus rate on G20 day (%)
假手术组 Sham operation group	13	11.62±3.93	91.67(70.38,100.00)	93.75(86.97,100.00)
RUPP 组 RUPP group	10	14.60±1.96	20.83(7.55,41.36) ^a	25.83(7.55,48.33) ^a
RUPP+灌水组 RUPP+H ² O group	9	13.56±2.30	20.00(8.01,33.33) ^a	20.00(8.01,33.33) ^a
<i>P</i>		0.116	0.000	0.000

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$ 。
Note. Compared with the sham operation group, ^a $P<0.05$.

2.2.4 三组胎仔体重及胎盘湿重比较

三组间孕 20 d 活仔体重及胎盘湿重差异有显著性,其中假手术组活仔体重明显高于 RUPP 组及 RUPP+灌水组,差异有显著性($P<0.05$),而 RUPP 组及 RUPP+灌水组间差异无显著性($P=0.746$)。RUPP+灌水组胎盘湿重明显低于假手术组,差异有显著性($P<0.05$),RUPP 组与 RUPP+灌水组差异无显著性($P=0.080$)。(表 3)

3 讨论

3.1 常见 PE 动物模型建立方法

目前,子痫前期的发病机理尚不清楚,比较公认是与子宫胎盘缺血缺氧有关,另外也与水钠代谢遗传异常、神经功能紊乱、各种血清因子释放异常等相关。因此,目前常见的子痫前期动物模型建立方法包括^[3]:(1)手术钳夹腹主动脉或子宫动脉,减

表 3 三组胎仔体重及胎盘湿重比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of fetal weight and placental wet weight among the three groups($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	例数 <i>n</i>	胎仔体重 Fetal weight (g)	胎盘湿重 Placental wet weight (g)
假手术组 Sham operation group	13	4.82±1.44	0.53±0.18
RUPP 组 RUPP group	10	3.11±0.90 ^a	0.46±0.17
RUPP+灌水区 RUPP+H ² O group	9	2.83±0.31 ^a	0.31±0.09 ^a
<i>P</i>		0.000	0.012

注:与假手术组相比,^a*P*<0.05。
Note. Compared with the sham operation group, ^a *P*<0.05.

少子宫血流灌注,造成子宫胎盘缺血缺氧^[4-5]。此法可快速建立模型,且缺血部位明确,也避免了药物对实验本身的干扰。但造模成功率不稳定,也无法体现滋养细胞侵袭不足、胎盘浅着床等特异性 PE 病理改变。(2)品系为 BPH/5 小鼠和 Dahl 盐敏感性大鼠的子代重复交配,可在自然培育的情况下产生高血压,具有一定遗传性^[6]。此法无人工干预,发生机制与人类相同,但饲养条件高,育种周期长,遗传性不稳定、易变种,延长了实验周期。(3)应用一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)因子诱导模型^[7],或携带人重组缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)蛋白的腺病毒^[8],诱导孕鼠特异性产生 PE 样症状。但并未报道肾脏、胎盘等脏器的病变情况,且药物本身对胎鼠有毒性作用,可能干扰 PE 重要指标的准确性。(4)通过低氧、惊吓、生活环境拥挤等物理方法,持续刺激孕鼠,诱发 PE 症状^[9-10];但未报道胎盘滋养细胞的侵袭情况及肾脏小血管损伤程度。

3.2 RUPP 改良手术造模法

本次实验 PE 造模的目的是用于后续药物试验,实验初始设计对孕鼠进行单纯 RUPP 手术造模,因后续研究需要灌药干预,因此另外设置了 RUPP+灌水区作为空白对照,但实验的结果非常有趣,虽然单纯 RUPP 组与 RUPP+灌水区均能出现高血压、蛋白尿等 PE 临床表现,但单纯 RUPP 手术血压增高并不稳定,有时甚至不能出现高血压,而 RUPP+灌水区孕鼠则能稳定表现出高血压,且仔鼠 FGR 情况更明显。因此,我们认为这可以成为一种 RUPP 改良模型。分析其原因可能为:RUPP 手术后,在子宫胎盘缺血模型基础上,每天灌胃对孕鼠造成压力,使孕鼠持续处于紧张状态,激活交感神经系统,交感神经系统过度刺激,去甲肾上腺素分泌增多,抗血管收缩因子分泌减少,所以能诱导出更明显的妊娠高血压症状,与 Takiuti 等^[9]及 Kanayama 等^[11]

等研究相符合。
本研究另外一个发现是,虽然 RUPP+灌水区孕鼠血压更高,但其 24 h 尿蛋白量并未见明显增高,是否与灌水区增加了血容量从而改善肾脏血流量有关?尚需进一步研究。但本研究显示,虽然 RUPP+灌水区 24 h 尿蛋白量增加不明显,胎儿生长受限却更显著,而且胎盘湿重更低,说明灌水区并不能改善子宫胎盘血流,RUPP 手术机械性钳夹血管降低子宫灌注是非常有效的。
多年来,传统 RUPP 手术建立 PE 模型由于能较针对性地引起由于胎盘缺血缺氧导致的妊娠高血压,接近临床上 PE 的发生机制,加上未使用药物建模,可减少建模药物对实验结果的影响,相比其他建模方式人数较多选择,但其重复性受大鼠品系、遗传背景、实验室条件等影响因素较多^[2,5,12-13]。本次实验的结果显示,RUPP+灌水区后能更稳定地构建 PE 模型,为子宫胎盘缺血妊娠高血压造模提供了新思路。

3.3 不足之处

RUPP 手术对孕鼠基本体质及实验室环境要求较高,且 RUPP 手术及颈动脉插管两次手术对孕鼠打击大,两次手术间隔时间短,孕鼠未完全恢复,令实验母鼠丢失率及胎仔吸收率较预期高。
临床公认的 PE 发病机制为:胎盘缺血缺氧,局部释放多种胎盘因子入血,引起全身小血管痉挛导致多脏器损伤。本实验只对孕鼠血压、蛋白尿及胎仔情况等临床表现进行了研究,并未关注孕鼠血液中的炎症介质含量及子宫以外其他脏器受损情况,能否模拟出临床公认的 PE 发病机制有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] Steegers EA, Von Dadelszen P, Duvekot JJ, et al. Pre-eclampsia [J]. Lancet. 2010, 376(9741): 631-644.

- [2] Li J, LaMarca B, Reckelhoff JF. A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(1):H1-8.
- [3] 周盛萍. 子痫前期动物模型研究进展 [J]. *实用妇产科杂志* 2017, 33(10):744-747.
Zhou CP. Progress in animal models of preeclampsia [J]. *J Practic Obstetr Gynecol*, 2017, 33(10):744-747.
- [4] Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 642-649.
- [5] Rogers JB, Klein R, Blumenthal HT, et al. Placental permeability in a toxemia-susceptible strain of guinea pigs [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1964, 88(4): 495-501.
- [6] Ganaway JR, Allen AM. Obesity predisposes to pregnancy toxemia (ketosis) of guinea pigs [J]. *Lab Anim Sci*, 1971, 21(1): 40-44.
- [7] Baijnath S, Soobryan N, Mackraj I, et al. The optimization of a chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition model of pre-eclampsia by evaluating physiological changes [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 182(1): 71-75.
- [8] Tal R, Shaish A, Barshack I, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α overexpression in pregnant mice: possible implications for pre-eclampsia and intrauterine growth restriction [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 2950-2962.
- [9] Takiuti NH, Kahlale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: A new Wistar rat model for human preeclampsia [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 186(3):544-550.
- [10] La Marca BB, Bennet WA, Alexander BT, et al. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor- α [J]. *Hypertension*, 2005, 46(4): 1022-1025.
- [11] Kanayama N, Tsujimura R, She L, et al. Cold-induced stress stimulates the sympathetic nervous system, causing hypertension and proteinuria in rats [J]. *J Hypertens*, 1997, 15(4): 383-389.
- [12] 姚蓓蓓, 桂鸣, 徐秀秀, 等. 妊娠大鼠子宫胎盘缺血改良手术方法诱发妊娠高血压模型 [J]. *中华高血压杂志*, 2014, 22(1): 74-78.
Yao BB, Gui M, Xu XX, et al. Gestational hypertension models induced by modified surgery for uteroplacental ischemia in pregnant rats [J]. *Chin J Hypertens*, 2014, 22(1): 74-78.
- [13] 周燕, 朱剑文, 邹丽, 等. 改良法建立妊娠期高血压疾病大鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(1): 53-56+83.
Zhou Y, Zhu JW, Zou L, et al. An improved method to establish animal model of hypertensive disorder complicating pregnancy [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2009, 17(1): 53-56+83.

[收稿日期] 2019-06-03

刘林,李弘,王宇红,等. 天麻芎苈止眩片对自发性与肾性高血压模型大鼠影响的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 781-789.

Liu L, Li H, Wang YH, et al. Comparison of the effects of Tianma Xiongling Zhixuan Tablet on the blood pressure in spontaneously and renal hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 781-789.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.015

天麻芎苈止眩片对自发性与肾性高血压模型大鼠影响的比较研究

刘林^{1,2}, 李弘³, 王宇红⁴, 任卫琼², 蔺晓源², 李苏², 柏正平^{1,3*}

(1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410013; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007;
3. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学科学创新中心, 长沙, 410007)

【摘要】 目的 探讨天麻芎苈止眩片对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和肾性高血压大鼠(renal hypertensive rats, RHR)大鼠的影响。**方法** 采用RHR和SHR大鼠模型进行实验,连续给药4周,观察比较各组大鼠血压值、左心室指数(left ventricular mass index, LVMI)、生化指标及HE染色观察心脏、肾、脑、主动脉的病理形态变化。**结果** 天麻芎苈止眩片高、中剂量组能显著降低RHR和SHR大鼠的收缩压和舒张压($P < 0.01$ 或 0.05);低剂量组能够显著降低SHR大鼠的收缩压和舒张压($P < 0.01$ 或 0.05),但对RHR大鼠无显著的降压效果($P > 0.05$)。与模型组比,SHR高剂量组左室质量(left ventricular mass, LVM)明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其他各给药组SHR和RHR大鼠左心室LVM减轻,左心室指数减小,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。与RHR模型组比,高剂量组能够显著降低RHR大鼠尿素氮(BUN)、肌酐(CREB)、肌酸激酶(CK)值,中剂量组大鼠能够显著降低乳酸脱氢酶(LDH)、CK、CREA、BUN值,低剂量组能够显著降低大鼠BUN值,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。与SHR模型组比,对SHR大鼠CK、CREA、CREA、BUN值有一定降低作用,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 天麻芎苈止眩片对两种不同高血压大鼠模型均有显著降压效应,具有能够将脉压差保持在合理范围,持续稳定调节血压的作用特点。天麻芎苈止眩片对高血压具有较好的防治药理作用。

【关键词】 肾性高血压大鼠;自发性高血压大鼠;高血压;左心室指数

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019)06-0781-09

Comparison of the effects of Tianma Xiongling Zhixuan Tablet on the blood pressure in spontaneously and renal hypertensive rats

LIU lin^{1,2}, LI Hong³, WANG Yuhong⁴, REN Weiqiong², LIN Xiaoyuan², LI Su², BAI Zhengping^{1,3*}

(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China. 2. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007. 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208.
4. Institute of Innovation and Applied Research, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007)

Corresponding author: BAI Zhengping. E-mail: bzp121@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Tianma Xiongling Zhixuan tablets (TXZT) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats (SHRs) and renal hypertensive rats (RHRs). **Methods** Both SHRs and

【基金项目】国家自然科学基金(81473616);中国博士后基金项目(2018M632966);湖南省卫健委项目(C2019090);长沙市杰出创新青年培养计划(kq1802008);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科资助(2018-2020年)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81473616), China Post-doctoral Foundation (2018M632966), Hunan Provincial Health Commission (C2019090), Changsha Outstanding Innovative Youth Training Plan (kq1802008), Subsidies for First-class Construction of Chinese Medicine in Hunan University of Chinese Medicine (2018-2020).

【作者简介】刘林,副研究员,医学博士,从事中药新药开发研究。Email: 286410883@qq.com

【通信作者】柏正平,主任医师,博士生导师,从事中医药临床研究。Email: bzp121@163.com

RHRs were used in the experiment, and the blood pressures of rats in each group were monitored. The left ventricular index (LVMI) of rats in each group was compared by the weighing method, the serum biochemical indexes were detected by ELISA, and the pathological changes of the heart, kidney, brain and aorta were observed using H&E staining. **Results** The high and middle doses of TXZT significantly lowered the systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) of RHRs and SHR rats ($P < 0.01$ or 0.05), whereas the low dose TXZT significantly lowered the SBP and DBP of SHR rats ($P < 0.01$ or 0.05), but had no significant effect on RHR rats ($P > 0.05$). Compared with the untreated model group, the LVMI of SHR rats treated with TXZT was significantly decreased in the high-dose group ($P < 0.05$), but not in other groups ($P > 0.05$). Compared with the RHR model group, the values of creatine kinase (CK), creatinine (CREA) and serum urea nitrogen (BUN) values in the high dose TXZT-treated rats were significantly decreased; Lactate dehydrogenase (LDH), CK, CREA and BUN values were significantly decreased with the middle dose group, and BUN values were significantly decreased with the low dose ($P < 0.01$ or 0.05). Compared with the SHR model group, the CK, CK, CREA and BUN values were decreased, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** TXZT has good antihypertensive pharmacological effect on the two different rat models of hypertension, can keep the pulse pressure difference in a certain range, and has a sustaining and stable pharmacological action in regulating blood pressure. TXZT has good preventive and therapeutic effects on hypertension.

[Keywords] renal hypertensive rats; spontaneously hypertensive rats; hypertension; left ventricular mass index

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

高血压是我国常见的心血管疾病之一,长期处于高血压状态容易引发心、脑、肾和血管等靶器官不同程度的损害,严重危害人类的健康^[1-2]。本课题组以与人类原发性高血压相似的动物—自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和继发性高血压动物—两肾一夹(2K1C)高血压大鼠(renal hypertensive rats, RHR)为研究对象。采用具有平肝熄风、清热活血、利湿化痰之功效天麻苘苓止眩片(Tianma Xiongling Zhixuan Tablet, TXZT)进行干预,比较药物对两种高血压模型大鼠的血压、生化功能等指标的影响。比较探讨 TXZT 对 SHR 大鼠和 RHR 大鼠的降压效应和改善高血压病理进展的特点,阐明其内在防治规律,为抗高血压中药新药开发研究动物模型选择和临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,8~10 周龄,体重 180~220 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司实验动物中心【SCXK(湘)2016-0002】。SPF 级 SHR 大鼠,雄性,8~10 周龄,体重 180~200 g,购于北京维通利华实验动物中心【SCXK(京)2016-0006】。SPF 级 WKY 大鼠,雄性,8~10 周龄,体重 180~200 g,购于北京维通利华实验动物中心【SCXK(京)2016-0006】。饲养于湖南中医药大学第一附属医

院实验动物中心【SYXK(湘)2015-0003】,实验操作过程中符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:ZYFY20161012)。

1.1.2 试剂与仪器

TXZT(每片 0.46 g),湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备,批号 20170315, TXZT 成人临床日用量为每日 5.52 g。厄贝沙坦片(每片 75 mg),扬子江药业集团北京海燕药业有限公司生产,批号 16112152,厄贝沙坦片成人临床日用量为每日 300 mg。

尿素氮(BUN),批号 171024;肌酐(Crea),批号 170952;肌酸激酶(CK),批号 170952,乳酸脱氢酶(LDH),批号 170952;以上试剂为北京中生北控工程公司产品。

BP2010 无创血压检测仪,北京软隆科技有限责任公司;CA-500 血液分析仪,山东兰桥医学科技有限公司产品;RT-1904C 型全自动生化分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司产品;显微镜摄影系统为 Olympus 产品。

1.2 方法

1.2.1 对 RHR 模型大鼠作用的研究

(1) 2K1C 法造模

动物适应性饲养 3 d 后,以无创血压检测仪检测大鼠血压,剔除血压异常者,按照血压随机分组,随机抽取 10 只大鼠为假手术组,其余大鼠均按照 2K1C 造模方法进行如下手术造模,造模后连续 4 周测定血压,以收缩压 ≥ 140 mmHg,且较术前血压超

出 20 mmHg 者为造模成功。假手术组大鼠除不结扎肾动脉外,其余手术操作均同上。

(2) 分组及给药

将成模大鼠按照收缩压随机分为 5 组,每组 10 只。分别为:模型对照组、厄贝沙坦对照组、天麻苧芩止眩片组高、中、低剂量组。模型组灌胃蒸馏水,阳性药组给予厄贝沙坦 27 mg/kg;TXZT 高、中、低剂量组分别按 2.0 g/kg、1.0 g/kg、0.5 g/kg 大鼠灌胃给药;每天给药 1 次,10 mL/kg,连续给药 4 周。

(3) 指标检测

①血压的测定:分别在给药前及药后每周,采用尾动脉测压法测量大鼠收缩压(SBP)和舒张压(DBP)。②LVMI 的测定:给药 4 周后,大鼠处死后迅速取出心脏,沿房室环剪去心房,沿室间隔剪去右心室,保留室间隔、左心室肌,以滤纸吸干后称重,计算左室质量与体重之比,以左室质量(LVM)与体重之比作为左心室指数(LVMI),计算公式: $LVMI = LVM/BW$ 。③生化指标检测:末次给药后,实验动物禁食 12 h,麻醉后腹主动脉采血,不抗凝,离心(4500 r/min, 10 min)分离血清, -80℃ 保存备用。严格按照试剂盒说明书的步骤操作检测生化指标。④病理检查大鼠取血后,迅速取左心室、肾、脑及主动脉,清洗干净,置于 4% 多聚甲醛中固定,浸蜡包埋,常规切片,HE 染色,观察组织形态学变化。

1.2.2 对 SHR 模型大鼠作用的研究

(1) 分组及给药

将 50 只 SHR 大鼠按照收缩压值随机分为:模型组、厄贝沙坦片组、天麻苧芩止眩片组高、中、低剂量组,每组 10 只,另设 10 只 WKY 大鼠为正常组。厄贝沙坦片组大鼠给予厄贝沙坦片 27 mg/kg;TXZT 高、中、低剂量组大鼠分别按 2.0 g/kg、1.0 g/kg、0.5 g/kg 大鼠给予药物;模型组和正常组分别给予等量蒸馏水;每天给药 1 次,10 mL/kg,灌胃给药,连续给药 4 周。

(2) 指标检测 SHR 大鼠收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),LVMI 指数,生化及病理指标检测及方法同 RHR 大鼠实验。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件处理。实验数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有资料进行正态性检验;符合正态分布者,多组计量资料采用单因素

方差分析(One-way ANOVA),多重比较方差齐者用 LSD 和 SNK 法,方差不齐者用 Tamhane's T2 或 Dunnett's T3 法;不符合正态分布者采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对不同高血压模型大鼠 SBP 和 DBP 的影响

2.1.1 对 RHR 大鼠的影响

与 RHR 模型组比较,高剂量组大鼠给药后各周收缩压显著降低,高剂量组大鼠舒张压第 1、3、4 周显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05);中剂量组大鼠收缩压第 1、2、3、4 周显著降低,中剂量组大鼠舒张压第 4 周显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05);低剂量组大鼠收缩压和舒张压有一定降低,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。(见图 1,图 2)

2.1.2 对 SHR 大鼠的影响

与 SHR 模型组比较,天麻苧芩止眩片高、中、低剂量组大鼠给药后各周的收缩压明显降低,第 2、3、4 周的舒张压明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05);天麻苧芩止眩片中、低剂量组第 3、4 周的舒张压明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。(见图 3,图 4)

2.2 对两种不同高血压模型大鼠 LVMI 的影响

2.2.1 对 RHR 大鼠 LVMI 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 LVM 明显增大,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其他各组 LVM 和 LVMI 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,其他各给药组 RHR 大鼠 LVM 减轻,LVMI 减小,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。(见图 5)

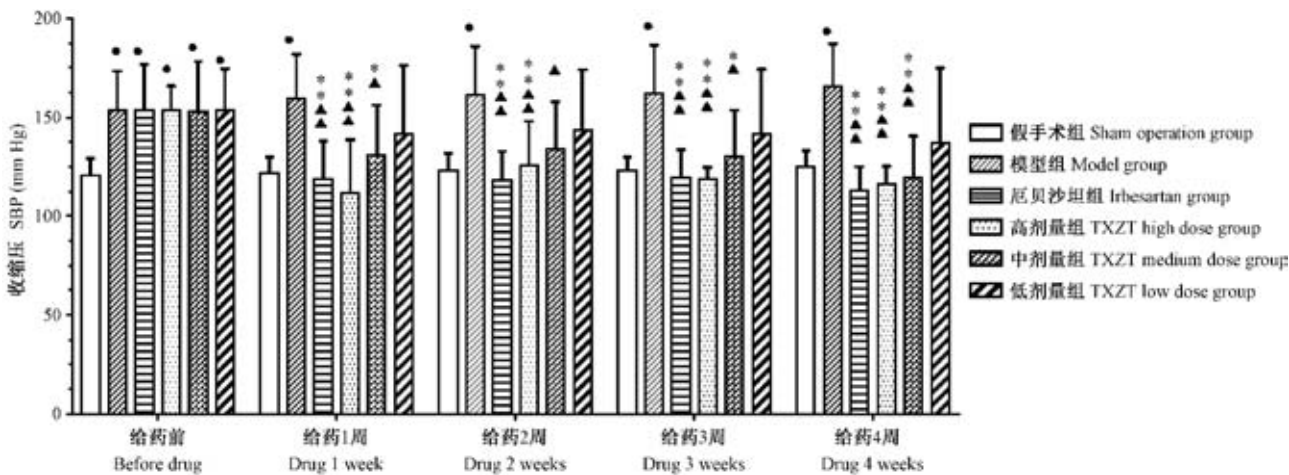
2.2.2 对 SHR 大鼠 LVMI 的影响

与 WKY 组比较,模型组及其他各组大鼠 LVMI 明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其他各组 LVM 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,高剂量组 LVM 明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其他各给药组 SHR 大鼠左心室 LVM 减轻,LVMI 减小,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。(见图 6)

2.3 对两种不同高血压模型大鼠心、肾功能生化指标的影响

2.3.1 对 RHR 大鼠心、肾功能生化指标的影响

如表 1 所示,与假手术组比较,模型组大鼠 LDH、CK、CREA、BUN 值显著升高,差异具有统计学



注:自身前后比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与假手术组比较, ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$;与模型组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ 。下图同。

图 1 天麻芎苈止眩片对 RHR 大鼠 SBP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Self comparison, before and after drug administration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the sham operation group, ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$. Compared with the model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$. The same in the following figure.

Figure 1 Effect of TXZT on the systolic blood pressure in the RHR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

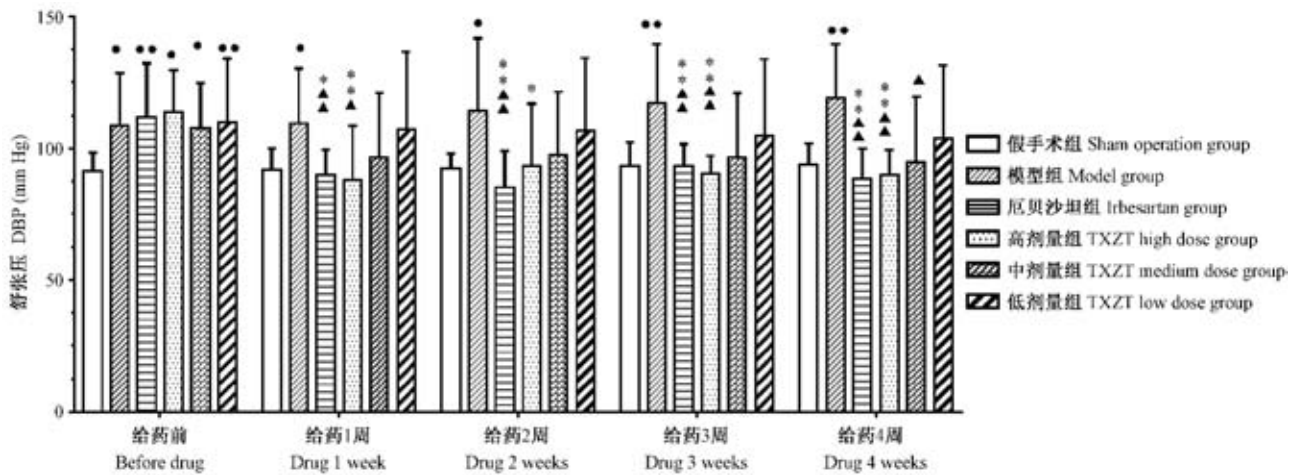


图 2 天麻芎苈止眩片对 RHR 大鼠 DBP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

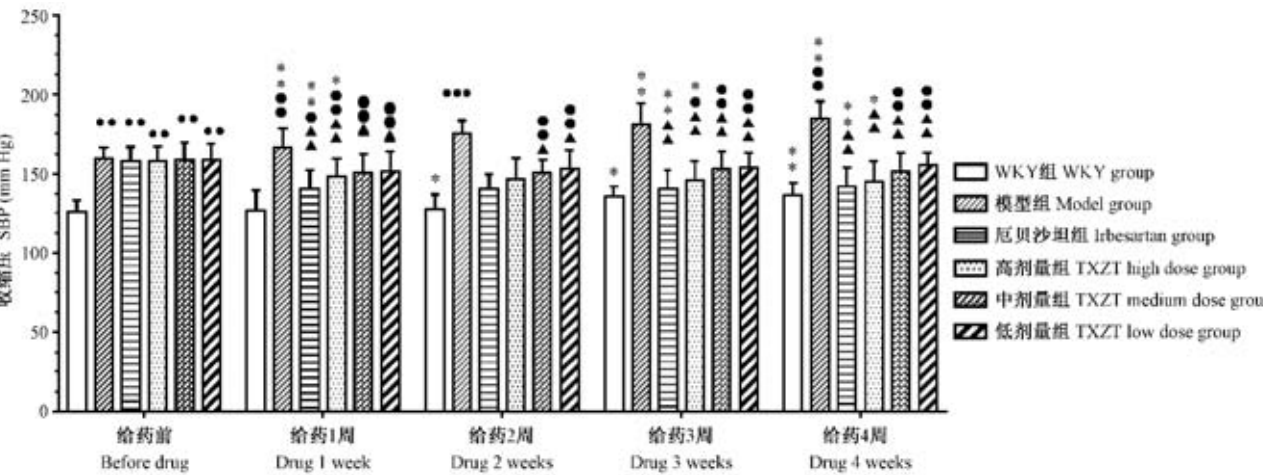
Figure 2 Effect of TXZT on the diastolic blood pressure in the RHR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

意义($P < 0.01$ 或 0.05)。高、中、低剂量组大鼠 CREA、BUN 值显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),其他大鼠血常规指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,高剂量组大鼠 CK、CREA、BUN 值显著降低,差异具有统计学意义 $P < 0.01$ 或 0.05)。中剂量组大鼠 LDH、CK、CREA、BUN 值显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 0.05)。低剂量组大鼠 BUN 值显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其他给药组生化指标值差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。提示,天麻芎苈止眩片有一定的改善 RHR 大鼠心、肾功能药理作用。

2.3.2 对 SHR 模型大鼠心、肾生化指标的影响

如表 2 所示,与 WKY 组比较,模型组大鼠 LDH、CK 值显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其他各给药组大鼠血常规指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。

与模型组比较,高、中、低剂量组大鼠 CK、CREA、CREA、BUN 值有一定降低,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。提示,与 WKY 组比较,SHR 大鼠心功能生化指标存在明显异常。天麻芎苈止眩片有一定的改善 SHR 大鼠心功能药理作用趋势。



注：自身前后比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 WKY 组比较，● $P < 0.05$ ，●● $P < 0.01$ ；与模型组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ 。下图同。

图 3 天麻芎苈止眩片对 SHR 大鼠 SBP 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Self comparison, before and after drug administration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the WKY group, ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$. Compared with the model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$. The same in the following figure.

Figure 3 Effect of TXZT on the systolic blood pressure in the SHR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

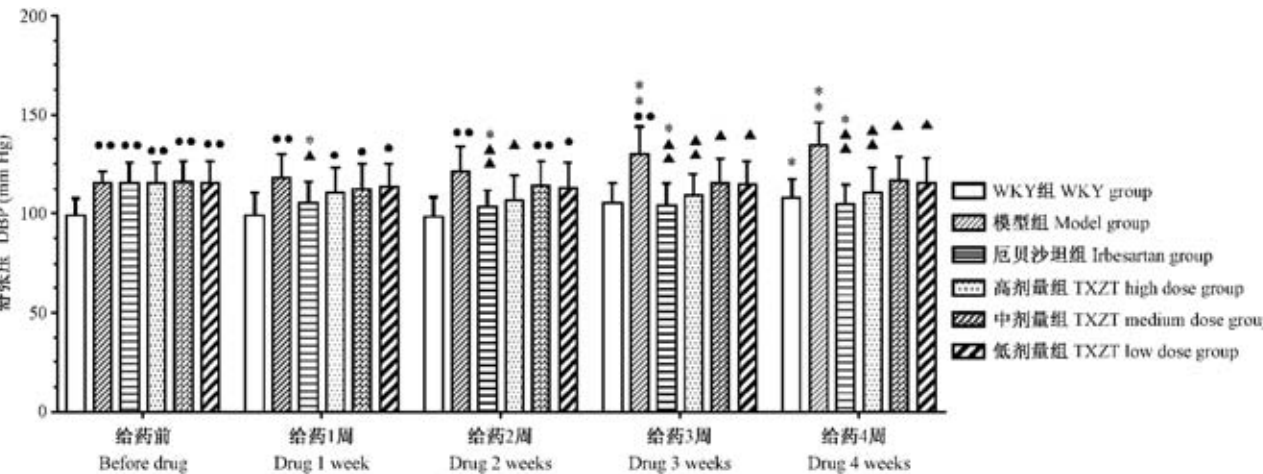


图 4 天麻芎苈止眩片对 SHR 大鼠 DBP 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Figure 4 Effect of TXZT on the diastolic blood pressure in the SHR rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.4 对两种不同高血压模型大鼠靶器官的影响

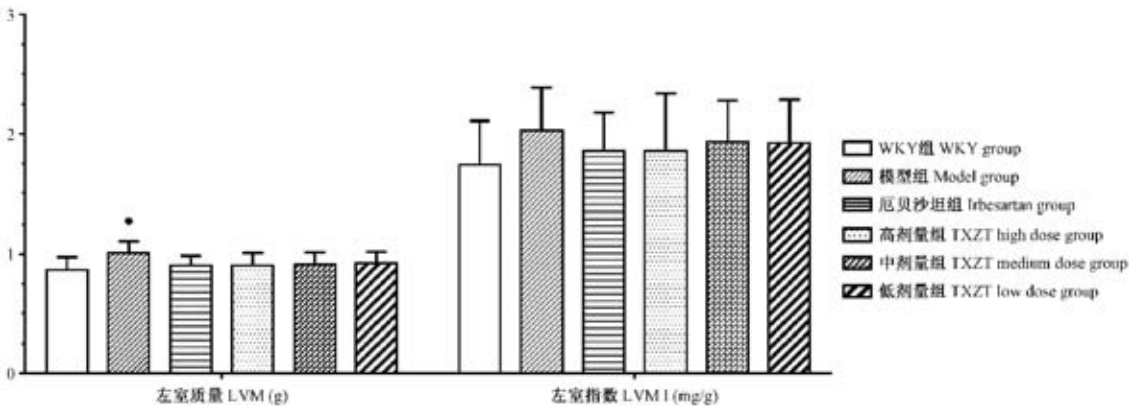
2.4.1 对 RHR 大鼠心、肾、脑、主动脉病理形态的影响

HE 染色病理学观察,模型大鼠组与假手术组大鼠心、肾及主动脉存在一定的病理变化,主要表现为左室心肌细胞肥大或部分消失,细胞横径增大,被纤维组织替代,并伴有炎性细胞浸润。肾小动脉管壁增厚,管腔狭窄,肾小管及肾小球均出现不同程度的萎缩,同时伴有肾间质纤维化。主动脉内膜明显增厚,肌纤维排列不整齐,粗细不一。脑组织未见明显变化。经过天麻芎苈止眩片治疗 4 周后,心肌纤维排列较整齐,细胞横径大小差异不大,肾小管及肾小球萎缩程度

减轻,主动脉内膜完整、排列整齐。天麻芎苈止眩片能较好的改善 RHR 大鼠左心室、肾脏、血管病理结构,对高血压靶器官具有一定的保护作用。(见图 7)

2.4.2 对 SHR 大鼠心脏、肾、脑、主动脉病理形态的影响

给药治疗 4 周,病理检查提示,WKY 组大鼠血管内膜完整,细胞排列整齐清晰、无明显增生;模型组大鼠血管内膜明显损伤,不完整,明显增厚;止眩片高剂量组大鼠血管病理改善,内膜较光滑,排列较整齐复方,中剂量组大鼠血管内膜轻损伤,平滑肌细胞增殖,低剂量组大鼠血管内膜轻损伤,中膜增厚,平滑肌细胞增殖。(见图 8)

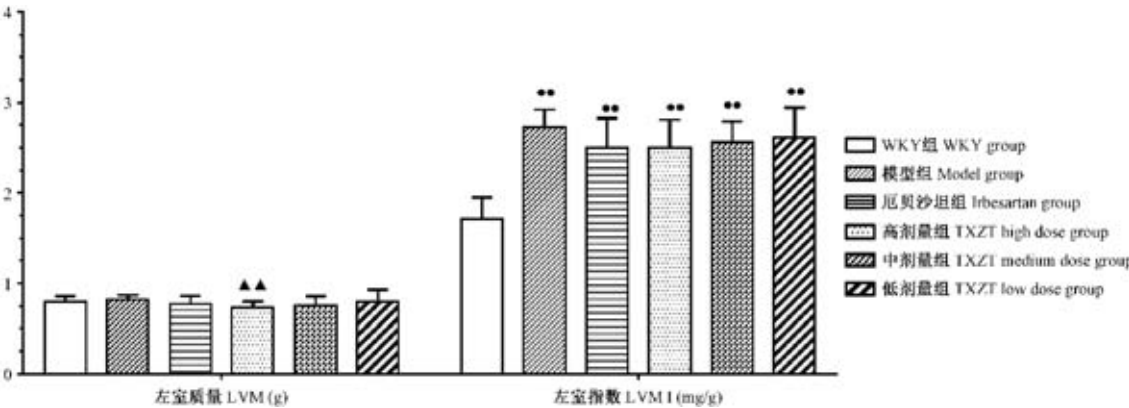


注:与假手术组比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

图 5 天麻苧苧止眩片对 RHR 模型大鼠 LVM 及 LVMI 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. Compared with the sham operation group, ● $P<0.05$, ●● $P<0.01$. Compared with the model group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 5 Effects of TXZT on the left ventricular mass and left ventricular mass index of the RHR rat models ($\bar{x}\pm s, n=10$)



注:与 WKY 组比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

图 6 天麻苧苧止眩片对 SHR 模型大鼠 LVM 及 LVMI 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Note. Compared with the WKY group, ● $P<0.05$, ●● $P<0.01$. Compared with the model group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 6 Effects of TXZT on the left ventricular mass and left ventricular mass index of SHR rat model($\bar{x}\pm s, n=10$)

表 1 天麻苧苧止眩片对 RHR 大鼠心、肾功能生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 Groups	LDH (U/L)	CK (U/L)	CREA ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
假手术组 Sham operation group	856 $\pm$ 235	356 $\pm$ 135	75.47 $\pm$ 8.25	6.32 $\pm$ 0.91
模型组 Model group	1192 $\pm$ 365●	485 $\pm$ 110●	93.89 $\pm$ 6.42●●	9.63 $\pm$ 0.88●●
厄贝沙坦组 Irbesartan group	840 $\pm$ 329▲	280 $\pm$ 142▲▲	86.40 $\pm$ 12.31●	8.20 $\pm$ 2.01●●
高剂量组 TXZT high dose group	881 $\pm$ 383	342 $\pm$ 136▲	82.91 $\pm$ 11.03▲▲	7.51 $\pm$ 0.80●●●▲
中剂量组 TXZT medium dose group	859 $\pm$ 307▲	341 $\pm$ 180▲	83.11 $\pm$ 5.19●▲▲	7.59 $\pm$ 0.66●●●▲
低剂量组 TXZT low dose group	973 $\pm$ 351	397 $\pm$ 215	87.20 $\pm$ 9.19●●	7.63 $\pm$ 0.79●●●▲

注:与假手术组比较,● $P<0.05$,●● $P<0.01$;与模型组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

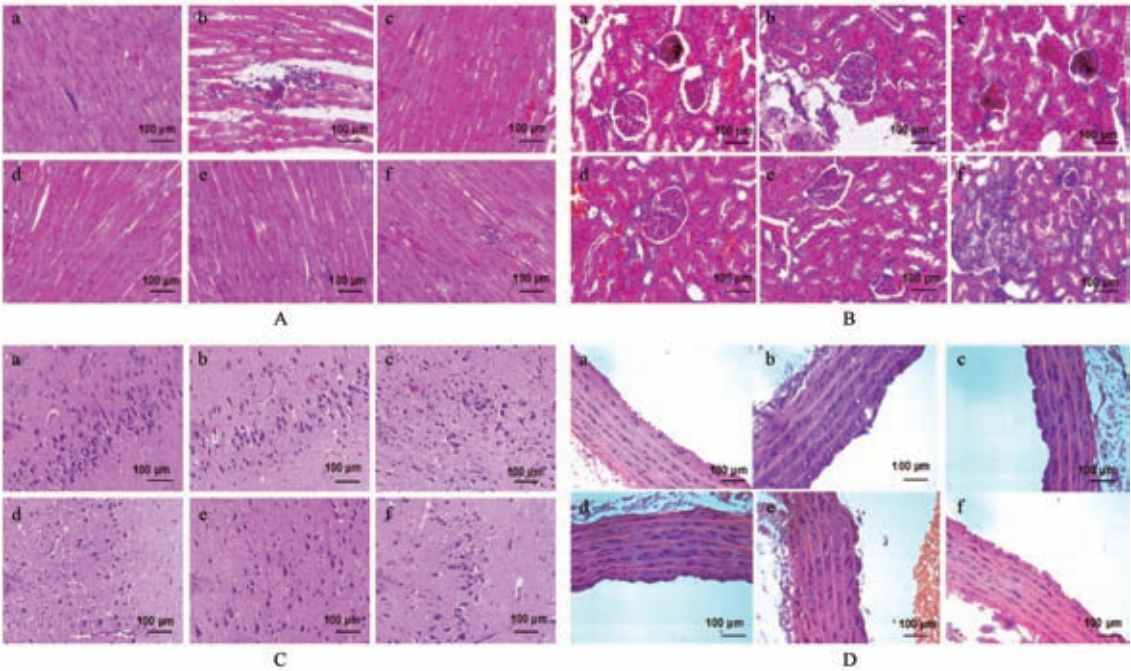
Note. Compared with the sham operation group, ● $P<0.05$, ●● $P<0.01$. Compared with the model group, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$.

表 2 对 SHR 模型大鼠心、肾功能生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of TXZT on biochemical indexes of heart and kidney functions in the SHR rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	LDH (U/L)	CK (U/L)	CREA ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
WKY 组 WKY group	1105.77 $\pm$ 399.17	418.30 $\pm$ 103.20	82.55 $\pm$ 10.88	8.98 $\pm$ 1.50
模型组 Model group	1509.01 $\pm$ 432.59 [●]	570.20 $\pm$ 178.40 [●]	90.21 $\pm$ 8.55	10.25 $\pm$ 1.25
厄贝沙坦组 Irbesartan group	1472.39 $\pm$ 462.76	494.20 $\pm$ 218.50	85.55 $\pm$ 13.48	9.22 $\pm$ 2.51
高剂量组 TXZT high dose group	1314.06 $\pm$ 472.35	414.20 $\pm$ 226.60	87.89 $\pm$ 12.25	9.08 $\pm$ 0.97
中剂量组 TXZT medium dose group	1347.55 $\pm$ 463.50	428.10 $\pm$ 130.50	85.58 $\pm$ 9.27	9.28 $\pm$ 1.12
低剂量组 TXZT low dose group	1294.81 $\pm$ 499.77	422.90 $\pm$ 155.70	88.22 $\pm$ 10.29	9.34 $\pm$ 1.25

注:与 WKY 组比较,● $P < 0.05$,●● $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the WKY group, ● $P < 0.05$, ●● $P < 0.01$. Compared with the model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$.



注:a,假手术组;b,模型组;c,厄贝沙坦组;d,止眩片高剂量组;e,止眩片中剂量组;f,止眩片低剂量组。

图 7 RHR 大鼠左心室(A)、肾(B)、脑(C)、主动脉(D)病理形态检测(HE 染色)

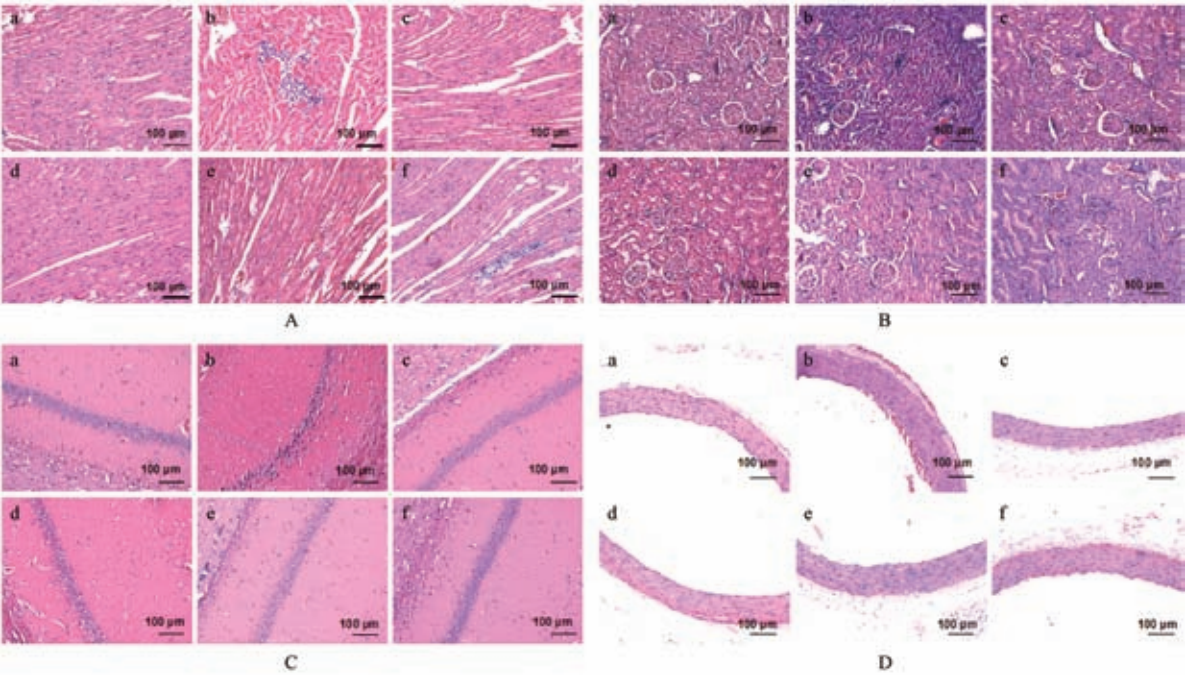
Note. a, Sham operation group. b, Model group. c, Irbesartan group. d, High dose group. e, Medium dose group. f, Low dose group.

Figure 7 Pathological changes of the left ventricle (A), kidney (B), brain (C) and aorta (D) in the RHR rats (HE staining)

3 讨论

高血压严重危害人类健康,长期处于高血压状态可造成心、脑、肾和血管等靶器官不同程度的损害。对应于人类高血压病理机制,高血压大鼠模型也可分为两大类:自发性高血压大鼠(SHR)和继发性高血压大鼠模型(如:两肾一夹型肾性高血压大鼠(RHR)等)^[3]。大鼠 SHR 从发病机制、并发症、外周血管阻力变化、对盐的敏感性等多方面来讲,都与人类高血压相似,是目前国际上公认的最接近人类原发性高血压的动物模型,已广泛应用于原发性高血压及抗高血压药物筛选^[4-5]。两肾一夹法高血压大鼠是研究肾血管性高血压最常用的模型,以肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-

aldosterone system, RAAS)激活为主,是国际上常用的经典的继发性高血压动物模型,在目前筛选降压药物中选用较多^[6]。两者相比,SHR 大鼠心功能较 RHR 大鼠低;RHR 大鼠肾组织肾素、血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 及醛固酮较高,且肾性高血压大鼠血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)mRNA 的表达量较 SHR 大鼠的低;此外,RHR 大鼠还有着窦性心动过缓、肾组织损伤等特点^[7-9]。本课题组在采用 RHR 和 SHR 进行研究时发现,两者血压均呈上升趋势,但是 SHR 大鼠的血压上升的更高、更快。RHR 大鼠血压不稳定,偏差大,造成这种现象的原因可能是因为左肾动脉结扎导致该侧肾脏缺血,而另一侧肾脏不触及。在本次研究中,我们发现天麻芎芩止眩片能够降低两种



注:a,WKY 组;b,模型组;c,厄贝沙坦组;d,止眩片高剂量组;e,止眩片中剂量组;f,止眩片低剂量组。

图 8 SHR 大鼠左心室(A)、肾(B)、脑(C)、主动脉(D)病理形态检测(HE 染色)

Note. a, WKY group. b, Model group. c, Irbesartan group. d, TXZT high dose group. e, TXZT medium dose group. f, Low Dose Group.

Figure 8 Pathological changes of the left vnticle(A), kidney (B), brain (C) and aorta (D) in the SHR rats(HE staining)

大鼠模型的收缩压和舒张压;能够明显的减小 SHR 大鼠的 LVMI 值,但对 RHR 大鼠的效果不明显;对于心肾功能,其可以很好的改善 RHR 的心肾功能,对 SHR 大鼠具有改善作用,但无统计学差异,可能是因为 SHR 大鼠早期的肾损伤不明显。

长期处于高血压状态下,易导致患者心、脑、肾、血管等多靶点、多器官器质性病变和功能性损害^[10-11]。中医药防治高血压病及其并发症立足于整体辨证论治,可对其多环节、多途径、多靶点进行调节,在降低血压、减轻或逆转靶器官损害、防止严重并发症、改善临床症状及提高患者生活质量等方面均具有较好的作用^[12-15]。本实验使用的中药天麻芎苈止眩片是由天麻、川芎等中药组成的复方,具有平肝熄风、清热活血、利湿化痰的功效,临床上主要用于治疗高血压病,眩晕耳鸣,头痛头胀等证者。研究发现,天麻的主要有效成分天麻素能够改善其大中动脉管壁弹性^[16],改善血管内皮功能,抗脂质过氧化损伤,降低血压等^[17-18];其地上部分能够减慢心率使心输出量减少,从而使动脉血流量降低,降低 RHR 血压^[19];此外,还有研究发现,天麻素可以改善心肌缺血/再灌注损伤从而保护心肌细胞^[20]。川芎主要有效成分川芎嗪能够显著增加肾血流,延缓慢性肾损害;抑制血管内皮细胞的分泌乳酸脱氢酶及丙二醛,减轻血管内皮细胞的损伤程

度;降低血压^[21]。通过本实验发现天麻芎苈止眩片对 SHR 大鼠及 RHR 大鼠均具有良好的降血压药理效应,且能够减少心、肾、血管等靶器官的损害,而这种改善作用可能是通过川芎的肾保护作用,天麻的心肌细胞保护作用及改善大中动脉管壁弹性作用等不同中药的综合药理作用来实现的,体现了中医药改善靶器官损伤治疗高血压的优势。

综上所述,天麻芎苈止眩片对两种不同高血压大鼠模型均具有良好降压药理效应。能够将脉压差保持在一定的范围,具有持续稳定的调控血压的药理作用。对高血压模型大鼠的心、肾靶器官损伤具有一定的保护作用,对中医药防治高血压病临床和实验研究具有重要的指导意义。

参 考 文 献 (References)

[1] 侯永兰, 李石林, 刘玲玲. MicroRNA-137 与 Ang II 在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 52-56.
Hou YL, Li SL, Liu LL. Effects of MicroRNA-37 and Ang II on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(7): 52-56.
[2] 赵胜楠, 何黎黎, 李自强, 等. 高血压合并高脂血症大鼠模型的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 33-39 +89.
Zhao SN, He LL, Li ZQ, et al. Establishment and characterization of a rat model of hypertension with hyperlipidemia [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 33-39+89.

- [3] 沈智洁, 张志辉, 杨侃. 高血压实验动物模型的研究进展[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(3): 232-234.
Shen ZJ, Zhang ZH, Yang K. Advances in experimental animal models of hypertension [J]. Chin Circul J, 2014, 29(3): 232-234.
- [4] 高婷, 刘健, 樊小农, 等. 自发性高血压大鼠模型的应用概况[J]. 实验动物科学, 2013, 30(6): 57-60.
Gao T, Liu J, Fan XN, et al. Application of spontaneously hypertensive rat model[J]. Lab Anim Sci, 2013, 30(6): 57-60.
- [5] 田永路, 李艳丽, 李军, 等. 不同周龄自发性高血压大鼠的动态血压变化与心脏的组织学改变[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(2): 164-167+191.
Tian YL, Li YL, Li J, et al. Hemodynamic variation and histological alterations of the heart in spontaneous hypertensive rats at different weeks of age [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(2): 164-167+191.
- [6] 李立强, 王聪, 谷涌泉, 等. 彩色多普勒超声技术对两肾一夹型肾血管性高血压大鼠模型的评价[J]. 新医学, 2018, 49(11): 803-806.
Li LQ, Wang C, Gu YQ, et al. Evaluation of a two-kidney, one-clip renal vascular hypertensive rat model by color Doppler ultrasonography [J]. J New Med, 2018, 49(11): 803-806.
- [7] 王娟, 赵英强. 肾性高血压大鼠模型与自发性高血压大鼠的比较[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(6): 144-146.
Wang J, Zhao YQ. Comparison between rat model of renal hypertension and rat model of spontaneous hypertension [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2014, 30(6): 144-146.
- [8] 陈建双, 王一帆, 李莎莎, 等. 决明子蒽醌苷对两肾一夹高血压大鼠肾损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37: 4752-4753.
Chen JS, Wang YF, Li SS, et al. Protective effect of Senna obtusifolia on renal injury in renovascular hypertensive rats [J]. Chin J Gerontol, 2017, 37: 4752-4753.
- [9] 徐亚玲. 有氧运动时程对 2K1C 肾血管高血压大鼠心血管及肾脏功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1379-1385.
Xu YL. Effects of aerobic exercise time on cardiovascular and renal functions of 2K1C renal vascular hypertensive rats [J]. Chin J Pathophysiol, 2017, 33(8): 1379-1385.
- [10] 尚倩倩, 王蕾, 陈兆善, 等. 159 例原发性高血压病合并靶器官损害患者脉图参数分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(6): 1033-1038.
Shang QQ, Wang L, Chen ZS, et al. Analysis of pulse parameters among 159 primary hypertension patients with target organ damage [J]. World Sci Tec/Modernization of TCM and Mat Med, 2016, 18(6): 1033-1038.
- [11] 孙丽敏. 中年高血压患者脉压与肾功能指标相关性的分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(5): 76-77.
Sun LM. The correlation analysis between pulse pressure and kidney function index in middle-aged patients with hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(5): 76-77.
- [12] 熊煜, 张荣珍. 高血压病靶器官损害与中医证型相关性研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(17): 1830-1832.
Xiong Y, Zhang RA. Correlation study on target organ damage and TCM syndrome type in patients with hypertension [J]. Modern J Integrated Tradit Chin West Med, 2013, 22(17): 1830-1832.
- [13] 秦大成. 中医辨证论治对高血压患者靶器官损害的保护作用研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(4): 102-105.
Qin DC. Protective effect of TCM Syndrome differentiation and treatment on target organ damage in patients with hypertension [J]. Guiyang Coll Tradit Chin Med, 2014, 36(4): 102-105.
- [14] 顾静, 郭超, 车敏, 等. 黄芪对高血压大鼠血管重构中内质网应激反应的影响[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 65-71.
Gu J, Guo C, Che M, et al. Effect of astragalus on endoplasmic reticulum stress during the vascular remodeling in hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 65-71.
- [15] 王德军, 张利棕, 方明笋, 等. 土茯苓对肾性高血压大鼠血压的调节作用和机制[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(12): 46-50.
Wang DJ, Zhang LZ, Fang MS, et al. Regulatory effects and mechanism of Smilax glabra on blood pressure in renovascular hypertensive rats [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(12): 46-50.
- [16] 曹书奎. 天麻素注射液联合贝那普利治疗高血压的疗效观察[J]. 医学理论与实践, 2016, 29(17): 3040-3042.
Cao SK. Effect of Gastrodin injection combined with Puli on hypertension [J]. J Med Theor Prac, 2016, 29(17): 3040-3042.
- [17] 张成宸, 石京山. 天麻的酚类成分及其中枢神经药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 167-174.
Zhang CC, Shi JS. A review on phenolic components in Gastrodia elata Blume and its pharmacological effects on the central nervous system [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(2): 167-174.
- [18] 陈湖海, 黄涛, 刘辉. 天麻素对高血压大鼠血压变化、血管保护作用及氧化应激反应机制研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(11): 2385-2388.
Chen HH, Huang T, Liu H. Gastrodin's effect on rats blood pressure changes and vascular protective effects of oxidative stress response [J]. World Chin Med, 2016, 11(11): 2385-2388.
- [19] 李燕, 谢森, 邵明莎, 等. 近 10 年来天麻的药理作用及化学成分研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 2987-2993.
Li Y, Xie M, Shao MS, et al. Research progress on pharmacological activities and chemical constituents of last ten years on Gastrodia elata Blume [J]. Chin Archives of TCM, 2017, 35(12): 2987-2993.
- [20] 周慧君. 天麻有效成分的药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2016, 8(22): 56-58.
Zhou HJ. A review on pharmacological action of active principle in gastrodia Gastrodia elata and the clinical application [J]. Clin J Chin Med, 2016, 8(22): 56-58.
- [21] 罗仁书, 何治勇. 川芎有效成分药理作用的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(9): 1294-1296.
Luo RS, He ZY. Pharmacological action of effective components of Ligusticum chuanxiong [J]. Eval Anal Drug-Use Hosp Chin, 2018, 18(9): 1294-1296.

周凌,宣伟军,丁大连. CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式的比较[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 790-798.

Zhou L, Xuan WJ, Ding DL. Comparison of different damage patterns of cochlear hair cells between CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 790-798.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.016

CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞 随着年龄增长不同损害模式的比较

周凌¹, 宣伟军^{2,3*}, 丁大连⁴

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院耳鼻喉科, 哈尔滨 150040; 2. 广西中医药大学第一临床医学院
耳鼻喉科, 南宁 530023; 3. 马萨诸塞州总医院, 哈佛大学医学院, 波士顿 MA 02114, 美国;
4. 听力与耳聋中心, 纽约州立布法罗大学, 布法罗 NY 14214, 美国)

【摘要】 目的 探讨和比较 CBA/CaJ 与 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式与规律。
方法 选择年龄在 6 个月、12 个月、18 个月和 24 个月的 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠各 32 只, 其中每个年龄各 8 只, 全身麻醉下取耳蜗, 进行全耳蜗基底膜铺片, 将全耳蜗内、外毛细胞计数结果输入计算机并应用耳蜗图软件, 按照对应的不同年龄进行两个鼠种耳蜗毛细胞密度对比和统计学分析。**结果** CBA/CaJ 小鼠于 12 月龄耳蜗顶部外毛细胞开始出现轻度损失, 伴随着年龄增加, 外毛细胞损失继续扩大, 以顶部向中部发展为主, 后期内毛细胞也出现损失。从 18 月龄开始, 耳蜗外毛细胞损失与上个年龄组比较均增加显著 ($P<0.05$)。而 C57BL/6J 小鼠于 6 月龄耳蜗底部均已出现外、内毛细胞损失, 而且以外毛细胞损失为主, 此后伴随着年龄增加, 毛细胞损失不断扩大, 于 6 月龄开始, 耳蜗外、内毛细胞损失与同龄 CBA/CaJ 小鼠比较均明显增加 ($P<0.05$), 12 月龄开始与同鼠种上个年龄组比较均明显增加 ($P<0.05$)。**结论** CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞损害遵循着从顶部和底部两端开始, 向中部延伸, 但顶部毛细胞损害比底部严重的病变规律。C57BL/6J 小鼠耳蜗毛细胞损害遵循着主要从耳蜗底部开始, 逐渐向中部和顶部扩展的病变规律。外毛细胞损害比内毛细胞早。C57BL/6J 小鼠毛细胞损害比 CBA/CaJ 小鼠早。提示两个鼠种均可作为老年性毛细胞凋亡研究动物模型, 但以 C57BL/6J 小鼠模型更适合短期观察研究, 两者间所出现的毛细胞变化差别可能与 Cdh23 基因是否变异和缺失有关。

【关键词】 小鼠; 耳蜗毛细胞; 耳蜗图

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0790-09

Comparison of different damage patterns of cochlear hair cells between CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging

ZHOU Ling¹, XUAN Weijun^{2,3*}, DING Dalian⁴

(1. Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China. 2. Department of Otorhinolaryngology, the First Clinical Medical College of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China. 3. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Harvard University, Boston, MA 02114, USA. 4. Center for Hearing and Deafness, the State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14214, USA)

Corresponding author: XUAN Weijun. E-mail: xuan5352100@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81973913, 81774374, 81373700, 81260552)。
[作者简介] 周凌(1957—), 女, 教授, 研究方向: 耳聋, 鼻窦炎。Email: zhouling8913@163.com
[通信作者] 宣伟军(1958—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 耳聋及其他耳鼻咽喉科疾病; 光动力学。Email: xuan5352100@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the different patterns of cochlear hair cell loss in CBA/CaJ and C57BL/6J mice with aging. **Methods** Thirty-two CBA/CaJ or C57BL/6J mice at 6, 12, 18, and 24 months of age were selected, with 8 mice in each age group. The cochleae were removed under general anesthesia, and then the intact basement membrane was taken out from the cochlea and used for making glass slides of whole cochlear basement membrane. The numbers of cochlear inner and outer hair cells were counted, and input into the computer using cochleogram software. The density of cochlear hair cells in the two mouse strains were compared at corresponding ages, and statistically analyzed. **Results** The outer hair cells from cochlear apex in the CBA/CaJ mice at 12 months of age began to loss slightly. With the increase of age, the losses of outer hair cells were continuously expanded, and their developments were mainly from the top to the middle part. The losses of inner hair cells also occurred in the later period. From 18 months of age on, the losses of the cochlear outer hair cells were increased significantly by comparison with that of the last age ($P < 0.05$). However, the losses of the outer and inner hair cells at the cochlear bottom appeared in C57BL/6J mice at the 6 months of age, and the losses were mainly of the outer hair cells. From then on, the losses of outer hair cells were continuously expanded with the increase of age. From 6 months of age on, the losses of the cochlear outer and inner hair cells were increased significantly compared with that of the CBA/CaJ mice at the same age ($P < 0.05$). From 12 months of age on, the losses of the cochlear outer and inner hair cells were increased significantly compared with that of the same strain ($P < 0.05$). **Conclusions** The damages of cochlear hair cells in the CBA/CaJ mice obey the rule of pathological changes that began at both ends of the cochlear top and bottom, and extended to the middle part, but the damages of hair cells at cochlear top were more serious than that at the cochlear bottom. The damages of cochlear hair cells in the C57BL/6J mice obey the rule of pathological changes that began mainly at the cochlear bottom and gradually extended to the middle and top. The damages of outer hair cells are earlier than that of inner hair cells. The damages of hair cells in C57BL/6J mice are earlier than that in CBA/CaJ mice. These result suggest that both species of mice can be used as animal models for the research of age-related hair cell apoptosis, but the model of C57BL/6J mouse is more suitable for the research of short-term observation. The differences of hair cell changes between the CBA/CaJ and the C57BL/6J mice may be related to the mutation and deletion of Cdh23 gene.

[Keywords] mice; cochlear hair cells; cochleograms

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

老年性聋又称年龄相关性聋 (age-related hearing loss, AHL), 随着世界人口的老年化, AHL 的发病率也逐年递增^[1]。AHL 因其病因病机复杂和防治困难, AHL 成为当前耳科学研究的重要热门课题之一^[2-4]。由于在 AHL 的临床研究中较难开展组织细胞水平或蛋白水平或基因水平等分子层面的实验研究, 因此目前对 AHL 的组织细胞学及更微细结构的研究大多还是借助动物实验模型。在诸多哺乳类实验动物模型中, 由于小鼠的生命周期相对较短而且目前已成功建立起多种 AHL 相关基因缺陷的小鼠实验模型, 因此 AHL 小鼠模型中的 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠得到更多的应用。CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠最早是由美国 Jackson Laboratory 于上世纪四十年代引入通过近交培育出的、具有遗传基因纯合、个体差异小、对试验反应均一、试验结果更准确和更可靠等特点的两个鼠种, 并维持应用至今。然而, 这两种较常用小鼠模型的耳蜗毛细胞损害规律及发展模式却并不相同^[5-6]。本文应用全耳蜗基底膜铺片技术和耳蜗图制备技

术, 对出生后不同年龄的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠的全耳蜗毛细胞进行了精确的定位定量观察, 并将两种不同小鼠的耳蜗毛细胞病理学改变进行了对比分析及讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验动物为清洁级 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 成年小鼠各 32 只, 雌雄各半, 年龄分别在 6 个月、12 个月、18 个月和 24 个月, 每个年龄组各 8 只, 由美国国家核准认定的标准实验动物源提供机构、国际标准 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠培育基地 Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/strain>) 提供, 其 mouse strain datasheet-stock No. 分别是 000654、000664, 均饲养于获得美国官方严格认证的美国纽约州立布法罗大学 (State University of New York at Buffalo) 实验动物中心。研究项目获得美国相关部门严格审查和批准开展。

1.1.2 试剂及仪器

主要实验试剂 Hematoxylin Solution, Harris Modified (Sigma-Aldrich, 产品号 HHS16), Potassium dihydrogen phosphate (Sigma-Aldrich, 产品号 NIST200B), Disodium hydrogen phosphate (Sigma-Aldrich, 产品号 NIST218611), Sodium succinate dibasic hexahydrate (Sigma-Aldrich, 产品号 S2378), Tetranitroblue tetrazolium chloride (Sigma-Aldrich, 产品号 T4000), Xylenes (Sigma-Aldrich, 产品号是 XX0060)。

1.2 方法

1.2.1 耳蜗标本制备与铺片

在麻醉状态下,牵引小鼠颈部造成颈椎脱位,然后开颅取出小鼠颞骨。在解剖显微镜下,在蜗尖钻孔并摘除镫骨同时打开园窗,向耳蜗内灌入 4% 甲醛固定液并固定 24 h 以上,再经 5% 盐酸溶液脱钙 48 h 后,分离取出全耳蜗基底膜,逐级递减梯度乙醇水化,苏木素染液常规对基底膜染色,自来水冲洗返蓝,逐级递增梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后将全耳蜗基底膜移入载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片,中性树胶封固。或向耳蜗内灌入琥珀酸脱氢酶孵育液,即琥珀酸脱氢酶孵育液由一份 0.2 mol/L 琥珀酸钠和一份 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液及两份 0.1% 氯化硝基四氮唑蓝混合配制而成。将含有琥珀酸脱氢酶孵育液的耳蜗置于 37℃ 恒温箱内孵育 40~60 min,然后将耳蜗浸入 10% 中性福尔马林固定液固定 24 h 以上,前法脱钙后,分离取出全耳蜗基底膜移入载玻片上的甘油滴中,盖上盖玻片,中性树胶封固^[7-9],显微镜下观察。

1.2.2 耳蜗图和毛细管的定位定量分析

在放大 400 倍的普通光学显微镜下,分别对 6 月龄组、12 月龄组、18 月龄组和 24 月龄组的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠的全耳蜗基底膜进行毛细胞缺损的定位定量观察。在置有标记单位长度为 0.24 mm 的显微测量尺目镜的光学显微镜下,从蜗尖向蜗底逐个视野依次进行内、外毛细胞计数,并将采集的数据输入到计算机中,分别与耳蜗图软件中预先设置的 CBA/CaJ 小鼠和 C57BL/6J 小鼠参考数据进行逐一比较,耳蜗基底膜的实际全长被转换为百分比长度单位,单位长度内的毛细胞实际数量被转换成毛细胞密度并按照百分比分布在耳蜗

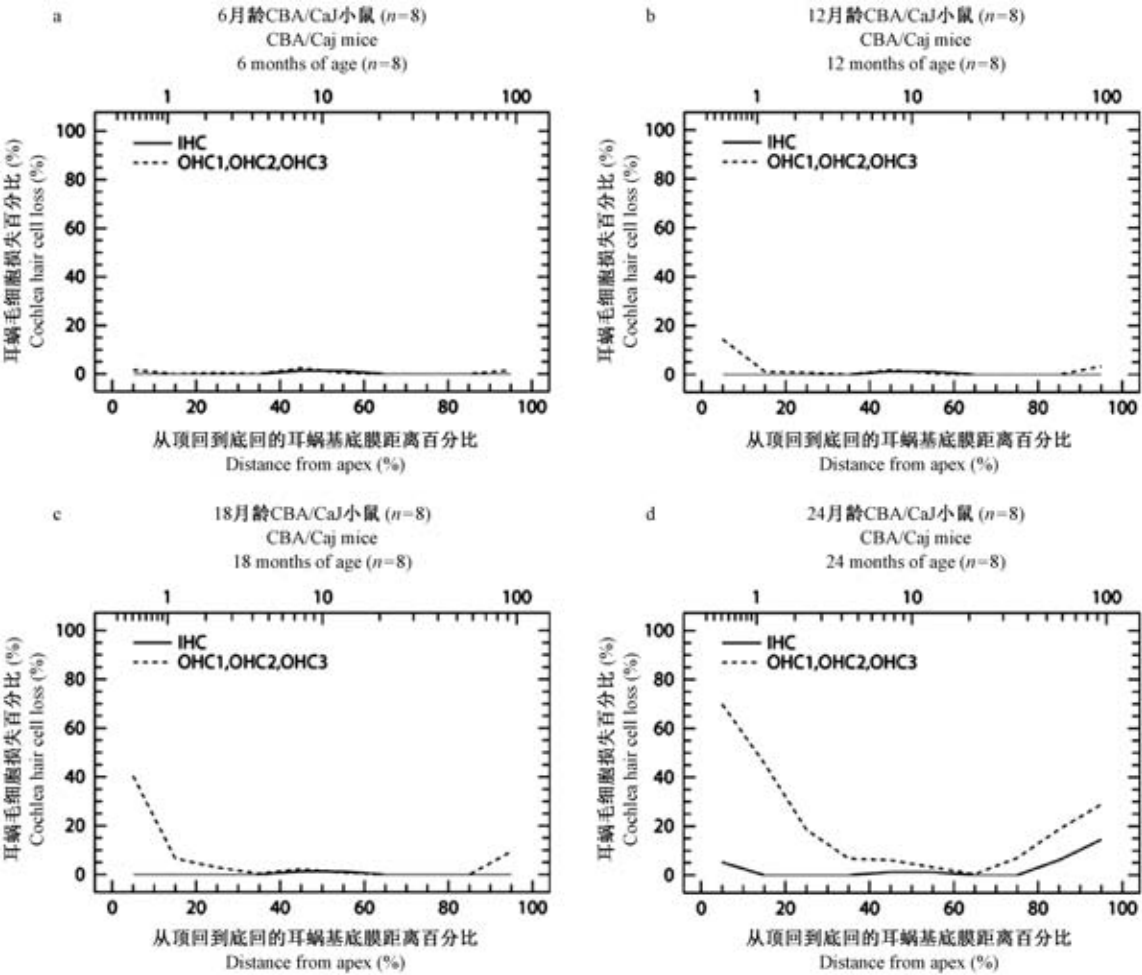
基底膜的各个部位,从而建立其该耳蜗的毛细胞缺损分析图。最后应用本耳蜗图软件程序,将每组 8 个耳蜗的毛细胞缺损分析图整合成该组动物的平均耳蜗图^[7-9]。另外,将不同区域的毛细胞密度值摘出,采集数据被输入到 GraphPad Prism 5 软件系统,最后进行统计分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两个或多个构成比比较应用卡方 (χ^2) 检验法,以 $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

CBA/CaJ 小鼠耳蜗图结果显示,6 月龄全耳蜗内外毛细胞数量完整,未见缺损(图 1a)。12 月龄从蜗尖开始至距离蜗尖 15% 区域出现外毛细胞缺损,离蜗尖越近缺损越重,最高缺损达到 15%。耳蜗底回 Hook 区域,即距离蜗尖 85% 至沟端区域也有缺损,离底部越近缺损越多,但不如顶部明显,最高缺损占 5%(图 1b)。18 月龄耳蜗外毛细胞缺损扩大,从蜗尖开始至距离蜗尖 30% 区域均出现外毛细胞缺损,其中从蜗尖至距离蜗尖 15% 区域处呈陡降高峰,显示该区域缺损最重,最高缺损达到 40%,同时向底回方向逐渐减少。耳蜗底回距离蜗尖 85% 至沟端区域外毛细胞也有缺损,缺损继续扩大,最高达到 15%,与耳蜗顶回缺损相反,外毛细胞缺损向底回方向逐渐加重(图 1c)。24 月龄全耳蜗各回外毛细胞均有不同程度缺损,比 18 月龄明显扩大,其中从蜗尖至距离蜗尖 35% 区域处呈陡降高峰,显示该区域外毛细胞缺损最重,最高缺损达到 70%。距离蜗尖 65% 至沟端区域,外毛细胞缺损也对应扩大,最高缺损占 30%。耳蜗顶部和底部内毛细胞开始出现缺损,其中距离蜗尖 75% 至沟端区域缺损增加,最高可达 15%,而顶回有所缺损,最高占 5%,比底部轻(图 1d)。CBA/CaJ 小鼠不同龄全耳蜗铺片顶回、底回毛细胞比较镜下观察见图 2A1-D2。总之,CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞变化特点是,伴随着年龄增长,12 月龄开始出现耳蜗外毛细胞轻度缺损,遵循着从顶回和底回两端开始,向中回延伸,但顶回毛细胞损害比底回严重的病变规律。24 月龄内毛细胞在顶回和底回两端开始出现缺损,但损害程度较轻。



注：IHC:内毛细胞平均曲线。OHC1、OHC2、OHC3:第一、二、三排外毛细胞平均曲线。

图1 CBA/CaJ 小鼠不同龄全耳蜗毛细胞计数耳蜗图

Note. IHC: average curve of inner hair cells. OHC1, OHC2, OHC3: average curve of the first, second and third row of outer hair cells.

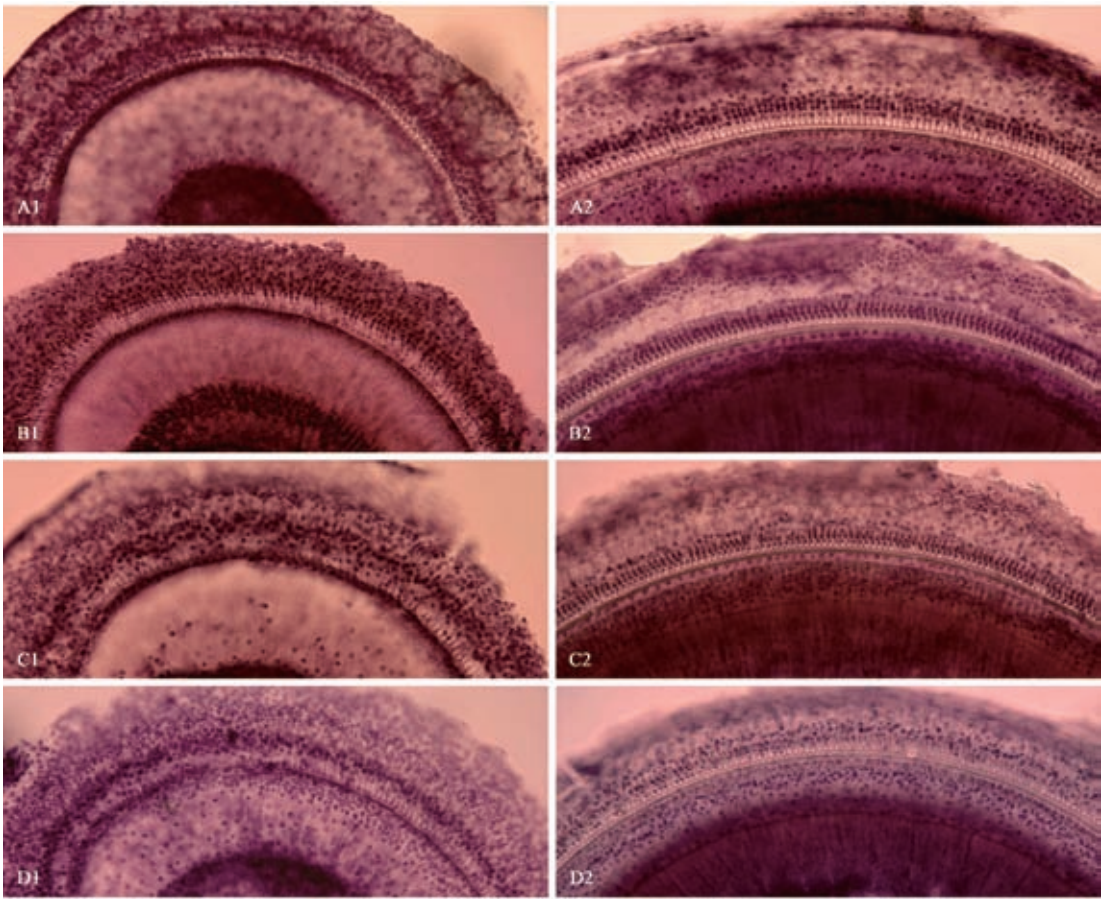
Figure 1 Cochleograms of whole cochlea hair cells count in the CBA/CaJ mice at different ages

C57BL/6J 小鼠耳蜗图结果显示,6 月龄已经出现外毛细胞缺损,以耳蜗底部为主,即从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 75% 区域出现外毛细胞缺损,越往底部越重,最高缺损可达 65%,同时从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 85% 区域也出现了内毛细胞的缺损,最高缺损程度可达 25%。耳蜗顶部出现外毛细胞缺损较少,从蜗尖开始至距离蜗尖 15% 区域出现外毛细胞缺损,离蜗尖越近外毛细胞的缺损数量越多,最高缺损可达 20%,但内毛细胞基本完整(图 3a)。12 月龄耳蜗底部外、内毛细胞缺损明显加重,从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 50% 区域都出现了外毛细胞的缺损,最高缺损程度达到 100%,同时从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 70% 区域开始出现内毛细胞缺损,最高缺损程度达到

55%。与 6 月龄动物相比,耳蜗顶部外毛细胞缺损变化不大,内毛细胞仍然保持基本完整(图 3b)。18 月龄动物耳蜗底部外、内毛细胞缺损继续扩大,从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 45% 区域均出现外、内毛细胞缺损,外毛细胞缺损形成陡降高峰,其中从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 70% 区域,外毛细胞的缺损都达到 100%,该区域内毛细胞平均缺损达到 50%。耳蜗顶部距离蜗尖 30% 区域外毛细胞缺损最高可达 40%,但顶部内毛细胞基本完整(图 3c)。24 月龄耳蜗外毛细胞缺损基本覆盖了耳蜗基底膜全程,其中从耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 40% 区域,相当耳蜗底回和中回外毛细胞缺损达到 100%,耳蜗顶部距离蜗尖 25% 以上区域外毛细胞缺损最高可达 80%,距离蜗尖 25% 至 35% 区域外毛细胞

胞缺损最轻,但也达到 25%。耳蜗底部沟端开始至距离蜗尖 45% 区域,出现内毛细胞大范围缺损,其中距离蜗尖 70% 以下区域的内毛细胞缺损程度平均达到 90%,但出现在顶回区域的内毛细胞缺损仅占 10%(图 3d)。C57BL/6J 小鼠不同龄全耳蜗铺片顶回、底回毛细胞比较镜下观察举例见图 4E1-H2。总之,C57BL/6J 小鼠耳蜗毛细胞变化特点是,伴随着年龄的增长,6 月龄已出现耳蜗外、内毛细胞缺损,并遵循着外毛细胞损害为主和从耳蜗底部开始,逐渐向中回和顶回扩展的病变规律。

两个不同鼠种不同龄耳蜗外、内毛细胞平均损失占比经 χ^2 检验结果表明(表 1),C57BL/6J 小鼠从 6 月龄开始至 24 月龄,与同龄 CBA/CaJ 小鼠比较,外、内毛细胞损失差异具有显著性意义($P<0.05$),与相同鼠种相邻观察年龄段比较,差异也具有显著性意义($P<0.05$)。CBA/CaJ 从 18 月龄至 24 月龄,与相同鼠种相邻观察年龄段外毛细胞缺损比较,差异具有显著性意义($P<0.05$),24 月龄内毛细胞与前个年龄段比较差异也具有显著性意义($P<0.05$)。

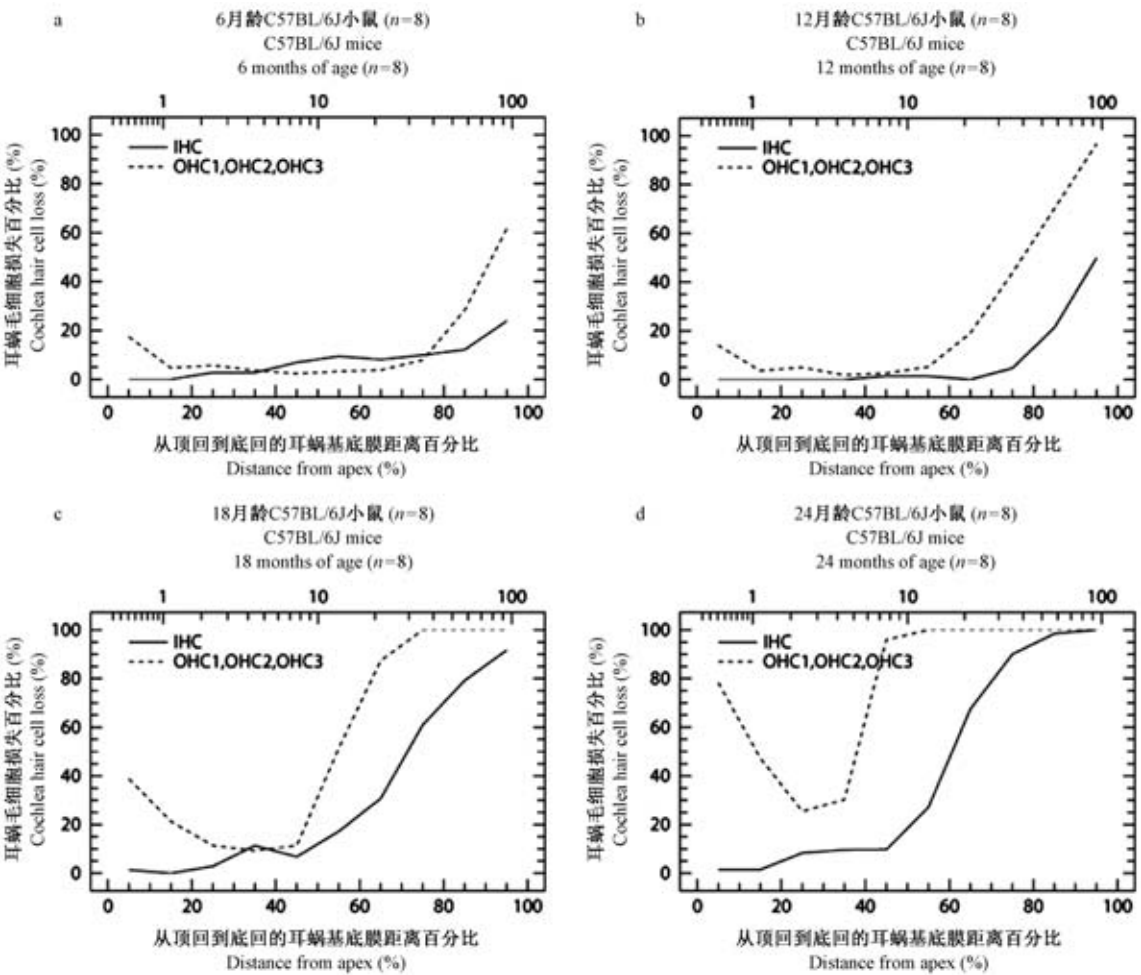


注:A1:6 月龄耳蜗基底膜顶回。A2:6 月龄耳蜗基底膜底回。B1:12 月龄耳蜗基底膜顶回。B2:12 月龄耳蜗基底膜底回。C1:18 月龄耳蜗基底膜顶回。C2:18 月龄耳蜗基底膜底回。D1:24 月龄耳蜗基底膜顶回。D2:24 月龄耳蜗基底膜底回。(苏木素染色,×100)

图 2 CBA/CaJ 小鼠不同龄耳蜗顶回、底回毛细胞比较镜下观察

Note. A1, Apical turn of the cochlear basement membrane at 6 months of age. A2, Basal turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. B1, Apical turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. B2, Basal turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. C1, Apical turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. C2, Basal turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. D1, Apical turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. D2, Basal turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. (Hematoxylin staining, ×100)

Figure 2 Microscopic comparison of the hair cells in cochlear apical turn and basal turn of CBA/CaJ mice at different ages



注：IHC:内毛细胞平均曲线。OHC1,OHC2,OHC3:第一、二、三排外毛细胞平均曲线。

图 3 C57BL/6J 小鼠不同龄全耳蜗毛细胞计数耳蜗图

Note. IHC: average curve of inner hair cells. OHC1, OHC2, OHC3:average curve of the first, second and third row of outer hair cells.

Figure 3 Chochleograms of whole cochlea hair cells count in the C57BL/6J mice at different ages

表 1 不同龄 CBA/CaJ、C57BL/6J 小鼠耳蜗外、内毛细胞平均损失百分比 X² 检验结果(百分比:%)

Table 1 The results of chi-square test for percentage of average loss of outer and inner hair cells in the cochleae of CBA/CaJ and C57BL/6J mice at different ages(Percentage:%)

种类 Mice	n	6 月龄 6 months		12 月龄 12 months		18 月龄 18 months		24 月龄 24 months	
		外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner	外 Outer	内 Inner
		1	0	2	0	10 [△]	0	30 [△]	5 [△]
C57BL/6J	8	18 [*]	5 [*]	35 ^{*△}	10 ^{*△}	60 ^{*△}	30 ^{*△}	80 ^{*△}	50 ^{*△}

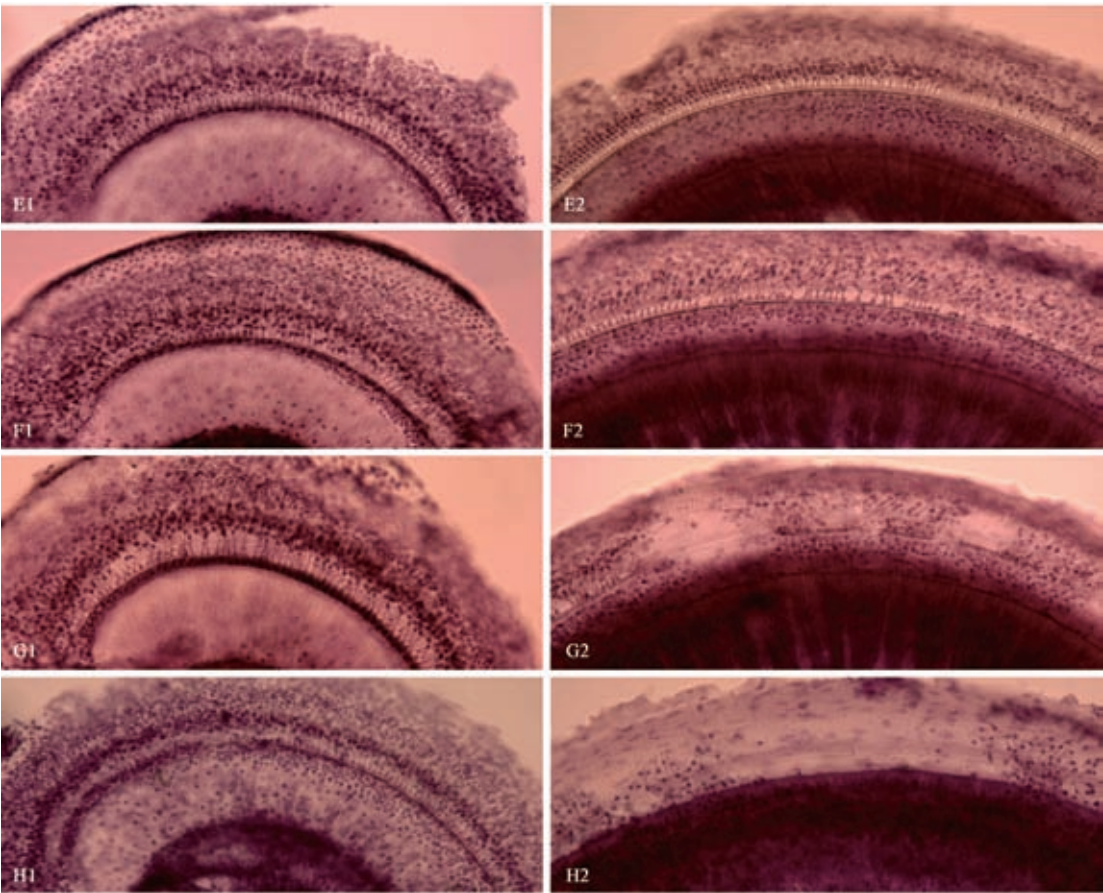
注：两个不同鼠种同龄同属细胞比较，**P*<0.05。相同鼠种该年龄与上年龄同属细胞比较，[△]*P*<0.05。

Note. Comparisons in the same genus cells of two different species at the same age, **P* < 0.05. Comparisons between the age and last age in the same genus cells of the same species, [△]*P*<0.05.

3 讨论

人类 AHL 因发病隐匿并呈渐进性发展,病程长,不易观察,一直是临床研究难题,其中如何进行耳蜗细胞形态学临床研究更是研究的瓶颈,因此,如何选择合适的动物模型研究和认识 AHL 细胞形

态学及其发展变化规律,并由此为基础研究分子通路机制、药物干预作用,一直以来成为耳科界探索热点,而观察、研究和比较耳蜗基底膜全程的毛细胞密度则是揭示研究 AHL 细胞形态学及其发展变化规律的关键,并为寻找合适的实验动物模型提供可参考实验依据。耳蜗图软件可以对全耳蜗毛细



注: E1: 6 月龄耳蜗基底膜顶回。E2: 6 月龄耳蜗基底膜底回。F1: 12 月龄耳蜗基底膜顶回。F2: 12 月龄耳蜗基底膜底回。G1: 18 月龄耳蜗基底膜顶回。G2: 18 月龄耳蜗基底膜底回。H1: 24 月龄耳蜗基底膜顶回。H2: 24 月龄耳蜗基底膜底回。(苏木素染色, $\times 100$)

图 4 C57BL/6J 小鼠不同龄耳顶回、底回毛细胞比较镜下观察举例

Note. E1, Apical turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. E2, Basal turn of cochlear basement membrane at 6 months of age. F1, Apical turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. F2, Basal turn of cochlear basement membrane at 12 months of age. G1, Apical turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. G2, Basal turn of cochlear basement membrane at 18 months of age. H1, Apical turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. H2, Basal turn of cochlear basement membrane at 24 months of age. (Hematoxylin stain, $\times 100$)

Figure 4 Microscopic comparison of hair cells in cochlear apical turn and basal turn of the C57BL/6J mice at different ages

胞密度、毛细胞丢失、耳蜗长度进行精准定位定量分析,为全面、完整、正确评估耳聋研究提供了一个重要的研究方法和手段,目前应用耳蜗图对全耳蜗毛细胞定位定量的评估方法已成为国际各权威耳科研究机构普遍采用的常规标准^[7-9]。哺乳类动物耳蜗听觉反应的特点是不同频率声波信号在基底膜上不同部位形成最大的振动幅度,从而可以选择性刺激该频率共振特定部位的毛细胞。一般来说,耳蜗底回的毛细胞感应高频声音刺激信号,而耳蜗顶回毛细胞则只对低频声音刺激起反应,由于耳蜗基底膜上不同部位的毛细胞只对特定频率的声音刺激起最大反应,因此沿着耳蜗基底膜的全长便形成了一个重要的耳蜗频率位置对应关系。不同物

种动物的耳蜗基底膜长度和听觉频率范围并不相同,例如人类的耳蜗基底膜长度大约在 35 mm 左右,其可听频率范围一般被认为是从 20 ~ 20 000 Hz;大鼠的耳蜗基底膜长度大约在 9 mm 左右,其可听频率范围是从 1000 ~ 90 000 Hz;小鼠的耳蜗基底膜长度大约在 6 mm 左右,其可听频率范围是从 1000 ~ 100 000 Hz。因此,耳蜗基底膜对应不同频率感应区的位置在不同种类的实验动物也不相同。由于实验动物的耳蜗图制备包含着该种类动物的耳蜗基底膜总长度和基底膜上每个不同位点的不同毛细胞密度及其对应的音频反应位置等重要信息,因此耳蜗图成为精准评估各种实验动物全耳蜗毛细胞病理学改变并对应其听觉功能障碍的最可

靠研究方法之一^[7]。

由于豚鼠寿命长,平均约在 5 年左右,以豚鼠作为研究老年性内耳损害模型,需要等待若干年直到动物进入老年,因此不易观察和研究。而小鼠生命周期短,尤其是有的特殊基因缺陷型小鼠能够提早发生 AHL,因此国际针对 AHL 研究,更多倾向于采用小鼠 AHL 模型。研究发现,不同种株近交系小鼠耳蜗毛细胞的退变随着年龄的增长存在着截然不同的病变发生时间和病理学改变进程^[7,10]。用于研究 AHL 动物模型较多的是 CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠。然而,通过听力学研究表明,在成年早期,CBA/CaJ 并没有表现 AHL,而 C57BL/6J 小鼠出现 AHL 较早,但在后期 CBA/CaJ 同样也出现 AHL^[11]。本次通过耳蜗图毛细胞密度、定位定量分析也证实,6 月龄 C57BL/6J 小鼠耳蜗基底部毛细胞已出现损失,但同龄 CBA/CaJ 小鼠几乎未见变化,至 18 月龄仅外毛细胞才出现具有统计学意义的时间可比性损失变化,但相较 C57BL/6J 小鼠,损失不多,而同龄 C57BL/6J 小鼠耳蜗外毛细胞损失过半,内毛细胞也损失几乎 1/3,之后随着年龄老化,CBA/CaJ 小鼠耳蜗毛细胞损失迅速增加。这些毛细胞退变和损失变化与前述文献报道的两种小鼠听力学改变一致。两种不同属性小鼠不同时间出现 AHL,与它们的基因遗传学密切相关,C57BL/6J 小鼠存在隐性等位基因改变,CBA/CaJ 小鼠则没有^[10]。为了探明 C57BL/6J 小鼠存在的隐性等位基因改变,通过对 C57BL/6J 小鼠 $Sod1^{+/+} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{+/+} Cdh23^{(+/+)}$ 、 $Sod1^{(-/-)} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{(-/-)} Cdh23^{(+/+)}$ 四种基因型 ABR (auditory brainstem-evoked response) 听力检测研究发现, $Sod1^{+/+} Cdh23^{(+/+)}$ 小鼠在 15 个月龄前仍保持正常听力,其中 $Sod1^{(-/-)} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 小鼠表现出听力损失最早而且发病最严重,其次是 $Sod1^{+/+} Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 、 $Sod1^{(-/-)} Cdh23^{(+/+)}$,由此认为, $Cdh23^{(ahl/ahl)}$ 基因缺陷型是导致 C57BL/6J 小鼠早期即出现 AHL 病变的主要原因^[12-13]。进一步研究显示,C57BL/6J 小鼠与 CBA/CaJ 小鼠不同,在于 C57BL/6J 隐性 $Cdh23$ 等位基因(ahl)在纯合子时对 AHL 的易感性增加,而 CBA/CaJ 是显性等位基因(Ahl+)则具有对 AHL 不易感性,通过对 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月、15 个月和 18 个月龄时测量 8 kHz、16 kHz 和 32 kHz 纯音刺激的 ABR 阈值比较,C57BL/6J 小鼠 32 kHz ABR 阈值在 6 月龄时明显高于 CBA/CaJ 小鼠,其

16 kHz 阈值在 12 个月龄时显著高于 CBA/CaJ 小鼠。这些结果表明,CBA/CaJ 衍生的 $Cdh23^{(ahl+)}$ 等位基因在其他 C57BL/6J 遗传背景下可显著减少听力损失和毛细胞死亡,但 C57BL/6J 小鼠衍生的 $cdh23^{(ahl)}$ 等位基因对其他 CBA/CaJ 背景下的听力损失影响不大^[14]。最新针对 $cdh23$ 基因,利用 C57BL/6 NJ 和 129S1/SvImJ 胚胎干细胞并使用互联单碱基对替换(B6- $Cdh23C.753A>G$ 和 129S1- $Cdh23C.753G>A$),进行同源重组设计小鼠种株,对与许多近交系鼠共同的钙粘蛋白 23 基因($Cdh23C.753A$)的单核苷酸变体(SNV)进行研究,通过检测 ABR 阈值和耳蜗病理学观察,对这些 SNV 小鼠同源 B6.129S1- $Cdh23Ahl+$ 与 129S1.B6- $Cdh23ahl$ 和亲源(B6N 和 129S1)进行了比较,结果证实, $Cdh23C.753G$ 等位基因对 C57BL/6J 小鼠至少 18 个月龄的高频听力损失具有保护作用,而 $Cdh23C.753A$ 等位基因的 AHL 诱导作用加重了 129S1 小鼠的听力损失。两个同源小鼠的 ABR 阈值不同和互联回交导致差异原因是定位于 Chr 10 QTL。这些结果说明了种株背景和同源区相关听力损失影响与 $Cdh23C.753$ 等位基因变异有关,即 $Cdh23C.753A$ 的 SNV,可加速 AHL,并可恶化其他突变的听觉表型^[15]。

综上所述,C57BL/6J 小鼠青年时期即可出现与年龄相关的毛细胞损失并由此导致 AHL 的主要原因是 $Cdh23$ 基因的缺失,而 CBA/CaJ 小鼠青年时期尚未出现毛细胞损失并由此导致 AHL 的主要原因正是因为其具有显性 $Cdh23$ 基因。因此,CBA/CaJ 小鼠所表现出的发生较晚的年龄相关听觉障碍似乎可以被认为是一种天然发生的 AHL 动物模型。于此不同的是,C57BL/6J 小鼠存在着 $Cdh23^{ahl}$ AHL 等位基因片段的缺失,在这种小鼠身上发生的较早听觉衰退被多数人赞同的看法似乎更像是与遗传基因缺陷有关。以往我们的研究,主要以 C57BL/6J 小鼠作为 AHL 动物模型,是利用其早期即出现 AHL,便于短期观察的特点^[6,16-17]。但 C57BL/6J 小鼠毕竟属于基因变异种株,相比之下,CBA/CaJ 小鼠更接近自然形成的 AHL,其导致 AHL 病理机制与 C57BL/6J 异同点,有待进一步探讨和揭示。

参 考 文 献(References)

- [1] Sprinzl GM, Riechelmann H. Current trends in treating hearing loss in elderly people: a review of the technology and treatment options—a mini-review [J]. Gerontology, 2010, 56(3): 351–358.
- [2] Vaisbuch Y, Santa Maria PL. Age-related hearing loss:

- innovations in hearing augmentation [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2018, 51(4): 705–723.
- [3] Humes LE. The World Health Organization's hearing-impairment grading system; an evaluation for unaided communication in age-related hearing loss [J]. *Int J Audiol*, 2019, 58(1): 12–20.
- [4] Han C, Ding D, Lopez MC, et al. Effects of long-term exercise on age-related hearing loss in mice [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(44): 11308–11319.
- [5] Ding D, McFadden SL, Wang J, et al. Age- and strain-related differences in dehydrogenase activity and glycogen levels in CBA and C57 mouse cochleas [J]. *Audiol Neurotol*, 1999, 4(2): 55–63.
- [6] 宣伟军, 丁大连, 蒋海燕, 等. 复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 毛细胞的保护作用 [J]. *中华耳科学杂志*, 2016, 14(2): 272–277.
- Xuan WJ, Ding DL, Jiang HY, et al. Protective effects of the compound healthy ear agent against presbycusis in C57BL/6J mice [J]. *Chin J Otol*, 2016, 14(2): 272–277.
- [7] Ding D, McFadden S, Salvi RJ. Cochlear hair cell densities and inner-ear staining techniques. In: *Handbook of Mouse Auditory Research* [M]. Florida: CRS Press, 2001.
- [8] 亓卫东, 丁大连, 蒋海燕, 等. 全耳蜗毛细胞定量分析系统 [J]. *听力学与言语疾病杂志*, 2007, 15(2): 158–160.
- Qi WD, Ding DL, Jiang HY, et al. Quantified analytic system for cochlear hair cells [J]. *J Audiol Speech Pathol*, 2007, 15(2): 158–160.
- [9] 丁大连, 亓卫东, 曲雁, 等. 内耳形态学研究方法. *内耳科学* [M]. 北京: 科学技术出版社, 2010.
- Ding DL, Qi WD, Qu Y, et al. *Research Method on Inner Ear Morphology*. Inner Ear Science [M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2010.
- [10] Willott JF, Erway LC, Archer JR, et al. Genetics of age-related hearing loss in mice. II. Strain differences and effects of caloric restriction on cochlear pathology and evoked response thresholds [J]. *Hear Res*, 1995, 8(1–2): 143–155.
- [11] Erway LC, Shiao YW, Davis RR, et al. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss [J]. *Hear Res*, 1996, 3(1–2): 181–187.
- [12] Zheng QY, Ding D, Yu H, et al. A locus on distal chromosome 10 (ahl4) affecting age-related hearing loss in A/J mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(10): 1693–1705.
- [13] Johnson KR, Yu H, Ding D, et al. Separate and combined effects of Sod1 and Cdh23 mutations on age-related hearing loss and cochlear pathology in C57BL/6J mice [J]. *Hear Res*, 2010, 268(1–2): 85–92.
- [14] Kane KL, Longo-Guess CM, Gagnon LH, et al. Genetic background effects on age-related hearing loss associated with Cdh23 variants in mice [J]. *Hear Res*, 2012, 283(1–2): 80–88.
- [15] Johnson KR, Tian C, Gagnon LH, et al. Effects of Cdh23 single nucleotide substitutions on age-related hearing loss in C57BL/6 and 129S1/Sv mice and comparisons with congenic strains [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(3): 44450.
- [16] 宣伟军, 丁大连, 宣毅, 等. 复方健耳剂对抗小鼠老年性耳蜗螺旋神经节神经元凋亡效应及机制研究 [J]. *中华老年医学杂志*, 2016, 35(12): 1329–1333.
- Xuan WJ, Ding DL, Xuan Y, et al. Effects of healthy ear compound of traditional Chinese medicine against age-induced apoptosis on cochlear spiral ganglion neurons in C57BL/6J mice and research on mechanisms by regulating caspase-3 [J]. *Chin J Geriatr*, 2016, 35(12): 1329–1333.
- [17] 宣伟军, 唐俊波, 陈壮, 等. 中药复方健耳剂对 C57BL/6J 小鼠 AHL 的防护效应 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(10): 1247–1251.
- Xuan WJ, Tang JB, Chen Z, et al. Protecting effects of Jian'erji on age-related hearing loss of C57BL/6J mice [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2016, 36(10): 1247–1251.

[收稿日期] 2019-04-14

蒋玮,曹林忠,邬明峻,等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 799-804.

Jiang W, Cao LZ, Wu MJ, et al. Establishment and evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 799-804.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.017

激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价

蒋玮¹, 曹林忠^{1,2*}, 邬明峻¹, 张琪¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院脊柱外科, 兰州 730020)

【摘要】 由于糖皮质激素的广泛应用,而导致的激素性股骨头坏死的发病率逐年升高,但其发病机制及预防措施仍不明确,为了进行深入研究,从根本上进行治疗,激素性股骨头坏死动物模型的建立将是这些研究成败的关键。本文将造模方案、造模动物以及造模标准的研究进展做一综述。

【关键词】 激素性股骨头坏死;动物模型;评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0799-06

Establishment and evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head

JIANG Wei¹, CAO Linzhong^{1,2*}, WU Mingjun¹, ZHANG Qi¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Department of Spinal Surgery, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine University, Lanzhou 730020)

Corresponding author: CAO Linzhong. E-mail: clzh1@163.com

【Abstract】 Owing to the widespread use of glucocorticoids, the incidence of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head has increased year by year, but its pathogenesis and possible preventive measures are still unclear. To carry out in-depth research into its fundamental treatment, the establishment of an animal model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head will be the key to success. This paper reviews the research progress of modeling schemes, modeling animals and modeling standards.

【Keywords】 Steroid-induced avascular necrosis; femoral head; animal model; evaluation

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

1957年由Pietrogramde和Mastomarine第一次提出短时间大剂量可的松会引起股骨头坏死(osteoarthrosis of femoral head, ONFH)之后,人们逐渐认识到长期服用糖皮质激素会导致激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of the femoral head, SANFH)的发生。然而激素在人体内引起ONFH的机制尚不明确,主要有脂肪代谢紊乱、血管内凝血和骨质疏松三种假说^[1]。激素进入人体后会影 响内分泌调节,导致血脂增高,易堵塞

微小血管,进而引起股骨头局部缺血坏死;股骨头坏死患者的血液粘稠度高,在激素的刺激下,容易发生高凝状态及血管内凝血,从而出现股骨头缺血坏死;骨量减少、骨小梁变细、变薄是激素的副作用之一,在外部应力的作用下,股骨头常发生软骨下骨折、局部塌陷导致血液循环障碍,引起股骨头缺血坏死^[2]。

随着研究不断深入,SANFH研究进入细胞、分子及基因领域,主要有激素代谢紊乱、干细胞分化

【基金项目】 国家自然科学基金(81860859)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(81860859).
【作者简介】 蒋玮,男,甘肃中医药大学中医骨伤科学专业在读研究生。
【通信作者】 曹林忠,男,主任医师,硕士生导师,主要从事中医药防治骨伤疾病。Email:clzh1@163.com

和基因多态三种假说。有研究者^[3]发现人体内细胞色素 P4503 A 酶的活性与糖皮质激素清除成正相关,酶活性的降低可导致体内激素作用时间增加,副作用也随之增加,最终导致股骨头坏死。研究发现,糖皮质激素会促进骨髓间充质干细胞向成脂分化、减少成骨分化,导致股骨头坏死。mRNA 作为调节因子,调控细胞的整个生命周期,但它是否参与 SANFH 的发生,当今尚不清楚,吴兴净等^[4]实验研究发现上调的 miR-125 α -3p 和下调的 miR-17-5p 可能参与激素性股骨头坏死的发生,但还有待进一步验证。

然而无论是三种坏死机制假说,还是更进一步的细胞、分子及基因研究,SANFH 动物模型的建立是研究的基础,本文就以“激素性股骨头坏死及造模”为检索词在 CNKI 数据库中,从 2009 年 01 月 01 日至今,共检索出相关文献 190 篇;以“animal model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head”为词条在 PubMed 中共检索到文献 58 篇。按照①股骨头坏死;②激素性;③股骨头坏死病因及机制;④动物模型;⑤造模方案;⑥造模成功标准,符合其中多项或一项为入选标准,排除较陈旧、相似或重复研究的文章,最终选择 37 篇文章进行分析、归纳、总结,将最近 10 年来国内外对造模方案、动物选择及造模成功标准进行简要综述,为 SANFH 动物模型建立提供参考。

1 SANFH 造模方案的选择

激素在动物和人体中有大致相似的作用机制,为了建立与人类 SANFH 病因及发病过程相似的动物模型,总结常用 SANFH 的建模方法有单纯糖皮质激素诱导、异体血清联合激素诱导和脂多糖联合激素诱导。糖皮质激素可使血管胶原纤维和弹性纤维结构和功能障碍,从而导致骨组织小动脉的断裂或栓塞,导致骨细胞缺血和骨髓内高压引起股骨头坏死,糖皮质激素还可抑制干细胞成骨分化,促进向脂肪细胞分化,导致 SANFH 的发生^[5]。然而大部分患者因为血液、免疫系统或其他疾病,使用激素治疗时,出现了股骨头坏死的副作用。所以为了模拟这一发病过程,常使用异体血清制造模型动物的血液和脉管系统炎症,或者使用脂多糖引起微循环障碍,再使用激素干预,最终形成 SANFH。

1.1 糖皮质激素诱导

糖皮质激素的使用是导致 SANFH 的主要原

因。常用的糖皮质激素有醋酸泼尼松龙、地塞米松、甲基强的松龙和甲基氢化泼尼松琥珀酸钠等。不同激素和使用剂量的不同对实验动物有不同的影响。范武等^[6]通过每周 2 次日本大耳兔左侧臀肌注射 10 mg/kg 的醋酸泼尼松龙注,连续 4 周后成功造模。赵振广等^[7]给大鼠每周 2 次腹腔注射地塞米松 10 mg/kg,持续 8 周的方案成功建立 SANFH 的早期模型。Kuribayashi 等^[8]通过肌肉注射甲基强的松龙 20 mg/(kg·d)的方式建立兔 SANFH 模型,4 周后有 70% 的发生 ONFH,然而在肌肉注射甲基强的松龙后,有 20% 的试验动物死亡。王荣田等^[9]用雌鸡来航鸡,每周 2 次胸肌注射甲基氢化泼尼松琥珀酸钠 5.2 mg/(kg·week),预防性注射青霉素 2×10^4 U/kg、链霉素 50 mg/kg,连续 8 周后造模成功。但李兴国等^[10]通过新西兰大白兔双侧臀肌连续 9 周注射地塞米松 2.5 mg/(kg·d),并且连续 1 周臀部肌注 8×10^4 U/d 庆大霉素,未成功造模,且动物死亡率高达 25%。

单纯糖皮质激素诱导 SANFH 模型的方法优点在于制模过程操作简单,所用药物价格便宜,经济负担较轻,但 SANFH 患者常患有多种基础疾病,所以单纯使用激素制模与人类实际发病过程有较大的差异。也有研究者表明^[11]单纯激素不能成功诱导 SANFH 动物模型,这一结论还有待进一步的验证。

1.2 异体血清加激素诱导

为了使建立的模型更有说服力,发病过程与人类相似,常使用异体血清制造模型动物的血液和脉管系统炎症,再加入激素干预进行造模。1992 年, Matsui 等^[12]首次通过兔耳缘静脉注射马血清 10 mL/kg,2 周后再次注射相同剂量,同时连续 3 天腹腔注射 40 mL/(kg·d)的甲基强的松龙,4 周后能在组织切片上观察到骨髓坏死,6~8 周后出现骨坏死,最终 70% 的动物成功制作 SANFH 模型。周正新等^[13]兔耳缘静脉注射马血清 10 mL/kg,第 3 周后,注射剂量为 7.5 mL/kg,第 5 周后,连续 3 天 45 mg/(kg·d)的甲基强的松龙,之后连续 10 周腹腔注射 7.5 mg/(kg·week)的甲基强的松龙,并臀部肌注 4 万单位/只青霉素钠预防感染后成功造模。佟鹏等^[14]通过间隔 12 周兔耳缘静脉注射两次马血清 10 mL/kg 后,连续 6 天,臀肌注射 8 mg/(kg·d)的醋酸泼尼松龙,以 80% 的成功率获得 SANFH 模型。

马血清进入动物体内后,因免疫反应使动物出

现血管炎型超敏反应,导致血管局部免疫复合物的沉积,并在免疫系统等的参与下,引发一系列的反应致组织损伤,进一步使用糖皮质激素引发 SANFH^[15],这一过程很好的模拟了人类疾病的发生发展过程。

1.3 脂多糖联合激素诱导

革兰阴性细菌细胞壁中有一种特殊物质,叫做脂多糖,它能促进血管活性物质如缓激肽、组胺、血管紧张素、白介素-6 等物质释放,导致微循环障碍,在此基础上进行激素的干预,最终导致 ONFH^[16]。李瑞琦等^[17]对兔连续 3 d 肌肉注射青霉素 4×10^5 U 预防感染后,间隔 24 h 耳缘静脉连续两次注射 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 内毒素,第二次注射完毕内毒素后,每间隔 24 h 臀肌注射 20 mg/kg 甲基强的松龙,此后每周 2 次肌肉注射 4×10^5 U 青霉素预防感染,注射期间动物死亡 3/21,4 周后成功建立 SANFH 模型。阮康明等^[18]通过犬耳缘静脉间隔 24 h 连续两次注射 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 内毒素,在第二次注射内毒素的同一天开始,连续注射 2 周,臀肌注射甲基强的(10 mg/kg),间隔 1 周后,再继续注射 2 周,成功获得模型。Zheng 等^[19]对鹌鹑序贯注射内毒素及甲基强的松龙,也成功获得 SANFH 的临床前期研究的模型。于鹏等^[20]对兔间隔 24 h 连续两次静脉注射 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 大肠杆菌内毒素后,间隔 24 h 连续 3 次臀肌注射 20 mg/kg 醋酸泼尼松龙,注射完成后周第四以 28/32 的比率获得 SANFH 动物模型。王泳等^[21]完全按照 Yamamoto 等^[22]的方法制作动物模型,内毒素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 联合甲基强的松龙 20 mg/kg ,实验动物在注射内毒素后 2 d 内死亡率接近 80%,但将内毒素的剂量降低至 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,动物的死亡率下降至不到 10%,并通过组织形态学检查得出了与高剂量制模方法一致的病理结果。还有研究者^[8]发现内毒素联合激素组比马血清联合激素组稍早出现股骨头坏死。肖春生等^[23]经实验验证了这一观点成立。也有研究者^[24]发现内毒素导致的股骨头组织中肿瘤因子 α 明显增高,提示该方法导致的 ONFH 可能与肿瘤因子密切相关,但还需进一步验证。所以小剂量脂多糖联合激素能成功制造 SANFH 模型,且具有动物模型发病机制与人类相似,成功率高,实验动物死亡率低的优点。

2 模型动物的选择

为了模型动物尽可能的与人类有相似的

SANFH 发生过程,模型动物应有以下特点:①实验动物与人类亲缘。②实验动物尽可能从组织学、生理学模拟人类 SANFH 的整个过程。③生物力学效应与人类相似。④实验动物具有良好的重复性,有明确的制模成功评价标准、价格低廉、饲养方便^[25]。目前造模常用动物是以鸡为代表的双足类动物和以大鼠及兔子为代表的四足类动物^[26]。

2.1 双足类动物

生物力学效应与人类相似的双足类动物,在站立行走时双侧股骨头均受压,一旦出现局部缺血坏死,在集中应力的作用下,病程进展较迅速。且双足类动物大多为禽类,在进食高脂肪饲料或激素刺激后易出现血脂增高和血液粘滞性增高,易形成股骨头缺血坏死。万蓉等^[27]、孔祥英等^[28]通过胸肌注射甲基泼尼松琥珀酸钠后成功获得鸡 SANFH 模型。曲春涛^[29]采用液氮冷冻并射频加热交替法损伤股骨头建立鹌鹑股骨头塌陷模型。但禽类动物与人类亲缘性较远,生理生化方面与哺乳动物有较大的差别。

2.2 四足类动物

四足类动物与人类具有相似的生理生化及基因,常用的四足类动物有大鼠和兔,其次还有犬、绵羊等动物。为了避免物理或化学刺激后产生的疼痛,四足类动物常出现减少患肢负重的保护性行为,减少了生物力学效应在 ONFH 过程中的作用。针对这一问题 Mihara 等^[30]通过强迫四肢动物站立,增加造模成功率。有研究者^[31]在其它条件相同的前提下,仅通过调整饲料高度迫使实验组动物站立取食,并予跑步机跑步 2 h/d 增加运动,结果表明实验组造模成功率提高约 15%。

犬因体型较大,常用于建立创伤性 ONFH 模型。巩建宝等^[32]、谢志涛等^[33]分别使用液氮冷冻法和内毒素联合甲强龙成功建立犬 ONFH 模型。羊长骨内脂肪丰富,适合建立减压性 ONFH 模型,但犬和羊价格昂贵,场地要求高,饲养不便利,不经常用于实验研究。相比于犬和羊,大鼠、兔没有上述顾虑,大鼠寿命较短,可以用于早期 ONFH 模型建立,但不利于晚期塌陷模型的建立。兔体型适中,饲养便利,寿命较长,是良好的动物模型的选择对象。

3 造模成功的标准

验证动物模型是否制备成功,是实验顺利进行

的关键步骤。常用的验证方法有影像学评估、病理学验证、实验室检查以及形态学观察等。

3.1 影像学评估

影像学评估是最简便的方法,国际骨循环学会 (Association Research Circulation Osseous, ARCO) 对股骨头坏死的分期:0 期和 I 期 ONFH 动物行髋关节正位 X 线和普通 CT 结果无异常表现,对此赵振广等^[7]研究者已做过相关验证。股骨头 X 线表现为斑片状阴影,硬化及囊肿形成,但股骨头无塌陷,为 II 期;表现为骨性关节面的下方出现新月形透明带,即“新月征”,则为 III 期;表现为股骨头塌陷,关节间隙变窄,囊性变等,为 IV 期。普通 CT 可较 X 线早发现 II 期股骨头坏死。Micro-CT 能检测骨小梁骨微结构的定量指标^[34],能发现 I 期 ONFH 骨小梁变细、变薄甚至断裂,但 Micro-CT 不能显示软组织及股骨头内骨髓、脂肪变化,不能发现 0 期股骨头内骨髓及脂肪变化,且检查费用昂贵不常使用。MRI 可将股骨头外形、关节间隙、关节积液、股骨头内信号均匀程度、骨髓是否水肿以及骨坏死信号等均能显现。T1 WI 上表现为点状、细线状、片状低信号强度,T2 WI 上表现为点状、细线状、片状高信号强,脂肪抑制序列呈现高信号示骨髓水肿,为 0 期 ONFH,张林波等^[35]做过相关验证。还有学者采用血管造影的方法观察股骨头内毛细血管情况,发现造模后股骨头内毛细血管明显减少并迂曲,但无法显示微小动脉状况,且无法判断股骨头坏死处于那一期,使用较少。

3.2 病理学检查

病理学检查是验证造模成功的金标准,动物处死后取股骨头制作病理切片,观察到空骨陷窝数量增加,骨细胞中脂滴充满,细胞核被挤向边缘,骨髓造血组织减少,脂肪细胞堆积骨小梁稀疏、变细变薄,甚至断裂,骨细胞核固缩溶解、消失,成骨细胞消失,脂肪组织和增大的脂肪细胞占据骨髓区,按 ARCO 标准,为 0 期股骨头坏死。李传将等^[36]、陈达等^[37]、李磊等^[38]经实验进行相关验证。虽然病理学检查标本能检测出超早期股骨头坏死,但需处死动物后才能得到切片,若需后续在体实验,将无法逐一进行验证,动物因个体差异将存在实验误差。

3.3 实验室检查及形态学观察

实验室检查发现血液中血清胆固醇和甘油三酯均升高,股骨头内血流动力学测定减慢。但无法

确定股骨头坏死处于那一期。此外动物造模过程中和完成后常出现毛发、饮食、步态以及消瘦状况等形态学改变,动物注射药物后出现精神萎靡、皮毛欠光滑、大便稀、饮食减少、跛行、活动减少等症状,部分实验动物还出现溃疡、脱毛等症状^[39]。

总的来说,早期 SANFH 造模成功主要依靠 MRI 及病理学的验证。

4 展望

人和动物存在较大的差异,动物模型的制备过程应尽可能的模拟与人类发病相似的自然病程和病理过程,但没有一种理想的动物及造模方法可以完全复制。动物模型的制备周期、制模成功率、制模成本均对实验有较大的影响。综上所述,不同的动物在不同的模型建立上有各自的优势,但没有一个完美的动物能建立与人类疾病发生极度相似的模型,根据自己不同的研究目的研究者应选择不同的动物模型及制模方案。综上所述,SANFH 制模方案选择异体血清联合激素或者小剂量、高频率脂多糖联合激素,并给予强迫站立体位,加强运动来可增加制模成功率,给予药物的同时给予胃黏膜保护药物以降低动物死亡率。建立良好的 SANFH 模型是研究 SANFH 的关键,相信随着研究不断地深入,研究方法不断地改进,更好的动物模型将会建立,用以 SANFH 的预防和治疗研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 邓振军,郑志永,徐谦,等. 激素性股骨头坏死发病机制的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(86): 57-58. Deng ZJ, Zheng ZY, Xu Q, et al. Research progress in the pathogenesis of steroid-induced femoral head necrosis [J]. World Latest Med Inform, 2018, 18(86): 57-58.
- [2] 赵海燕,夏亚一,康鹏德. 股骨头坏死病因与发病机制研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(8): 604-607. Zhao HY, Xia YY, Kang DP. Etiology and pathogenesis of osteonecrosis of the femoral head [J]. Orthop J Chin, 2009, 17(8): 604-607.
- [3] 刘文刚. CYP3A 酶在激素性股骨头坏死发病中的作用及健骨方对其影响的实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011. Liu WG. Experimental study on the relationship between activity of hepatic CYP3A and steroid-induced femoral head osteonecrosis and effect of the jiangufang to the hepatic CYP3A activity in a rabbit model [D]. Gangzhou: Gangzhou University of Chinese Medicine, 2011.
- [4] 吴兴净,张永涛,郭雄,等. miR-125a-3p 和 miR-17-5p 在激素性股骨头坏死中的作用 [J]. 西安交通大学学报(医学

- 版), 2015, 36(2): 210-214.
- Wu JX, Zhang YT, Guo X, et al. Effects of miR-125a-3P and miR-17-5p on steroid-induced osteonecrosis [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci), 2015, 36(2): 210-214.
- [5] 陈雁飞, 吴吉荣. 糖皮质激素致股骨头坏死的病理生理机制研究进展 [J]. 解放军药学报, 2017, 33(6): 566-569, 587.
- Chen YY, Wu JR. Advances in pathophysiological mechanisms of glucocorticoid-induced femoral head necrosis [J]. Pharmaceut J Chin People's Liberation Army, 2017, 33(6): 566-569, 587.
- [6] 范武, 于雪峰, 任向楠, 等. 中药骨蚀灵胶囊对早期兔激素性股骨头坏死的干预作用 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(13): 2141-2145.
- Fan W, Yu XF, Ren XN, et al. Intervention research on Chinese medicine Gujingling capsule in treating steroid-associated necrosis of the femoral head in rabbits [J]. J Pract Med, 2018, 34(13): 2141-2145.
- [7] 赵振广, 潘树义, 李航. 大鼠激素性股骨头坏死的 2 种造模方法比较 [J]. 中国药业, 2015, 24(20): 16-18.
- Zhao ZG, Pan SY, Li H. Comparison of 2 rat modelling methods of glucocorticoid-induced avascular necrosis [J]. Chin Pharmaceut, 2015, 24(20): 16-18.
- [8] Kuribayashi M, Fujioka M, Takahashi KA, et al. Vitamin E prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits [J]. Acta Orthop, 2010, 81(1): 154-160.
- [9] 王荣田, 林诗富, 万蓉, 等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡血脂、血黏度、凝血及纤溶功能的影响 [J]. 中医正骨, 2013, 25(3): 21-30.
- Wang TR, Lin SF, Wang R, et al. Effects of different therapeutic methods and prescriptions on blood fat, blood viscosity, blood coagulation and fibrinolysis of chickens with steroid-induced necrosis of femoral head [J]. J Tradit Chin Orthope Traumatol, 2013, 25(3): 21-30.
- [10] 李兴国, 赵道洲, 张磊. 三种激素性股骨头坏死造模影像病理学比较研究 [J]. 西部中医药, 2018, 31(11): 123-127.
- Li XG, Zhao DZ, Zhang L. Comparative study on imaging pathological changes of femoral head necrosis models prepared by three methods [J]. Western J Tradit Chin Med, 2018, 31(11): 123-127.
- [11] Motomura G, Yamamoto T, Irisa T, et al. Dose effects of corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits [J]. J Rheumatol, 2008, 35(12): 2395-2399.
- [12] Matsui M, Saito S, Ohzono K, et al. Experimental steroid-induced osteonecrosis in adult rabbits with hypersensitivity vasculitis [J]. Clin Orthop Relat Res, 1992, 27(7): 61-72.
- [13] 周正新, 李文华, 朱磊, 等. 中药骨痹通消颗粒干预激素性股骨头坏死模型兔的细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(20): 3190-3194.
- Zhou ZX, Li WH, Zhu L, et al. Gubi Tongxiao Granule effects on the cell apoptosis in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2018, 22(20): 3190-3194.
- [14] 佟鹏, 王洋, 梁瀛. 激素性股骨头缺血性坏死动物模型的建立及综合评估 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(32): 5169-5174.
- Tong P, Wang Y, Liang Y. Establishment and comprehensive evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2018, 22(32): 5169-5174.
- [15] Wen Q, Jin D, Zhou CY, et al. HGF-transgenic MSCs can improve the effects of tissue self-repair in a rabbit model of traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37503.
- [16] Yuan L, Liu S, Bai X, et al. Oxytocin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells and attenuates microglial activation in lipopolysaccharide-treated mice [J]. J Neuroinflamm, 2016, 13(1): 77.
- [17] 李瑞琦, 张国平, 李宜炯, 等. 提高激素性股骨头坏死模型成活率的方法 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8729-8734.
- Li RQ, Zhang GP, Li YJ, et al. A method for elevating survival rate of models of steroid-induced necrosis of femoral head [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2013, 17(50): 8729-8734.
- [18] 阮康明. 激素法与液氮冷冻法建立犬股骨头坏死造模中的应用比较研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
- Ruan KM. The comparative application of hormonal method and liquid nitrogen method in modeling of femoral head necrosis in dogs [D]. Fuzhou: Fujian University of Medicine, 2014.
- [19] Zheng LZ, Liu Z, Lei M, et al. Steroid-associated hip joint collapse in bipedal emus [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76797.
- [20] 于鹏, 纪志华, 贾丙申, 等. 髓芯减压联合富血小板血浆对兔激素性股骨头坏死的疗效及对金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制剂系统的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 53-58.
- Yu P, Ji ZH, Jia BS, et al. Effect of platelet rich plasma combined with core decompression on the repair of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head and the MMP/TIMP in rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 53-58.
- [21] 王泳, 高春锦, 杨晋才, 等. 兔激素性股骨头坏死模型的建立 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(11): 2233-2234, 2239.
- Wang Y, Gao JH, Yang JC, et al. Establishment of animal model of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rabbits [J]. Chin J Pathophysiol, 2009, 25(11): 2233-2234, 2239.
- [22] Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction [J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, 3(16): 235-243.
- [23] 肖春生, 林娜, 林诗富, 等. 不同糖皮质激素诱导鸡股骨头坏死的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2010, 23(3): 184-187.
- Xiao CS, Lin N, Lin SF, et al. Experimental study on avascular necrosis of femoral head in chickens induced by different glucocorticoides [J]. Chin J Orthop Traumatol, 2010, 23(3): 184-187.

- [24] Aruwajoye OO, Patel MK, Allen MR, et al. Microcrack density and nanomechanical properties in the subchondral region of the immature piglet femoral head following ischemic osteonecrosis [J]. Bone, 2013, 5(22): 632-639.
- [25] 蒋鲁勇, 庞清江. 股骨头坏死动物模型的研究进展 [J]. 现代实用医学, 2015, 27(10): 1394-1396.
- Jiang LY, Pang QJ. Research progress in animal model of femoral head necrosis [J]. Mod Practic Med, 2015, 27(10): 1394-1396.
- [26] 张成龙, 尹华, 章建华. 股骨头坏死动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 58-62.
- Zhang CL, Yi H, Zhang JH. Advances in research on animal models of osteonecrosis of femoral head [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(3): 58-62.
- [27] 万蓉, 李莉, 孔祥英, 等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡股骨头 OPG、RANKL mRNA 表达的影响 [J]. 实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 149-153.
- Wang R, Li L, Kong XY, et al. Effects of different prescriptions on the expression of OPG, RANKL and mRNA in femoral head of steroid-induced femoral head necrosis [J]. Chin J Expe Tradit Med Formulae, 2011, 17(8): 149-153.
- [28] 孔祥英, 万蓉, 李莉, 等. 不同治法方药对激素性股骨头坏死鸡成骨相关因子的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 614-617.
- Kong XY, Wan R, Li L, et al. Effect of different treating principles and formulas on expression of osteogenic factors in steroid-induced osteonecrosis of femoral head of chicken [J]. Chin J Chin Mater Med, 2011, 36(5): 614-617.
- [29] 曲春涛. 构建双足类大型鸟类鸸鹋股骨头坏死模型 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(5): 611-615.
- Qu CT. Establishing a large double-foot bird emu model of femoral head necrosis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2016, 20(5): 611-615.
- [30] Mihara K, Hirano TJ. Standing is a causative factor in osteonecrosis of the femoral head in growing rats [J]. J Pediatr Orthop, 1998, 18(5): 665-669.
- [31] 王继涛, 阮红峰, 付方达, 等. 改良型激素性股骨头坏死小鼠模型的建立与评价 [J]. 中国中医急诊, 2017, 26(9): 1525-1528.
- Wang JT, Ruan HF, Fu FD, et al. Establishment and evaluation of a modified mouse model of steroid induced osteonecrosis of the femoral head [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2017, 26(9): 1525-1528.
- [32] 巩建宝. MRI 引导下氩氦刀靶向冷冻系统建立犬股骨头坏死模型的新方法相关研究 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- Gong JB. MRI-guided argon-helium cryoablation targeting cryosystem to establish a new method for canine femoral head necrosis model [D]. Jinan: Shandong University, 2014.
- [33] 谢志涛, 赵德伟, 江磊, 等. 甲强龙联合内毒素诱导犬股骨头坏死的实验研究 [J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2014, 29(6): 570-571.
- Xie ZT, Zhao DW, Jiang L, et al. Experimental study of avascular necrosis of femoral head of dogs induced by methylprednisolone and endotoxin [J]. Chin J Bone Joint Inj, 2014, 29(6): 570-571.
- [34] Nadia ME, Mohd FK, Ahmad NS. Micro-CT assessments of potential anti-osteoporotic agents [J]. Curr Drug Targets, 2013, 14(13): 1542-1551.
- [35] 张林波, 张桂珍, 杨海山, 等. 激素性股骨头坏死动物模型的建立及影像学评价 [J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 331-334.
- Zahng LB, Zhang GZ, Yang HS, et al. Establish of animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head and evaluate by radiological methods [J]. Chin J Vet Sci, 2009, 29(3): 331-334.
- [36] 李传将, 王万明, 庄颜峰, 等. 改良激素性股骨头坏死动物模型的建立与评价 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4393-4397.
- Li CJ, Wang WM, Zhu YF, et al. Establishment and evaluation of a modified animal model of steroid-induced avascular necrosis of femoral head [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2010, 14(24): 4393-4397.
- [37] 陈达, 陈晓波, 白显昉, 等. 通络生骨胶囊促进兔激素性股骨头坏死修复的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 351-356.
- Chen D, Chen XB, Bai YY, et al. Mechanism of Tongluo Shenggu Capsule on glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral head in rabbits [J]. Chin J New Drugs Clin Pharm, 2016, 27(3): 351-356.
- [38] 李磊, 郑怀亮, 寇玉, 等. 髓芯减压联合骨髓间充质干细胞治疗早期股骨头坏死的病理学变化 [J]. 重庆医学, 2018, 47(27): 3490-3493.
- Li L, Zhen HL, Kou Y, et al. Pathologic change of core decompression combined with implantation of bone mesenchymal stem cells in treating early femoral head necrosis [J]. Chongqing Med J, 2018, 47(27): 3490-3493.
- [39] 张立岩, 孙新, 田丹, 等. 兔早期激素性股骨头缺血性坏死模型建立及其 MRI 与病理特征研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(10): 1240-1243.
- Zhang LY, Sun X, Tian D, et al. Model establishment, MRI and pathological features of early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit [J]. Chin J Reparat Reconstr Surg, 2015, 29(10): 1240-1243.

[收稿日期] 2019-03-31

刘伟,胡鹏,冯波. 血管性痴呆大鼠模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 805-809.
Liu W, Hu P, Feng B. Research progress of rat models of vascular dementia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 805-809.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.018

血管性痴呆大鼠模型的研究进展

刘伟^{1#}, 胡鹏^{2#}, 冯波^{1*}

(1. 滨州医学院附属医院神经内科, 滨州 256603; 2. 滨州医学院附属医院脊柱外科, 滨州 256603)

【摘要】 动物模型可模拟人类血管性痴呆的发病机制、病理改变及临床症状, 为血管性痴呆的预防、诊断及治疗提供新思路, 这对于血管性痴呆的研究具有重要意义。本文拟就血管性痴呆大鼠模型的制作方法进行浅析, 为实验者选择动物模型提供参考及借鉴。

【关键词】 痴呆, 血管性; 模型, 动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0805-05

Research progress of rat models of vascular dementia

LIU Wei^{1#}, HU Peng^{2#}, FENG Bo^{1*}

(1. Department of Neurology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China.
2. Department of Spinal Surgery, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603)
Corresponding author: FENG Bo. E-mail: fpp-99@163.com

【Abstract】 Animal models can simulate the pathogenesis, pathological changes and clinical symptoms of vascular dementia seen in humans, and provide new ideas for the prevention, diagnosis and treatment of vascular dementia, therefore, important for research of vascular dementia. This paper reviews the rat modeling method for vascular dementia, and provides references for researchers regarding selection of animal models.

【Keywords】 dementia; vascular; models; animal

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

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 是由于脑血管病危险因素或脑血管病变引起的认知功能损害^[1]。血管性痴呆的病理改变可能与脑血流量不足导致的脑血管屏障受损、神经炎性反应、神经元损伤及弥漫性白质改变包括髓鞘丢失、轴突异常等有关^[2-3]。VaD 目前已成为导致痴呆的第二大病因, 仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[2]。VaD 可以得到有效的预防, 延缓痴呆的进展过程。因此积极防治 VaD 以及研究有效药物显得尤为重要, 诸多实验者将设计理想的动物模型视为研究 VaD 治疗的第一步。本文将对 VaD 大鼠模型制作方法进行阐述。

1 实验动物的选择及注意事项

动物模型的选择应该尽量满足以下几个条件: 1. 实验动物脑血管解剖特点与人类相似; 2. 实验动物易获得、易饲养管理; 3. 制作模型简单, 存活率高, 易观察实验指标; 4. 实验动物及造模过程符合伦理道德规范。相对于家兔、猫、狗、非人灵长类等动物, 啮齿类动物在综合条件下更符合大多数实验者的选择^[4]。其中大鼠体积大, 血管较粗, 易于操作, 因此 VaD 动物模型以大鼠最为常见, 实验时一般选

【基金项目】 山东省医药卫生科技计划 (2015WS0482, 2017WS752)。
Funded by Shandong Medicine and Health Science Technology Project (2015WS0482, 2017WS752).

【作者简介】 刘伟 (1994—), 女, 研究生, 研究方向: 神经病学。Email: 18853968718@sina.cn;
胡鹏 (1979—) 男, 博士, 副教授, 研究方向: 腰椎退行性疾病。Email: qyhupeng@163.com。
共同第一作者

【通信作者】 冯波 (1981—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 神经病学。Email: fpp-99@163.com

择成年、体重为 (250 ± 20) g 的 SPF 级 SD 雄性大鼠或 Wistar 雄性大鼠。

在整个实验过程中应该保持实验环境舒适且相对恒定。一般环境温度设为 $(21\sim 25)$ ℃左右,湿度为 50%–70%,且提供足够的食物和水供大鼠自由获取,光照时间一般为 12 h/d^[5–7]。麻醉大鼠时可以选择腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg)^[6],也有实验选择使大鼠吸入 4% 异氟烷预麻醉后使用 2% 异氟烷维持麻醉状态^[7]等。术后为防止大鼠发生感染影响实验结果甚至死亡,在缝合切口后可应用青霉素、庆大霉素等抗生素^[8–9]。

2 动物模型制备方法

2.1 血管外阻断法

血管外阻断法通过闭塞颅内大动脉或脑缺血再灌注导致脑血流量显著减少从而引起颅内局部血流动力学改变,发生大脑白质受损、神经炎症反应及大脑皮层及海马区神经元受损或死亡,进而出现认知功能缺陷^[6–7]。此外,脑缺血再灌注会产生羟自由基,明显地增加了大鼠大脑皮质和海马内丙二醛的含量,丙二醛通过影响 DNA 的复制、转录及传递影响蛋白质的合成及功能,最终导致脑组织结构及功能紊乱^[10]。

2.1.1 永久性结扎双侧颈总动脉

大鼠于实验前 12 h 开始禁食,不禁水。麻醉后将大鼠固定于实验台上,消毒后沿颈正中线切开皮肤约 4~5 cm,暴露并分离出双侧颈总动脉,此时需注意避免损伤迷走神经,永久性结扎双侧颈总动脉。若有对照组,则对照组大鼠只分离双侧颈总动脉而不结扎,术后缝合皮肤、消毒并应用抗生素^[5,11–15]。有研究将此法改良为分次进行的永久性结扎双侧颈总动脉,即先结扎一侧颈总动脉,3~7 d 后再行结扎对侧颈总动脉^[7,16]。由于大鼠侧支循环具有个体差异性,因此结扎颈总动脉后所造成的卒中严重程度不同,脑血流量严重不足时可导致大鼠死亡。改良后的手术方法结扎一侧颈总动脉后通过大脑侧支循环逐步代偿后再行结扎对侧颈总动脉,不至于使脑血流量骤然减少导致大鼠死亡。该方法提高了大鼠存活率,但目前应用较少,还需重复验证该方法的稳定性及可靠性。

2.1.2 双血管阻断法

双血管阻断法^[17–20]与永久性结扎双侧颈总动脉法相似,但其分离出双侧颈总动脉后不直接结

扎,而是使用血管夹夹闭颈总动脉 10 min 后松开,等待 10 min 后再次夹闭,重复 2~3 次后缝合皮肤、消毒并应用抗生素。也有实验^[20]是将其夹闭 20 min 后再松开血管夹,待血管放松 10 min 后再次夹闭。目前尚无统一标准规定夹闭、放松时间及重复次数,还需进一步研究夹闭和放松时间及重复次数对实验结果的影响。

2.1.3 四血管阻断法

四血管阻断法^[21–23]与双血管阻断法不同之处在于先将椎动脉永久性闭塞,即大鼠麻醉后以俯卧位固定于实验台,沿背部正中中线切开皮肤后,充分暴露双侧第 1 颈椎横突翼小孔,用电凝针烧灼翼小孔内的椎动脉,缝合皮肤并消毒。而后再从前正中中线切开皮肤,分离出双侧颈总动脉进行夹闭、松开数次,最后缝合皮肤、消毒并应用抗生素。夹闭及松开时间、重复次数尚无统一标准。该方法需要做两个切口,操作步骤复杂、感染风险大,实验动物耐受性差。

2.2 血管内栓塞法

血管内栓塞法一般可用血凝块、胆固醇晶体、微球^[24]、石蜡等作为栓子。小栓子进入颅内后造成多发性脑梗死灶,且多位于于大脑中动脉供血区,造成相应部位的脑组织缺血,从而出现认知功能障碍。值得注意的是线栓法有所不同,其原理同血管外阻断法相似,通过阻断大脑中动脉使脑血流量持续降低,引起神经元损伤,形成血管性痴呆动物模型。

2.2.1 线栓法

该方法最初由 Longa 提出,即将尼龙线一端烫成光滑的球面作为线栓,将麻醉后的大鼠固定于试验台上,消毒后沿颈正中线做切口,暴露并分离出颈总动脉、颈外动脉、及颈内动脉,结扎颈外动脉后,可沿颈总动脉插入栓线进入颈内动脉,也可于分叉处直接将栓线插入颈内动脉,留置一段时间后将栓线取出,达到脑缺血再灌注的效果^[25–27]。留置时间过短有可能达不到脑缺血效果,大鼠可能无明显神经系统受损症状因而不能纳入研究,而时间过长又会导致大鼠颅内严重缺血甚至死亡,国内大部分实验者选择留置 2 h^[28]。有研究将此法改良为结扎颈总动脉近心端、颈外动脉根部后,用血管夹暂时夹闭颈内动脉根部,于颈总动脉剪一小口,将线栓沿颈总动脉插入颈内动脉,至血管夹处快速松开血管夹使线栓进入颈内动脉,进入颈内动脉约 18~

25 mm 后感到稍有阻力时于颈内动脉根部牢牢固定线栓,消毒并缝合手术切口^[29]。研究表明,实验环境及围手术期护理相同的情况下,改良后的线栓法成功率明显高于 Longa 的方法,且手术操作更加简单,动物模型更加稳定^[30]。

线栓法具有无需开颅、术后动物生命体征稳定等优点,是目前认可度较高的一个血管性痴呆模型。但仍然存在一些问题,比如线栓进入的部位对实验的影响、估量线栓进入的长度、线栓停留的时间等,值得我们不断探讨与改进。

2.2.2 血凝块

在大鼠身上取血后经无菌干燥后形成血凝块,加入生理盐水制成混悬液。大鼠麻醉后暴露颈总动脉及颈外动脉,结扎颈外动脉后将混悬液注入颈总动脉,小栓子沿颈总动脉、颈内动脉进入颅内,形成多发性脑梗死动物模型^[31-32]。有研究将大鼠自身静脉血 0.6 mL 与 200 U/mL 凝血酶 0.15 mL 混合,放入 PE50 管静置 4 h 形成血凝块,再将血凝块切成小血栓放入 PE50 管中备用。暴露颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉及其他小动脉后,将颈外动脉及其他小动脉永久性结扎,将颈总动脉及颈内动脉暂时夹闭,把含有小栓子的 PE50 管插入颈总动脉分叉处,打开血管夹向动脉内输注小栓子,造成颅内多发梗死灶^[33]。

2.2.3 胆固醇晶体

此法与血凝块法相似,使用过滤器过滤出大小为 70~100 μm 的胆固醇晶体并用生理盐水稀释,每只大鼠使用 300 μL 的生理盐水稀释 500 $\pm$ 100 个胆固醇晶体。麻醉大鼠后沿颈正中中线做切口,暴露并分离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,结扎颈外动脉并用血管夹夹闭颈总动脉及颈内动脉,将 1 mL 注射器连接至 PE50 管上,插入颈总动脉分叉处,在 1 min 内缓慢向血管内注射晶体并移除血管夹,从而形成多发性脑梗死动物模型^[34-35]。

2.3 高危因素导致的 VaD

2.3.1 高血压^[36-37]

自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 是 Wistar 大鼠通过选择性交配培育出的一种大鼠,其高血压发生率高,具有脑卒中倾向。在自发性高血压大鼠发生脑卒中后,对存活的大鼠进行认知功能评估筛选出符合实验条件的动物模型^[36-37]。自发性高血压大鼠通过引起小血管内皮损伤导致白质及髓鞘损伤、神经炎性反应及神经元损伤等形成高血压脑卒中模型^[36]。但由于高血压

所造成的卒中部位及严重程度不确定,且此大鼠模型费用较高,实验周期长,该实验模型应用较少。

2.3.2 糖尿病

给予大鼠高糖饮食 4 周,禁食 12 h 后测量体重及空腹血糖。将链脲佐菌素 (50 mg/kg) 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液中,在避光条件下给予大鼠一次性腹腔注射,48 h 后测量大鼠血糖,若空腹血糖 > 11.1 mmol/L 则表示糖尿病大鼠造模成功,再通过认知功能评估筛选出有认知功能障碍的大鼠模型^[36,38-39]。已有研究表明长期高血糖状态会加速动脉粥样硬化进程,导致小血管闭塞,最终引起脑卒中。此外,糖尿病大鼠认知功能缺陷可能与海马区小胶质细胞活化、树突状细胞密度降低及氧化应激等有关^[36]。

2.4 认知功能评估

通过血管外阻断法、血管内阻断法或其他实验方法造模后需要通过行为学实验进行认知功能评估,以确保造模成功。评估大鼠认知功能常用的方法有迷宫实验、新物体识别、条件性恐惧实验以及主动回避任务及被动回避任务等^[40]。其中以 Morris 水迷宫应用最为广泛,需要进行手术的一般在术后 6~8 周开始进行认知功能评估实验^[8,11-13]。

2.4.1 Morris 水迷宫实验

准备一个直径为 160 cm,高度为 50 cm 的圆形水池,水温维持在 24~26℃,水池上方固定一个连接到电脑程序的摄像头,将水池分为四个象限,在目标象限中心放置一个直径为 10 cm 的可移动平台,距离水面约 2 cm,可在水中加入墨汁或牛奶更好地隐匿平台。在 5 d 的训练实验中,让大鼠面向水池壁后从不同象限将其放入水池中,使大鼠在规定时间内寻找平台,规定时间可为 60 s、90 s 或 120 s 不等,大鼠到达平台后使其停留 10 s 并记录逃避潜伏期,若规定时间内大鼠未能寻找到平台则引导其到平台上停留 10 s,逃避潜伏期记录为规定的时间。每天进行 2~3 次,每次间隔 10 min。第 6 天时,移除平台,使大鼠自由游泳并记录其穿过平台的次数及停留时间,作为评估大鼠记忆能力的指标。在实验过程中水池及平台大小可以因实验室条件不同而做一定的调整。

2.4.2 新物体识别实验

新物体识别实验^[40-41]将大鼠置于一个固定大小的场地中,在没有任何物体的情况下让大鼠熟悉环境 5 min。次日将两个相同的物体放在场地两个相对的角落中,记录 10 min 内大鼠探索两个物体的时间。利用大鼠喜爱探索新事物的天性,在第 3 天

将其中一个物体换成一个不同的新物体,记录 10 min 内大鼠探索旧物体和新物体的时间,作为评估大鼠记忆能力的指标。每次实验前用 70% 的酒精清洗物体和场地。

2.4.3 被动回避任务

被动回避任务^[40, 42]需准备一个由大小相同的暗室和光室组成的回避装置,两室间有可滑动的隔板间隔。利用大鼠偏爱黑暗环境的天性,将大鼠放置在光室内,移开隔板,记录大鼠进入暗室的潜伏期。当大鼠四只爪子完全进入暗室时关闭隔板并给予大鼠足部 0.5 mA 电击 10 s,电击结束后立即将大鼠从装置中取出,放回笼子中。第二天,再次将大鼠放置在光室中,移开隔板,记录大鼠进入暗室的潜伏期,作为评估大鼠记忆能力的指标,若 300 s 后大鼠仍未进入暗室,则实验结束,潜伏期记为 300 s。

3 展望

现应用较多的血管性痴呆大鼠模型为永久性双侧颈总动脉阻断法、双血管阻断法、线栓法,其均是通过阻断颅内大动脉造成脑血流量减少,引起认知功能障碍,但在操作过程中实验动物容易失血过多而死亡,这对实验者的操作技术提出了更高的要求。造模后可应用磁共振明确实验动物卒中部位及责任血管^[7],或使用多普勒检测仪在术前、术中、术后监测脑血流量,同时通过 Morris 水迷宫等行为学实验评估认知功能障碍程度,确保动物模型符合实验条件^[10, 43]。

总之,建立一种生理指标稳定、模型重复性好、简单易操作的血管性痴呆动物模型有助于我们对血管性痴呆的发病机制、病理改变及临床症状的认识。

参 考 文 献(References)

- [1] Singh V, Dhamoon MS, Allaid S. Stroke risk and vascular dementia in South Asians [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2018, 20(9): 43.
- [2] Wang F, Cao Y, Ma L, et al. Dysfunction of cerebrovascular endothelial cells: prelude to vascular dementia [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10(1): 376.
- [3] Kalaria RN. The pathology and pathophysiology of vascular dementia [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134 (Pt B): 226–239.
- [4] 刘盼功, 杜洋, 赵晓峰等. 脑缺血动物模型动物选择研究 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(09): 2372–2373.
Liu PG, Du Y, Zhao XF, et al. Animal model selection in cerebral ischemia [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2010, 21(09): 2372–2373.
- [5] Zhu JD, Wang JJ, Zhang XH, et al. Panax ginseng extract attenuates neuronal injury and cognitive deficits in rats with vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(4): 664–672.
- [6] Qin Y, Ji M, Deng T, et al. Functional and morphologic study of retinal hypoperfusion injury induced by bilateral common carotid artery occlusion in rats [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 80.
- [7] Rots ML, de Borst GJ, van der Toorn A, et al. Effect of bilateral carotid occlusion on cerebral hemodynamics and perivascular innervation: An experimental rat model [J]. *J Comp Neurol*, 2019, 527: 2263–2272.
- [8] Guo LL, Wang DS, Xu YY. Effects of IL-1 β on hippocampus cell apoptosis and learning ability of vascular dementia rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(18): 6042–6048.
- [9] Huang K, Shen L, Niu T, et al. Naomaitai ameliorated brain damage in rats with vascular dementia by PI3K/PDK1/AKT signaling pathway [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2019; 2019: 2702068.
- [10] 孟敏, 李林. 双侧颈总动脉结扎致血管性痴呆大鼠模型研究进展 [J]. *中国康复理论与实践*, 2018, 24(3): 309–312.
Meng M, Li L. Progress in vascular dementia rat model induced by bilateral common carotid artery ligation [J]. *Chin J Rehabil Theory Pract*, 2018, 24(3): 309–312.
- [11] Li H, Liu Y, Lin LT, et al. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats [J]. *Neurochem Int*, 2016, 92: 35–42.
- [12] Liu DD, Yuan X, Chu SF, et al. CZ-7, a new derivative of Claulansine F, ameliorates 2VO-induced vascular dementia in rats through a Nrf2-mediated antioxidant responses [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(4): 425–440.
- [13] Jiang X, Niu X, Guo Q, et al. FoxO1-mediated autophagy plays an important role in the neuroprotective effects of hydrogen in a rat model of vascular dementia [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356: 98–106.
- [14] Park JM, Kim YJ, Song MK, et al. Genomewide DNA methylation profiling in a rat model with vascular dementia [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 123–130.
- [15] Wang DP, Yin H, Kang K, et al. The potential protective effects of cannabinoid receptor agonist WIN55, 212-2 on cognitive dysfunction is associated with the suppression of autophagy and inflammation in an experimental model of vascular dementia [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 267: 281–288.
- [16] 黄文革, 郭芬芬, 刘慰华, 等. 血管性痴呆动物模型制作方法的改良 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(5): 49–52+84.
Huang WG, Guo FF, Liu WH, et al. Improvement of vascular dementia model in rats [J]. *Chin J Comp Med*, 2011, 21(5): 49–52+84.
- [17] Fan M, Jin W, Zhao H, et al. Lithium chloride administration prevents spatial learning and memory impairment in repeated cerebral ischemia-reperfusion mice by depressing apoptosis and increasing BDNF expression in hippocampus [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 291: 399–406.

- [18] Impellizzeri D, Siracusa R, Cordaro M, et al. N-Palmitoylethanolamine-oxazoline (PEA-OXA): A new therapeutic strategy to reduce neuroinflammation, oxidative stress associated to vascular dementia in an experimental model of repeated bilateral common carotid arteries occlusion [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 125: 77–91.
- [19] Tiwari N, Bhatia P, Kumar A, et al. Potential of carnosine, a histamine precursor in rat model of bilateral common carotid artery occlusion-induced vascular dementia [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2018, 32(5): 516–531.
- [20] Xue Y, Qu ZZ, Fu J, et al. The protective effect of astaxanthin on learning and memory deficits and oxidative stress in a mouse model of repeated cerebral ischemia/ reperfusion [J]. *Brain Res Bull*, 2017, 131: 221–228.
- [21] Cho CH, Byun HR, Jover-Mengual T, et al. Gadd45b acts as neuroprotective effector in global ischemia-induced neuronal death [J]. *Int Neurol J*, 2019, 23 (Suppl 1): S11–21.
- [22] Kamisli S, Basaran C, Batcioglu K, et al. Neuroprotective effects of the new Na channel blocker rs100642 in global ischemic brain injury [J]. *Arch Med Sci: AMS*, 2019, 15(2): 467–474.
- [23] Nogami-Hara A, Nagao M, Takasaki K, et al. The Japanese Angelica acutiloba root and yokukansan increase hippocampal acetylcholine level, prevent apoptosis and improve memory in a rat model of repeated cerebral ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 214: 190–196.
- [24] Takagi K. The model of stroke induced by microsphere embolism in rats [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacol Jpn*, 2003, 121(6): 440–446.
- [25] Fang Y. Electroacupuncture at the Wangu acupoint suppresses expression of inflammatory cytokines in the hippocampus of rats with vascular dementia [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13(5): 17–24.
- [26] Xu H, Hua Y, Zhong J, et al. Resveratrol delivery by albumin nanoparticles improved neurological function and neuronal damage in transient middle cerebral artery occlusion rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1403.
- [27] Lopez MS. Modeling transient focal ischemic stroke in rodents by intraluminal filament method of middle cerebral artery occlusion [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1717: 101–113.
- [28] 袁洪霞, 朱世杰, 石国凤等. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型制备研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(5): 677–678.
Yuan HX, Zhu SJ, Shi GF, et al. Progress in the preparation of focal cerebral ischemia model in rats by suture method [J]. *Mod Med Health*, 2019, 35(5): 677–678.
- [29] Martha SR, Collier LA, Davis SM, et al. Early acid/base and electrolyte changes in permanent middle cerebral artery occlusion: Aged male and female rats [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(1): 179–190.
- [30] 杨赞章, 陈虹. 线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型的改进与体会 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(9): 2189–2190.
Yang ZZ, Chen H. Improvement and experience in suture methods for rat model of focal cerebral ischemia [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, 19(9): 2189–2190.
- [31] Li QQ, Shi GX, Yang JW, et al. Hippocampal cAMP/PKA/CREB is required for neuroprotective effect of acupuncture [J]. *Physiol Behav*, 2015, 139: 482–490.
- [32] Liu CZ, Li ZG, Wang DJ, et al. Effect of acupuncture on hippocampal Ref-1 expression in cerebral multi-infarction rats [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(3): 305–312.
- [33] Si Z, Liu J, Hu K, et al. Effects of thrombolysis within 6 hours on acute cerebral infarction in an improved rat embolic middle cerebral artery occlusion model for ischaemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2468–2474.
- [34] Venkat P, Chopp M, Zacharek A, et al. White matter damage and glymphatic dysfunction in a model of vascular dementia in rats with no prior vascular pathologies [J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 50: 96–106.
- [35] Venkat P, Chopp M, Zacharek A, et al. Sildenafil treatment of vascular dementia in aged rats [J]. *Neurochem Int*, 2019, 127: 103–112.
- [36] Venkat P, Chopp M. Models and mechanisms of vascular dementia [J]. *Exp Neurol*, 2015, 272: 97–108.
- [37] Jalal FY, Yang Y, Thompson J, et al. Myelin loss associated with neuroinflammation in hypertensive rats [J]. *Stroke*, 2012, 43(4): 1115–1122.
- [38] Kawamoto EM, Cutler RG, Rothman SM, et al. TLR4-dependent metabolic changes are associated with cognitive impairment in an animal model of type 1 diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 433(2): 731–737.
- [39] Thomas J, Garg ML, Smith DW. Dietary resveratrol supplementation normalizes gene expression in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic C57Bl/6 mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(3): 313–318.
- [40] 郑前敏, 徐平. 认知功能相关的动物行为学实验研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(7): 85–89.
Zheng QM, Xu P. Research of animal behavior assessment about cognitive functions [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(7): 85–89.
- [41] Sohn E, Kim YJ, Lim HS, et al. Hwangryunhaedok-Tang exerts neuropreventive effect on memory impairment by reducing cholinergic system dysfunction and inflammatory response in a vascular dementia rat model [J]. *Molecules*, 2019, 24(2): pii:E343.
- [42] Yin S, Bai W, Li P, et al. Berberine suppresses the ectopic expression of miR-133a in endothelial cells to improve vascular dementia in diabetic rats [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(8): 708–716.
- [43] Wang XR, Shi GX, Yang JW, et al. Acupuncture ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia through Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 1077–1084.

杜珍珍,徐郑美,司琳清,等. 脂肪间充质干细胞在动物模型中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 810-814.
Du ZZ, Xu ZM, Si LQ, et al. Progress in the application of adipose-derived mesenchymal stem cells in animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 810-814.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.019

脂肪间充质干细胞在动物模型中的应用进展

杜珍珍,徐郑美,司琳清,曹立明,刘庆,鲁文赓*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院,黑龙江 大庆 163319)

【摘要】 干细胞被称为医学界的“万能细胞”。随着医学技术的发展,治疗疾病的方法也在日益更新。基于脂肪间充质干细胞具有获取方便,且体外易扩增,伦理学争议小等优点,越来越多的研究人员将目光聚焦在脂肪间充质干细胞上,因此脂肪间充质干细胞在动物模型上的应用也越来越多。本文通过介绍较为典型小鼠疾病模型的临床应用,分析了脂肪间充质干细胞对疾病的治疗作用,得出脂肪间充质干细胞可以通过分泌细胞因子、多向分化,以及免疫调节来发挥多种类型疾病的治疗作用,以期对脂肪间充质干细胞的临床研究与应用提供参考。

【关键词】 脂肪间充质干细胞;小鼠疾病模型;应用治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0810-05

Progress in the application of adipose-derived mesenchymal stem cells in animal models

DU Zhenzhen, XU Zhengmei, SI Linqing, CAO Liming, LIU Qing, LU Wengeng*

(College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Corresponding author: LU Wengeng. E-mail: lwg172@163.com

【Abstract】 Stem cells are known as the “universal cells” in medicine. With the development of medical technology, the method for treating diseases are constantly being updated. Based on the advantages of adipose mesenchymal stem cells (i.e., they are easy to obtain, easy to amplify in vitro, and cause less ethical controversy), an increasing number of researchers focus on this type of stem cells. Therefore, the application of adipose-derived mesenchymal stem cells in animal models is more and more. This article introduces the clinical application of a typical mouse disease model, analyzes the therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on the disease, and concludes that adipose-derived mesenchymal stem cells can differentiate in many ways by secreting cytokines. Based on clinical research and the application of adipose mesenchymal stem cells, immunomodulation may play a role in the treatment of many kinds of diseases.

【Keywords】 adipose-derived mesenchymal stem cells; mouse disease model; application therapy

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

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 可分为骨髓间充质干细胞和脂肪来源等的间充质在皮肤、脂肪、肌肉、骨、骨髓、脐带、脐带血、胎盘、干细胞。间充质干细胞应满足国际细胞治疗协会羊水等中存在^[1-2]。间充质干细胞根据来源不同, 规定的三个标准:首先应具有贴壁性能;其次细胞

【基金项目】 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目(YJSCX2018-Y19)。
Funded by Heilongjiang Bayi Agricultural University Graduate Innovative Scientific Research Project (YJSCX2018-Y19).
【作者简介】 杜珍珍(1993—),女,硕士研究生,主要从事研究动物繁殖障碍性疾病。Email: 1291335206@qq.com
【通信作者】 鲁文赓(1973—),男,博士,副教授,主要从事研究动物繁殖障碍性疾病。Email: lwg1712@163.com

表型也应符合规定,即 CD105、CD73、CD90 阳性, CD45、CD34、CD14/CD11b、CD79a/CD19、HLA-DR 阴性;最后还应具有分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等多分化潜能^[3]。由于动物种属的不同,间充质干细胞表型也存在差异,所以目前还没有统一的标准^[4]。

Friedenstein 等^[5]于上世纪 70 年代发现间充质干细胞,是世界上第一个发现和分离间充质干细胞的学者。间充质干细胞首次发现时被称为基质细胞,到了 1991 年美国克利夫兰西地大学 Caplan 才首次正式将该细胞命名为间充质干细胞。而脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs)是 Zuk 等人于 2001 年首次分离并培养的间充质干细胞,并证实了脂肪间充质干细胞是从脂肪组织内血管周围分离的^[6]。脂肪间充质干细胞在许多疾病的治疗中取得了很好的疗效,这使得越来越多的研究人员开始应用脂肪间充质干细胞进行实验研究并确保了其临床应用的安全性。脂肪间充质干细胞由于其特殊的生物特性被应用于治疗组织损伤的修复^[7]、炎症^[8]、自身免疫系统病^[9]、神经退行性疾病^[10]等。在这些疾病模型的治疗中表现出了间充质干细胞治疗独有的特性。

1 脂肪间充质干细胞在物理性皮肤病上的应用研究

皮肤是防御病原体侵入机体发生感染的屏障,更是缓冲外界对机体刺激作用的首要组织。皮肤创伤属于物理性皮肤病,皮肤的创伤包括烫伤、烧伤以及其他因素所引起的组织损伤。创伤面的愈合是很复杂的生理过程,包括炎症反应、新组织的形成和组织结构重建这三个阶段以及与不同的组织细胞相互作用来完成伤口愈合。创伤后,尽快愈合创面可以有效抵抗外界病菌感染,减轻炎症反应。不恰当的创面治疗会使皮肤创面的愈合能力变差,影响肉芽组织的生长。很多报道已经证明了脂肪间充质干细胞可以加快小鼠创面的愈合速度^[11-15]。脂肪间充质干细胞受到损伤应激时,它分泌的多种有益细胞因子如 IL-6 等会归巢到受伤部位并进行修复,减轻炎症反应,增强皮肤愈合能力。

2 脂肪间充质干细胞在慢性呼吸系统疾病上的应用研究

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)特点为病程缓慢且易复发,造成肺损

伤,并伴有炎症症状。该病为呼吸障碍疾病。其病因与吸入有害气体有关,如吸入过多的香烟烟雾或有害气体均可引起发病。研究人员发现,当发生慢性阻塞性肺疾病时,脂肪间充质干细胞可以分化为肺上皮细胞并表达其表面标记物^[16],使其可以逃脱免疫监视。除此之外,脂肪间充质干细胞可以通过归巢特性到达慢性肺阻塞性肺病的小鼠肺组织内并存活,减轻肺组织病变^[17-21]。脂肪间充质干细胞对慢性肺阻塞性疾病的主要作用是脂肪间充质干细胞分泌的细胞因子可以调节减轻炎症反应,对肺组织进行修复,从而改善小鼠的肺功能,达到对慢性阻塞性肺病小鼠的治疗作用。

3 脂肪间充质干细胞在免疫性疾病上的应用研究

3.1 在系统性红斑狼疮中的作用

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)会导致免疫调节失衡及体内形成大量的抗体,进而引起多个器官受到损伤。该病为自身免疫系统疾病,特点为多种免疫细胞因子异常活化。在临床上,研究红斑狼疮常用 MRL/lpr 小鼠作为疾病模型来评估脂肪间充质干细胞对红斑狼疮的治疗效果^[22]。脂肪间充质干细胞可以调节狼疮小鼠的免疫功能并对免疫紊乱起调节作用^[23-26],主要通过减少系统性红白狼疮小鼠自身产生抗体,加强树突状细胞增殖能力,促进 Th 细胞的转化,从而改变免疫应答的类型,提高小鼠存活率。

3.2 在免疫性脑脊髓炎中的作用

免疫性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)发生在中枢神经系统,其特征是髓磷脂损失的自身免疫性疾病。本病特点为髓鞘再生机能丧失,神经元发生不可逆损伤,并破坏血脑屏障。研究人员通过建立自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型发现,脂肪间充质干细胞是促进髓鞘再生及修复的有效方法,通过给小鼠注射脂肪间充质干细胞,小鼠的神经功能缺损会下降^[27-28]。在建立免疫性脑脊髓炎小鼠模型时,研究者还发现免疫性脑脊髓炎小鼠脾脏的 Treg 细胞明显降低,且 Th1 型和 Th2 型细胞关系失衡^[29]。脂肪间充质干细胞对免疫性脑脊髓炎的作用机制既包括机体免疫功能异常时的免疫调节,又包括炎症环境时的抗炎修复。Th1 型细胞及单核细胞均会参与免疫性脑脊髓炎小鼠的脱髓鞘过程,并会产生促炎因子如 TNF- α 和 IL-17 等,进而促进 T 细胞和巨噬细胞的活化,导

致血脑平衡破坏,使炎性细胞进入大脑神经系统,导致神经损伤。而 Th2 型细胞会产生抗炎因子,这些抗炎细胞因子的产生有助于免疫性脑脊髓炎病程的延缓^[30]。脂肪间充质干细胞移植后,会使细胞向 Th2 型细胞分化,改变体内微环境,进而抗炎,改善神经功能,减少神经细胞发生损伤,并使中枢神经系统内形成一种抑炎的微环境,从而起到对神经髓鞘进行保护的作用,使其有望于成为免疫性脑脊髓炎治疗的新方法。

4 脂肪间充质干细胞在神经性疾病上的应用研究

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病,本病主要的致病机制为 Tau 蛋白和 β 淀粉样蛋白异常堆积造成中枢神经系统损伤以及神经胶质细胞异常增生^[31]。脂肪间充质干细胞主要通过分化成神经细胞并归巢到病变部位,从而对此类神经性疾病发挥作用。在小鼠模型中,研究人员发现通过注射脂肪间充质干细胞可以促进小胶质细胞活化,提高小鼠神经再生活性,促进神经修复功能,进而缓解小鼠的病情进展^[32-34]。脂肪间充质干细胞对神经退行性疾病作用是多方面的,如促进神经细胞的修复和减轻炎症。脂肪间充质干细胞还可以治疗肌萎缩侧索硬化等神经性疾病^[35],对这些神经性疾病起作用可能是与脂肪间充质干细胞的高分化潜能有关,脂肪间充质干细胞通过分化为神经细胞,迁移到受损的神经细胞周围,并对其修复,来达到延缓或缓解病情的作用。

5 脂肪间充质干细胞在其他疾病上的应用研究

5.1 在 1 型糖尿病中的作用

1 型糖尿病 (diabetes mellitus type 1, T1DM) 主要特征是葡萄糖代谢紊乱及胰岛素分泌异常从而引起机体血糖升高及一系列并发症,该病是一种代谢性疾病。实验研究发现,注射脂肪间充质干细胞可以使 1 型糖尿病动物模型的血糖快速降低^[36]。以前的研究证明了间充质干细胞对 1 型糖尿病起治疗作用^[37-39],这可能是因为脂肪间充质干细胞可以分化为胰岛细胞并增强胰岛细胞分泌胰岛素能力,加快肝脏代谢葡萄糖的速度,进而降低血糖水平,达到治疗 1 型糖尿病的作用。

5.2 在脑损伤中的作用

脑损伤 (brain injury) 是由于脑神经元受到不可

逆损伤而引起的。有研究报道了脂肪间充质干细胞可以对冻伤大鼠脑损伤起作用^[40]。通过静脉注射脂肪间充质干细胞,脂肪间充质干细胞可以通过血脑屏障迁移到损伤部位,并可以在脑组织中扩散,促进受损脑组织中神经细胞因子的分泌,使脑损伤区细胞凋亡减少,修复受损部位,减轻炎症反应,使神经功能明显改善,进而对脑损伤起到治疗作用。

6 展望

脂肪间充质干细胞除对上述疾病有治疗作用外,还可以治疗肝损伤、肾衰竭、肾病综合征、放射性疾病等。脂肪间充质干细胞在炎症中的积极作用为大家所认可,间充质干细胞可以分泌大量抗炎因子进行抗炎,同时在炎症及损伤刺激下也会分泌许多其他的细胞因子来调节炎症反应,进而实现对疾病的抗炎修复。脂肪间充质干细胞在免疫性疾病中也表现出了积极的治疗作用,脂肪间充质干细胞可以活化免疫细胞,如其中激活的淋巴细胞,它可以增强免疫耐受,减轻免疫反应,对疾病进行治疗。对于其他疾病,脂肪间充质干细胞可以分化成所需的细胞,并分泌多种细胞因子对疾病发挥治疗作用。在未来,脂肪间充质干细胞对疾病的作用机制也将变得越来越全面,从而推动医学的发展,使其达到一个新的阶段。

参 考 文 献 (References)

- [1] Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(2): 163-176.
- [2] Montesinos JJ, Mora-Garcia Mde L, Mayani H, et al. In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity [J]. *Stem Cell Dev*, 2013, 22(18): 2508-2519.
- [3] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [4] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 208(1): 64-76.
- [5] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267-274.

- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue; implications for cell-based therapies [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(2): 211–228.
- [7] 刘培, 胡培生, 马玲, 等. 脂肪间充质干细胞条件培养基制备温敏凝胶外用治疗皮肤烫伤[J]. *中国组织工程研究*, 2017, (30): 4852–4859.
Liu P, Hu ZS, Ma L, et al. Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell conditioned medium thermosensitive hydrogel on skin scald [J]. *Chin Tissue Eng Res*, 2017, (30): 4852–4859.
- [8] 王艾彤, 肖建辉. 不同来源间充质干细胞在骨性关节炎及软骨缺损治疗中应用的研究进展 [J]. *山东医药*, 2018, 58(16): 95–97.
Wang AT, Xiao JH. Advances in the application of mesenchymal stem cells from different sources in the treatment of osteoarthritis and cartilage defects [J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(16): 95–97.
- [9] Park MJ, Kwok SK, Lee SH, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce expansion of Interleukin-10 producing regulatory B cells and ameliorate autoimmunity in a murine model of systemic lupus erythematosus [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(11): 2367–2377.
- [10] Yan Y, Ma T, Gong K, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(8): 798–805.
- [11] Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2648–2659.
- [12] Balakumaran A, Pawelczyk E, Ren J, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their “stemness”[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11462.
- [13] Chen L, Tredget EE, Wu PY, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1886.
- [14] 刘晓玉, 王瑞, 张涛, 等. 人脂肪间充质干细胞对皮肤创伤修复的作用 [J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(11): 1377–1381.
Liu XY, Wang R, Zhang T, etc. Effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on cutaneous wound healing [J]. *Basic Med Clin*, 2013, 33(11): 1377–1381.
- [15] 马诗雨, 王欣, 李晓庆, 等. 间充质干细胞对皮肤创面的改善作用 [J]. *实用医学杂志*, 2017, (7): 1184–1187.
Ma SY, Wang X, Li XQ, etc. Effect of mesenchymal stem cells on skin wound improvement [J]. *J Pract Med*, 2017, (7): 1184–1187.
- [16] 周湘乡. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型肺组织诱导骨髓间充质干细胞向肺泡上皮细胞分化的研究 [D]. 南昌: 南昌大学; 2018.
Zhou XX. The study on the differentiation of BMSCs into alveolar epithelial cells induced by lung tissue of COPD model mouse [D]. Nanchang: Nanchang University; 2018.
- [17] 郝术安, 吴琦, 王茂均. 脂肪间充质干细胞移植治疗慢性阻塞性肺疾病 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(41): 6177–6182.
Hao SA, Wu Q, Wang MJ. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation for treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Tiss Eng Res*, 2016, 20(41): 6177–6182.
- [18] 周湘乡, 颜兴艳, 钟玉兰, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路调控间充质干细胞向肺泡上皮细胞分化及在慢性阻塞性肺病修复中的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(25): 159–164.
Zhou XX, Yan XY, Zhong YL, etc. Wnt/ β -catenin signaling pathway regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into epithelial cells in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin Tiss Eng Res*, 2018, 22(25): 159–164.
- [19] 邱川, 李明才, 武燕, 等. 慢性阻塞性肺疾病气道炎症的研究进展 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2011, 10(2): 196–199.
Qiu C, Li MC, Wu Y, et al. Recent progress of airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Resp Crit Care*, 2011, 10(2): 196–199.
- [20] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells [J]. *Cell Death Diff*, 2014, 21(2): 216–225.
- [21] Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model [J]. *Mol Ther*, 2011, 19(1): 196–203.
- [22] Zhao W, Wu C, Li LJ, et al. RNAi silencing of HIF-1 α ameliorates lupus development in MRL/lpr mice [J]. *Inflammation*, 2018, 41(5): 1717–1730.
- [23] 彭宇声. 脂肪源间充质干细胞移植治疗狼疮鼠疗效的实验研究 [D]. 广州: 南方大学; 2015.
Peng YS. The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation therapy in mice with systemic lupus erythematosus [D]. Guangzhou: Southern Medical University; 2015.
- [24] Liang J, Sun L. Mesenchymal stem cells transplantation for systemic lupus erythematosus [J]. *Int J Rheum Dis*, 2015, 18(2): 164–171.
- [25] 叶玲, 朱静, 何成松. 脂肪来源间充质干细胞移植干预系统性红斑狼疮模型小鼠的免疫功能 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(17): 2696–2702.
Ye L, Zhu J, He CS. Intervention with autologous adipose-derived mesenchymal stem cells for immune function in mice with systemic lupus erythematosus [J]. *Chin Tiss Eng Res*, 2019, 23(17): 2696–2702.
- [26] 罗利梅, 骆辑, 周晓泉, 等. 间充质干细胞对系统性红斑狼疮 T 淋巴细胞的免疫调节作用 [J]. *免疫学杂志*, 2016, (8): 681–686.
Luo YM, Luo J, Zhou XQ, et al. Immunosuppressive effects of

- allogeneic human mesenchymal stem cells on T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Immu*, 2016, (8): 681-686.
- [27] Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, et al. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Ann Neurol*, 2007, 61(3): 219-227.
- [28] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(5): 1076-1084.
- [29] 薛鹏, 李金凤, 刘新珊, 等. 脂肪间充质干细胞治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的效果[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2016, 51(6): 731-735.
- Xue P, Li JF, Liu XS, et al. Efficacy of adipose mesenchymal stem cells on experimental autoimmune encephalomyelitis mice [J]. *J Zhengzhou Univ: Med Edition*, 2016, 51(6): 731-735.
- [30] Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, et al. A new focal EAE model of cortical demyelination: multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination [J]. *Brain*, 2006, 129(8): 1972-1983.
- [31] Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(8): 1063-1070.
- [32] Ma T, Gong K, Ao Q, et al. Intracerebral transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells alternatively activates microglia and ameliorates neuropathological deficits in Alzheimer's disease mice [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(1): 113-126.
- [33] Yan Y, Ma T, Gong K, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(8): 798-805.
- [34] Kim S, Chang KA, Kim JA, et al. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45757.
- [35] Gu R, Hou X, Pang R, et al. Human adipose-derived stem cells enhance the glutamate uptake function of GLT1 in SOD1 (G93A)-bearing astrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(3): 481-486.
- [36] 庞雅平, 程愈, 郝好杰, 等. 间充质干细胞培养上清输注对糖尿病大鼠治疗作用的机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(6): 449-453.
- Pang YP, Cheng Y, Hao HJ, etc. Infusion of mesenchymal stem cells culture supernatant ameliorates hyperglycemia disorders in STZ-induced diabetes mellitus rats [J]. *PLA Med J*, 2015, 40(6): 449-453.
- [37] Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, et al. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo [J]. *Adv Nutr*, 2012, 3(3): 286-294.
- [38] Si YL, Zhao YL, Hao HJ, et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns [J]. *Ageing Res Rev*, 2011, 10(1): 93-103.
- [39] Shou P, Xu C, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair [J]. *Cell Res*, 2010, 20(5): 510-518.
- [40] 朱俊卿, 洪军, 崔建忠, 等. 脂肪间充质干细胞治疗外伤性脑损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(1): 71-76.
- Zhu JQ, Hong J, Cui JZ, etc. Adipose mesenchymal stem cells for treatment of traumatic brain injury [J]. *Chin Tiss Eng Res*, 2017, 21(1): 71-76.

[收稿日期] 2019-05-05

杨晶晶,陈慧. 不同染毒方式构建镍损伤动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 815-820.

Yang JJ, Chen H. Research progress on animal models of nickel-induced damages constructed using different poisoning methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 815-820.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.020

不同染毒方式构建镍损伤动物模型的研究进展

杨晶晶,陈慧*

(甘肃省兰州市兰州大学第二医院·第二临床医学院,兰州 730000)

【摘要】 镍(nickel)是人类在生活和生产中广泛接触的一种金属元素,是人体必需的微量元素,但其过量蓄积会对人体产生危害。目前镍中毒后对人体造成损伤的机制尚不明确,仍需进一步研究和探讨,而镍损伤中毒模型是研究镍损伤发生机制和治疗的基础。不同镍损伤中毒模型的制备特点不尽相同,应根据不同实验目的来选择不同的实验动物模型,本文对目前常用的几种建模方法进行综述。

【关键词】 染毒方式;镍损伤;模型构建

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0815-06

Research progress on animal models of nickel-induced damages constructed using different poisoning methods

YANG Jingjing, CHEN Hui*

(Lanzhou University Second Hospital and the Second Clinical Medical College, Lanzhou 730000, China)

Corresponding author: CHEN Hui. E-mail:chenhui@lzu.edu.cn

【Abstract】 Nickel is a metal that humans are often exposed to during production and daily life. It is an essential trace element in the human body, but in excess, it can harm the body. The exact mechanism of damage caused by excessive nickel exposure remains unclear, but is related to complex cellular and molecular mechanisms. The model of nickel-induced damages forms the basis for studying the mechanisms treatment of nickel-induced damages. The preparation characteristics of different models of nickel poisoning damage are similar, thus, experimental models should be selected according to the experimental purpose. This paper reviews several commonly used methods of modeling nickel poisoning.

【Keywords】 poisoning method; nickel-induced injury; model building

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

镍(nickel)作为人体必需的微量元素,每日摄入量约为0.3~0.5 mg,总量约为10 mg,可促进心肌细胞生长和修复,对维持血管结构和稳定性有一定作用,同时还可促进红细胞的生成。但大量研究表明镍化合物对人体有较大危害,镍蓄积过量常见于镍污染地区或镍矿冶炼工人。其可引起呼吸道及皮肤等的炎症反应、神经衰弱和系统功能紊

乱等,同时具有致癌、致畸和致突变等危害,可对呼吸系统、生殖系统、内分泌系统和免疫系统等多个系统产生影响。镍化合物主要通过引发氧化应激、DNA甲基化和阻碍DNA修复等导致DNA损伤,引起基因异常表达^[1]。动物镍损伤中毒主要表现为实验动物行为学改变,饮食、体重下降,组织镍浓度升高,出现病理变化,以及凋亡蛋白上调和氧化应

【基金项目】 国家自然科学基金(31670518);兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划(CY2018-ZD02)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31670518), Lanzhou University Second Hospital “Cuiying Technology Innovation” Program (CY2018-ZD02).

【作者简介】 杨晶晶(1994—),女,硕士,主要从事内分泌疾病研究。Email: yangjj2018@lzu.edu.cn

【通信作者】 陈慧(1967—),女,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事内分泌系统疾病研究。Email:chenhui@lzu.edu.cn

激水平增高等,急性镍损伤中毒表现为急性炎症反应的临床表现。根据不同研究目的,采用不同镍给予方式,产生损伤的器官、组织效应和程度各不相同。因此,选择一种合适的建模方式是实验过程中至关重要的环节。

1 镍化合物损伤动物模型

1.1 镍化合物腹腔注射方法染毒

镍化合物腹腔注射染毒主要包括硫酸镍(nickel sulfate, NiSO_4)和氯化镍(nickel chloride, NiCl_2)。镍化合物是电镀镍和化学镍的主要镍盐,是硬化油生产中油脂加氢的催化剂,可用作维生素 C 氧化反应的催化剂,及各种防毒面具的原料。镍化合物腹腔注射是常见的构建镍中毒模型的方式, Ni^{2+} 主要通过诱发氧化应激和 DNA 甲基化等方式破坏 DNA 的完整性,导致 DNA 链的断裂、DNA-蛋白交联及形成 DNA 加合物等,使得相关基因的表达缺失和抑癌基因沉默,使细胞易于癌变^[2]。孙应彪等^[3]将 1.25、2.5 和 5 mg/kg 的 NiSO_4 连续 14 d 注射至 Wistar 大鼠腹腔,大鼠睾丸组织中镍含量增高,抑制组织一氧化氮合成酶(NOS)活力的同时引起 NO 含量下降,呈明显剂量-效应关系;并影响睾丸功能而引发性激素 LH 的含量降低,而出人意料的是,T、FSH 的含量也降低,可能是由于镍过量导致大鼠下丘脑-垂体轴功能紊乱,需进一步实验验证。Doreswamy 等^[4]采用 1.25、2.5 和 5 mmol/100 g 剂量的 NiCl_2 注射 CFT-Swiss 小鼠腹腔内,小鼠睾丸组织出现 DNA 损伤,氧化应激水平增高,且精子的成活率下降,呈明显的剂量-依赖关系。

1.2 镍化合物呼吸道吸入方法染毒

1.2.1 羰基镍呼吸道吸入染毒

羰基镍(nickel tetracarbonyl, $\text{Ni}(\text{CO})_4$)是一种金属有机化合物,由镍和 CO 在一定条件下形成,是一种剧毒物品。与空气混合、遇热、震动和摩擦可引起爆炸,遇明火、高温和氧化剂后可燃,遇热、遇酸放出有毒气体。动物暴露于羰基镍蒸气,肺脏损害最严重,可并发严重的肺泡水肿、充血和细胞肿胀变性;并有全身毒性作用,可导致肝、肾和脑损害,造成全身多器官功能衰竭^[5]。罗琴等^[6]采用 20、135 和 250 mg/m^3 的羰基镍使 SPF 级 SD 大鼠吸入染毒,发现大鼠肾脏 DNA 损伤,呈明显的剂量-效应关系,肾脏超微结构在高剂量时有部分改变。尚慧等^[7]使 SPF 级 SD 大鼠在 24、48、72 h 和 7 d 吸

入 20、135 和 250 mg/m^3 羰基镍,检测血液中镍浓度,发现血清镍含量与吸入浓度呈明显的剂量-效应关系,因此,血清镍含量可作为急性羰基镍中毒的参考指标。羰基镍吸入方法常用于急性镍中毒模型的建立和镍对肺、肾等腺体影响的研究^[8]。但此种方法不能精确计算动物摄入羰基镍的实际含量,且容易因吸入剂量不易控制而造成动物死亡,影响实验结果。

1.2.2 镍冶炼烟尘气管内滴注染毒

镍冶炼烟尘是镍在冶炼、提取过程中产生的废气,是工人在岗期间直接接触到的镍化合物,其相关研究可明确镍冶炼过程中产生的废气对工人身体的损害部位以及程度。杨越等^[9]将镍冶炼烟尘以 0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg/kg 对 Wistar 大鼠气管内滴注 2 d,结果表明镍冶炼烟尘引起大鼠肺组织的氧化损伤,同时诱导凋亡相关蛋白 p-JNK、Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 的表达上调,最终导致细胞凋亡。此种方法可以模拟作业工人在遭受镍环境污染时身体的变化情况,然而镍冶炼烟尘中含有较多杂质,表现出来的损伤可能是多种物质的共同作用。

1.2.3 纳米氧化镍置于气管内染毒

纳米氧化镍(nickel oxide nanoparticles, NiONPs)是绿色至黑绿色立方晶系粉末,加热后变黄色。溶于酸和氨水,而不溶于水和液氨。主要用作搪瓷的密着剂和着色剂,陶瓷和玻璃的颜料,以及用于制造镍盐原料等。空气中最高容许浓度:二价镍氧化物为 0.5 mg/m^3 (以镍计)。生产时操作人员要戴防毒口罩及面具,接触镍化合物的人员要定期检查肺功能、肝功能和肾功能等。Chang 等^[10]将氧化纳米镍溶液 0.015、0.06 和 0.24 mg/kg 连续 6 周滴入 Wistar 大鼠气管中,导致大鼠肺脏纤维化,表现为羟脯氨酸,I 型和 III 型胶原的含量增加,组织病理学显示肺脏纤维化。Bai 等^[11]将 10、20、50 和 100 μg 的氧化纳米镍放置于 BALB/c 小鼠支气管,发现小鼠肺脏组织实变且出现纤维化。

1.3 镍化合物经消化道方法染毒

1.3.1 镍化合物经口腔摄入染毒

镍化合物主要通过摄入被镍污染的食物或水进入人体。在镍污染严重地区,镍化合物经口进入体内是当地人镍暴露的主要原因之一^[12-13]。Yin 等^[14]将 300、600 和 900 mg/kg 的 NiCl_2 加入艾维茵肉鸡的饲料中,分别于第 7、14、21、28、35 和 42 天分

别处死实验动物,结果表明,镍暴露肉鸡的饮食及体重明显下降,且发现实验组淋巴滤泡中淋巴细胞减少,呈明显的剂量-效应和时间-效应关系。Wu 等^[15]将 300、600 和 900 mg/kg 的 NiCl_2 加入艾维茵肉鸡的基础玉米-大豆食物中,发现 NiCl_2 可减少小肠和盲肠扁桃体中 IgA^+B 细胞的数量和 sIgA 、 IgA 、 IgG 和 IgM 的含量,提示肠黏膜中的体液免疫功能受损, NiCl_2 在动物体内具有肠黏膜体液免疫毒性。经消化道染毒可以反映在镍污染严重地区,当地居民经口摄入较多镍化合物时体内受到的影响,但这种方法不易准确计算实验动物摄入镍的具体量。

1.3.2 镍化合物灌胃染毒

Rao 等^[16]将 8、16 mg/kg 的 NiCl_2 通过灌胃的方法注入 Swiss albino 小鼠体内,导致小鼠体重减轻,体内脂质过氧化物(LPO)的水平升高,同时谷胱甘肽(GSH)、总抗坏血酸水平以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶活性显著下降。李湛等^[17]将放射性同位素标记的镍化合物通过灌胃方式注入 SPF 级 SD 大鼠体内,观察镍化合物在大鼠体内的分布情况,结果表明,长时间摄入后,大鼠毛发、肠道、脑组织和胰腺等器官中镍含量明显高于对照组。灌胃染毒方式与口服相似,优点是可以较准确的控制动物染毒剂量,但其与生理摄入方式有所不同,是否会影响染毒部位与效果目前还不清楚,需要进一步实验验证。

1.4 镍及其合金植入体内组织方法染毒

镍及其金属化合物植入实验动物体内后, Ni^{2+} 析出使实验动物脏器内组织镍含量增高,导致细胞和组织的过敏、中毒等反应^[18]。接受镍及其合金植入后,Wistar 大鼠表现为内视网膜向视盘大部分突出,形成大面积褶皱;肾脏肾小体大小不一,可有肥大,肾小球内细胞增多,囊腔狭窄,部分囊腔内可见粉红色均质物质沉积^[19]。镍合金相关医疗材料植入体内是当今医学中常采用的医疗手段,主要应用于骨科、齿科的固定和矫形过程以及心血管系统的支架中^[20-21]。该领域的研究成果有助于当今含镍医疗器械产品生物安全性的发展和改进。

1.5 镍化合物皮肤接触刺激方法染毒

人体皮肤直接接触的镍化合物制品常见于日常生活中不锈钢制品的用具以及女性的廉价装饰品中^[20],研究表明人体接触镍合金制品对人体皮肤有刺激作用,镍化合物作为一种变应原可在皮肤引

起变应性接触性皮炎。魏若尧等^[22]将 5%~5% 硫酸镍、10%~10% 硫酸镍和 10% 硫酸镍单次刺激组连续 3 d 涂抹于 C57BL/6 小鼠皮肤表面,小鼠出现表皮增厚、水肿,刺激性红斑,糜烂渗出及结痂,镍化合物刺激皮肤出现炎性细胞浸润等病理变化,且高剂量组中白细胞介素-4 水平明显增高。

1.6 其他染毒方式

其他染毒方式还包括静脉注射染毒、不同镍化合物联合染毒、不同染毒部位共同染毒,其他镍化合物染毒等多种染毒方式。不同染毒方式的作用效果与染毒作用部位可能不同,实验者可以根据不同染毒目的选择合适的染毒方式。

2 镍化合物细胞损伤模型

2.1 不可溶性镍化合物细胞损伤

不可溶性镍化合物主要为硫化镍(nickel sulfide, NiS)和氧化镍(Nickel oxide, NiO),溶于二甲基亚砜经稀释后作用于细胞,直接观察镍化合物对细胞的毒性作用。王婷等^[23]将 1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 NiS 溶解后作用于支气管上皮细胞 24 h,细胞中活性氧(ROS)和促氧化应激因子丙二醛(MDA)水平增高,抑制氧化应激的因子 SOD 和 GSH-Px 水平降低,表明 NiS 可以通过激活细胞氧化应激,最终导致细胞损伤。张岚等^[24]利用结晶型 NiS 恶性转化人支气管上皮细胞 16HBE 株,证明结晶型 NiS 通过细胞自噬诱导 16HBE 细胞转化癌变。硫化镍直接作用于细胞可直接观察细胞在镍化合物的作用下受到的损伤情况,因此,可以忽略体内其他因素对细胞的影响。

2.2 可溶性镍化合物细胞损伤

可溶性镍化合物主要包括 NiSO_4 和 NiCl_2 ,溶于生理盐水或细胞培养基后可直接作用于细胞,直接反映镍化合物的细胞损伤作用。研究表明,镍化合物主要通过抑制抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和激活促细胞凋亡蛋白 Bax 来诱导细胞凋亡和增强氧化应激等损伤细胞。关聪会等^[25]将 62.5、125、250、500 和 1000 $\mu\text{mol/L}$ 镍化合物直接作用于睾丸间质细胞 3、6、12、24、36 和 48 h 后,睾丸间质细胞增殖受到抑制,呈现剂量-效应关系、时间-效应关系,且镍化合物干预组中细胞毒性标志物乳酸脱氢酶(LDH)明显增高。张贵等^[26]将 1000、500、250、125、62.5 和 31.25 $\mu\text{mol/L}$ 镍化合物作用于内皮细胞 72 h,内皮细胞形态改变,凋亡率增高,LDH 明显增高。高晓

洁等^[27]将纳米镍作用于大鼠睾丸生精-支持共培养细胞,实验组细胞存活率降低,细胞核或细胞质内出现浓染致密的颗粒状荧光及明显核形态变化,染毒组细胞凋亡率增高,且与凋亡相关的 lncRNA 数量亦增高。细胞毒性研究显示, NiSO_4 比 NiCl_2 呈现更强的细胞毒性,体外诱发细胞恶性转化的能力的比较中, NiCl_2 的恶性转化能力最强, NiSO_4 强于结晶型硫化镍^[28];等剂量的 NiSO_4 诱发细胞突变的能力强于 NiCl_2 ;两者致微核形成率均较强^[29]。

3 不同染毒方式镍损伤的造模成功标准

不同的染毒方式引起的损伤部位及损伤程度不同,不同实验目的决定了所选染毒方式,但目前尚无每种染毒方式造模成功的通识。因此,本文对不同染毒方式所致镍损伤特征进行总结。①腹腔注射染毒方式所致镍损伤特征为:实验动物饮食与体重下降,体内性腺激素、垂体激素等水平改变,组织镍浓度增高,DNA 损伤,氧化应激水平增高,细胞凋亡增加。②呼吸道染毒方式所诱发镍损伤特征为:实验动物肺脏损害严重,可并发严重的肺泡内水肿、充血及细胞肿胀变性,并有 DNA 损伤,同时肺组织出现氧化损伤,诱导凋亡蛋白的高表达。③消化道染毒方式所致镍损伤特征为:实验动物消化道组织内镍含量增高更明显,肠道免疫细胞数量减少,免疫功能下降,且实验动物体内组织结构发生改变,呈明显的剂量-效应、时间-效应关系。④组织中植入镍合金染毒方式中,镍损伤特征为:实验动物脏器组织内镍含量增高,多个器官出现病理改变。⑤皮肤直接接触引起镍损伤的特征为:实验动物表皮增厚、水肿,刺激性红斑,糜烂渗出及结痂,出现炎性细胞浸润等病理变化,且体内炎症因子水平增高。⑥镍化合物直接作用于体外细胞的镍损伤特征为:细胞存活率降低,细胞核或细胞质内出现浓染致密的颗粒块状物质及明显核形态变化,细胞凋亡率升高,与凋亡相关的蛋白表达增加,激活细胞氧化应激,促进细胞癌变。镍损伤判断标准可能主要通过实验动物临床中毒表现,脏器指数下降、组织内镍浓度增加,出现病理变化,凋亡蛋白增高和氧化应激水平增高以及促进细胞癌变引起细胞凋亡等判断。

4 讨论

迄今为止,建立镍损伤的方法越来越丰富多

样。已有的镍中毒的相关研究,揭示了不同染毒方式下对机体不同组织器官产生不同程度的影响,进而产生不同的生物学效应。但是动物/细胞内损伤模型制作尚不能完全模拟人体受到镍损伤的病理生理过程,而且,目前建立的镍损伤模型与人体长期镍暴露受到的损伤程度与损伤部位也不尽相同。目前镍损伤相关研究表明,镍损伤对机体造成损害可能主要与激活细胞凋亡蛋白,导致细胞 DNA 损伤,促进细胞凋亡,增强氧化应激,以及通过细胞自噬途径诱导细胞癌变等对机体造成损伤。有研究表明, Ni^{2+} 作为一种内分泌干扰物,其过量对内分泌腺体有一定损伤,镍可通过直接或间接或通过中枢神经系统中心和信号传导机制影响内分泌腺。体内镍含量过高,会造成机体内分泌激素分泌紊乱,如皮质醇、甲状腺激素及性腺激素等,甲状腺激素水平紊乱造成甲状腺功能异常,性腺激素分泌异常引起不孕以及精子成活率低,还有研究表明,镍暴露与糖尿病发病率有一定关系。同时镍暴露会对内分泌腺组织结构产生影响,会造成甲状腺滤泡增生^[30]。镍中毒模型与长期镍暴露的影响还有待进一步探讨,因此,探索一种有效的建模方式可以有效研究镍暴露作用于不同系统对人体产生的影响,以便有效的预防镍损伤对人体带来的生物学损伤和危害。

参 考 文 献(References)

- [1] Rehman K, Fatima F, Waheed I, et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 157-184.
- [2] 魏巧妙,程宁. 镍及其化合物 DNA 损伤的研究进展 [J]. 工业卫生与职业病, 2015, 41(6): 471-473.
Wei Q, Cheng N. Research progress in DNA damage of nickel and its compounds [J]. Industr Health Occupat Dis, 2015, 41(6): 471-473.
- [3] 孙应彪,朱玉真,王学习. 硫酸镍对雄性大鼠生殖系统损伤的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21(4): 20-22.
Sun YB, Zhu YZ, Wang XX. A study on the genital system injury induced by nickel sulfate in male rats [J]. Chin J Industr Hygiene Occupat Dis, 2003, 21(4): 20-22.
- [4] Doreswamy K, Shrilatha B, Rajeshkumar T, et al. Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects [J]. J Androl, 2004, 25(6): 996-1003.
- [5] Derek Rusin, David Nickeson, Aaron W. A fatal workplace nickel carbonyl exposure [J]. Clin Toxicol (Phila), 2019, 57(1): 63-64.
- [6] 罗琴,李宇,刘静,等. 大鼠急性羰基镍中毒肾细胞 DNA 损

- 伤和超微结构的观察 [J]. 工业卫生与职业病, 2011, 37(4): 229-233.
- Luo Q, Li Y, Liu J, et al. Observation on DNA damage and ultrastructure alteration in renal cells of acute nickel carbonyl poisoning rat [J]. *Industr Hygiene Occupat Dis*, 2011, 37(4): 229-233.
- [7] 尚慧, 马国煜, 王秋英, 等. 羰基镍急性吸入性致毒血清镍含量的变化 [J]. *甘肃医药*, 2012, 31(9): 667-668.
- Shang H, Ma GY, Wang QY, et al. Study of serum levels of nickel changes on rat acutely poisoned by nickel carbonyl [J]. *Gansu Med J*, 2012, 31(9): 667-668.
- [8] 赵业婷, 赵金垣. 羰基镍毒性的研究现状与展望 [J]. *中国劳动卫生职业病杂志*, 2006, 25(5): 315-318.
- Zhao YT, Zhao JX. Present condition and prospect for research on toxicity of nickel carbonyl [J]. *Chin J Occupat Health Occupat Dis*, 2006, 25(5): 315-318.
- [9] 杨越, 王玥, 安学军, 等. 镍冶炼烟尘对大鼠肺细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响 [J]. *中国工业医学杂志*, 2016, 29(4): 289-292+321.
- Yang Y, Wang W, An XJ, et al. Effect of nickel-smelting fumes on expression of apoptosis related proteins in rat lung cells [J]. *Chin J Industr Med*, 2016, 29(4): 289-292+321.
- [10] Chang XH, Zhu A, Liu FF, et al. Nickel oxide nanoparticles induced pulmonary fibrosis via TGF- β 1 activation in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 36(8): 802-812.
- [11] Bai KJ, Chuang KJ, Chen JK, et al. Investigation into the pulmonary inflammopathology of exposure to nickel oxide nanoparticles in mice [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(7): 2329-2339.
- [12] Rehman K, Fatima F, Waheed I, et al. Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 157-184.
- [13] Simona C, Jacopo F, Maria Enrica G, et al. Development of a new sequential extraction procedure of nickel species on workplace airborne particulate matter: Assessing the occupational exposure to carcinogenic metal species [J]. *Int J Anal Chem*, 2018, 2018: 3812795.
- [14] Yin S, Guo H, Cui H, et al. Nickel chloride (NiCl₂) induces histopathological lesions via oxidative damage in the Broiler's bursa of Fabricius [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 171(1): 214-223.
- [15] Wu B, Cui H, Peng X, et al. Toxicological effects of nickel chloride on IgA⁺ B cells and sIgA, IgA, IgG, IgM in the intestinal mucosal immunity in broilers [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(8): 8175-8192.
- [16] Rao MV, Chawla SL, Sharma SR. Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(6): 1368-1371.
- [17] 李湛. 放射性示踪法研究镍在大鼠体内的药动参数与镍镉联合制毒机理的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- Li Z. Study on the pharmacokinetic parameters of nickel in rats and the mechanism of nickel-cadmium combined poisoning by radioactive tracer method [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2008.
- [18] 王振霞, 赵远涛, 单小林, 等. 医用钛镍合金表面改性技术的研究进展 [J]. *稀有金属材料与工程*, 2016, 45(5): 1364-1368.
- Wang ZX, Zhao YT, Shan XL, et al. Research progress of medical TiNi alloy surface modification technology [J]. *Rare Met Mater Eng*, 2016, 45(5): 1364-1368.
- [19] 赵英. 镍及其合金植入大鼠体内后镍的代谢和胚胎转运的观察 [D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- Zhao Y. The metabolism and embryo-transportation of nickel and NTI SMA implanted in rats [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007.
- [20] Yang K, Ren Y. Nickel-free austenitic stainless steels for medical applications [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2010, 11(1): 014105.
- [21] 唐苏铭, 周晓航, 李黎明, 等. 无镍不锈钢金属支架材料对血管内皮细胞凋亡的诱导机制 [J]. *中国医科大学学报*, 2014, 43(6): 481-484.
- Tang SM, Zhou XH, Li LM, et al. Mechanisms of nickel-free stainless steel induced apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *J Chin Med Univ*, 2014, 43(6): 481-484.
- [22] 魏若尧, 孙井江, 李攀, 等. 镍变应性接触性皮炎小鼠动物模型建立 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2017, 11(2): 142-148.
- Wei RZ, Sun JJ, Li W, et al. Establishment of a mouse model of nickel-induced allergic contact dermatitis [J]. *Chin J Clin Immunol Allergy*, 2017, 11(2): 142-148.
- [23] 王婷, 刘志东, 钟文晖. 硫化镍对支气管上皮细胞膜脂质过氧化的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(3): 221-222.
- Wang T, Liu ZD, Zhong WH. Effects of nickel sulfide on lipid peroxidation in bronchial epithelial cells [J]. *Chin J Toxicol*, 2011, 25(3): 221-222.
- [24] 张岚, 杨磊, 吕嘉春. 结晶型硫化镍通过自噬途径诱导 16HBE 细胞恶性转化癌变 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(3): 222-225.
- Zhang W, Yang L, Lu JC. Crystalline nickel sulfide induces malignant transformation of 16HBE cells through autophagy pathway [J]. *Gen Appl Biol*, 2012, 31(3): 222-225.
- [25] 关聪会, 张志刚, 孙应彪, 等. 硫酸镍对体外培养大鼠睾丸间质细胞毒作用的实验研究 [J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(4): 284-287.
- Guan CH, Zhang ZG, Sun YB, et al. Experimental study on the toxicity of nickel sulfate on rat Leydig cells in vitro [J]. *Chin J Toxicol*, 2011, 25(4): 284-287.
- [26] 张贵, 程彩霞, 祁凤君, 等. 镍对体外培养内皮细胞的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(2): 224-228.
- Zhang G, Cheng CX, Yan FJ, et al. Effect of nickel on endothelial cells cultured in vitro [J]. *Prog Mod Biomed*, 2010, 10(2): 224-228.
- [27] 高晓洁, 孔璐, 薛玉英. 纳米镍对大鼠睾丸生精一支持共培养细胞的凋亡作用及机制研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2018,

30(1): 8-13+19.

Gao XJ, Kong W, Xue YY. Apoptotic effects of nickel nanoparticles on SD rat Sertoli-germ cell co-cultures [J]. Carcinogen Distort Mutat, 2018, 30(1): 8- 13+19.

[28] 张桥. 镍化合物体外诱发细胞恶性转化的研究. II. 镍化合物诱导大鼠气管上皮细胞恶性转化 [J]. 卫生毒理学杂志, 1989, 3(1): 33-36+67.

Zhang Q. Studies on the malignant transformation of nickel compounds in vitro. II. Nickel compounds induce malignant transformation of rat tracheal epithelial cells [J]. J Hygien Toxicol, 1989, 3 (1): 33-36+67.

[29] 张桥.不同致癌能力镍化合物的致突变效应 [J].中华劳动卫生职业病杂志, 1989, 7(5): 296-299.

Zhang Q. The mutagenic effect of nickel compounds with different carcinogenic ability [J]. Chin J Industr Hygiene Occupat Dis, 1989, 7(5): 296-299.

[30] Rana. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals — a review [J] Biol Trace Elem Res, 2014, 160(1): 1-14.

[收稿日期] 2019-06-14

勘误声明

本刊对下述论文进行勘误：

出版信息	2019 年 27 卷 5 期,页码为 583-591
论文标题	利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片段敲除小鼠模型
稿次	☐ 录用定稿 ☐ 排版定稿 ☐ 整期定稿 ☒ 印刷版 ☐ 其它
作者	吴曦,霍桂桃,刘甦苏,谷文达,曹愿,柳全明,吕建军,范昌发
DOI	10. 3969 /j.issn.1005-4847. 2019. 05. 006
勘误内容	“致谢”一栏 原为： 致谢:作者感谢北京市第二十五中学吕云松在 DNA 提取和 PCR 实验中所提供的帮助。 应更正为： 致谢:作者感谢北京市第十二中学吕云松在 DNA 提取和 PCR 实验中所提供的帮助。

特此告知并诚挚地向读者致歉。

《中国实验动物学报》编辑部
日期:2019 年 11 月 6 日

朱丽茹,赵德善. 人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 821-825.

Zhu LR, Zhao DS. Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid-cancer cell lines [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 821-825.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 06. 021

人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展

朱丽茹,赵德善*

(山西医科大学第二医院核医学科,太原 030001)

【摘要】 甲状腺癌在内分泌恶性肿瘤中居于首位。甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型是人类甲状腺癌的一个缩影,对甲状腺癌的发病机制、药物治疗及¹³¹I治疗的机制等研究都有重要的意义。了解和熟知甲状腺癌免疫缺陷鼠建模过程中实验动物选择、关键实验操作,以及明确实验动物碘营养状况和血清促甲状腺激素水平等关键影响因素可以有效提高建模成功率。因此,本文就影响人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模成功的相关因素做一简要综述。

【关键词】 甲状腺癌;异种移植模型;促甲状腺激素;碘

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0821-05

Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid cancer cell lines

ZHU Liru, ZHAO Deshan*

(Department of Nuclear Medicine, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Corresponding author: ZHAO Deshan.E-mail:deshanzh@vip.163.com

【Abstract】 Thyroid carcinoma ranks first among the malignant endocrine tumors. Immunodeficient mice or rat models of thyroid cancer-cell-line transplantation represent microcosms of human thyroid cancer, which are of great significance for the study of the pathogenesis of thyroid cancer, drug therapy and the mechanism of iodine-131 treatment. Understanding the key influences in the modeling of thyroid cancer immunodeficient mice or rats could improve the success rate of modeling. Therefore, the factors affecting the successful modeling of human thyroid cancer cell-lines in immunodeficient mice and rats are briefly reviewed in this paper.

【Keywords】 thyroid carcinoma; xenograft model; thyroid stimulating hormone; iodine; mouse; rat

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

甲状腺癌是一种常见的内分泌恶性肿瘤,其发病率逐年增高,我国肿瘤登记中心相关数据表明,近年来,甲状腺癌位居城市地区女性恶性肿瘤第4位,据估计未来我国甲状腺癌发病率将以每年20%的速度不断增长^[1]。应用甲状腺癌免疫缺陷鼠模型的动物实验在研究甲状腺癌的发病机制、发展过

[作者简介]朱丽茹(1993—),女,硕士在读,主要从事甲状腺癌¹³¹I治疗研究。Email: 1397293938@qq.com

[通信作者]赵德善,男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事甲状腺癌¹³¹I治疗研究。Email:deshanzh@vip.163.com

程及有效治疗方法等方面作用重大。因此,如何成功建立有效的人甲状腺癌免疫缺陷鼠模型是实验顺利进行的基础。本文就影响人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模成功的相关因素做一简要综述。

1 一般影响因素

1.1 肿瘤细胞株

1.1.1 肿瘤细胞株种类

目前用于细胞水平及移植动物模型研究的甲状腺癌细胞株种类繁多,根据分化类型可分为分化型甲状腺癌细胞株和未分化型甲状腺癌细胞株,而同等数量未分化或分化程度低的肿瘤细胞较分化程度高的肿瘤细胞接种时造模成功率更高。国内学者^[2]通过建立不同分化程度的甲状腺癌免疫缺陷小鼠模型,评估其对化疗敏感性的研究显示,低分化及未分化甲状腺癌造模成功率相对高于乳头状甲状腺癌,说明肿瘤细胞的分化程度与建模能否成功密切相关。出现此类现象,与肿瘤细胞的恶性程度有关,肿瘤细胞分化程度越低其恶性程度越高。肿瘤细胞的增殖不同于正常细胞有自限性,且随着肿瘤细胞恶性程度的增加,其自身增殖能力增强,接近无限性增殖,因此造模成功率较高。

1.1.2 肿瘤细胞株的接种

接种的肿瘤细胞数量应介于 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6 / 0.1 \text{ mL}$,每只 0.2 mL ^[3],因此接种时应进行多次细胞计数取均值、“Z”字形进针以防止注射后细胞外溢,来确保移植细胞数量的准确性;接种的肿瘤细胞应选择处于对数生长期的细胞,胰酶消化贴壁细胞时应注意消化时间不应过度消化,保证细胞存活率 > 90%,以避免肿瘤细胞移植失败或移植后细胞变异。

1.1.3 移植方式

肿瘤细胞接种成功与否决定了造模的成败,其主要影响因素包括接种的细胞状态、数量级方式。根据实验目的不同接种方式可分为皮下接种、原位移植和静脉或心脏注射肿瘤细胞株等。皮下接种便于观察免疫缺陷鼠成瘤情况,对实行不同干预条件的实验对象有更直观的评估。皮下接种时,以近头侧皮肤松弛部较近尾侧成功率高且成瘤体积大,最佳注射部位为腋窝中部外侧皮下^[4],注射时以形成一个突起的皮丘为宜。原位移植的甲状腺癌免疫缺陷鼠模型能更准确的模拟肿瘤的生长情况,Morrison 等^[5],利用未分化甲状腺癌(anaplastic

thyroid cancer, ATC)细胞株 8505C、T238 及乳头状甲状腺癌(papillary thyroid cancer, PTC)细胞株 K1/GLAG-66、BCPAP,以浓度为 $1 \times 10^5 / 0.1 \text{ mL}$,每只 0.5 mL ,借助显微镜寻找免疫缺陷小鼠甲状腺后进行腺体内注射,于 4~5 周后以大于 90%的造模成功率建立了甲状腺癌免疫缺陷小鼠原位移植模型。原位移植的甲状腺癌免疫缺陷小鼠模型的建立对操作者的专业素质要求较高,造模过程中常因找不到正常甲状腺组织而使原位移植造模失败。静脉或心脏注射肿瘤细胞株是制作远处转移瘤模型的有效方法,对研究肿瘤在体内的生物学行为及转移瘤的治疗等有极大的价值,相关学者^[6]利用 ATC 细胞株 8505C、C-643、SW-1736 及滤泡状甲状腺癌(follicular thyroid cancer, FTC)细胞株 FTC-133、FTC-236 等,经 8~12 周的 SCID 免疫缺陷小鼠尾静脉注射 0.2 mL 含 $3 \times 10^4 \sim 7.5 \times 10^5$ 个肿瘤细胞的细胞悬液,成功建立了甲状腺癌肺转移及骨转移模型。

目前国内外已有部分学者逐渐将免疫缺陷大鼠应用于人源性肿瘤组织异种移植模型中,如彭秀华等^[7]为评价涉及肝、血管等外科操作的肝转移治疗模式,成功地在 26 只 5 周龄裸大鼠(rnu/rnu)(CrI:NIH-Foxnl)体内建立了人结肠癌细胞肝转移模型;贾罗琦等^[8]为获得较大的瘤组织及利于手术操作,成功建立了 10 只 4~5 周龄健康雌性裸大鼠(rnu/rnu)乳腺癌皮下移植瘤模型;国外学者^[9]采用 3~5 周龄雄性裸大鼠(NIH-rnu)成功建立了原位非小细胞肺癌裸大鼠模型。综上所述,因大鼠甲状腺体积大于小鼠的甲状腺组织,在甲状腺癌原位移植模型建立过程中应用免疫缺陷大鼠可有效降低手术操作困难程度,进一步提高造模成功率。

1.2 免疫缺陷鼠

1.2.1 免疫缺陷鼠

免疫缺陷鼠是指由于先天性遗传缺陷或用人工方法造成免疫系统一种或多种成分缺陷的小鼠或大鼠,在研究人类许多疾病机理、研发药物、器官移植等工作中有重要的作用。自 1968 年相关科学家发现裸小鼠无正常胸腺、外周血淋巴细胞数量稀少以来,科学家们培育出了多种免疫缺陷鼠杂交品系,其中有免疫缺陷小鼠及免疫缺陷大鼠,如:多种免疫细胞缺陷的 SCID 小鼠、B-nsg 小鼠、FPG 大鼠及 F344RG 大鼠等。

如前所述,近年来国内部分异种移植模型的研究中应用了裸大鼠,目前成功造模的免疫缺陷大鼠

异种移植肿瘤有黑色素瘤、恶性胶质瘤、结肠癌、肺癌、乳腺癌、子宫内膜癌、肝癌等。免疫缺陷小鼠较免疫缺陷大鼠在造模应用方面更为普遍,且具有价廉、易饲养、成本低、来源广及造模成功率高等特点,但近年来免疫缺陷大鼠的应用在逐渐增多。虽然免疫缺陷大鼠较免疫缺陷小鼠费用昂贵且在饲养等方面维持经费高,但是由于免疫缺陷大鼠与免疫缺陷小鼠生物学特性相似,且体型较大、适应性强、皮下成瘤体积大、取血量多、便于手术操作以及便于影像学观察等优势,在国外大量研究中,免疫缺陷大鼠在各类人类肿瘤的异种移植、药物研究、用于整形的皮肤移植等领域已得到广泛地应用^[10]。而在用于多学科异种肿瘤研究方面,尤其是影像学评价时,免疫缺陷大鼠肿瘤模型具有明显优势。

1.2.2 鼠龄及生长环境

大部分免疫缺陷鼠并非完全缺乏免疫细胞,比如无胸腺裸鼠,体内几乎无 T 淋巴细胞,但 NK 细胞和 B 淋巴细胞活性仍然很高,而免疫缺陷鼠生长环境无法绝对无菌化,随着鼠龄的增加环境中的感染源可刺激其体内 NK 细胞等免疫细胞的活性增加,从而影响移植瘤免疫缺陷鼠模型的成功制作。3 周龄及以下的幼龄鼠虽较 6~8 周龄的成年鼠更易成瘤,且瘤体侵袭性及转移性更高,但幼龄鼠发育不成熟,成瘤后死亡率较高,且不利于观察及进行后续实验研究。因此,从成瘤率和实验便利性角度出发,在相对无菌的通风清洁 SPF 级环境中,饲喂的 6~8 周龄的成年免疫缺陷鼠将成为最佳人肿瘤细胞接种鼠。

2 特异影响因素

2.1 免疫缺陷鼠的血清促甲状腺激素水平

促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH) 具有促进甲状腺滤泡上皮细胞增生、合成与分泌甲状腺激素等作用,在免疫缺陷鼠中 TSH 增高有助于肿瘤细胞的增殖。相关临床研究显示^[11], TSH 水平在分化型甲状腺癌患者中明显高于良性甲状腺结节患者;且 TSH 浓度与分化型甲状腺癌发病率及淋巴结转移有明显的相关性;另外,当 TSH 水平升高,病变肿瘤体积也相应变大,提示血清 TSH 水平不仅对甲状腺癌的发生、发展有相关性,并且也是影响肿瘤生长体积的一个重要因素。

有研究者^[12]将浓度为 $1 \times 10^6/0.1$ mL 的人乳头状甲状腺癌细胞 (TPC-1) 皮下接种于 35 只雄性裸

小鼠 (BALB/c-nu/nu) 颈背部,同时分为 7 组,给予不同浓度的重组人促甲状腺激素,观察 16 d;结果显示,当作用的 TSH 达到一定浓度时,裸鼠成瘤速度较其他相关建模实验^[13]明显加快(第 3 天成瘤),且成瘤速度及肿瘤的体积与 TSH 浓度有相关性;同时,该实验用放射免疫法对瘤组织中的甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, Tg) 进行测定,结果显示 Tg 的浓度与肿瘤体积的大小呈正相关。

目前对于 TSH 在甲状腺癌发生发展中的具体作用机制没有明确的定论,但相关临床研究及动物实验表明^[14],正常生理情况下, TSH 与位于甲状腺滤泡基底膜的促甲状腺激素受体 (thyroid stimulating hormone receptor, TSHR) 结合,通过腺苷酸环化酶,引起 c-AMP 信号通路级联,调节甲状腺碘处理基因: Tg、甲状腺过氧化物酶 (thyroid peroxidase, TPO)、钠碘转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 等的表达;而在分化型甲状腺癌中 TSH 通过结合血管内皮生长因子、细胞生长因子及胰岛素样生长因子等细胞因子,引起受体功能区内基因的突变,致使其下游信号分子异常表达,直接或间接诱导分化型甲状腺癌 (differentiated thyroid cancer, DTC) 的发生,促进 DTC 癌细胞的增殖分化、侵袭和转移;同时, TSH 可能会通过影响相关氧化蛋白酶信号通路诱导分化型甲状腺癌的发生和发展。

因此,在人甲状腺癌细胞株移植裸鼠模型建立过程中,一定浓度的血清 TSH 水平,对提高建模的成功率,加快免疫缺陷鼠成瘤有重要的意义,同时可减少接种所用癌细胞量,相对降低实验成本。

对于提高免疫缺陷鼠血清 TSH 水平的方法有:肌肉注射重组人促甲状腺激素;在建立异种甲状腺癌模型前先使免疫缺陷鼠甲状腺功能降低或缺失,即先建立甲减免疫缺陷鼠模型,利用甲状腺激素分泌的负反馈调节作用使免疫缺陷鼠血清 TSH 水平升高可增加建模成功率。对于成年的免疫缺陷鼠甲减模型的制备可根据具体实验需求及实验条件选用以下三种方法:药物诱导甲减模型^[15], ¹³¹I 诱导甲减模型^[16]及甲状腺切除甲减模型^[17]。

2.2 免疫缺陷鼠的碘营养状态

碘是调节人体甲状腺发育和功能的重要元素。碘不仅维持正常的甲状腺细胞同源异型增生,而且对甲状腺癌的发生也有一定的影响。更重要的是,

碘可以诱导甲状腺癌细胞的细胞周期阻滞和凋亡^[18]。

相关研究显示^[19],碘摄入量与甲状腺疾病发生发展的关系呈 U 型曲线,碘摄入不足和过量均会导致甲状腺癌的发生;其中慢性碘缺乏一直被认为是滤泡状甲状腺癌的危险因素^[20];而在既往碘缺乏的地区,在碘预防前后的研究中表明,补充碘可能会增加甲状腺乳头状癌的发病率^[21]。碘缺乏引起的甲状腺癌组织病理学和激素水平变化与碘缺乏引起高甲状腺素血症的机制是一致的,这种机制是通过下丘脑-垂体-甲状腺轴的负反馈机制使 TSH 分泌增加来实现的。同时,低水平的碘可以通过促进活性氧而导致 DNA 损伤和突变,在一些致癌因素,如辐射及化学药物等存在时可促进肿瘤的发生^[22]。然而,过量碘的促肿瘤机制还没有得到很好的研究。

在关于碘营养状态与甲状腺癌关系的动物实验研究中发现,低碘饮食的雌性大鼠 TSH 升高,54%~100%大鼠发生甲状腺肿瘤,主要是滤泡状腺瘤和滤泡状癌。用高碘饮食(约碘 120 mg/d)喂养大鼠 9 个月,发现 40%实验鼠甲状腺重量增加,但没有肿瘤发生^[23]。

韩国是一个碘含量丰富的地区,据统计^[24]韩国是世界上甲状腺癌发生率最高的国家之一。因此有学者研究了碘摄入量与甲状腺癌在韩国甲状腺结节患者之间的关系^[25],结果发现 1170 名甲状腺结节患者中 18%经手术证实为甲状腺癌,而其中 98%的患者被确诊为甲状腺乳头状癌,且其尿碘值均高于世界卫生组织的标准(100~199 $\mu\text{g/L}$)。

因此,在制作人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型过程中,可根据所接种细胞株的种类不同对免疫缺陷鼠碘营养状况进行人为干预,以促进肿瘤形成。

甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠模型是人类甲状腺癌的一个缩影,对甲状腺癌的发病机制、药物治疗及¹³¹I 治疗的机制等研究都有重要的意义;了解和熟知甲状腺癌免疫缺陷鼠建模过程中实验动物的选择、关键实验操作,以及明确实验动物血清 TSH 水平和碘营养状况等关键影响因素可以有效提高建模成功率,一个高效且成功的甲状腺癌动物模型可以缩短实验时间,节约实验成本,使研究者更好的完成实验研究内容,对研究甲状腺癌的防治措施至关重要。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 甲状腺癌诊疗规范(2018 年版) [J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2019, 13(1): 1-15.
- [2] 安常明. 甲状腺低分化癌裸鼠移植瘤模型的建立及化疗敏感性研究 [D]. 北京:北京协和医学院;中国医学科学院, 2010. An CM. Establishment of ectopic model of poorly differentiated thyroid carcinoma in athymic nude mice and testing of chemosensitivity in vivo and in vitro [D]. Beijing, Peking Union Medical College; Chinese Academy of Medical Sciences, 2010.
- [3] 田庆镗,李玛琳. 人肿瘤细胞悬液裸鼠皮下接种及影响移植成功的因素 [J]. 实验动物科学与管理, 2004, 21(3): 47-50. Tian QE, Li ML. The effect factors of transplantation after human tumor cell suspension inoculated subcutaneously into nude mice [J]. Lab Anim Sci Manage, 2004, 21(3): 47-50.
- [4] 施新猷,王四旺,顾为望,等. 比较医学 [M]. 西安:陕西科学技术出版社, 2003. Shi XY, Wang SW, Gu WW, et al. Comparative Medicine [M]. Xi'an: Shaanxi, Science and Technology Press, 2003.
- [5] Morrison JA, Pike LA, Lund G, et al. Characterization of thyroid cancer cell lines in murine orthotopic and intracardiac metastasis models [J]. Horm Cancer, 2015, 6(2-3): 87-99.
- [6] Zhang L, Gaskins K, Yu Z, et al. An in vivo mouse model of metastatic human thyroid cancer [J]. Thyroid, 2014, 24(4): 695-704.
- [7] 彭秀华,沈艳,徐春华,等. 裸大鼠人高转移肝癌皮下和原位移植模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(1): 33-37. Peng XH, Shen Y, Xu CH, et al. Establishment of subcutaneous and orthotopic transplant tumor model of hepatocellular carcinoma cell line with high metastatic potential in nude rat [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31(1): 33-37.
- [8] 贾罗琦,王超,程明军,等. 裸大鼠人乳腺癌皮下移植瘤模型的建立和评价 [J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41(5): 685-689. Jia LQ, Wang C, Cheng MJ, et al. Establishment and evaluation of the animal model of human breast carcinoma with nude rats [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2014, 41(5): 685-689.
- [9] Vercio J, Johnston W, Frost M, et al. Inhaled submicron particle Paclitaxel (NanoPac) induces tumor regression and immune cell infiltration in an orthotopic athymic nude rat model of non-small cell lung cancer [J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2019, 32(5): 266-277.
- [10] 沈艳,周文江,杨永昕,等. 裸大鼠生物学特性的初步观测 [J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(1): 44-47. Shen Y, Zhou WJ, Yang YX, et al. Preliminary observation of biological characteristics of nude rats [J]. Lab Anim Comp Med, 2009, 29(1): 44-47.
- [11] 李轩,赵占吉,范筱勇,等. 血清促甲状腺激素浓度与分化型

- 甲状腺癌的关系研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35 (2): 107-109.
- Li X, Zhao ZJ, Fan XY, et al. Study on correlation between thyroid stimulating hormone and differentiated thyroid cancer [J]. Chin J Biol Med, 2015, 35(2): 107-109.
- [12] 董天思. 促甲状腺激素(TSH)对裸鼠甲状腺乳头状癌组织的影响及意义[D]. 石家庄:河北医科大学, 2016.
- Dong TS. Effect of thyroid stimulating hormone (TSH) on the growth of thyroid papillary carcinoma in nude mice [D]. Shijiazhuang: Hebei Med Univ, 2016.
- [13] 张蓉, 俞立波, 李梅芳, 等. 具有摄碘功能甲状腺乳头状癌移植瘤裸鼠模型的建立 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30 (9): 775-778.
- Zhang R, Yu LB, Li MF, et al. Establishment of nude mice xenograft model of papillary thyroid carcinoma with the ability of ^{99m}Tc -intake [J]. Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30(9): 775-778.
- [14] Kim HI, Jang HW, Ahn HS, et al. High serum TSH level is associated with progression of papillary thyroid microcarcinoma during active surveillance [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(2): 446-451.
- [15] Demir S, Üñibol M, Aypak SÜ, et al. Histopathologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease in hypothyroidism-induced rats [J]. Int J Endocrinol, 2018, 103(2): 446-451.
- [16] 孟召伟, 贾强, 王深, 等. 核因子- κB 抑制剂增强 ^{131}I 治疗甲状腺癌疗效的裸鼠实验研究 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(2): 129-133.
- Meng SW, Jia Q, Wang S, et al. Enhancement of ^{131}I therapeutic efficacy on differentiated thyroid cancer by nuclear factor- κB inhibitor in nude mice [J]. Chin J Nucl Med Mol Imag, 2013, 33(2): 129-133.
- [17] da Conceição RR, Laureano-Melo R, Oliveira KC, et al. Antidepressant behavior in thyroidectomized Wistar rats is induced by hippocampal hypothyroidism [J]. Physiol Behav, 2016, 157: 158-164.
- [18] Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, et al. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2009, 46(5-6): 302-318.
- [19] Laurberg P, Bülow Pedersen I, Knudsen N, et al. Environmental iodine intake affects the type of nonmalignant thyroid disease [J]. Thyroid, 2001, 11(5): 457-469.
- [20] Burgess JR, Dwyer T, McArdle K, et al. The changing incidence and spectrum of thyroid carcinoma in Tasmania (1978-1998) during a transition from iodine sufficiency to iodine deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(4): 1513-1517.
- [21] Bacher-Stier C, Riccabona G, Tötsch M, et al. Incidence and clinical characteristics of thyroid carcinoma after iodine prophylaxis in an endemic goiter country [J]. Thyroid, 1997, 7 (5): 733-741.
- [22] Zhang J, Zhang XC, Li YN, et al. Low dose of Bisphenol A enhance the susceptibility of thyroid carcinoma stimulated by DHPN and iodine excess in F344 rats [J]. Oncotarget, 2017, 8 (41): 69874-69887.
- [23] 朱林波, 李鹏飞, 张鹏斌. 碘营养失衡与甲状腺癌的关系 [J]. 浙江医学, 2018, 40(14): 1644-1646, 1650.
- Zhu LB, Li PF, Zhang PB. Relationship between iodine imbalance and thyroid cancer [J]. Zhejiang Med J, 2018, 40 (14): 1644-1646, 1650.
- [24] Shin HR. Global activity of cancer registries and cancer control and cancer incidence statistics in Korea [J]. J Prev Med Public Health, 2008, 41(2): 84-91.
- [25] Kim HJ, Kim NK, Park HK, et al. Strong association of relatively low and extremely excessive iodine intakes with thyroid cancer in an iodine-replete area [J]. Eur J Nutr, 2017, 56(3): 965-971.

[收稿日期] 2019-06-15

《中国实验动物学报》2019 年总目次

2019 年 第 27 卷 1~6 期

第 1 期

小鼠后肢特异表达基因的筛选及验证 王茂春,段维旺,李凯,周宇荀,肖君华(1)

基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 王洁,赵宁宁,张彩勤,赵勇,谭邓旭,吴朋朋,赵菊梅,师长宏(7)

布比卡因致心肌细胞线粒体损伤大鼠模型的建立 张颖颖,段然,陈永学,赵森明,夏登云(13)

大鼠恐惧应激模型的建立及其视觉认知效果分析 李晓媛,周星,武鹏,刘强,王振龙(19)

一种新型高脂血症易感大鼠的血脂水平及心血管并发症 马全鑫,陈姣姣,郁晨,张利棕,寿旗扬,陈民利(25)

大鼠慢性进行性肾病的病理学特点 王贝贝,吴文玉,赵蕾,左从林,张惠铭(32)

生理盐水实验性干预对肉鸡盲肠微生物区系和短链脂肪酸含量的影响 宫玉杰,邹晓庭,肖英平,夏文锐,温雪婷,杨华(38)

足底电击法诱导大鼠内脏高敏感模型的建立和评价 赵磊,李希,袁建业,林江(46)

姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型肾纤维化的保护作用 严颖,谭睿陟,赵长英,李健春,钟霞,王露,林晓,王丽(52)

通过烟熏和间歇低氧构建大鼠 COPD-OSAHS 重叠综合征模型 陈敏,黄照明,何剑,毕虹,王清,何乐伟,杜俊毅,周开华,金志贤(59)

黄芪对高血压大鼠血管重构中内质网应激反应的影响 顾静,郭超,车敏,吴红彦,李海龙(65)

基于高通量测序的不同年龄恒河猴肠道菌群结构差异分析 朱华,肖冲,尚海泉,郭亚茜,杜晓鹏,秦川(72)

药物涂层球囊微粒兔肾栓塞风险的探讨 宋精忠,龙汉,刘艳芬,王阁奇,江巍,王刚(79)

木豆素对慢性不可预见温和应激小鼠的抗抑郁作用 张梦荻,王丽莎,李晨晨,陶雪,周云丰,刘新民,潘瑞乐,常琪(85)

尼罗红示踪纳米制剂在荷瘤裸鼠体内活体成像的应用 张凤梅,李可欣,余忠姝,张景劼,潘永全,韩文莉(91)

广西巴马小型猪 *CTSK* 基因 CDS 区克隆与生物信息学分析 黄叶,瞿秋红,奉玲丽,江雨航,朱思燃,张广杰,张其伟,蔡文晶,郭亚芬,兰千球(96)

我国实验小型猪的发展现状及展望 石兴勇,王吉,陈斌(104)

异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展 梁娟,刘越,尹新华(110)

STORM 和 STED 成像技术特点的比较 宗艾伦,周迎生(115)

大鼠肝癌模型建立的研究进展 韦武,郭红星(119)

以肠道菌群为靶向的粪菌移植法及其在畜牧业的应用潜能 李晓蕾,李地艳,孙静(124)

第 2 期

合子基因 *mcm3* 在斑马鱼肝早期发育中的作用* 刘敏,何兴,蒲晓华,张雨,陈炳宇,黄四洲(129)

虹鳟肝组织新转录本分析及基因结构优化 马芳,刘哲,康玉军,权金强(135)

利用黑斑双鳍电鳐构建实验性自身免疫性重症肌无力小鼠模型 李志彬,李毅,金宛霖,杨树梅,孟环宇,胡波,徐立群,罗朝辉,杨欢(143)

三七总皂苷对斑马鱼胚胎初级和次级造血的抑制作用* 孙一涵,毛爱华,王强(148)

生长激素促进斑马鱼尾鳍的再生* 刘雪静,王雪雯,石运伟,王新,高煜,刘东(154)

减蛋综合征病毒在不同品系小鼠体内的组织分布 范涛,梁琳,李嘉阳,李刚(160)

小鼠休眠胚胎与正常胚胎冻融后体内外发育潜力的比较 陈超磊,芦天罡,倪和民,盛熙晖,王相国,齐晓龙,邢凯,刘云海,郭勇(167)

泼尼松龙致不同品系小鼠药源性证候的比较 钱宏梁,潘志强,彭佩克,卢涛,钱杨杨,宋秋佳,费敏红,方肇勤(173)

大鼠冠状病毒和仙台病毒的双重 PCR 检测方法的建立与应用 孟钰榕,郑龙,祝岩波,王璇,尤红煜,刘健敏,栗彦宁,连伟光,张东明,王俊霞(181)

一种皮肤型狼疮小鼠模型的鉴定 钟荣玉,段新旺,牛海涛(187)

血栓调节蛋白在大鼠深静脉血栓模型中的表达及其意义 成曦,孙宝兰,苏张瑶,张玉泉(193)

主要组织相容性复合体单倍型鸭抗原处理相关转运体单抗的制备 王兴童,孟兴,佟相慧,陈洪岩,韩凌霄(200)

二苯乙烯苷抑制 NADPH 氧化酶对小鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用 薛威,唐虹,孙雨倩,江勤,黄大可,董六一(208)

沉默 *Wnt4* 基因抑制大鼠肾间质纤维化 杨阳,白海涛,李玲,陈美雪(215)

重组 CC16 蛋白对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织结构及 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 房晨阳,周霞,杨艳珍,梁李娟,庞敏,王文桃,孙佳,刘宏延,王海龙(222)

常见 SPF 级小鼠和大鼠肠道菌群多样性研究 黄树武,闵凡贵,王静,潘金春(229)

采样参数设置对小鼠心电图波形的影响 孙权,邱雪婷,李传昶,周正适(236)

斑马鱼胚胎背腹轴建立的分子机制* 闫一芳,王强(242)

斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展* 彭伟,张文娟,薛钰(248)

A 型流感病毒感染雪貂造模的研究进展 马树杰,张博,孔宇飞,关云涛(254)

海分枝杆菌-斑马鱼模型的抗结核研究进展* 刘红旭,何树梅,张舒林(261)

白血病小鼠模型的建立与应用进展 马畅,郭健敏,谢松强,杨威(266)

*“斑马鱼发育和遗传”专题

第 3 期

利用CRISPR/Cas9 技术产生肌肉特异表达 Cas9 的小鼠胚胎 李昊,陈胜男,李松美,朴善花,安铁洙,王春生(271)

响应性聚集金纳米粒子体系用于细菌的体外热疗研究 付超,常静林,姜轩,张从柔,张玉民,褚丽萍,赵瑞利(278)

心肌组织特异性 *Isca1* 敲除造成新生大鼠心脏结构异常 杨辛兰,吕丹,张旭,董伟,陈炜,高珊,高凯,史旭东,马元武,张连峰(286)

经肠道播散诱导内源性感染小鼠模型的建立及评价 叶先飞,陈丽,王若南,葛超荣,陈瑜(291)

X 线全身照射对 2 型糖尿病 KKAy 小鼠造血免疫系统功能的影响 党女,卢延华,管博文,苏路路,李程程,荣利,王小春,孟爱民(298)

淫羊藿苷及宝藿苷 I 对气管切开模型大鼠肺组织病理学及炎症因子的影响 鞠静,彭玲玲,潘宇政,谭人千,潘茂华,韦进新(305)

骨形态发生蛋白 9 基因敲除小鼠的构建 周珂,辛智倩,刘佩娟,马翠,师长宏,王华,张海(311)

微弧氧化和碱处理技术在多孔铝修复兔颅骨缺损中的应用 李振宗,薛亚虹,高华(316)

Fancm 基因敲除小鼠构建及其表型分析 杨桥,郭红刚,楼琦,柯贤福,周文伟,应华忠,俞冰,张婷婷(323)

瘦素受体基因敲除 SD 大鼠的表型及病理观察 蒋丹丹,曹兰凤,许朝霞,李硕,董晓辉,姚芳,张连珊(331)

白毛黑眼兔与日本大耳白兔胰岛素抵抗动脉粥样硬化模型的比较 刘军平,潘永明,陈民利,朱科燕,蔡月琴,吕涛,黄俊杰(339)

周脂素在糖尿病肾病大鼠肾组织中的表达 卫兵艳,樊林花,刘茂林,轩瑞晶,刘田福(347)

猪圆环病毒 3 型感染 BALB/c 小鼠的实验观察 张超林,刘攀,沈萌,王妍,王娟,颜世君,严权斌,邓均华,孙哲,郭小参,王同燕,李向东,田克恭(353)

低氟铝长期与高氟铝短期暴露后大鼠骨生长的比较研究 黄连芳,陈艳(359)

基于高通量测序技术测定普通棉耳狢猴粪便微生物多样性 张飞燕,金洁,刘超,王芸,谢丽分,张晓迪,郭继文,吕龙宝(366)

椎间盘退变动物模型的研究进展 海宝,祝斌,刘晓光(374)

孤独症谱系障碍动物模型研究进展 周荣易,党伟利,周正,李华伟,张晰(380)

钙调蛋白激酶Ⅱ在神经病理痛中的作用及其痛觉调控通路概况 邵昭霞,费雪瑜,何晓芬,瞿思颖,王涵芝,方剑乔,蒋永亮(387)

6 Hz 角膜点燃癫痫动物模型的研究进展 高青,曾贵荣,欧阳冬生(393)

腰痛相关动物模型的研究进展 李赫桐,勾禹,田发明,张柳(399)

犬髋关节发育不良数量性状位点及致病基因研究进展 肖启程,彭广能,刘海峰,周紫峒,马晓平,钟志军(405)

胃排空检测方法的研究及展望 陈学艳,王立振,廖中华,刘娟(410)

第 4 期

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,颜光玕(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,朱镡鑫,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 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,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,全品芬,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,全品芬,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}/PS1ΔE9* 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(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)

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)

* :非人灵长类动物模型研究及其应用

第 5 期

受体相互作用蛋白激酶-3 参与甲型流感病毒 H1N1 感染 C57BL/6 小鼠诱导特异性 CD8⁺T 细胞应答* 秦波音,王超,刘洋,谭丹,方钟,李顺,周晓辉(549)

A/Guangdong/Th005/2017(H7N9) 禽流感病毒对禽类致病力的研究* 吕琦,李枫棣,龚姝然,戚菲菲,王顺意,王冠澎,姜静,鲍琳琳(555)

甲型流感病毒 H1N1 pdm09 与 PR8 感染 C57BL/6 小鼠诱生特异性 CD8 ⁺ T 细胞免疫应答的比较研究*	王超, 刘洋, 秦波音, 任晓楠, 谭丹, 杨华, 李顺, 周晓辉 (561)
A 型流感病毒感染 BALB/c 小鼠炎症模型的建立*	孙海伟, 史馨瑾, 陈艳艳, 钟秋萍, 张萌, 吕璐, 王俊, 陈鸿军 (571)
非人灵长类单侧脑损伤模型运动感知行为的评价研究	黄忠强, 刘书华, 关雅伦, 李韵峰, 李雪娇, 黄韧, 张钰, 李舸 (577)
利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 <i>FcγR</i> 基因大片段敲除小鼠模型	吴曦, 霍桂桃, 刘颍苏, 谷文达, 曹愿, 柳全明, 吕建军, 范昌发 (583)
参苓芩口服液对 <i>App/Ps1</i> 双转基因小鼠早期海马突触和髓鞘改变的影响	巩卓彦, 黄帅阳, 陈芳, 盛宁, 冯慧利, 董云芳, 任映, 杨金铎, 王蓬文 (592)
两种乙肝肝纤维化小鼠复合模型的比较	黄恺, 孙鑫, 赵志敏, 彭渊, 陶艳艳, 刘成海 (598)
金黄色葡萄球菌感染小鼠乳房炎模型的建立及 IL-2 和 IL-4 的变化	吕琛, 张全伟, 王琪, 张勇, 马友记, 赵兴绪 (604)
<i>L</i> -精氨酸在实验室果蝇扩繁中的应用	赵国栋, 陈晖, 邵建翔, 马晨, 阿依先木·米吉提, 艾则孜·阿布都克依木, 李晓斌 (612)
经皮致敏小鼠肠道过敏模型的建立与评价	费巧玲, 齐睿娟, 张小雨, 高源, 韩宜芯, 李西蒙, 蔡润兰, 齐云 (619)
自发性糖尿病食蟹猴的诊断及其骨微结构的改变	贾欢欢, 罗晓玲, 高洪彬, 梁十, 罗挺, 陈结文, 何积存, 黄庆宇, 李永锋, 卢丽, 陈梅丽 (626)
参仁活血颗粒对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 TGF-β1/Smad 信号通路的影响	彭孟云, 陈然, 朱晓宁, 汪静 (631)
富硒米糠代替有机硒对实验仔兔生长性能和抗氧化功能的影响	韩志刚, 何明忠, 何丽雯, 曹科, 谭毅, 谭冬梅 (637)
β-氨基丙腈诱导鼠夹层动脉瘤动物模型的建立	马晓中, 张韶鹏, 王菁, 姜楠, 陈庆良 (644)
基于 Bcl-2/Bec1n-1 复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用	丁实, 赵学荣, 李宝群, 赵亮, 周健, 毕红东, 庞冲, 郭娜娜 (651)
缺血再灌注脊髓损伤动物造模研究进展	王雨榕, 邓强, 郭铁峰, 彭冉东, 李军杰, 徐浩军 (658)
基于 PDX 模型的胃癌转移相关基因研究进展	王洁, 赵菊梅, 魏晓丽, 师长宏 (663)
持续性高+Gz 加速度生理响应的动物实验研究进展	贾谊, 郭宇, 李志利, 刘书娟 (668)
大鼠间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征模型建立的研究进展	张威, 孟令峰, 刘晓东, 王佳文, 张耀光 (673)
造影剂肾病动物模型研究进展	张志明, 林开阳, 林茂强, 徐家豪, 严晗, 陈汉川, 王孙荃, 陈希男, 刘东辉, 郭延松 (678)
*: 感染动物模型与生物安全专题	

第 6 期

紫苏籽提取物在 ApoE ^{-/-} 小鼠中的抗动脉粥样硬化和心脏保护作用	郑双, 谭伟江, 李想, 马俊峰, 任学聪, 郑凌云, 王丽京, 杨丰华, 黄韧 (683)
慢性光照联合氢醌诱导小鼠年龄相关性黄斑变性模型	张晶, 许凯, 梁洁, 陈强, 马群英, 梁丽娜 (692)
湿热泄泻模型大鼠的尿液代谢组学研究	彭晓婷, 马琪, 张晓松, 华永丽, 纪鹏, 姚万玲, 魏彦明 (700)
p38 MAPK 在腹泻型肠易激综合征大鼠中的变化及其免疫调控作用	郭军雄, 汪斌, 马丽, 康万荣, 许小敏, 徐生刚 (709)
冠心病病人肠道菌群小鼠模型的建立及评价	朱华, 李卓, 苏磊, 郭亚茜, 杜晓鹏, 袁建松, 秦川 (716)
三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究	苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 闫菲, 王晓梅, 韩福国, 刘清飞, 史云 (725)
红外热像技术在小鼠阳虚证研究中的运用及其评价体系	钱宏梁, 潘志强, 方肇勤 (733)
PM _{2.5} 短期暴露对大鼠子宫组织的损伤及其作用机制	张丰泉, 董恩恒, 薛玉雪 (740)
大鼠高尿酸血症模型的建立与研究	李媛媛, 周海燕, 吴绿英, 莫贤伟, 李晶 (747)
静脉注射针与自制 PE-50 管针头用于大鼠阴茎海绵体内压测定的比较	叶妙勇, 赵凡, 马轲, 张利棕, 方明笋, 寿旗扬, 马寅锋, 黄文杰, 吕伯东 (753)
青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 TRH mRNA 的原位杂交	梁志康, 冯静雯, 谢保胜 (760)
子午沙鼠与 SD 大鼠肾脏形态学特征的比较	袁江玲, 徐晓辉, 史深, 张燕, 徐艺玫 (765)
巨噬细胞条件性 Atg5 基因敲除小鼠的构建及鉴定	黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 杨陈, 汤济鑫, 安宁, 刘建兴, 刘华锋 (770)
改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型	黄文亭, 曾子纯, 王冬菊, 肖小敏 (776)

天麻芎芩止眩片对自发性与肾性高血压模型大鼠影响的比较研究 刘林,李弘,王宇红,任卫琼,简晓源,李苏,柏正平(781)

CBA/CaJ 和 C57BL/6J 小鼠全耳蜗毛细胞随着年龄增长不同损害模式的比较 周凌,宣伟军,丁大连(790)

激素性股骨头坏死动物模型的建立及评价 蒋玮,曹林忠,鄢明峻,张琪(799)

血管性痴呆大鼠模型的研究进展 刘伟,胡鹏,冯波(805)

脂肪间充质干细胞在动物模型中的应用进展 杜珍珍,徐郑美,司琳清,曹立明,刘庆,鲁文赓(810)

不同染毒方式构建镍损伤动物模型的研究进展 杨晶晶,陈慧(815)

人甲状腺癌细胞株移植免疫缺陷鼠建模的影响因素研究进展 朱丽茹,赵德善(821)

《中国实验动物学报》2019 年总目次 (826)

《ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA》
CUMMULATIVE TABLE OF CONTENTS

Vol.27 Issues 1–6 2019

Issue 1

Screening and verification of mouse hind limb-specific gene expression WANG Maochun, DUAN Weiwang, LI Kai, ZHOU Yuxun, XIAO Junhua(1)

Establishment of a nude mouse model of gastric cancer metastasis derived from clinical tumor specimens WANG Jie, ZHAO Ningning, ZHANG Caiqin, ZHAO Yong, TAN Dengxu, WU Pengpeng, ZHAO Jumei, SHI Changhong(7)

Establishment of a rat model of myocardial mitochondrial damage induced by bupivacaine ZHANG Yingying, DUAN Ran, CHEN Yongxue, ZHAO Senming, XIA Dengyun(13)

Establishment of a model of fear stress and its effects on visual cognition in rats LI Xiaoyuan, ZHOU Xing, WU Peng, LIU Qiang, WANG Zhenlong(19)

Blood lipid levels and cardiovascular complications in a new type of hyperlipidemia-susceptible rats MA Quanxin, CHEN Jiaojiao, YU Chen, ZHANG Lizong, SHOU Qiyang, CHEN Minli(25)

Pathological characteristics of chronic progressive nephropathy in rats WANG Beibei, WU Wenyu, ZHAO Lei, ZUO Conglin, ZHANG Huiming(32)

Effects of experimental intervention with normal saline on the microflora and short-chain fatty acid content in the cecum of broilers GONG Yujie, ZOU Xiaoting, XIAO Yingping, XIA Wenrui, WEN Xueting, YANG Hua(38)

Establishment and evaluation of a rat model of footshock-induced visceral hypersensitivity ZHAO Lei, LI Xi, YUAN Jianye, LIN Jiang(46)

Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease...YAN Ying, TAN Ruizhi, ZHAO Gangying, LI Jianchun, ZHONG Xia, WANG Lu, LIN Xiao, WANG Li(52)

Establishment of a rat model of COPD-OSAHS overlap syndrome induced by smoking and intermittent hypoxia CHEN Min, HUANG Zhaoming, HE Jian, BI Hong, WANG Qing, HE Lewei, DU Junyi, ZHOU Kaihua, JIN Zhixian(59)

Effect of Astragalus on endoplasmic reticulum stress during the vascular remodeling in hypertensive rats GU Jing, GUO Chao, CHE Min, WU Hongyan, LI Hailong(65)

Analysis of gut microbiomes of rhesus macaques of different ages by high-throughput sequencing ZHU Hua, XIAO Chong, SHANG Haiquan, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, QIN Chuan(72)

Exploration of the risk of renal embolization caused by drug-coated balloon particles in rabbits SONG Jingzhong, LONG Han, LIU Yanfen, WANG Geqi, JIANG Wei, WANG Gang(79)

Antidepressant effects of cajaninstilbene acid on chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice ZHANG Mengdi, WANG Lisha, LI Chenchen, TAO Xue, ZHOU Yunfeng, LIU Xinmin, PAN Ruile, CHANG Qi(85)

In vivo imaging of a Nile red-labeled nanoemulsion in tumor-bearing nude mice ZHANG Fengmei, LI Kexin, YU Zhongshu, ZHANG Jingqing, PAN Yongquan, HAN Wenli (91)

Cloning and bioinformatics analysis of CTSK CDS region in Guangxi Bama mini-pig HUANG Ye, QU Qiu hong, FENG Lingli, JIANG Yuhang, ZHU Siran, ZHANG Guangjie, ZHANG Qiwei, QI Wenjing, GUO Yafen, LAN Ganqiu(96)

Current status and prospect of research of experimental miniature swine in China SHI Xingyong, WANG Ji, CHEN Bin(104)

Research progress of animal models of myocardial injury induced by isoproterenol LIANG Juan, LIU Yue , YIN Xinhua(110)

Comparison of the characteristics of STORM and STED micro-imaging techniques ZONG Ailun, ZHOU Yingsheng(115)

Research progress in establishing rat liver cancer models WEI Wu, GUOHongxing(119)

Intestinal flora-targeted fecal microbiota transplantation and its potential applications in animal husbandry LI Xiaolei, LI Diyan, SUN Jing(124)

Issue 2

Role of zygotic *mcm3* in the early development of zebrafish liver LIU Min, HE Xing, PU Xiaohua, ZHANG Yu, CHEN Bingyu, HUANG Sizhou(129)

- Analysis of novel transcripts and optimization of the gene structure in the liver of rainbow trout
..... MA Fang, LIU Zhe, KANG Yujun, QUAN Jinqiang(135)
- Establishment of a mouse model of experimental autoimmune myasthenia gravis by using the *Nacrine maculata* electric organ
..... LI Zhibin, LI Yi, JIN Wanlin, YANG Shumei, MENG Huanyu, HU Bo, XU Liqun, LUO Zhaohui, YANG Huan(143)
- Panax notoginsenosides* inhibit primitive and definitive hematopoiesis during the zebrafish embryonic development
..... SUN Yihan, MAO Aihua, WANG Qiang(148)
- Growth hormone promotes regeneration of the zebrafish caudal fin
..... LIU Xuejing, WANG Xuwen, SHI Yunwei, WANG Xin, GAO Yu, LIU Dong(154)
- Tissue distribution of the egg drop syndrome virus in different mouse strains FAN Tao, LIANG Lin, LI Jiayang, LI Gang(160)
- Comparison of the in vivo and in vitro developmental potential of dormant and normal mouse embryos before and after cryopreservation
CHEN Chaolei, LU Tiangang, NI Hemin, SHENG Xihui, WANG Xiangguo, QI Xiaolong, XING Kai, LIU Yunhai, GUO Yong(167)
- Comparison of the prednisolone-induced syndromes in different strains of mice
..... QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang, PENG Peike, LU Tao, QIAN Yangyang, SONG Qiuqia, FEI Minghong, FANG Zhaoqin(173)
- Establishment and application of a duplex PCR assay for detection of Rat coronavirus and Sendai virus
..... MENG Yurong, ZHENG Long,
ZHU Yanbo, WANG Xuan, YOU Hongyu, LIU Jianmin, LI Yanning, LIAN Weiguang, ZHANG Dongming, WANG Junxia(181)
- Identification of a new mouse model of cutaneous lupus erythematosus ZHONG Rongyu, DUAN Xinwang, NIU Haitao(187)
- Expression and significance of thrombomodulin in a rat model of deep-vein thrombosis
..... CHENG Xi, SUN Baolan, SU Zhangyao, ZHANG Yuquan(193)
- Preparation of a monoclonal antibody against transporter associated with antigen processing in MHC haplotype SPF ducks
..... WANG Xingtong, MENG Xing, TONG Xianghui, CHEN Hongyan, HAN Lingxia(200)
- Tetrahydroxystilbene glucoside protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting expression of NADPH oxidase in mice
..... XUE Wei, TANG Hong, SUN Yuqian, JIANG Qin, HUANG Dake, DONG Liuyi(208)
- Silencing Wnt4 inhibits renal interstitial fibrosis in rats YANG Yang, BAI Haitao, LI Ling, CHEN Meixue(215)
- Effect of rCC16 protein on the lung histology and expressions of MMP-9 and TIMP-1 in mice with chronic obstructive pulmonary disease
..... FANG Chenyang,
ZHOU Xia, YANG Yanzhen, LIANG Lijuan, PANG Min, WANG Wentao, SUN Jia, LIU Hongyan, WANG Hailong(222)
- Diversity of intestinal flora in commonly used SPF mice and rats
..... HUANG Shuwu, MIN Fangui, WANG Jing, PAN Jinchun(229)
- Effects of sampling parameters on electrocardiogram waveforms in mice
..... SUN Quan, QIU Xueting, LI Chuanchang, ZHOU Zhengshi(236)
- Molecular nature of dorsal-ventral patterning in the zebrafish embryo YAN Yifang, WANG Qiang(242)
- Research progress of zebrafish models of bone diseases PENG Wei, ZHANG Wenjuan, XUE Yu(248)
- Research progress of ferret models of influenza A virus infection MA Shujie, ZHANG Bo, KONG Yufei, GUAN Yuntao(254)
- Progress in the anti-tuberculosis research of the zebrafish model of *Mycobacterium marinum*-tuberculosis
..... LIU Hongxu, HE Shumei, ZHANG Shulin(261)
- Research progress in establishment and application of mouse models of leukemia
..... MA Chang, GUO Jianmin, XIE Songqiang, YANG Wei(266)

Issue 3

- Generation of muscle-specific gene-targeted mouse embryos expressing Cas9 protein
..... LI Hao, CHEN Shengnan, Li Songmei, PIAO Shanhua, AN Tiezhu, WANG Chunsheng(271)
- Responsive aggregation of gold nanoparticles system for photothermal therapy of bacteria *in vitro*
..... FU Chao, CHANG Jinglin, JIANG Xuan, ZHANG Congrou, ZHANG Yumin, CHU Liping, ZHAO Ruili(278)
- Isc1* myocardial conditional knockout results in cardiac structural abnormalities in newborn rats YANG Xinlan,
LYU Dan, ZHANG Xu, DONG Wei, CHEN Wei, GAO Shan, GAO Kai, SHI Xudong, MA Yuanwu, ZHANG Lianfeng(286)
- Establishment and evaluation of a mouse model of endogenous infection induced by intestinal dissemination
..... YE Xianfei, CHEN Li, WANG Ruonan, GE Chaorong, CHEN Yu(291)
- Effects of X-ray whole body irradiation on the hematopoietic immune system in KKAY mice with type 2 diabetes mellitus
..... DANG Nv, LU Yanhua, GUAN Bowen, SU Lulu, LI Chengcheng, RONG Li, WANG Xiaochun, MENG Aimin(298)
- Effects of icariin and baohuoside I on the pathological changes and inflammatory factors in tracheotomized rats
..... JU Jing, PENG Lingling, PAN Yuzheng, TAN Renqian, PAN Maohua, WEI Jinxin(305)
- Construction of bone morphogenetic protein 9-knockout mice
..... ZHOU Ke, XIN Zhiqian, LIU Peijuan, MA Cui, SHI Changhong, WANG Hua, ZHANG Hai(311)

Application of micro-arc oxidation and NaOH treatment in the repair of rabbit skull defect using bioactive tantalum metal	LI Zhenzong, XUE Yake, GAO Hua(316)
Generation and phenotypic analysis of <i>Fancm</i> gene knockout mice	YANG Qiao, GUO Honggang, LOU Qi, KE Xianfu, ZHOU Wenwei, YING Huazhong, YU Bing, ZHANG Tingting (323)
Phenotype and pathological observation of leptin receptor-knockout SD rats	JIANG Dandan, CAO Lanfeng, XU Zhaoxia, LI Shuo, DONG Xiaohui, YAO Fang, ZHANG Lianshan(331)
Comparison of the WHBE and Japanese white rabbit models of insulin resistance atherosclerosis	LIU Junping, PAN Yongming, CHEN Minli, ZHU Keyan, CAI Yueqin, LYU Tao, HUANG Junjie(339)
Evaluation of perilipin expression in the kidney tissues of rats with diabetic nephropathy	WEI Bingyan, FAN Linhua, LIU Maolin, XUAN Ruijing, LIU Tianfu(347)
Porcine circovirus 3 infection in BALB/c mice	ZHANG Chaolin, LIU Pan, SHEN Meng, WANG Yan, WANG Juan, YAN Shijun, YAN Quanbin, DENG Junhua, SUN Zhe, GUO Xiaocan, WANG Tongyan, LI Xiangdong, TIAN Kegong(353)
Comparison of the bone growth in rats after short-term exposure to high fluoride and aluminum and long-term exposure to low fluoride and aluminum	HUANG Lianfang, CHEN Yan(359)
Analysis of microbial diversity in feces of the common cotton-eared marmosets by high-throughput sequencing	ZHANG Feiyan, JIN Jie, LIU Chao, WANG Yun, XIE Lifan, ZHANG Xiaodi, WU Jiwen, LYU Longbao(366)
Current status of research on animal models of intervertebral disc degeneration	HAI Bao, ZHU Bin, LIU Xiaoguang(374)
Advances in research of animal models of autism spectrum disorders	ZHOU Rongyi, DANG Weili, ZHOU Zheng, LI Huawei, ZHANG Xi(380)
Role of calmodulin kinase II in neuropathic pain and its pathway of pain regulation	TAI Zhaoxia, FEI Xueyu, HE Xiaofen, QU Siying, WANG Hanzhi, FANG Jianqiao, JIANG Yongliang(387)
Research progress of the 6 Hz corneal kindling seizure animal models	GAO Qing, ZENG Guirong, OU-YANG Dongsheng(393)
Research progress on animal models of low-back pain	LI Hetong, GOU Yu, TIAN Faming, ZHANG Liu(399)
Recent advances in understanding of quantitative trait loci and pathogenic genes associated with canine hip dysplasia	XIAO Qicheng, PENG Guangneng, LIU Haifeng, ZHOU Ziyao, MA Xiaoping, ZHONG Zhijun(405)
Methods and perspectives of application of gastric emptying detection techniques in laboratory animals	CHEN Xueyan, WANG Lizhen, LIAO Zhonghua, LIU Juan(410)

Issue 4

Effect of Smad2/3a on the expression of the neural crest cell marker <i>crestin</i> 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 <i>Hif-α</i> in schizothoracine fish	WU Rongrong, CHAO Yan, ZHAO Yongli, CHEN Qichang, ZHENG Zhiqin, XIA Mingzhe, QI Delin(433)
Effects of chronic PM2.5 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 <i>Tyr</i> 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)

Issue 5

- Receptor-interacting protein 3 plays a role in the induction of influenza viral antigen specific CD8⁺T cell responses in C57BL/6 mice
 upon H1N1 influenza virus infection
 QIN Boyin, WANG Chao, LIU Yang, TAN Dan, FANG Zhong, LI Shun, ZHOU Xiaohui(549)
- The virulence of A/Guangdong/Th005/2017(H7N9) influenza virus in poultry
 LYU Qi, LI Fengdi, GONG Shuran, QI Feifei, WANG Shunyi, WANG Guanpeng, JIANG Jing, BAO Linlin(555)
- Comparative study on immune responses of specific CD8⁺T cells induced by influenza A virus H1N1 PR8 and pdm09 in C57BL/6 mice
 WANG Chao, LIU Yang, QIN Boyin, REN Xiaonan, TAN Dan, YANG Hua, LI Shun, ZHOU Xiaohui(561)
- Establishment of a BALB/c mouse model of influenza A virus-induced inflammation
 SUN Haiwei, SHI Xinjin, CHEN Yanyan, ZHONG Qiuping, ZHANG Meng, LYU Lu, WANG Jun, CHEN Hongjun(571)
- Investigation of evaluation method for motion and perception behavior in a nonhuman primate unilateral brain injury model
 HUANG Zhongqiang, LIU Shuhua, GUAN Yalun, LI Yunfeng, LI Xuejiao, HUANG Ren, ZHANG Yu, LI Ge(577)
- Establishment of a large fragment Fc γ R gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique
 WU Xi, HUO Guitao, LIU Susu, GU Wenda, CAO Yuan, LIU Quanming, LYU Jianjun, FAN Changfa(583)
- Effect of Shenzhiling oral liquid on early hippocampal synapses and myelin sheath alterations in App/Ps1 transgenic mice
 GONG Zhuoyan,
 HUANG Shuaiyang, CHEN Fang, SHENG Ning, FENG Huili, DONG Yunfang, REN Ying, YANG Jinduo, WANG Pengwen(592)
- Comparison of two composite mouse models of hepatitis B fibrosis
 HUANG Kai, SUN Xin, ZHAO Zhimin, PENG Yuan, TAO Yanyan, LIU Chenghai(598)
- Establishment of a mouse model of mastitis with Staphylococcus aureus infection and its changes of IL-2 and IL-4 expression
 LYU Chen, ZHANG Quanwei, WANG Qi, ZHANG Yong, MA Youji, ZHAO Xingxu(604)
- Application of L-arginine in laboratory Drosophila melanogaster propagation
 ZHAO Guodong, CHEN Hui, SHAO Jianxiang, MA Chen, Ayixianmu·MJT, Aizezi·ABDKYM, LI Xiaobin(612)
- Establishment and evaluation of a mouse model of intestinal allergy by epicutaneous sensitization
 FEI Qiaoling, QI Ruijuan, ZHANG Xiaoyu, GAO Yuan, HAN Yixin, LI Ximeng, CAI Runlan, QI Yun(619)
- Diagnosis of and bone microstructure in spontaneous diabetic cynomolgus monkeys JIA Huanhuan, LUO Xiaoling,
 GAO Hongbin, LIANG Shi, LUO Ting, CHEN Jiewen, HE Jicun, Huang Qingyu, LI Yongfeng, LU Li, CHEN Meili(626)
- Effect of Shenren Huoxue granules on the TGF- β 1/Smad signaling pathway in CCl₄-induced liver fibrosis in rats
 PENG Mengyun, CHEN Ran, ZHU Xiaoning, WANG Jing(631)
- Using selenium-enriched rice bran to replace organic selenium and its effect on growth performance and antioxidant function in weaned
 rabbits HAN Zhigang, HE Mingzhong, HE Liwen, CAO Ke, TAN Yi, TAN Dongmei(637)
- β -Aminopropionitrile-induced rodent models of aortic dissecting aneurysm
 MA Xiaozhong, ZHANG Shaopeng, WANG Jing, JIANG Nan, CHEN Qingliang(644)
- Protective effect of berberine on the cerebral ischemia-reperfusion injury in rats based on Bcl-2/Beclin-1 complex
 DING Shi, ZHAO Xuerong, LI Baoqun, ZHAO Liang, ZHOU Jian, BI Hongdong, PANG Chong, GUO Nana(651)
- Research progress in the establishment of animal models of spinal cord ischemia-reperfusion injury
 WANG Yurong, DENG Qiang, GUO Tiefeng, PENG Randong, LI Junjie, XU Haojun(658)
- Research of metastasis-related genes based on the patient-derived gastric cancer xenograft model
 WANG Jie, ZHAO Jumei, WEI Xiaoli, SHI Changhong(663)

Progress in animal experimental research on the physiological response to persistent high +Gz acceleration	JIA Yi, GUO Yu, LI Zhili, LIU Shujuan(668)
Research progress in the establishment of rat models of interstitial cystitis/bladder pain syndrome	ZHANG Wei, MENG Lingfeng, LIU Xiaodong, WANG Jiawen, ZHANG Yaoguang(673)
Research progress in establishing contrast-induced nephropathy animal models	ZHANG Zhiming, LIN Kaiyang, LIN Maoqiang, XU Jiahao, YAN Han, CHEN Hanchuan, WANG Sunying, CHEN Xinan, LIU Donghui, GUO Yansong(678)

Issue 6

Anti-atherosclerotic and cardioprotective effects of perilla seed extract on ApoE ^{-/-} mice	ZHENG Shuang, TAN Weijiang, LI Xiang, MA Junfeng, REN Xuecong, ZHENG Lingyun, WANG Lijing, YANG Fenghua, HUANG Ren(683)
A novel murine model of age-related macular degeneration induced by combined chronic exposure to light and hydroquinone	ZHANG Jing, XU Kai, LIANG Jie, CHEN Qiang, MA Qunying, LIANG Lina(692)
Urine metabolomics in the rat model of damp-heat diarrhea	PENG Xiaoting, MA Qi, ZHANG Xiaosong, HUA Yongli, JI Peng, YAO Wanling, WEI Yanming(700)
Immunoregulatory effects of the p38 MAPK-signaling pathway in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome	GUO Junxiong, WANG Bin, MA Li, KANG Wanrong, XU Xiaomin, XU Shenggang(709)
Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease	ZHU Hua, LI Zhuo, SU Lei, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, YUAN Jiansong, QIN Chuan(716)
Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency	SU Xianzhi, LIU Yifei, KONG Wenjuan, YAN Fei, WANG Xiaomei, HAN Fuguo, LIU Qingfei, SHI Yun(725)
Application of infrared thermography in the evaluation of mouse Yangxu Syndrome and its evaluation criteria	QIAN Hongliang, PAN Zhiqiang, FANG Zhaoqin(733)
Effect and mechanism of short-term exposure to PM _{2.5} on the rat uterine injury	ZHANG Fengquan, DONG Enheng, XUE Yuxue(740)
Establishment and study of a hyperuricemia rat model	LI Yuanyuan, ZHOU Haiyan, WU Lyuying, MO Xianwei, LI Jing(747)
Comparison of the use of intravenous infusion needle and self-made PE-50 tube needle in the measurement of intracavernosal pressure in rat penis	YE Miaoyong, ZHAO Fan, MA Ke, ZHANG Lizong, FANG Mingsun, SHOU Qiyang, MA Yinfeng, HUANG Wenjie, LYU Bodong(753)
In situ hybridization of TRH mRNA at different periods in the development of <i>Gymnocypis przewalskii</i>	LIANG Zhikang, FENG Jing wen, XIE Baosheng(760)
Morphological comparison of kidneys between <i>Meriones meridianus</i> and SD rats	YUAN Jiangling, XU Xiaohui, SHI Shen, ZHANG Yan, XU Yimei(765)
Construction and identification of macrophage-conditional Atg5-knockout mice	HUANG Xiaorong, HUANG Yanheng, YE Lin, YANG Chen, TANG Jixin, AN Ning, LIU Jianxing, LIU Huafeng(770)
Establishment of a rat model of pre-eclampsia via the improved method of reduced-uterine perfusion pressure	HUANG Wenting, ZENG Zichun, WANG Dongju, XIAO Xiaomin(776)
Comparison of the effects of Tianma Xiongling Zhixuan Tablet on the blood pressure in spontaneously and renal hypertensive rats	LIU lin, LI Hong, WANG Yuhong, REN Weiqiong, LIN Xiaoyuan, LI Su, BAI Zhengping(781)
Effect of Zhengqingfengtongning on the expression of aggrecanase-1 (ADAMTs-4) and aggrecanase-2 (ADAMTs-5) in the cartilage tissue of knee joint in rabbit models of osteoarthritis	ZHOU Ling, XUAN Weijun, DING Dalian(790)
Establishment and evaluation of animal models of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head	JIANG Wei, CAO Linzhong, WU Mingjun, ZHANG Qi(799)
Research progress of rat models of vascular dementia	LIU Wei, HU Peng, FENG Bo(805)
Progress in the application of adipose-derived mesenchymal stem cells in animal models	DU Zhenzhen, XU Zhengmei, SI Linqing, CAO Liming, LIU Qing, LU Wengeng(810)
Research progress on animal models of nickel-induced damages constructed using different poisoning methods	YANG Jingjing, CHEN Hui(815)
Analysis of factors influencing the modeling of immunodeficient mouse or rat models transplanted with human thyroid-cancer cell lines	ZHU Liru, ZHAO Deshan(821)

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”。