

王晓宇,马富强,张晓宁,等. 不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和微生物菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 1-9.

Wang XY, Ma FQ, Zhang XN, et al. Effects of chronic heterotypic intermittent stress stimulation on gastrointestinal immunity and microflora in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.001

不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和微生物菌群的影响

王晓宇¹,马富强²,张晓宁¹,何伟¹,宿杨帅¹,万红叶¹,胡玲¹,景向红^{1*}

(1.中国中医科学院针灸研究所,北京 100700; 2.洛阳市第一中医院,河南 洛阳 471000)

【摘要】 目的 通过对9 d不可预期应激刺激干预后大鼠的观察,分析不可预期应激刺激对胃肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供参考。**方法** 24只SD大鼠随机分为空白组和慢性应激模型组。模型组大鼠连续9 d接受不可预期应激刺激。造模完成后随机选择5只正常组和模型组大鼠,采集其粪便样本进行肠道微生物多样性分析。两组各12只大鼠中,随机选取4只进行灌流固定,取胃窦、结肠组织进行形态学观察;其余8只大鼠取血浆和肾上腺组织检测其中皮质酮的含量。**结果** (1)9 d不可预期应激刺激后,模型组大鼠9 d体重增值与正常组大鼠相比明显减少($P=0.001$),模型组大鼠肾上腺组织中皮质酮含量与正常组大鼠相比明显降低($P=0.006$);模型组大鼠血浆中皮质酮含量与正常组大鼠相比增加($P=0.025$)。(2)9 d后模型组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列较正常组稀疏,其厚度与正常组相比减少($P=0.034$);模型组大鼠的胃黏膜固有层中性粒细胞数量与正常组相比减少($P=0.016$);模型组大鼠的结肠黏膜中性粒细胞数量与正常组相比增多($P=0.013$)。3)经过9 d慢性不可预期应激,Alpha多样性分析显示,模型组大鼠粪便样本OTU中细菌种类与正常组大鼠相比明显增加($P=0.001$);其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科和螺杆菌科的占比与正常组大鼠相比增加($P=0.011, P=0.047$);模型组大鼠样本中类杆菌科的占比与正常组大鼠相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。**结论** 9 d不可预期应激刺激可以造成一个稳定的慢性应激大鼠模型,慢性应激所导致的免疫抑制与大鼠肠道微生物菌群失调伴随发生。

【关键词】 不可预期应激;慢性刺激;皮质酮;胃黏膜;肠道微生物菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0001-09

Effects of chronic heterotypic intermittent stress stimulation on gastrointestinal immunity and microflora in rats

WANG Xiaoyu¹, MA Fuqiang², ZHANG Xiaoning¹, HE Wei¹, SU Yangshuai¹,
WAN Hongye¹, HU Ling¹, JING Xianghong^{1*}

(1. Institute of Acupuncture and Moxibustion CACMS, Beijing 100700, China.
2. Luoyang No.1 Hospital of TCM, Luoyang 471000)

【Abstract】 Objective To observe the effects of chronic heterotypic intermittent stress (HIS) on the gastrointestinal immune system, particularly in terms of (1) the morphology of the gastric and colonic mucosa, and (2)

【基金项目】 国家自然科学基金(81674083)。

【作者简介】 王晓宇(1978—),女,副研究员,研究方向:针灸的效应及机制研究。E-mail: xiaorain_wang@hotmail.com

【通信作者】 景向红(1966—),女,研究员,研究方向:针灸作用机理研究。E-mail: jxhtjb@263.net

intestinal microbial diversity. **Methods** We randomly divided 24 SD rats into a control group and a model group. The rats in the model group received HIS for 9 days. After the 9 days of modeling, five rats in the control and model group were randomly selected, and fecal samples were collected for gut microbial diversity analysis. Four of the 12 rats from each of the two groups were randomly selected for perfusion and fixation, and tissues from the gastric antrum and colon were taken for morphological observation. Plasma and adrenal tissues were taken from the remaining eight rats for assessment of corticosterone content. **Results** (1) After 9 days of HIS, the rats in the model group had gained significantly less weight than those in the control group ($P=0.001$). Furthermore, the corticosterone content in adrenal tissue was significantly lower in the model group vs. the control group ($P=0.006$), and the corticosterone content in plasma was higher in the model group vs. the control group ($P=0.025$). (2) After HIS, the arrangement of gastric mucosal epithelial cells in the model group was thinner than that in the control group ($P=0.034$). Additionally, the number of neutrophils in the lamina propria of the gastric mucosa in the model group was lower than that in the control group ($P=0.016$). The number of neutrophils in the colonic mucosa in the model group was higher than that in the control group ($P=0.013$). (3) After 9 days of HIS, Alpha diversity analysis showed that the number of operational taxonomic units in the fecal samples from the model group was significantly higher than that in the control group ($P=0.001$). The proportion of desulfovibrionaceae and helicobacteraceae in the model group was higher than that in the control group ($P=0.011$, $P=0.047$). Furthermore, the proportion of bacteroidaceae in the model group was significantly lower than that in the control group ($P=0.001$). **Conclusions** Nine days of HIS induced a stable rat model of chronic stress in which chronic stress-induced immunosuppression occurred concomitantly with dysregulation of the gut microbial flora.

【Keywords】 heterotypic intermittent stress; chronic stress; corticosterone; gastric mucosa; intestinal microflora

急性的应激刺激可通过影响胃肠道血流、运动收缩功能而产生直接的作用^[1]。慢性应激刺激对胃肠道的影响与急性应激明显不同,其所致的焦虑和紧张可增加如腹泻^[2]、便秘、胀气和腹痛^[3]等状况^[4],因此较多的研究工作关注了慢性应激与功能性消化不良、肠易激综合征之间的联系^[5-6]。在慢性应激刺激对胃肠道产生影响的过程中,免疫系统^[7]和肠道微生物种群^[8]的改变也起到了重要的作用,但在目前动物实验中对这两方面内容的观察和系统研究比较少。

在研究慢性应激的动物实验中,为了避免神经内分泌系统对应激刺激的适应和习惯化,慢性应激模型的建立从单一刺激源的模式过渡到多重刺激源的模式^[9]。慢性不可预期刺激最初由 Katz 等人^[10]提出,多年来该刺激模式已经被反复的修改,并作为研究抑郁症和创伤应激障碍的一个有价值的模型系统得到研究者的重视^[11]。在大鼠慢性应激模型的建立中,较常用的方法有:束缚应激,制动应激,寒冷应激、电击、听源性应激和环境应激等^[12]。本研究选择了避水应激,强迫游泳应激,寒冷束缚应激作为不可预期刺激的应激源,(与 1.3.1 对应)对大鼠慢进行为期 9 d 干预^[13],使用随机数列来组合排列不同刺激的顺序。通过对接受该刺激大鼠体重、胃黏膜受损情况、应激程度以及肠道微生物多样性的观察,分析慢性应激刺激对胃

肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供重要的补充和参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 6 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重(207.50 ± 4.64)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0002]。实验动物均饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所[SYXK(京)2016-0021]。适应性饲养 3 d 后,根据体重随机分为正常组和模型组,每组 12 只。模型组大鼠连续 9 d 接受不可预期应激刺激,实验内容经中国中医科学院针灸研究所伦理委员会审查(中科针伦(D2018-04-13-1))。

1.2 主要试剂与仪器

10%福尔马林固定液(索莱宝,中国);皮质酮(Corticosterone, Cort)荧光免疫分析试剂盒(R&D systems,美国);无水乙醇(国药集团,中国);二甲苯(国药集团,中国);苏木精(SIGMA,美国);水溶性伊红(国药集团,中国);DNA Marker(Thermo,美国);琼脂糖(Oxoid,英国);溴化乙锭(Thermo,美国);冰乙酸(国药集团,中国);异丙醇(国药集团,中国)。

电子秤(日立,日本);EG1150H 组织包埋机(徕卡,德国);RM2235 石蜡切片机(徕卡,德国);

光学显微镜(奥林巴斯,日本);Thermo 4℃低温高速离心机(Thermo,美国);全波长扫描式多功能酶标仪(Thermo,美国);T-gradient PCR 仪(Biometra,德国);Gel-Doc2000 凝胶成像系统(Bio-rad,美国);变性梯度凝胶电泳仪(Bio-rad,美国);DNA 测序仪(Hitachi,日本);凝胶电泳成像分析仪(Bio-rad,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 不可预期应激模型的建立

模型组大鼠连续 9 d 接受不可预期应激刺激。该刺激由 3 个随机选择的应激源组成:避水应激(water avoidance stress, WAS) 60 min,强迫游泳应激(forced swimming stress, FSS) 20 min,寒冷束缚应激(cold restraint stress, CRS) 5 min。每天上午 8 点到 11 点之间,模型组大鼠进行应激刺激,所使用的应激源由电脑设定随机序列来确定。避水应激刺激的实施:大鼠被放置在一个长度 8.5 cm 宽度 6 cm 高度为 12 cm 的高台上并放入一个装满水的塑料容器(长 54 cm、宽 36 cm、高 14 cm)中 60 min,实施的时间是第 1、4、6 天。强迫游泳应激刺激的实施时间是第 2、7、9 天。对于 CRS,实验动物被限制在金属固定器中,浸入 4℃的水中 5 min,实施的时间是第 3、5、8 天。正常组大鼠同时被放置到另一个不进行应激刺激的实验室。

9 d 造模完成后随机选择 5 只正常组和模型组大鼠,采集其粪便样本进行肠道微生物多样性分析。两组各 12 只大鼠中,随机选取 4 只正常组和模型组大鼠进行灌流固定,取胃窦、部结肠组织进行形态学观察;各组其余 8 只大鼠取血浆和肾上腺组织检测其中皮质酮的含量,取材完毕后将大鼠放入二氧化碳箱中处死。

1.3.2 血清及肾上腺中皮质酮含量的测量

正常组和模型组大鼠于第 9 天后上午经心脏取血浆和肾上腺组织。使用双抗夹心 ELISA 分别测定血浆及肾上腺组织中的皮质酮含量,分析结果使用酶标仪在 450 nm 吸收波长读数,使用标准品 OD 值建立标准方程,再将样本 OD 值代入标准方程求得样本含量。

1.3.3 胃组织石蜡切片的观察

随机选取 4 只正常组和模型组大鼠进行灌流固定,每只大鼠取 1.5 cm×0.5 cm 胃窦部和结肠组织,使用 4%的甲醛溶液进行固定,进行石蜡包埋、切片并进行 HE 染色,染色完成后使用中性树脂封片进

行观察。胃黏膜厚度的测量:随机选择正常组和模型组大鼠各样本中胃黏膜 2 个视野,测量每个视野下胃黏膜的厚度,取其平均值。中性粒细胞的计数:在 40 倍镜下,随机选择正常组和模型组大鼠各样本中胃黏膜及结肠 2 个视野,测量每个视野下胃黏膜固有层及结肠黏膜中的中性粒细胞个数,取其平均值。

1.3.4 胃肠道微生物多样性分析

随机选择 5 只正常组和模型组大鼠,采集其粪便进行胃肠道微生物多样性分析。提取各组样本总 DNA 后,通过热循环 PCR 系统,使用正向引物 341F-35 (5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTAGACGTCCTAYGGGRBGCASCAG-3') 和反向引物 806R (5'-GCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGACTACNNGGCTATCTAAT-3') 靶向 16S rRNA 基因的 V3~V4 区域进行扩增^[14-15]。PCR 反应一式三份,起始变性步骤是在 95℃进行 3 min,然后在 95℃进行 27 轮变性 30 s,在 55℃进行 30 s 退火,并在 72℃进行 45 s 的延伸,最后的延伸步骤为 72℃,持续 10 min。扩增的产物在 2%琼脂糖凝胶上可视化,经纯化、定量和均一化形成测序文库。

建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库使用 Illumina HiSeq 2500 进行高通量测序。所获得的原始图像数据文件,经碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(sequenced reads)。将 HiSeq 测序得到的双端序列数据使用 FLASH v1.2.7 软件拼接成一条序列 Tags,使用 Trimmomatic v0.33 软件对拼接得到的 Raw Tags 进行过滤,使用 UCHIME v4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据。在完成数据预处理后,对信息进行分析,划分操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)并进行多样性分析。分类分析是基于 97%的同一性阈值获得的 OTUS,因为这个同一性值通常被认为代表物种水平。将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比对可得到每个 OTU 对应的物种分类信息,进而在个水平(门、纲、类、科、属、种)统计各样本群落组成,生成不同分类水平上的物种丰度表。Alpha 多样性反映的是单个样品内部的物种多样性,有多种衡量指标: Ace、Chao1 等。使用 QIIME 软件对数据进行 Beta 多样性分析,比较不同组样本在物种多样性方面存在的差异大小。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,计量资料

以平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。符合正态分布且方差齐者,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验;不满足方差齐性或正态分布则采用 Kruskal-Wallis H 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。配对样本数据采用配对样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 不可预期应激刺激对大鼠体重的影响

9 d 不可预期应激刺激后,模型组大鼠体重均值为(271.40 ± 4.17) g,与正常组大鼠(300.64 ± 4.22) g 相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P < 0.01$)。模型组大鼠在应激 9 d 中体重增值为(58.58 ± 3.80) g,与正常组大鼠未受应激生长 9 d (92.54 ± 3.57) g 相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P = 0.001$)。(见图 1)

2.2 不可预期应激刺激对大鼠肾上腺及血清中皮质酮含量的影响

9 d 不可预期应激刺激后,模型组大鼠肾上腺组织中皮质酮含量为(0.20 ± 0.02) pg/mg,与正常组大鼠(0.34 ± 0.03) pg/mg 相比明显降低,差异具有极显著的统计学意义($P = 0.006$)。模型组大鼠在应激 9 d 后血浆中皮质酮含量(0.29 ± 0.03) pg/mL,与正常组大鼠(0.17 ± 0.03) pg/mL 相比明显增加,差异具有显著的统计学意义($P = 0.025$)。(见图 2)

2.3 不可预期应激刺激对大鼠胃黏膜的影响

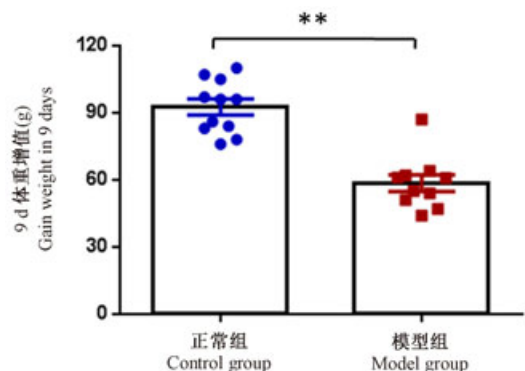
正常组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列整齐,黏膜肌层与黏膜下层结构清晰,固有层可见中性粒细胞。模型组大鼠的胃黏膜层上皮细胞排列较正常组稀疏,其厚度为(635.14 ± 36.00) μm ,与正常组

(893.86 ± 45.52) μm 相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.034$)。模型组大鼠的胃黏膜固有层中性粒细胞数量(16.27 ± 1.80) 个与正常组(23.33 ± 2.80) 个相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.016$)。(见图 3)

正常组大鼠的结肠黏膜组织中可散见中性粒细胞。与正常组相比,模型组大鼠的结肠组织中可观察到较多数量的中性粒细胞浸润。模型组大鼠结肠黏膜中中性粒细胞数量为(34.50 ± 3.10) 个与正常组(21.50 ± 2.60) 个相比明显减少,差异具有显著的统计学意义($P = 0.013$)。(见图 4)

2.4 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道微生物多样性的影响

9 d 不可预期应激刺激后,取 5 只模型组大鼠和 5 只正常组大鼠粪便样本进行了微生物多样性分析。基于细菌(Silva)和真菌(UNITE)分类学数据

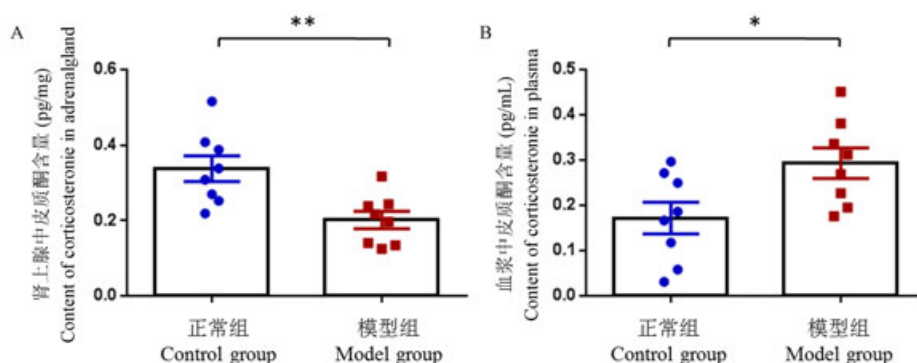


注:与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 9 d 不可预期应激刺激对大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 12$)

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

Figure 1 Effect of 9 days HIS on body weight in rats

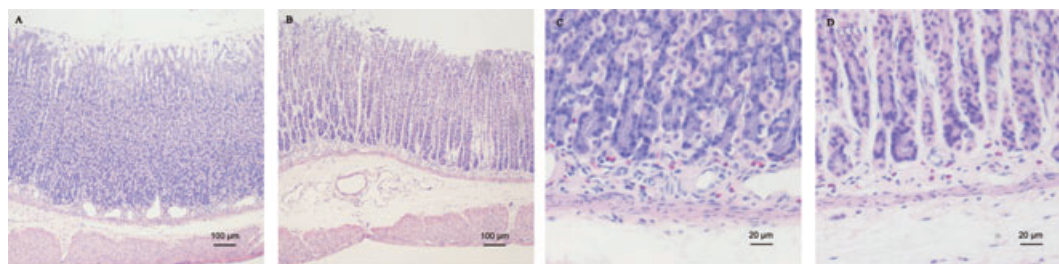


注:A:与正常组比较, ** $P < 0.01$; B:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 9 d 不可预期应激刺激对大鼠肾上腺及血清中皮质酮含量的影响($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n = 8$)

Note. A, Compared with control group, ** $P < 0.01$. B, Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Effect of 9 days HIS on CORT levels in adrenal gland and plasma

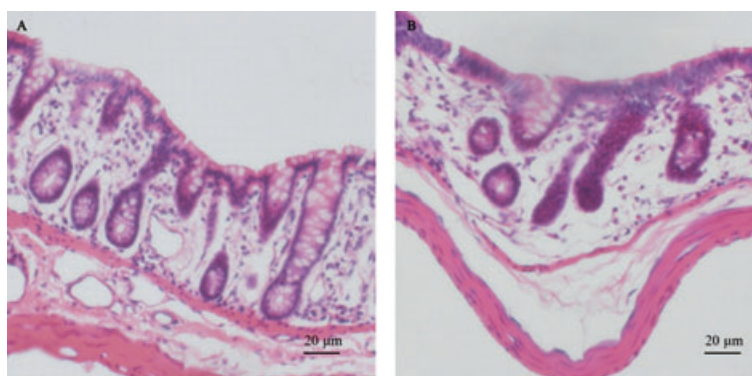


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 正常组; D: 模型组。

图 3 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃黏膜的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=4$)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Control group. D, Model group.

Figure 3 Effect of 9 days HIS on gastric mucosa in rats



注: A: 正常组; B: 模型组。

图 4 9 d 不可预期应激刺激对大鼠结肠黏膜的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=3$)

Note. A, Control group. B, Model group.

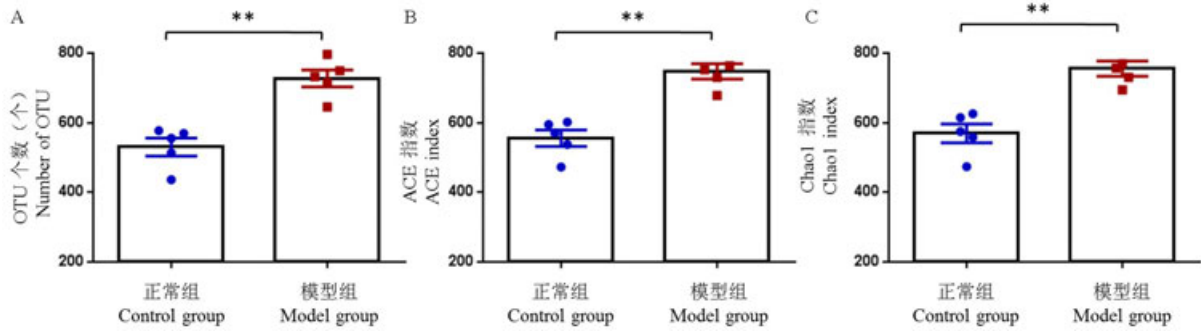
Figure 4 Effect of 9 days HIS on colonic mucosa in rats

库,对样本 OTU 聚类进行分类学注释,并通过聚类得到个样本的 OTU 聚类的个数。Alpha 多样性分析结果显示模型组大鼠样本中 OTU 个数为(727.20 ± 24.66)个,与正常组大鼠(530.00 ± 25.96)个相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。对所获得的数据进行 Alpha 多样性分析,可以观察到模型组大鼠样本 ACE 指数为(747.20 ± 21.98),与正常组大鼠(555.34 ± 23.47)相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$);模型组大鼠样本 Chao1 指数为(755.04 ± 21.31),与正常组大鼠(569.40 ± 26.94)相比明显增加,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$) (见图 5、6)。

正常组和模型组大鼠样本中优势菌种主要归属于拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 及变形菌门 (Proteobacteria) 三大类,与肠道主要固有菌群的构成相同。其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) 的占比为(2.53 ± 0.46)%,与正常组大鼠(0.78 ± 0.27)%相比

明显增加,差异具有显著的统计学意义($P=0.011$);模型组大鼠样本中螺杆菌科 (Helicobacteraceae) 的占比为(8.21 ± 1.86)%,与正常组大鼠(2.90 ± 1.29)%相比明显增加,差异具有显著的统计学意义($P=0.047$)。模型组大鼠样本中类杆菌科 (Bacteroidaceae) 的占比为(0.35 ± 0.11)%,与正常组大鼠(2.60 ± 0.44)%相比明显减少,差异具有极显著的统计学意义($P=0.001$)。(见图 7、8)

通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 的方法,对各组样本进行 Beta 多样性分析,可以观察到正常组和模型组大鼠样本中菌种主要成分有分离的趋势,两组细菌群落结构有一定的差异 (图 9)。正常组大鼠中第一主成分对样品差异的贡献值为 74.38%,第二主成分对样品差异的贡献值为 11.42%。与模型组中第一主成分对样品差异的贡献值 83.19% 和第二主成分对样品差异的贡献值 7.44% 相比,差异无统计学意义($P=0.341$)。(见图 9)

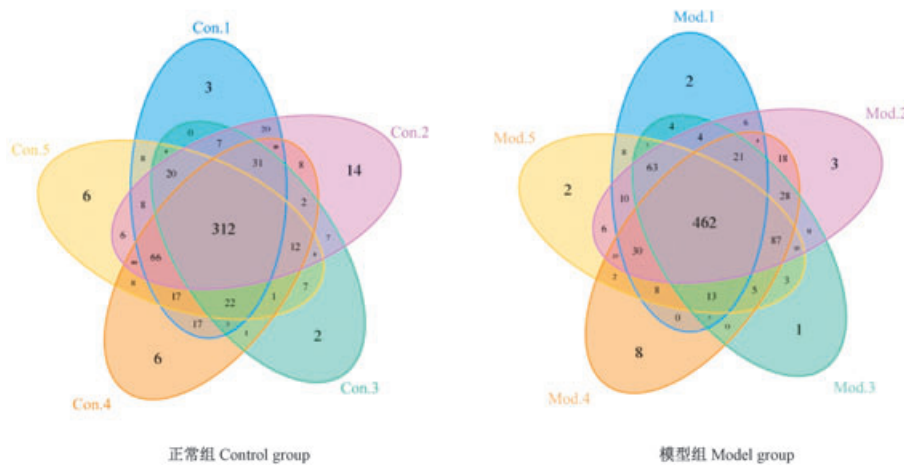


注:A:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$; B:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$; C:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图5 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道微生物多样性的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=5$)

Note. A, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$. B, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$. C, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of 9 Days HIS on gastrointestinal microbial diversity in rats

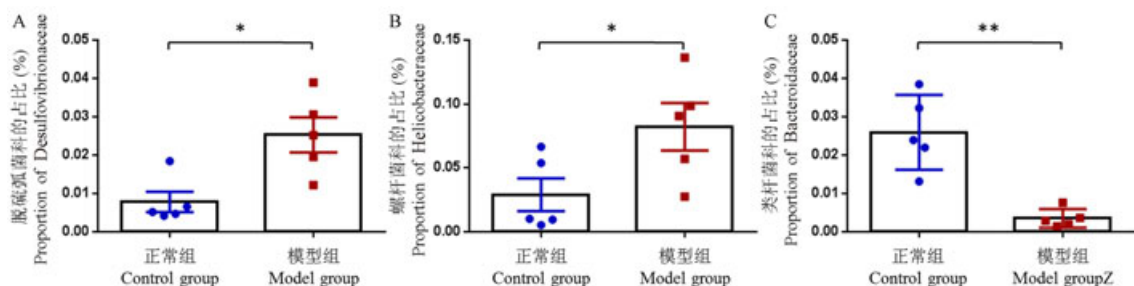


注:Venn 图可以展示样本之间共有、特有 OTU 数目,直观地表现出样本间 OTU 的重合情况。

图6 正常组和模型组各样本胃肠道微生物 OTU Venn 图

Note. The Venn diagram can show the number of unique OTUs shared between samples, visually showing the coincidence of OTUs between samples.

Figure 6 Gastrointestinal microbe OTU Venn map of control and model groups



注:A:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$; B:模型组与正常组比较, * $P < 0.05$; C:模型组与正常组比较, ** $P < 0.01$ 。

图7 9 d 不可预期应激刺激对大鼠胃肠道细菌中脱硫弧菌科、螺杆菌科和类杆菌科占比的影响 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$, $n=5$)

Note. A, Model group compared with control group, * $P < 0.05$. B, Model group compared with control group, * $P < 0.05$. C, Model group compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 7 Effect of 9 Days HIS on proportion of desulfovibrionaceae, helicobacteraceae and bacteroidaceae in gastrointestinal microbial diversity

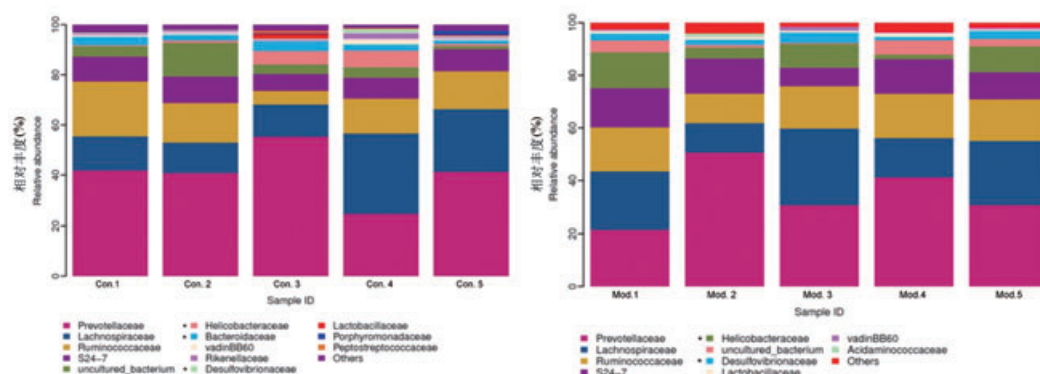


图 8 正常组和模型组各样本胃肠道细菌物种分布柱状图

Figure 8 Histogram of species distribution of gastrointestinal bacteria in control and model groups

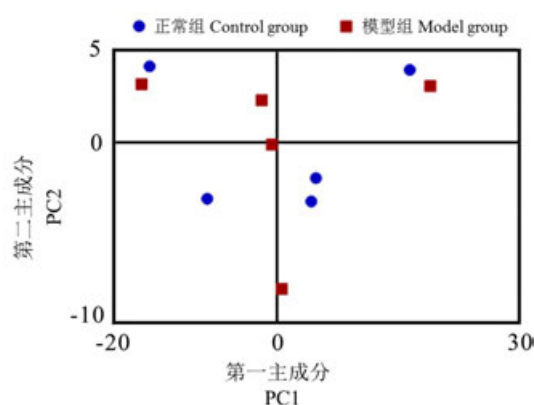


图 9 正常组和模型组各样本胃肠道细菌物种 PCA 分析图

Figure 9 PCA analysis of gastrointestinal bacteria in control and model groups

3 讨论

具有一致性和可重复性的实验模型和范式是推动生物学科发展的助力之一。在慢性应激研究中不可预期应激刺激模式可以提供更一致的造模方法并提高了在不同实验室之间产生可重复结果的可能性^[16]。本研究中采用的 9 d 不可预期应激刺激造成大鼠体重增幅明显降低^[17-18]。同时观察到慢性应激导致血浆皮质酮含量显著升高^[19]，肾上腺肥大但皮质酮含量减少的现象^[20]。说明经过 9 d 不可预期刺激后大鼠的下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 已被激活^[9]。

慢性应激刺激对胃肠道免疫功能的影响也是显而易见的。长期应激刺激可以直接影响胃窦和胃底上皮细胞的增殖^[21]，并导致血管充血以及回肠和结肠上皮的退化^[22]。有不少研究者们注意到了应激可诱导的血浆皮质酮升高通过激活糖皮质激素

受体抑制先天免疫^[23]，14 d 慢性应激暴露导致雄性 Wistar 大鼠血浆中 IgG 抗体水平和迟发型超敏反应 (DTH) 响应受到抑制^[24]。有研究观察到慢性应激对大鼠皮肤的免疫力产生了免疫抑制，抑制了白细胞从血液到皮肤的动员^[25]。这一结果与本研究中观察到慢性应激大鼠胃黏膜固有层中性粒细胞数量减少的现象类似。本研究中还观察到，慢性不可预期刺激导致结肠黏膜中性粒细胞数量高于正常组，说明慢性应激刺激与肠道慢性炎症之间的具有密切的联系。长期、持续的压力会增加溃疡性结肠炎患者复发的次数^[26]，环境应激延长了克罗恩病的病程^[27]。这与应激对神经内分泌、行为和免疫功能具有强大调节能力关系密切^[28]。还有研究观察到长期暴露于社会心理应激会促进大鼠肠黏膜炎症和肥大细胞介导的屏障功能障碍；应激引起的线粒体损伤和空肠通透性增加，与肥大细胞激活密切相关^[29]。说明肥大细胞可以作为观察慢性应激刺激对肠道免疫功能影响更精准的新靶点，这个方向的研究我们会在之后的工作中继续进行。

在过去的几年中，得益于高通量核酸检测技术的发展，对肠脑轴 (肠道和大脑之间的双向通信系统) 的研究大量增加^[30]，肠道菌群作为研究的关键角色得到了更多关注。应激所致的免疫抑制是影响肠道微生物种群变化的原因之一^[31]，在本研究中我们观察到 9 d 不可预期应激刺激后，模型组大鼠粪便样本中微生物种类的明显增多。其中模型组大鼠样本中脱硫弧菌科 (Desulfovibrionaceae) 和螺杆菌科 (Helicobacteraceae) 细菌的占比较正常对照组明显增加，而类杆菌科 (Bacteroidaceae) 细菌的占明显下降。有研究使用牛蔗糖喂养的大鼠导致其发

生肠道营养不良,这类大鼠的结肠微生物组群观察中同样显示出脱硫弧菌科的细菌丰度的增加^[32];在调查上海市实验动物生产设施以及大鼠、小鼠细菌携带状况的研究中,观察到所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染^[33]。在大肠癌患者的早期诊断和筛查中,有研究观察到双歧杆菌和乳杆菌明显少于正常健康组,尤其是膜菌群的肠杆菌、肠球菌、类杆菌、双歧杆菌和乳杆菌的占比与正常组对比明显下降^[34]。说明慢性应激造成大鼠肠道微生物菌群失调,具体表现为正常健康者携带的有益菌占比下降,而与肠道营养不良,设施污染相关的菌群占比上升。本研究中,由于采集的样本量偏少,在 Beta 多样性分析过程中,未发现两组大鼠第一和第二主成分对样品差异的贡献值有差异,仅可观察到正常组和模型组大鼠样本中菌种主要成分有分离的趋势,在下一步的研究中,会加大样本量继续进行观察。综上所述,9 d 不可预期应激刺激可以造成一个稳定的慢性应激大鼠模型。在这个模型中本研究通过对大鼠体重、胃黏膜结肠黏膜形态学以及肠道微生物多样性的观察,全面的分析了慢性应激刺激对胃肠道免疫系统和微生物种群的影响,为慢性应激对胃肠道功能的研究提供重要的补充和参考。

参考文献:

- [1] Stam R, Akkermans LM, Wiegant VM. Trauma and the gut: interactions between stressful experience and intestinal function [J]. *Gut*, 1997, 40(6): 704-709.
- [2] 马晓玲, 夏提古丽·阿不利孜, 石磊岭, 等. 慢性束缚应激联合特殊饮食制备腹泻性肠易激综合征 (IBS-D) 大鼠模型的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 12-17.
- [3] Winston JH, Xu GY, Sarna SK. Adrenergic stimulation mediates visceral hypersensitivity to colorectal distension following heterotypic chronic stress [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 294-304.
- [4] O'Malley D, Quigley EM, Dinan TG, et al. Do interactions between stress and immune responses lead to symptom exacerbations in irritable bowel syndrome [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(7): 1333-1341.
- [5] Chang L. The role of stress on physiologic responses and clinical symptoms in irritable bowel syndrome [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(3): 761-765.
- [6] Bennett EJ, Piesse C, Palmer K, et al. Functional gastrointestinal disorders: psychological, social, and somatic features [J]. *Gut*, 1998, 42(3): 414-420.
- [7] Hart A, Kamm MA. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(12): 2017-2028.
- [8] Slyepchenko A, Maes M, Jacka FN, et al. Gut Microbiota, Bacterial translocation, and interactions with diet: pathophysiological links between major depressive disorder and non-communicable medical comorbidities [J]. *Psychosom*, 2017, 86(1): 31-46.
- [9] Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents [J]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1998, 10(2): 230-231.
- [10] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251.
- [11] Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, et al. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(4): 2008-2017.
- [12] McCarty R. Optimizing laboratory animal stress paradigms: The H-H* experimental design [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2017, 75: 5-14.
- [13] Zhou YY, Wanner NJ, Xiao Y, et al. Electroacupuncture alleviates stress-induced visceral hypersensitivity through an opioid system in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7201-7211.
- [14] Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, et al. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing [J]. *J Biotechnol*, 2012, 158(4): 248-258.
- [15] Niem JM, Billones-Baaijens R, Stodart B, et al. Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic pseudomonas against grapevine trunk diseases [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 477.
- [16] 樊江波, 畅洪昇, 董世芬, 等. 慢性应激致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(2): 91-95, 88.
- [17] Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, et al. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat [J]. *Metabolism*, 2002, 51(7): 925-931.
- [18] 周晨, 胡浪, 李天雪, 等. 应激所致肠功能紊乱大鼠模型的建立及内源性标志物的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 13-17, 2.
- [19] Du Ruisseau P, Taché Y, Selye H, et al. Effects of chronic stress on pituitary hormone release induced by combined hemiextirpation of the thyroid, adrenal and ovary in rats [J].

- Neuroendocrinology, 1977, 24(3-4): 169-182.
- [20] Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, et al. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006, 291(5): E965-E973.
- [21] Kuwayama H, Eastwood GL. Effects of water immersion restraint stress and chronic indomethacin ingestion on gastric antral and fundic epithelial proliferation [J]. Gastroenterology, 1985, 88(1 Pt 2): 362-365.
- [22] Ercan F, Cetinel S, Contuk G, et al. Role of melatonin in reducing water avoidance stress-induced degeneration of the gastrointestinal mucosa [J]. J Pineal Res, 2004, 37(2): 113-121.
- [23] Gao S, Deviche PJ. Glucocorticoid receptor selectively mediates stress-induced suppression of innate immunity in the House Sparrow, *Passer domesticus* [J]. Dev Comp Immunol, 2018, 84: 427-435.
- [24] Thakur T, Gulati K, Rai N, et al. Experimental studies on possible regulatory role of nitric oxide on the differential effects of chronic predictable and unpredictable stress on adaptive immune responses [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 236-242.
- [25] Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 917: 876-893.
- [26] Levenstein S, Prantera C, Varvo V, et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission [J]. Am J Gastroenterol, 2000, 95(5): 1213-1220.
- [27] Ringel Y, Drossman DA. Psychosocial aspects of Crohn's disease [J]. Surg Clin North Am, 2001, 81(1): 231-252.
- [28] Zhang J, Huang J, Aximujiang K, et al. Thyroid dysfunction, neurological disorder and immunosuppression as the consequences of long-term combined stress [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4552.
- [29] Vicario M, Guilarte M, Alonso C, et al. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress [J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(7): 1166-1175.
- [30] Weltens N, Iven J, Van Oudenhove L, et al. The gut-brain axis in health neuroscience: implications for functional gastrointestinal disorders and appetite regulation [J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1428(1): 129-150.
- [31] Dantzer R, Cohen S, Russo SJ, et al. Resilience and immunity [J]. Brain Behav Immun, 2018, 74: 28-42.
- [32] Van Hecke T, De Vrieze J, Boon N, et al. Combined consumption of beef-based cooked mince and sucrose stimulates oxidative stress, cardiac hypertrophy, and colonic outgrowth of desulfovibrionaceae in rats [J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(2): e1800962.
- [33] 冯洁, 谢建云, 魏晓峰, 等. 实验大鼠和小鼠多种细菌 PCR 检测与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 89-93, 116.
- [34] 李冰, 马丰玲. 肠道膜菌群检测在大肠癌早期诊断筛查中的应用分析 [J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(35): 48-49.
- [收稿日期] 2019-10-09

廉梅,林晓琳,贾俊双,等. TRIM26在人和小鼠主要组织器官中的表达谱[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 10-15.
Lian M, Lin XL, Jia JS, et al. TRIM26 expression profile in multiple human and mouse tissues and organs [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 10-15.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.002

TRIM26在人和小鼠主要组织器官中的表达谱

廉梅^{1,2}, 林晓琳¹, 贾俊双¹, 肖胜军³, 肖东^{1,2*}

(1.南方医科大学基础医学院, 广州 510515; 2.南方医科大学实验动物管理中心, 广州 510515;
3.桂林医学院第二附属医院病理科, 广西 桂林 541199)

【摘要】 目的 明确 TRIM26 在人和小鼠不同组织器官中的表达定位和水平。**方法** 表达定位研究采用免疫组织化学 PV-9000 二步法(非生物素), 利用 BioGPS 数据库分析 TRIM26 在人体组织中的表达水平, RT-qPCR 检测小鼠主要组织器官中 TRIM26 表达水平。**结果** IHC 的结果显示, TRIM26 蛋白信号定位于细胞质和细胞核, 其表达多见于上皮细胞。TRIM26 蛋白在人和小鼠的食管鳞状上皮细胞、胃上皮细胞、小肠上皮细胞、结肠上皮细胞、胰岛细胞、脑胶质细胞、肾小管上皮细胞和肾小球细胞以及子宫内膜腺上皮细胞中的表达定位一致。另外, TRIM26 分别在人体气管组织和小鼠脾组织上的相对表达量最高。**结论** TRIM26 在人和小鼠组织上的表达定位具有一致性, 表达量略有差异。TRIM26 在人和小鼠主要组织器官上的表达谱的明确, 将为利用 TRIM26 条件性敲除小鼠解析 TRIM26 在不同组织器官的功能奠定了良好基础。

【关键词】 TRIM26; 免疫组织化学; 表达谱

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0010-06

TRIM26 expression profile in multiple human and mouse tissues and organs

LIAN Mei^{1,2}, LIN Xiaolin¹, JIA Junshuang¹, XIAO Shengjun³, XIAO Dong^{1,2*}

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

2. Laboratory Animal Management Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515.

3. Pathology Department of the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541199)

【Abstract】 Objective To examine the expression level and distribution of TRIM26 in multiple human and mouse tissues and organs. **Methods** The immunohistochemistry (IHC) PV-9000 two-step method (non-biotin) was used to determine the expression and distribution of TRIM26. BioGPS was used to calculate TRIM26 expression levels in human tissues and organs, whereas RT-qPCR was performed to determine its counterparts in mice. **Results** The IHC result indicated that the TRIM26 protein is expressed in the cytoplasm and nucleus, mainly in epithelial cells. Its expression distribution in human esophageal squamous cells, gastric epithelial cells, small intestinal epithelial cells, colon epithelial cells, islet cells, brain glial cells, renal tubular epithelial cells, glomerular cells, and endometrial glandular epithelial cells was consistent with that in the mouse equivalent cells. The highest relative expression of TRIM26 was observed in human tracheal cells and mouse spleen. **Conclusions** Humans and mice show consistent expression distribution of TRIM26 in multiple tissues and organs, but with different expression levels. Revealing the TRIM26 expression profile in human and mouse main organs and tissues lays a foundation for further exploration of the functions of TRIM26 in different tissues and organs by engineering conditional TRIM26-knockout mice.

【Keywords】 TRIM26; immunohistochemistry; expression profile

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81702778); 桂林市科学研究与技术开发计划课题(20130120-8); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA159131)。

【作者简介】 廉梅(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事糖脂代谢研究。E-mail: 751139482@qq.com

【通信作者】 肖东(1968—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 糖脂代谢和来源化肝脏动物模型(鼠和小型猪等)开发与应用。
E-mail: xiao_d@hotmail.com

TRIM(三结构域蛋白, Tripartite motif)家族蛋白具有高度保守的 RBCC 结构域,由众多的成员组成,广泛存在于大多数动物体内,具有免疫调节和 E3 泛素连接酶活性,可参与机体的免疫应答过程和泛素依赖的蛋白酶体介导的蛋白质降解^[1]。大多数 TRIM 蛋白由一个 RING 锌指结构域、一个或两个 B-box 结构域和一个卷曲螺旋结构域(coiled-coil, CC),又被称为 RBCC 结构域^[2]。到目前为止已经发现了 70 多个人源 TRIM 蛋白,它们在机体中参与了多种生物过程和疾病发病机制的调控过程。

TRIM26/ZNF173/RNF95 基因位于 6 号染色体的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)区域^[3]。TRIM26 由一个 RING 锌指结构域、一个 B-box 2 结构域、一个卷曲螺旋结构域和一个 PRY-SPRY 结构域^[4]组成;其中锌指结构域结合 DNA,参与基因表达调控,RING 结构域具有 E3 泛素连接酶的活性^[5],B-box 2 结构域参与蛋白泛素化修饰调节,PRY-SPRY 结构域对免疫应答有调控作用,可以促进多聚信号复合体的形成^[6]。迄今,为数不多的研究表明,TRIM26 具有 E3 泛素连接酶的活性^[7],其在呼吸道疾病^[8]、抗 HIV-1 感染^[9]和作为精神分裂症的易感基因^[10]等方面发挥着重要作用。此外,E3 连接酶 TRIM26 通过泛素化降解核内的 IRF3 负向调控 IFN- β 的产生和抗病毒免疫反应^[11];TRIM26 是抗 RNA 病毒先天免疫反应的一个重要调节因子^[12]。

最近有研究表明,TRIM26 与肿瘤有一定关系。Mule 和 TRIM26 介导的 NEIL1 泛素化依赖调节是细胞 DNA 损伤反应所需要的,RNA 干扰沉默 TRIM26 表达可增强人骨肉瘤 U2OS 细胞对放疗的抵抗性^[13]。TRIM26 可通过泛素化调节 NTH1 参与人结直肠癌 HCT116 细胞对氧化应激敏感性的调控,RNA 干扰沉默 TRIM26 表达可增强对过氧化氢(H_2O_2)所致 HCT116 细胞氧化应激损伤的保护作用^[14]。此外,RT-qPCR、基因芯片和原位杂交等研究结果显示,TRIM26 在鼻咽癌组织中表达显著下调;同时,基因芯片数据亦揭示,在下调最明显的 10 个基因中,TRIM26 位于第 4 位^[15]。新近研究亦证实,鼻咽癌组织中 TRIM26 表达下调与鼻咽癌低免疫反应密切相关^[16]。总之,目前对 TRIM26 在肿瘤发生、发展中的调控作用仍然知之甚少,还有待进一步的探索。

为明确 TRIM26 在人和小鼠主要组织器官上的

表达谱,本文通过免疫组织化学技术检测 TRIM26 在正常人体和小鼠组织器官中的表达,了解该基因在不同组织上的表达定位情况,再结合 BioGPS 数据库和 RT-qPCR 对 TRIM26 在组织上的表达水平进行分析。通过表达定位和表达水平的综合分析,明确该基因在人和小鼠主要组织器官上的表达谱,将为利用 TRIM26 条件性敲除小鼠解析 TRIM26 在不同组织器官的功能及其在肿瘤等疾病发生发展过程的作用及其分子调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雌性 5 只,30~35 日龄,体重 15~17 g,购买于南方医科大学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0041],饲养在南方医科大学实验动物中心 SPF 实验动物部[SYXK(粤)2016-0167]。实验方案通过南方医科大学实验动物伦理审查委员会审批(L2017068),符合 3R 原则。

1.1.2 实验组织

正常人体组织标本来自桂林医学院第二附属医院病理科,取自手术切除器官病变旁正常组织(标本来源经桂林医学院第二附属医院伦理委员会批准并由患者签署知情同意书)。肝(10 例),胃(7 例),肺(6 例),结肠、胰腺、肾和脾(各 5 例),食管和子宫内膜(各 4 例),甲状腺、皮肤和乳腺(各 3 例),脑和卵巢(各 2 例)。所有组织经病理学检查不含癌组织。

1.2 主要试剂与仪器

无水乙醇、二甲苯、氯仿、异丙醇(天津市大茂化学试剂厂);TRIM26 抗体(ab188017)(美国 Abcam 公司);PBS 缓冲液粉末、柠檬酸盐修复液(pH6.0)、封闭用羊血清(工作液)、兔二步法试剂盒(内源性过氧化物酶阻断剂、酶标山羊抗兔 IgG 聚合物)、DAB 显色试剂盒(20X)、苏木素染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);TRIzol、PrimeScriptTM RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa 公司)。荧光定量 PCR 仪(LightCycler[®] 96,瑞士 Roche 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本处理

4%多聚甲醛溶液固定组织 24 h,常规石蜡脱水、包埋、切片(4 μ m)(为减少误差,相同器官组织

包埋于一个蜡块上)。

1.3.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色

选择 PV-9000 二步法 (非生物素): 石蜡切片经脱蜡、水化、抗原修复后, 滴加一抗并 4℃ 过夜; 酶标山羊抗兔 IgG 聚合物 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色 (显色时间控制一致), 苏木素复染, 经过梯度乙醇与二甲苯脱水, 最后中性树脂封片后在光镜观察并拍照。阴性对照为 PBS 代替一抗。

1.3.3 免疫组织化学结果判读

免疫组织化学染色, 呈棕黄色为阳性, 不着色为阴性。结果由两位桂林医学院第二附属医院病理科医生独立判读 TRIM26 所表达的组织部位并评分, 根据阳性信号强度不同分为 0~3 分, 分别代表 TRIM26 在组织上不表达、弱阳性表达、中等阳性表达和强阳性表达, 统计评分结果, 确定该基因在不同组织上的表达强度。阴性对照不着色为不表达。

1.3.4 BioGPS 数据库分析

利用 BioGPS 数据库中的 Gene Atlas U133 A, gcrma (<http://biogps.org/>) 数据集, 分析 TRIM26 在人的主要组织器官中的 mRNA 表达水平, 并用 GraphPad Prism 5 做柱形图。

1.3.5 小鼠组织 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

收取小鼠主要组织器官, 按说明书抽提总 RNA 和逆转录反应。以获得的 cDNA 为模板, 设计引物进行 RT-qPCR 检测。选择 GAPDH 基因作为内参照, 检测 TRIM26 的表达; 选择在小鼠组织中表达量最低的组织为 1, 其他组织器官按其相对表达量作图。

小鼠 GAPDH 上游引物序列: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 下游引物序列: 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'; 小鼠 TRIM26 上游引物序列: 5'-TCGGCCAGTGGATACCTACAT-3', 下游引物序列: 5'-TGGCTCAGTCAAAGTCTG-3'。

2 结果

2.1 人体主要组织器官中 TRIM26 的表达谱

对不同人体组织的 IHC 染色结果进行评分, 染色呈深棕色为强表达, 不着色为不表达。IHC 结果分析显示, TRIM26 蛋白主要定位于细胞质中, 少部

分组织定位于细胞核, 同一组织的表达定位在多例标本中一致 (图 1)。在食管鳞状上皮细胞 (图 1A)、胃底腺上皮细胞 (图 1B)、小肠和结肠的上皮细胞 (图 1C、1D)、肝细胞 (图 1E)、胰岛细胞 (图 1F)、脑神经元和胶质细胞 (图 1G)、气管及支气管纤毛柱状上皮细胞 (图 1H)、肺泡腔内巨噬细胞及上皮细胞 (图 1I)、脾血窦内皮细胞 (图 1J)、肾小管和肾球囊壁上皮细胞及肾小球细胞 (图 1K)、卵巢间质细胞 (图 1L)、子宫内膜腺上皮细胞 (图 1M)、甲状腺滤泡上皮细胞 (图 1N)、乳腺小叶上皮细胞 (图 1O) 和鳞状上皮细胞 (图 1P) 中 TRIM26 均有表达, 但在以上这些组织中, 乳腺小叶上皮细胞和胰岛细胞中 TRIM26 表达较强。

2.2 TRIM26 在人体主要组织器官中的相对表达水平

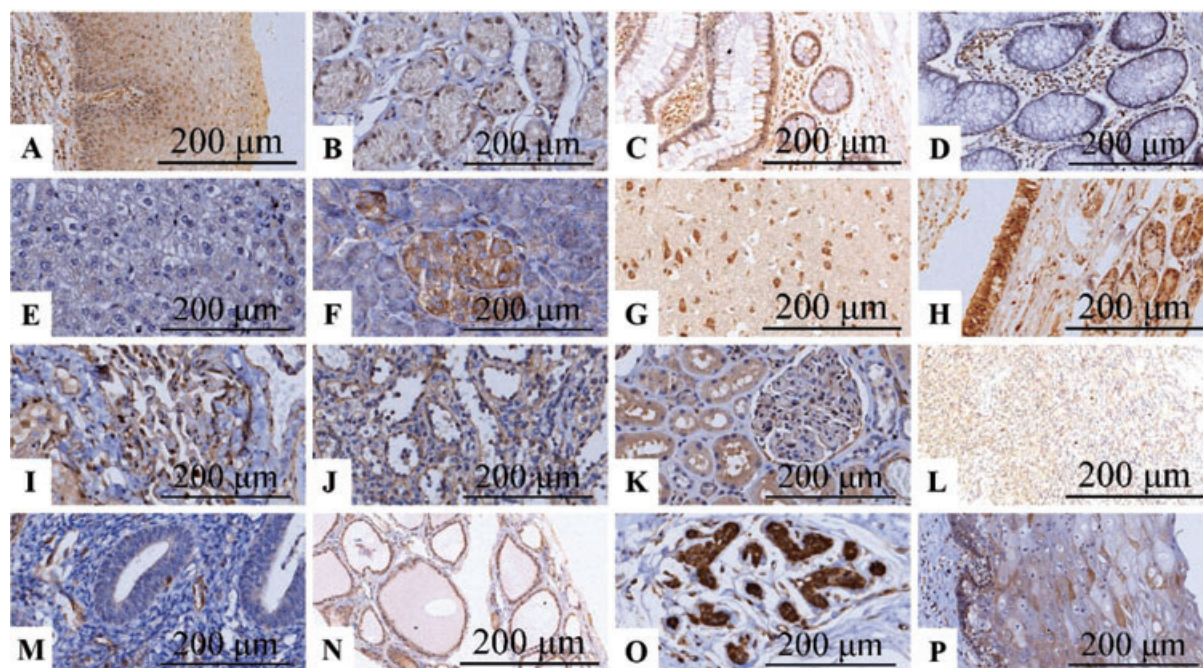
根据 BioGPS 数据库中的 Gene Atlas U133A, gcrma 数据集, 以数据库中 TRIM26 表达量最低的卵巢组织为 1, 其它组织器官按其相对表达量作图。TRIM26 在人的主要组织器官上的 mRNA 表达量见图 2。TRIM26 在气管、肝和甲状腺上的表达水平较高, 并且该基因在胰岛细胞上的表达量高于其在胰腺组织上的表达量。

2.3 IHC 揭示小鼠主要组织器官中 TRIM26 表达谱

对小鼠组织的 IHC 染色结果进行评分, 染色呈深棕色为强表达, 不着色为不表达。IHC 结果分析显示, TRIM26 在小鼠细胞的细胞质与细胞核中均有表达 (图 3)。TRIM26 表达于食管鳞状上皮细胞及附属腺体 (图 3A)、胃上皮细胞 (图 3B)、小肠和结肠上皮细胞 (图 3C、3D)、胰岛细胞及外分泌腺 (图 3E)、脑神经元及胶质细胞 (图 3F)、细小支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞 (图 3G)、肾小管上皮细胞和肾小球细胞 (图 3H) 以及子宫内膜腺上皮细胞 (图 3I)。

2.4 RT-qPCR 揭示 TRIM26 在小鼠主要组织器官中的表达水平

RT-qPCR 检测了 TRIM26 在小鼠组织中的表达量, 结果如图 4 所示。选择在小鼠组织中表达量最低的心脏为 1, 其它组织器官按其相对表达量作图。结果显示, TRIM26 在小鼠的脾、肺和胰腺组织上的表达量相对较高。



注:A:食管;B:胃;C:小肠;D:结肠;E:肝;F:胰腺;G:脑;H:气管;I:肺;J:脾;K:肾;L:卵巢;M:子宫内膜;N:甲状腺;O:乳腺;P:皮肤。

图1 TRIM26 在人体主要组织器官中的表达

Note. A, Esophagus. B, Stomach. C, Small Intestine. D, Colon. E, Liver. F, Pancreas. G, Brain. H, Trachea. I, Lung. J, Spleen. K, Kidney. L, Ovary. M, Endometrium. N, Thyroid. O, Breast. P, Skin.

Figure 1 Expression of TRIM26 in human tissues and organs

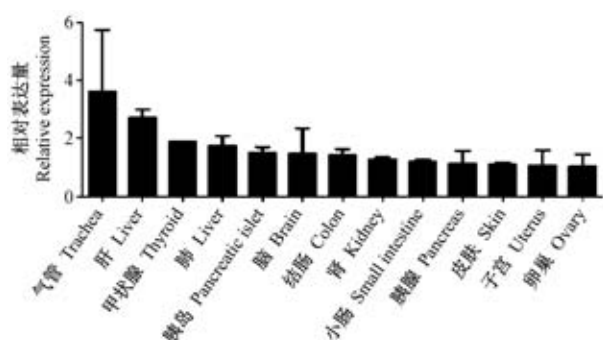


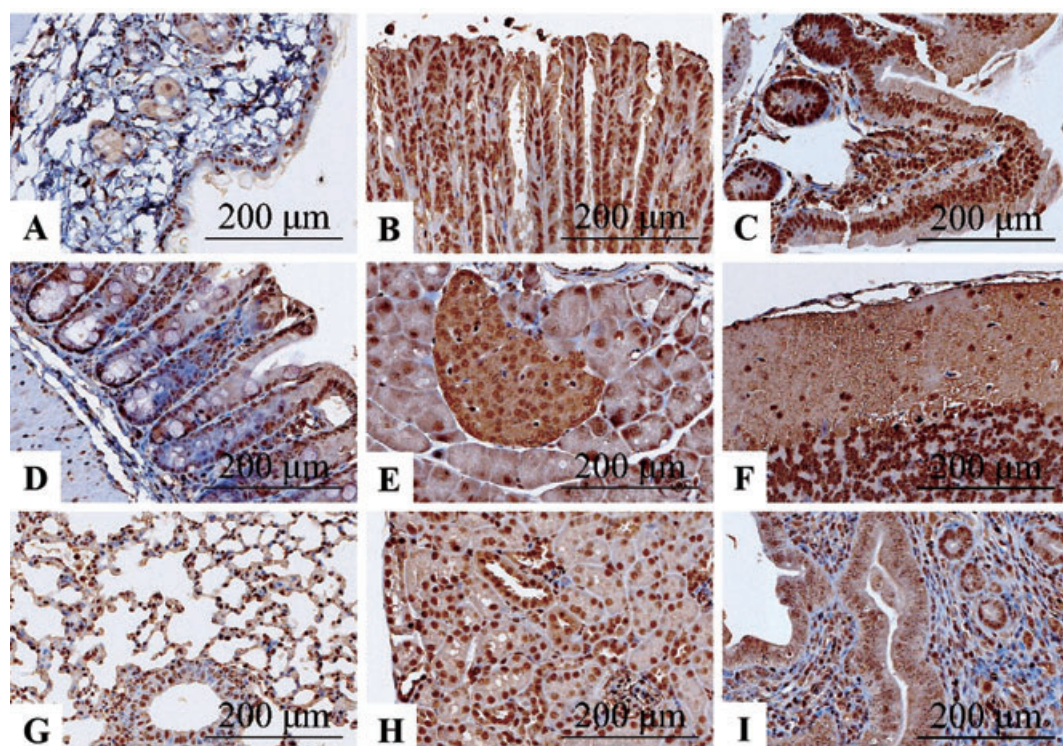
图2 TRIM26 在人体主要组织器官中的相对表达量

Figure 2 The relative expression of TRIM26 in human tissues and organs

3 讨论

本研究通过 IHC 和 RT-qPCR 明确了 TRIM26 基因在人和小鼠主要组织器官中的表达定位及相对表达量。研究发现,TRIM26 在细胞核与细胞质中均有表达,且多表达于上皮细胞,其表达定位在人和小鼠的主要组织器官中具有高度的一致性,同时表达于食管鳞状上皮,胃、小肠和结肠的上皮细胞,胰岛细胞,脑神经元和胶质细胞和子宫内膜腺上皮细胞等。

根据文献报道,TRIM 蛋白参与调控肿瘤的发生发展^[5],这与蛋白在组织中的表达与定位密切相关。在结直肠癌中,Williams 等^[14]发现 TRIM26 通过泛素化调节 NTH1 实现人结直肠癌 HCT116 细胞对氧化应激敏感性的调控;本研究证实,TRIM26 在人和小鼠的结肠上皮细胞上有表达,可进一步通过基因修饰小鼠探究该基因在结直肠癌进程中的调控方式。Wang 等^[17]发现 TRIM26 在肝癌临床组织标本中的表达水平量明显下调,且该基因表达缺失与肝细胞癌的恶性程度密切相关;本研究中,TRIM26 表达于肝细胞胞质中,以上结果提示 TRIM26 可能发挥抑癌基因的功能,降低该基因在肝细胞上的表达水平,可接下来探讨其表达缺失与肝癌发生的相关性。另外,赵学英等^[18]和李振强等^[19]分别在胶质瘤细胞中过表达和沉默 TRIM26 表达,证实 TRIM26 正向调控了胶质瘤细胞的增殖,并与患者的预后呈负相关。本研究发现,TRIM26 在人和小鼠的脑胶质细胞中均有较强的表达,这提示 TRIM26 在胶质细胞中表达水平变化可能引起细胞功能的改变。由此可见,明确 TRIM26 的表达定位与表达水平在研究肿瘤的发生发展过程中具有重大意义。然而,目前

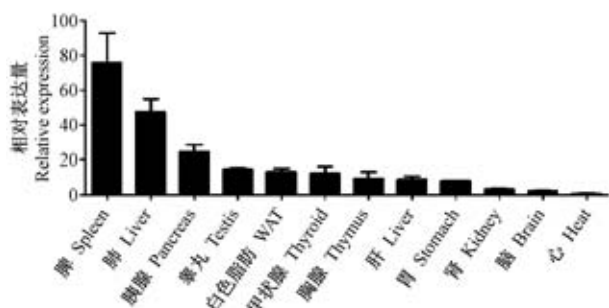


注: A:食管; B:胃; C:小肠; D:结肠; E:胰腺; F:脑; G:肺; H:肾; I:子宫内膜。

图 3 TRIM26 在主要组织器官中的表达

Note. A, Esophagus. B, Stomach. C, Small Intestine. D, Colon. E, Pancreas. F, Brain. G, Lung. H, Kidney. I, Endometrium.

Figure 3 The expression of TRIM26 in different tissues and organs of mice



注: WAT: 白色脂肪组织。

图 4 TRIM26 在主要组织器官中的相对表达量

Note. WAT, White adipose tissue.

Figure 4 The relative expression of TRIM26 in different tissues and organs of mice

对于 TRIM26 在人和小鼠主要组织器官中的功能还知之甚少,还有待进一步深入研究。

此外,本研究发现 TRIM26 在胰岛细胞上的表达尤为明显, IHC 结果显示,该基因在胰岛细胞上的表达强度明显高于胰腺外分泌腺细胞,在小鼠胰腺上亦得到了类似的结果。可见, TRIM26 在胰岛细

胞上可能发挥重要而特殊的功能。根据此结果,本课题组已委托南京大学-南京生物医药研究院构建了 TRIM26 条件性基因敲除小鼠,拟再与 Pdx-Cre 小鼠交配,获得胰岛 β 细胞特异性敲除 TRIM26 的 C57BL/6 小鼠,进而探究该基因在胰岛细胞上的功能。

本实验在对成人组织与成年小鼠的研究中发现, TRIM26 表达具有一定的组织器官特异性,提示其功能的复杂性和组织器官依赖的特征。为深入探究 TRIM26 在生长发育过程中承担的生物学功能,本课题组将利用小鼠进一步明确 TRIM26 在胚胎发育至老龄化过程中的不同时期、不同组织器官中 RNA 表达水平及蛋白表达量的变化,完善该基因在不同时间与空间的表达谱和功能谱,不仅为后续探索 TRIM26 基因在组织发育中的分子调控机制奠定基础,同时对于利用基因修饰小鼠阐明该基因在研究肿瘤的发生发展过程中的作用也是十分重要的。

参考文献:

- [1] Ikeda K, Inoue S. TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 770: 27-37.
- [2] 仇艳光, 王江雁, 王沛. TRIM 蛋白家族结构与抗病毒功能 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(1): 107-110.
- [3] Beck TW, Menninger J, Murphy WJ, et al. The feline major histocompatibility complex is rearranged by an inversion with a breakpoint in the distal class I region [J]. *Immunogenetics*, 2005, 56(10): 702-709.
- [4] Kawai T, Akira S. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins [J]. *EMBO Mol Med*, 2011, 3(9): 513-527.
- [5] 陈艳清, 曹树辉, 李传友. 三结构域蛋白 (TRIM) 家族结构及功能的研究进展 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(6): 479-484.
- [6] D'cruz AA, Babon JJ, Norton RS, et al. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity [J]. *Protein Sci*, 2013, 22(1): 1-10.
- [7] Perfetto L, Gherardini PF, Davey NE, et al. Exploring the diversity of SPRY/B30.2-mediated interactions [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(1): 38-46.
- [8] Zhao W, Li Q, Ayers S, et al. Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1037-1050.
- [9] Raposo RA, Abdel-mohsen M, Bilska M, et al. Effects of cellular activation on anti-HIV - 1 restriction factor expression profile in primary cells [J]. *J Virol*, 2013, 87(21): 11924-11929.
- [10] De Jong S, Van Eijk KR, Zeegers DW, et al. Expression QTL analysis of top loci from GWAS meta-analysis highlights additional schizophrenia candidate genes [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20(9): 1004-1008.
- [11] Wang P, Zhao W, Zhao K, et al. TRIM26 negatively regulates interferon - β production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3 [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(3): e1004726.
- [12] Ran Y, Zhang J, Liu LL, et al. Autoubiquitination of TRIM26 links TBK1 to NEMO in RLR-mediated innate antiviral immune response [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(1): 31-43.
- [13] Edmonds MJ, Carter RJ, Nickson CM, et al. Ubiquitylation-dependent regulation of NEIL1 by Mule and TRIM26 is required for the cellular DNA damage response [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(2): 726-738.
- [14] Williams SC, Parsons JL. NTH1 is a new target for ubiquitylation-dependent regulation by TRIM26 required for the cellular response to oxidative stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(12): e00616-e00617.
- [15] Xiong S, Wang Q, Zheng L, et al. Identification of candidate molecular markers of nasopharyngeal carcinoma by tissue microarray and in situ hybridization [J]. *Med Oncol*, 2011, 1: S341-S348.
- [16] Lyu XM, Zhu XW, Zhao M, et al. A regulatory mutant on TRIM26 conferring the risk of nasopharyngeal carcinoma by inducing low immune response [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(8): 3848-3861.
- [17] Wang Y, He D, Yang L, et al. TRIM26 functions as a novel tumor suppressor of hepatocellular carcinoma and its downregulation contributes to worse prognosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 458-465.
- [18] 赵学英, 樊明德, 董文艳, 等. 三结构域蛋白 26 在胶质瘤组织中的表达及临床意义 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2019, 57(3): 63-68.
- [19] 李振强, 刘健, 出良钊. 干扰 TRIM26 表达对胶质瘤细胞增殖的影响 [J]. *郑州大学学报 (医学版)*, 2019, 54(6): 802-806.

[收稿日期] 2020-02-05

梁仁拔,李欣晓,朱小东. P21 抑制剂 UC2288 诱导鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 凋亡的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 16-22.

Liang RB, Li XX, Zhu XD. Apoptosis of nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R induced by p21 inhibitor UC2288 [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.003

P21 抑制剂 UC2288 诱导鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 凋亡的研究

梁仁拔^{1#}, 李欣晓^{1#}, 朱小东^{1,2,3*}

(1.广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; 2.广西区域高发肿瘤早期防治重点实验室, 南宁 530021;
3.广西医科大学附属武鸣医院, 南宁 530021)

【摘要】 目的 探讨 P21 抑制剂 UC2288 对鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 增殖和凋亡的影响及可能的作用机制。**方法** 运用 CCK-8 实验检测 UC2288 对细胞活力的影响;利用克隆形成实验检测细胞克隆形成能力的情况;显微镜拍照法和 Hoechst 33342 染色实验观察细胞形态的变化;Annexin V-APC/7-AAD 双染法测定细胞凋亡;蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bax、Cleaved-caspase 3、Caspase 3、Bcl-2、Survivin、 γ -H2AX、P21、聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 蛋白表达情况。**结果** CCK-8 实验结果显示, UC2288 显著降低 CNE-2R 细胞的活力和增殖, 呈剂量依赖性和时间依赖性;UC2288 抑制 CNE-2R 细胞的克隆形成能力;形态学观察结果显示, UC2288 处理后, 细胞呈圆形萎缩, 细胞核固缩, 体积变小;Annexin V-APC/7-AAD 实验结果显示, UC2288 呈剂量依赖性诱导 CNE-2R 细胞凋亡;UC2288 作用细胞后, Bax、Cleaved-caspase 3、Caspase 3 和 γ -H2AX 蛋白表达水平增加, Bcl-2、Survivin、P21 和 PARP 蛋白表达量减少。**结论** UC2288 显著抑制 CNE-2R 细胞增殖, 引起 DNA 损伤, 诱导凋亡, 其机制可能与 PARP 表达水平降低有关。

【关键词】 UC2288; 鼻咽癌; 凋亡; PARP

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0016-07

Apoptosis of nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R induced by P21 inhibitor UC2288

LIANG Renba^{1#}, LI Xinxiao^{1#}, ZHU Xiaodong^{1,2,3*}

(1. Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, China. 2. Key Laboratory of Early Prevention and Treatment for Regional High Frequency Tumor (Guangxi), Ministry of Education, Nanning 530021.
3. Wuming Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021)

【Abstract】 Objective To assess the effects of P21 inhibitor UC2288 on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R and the possible mechanisms. **Methods** The effect of UC2288 on cell viability was examined by a CCK-8 assay. The colony formation ability was investigated by a colony formation assay. Changes of cell morphology were observed by microscopy and Hoechst 33342 staining. An annexin V-APC/7-AAD assay

[基金项目] 国家自然科学基金(81760544); 广西重点研发计划项目(桂科 AB18221007)。

[作者简介] 梁仁拔(1991—), 男, 在读博士, 研究方向: 鼻咽癌基础与临床研究。E-mail: liangrenba@stu.gxmu.edu.cn

李欣晓(1992—), 女, 在读博士, 研究方向: 肿瘤的基础与临床研究。E-mail: xiaoxiao92831@126.com

[通信作者] 朱小东(1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 鼻咽癌基础与临床研究。E-mail: zhuxiaodong@gxmu@126.com

was used to measure apoptosis. The protein levels of Bax, Cleaved-caspase 3, Caspase 3, Bcl-2, Survivin, γ -H2AX, P21, and PARP were measured by Western blot. **Results** The CCK-8 assay showed that UC2288 significantly reduced the viability and proliferation of CNE-2R cells in dose- and time-dependent manners. UC2288 also inhibited the colony formation of CNE-2R cells. Cells became round and atrophic, the nucleus shrunk, and the cell volume became smaller after treatment with UC2288. Annexin V-APC/7-AAD assays demonstrated that UC2288 induced apoptosis of CNE-2R cells in a dose-dependent manner. After treatment with UC2288, the expression levels of Bax, Cleaved-caspase 3, Caspase 3, and γ -H2AX increased accompanied by decreases of Bcl-2, Survivin, P21, and PARP. **Conclusions** UC2288 significantly inhibits the proliferation of CNE-2R cells, causes DNA damage, and induces apoptosis through possibly reducing the expression of PARP.

【Keywords】 UC2288; nasopharyngeal carcinoma; apoptosis; PARP

鼻咽癌是发生于鼻咽部的恶性上皮肿瘤,常见于我国南方及东南亚地区,尤其在广东省高发,俗称“广东瘤”^[1]。放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,大部分早期患者通过放射治疗能得到根治。遗憾的是,临床上约有 20% 的鼻咽癌患者经过治疗后仍出现局部复发和远处转移^[2-3],主要归因于鼻咽癌放射抗拒。再程放疗毒副反应大,而且以铂类为基础的化疗反应率为 40%~65%,预后差^[3]。因此,有必要探索更多的治疗策略,为鼻咽癌的治疗提供新的选择。

P21 是周期蛋白依赖性激酶抑制剂,参与 DNA 损伤反应^[4]。UC2288,分子式为 $C_{20}H_{18}ClF_6N_3O_2$,全称为反-1-(4-氯-3-三氟甲基-苯)-3-[4-(5-三氟甲基-吡啶-2-烷氧基)-环己基]-脲。研究发现,UC2288 是 P21 的抑制剂,通过转录和转录后途径下调 P21 的表达^[5]。UC2288 的结构与索拉非尼的结构相似^[5]。作为多种激酶抑制剂,索拉非尼能有效延长晚期肝癌、肾癌患者生存时间^[6-7],在复发或者转移鼻咽癌患者中,也显示出一定的抗肿瘤作用^[8-9]。然而,与索拉非尼不同的是,UC2288 不抑制 RAF 激酶或者 VEGF 活性^[5]。研究发现,UC2288 对人结肠癌 HCT116 细胞有一定的抑制作用^[10],但其具体的作用机制及对其他肿瘤的影响尚不清楚,有必要进行更深入全面的研究。

本研究利用鼻咽癌放射抗拒细胞株 CNE-2R^[11-13],探讨 UC2288 对 CNE-2R 细胞增殖和凋亡的影响及其可能的作用机制,为鼻咽癌的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

CNE-2R 细胞由广西医科大学肿瘤医院放疗科构建。

1.2 主要试剂与仪器

UC2288 购自美国 Abcam 公司;RPMI-1640 培养基,胎牛血清购自美国 Gibco 公司;青霉素,二甲亚砜(DMSO)购自中国索莱宝公司;0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液购自中国碧云天公司;PBS 缓冲液购自中国中杉金桥公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁公司;Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;Hoechst 33342 染色液中国索莱宝公司;BCA 蛋白定量试剂盒中国碧云天公司;Western blot 所用抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;增强型化学发光自显影试剂盒(enhanced chemiluminescence, ECL)购自中国百智生物公司;EVOS FL Auto 荧光显微镜购自美国 Life technologies 公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 用 RPMI-1640 完全培养液(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)置于 37℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,待细胞贴壁生长至融合度达 90% 以上时,用胰酶消化传代。

1.3.2 药物配制

UC2288 用二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)配成 5 mmol/L 的母液,置于 -20℃ 冰箱储存。临用时用完全培养液配制成不同浓度的工作液。

1.3.3 CCK-8 实验

取对数生长期的 CNE-2R 细胞,以 3500 个/孔、每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中培养,设空白组(不含细胞的培养液)、对照组(DMSO 组)及 UC2288 处理组(2、4、6、8、12、16 μ mol/L),每组 5 个平行孔。24 h 后,弃原培养液,按以上分组作用细胞 24、48 h,

每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 后, 用酶标仪测 450 nm 处吸光度 (OD) 值, 计算细胞存活率。存活率 (%) = (OD_{处理组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组}) $\times$ 100%。

1.3.4 平板克隆形成实验

以 300 个细胞/孔接种于 6 孔板, 置培养箱中培养 24 h 后, 用不同浓度的药物 (0、2、4、6、8 μ mol/L) 作用细胞 48 h。更换新培养液继续培养 12 d 后, PBS 缓慢冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 姬姆萨染色 30 min, 晾干后拍照, 利用 Image J 软件计算克隆数。

1.3.5 观察细胞形态

细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 用不同浓度的药物 (0 (DMSO)、4、6、8、12、16 μ mol/L) 作用细胞 48 h。于倒置显微镜观察细胞数量及形态变化。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取适量细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后弃去旧培养基, 加入不同浓度的药物 (0、4、6、8、12 μ mol/L)。培养 48 h 后, 收集上清液, 用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化并收集细胞, 根据 Annexin V-APC/7-AAD 试剂盒说明书操作, 1 h 内上流式机检测。

1.3.7 Hoechst 33342 染色实验

取适量细胞接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后弃去旧培养基, 加不同浓度的药物 (0、4、8 μ mol/L)。作用 24 h 后, 用 PBS 缓慢冲洗 2 次, 每孔加入 1 mL Hoechst 33342 染色液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。弃染色液, 用 PBS 洗涤 2 次, 于荧光显微镜观察细胞核的形态及染色的亮度。

1.3.8 蛋白免疫印迹

将细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中, 培养至融合度为 70% 左右时, 加不同浓度的药物 (0、4、8 μ mol/L)。处理 24 h 后, 提取细胞蛋白, 以 BCA 法测蛋白浓度。将蛋白样品等体积上样于 10% SDS-PAGE 电泳, 冰中恒压湿转。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。TBST 洗膜, 一抗 Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000)、Survivin (1:1000)、Cleaved-caspase 3 (1:1000)、Caspase 3 (1:1000)、 γ -H2AX (1:1000)、P21 (1:1000)、PARP (1:1000)、GAPDH (1:1000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:1000) 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 化学发光试剂盒进行曝光显影。

1.4 统计学方法

所有实验独立重复 ≥ 3 次, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 IBM SPSS 20.0 软件进行统计学分析。组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC2288 降低 CNE-2R 细胞的活力

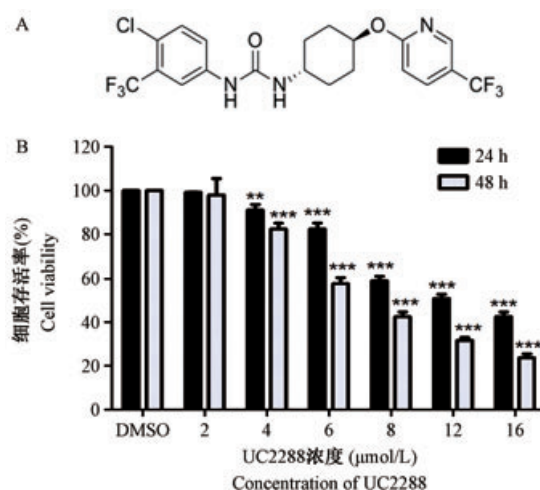
UC2288 结构如图 1A 所示。CCK8 结果显示, UC2288 明显抑制 CNE-2R 细胞的增殖, 呈剂量依赖和时间依赖关系。与对照组相比, 当 UC2288 浓度 ≥ 4 μ mol/L 时, 各组间存活率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B)。

2.2 UC2288 抑制 CNE-2R 细胞克隆形成

为进一步验证 UC2288 对细胞增殖的影响, 进行克隆形成实验。结果表明, 浓度 ≥ 4 μ mol/L 处理组的克隆形成数目明显减少 (图 2A), 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2B)。这显示 UC2288 对细胞的长期增殖能力也有明显的抑制作用。

2.3 显微镜下观察细胞形态的变化

UC2288 处理 CNE-2R 细胞 48 h 后, 直接在显微镜下观察, 随着浓度的增加, 细胞圆形萎缩或结构不完整, 体积变小, 脱落增多。当浓度为 16 μ mol/L 时, 细胞大部分脱落死亡 (图 3A)。Hoechst 染色后通过荧光显微镜观察, 经药物处理



注: A: UC2288 结构式; B: 细胞活力。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 UC2288 对 CNE-2R 细胞活力的影响

Note. A, Structure of UC2288. B, Cell viability. Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

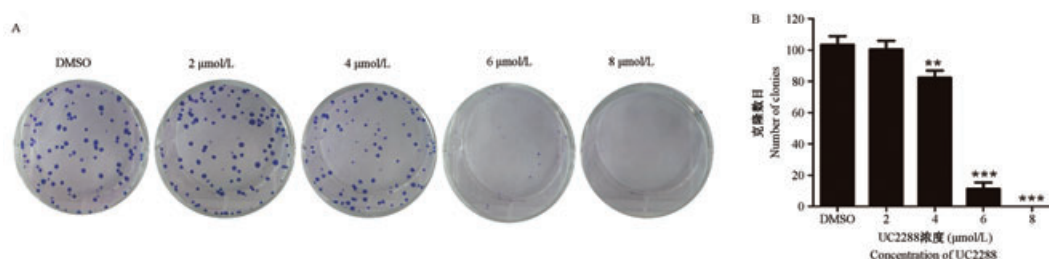
Figure 1 The effects of UC2288 on cell viability of CNE-2R

后,细胞核皱缩,染色亮度增高,呈致密浓染或呈碎块状致密浓染(图 3B),表明细胞染色质凝聚浓缩,发生凋亡。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

鉴于 UC2288 抑制细胞的增殖,且形态学观察

发现细胞在药物的作用下发生死亡,本研究运用流式细胞术进一步检测 UC2288 对细胞凋亡的影响。Annexin V-APC/7-AAD 双染实验表明,随着 UC2288 浓度的增高,细胞凋亡率显著增加(图 4A),各处理组间差异具有统计学差异($P<0.05$,图 4B)。

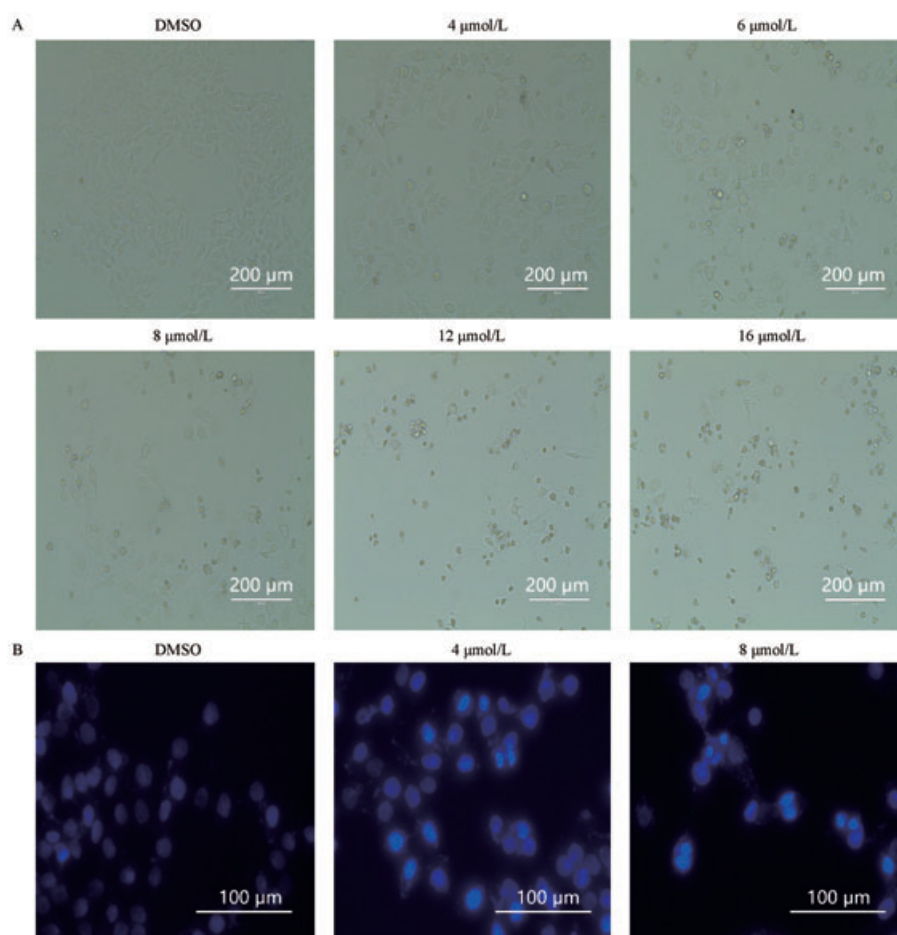


注:与对照组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 2 UC2288 对 CNE-2R 细胞克隆形成能力的影响

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

Figure 2 The Effects of UC2288 on clone formation ability of CNE-2R



注:A:光学显微镜下细胞形态;B:Hoechst 33342 染色。

图 3 UC2288 对 CNE-2R 细胞形态的影响

Note. A, Cell morphology under light microscope. B, Hoechst 33342 staining.

Figure 3 The effects of UC2288 on cell morphology of CNE-2R

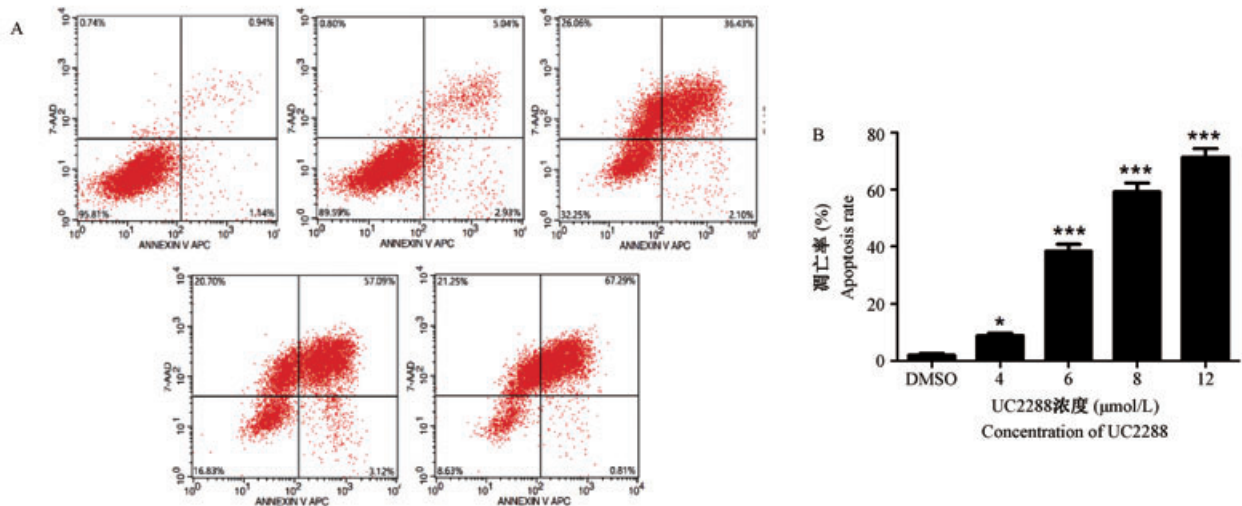
2.5 UC2288 对凋亡相关蛋白的影响

蛋白免疫印迹结果显示,与对照组相比,随着 UC2288 浓度的提高,促凋亡蛋白 Bax、Cleaved-caspase 3、Caspase 3 表达增高,而抗凋亡蛋白 Bcl-2、Survivin 表达下降。DNA 双链断裂标志蛋白 γ -H2AX 表达升高,预示 DNA 发生断裂损伤。结果表明,UC2288 可能通过诱导 DNA 双链断裂,引起细胞

凋亡(图 5)。

2.6 UC2288 对 PARP 蛋白的影响

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]是 DNA 修复酶。如图 6 所示,UC2288 作用细胞后,PARP 表达水平明显降低。这表明,UC2288 可能通过抑制 PARP 表达,诱导 DNA 损伤。

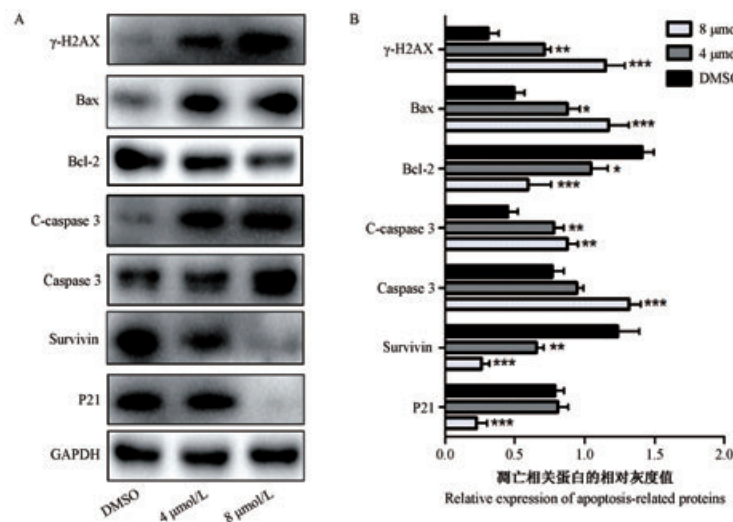


注:与对照组相比, * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 UC2288 对 CNE-2R 细胞凋亡的影响

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

Figure 4 The effects of UC2288 on cell apoptosis of CNE-2R

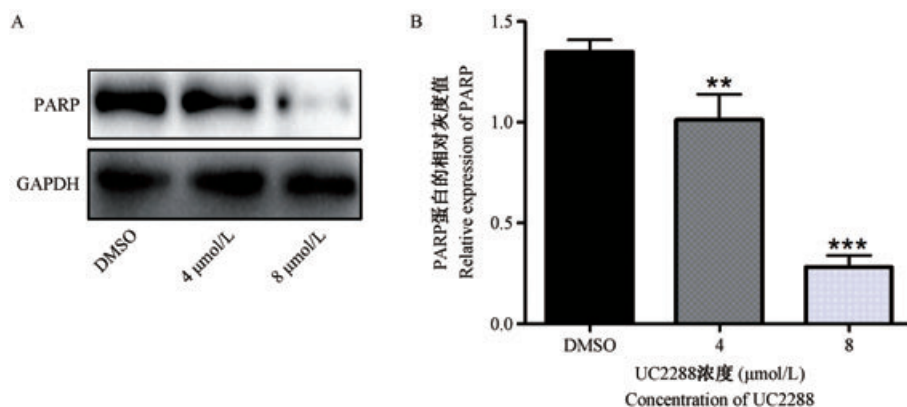


注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 UC2288 对 CNE-2R 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

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

Figure 5 The effects of UC2288 on expression of apoptosis-related proteins in CNE-2R



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

图 6 UC2288 对 CNE-2R 细胞 PARP 蛋白表达的影响

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

Figure 6 The effects of UC2288 on expression of PARP in CNE-2R

3 讨论

鼻咽癌好发于东南亚地区。每年新发病大约 87000 例,70% 患者是局部晚期^[14]。局部晚期鼻咽癌的标准治疗方案是放化疗。经过治疗后,仍有 10% 患者出现残留或局部复发^[15-16]。再程放疗和手术可挽救局部治疗失败。然而,再程放疗风险大,约 33% 患者发生 5 级毒副反应^[17]。鼻咽位置较深,结构复杂,挽救性手术难度大,且 40% 以上的患者出现面部麻木、牙关紧闭、腭痿等并发症^[18]。对于远处转移患者,采用以顺铂为基础的姑息化疗,反应率为 40%~65%。因此,需探索更多的治疗策略,为提高鼻咽癌疗效提供更多的选择。

本研究发现,UC2288 明显抑制 CNE-2R 细胞的增殖,呈浓度-效应和时间-效应关系;Hoechst 33342 染色实验和流式细胞术结果提示 UC2288 诱导 CNE-2R 细胞凋亡,随着浓度的增加,凋亡率显著升高,且 Western blot 中促凋亡蛋白 Bax、Cleaved-caspase 3、Caspase 3 表达增高和抗凋亡蛋白 Bcl-2、Survivin 表达下降,更加验证 UC2288 的促凋亡作用。

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶在 DNA 单链断裂 (single strand breaks, SSBs) 修复中发挥重要的作用,主要通过碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径^[19]。PARP 被激活时,招募其他 DNA 修复蛋白,参与 DNA 损伤修复^[20]。抑制 PARP 活性,可阻止 DNA 单链断裂的修复,产生双链断裂,最终导致细胞死亡^[21-22]。因此,PARP 抑制剂已运用于临床,在卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌和前列腺癌治疗中

取得良好的疗效^[23]。有研究发现,P21 调节 PARP 活性,参与 DNA 损伤修复^[24]。敲除 P21,引起 PARP 活化,减少 DNA 损伤^[25]。本研究中,UC2288 作用 CNE-2R 细胞后, γ -H2AX 表达增加,PARP 表达下降,而 P21 表达不呈剂量依赖性变化,这提示 UC2288 可能不是通过 P21 途径调控 PARP,UC2288 可能通过直接抑制 PARP 的活性,从而引起 DNA 双链断裂。然而,这需要进一步实验的探索。

综上,本研究表明 UC2288 可显著抑制 CNE-2R 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,这可能与降低 PARP 活性,引起 DNA 双链断裂有关。这为 UC2288 进一步的研究提供理论基础,有可能为鼻咽癌的综合治疗提供更多的选择。

参考文献:

- [1] 肖洋洋,卿吉琳,李宝铤,等.鼻咽癌实验动物模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2018,28(12):108-112.
- [2] Xiao WW, Huang SM, Han F, et al. Local control, survival, and late toxicities of locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated by simultaneous modulated accelerated radiotherapy combined with cisplatin concurrent chemotherapy: long-term results of a phase 2 study [J]. Cancer, 2011, 117(9): 1874-1883.
- [3] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. Lancet, 2019, 394(10192): 64-80.
- [4] Deng T, Yan G, Song X, et al. Deubiquitylation and stabilization of p21 by USP11 is critical for cell-cycle progression and DNA damage responses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(18): 4678-4683.
- [5] Wettersten HI, Hee Hwang S, Li C, et al. A novel P21 attenuator which is structurally related to sorafenib [J]. Cancer Biol Ther, 2013, 14(3): 278-285.

- [6] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378–390.
- [7] Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009.
- [8] Elser C, Siu LL, Winquist E, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(24): 3766–3773.
- [9] Xue C, Huang Y, Huang PY, et al. Phase II study of sorafenib in combination with cisplatin and 5-fluorouracil to treat recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(4): 1055–1061.
- [10] Gupta R, Dong Y, Solomon PD, et al. Synergistic tumor suppression by combined inhibition of telomerase and CDKN1A [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(30): E3062–E3071.
- [11] 苏芳, 朱小东, 曲颂, 等. 人鼻咽癌放射抗拒细胞株建立及其细胞周期的观察 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(16): 1221–1224.
- [12] Chen KH, Guo Y, Li L, et al. Cancer stem cell-like characteristics and telomerase activity of the nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(9): 4755–4764.
- [13] Guo Y, Zhu XD, Qu S, et al. Identification of genes involved in radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by integrating gene ontology and protein-protein interaction networks [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(1): 85–92.
- [14] Pan JJ, Ng WT, Zong JF, et al. Prognostic nomogram for refining the prognostication of the proposed 8th edition of the AJCC/UICC staging system for nasopharyngeal cancer in the era of intensity-modulated radiotherapy [J]. *Cancer*, 2016, 122(21): 3307–3315.
- [15] Mao YP, Tang LL, Chen L, et al. Prognostic factors and failure patterns in non-metastatic nasopharyngeal carcinoma after intensity-modulated radiotherapy [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35(1): 103.
- [16] Zhang MX, Li J, Shen GP, et al. Intensity-modulated radiotherapy prolongs the survival of patients with nasopharyngeal carcinoma compared with conventional two-dimensional radiotherapy: A 10-year experience with a large cohort and long follow-up [J]. *Eur J Cancer*, 2015, 51(17): 2587–2595.
- [17] Leong YH, Soon YY, Lee KM, et al. Long-term outcomes after reirradiation in nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy: A meta-analysis [J]. *Head Neck*, 2018, 40(3): 622–631.
- [18] Chan JY, Tsang RK, Wei WI. Morbidities after maxillary swing nasopharyngectomy for recurrent nasopharyngeal carcinoma [J]. *Head Neck*, 2015, 37(4): 487–492.
- [19] de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(14): 7303–7307.
- [20] Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(8): 619–631.
- [21] O'Connor MJ. Targeting the DNA damage response in cancer [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 547–560.
- [22] Satoh MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair [J]. *Nature*, 1992, 356(6367): 356–358.
- [23] Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic [J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1152–1158.
- [24] Cazzalini O, Dona F, Savio M, et al. p21CDKN1A participates in base excision repair by regulating the activity of poly(ADP-ribose) polymerase-1 [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2010, 9(6): 627–635.
- [25] Yao H, Sundar IK, Gorbunova V, et al. P21-PARP-1 pathway is involved in cigarette smoke-induced lung DNA damage and cellular senescence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80007.

[收稿日期] 2020-01-09

李文奇,冯磊. 性别对慢性交感应激导致心脏重塑的差异研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 23-28,56.

Li WQ, Feng L. Gender differences in cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 23-28,56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.004

性别对慢性交感应激导致心脏重塑的差异研究

李文奇¹, 冯磊^{2*}

(1.江南大学药学院,江苏 无锡 214122; 2.江南大学无锡医学院,江苏 无锡 214122)

【摘要】 目的 探究性别对慢性交感应激导致的心脏重塑是否存在差异。**方法** 将小鼠随机分为四组:雄性对照组、雄性异丙基肾上腺素(ISO)组、雌性对照组、雌性ISO组。皮下注射异丙基肾上腺素 ISO 10 mg/(kg·d) 14 d,诱导小鼠心脏重塑模型。通过心脏重量与小鼠体重之比(HW/BW)、心脏重量与胫骨长度之比(HW/TL),评估心脏重塑大体指标;超声心动图评估小鼠心功能;HE染色检测心肌细胞横截面积,超声心动图检测舒张末期室壁厚度,用于评估小鼠心脏肥大;天狼猩红染色用于评估心脏纤维化。**结果** 雄性ISO组与对照组相比,心体比和心腔比分别增加9.1% ($P<0.05$)和42.8% ($P<0.001$),雌性ISO组与对照组相比,心体比和心腔比分别增加12.9% ($P<0.05$)和9.5% ($P<0.05$),而与雌性ISO组相比,雄性ISO组心腔比增加了19.8% ($P<0.01$);雄性ISO组与对照组相比,心肌细胞横截面积增加了19.1% ($P<0.0001$),雌性ISO组与对照组相比,小鼠心肌细胞横截面积增加了6.9% ($P<0.05$),而与雌性ISO组相比,雄性ISO组心肌细胞横截面积增加了11.6% ($P<0.01$);与对照组相比,雄性和雌性ISO组EF值和FS值均无明显差异;雄性ISO组与对照组相比,小鼠心脏纤维化面积增加了158% ($P<0.0001$),雌性ISO组与对照组相比,纤维化面积增加了39.7% ($P<0.05$),与雌性ISO组相比,雄性ISO组心脏的纤维化面积增加了119% ($P<0.0001$)。**结论** 性别对慢性交感应激导致的心脏重塑存在差异,与雌鼠相比,雄鼠更容易出现心脏肥大和心脏纤维化。

【关键词】 性别;慢性交感应激;心脏重塑

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0023-06

Gender differences in cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation

LI Wenqi¹, FENG Lei^{2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China.

2. Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122)

【Abstract】 Objective To investigate whether there are gender differences in cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation. **Methods** Mice were randomly divided into four groups: male control, male isoprenaline (ISO), female control, and female ISO groups. A cardiac remodeling model was established by subcutaneous injection of ISO for 14 days. The ratio of heart weight to body weight (HW/BW) and the ratio of heart weight to tibia length (HW/TL) were used to assess cardiac remodeling; Cardiac function was assessed using echocardiography to determine diastolic left ventricular posterior wall thickness (LVPW;d). Hematoxylin and eosin staining was used to determine myocyte cross-sectional area. Picric-sirius red staining was used to evaluate cardiac fibrosis. **Results** Compared with the control group,

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30772586)。

【作者简介】 李文奇(1995—),男,本科,研究方向:药理学。E-mail:6171504015@stu.jiangnan.edu.cn

【通信作者】 冯磊(1974—),男,副教授,研究方向:生物医学工程。E-mail:feng2008lei@163.com

the HW/BW and HW/TL ratios were increased by 9.1% ($P<0.05$) and 42.8% ($P<0.001$), respectively, in the male ISO group and by 12.9% and 9.5% (all $P<0.05$), respectively, in the female ISO group. The increase was significantly greater in the male ISO group (19.8%, $P<0.01$) than in the female ISO group. Compared with the control group, the myocyte cross-sectional area in the male ISO group increased by 19.1% ($P<0.0001$), while that in the female ISO group increased by 6.9% ($P<0.05$). The increase was significantly greater in the male ISO group ($P<11.6\%$) than in the female ISO group. There was no significant difference in cardiac function among groups. Compared with the control group, the cardiac fibrosis area of the male ISO group increased by 158% ($P<0.0001$) and by 39.7% ($P<0.05$) in the female ISO group. Compared with the female ISO group, the fibrosis area of the male ISO group increased by 119% ($P<0.0001$).

Conclusions There are gender differences in cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation. Greater cardiac hypertrophy and cardiac fibrosis occur in male mice compared with female mice.

【Keywords】 gender; chronic sympathetic activation; cardiac remodeling

心脏重塑是心血管疾病发生发展的重要阶段,是多种心血管疾病的病理基础,其发病机制包括交感-儿茶酚胺系统的过度激活、细胞钙信号的改变等,其中 β -肾上腺素受体(β -AR)及其信号通路的过度激活是心脏重塑过程中最重要的机制。 β -肾上腺素受体(β -AR)是 G 蛋白偶联受体(GPCR)超家族的成员之一,能够将细胞外信号传递到细胞内,引起生物学功能的相应改变^[1]。心脏交感神经激活后释放儿茶酚胺,而儿茶酚胺作用于 β -AR,发挥其生理和病理效应^[2-3]。交感神经系统的过度激活,儿茶酚胺水平的升高,在心脏重塑的发生发展中起着关键作用。儿茶酚胺的过度释放会激活肾上腺素受体,最终导致心力衰竭^[4-7]。然而慢性交感神经刺激导致的的心脏重塑仍然受一些因素影响,如性别因素。既往的研究指出,性别可能影响慢性容量超负荷或心肌梗死引起的心脏重塑。在慢性容量超负荷引起的心脏重塑模型中,雌性大鼠左心室扩张程度小于雄性大鼠^[8]。此外,雌性大鼠心肌梗死后左心室肥厚程度相比雄性大鼠有所减轻^[9]。然而,性别差异是否影响肾上腺素受体介导的心脏重塑尚不清楚。因此,本研究拟通过比较性别对于慢性交感神经刺激导致的心脏重塑,为性别对 β -AR 介导心脏重塑的差异提供了证据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12 周龄、体重 22 ~ 24 g 的 SPF 级野生型 C57BL/6 小鼠 28 只,雌雄各半,分别随机分为 2 组,每组 7 只。小鼠来源于北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2016-0010],动物饲养于北京大学医学部实验动物中心 SPF 级动物饲养屏障环境[SYXK(京)2016-0041]中,温度维持在 22℃ ~

25℃,湿度保持在 50% ~ 55%、12 h 明暗交替采光,小鼠自由进食饮水,所有动物实验遵守北京大学生物医学研究伦理要求(LA2010-048),并按照实验动物的 3R 原则基于人道的关怀。

1.2 主要仪器

ISO(WXBC5302 V)购自 Sigma 公司;Vevo 2100 小动物超声仪(2100CR0674)购自 FujiFilm Visual Sonics 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠心脏重塑模型的构建

将小鼠随机分为 4 组:雄性对照组、雄性 ISO 组、雌性对照组、雌性 ISO 组。ISO 组小鼠皮下注射异丙基肾上腺素 ISO 10 mg/(kg·d)(WXBC5302V, Sigma) 14 d,诱导小鼠心脏重塑模型,对照组小鼠皮下注射等量生理盐水 14 d。

1.3.2 超声心动图

使用 Vevo 2100 小动物超声仪(2100CR0674, FujiFilm Visual Sonics),探头频率为 30 MHz,将探头置于小鼠胸骨前,用 1.5%异氟醚麻醉小鼠,以获得准确和稳定的图像,二维超声心动图在乳头肌水平的短轴上捕捉到最大的左室直径。采用 M 型图像测量舒张期左室后壁厚度(LVPW;d),分别计算左心室射血分数(EF,%)和左心室短轴缩短率(FS,%),以评估心脏收缩功能。连续测量三个心动周期,计算均值。

1.3.3 心脏取材

称取小鼠体重(body weight, BW),麻醉后打开胸腔,用预冷的 PBS 冲洗残余血液,用滤纸蘸干心脏周围水分,称重并记录心脏体重(heart weight, HW)。将小鼠右侧胫骨取出,用游标卡尺测量胫骨长度(tibia length, TL),分别计算心体比(HW/BW)和心胫比(HW/TL)。将心脏沿短轴中点处切开,取

心底部心脏置于 4% 的中性甲醛进行固定。剩余心脏组织小心放入冻存管并迅速放于液氮中, -80°C 冰箱中储存。

1.3.4 HE 染色

小鼠麻醉后处死取材, 将心脏固定在甲醛中, 包埋于石蜡, 并切成厚度为 $5\ \mu\text{m}$ 的石蜡切片。标本用乙醇梯度脱水, 石蜡包埋。用 HE 染色评价心肌细胞面积, 显微镜下获得心肌细胞形态图像, 使用 Image-Pro-Plus 6 软件进行测量。

1.3.5 天狼猩红染色

苦味酸-天狼猩红染色观察胶原沉积情况, 用纤维化面积百分比评价心脏纤维化。胶原蛋白和整个心脏的面积由 Image-Pro-Plus 6 软件测量。

1.4 统计学方法

应用 GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) 进行统计分析, 计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有数据均采用双因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 性别对心体比和心胫比的影响

通过比较小鼠心体比与心胫比, 评价心脏肥大。发现与对照组相比, ISO 组小鼠的心脏均出现

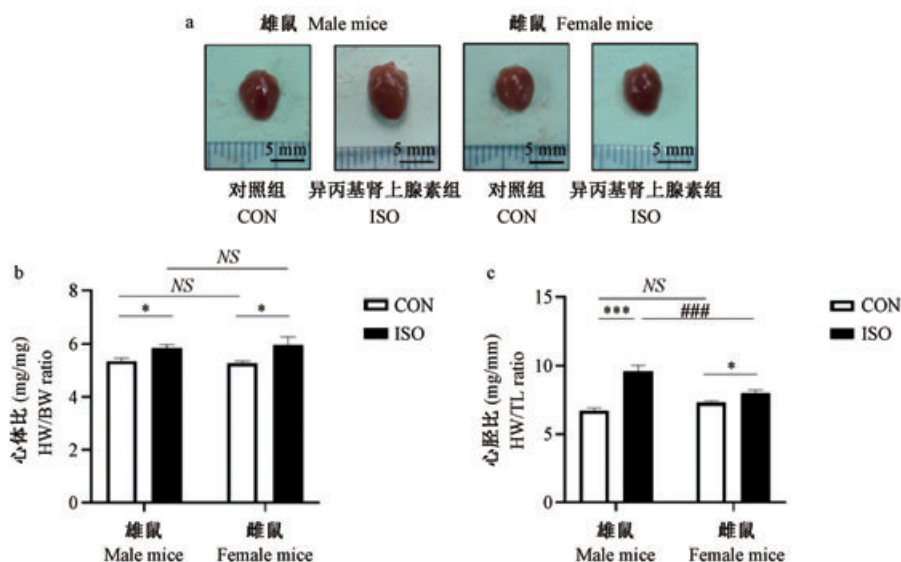
明显的肥大(见图 1a), 与对照组相比, 雄性 ISO 组心体比和心胫比分别增加 9.1% ($P < 0.05$) 和 43.7% ($P < 0.001$), 雌性 ISO 组心体比和心胫比分别增加 12.9% 和 13.4% (均为 $P < 0.05$), 而与雌性 ISO 组相比, 雄性 ISO 组心胫比增加了 19.8% ($P < 0.01$) (见图 1b、1c)。

2.2 性别对心脏肥大的影响

通过 HE 染色的方法, 评价心脏形态变化。雄性 ISO 组与对照组相比, 小鼠心肌细胞横截面积增加了 19.7% ($P < 0.0001$), 雌性 ISO 组与对照组相比, 小鼠心肌细胞横截面积增加了 17.0% ($P < 0.0001$), 而与雌性 ISO 组相比, 雄性 ISO 组心肌细胞横截面积增加了 11.6% ($P < 0.01$) (见图 2b、2c)。超声心动图检测心脏舒张末期室壁厚度 LVPW;d, 雄性 ISO 组与对照组相比, LVPW;d 增加了 31.4% ($P < 0.001$), 雄性 ISO 组 LVPW;d 增加了 21.5% ($P < 0.05$), 而雌雄组 ISO 组之间无明显差异(见图 2)。提示性别对慢性交感应激导致的有一定影响, 相较于雄鼠, 雌鼠对于慢性交感应激导致的心脏肥大反应性较差。

2.3 性别对心脏纤维化的影响

通过天狼猩红染色的方法, 评价心脏胶原沉积情况。发现与对照组相比, ISO 组胶原沉积明显增

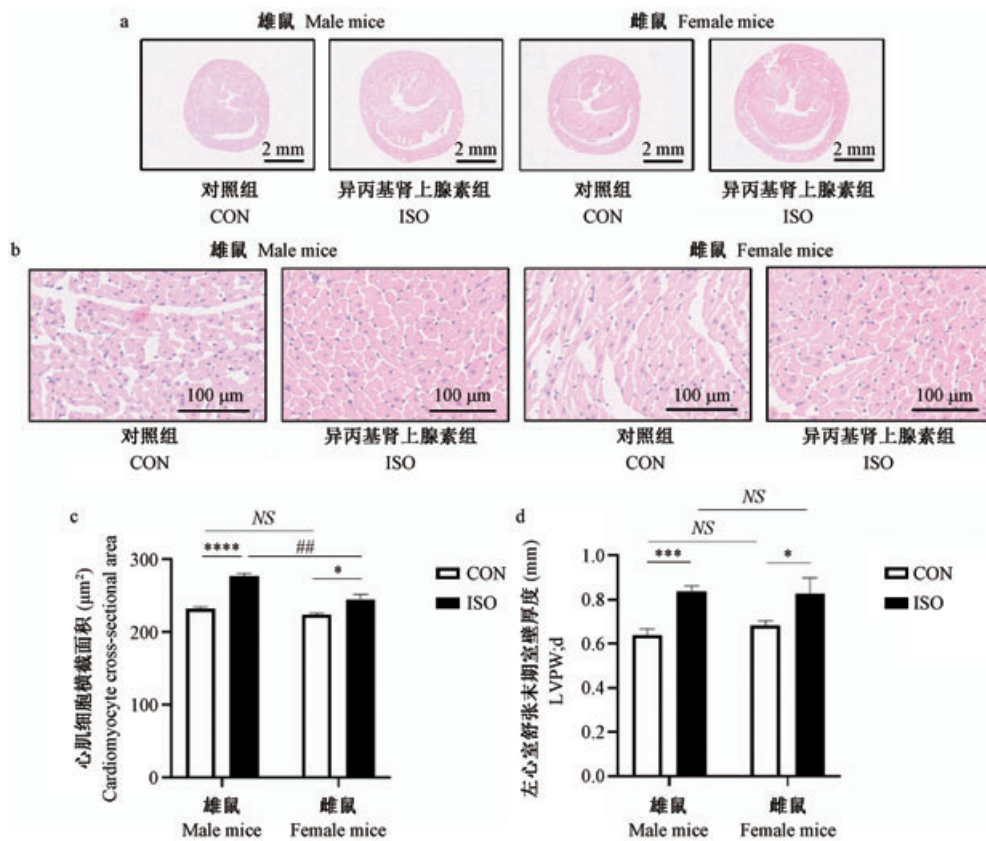


注:a:小鼠心脏大体图;b:心体比统计图;c:心胫比统计图。心体比:与相应对照组相比, * $P < 0.05$ 。心胫比:与雄性对照组相比, *** $P < 0.001$;与雌性对照组相比, * $P < 0.05$;与雌性给药组相比, ### $P < 0.001$ 。

图1 性别对心体比和心胫比的影响($n=7$)

Note. a, General view of mice heart. b, Quantitative analysis of the ratio of heart weight to length body weight (HW/BW ratio) ($n=7$). c, Quantitative analysis of the ratio of heart weight to length tibia (HW/TL ratio) ($n=7$). HW/BW ratio, Compared with relevant control group, * $P < 0.05$. HW/TL ratio, Compared with male control group, *** $P < 0.001$. Compared with female control group, * $P < 0.05$. Compared with female ISO group, ### $P < 0.001$.

Figure 1 Effects of gender on the HW/BW ratio and HW/TL ratio

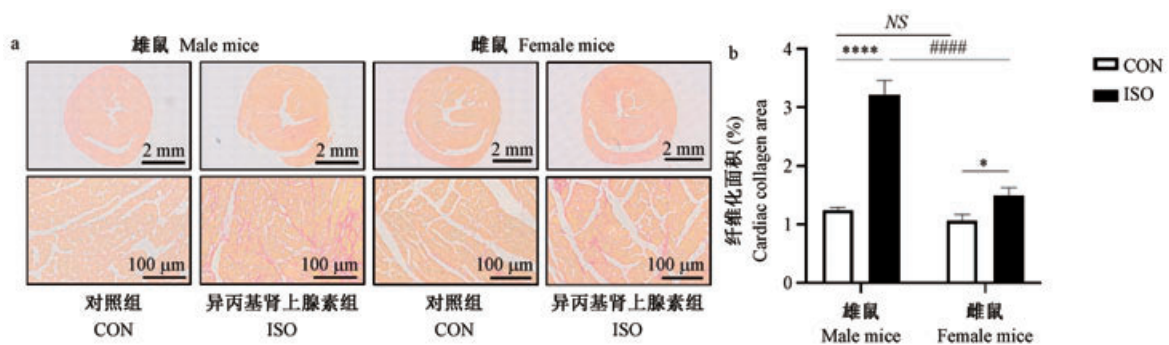


注:a:小鼠心脏 HE 染色大体图;b:心肌细胞横截面积代表图;c:心肌细胞横截面积统计图;d:LVPW;d 统计图。心肌细胞横截面积:与雄性对照组相比, **** $P<0.0001$;与雌性对照组相比, * $P<0.05$;与雌性给药组相比, ## $P<0.01$ 。左心室舒张末期室壁厚度:与雄性对照组相比, *** $P<0.001$;与雌性对照组相比, * $P<0.05$ 。

图 2 性别对心脏肥大的影响 ($n=7$)

Note. a, Representative HE staining micrographs displaying heart. b, Representative HE staining micrographs displaying cardiomyocyte cross-sectional area. c, Quantitative analysis of cardiomyocyte cross-sectional area ($n=7$). d, Quantitative analysis of diastolic left ventricular posterior wall thickness (LVPW,d) after ISO-treatment for 14 days. Cardiomyocyte cross-sectional area, Compared with male control group, **** $P<0.0001$. Compared with female control group, * $P<0.05$. Compared with female ISO group, ## $P<0.01$. LVPW,d, Compared with male control group, *** $P<0.001$. Compared with female control group, * $P<0.05$.

Figure 2 Effects of gender on the cardiac hypertrophy



注:a:心脏天狼猩红染色代表图;b:纤维化面积统计图。与雄性对照组相比, **** $P<0.0001$;与雌性对照组相比, * $P<0.05$;与雌性给药组相比, #### $P<0.0001$ 。

图 3 性别对心脏纤维化的影响 ($n=7$)

Note. a, Representative micrographs of picrosirius red staining. b, Quantitative analysis of cardiac collagen content. Compared with male control group, **** $P<0.0001$. Compared with female control group, * $P<0.05$. Compared with female ISO group, #### $P<0.0001$.

Figure 3 Effects of gender on cardiac fibrosis

加雄性 ISO 组小鼠心脏纤维化面积增加了 158% ($P < 0.0001$), 雌性 ISO 组小鼠增加了 39.7% ($P < 0.05$), 而实验组中, 与雄性 ISO 组相比, 雌性 ISO 组心脏的纤维化面积降低了 54.4% ($P < 0.0001$) (见图 3)。提示性别对慢性交感应激导致的纤维化有一定影响, 相较于雄鼠, 雌鼠对于慢性交感应激导致的纤维化反应性较差。

2.4 性别对心功能的影响

通过超声心动图的方法 (见图 4a), 测定小鼠 EF 值和 FS 值, 评价心脏的收缩功能。发现与对照组相比, EF 值和 FS 值均无明显差异, ISO 组雌雄鼠之间也无明显差异 (见图 4b、4c), 提示性别对慢性交感应激导致的心脏收缩功能无明显影响。

3 讨论

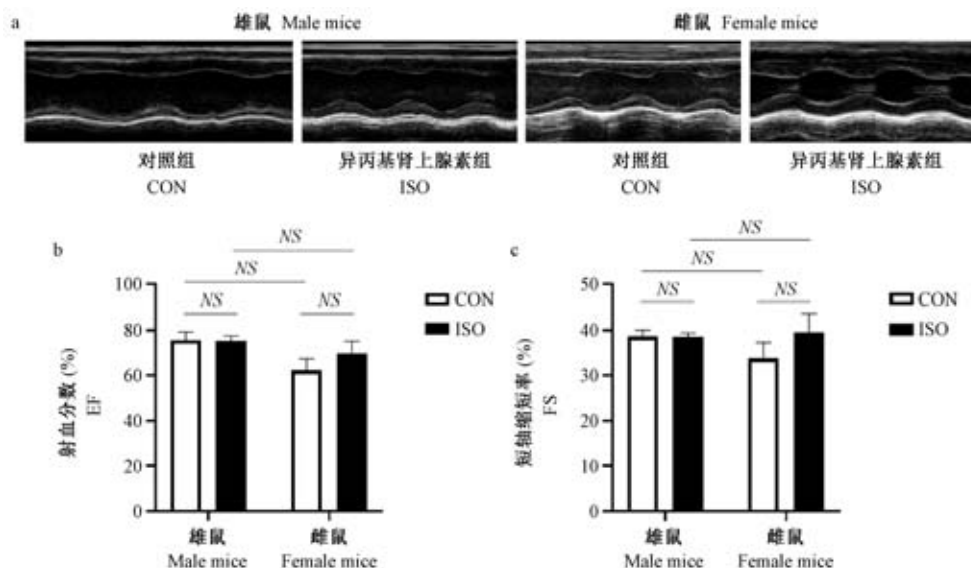
心脏重塑是心血管疾病发生发展的重要阶段, 是多种心血管疾病的病理基础, 主要有心脏肥大和心脏纤维化两种病理表现。 β -肾上腺素受体 (β -AR) 是 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 超家族的成员之一, 能够将细胞外信号传递到细胞内, 激活受体下游一系列信号途径, 从而引起生物学功能的相应改变^[1-3]。 β -AR 及其信号通路的过度激活在心脏重塑的发生发展的整个过程中起十分关键的作用, 生理条件下, 心脏交感神经系统激活后释放儿茶酚胺, 而儿茶酚胺作用于 β -AR, 发挥其生理和病理效

应。交感神经系统的过度激活, 儿茶酚胺水平的升高, 在心脏重塑的发生发展中起着关键作用。儿茶酚胺的过度释放会激活肾上腺素受体, 最终导致心力衰竭^[4-7]。受体阻滞剂被广泛应用于慢性心力衰竭的治疗中, 其作用机制是抑制心脏交感神经过度激活, 能够有效抑制心脏重塑, 改善心脏收缩功能^[10-12]。

既往的研究指出, 性别可能影响慢性容量超负荷或心肌梗死引起的心脏重塑。在慢性容量超负荷引起的心脏重塑模型中, 雌性大鼠左心室扩张程度小于雄性大鼠^[8]。此外, 雌性大鼠心肌梗死后左心室壁厚程度相比雄性大鼠有所减轻^[9]。然而, 性别差异是否影响肾上腺素受体介导的心脏重塑尚不清楚。因此, 本文为性别对于 β -AR 介导心脏重塑的差异提供了证据。

在本研究中, 我们发现在慢性交感应激导致的心脏重塑中存在着性别差异, 雌鼠对慢性交感应激的反应性较差。与雄性 ISO 组相比, 雌性 ISO 组小鼠心脏体积减小, 心腔比明显降低。而心功能的结果显示, 雌雄鼠间无明显差异。原因可能是心脏重构处于代偿阶段, 心功能未受损^[13]。

已有的研究表明, 性别在其它类型的重塑中也存在着类似的差异。在心肌梗死后的重塑中, 相比于雄性小鼠, 雌性小鼠表现为心肌肥厚程度减少; 而在容量负荷引起的心脏重塑中, 也观



注: a; 超声心动图代表图; b; EF 值统计图; c; FS 值统计图。

图 4 性别对心功能的影响 ($n=7$)

Note. a, Representative parasternal short axis view echocardiographic M-mode images after ISO-treatment for 14 days. b, Quantitative analysis of ejection fraction (EF) after ISO-treatment for 7 days ($n=7$). c, Quantitative analysis of fraction shortening (FS) after ISO-treatment for 7 days.

Figure 4 Effects of gender on cardiac function

察到了性别的差异^[14]。此外,动物实验的结果也表明,与雄性大鼠相比,雌鼠对容量负荷引起的心脏重塑有较好的保护作用^[15-16]。

我们发现在慢性交感应激导致的心脏肥大和心脏纤维化中存在性别差异,其可能的机制主要有三个:1.影响儿茶酚胺浓度和反应性。儿茶酚胺主要包括肾上腺素(E)、去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA),儿茶酚胺通过肾上腺素受体激活交感神经系统。而性别可以影响血浆儿茶酚胺浓度。研究发现,切除性腺的雌性大鼠血浆儿茶酚胺浓度高于对照组^[17]。同时性别在应激反应的血浆儿茶酚胺调节中也起着重要作用。例如,雌性小鼠在胰岛素诱导的低血糖期间儿茶酚胺反应较弱^[18]。此外,有研究指出与进行倾斜试验的年龄相关男性相比,女性志愿者去甲肾上腺素的增加明显减少^[14]。因此,血浆儿茶酚胺调节的性别差异可能与 ISO 诱导的心脏重塑的性别差异有关。2.影响雌激素。雌激素在心脏病中起关键作用^[19]。 β -AR 的调控依赖于雌激素,慢性雌激素治疗可降低 β -AR 的反应性^[20]。慢性雌激素治疗可以增加儿茶酚胺的分泌,而儿茶酚胺分泌能够降低 β -AR 的表达和反应性^[21]。而研究指出,雌性大鼠卵巢切除后, β 1-AR 的表达明显增加,而给予雌激素补充后其表达趋于正常^[22]。此外,还有研究报道心肌细胞和成纤维细胞中均含有功能性的雌激素受体,提示心脏疾病的性别差异可能与雌激素对心脏的直接影响有关^[23]。3.影响黄体酮和睾酮。黄体酮和睾酮与心脏疾病的进程密切相关。黄体酮可保护女性免受 III 类抗心律失常药物引起的心律失常,可以通过与雌激素的协同作用减弱小鼠的结合亲和力^[24]。而与雌激素和黄体酮对心脏病的保护作用相反,睾酮会加重急性心肌炎症,并对心脏早期重塑产生不利影响^[25]。

在本研究中,我们的数据提供了性别对于慢性交感应激导致心脏重塑的证据,为心脏重塑患者的针对性治疗提供了依据。

参考文献:

- [1] 关开行,王文景,姜允奇,等. β 肾上腺素受体在心血管系统的基础与临床研究进展[J].中国心血管杂志,2019,24(5):399-403.
- [2] van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart [J]. J Clin Invest, 2013, 123(1): 37-45.
- [3] Chaulet H, Lin F, Guo J, et al. Sustained augmentation of cardiac α 1A-adrenergic drive results in pathological remodeling with contractile dysfunction, progressive fibrosis and reactivation of matricellular protein genes [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(4): 540-552.
- [4] Ayme-Dietrich E., Marzak H., Lawson R., et al. Contribution of serotonin to cardiac remodeling associated with hypertensive diastolic ventricular dysfunction in rats [J]. J Hypertens, 2015, 33(11): 2310-2321.
- [5] Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(4): 549-574.
- [6] Fu Y, Xiao H, Zhang Y. Beta-adrenoceptor signaling pathways mediate cardiac pathological remodeling [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2012, 4: 1625-1637.
- [7] Kiriazis H, Wang K, Xu Q, et al. Knockout of β (1)- and β (2)-adrenoceptors attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(4): 684-692.
- [8] Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload [J]. Card Fail, 2002, 8(2): 101-107.
- [9] Litwin SE, Katz SE, Litwin CM, et al. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling [J]. Cardiology, 1999, 91(3): 173-183.
- [10] Hwangbo S, Kim J, Her S, et al. Therapeutic potential of human adipose stem cells in a rat myocardial infarction model [J]. Yonsei Med J, 2010, 51(1): 69-76.
- [11] Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure-a rational approach for disease treatment [J]. Cell Metab, 2015, 21(2): 183-194.
- [12] Rengo G, Pagano G, Filardi PP, et al. Prognostic value of lymphocyte γ protein-coupled receptor Kinase-2 protein levels in patients with heart failure novelty and significance [J]. Circ Res, 2016, 118(7): 1116-1124.
- [13] Machackova J, Sangalmath SK, Barta J, et al. Amelioration of cardiac remodeling in congestive heart failure by β -adrenoceptor blockade is associated with depression in sympathetic activity [J]. Cardiovasc Toxicol, 2010, 10(1): 9-16.
- [14] Karlsson S, Scheurink AJ, and Åhrén B. Gender difference in the glucagon response to glucopenic stress in mice [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(1): R281-R288.
- [15] Mercurio G, Deidda M, Piras A, et al. Gender determinants of cardiovascular risk factors and diseases [J]. Cardiovasc Med (Hagerstown), 2010, 11(3): 207-220.
- [16] Gardner JD, Brower GL, Janicki JS. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload [J]. J Card Fail, 2002, 8(2): 101-107.
- [17] Gomes HL, Graceli JB, Gonçalves WL, et al. Influence of gender and estrous cycle on plasma and renal catecholamine levels in rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2012, 90(1): 75-82.

(下转第 56 页)

范敏,郑文兰,文晓敏. 加味宫外孕 II 号方对人滋养叶细胞 Caspase-12 通路影响的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 29-34.

Fan M, Zheng WL, Wen XM. Effect of modified ectopic pregnancy formula II on the Caspase-12 pathway in human trophoblasts [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 29-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.005

加味宫外孕 II 号方对人滋养叶细胞 Caspase-12 通路影响的研究

范 敏¹, 郑文兰^{2*}, 文晓敏²

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 观察加味宫外孕 II 号方对人滋养叶细胞内质网应激 Caspase-12 信号通路凋亡相关蛋白 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 水平的影响及细胞超微结构变化, 探讨其治疗异位妊娠的作用机制。**方法** 将 SD 大鼠分为阴性对照组(B 组)、低、中、高剂量中药组(C 组、D 组、E 组)、甲氨蝶呤组(F 组)、中西药结合组(G 组), 予相应药物处理后取血制备含药血清, 将各组含药血清分别作用于 HTR-8/SVneo 细胞 24 h, 并设置未用含药血清处理的细胞作为空白对照组(A 组)。采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)与实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 HTR-8/SVneo 细胞中凋亡基因 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达水平; 采用透射电镜观察细胞超微结构的变化。**结果** (1) Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白水平及 mRNA 相对表达量: A 组与 B 组比较无差异($P>0.05$); 与 B 组比较, C 组 Caspase-7 mRNA、Caspase-9 蛋白及 Caspase-3 蛋白与 mRNA 表达均上调明显($P<0.05$), 而 Caspase-7 蛋白、Caspase-9 mRNA 表达无差异($P>0.05$); D、E、F、G 组 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量均较 B 组明显上调($P<0.05$); E 组较 D 组上调明显($P<0.05$); E 组与 F 组比较, Caspase-7、Caspase-9 蛋白与 mRNA 及 Caspase-3 蛋白表达上调明显($P<0.05$); E 组与 G 组比较, Caspase-9 蛋白与 mRNA 及 Caspase-3 蛋白表达上调明显($P<0.05$); F 组与 G 组比较无差异($P>0.05$)。 (2) 透射电镜结果显示: A 组与 B 组细胞染色质均匀散布于核膜内, 细胞内质网、线粒体、高尔基体清晰可见; 与 B 组比较, C、D、E、F、G 组细胞微绒毛减少, 染色质固缩, 异染色质边缘化, 部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂、甚至消失, 线粒体空泡化等典型的凋亡特征改变。**结论** 加味宫外孕 II 号方可能通过激活内质网应激 Caspase-12 信号通路, 破坏滋养叶细胞的形态学结构, 上调 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 凋亡相关基因的表达, 促进滋养叶细胞凋亡。

【关键词】 加味宫外孕 II 号方; 内质网应激; HTR-8/SVneo 细胞; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0029-06

Effect of modified ectopic pregnancy formula II on the Caspase-12 pathway in human trophoblasts

FAN Min¹, ZHENG Wenlan^{2*}, WEN Xiaomin²

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

【基金项目】 国家自然科学基金(81660805)。

【作者简介】 范敏(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗异位妊娠的基础研究。E-mail: fanmin1207@163.com

【通信作者】 郑文兰(1963—), 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 异位妊娠中西医结合治疗研究。E-mail: yunqq533@163.com

【Abstract】 Objective To examine the effect of modified ectopic pregnancy formula II on levels of apoptosis-related proteins Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 in the endoplasmic reticulum stress Caspase-12 signaling pathway in human trophoblasts, as well as associated changes in cell ultrastructure, to explore its treatment mechanism for ectopic pregnancy. **Methods** SD rats were divided into a negative control group (group B), low-, medium-, and high-dose Chinese medicine groups (groups C, D, E), a methotrexate group (group F), and a combined Chinese and Western medicine group (group G). After receiving the corresponding drug treatment, we collected blood to prepare a drug-containing serum. The drug-containing serum from each group was applied to HTR-8/SVneo for 24 h, and cells not treated with drug-containing serum were set as a blank control group (group A). The expression levels of apoptotic genes Caspase-7, Caspase-9, Caspase-3 protein and mRNA in HTR-8/SVneo cells were detected via Western blot and real-time quantitative PCR. Transmission electron microscopy was used to observe changes in cell ultrastructure. **Results** (1) There was no difference between group A and group B in terms of Caspase-7, Caspase-9, or Caspase-3 protein levels and relative mRNA expression ($P > 0.05$). Compared with group B, expression levels of Caspase-7 mRNA, Caspase-9 protein, and Caspase-3 protein and mRNA were significantly up-regulated in group C ($P < 0.05$), but we found no differences in Caspase-7 protein or Caspase-9 mRNA expression ($P > 0.05$). In terms of Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 protein and mRNA expression, expression was significantly increased in groups D, E, F, and G compared with group B ($P < 0.05$), and expression in Group E was significantly up-regulated compared with group D ($P < 0.05$). Group E was compared with group F, expression levels of Caspase-7, Caspase-9 protein and mRNA, and Caspase-3 protein were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Group E was compared with group G, expression of Caspase-9 protein and mRNA and Caspase-3 protein was significantly increased ($P < 0.05$). There was no difference between group F and group G ($P > 0.05$). (2) Transmission electron microscopy indicated that the cell chromatin in group A and group B was evenly distributed in the nuclear membrane, and the endoplasmic reticulum, mitochondria, and Golgi apparatus were clearly visible. Compared with group B, the cell microvilli in groups C, D, E, F, and G were reduced, chromatin was condensed, heterochromatin was marginalized, some mitochondria were swollen, disordered, broken, or even absent, and mitochondrial vacuolation were typical apoptotic characteristics. **Conclusions** Modified ectopic pregnancy formula II may activate the Caspase-12 signaling pathway of endoplasmic reticulum stress, destroy the morphological structure of trophoblasts, up-regulate the expression of Caspase-7, Caspase-9, and Caspase-3 apoptosis-related genes, and promote trophoblast apoptosis.

【Keywords】 modified ectopic pregnancy formula II; endoplasmic reticulum stress; HTR-8/SVneo cells; Caspase-7; Caspase-9; Caspase-3

内质网应激信号转导通路是目前研究细胞凋亡的热点之一, Caspase-12 作为特有的仅在内质网应激状态下激活的蛋白, 与细胞凋亡及疾病发展变化的关系已被逐步揭示。Caspase-7、Caspase-9 与凋亡靶因子 Caspase-3 是 Caspase-12 通路中的关键蛋白, 研究显示内质网应激介导细胞凋亡时 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 呈高表达^[1-2]。本院基于“瘀”是导致异位妊娠主要病因病机的中医理论, 运用加味宫外孕 II 号方保守治疗异位妊娠, 取得肯定临床疗效, 且前期研究证实该方具有诱导细胞凋亡的作用^[3], 但是否可以通过内质网过度应激 Caspase-12 信号通路调控 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 基因表达发挥促细胞凋亡作用尚未可知。本实验运用人绒毛膜滋养层细胞系 HTR-8/SVneo 代替异位妊娠滋养细胞来研究该方诱导凋亡的机

制^[4], 为中医药保守治疗异位妊娠及药物开发利用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康雌性 SD 大鼠 36 只, SPF 级, 体重 (200 ± 20) g, 由湖北省实验动物研究中心提供[SCXK(鄂)2015-0018]。饲养于湖北省预防医学科学院屏障动物实验环境[SYXK(鄂)2017-0065]。本实验通过湖北省实验动物管理与使用委员会批准(20182901), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 实验细胞

HTR-8/SVneo 人绒毛膜滋养层细胞系来自于武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院。

1.2 主要试剂与仪器

加味宫外孕 II 号方(丹参、赤芍各 15 g,桃仁、三棱、莪术各 9 g,蜈蚣 4 g,全蝎 6 g,土鳖虫 10 g,紫草 25 g,购于贵州省中医院,熬成 3 g/mL 的中药液备用);注射用甲氨蝶呤(广东岭南制药有限公司生产,国药准字 H20054692);胎牛血清(美国 Gibco);Caspase-9(中国武汉博士德);Caspase-7(美国 CST);Caspase-3(美国 Abcam);逆转录及荧光定量试剂盒(中国南京 Vazyme);引物(中国武汉擎科生物)。QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI);FEI TecnaiG200 TWIN 透射电镜(美国 FEI)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

36 只大鼠随机分为 6 组,即阴性对照组(B 组)、低、中、高剂量的中药加味宫外孕 II 号方组(C 组、D 组、E 组)、甲氨蝶呤组(F 组)及中剂量加味宫外孕 II 号方+甲氨蝶呤组(G 组)。由人与大鼠等效剂量换算^[5],计算出加味宫外孕 II 号方低剂量为 12 g/(kg·d),中、高剂量分别为 24、48 g/(kg·d)。B 组予中药中剂量等体积生理盐水灌胃;C 组、D 组、E 组分别予中药低、中、高剂量灌胃;F 组予中药中剂量等体积生理盐水灌胃,G 组予中剂量中药灌胃,两组均在取血前 1 h 按 7.775 mg/kg 体重肌注甲氨蝶呤;灌胃每天 1 次,连续 8 d。

1.3.2 含药血清的制备

第 8 天末次给药 1 h 后心脏采血,3000 r/min 离心 12 min,分离血清,0.22 μm 滤膜过滤除菌,56℃灭活 30 min,将同组大鼠的血清混合、分装,存于-80℃冻存备用。

1.3.3 HTR-8/SVneo 细胞培养及处理

用含 10% 胎牛血清和 1% 青、链霉素的 RPMI 1640 完全培养基接种细胞于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中,细胞贴壁生长至 85% 左右,胰酶消化传代。取生长状态良好的细胞接种于六孔板,培养 24 h,加入对应组别含药血清,前期研究证实含药血清体积分数 10% 为最佳,故选用此体积分数含药血清作用于 HTR-8/SVneo 细胞 24 h,收集细胞进行相关指标检测。为排除大鼠含药血清对实验结果的干扰,设置未用含药血清处理的细胞作为空白对照组,作为阴性对照组的参照。

1.3.4 Western blot 检测 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达水平

提取总蛋白并测定浓度,聚丙烯酰胺凝胶上

样,电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭,一抗(Caspase-7 1:1000、Caspase-9 1:500、Caspase-3 1:2000 稀释)4℃孵育过夜,TBST 洗膜,二抗(1:5000 稀释)37℃孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 发光液显影,胶片定影,BandScan 软件进行胶片灰度值分析。

1.3.5 Real-time PCR 检测 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达水平

提取总 RNA 并检测纯度和浓度,RNA 定量后逆转录合成 cDNA,反应条件为 25℃ 5 min,50℃ 15 min,85℃ 5 min,4℃ 10 min,配制 20 μL 体系进行基因扩增,扩增条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,40 个循环。以 2^{-ΔΔCt} 进行所得数据分析。引物设计序列如下(见表 1)。

1.3.6 透射电镜观察细胞超微结构变化

分别用 2.5% 戊二醛及 1% 四氧钨酸室温固定,按常规方法乙醇梯度脱水,再使用丙酮和 Epon-812 包埋剂等体积混合液与纯 Epon-812 包埋剂渗透,制成 70 nm 超薄切片,2% 醋酸双氧铀-枸橼酸铅染色,透射电镜观察细胞超微结构变化。

1.4 统计学方法

GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白相对表达量

A 组与 B 组比较无差异($P > 0.05$)。与 B 组比较,C 组 Caspase-7 蛋白无差异($P > 0.05$),D、E、F、G 组表达量上调($P < 0.05$);与 C 组比较,E、F、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$);与 D 组比较,E、G 组蛋白表达量上调($P < 0.05$);与 F 组比较,E 组蛋白表达

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	片段长度 Fragment length
GAPDH	F: 5'-TCAAGAAGGTGCTGAAGCAGG-3' R: 5'-TCAAAGGTGGAGCAGTGGGT-3'	115 bp
Caspase-7	F: 5'-TCTTCGCCTATTCACGGTT-3' R: 5'-GGCAACTCTGTCAATTCACCC-3'	152 bp
Caspase-9	F: 5'-CTTCGTTTCTGCGAACTAACAGG-3' R: 5'-GCACCACTGGGGTAAGGTTT-3'	75 bp
Caspase-3	F: 5'-AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC-3' R: 5'-ACAGTCCAGTCTGTACCACG-3'	81 bp

量上调($P<0.05$);G 组与 E、F 组比较无差异($P>0.05$)。与 B 组比较,C、D、E、F、G 组 Caspase-9 蛋白表达量上调($P<0.05$);与 C 组比较,D、E、F、G 组蛋白表达量上调($P<0.05$);与 D、F、G 组比较,E 组蛋白表达量上调($P<0.05$);F 组与 G 组比较无差异($P>0.05$)。与 B 组比较,C、D、E、F、G 组 Caspase-3 蛋白表达量上调($P<0.05$);与 C、D 组比较,E、F、G 组蛋白表达量上调($P<0.05$);与 F、G 组比较,E 组蛋白表达量上调($P<0.05$);F 组与 G 组比较无差异($P>0.05$),(见图 1、表 2)。

2.2 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 相对表达量

A 组与 B 组比较无差异($P>0.05$)。与 B 组比较,C、D、E、F、G 组 Caspase-7 mRNA 表达量上调($P<0.05$);与 C、D 组比较,E、G 组 mRNA 表达量上调($P<0.05$);与 F 组比较,E 组 mRNA 表达量上调($P<0.05$),G 组无差异($P>0.05$);E 组与 G 组比较无差异($P>0.05$)。与 B 组比较,C 组 Caspase-9 mRNA 表达无差异($P>0.05$),D、E、F、G 组表达量上调($P<0.05$);与 C 组比较,E、F、G 组 mRNA 表达量上调($P<0.05$);与 D、F、G 组比较,E 组 mRNA 表达量上调($P<0.05$);F 组与 G 组比较无差异($P>0.05$)。与 B 组比较,C、D、E、F、G 组 Caspase-3 mRNA 表达量上调($P<0.05$);与 C 组比较,E、G 组

mRNA 表达量上调($P<0.05$);与 D 组比较,E、F、G 组 mRNA 表达量上调($P<0.05$);E、F、G 组三者比较无差异($P>0.05$),(见表 3)。

2.3 透射电镜观察 HTR-8/SVneo 细胞超微结构的变化

A、B 组细胞包膜完整,表面有微绒毛,见清晰的核膜及核仁,均匀的染色质散布于核膜内,细胞内线粒体、内质网、高尔基体清晰可见,线粒体内外膜完整、形态良好;C、D、E、F、G 组微绒毛减少,其中 C、D 组异染色质沿核膜边集,部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂,E、F、G 组细胞核不规则,染色质固缩,边集于核内的异染色质增多,胞浆内布满肿胀的线粒体,部分出现脊紊乱或断裂、甚至消失,线粒体空泡化;E、G 组观察到自噬体形成增多,(见图 2)。

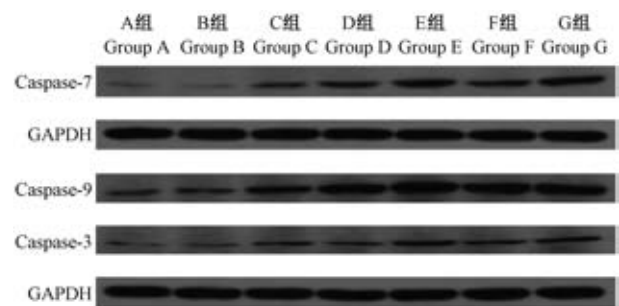


图 1 HTR-8/SVneo 细胞蛋白表达量

Figure 1 Protein expression of HTR-8/SVneo cells

表 2 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Protein expression of Caspase-7, Caspase-9 and Caspase-3 in HTR-8/SVneo cells

组别 Groups	Caspase-7	Caspase-9	Caspase-3
A 组 Group A	0.037±0.005	0.070±0.005	0.053±0.008
B 组 Group B	0.036±0.006	0.073±0.009	0.057±0.011
C 组 Group C	0.081±0.015	0.121±0.018 *	0.141±0.006 *
D 组 Group D	0.129±0.032 *	0.187±0.019 *▲	0.104±0.009 *
E 组 Group E	0.264±0.016 *▲●	0.269±0.027 *▲●	0.272±0.014 *▲●
F 组 Group F	0.182±0.024 *▲□	0.212±0.010 *▲□	0.173±0.005 *▲□
G 组 Group G	0.231±0.010 *▲●	0.216±0.004 *▲□	0.202±0.012 *▲□

注:与 A、B 组比较,* $P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$;与 D 组比较,● $P<0.05$;与 E 组比较,□ $P<0.05$ 。

Note. Compared with group A and B, * $P<0.05$. Compared with group C, ▲ $P<0.05$. Compared with group D, ● $P<0.05$. Compared with group E, □ $P<0.05$.

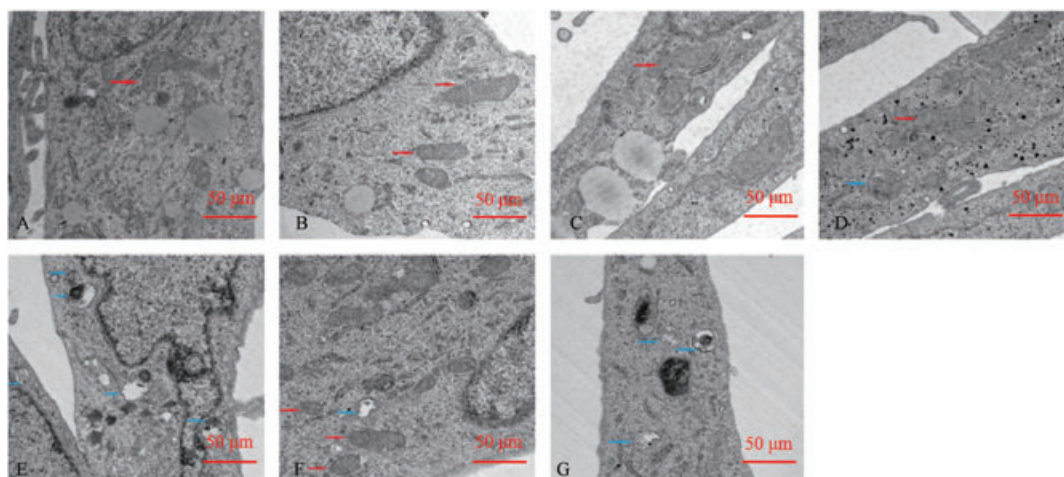
表 3 HTR-8/SVneo 细胞 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 mRNA 表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Expression of Caspase-7, Caspase-9 and Caspase-3 mRNA in HTR-8/SVneo cells

组别 Groups	Caspase-7	Caspase-9	Caspase-3
A 组 Group A	1.030±0.088	1.004±0.054	0.940±0.071
B 组 Group B	1.089±0.057	1.019±0.063	1.025±0.143
C 组 Group C	1.507±0.193 *	1.380±0.123	1.895±0.149 *
D 组 Group D	1.583±0.063 *	1.655±0.122 *	1.805±0.218 *
E 组 Group E	2.312±0.159 *▲●	2.444±0.176 *▲●	3.060±0.340 *▲●
F 组 Group F	1.701±0.078 *□	1.950±0.185 *▲□	2.483±0.351 *●
G 组 Group G	1.988±0.179 *▲●	1.905±0.219 *▲□	2.964±0.084 *▲●

注:与 A、B 组比较,* $P<0.05$;与 C 组比较,▲ $P<0.05$;与 D 组比较,● $P<0.05$;与 E 组比较,□ $P<0.05$ 。

Note. Compared with group A and B, * $P<0.05$. Compared with group C, ▲ $P<0.05$. Compared with group D, ● $P<0.05$. Compared with group E, □ $P<0.05$.



注:红色箭头指示为线粒体,蓝色箭头指示为自噬体。

图2 HTR-8/SVneo 细胞透射电镜观察

Note. Red arrow indicates mitochondria. Blue arrow indicates autophagy.

Figure 2 TEM observation of HTR-8/SVneo cells

3 讨论

本实验从蛋白、基因水平测定及形态学观察,研究妊娠滋养叶细胞凋亡情况。为排除大鼠含药血清对实验结果的干扰,设置空白对照组作为参照,确保实验结果的准确性。细胞凋亡是指在多种条件刺激下,多基因、多通路联合调控的细胞主动有序的死亡方式^[6]。细胞凋亡的发生可清除体内有害、多余、突变或衰老的细胞,同时抑制细胞过度增殖^[7],在胚胎发育、肿瘤的发生及自身免疫系统疾病中占有重要地位^[8]。现研究的细胞凋亡途径主要有死亡受体、线粒体和内质网途径^[9]。研究显示中药可以通过调控内质网应激对疾病产生影响^[10]。活血化瘀中药可通过死亡受体通路和线粒体通路促使异位妊娠胚胎死亡已有报道,而关于本院经验方加味宫外孕 II 号方能否通过内质网应激介导滋养细胞凋亡尚未阐明。研究表明内质网应激参与子痫前期、妊娠期糖尿病等妊娠相关疾病的发生发展^[11-12]。各种因素如 Ca^{2+} 紊乱、氧化应激、病毒感染、营养缺乏、缺氧、药物或环境应激引起内质网功能障碍^[13-14],蛋白质在腔内正确折叠受阻,出现过量的错误折叠和未折叠蛋白在内质网腔中积累的现象称为内质网应激^[15-16]。适当的内质网应激可促进蛋白质的重新折叠或抑制蛋白质的合成以减轻细胞损伤,同时清除不可逆损伤细胞恢复稳态,而过强的内质网应激超过未折叠蛋白的承受能力无法修复细胞损伤时,则引起 Caspase 和相关蛋白酶的激活,引发凋亡级联放大效应^[17]。

内质网过度应激时,胞质中的 Caspase-7 转移到内质网表面发生蛋白水解, Caspase-7 激活 Caspase-12,活化的 Caspase-12 裂解 Caspase-9,进而分解凋亡效应因子 Caspase-3 诱发细胞凋亡^[18]。课题前期研究结果提示加味宫外孕 II 号方含药血清处理的 HTR-8/SVneo 细胞中仅在内质网应激时活化的 Caspase-12 蛋白及基因水平呈高表达。从以上数据分析,我们发现经中、高剂量中药、甲氨蝶呤及二者联合用药干预后的大鼠血清作用于 HTR-8/SVneo 细胞, Caspase-7、Caspase-9 蛋白及 mRNA 表达水平与所有药物处理组的 Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达量均较空白及阴性对照组增加,中药低剂量组 Caspase-7 mRNA、Caspase-9 蛋白表达增加,提示中药及甲氨蝶呤能够上调 Caspase-12 通路中凋亡因子的表达。中药低剂量组 Caspase-7 蛋白、Caspase-9 mRNA 表达与空白及阴性对照组比较无差异,考虑可能与此剂量下蛋白剪切激活、转录后修饰有关。经中药中、高剂量与甲氨蝶呤处理的滋养叶细胞蛋白与基因表达处于高水平,说明 HTR-8/SVneo 细胞内质网发生过度应激,内质网凋亡通路被激活,通过调控 Caspase-12 信号通路发挥凋亡作用。由此推测,加味宫外孕 II 号方及甲氨蝶呤促妊娠滋养叶细胞凋亡的机制之一可能是通过内质网过度应激激活 Caspase-12 通路诱导 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 因子活化的凋亡途径。其中中药高剂量组较中药低、中剂量组表达更显著,说明高剂量较低、中剂量促细胞凋亡作用增强,可达到进一步促进胚胎消亡的功效。而中药高剂量组杀胚效果与

甲氨蝶呤组、中西药结合组相近,郑文兰等^[19]研究显示中药加大剂量时杀胚效果增强,且对肝的损伤较使用甲氨蝶呤小,鉴于中药具有高效杀胚且低毒副作用的特点,临床值得推广应用。

本实验还通过细胞形态学、超微结构的变化进一步观察细胞凋亡情况。发现低、中、高剂量中药、甲氨蝶呤与中西药结合含药血清处理 HTR-8/SVneo 细胞,出现染色质固缩,异染色质边缘化,部分线粒体肿胀、脊紊乱或断裂、甚至消失,线粒体空泡化等凋亡特征。电镜下未见明显凋亡小体,可能与细胞尚处于凋亡早期,未进入核碎裂阶段有关。线粒体在细胞凋亡发生时反应较灵敏,中药高剂量组、甲氨蝶呤组与中西药结合组线粒体损伤严重,且中药高剂量组与中西药结合组可见自噬体形成增多,研究提示细胞自噬过度可启动凋亡,使细胞程序化死亡,二者存在协同关系^[20]。本研究从形态学上证实经不同剂量的中药、西药及中西药结合含药血清处理的细胞存在不同程度损伤和细胞凋亡的典型特征。因此我们推断加味宫外孕 II 号方通过破坏妊娠滋养叶细胞正常形态结构,使线粒体功能障碍,ATP 合成受阻,致妊娠组织失去营养支持而消亡。

综上,加味宫外孕 II 号方可破坏滋养叶细胞的超微结构,诱导细胞凋亡,其机制可能是内质网过度应激激活 Caspase-12 通路,通过上调 Caspase-7、Caspase-9、Caspase-3 凋亡基因的表达促使滋养叶细胞凋亡。本研究在细胞超微结构中发现大量自噬体形成,可能该方与自噬也存在一定关系,下一步可针对滋养叶细胞自噬机制开展研究,挖掘中医药保守治疗异位妊娠的更多理论依据。

参考文献:

- [1] Ren MT, Gu ML, Zhou XX, et al. Sirtuin 1 alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of intestinal epithelial cells in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5800-5813.
- [2] 王海臻,蔡丹纯,廖丹丹,等. 内质网应激介导滋养细胞凋亡在妊娠期肝内胆汁淤积症中的作用及机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(5): 572-577.
- [3] 郑文兰,杨江燕,谢智,等. 加味宫外孕 II 号方对早孕大鼠滋养细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2 的影响 [J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(12): 73-74.
- [4] 陈涛. 邓高丕教授关于输卵管妊娠基础研究的总结与创新 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [5] 张君涛,王平,刘爱峰,等. 中药含药血清制备方法的研究概述 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(11): 4006-4009.
- [6] Zeng C, Xing R, Liu J, et al. Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(1): 1-12.
- [7] 阎海. 细胞凋亡研究进展 [J]. *中山大学研究生学刊(自然科学与医学版)*, 2012, 33(3): 8-13.
- [8] Mondal T, Lavanya AVS, Mallick A, et al. Novel Triazole linked 2-phenyl benzoxazole derivatives induce apoptosis by inhibiting miR-2, miR-13 and miR-14 function in *Drosophila melanogaster* [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(6): 786-799.
- [9] Dai C, Li J, Tang S, et al. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(7): 4075-4085.
- [10] 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.
- [11] Xiong J, Ding N, Gao T, et al. Hypermethylation of endoplasmic reticulum disulfide oxidase 1 α leads to trophoblast cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress in preeclampsia [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8588-8599.
- [12] 韩云,陈丽平,郑艳莉,等. 内质网应激介导的胎盘滋养细胞凋亡在妊娠期糖尿病合并胎儿生长受限中的研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2018, 19(5): 445-446.
- [13] Lin X, Zhao Y, Li S, et al. Astaxanthin attenuates glutamate-induced apoptosis via inhibition of calcium influx and endoplasmic reticulum stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806(7): 43-51.
- [14] Simard JC, Vallieres F, de Liz R, et al. Silver nanoparticles induce degradation of the endoplasmic reticulum stress sensor activating transcription factor-6 leading to activation of the NLRP-3 inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5926-5939.
- [15] Clayton BL, Popko B. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia [J]. *Brain Res*, 2016, 1648: 594-602.
- [16] Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78 [J]. *FASEB J*, 2013, 27(4): 1600-1609.
- [17] Jong CJ, Ito T, Prentice H, et al. Role of mitochondria and endoplasmic reticulum in taurine-deficiency-mediated apoptosis [J]. *Nutrients*, 2017, 9(8): 795.
- [18] Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33869-33874.
- [19] 郑文兰,杨江燕,文晓敏,等. 加味宫外孕 II 号方对早孕大鼠滋养细胞及肝脏的影响 [J]. *贵州医药*, 2016, 40(10): 1032-1035.
- [20] 蔺婷,罗晶婧,周芳亮,等. 益气解毒方通过诱导自噬促进鼻咽癌细胞凋亡的作用研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(10): 1149-1158.

[收稿日期] 2020-01-06

何嘉玲, 暴国, 王天奇, 等. 斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 35-41.

He JL, Bao G, Wang TQ, et al. Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 35-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.006

斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作

何嘉玲, 暴国, 王天奇, 张长勇, 李楠, 孙德明*

(国家卫生健康委科学技术研究所实验动物中心, 北京 100081)

【摘要】 目的 探讨斑马鱼幼鱼整鱼的石蜡切片制作。**方法** 以 4 d 斑马鱼幼鱼为材料, 探讨使用不同固定剂和脱水剂的切片效果。**结果** 4% PFA 过夜不适合幼鱼脑组织和肌肉固定, 组织脆裂严重, 但对肠道影响较小。Bouin's 液适合幼鱼固定, 后续使用叔丁醇脱水稍优于乙醇。Bouin's 液固定的幼鱼脑组织脱水 1 min, 肌肉组织脱水 4 min 能获得良好的切片效果。**结论** 在优化条件下, 制作的切片基本达到了切片完整, 薄厚均匀, 无褶无刀痕, 裂痕; 染色核质分明, 红蓝适度, 透明洁净等要求。可供需进行斑马鱼幼鱼石蜡切片的研究者参考。

【关键词】 斑马鱼幼鱼; 石蜡切片; 固定剂; 脱水剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0035-07

Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva

HE Jialing, BAO Guo, WANG Tianqi, ZHANG Changyong, LI Nan, SUN Deming*

(Experimental Animal Center of National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

【Abstract】 Objective To develop a method of paraffin-embedded section preparation of whole zebrafish larva. **Methods** At 4 days post-fertilization, zebrafish larvae were used to explore the effect of two kinds of fixative solution and dehydration reagent on paraffin-embedded sections. **Results** Overnight 4% PFA fixation was not suitable for brain or muscle tissues of zebrafish larva. The tissue was severely brittle, but it had little effect on the intestines. Bouin's fixative solution was suitable for fixation of zebrafish larva, and subsequent use of tert-butanol or ethanol showed little difference. The dehydration by tert-butanol was slightly better than that of ethanol. For Bouin's solution-fixed zebrafish larva, brain tissue dehydrated for 1 minute and muscle tissue dehydrated for 4 minutes can obtain a standard paraffin section which has no folds, no cracks and clearly dyed. **Conclusions** Under optimized conditions, the prepared sections met the standard for paraffin-embedded sections: a complete, uniform thickness, no folds, no knife marks or cracks, a clearly dyed nucleus, moderately red and blue, transparent, and clean. This method can be used as a reference for researchers who need to prepare paraffin-embedded sections of zebrafish larva.

【Keywords】 zebrafish larva; paraffin-embedded section; fixative solution; dehydration reagent

斑马鱼 (*Danio rerio*) 又名蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼, 隶属辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属, 是发育生物学、遗传学、毒理学等领域重要的脊椎动物模

型^[1-5]。然而, 目前国内尚缺乏其系统的组织形态学描述。为数不多的国内研究也较多地关注斑马鱼成鱼的组织形态学变化, 如成鱼的脑、肠道、心

【基金项目】 2019 年度国家卫生健康委科研所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019GJM03); 2018 年度国家卫计委科研所科技创新重点项目 (2018GJ07)。

【作者简介】 何嘉玲 (1980—), 女, 助研, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: missu329@aliyun.com

【通信作者】 孙德明 (1958—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: sundemingnet@163.com

脏和肝等^[6-8]。在生物学及医学领域,由于斑马鱼早期胚胎透明,易于观察,其在各领域的应用远远较成鱼广泛。然而目前国内尚未检索到关于斑马鱼幼鱼石蜡切片条件优化的文献。研究者在进行幼鱼石蜡切片的过程中多采用传统石蜡切片制备方法,切片质量良莠不齐^[9-10]。斑马鱼幼鱼体型小,含水量高,有必要摸索出一套适合于斑马鱼幼鱼的石蜡切片方法,以获得优质的组织切片。

优质的石蜡组织切片能够保持细胞间的正常相互关系,清晰显示组织细胞的形态结构,真实地展示组织形态学结构。在条件摸索中我们发现,不恰当的石蜡切片制作方法,可能人为导致正常的生理组织出现“异常”的形态和结构,影响实验的判断。本实验以斑马鱼幼鱼整鱼为实验材料,从固定、脱水、透明等环节出发摸索实验条件。通过 HE 染色后采集图像,展示不同条件下获得的切片效果,为后续研究者进行斑马鱼幼鱼切片制作提供有益的参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用斑马鱼成鱼为野生型 TU 品系,由北京大学生命科学学院细胞增殖与分化教育部重点实验室张博教授馈赠,20~24 周龄,体重约 350~390 mg,雌雄各 4 尾。按照 Westerfield^[11]述及的方法饲养、繁育、收集受精卵。受精卵清洗和消毒后,放入含有 1‰(w/v)亚甲基蓝的培养液中,于 28.5℃ 培养箱中培养 4 d,期间每天更换新鲜培养液。上述斑马鱼饲养及实验均在国家卫生健康委科学技术研究所实验动物中心[SYXK(京)2018-0010]完成。所有研究方案均通过国家卫生健康委科学技术研究所实验动物福利伦理委员会审批(NRIFH11-1912-6),严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Tricaine(sigma);多聚甲醛(天津市致远化学试剂有限公司);波恩氏液(北京百奥莱博科技有限公司);乙醇(宜兴市第二化学试剂厂);二甲苯(宜兴市第二化学试剂厂);叔丁醇(上海阿拉丁化学试剂有限公司);苏木素染液(珠海贝索生物技术有限公

司);伊红(天津市大茂化学试剂厂)。切片机(德国莱卡公司);正置光学显微镜(德国莱卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 固定、脱水、透明

受精后 4 d(4 days post fertilization, 4dpf) 幼鱼固定前,用 0.02% 的 Tricaine (ethylm-aminobenzoate, 1 mol/L Tris - HCl, pH9.0) 进行安乐死。随后分别用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 和 Bouin's 液固定 24 h。固定完成后,4% 多聚甲醛固定的样品放入装有蒸馏水的离心管中,置摇床上,清洗 3~4 次,每 15~30 min 换一次水。Bouin's 液固定的样品放入装有 70% 乙醇(配制时 50 mL 中加 30 μ L 浓氨水)的离心管中,同法清洗固定组织,以去除固定液中色素的干扰。

脱水时间分别为 1 min 和 4 min,叔丁醇脱水后直接浸蜡,乙醇脱水后经二甲苯透明后浸蜡,透明程序为:无水乙醇-二甲苯等体积混合液 2.5 min,二甲苯 I 1 min,二甲苯 II 1 min。

实验设计详见表 1、表 2 和表 3。

1.3.2 浸蜡、包埋、切片

按照常规方法进行浸蜡,包埋和切片处理。透明后于 65℃ 浸蜡,共 2 次,分别为 20 min 和 40 min。为获得斑马鱼不同切面的切片,包埋时可使用高精密镊子在液态石蜡中摆放幼鱼。待蜡块彻底冷却后,蜡块于 -20℃ 冰箱冷冻 1~2 h,修块,制备 5 μ m 切片。

1.3.3 HE 染色

石蜡切片的 HE 染色参考常规方法进行。切片 65℃ 干烤 1 h 后立即浸入二甲苯脱蜡,二甲苯 I 和二甲苯 II 各 25 min。随后梯度水化:无水乙醇 I,无水乙醇 II,95% 乙醇 I,95% 乙醇 II,75% 乙醇,蒸馏水各 10 min。苏木精-伊红(HE)染色按常规方法进行:苏木素染液染色 2 min,蒸馏水洗 3 次,盐酸乙醇 2 s,蒸馏水洗 3 次,氨水乙醇 20 s,蒸馏水洗 3 次,伊红染色 1 min,蒸馏水洗 3 次。随后 75% 乙醇快速脱水,95% 乙醇 I,95% 乙醇 II,100% 乙醇 I,100% 乙醇 II 各脱水 5 min,二甲苯 I 和二甲苯 II 各 15 min,最后中性树胶封片,制成永久切片。用正置显微镜观察并采集图片。

表 1 斑马鱼 4 dpf 幼鱼石蜡切片实验分组

Table 1 Experimental group of 4dpf zebrafish larva for paraffin section

组别 Groups	固定液 Fixative solution	脱水剂 Dehydrating agent	透明剂 Transparent agent
组 I Group I	4%多聚甲醛 4% PFA	叔丁醇 Tertiary butanol	/
组 II Group II	4%多聚甲醛 4% PFA	乙醇 Ethanol	二甲苯 Xylene
组 III Group III	波恩氏液 Bouin's solution	叔丁醇 Tertiary butanol	/
组 IV Group IV	波恩氏液 Bouin's solution	乙醇 Ethanol	二甲苯 Xylene

表 2 脱水过程

Table 2 Process of dehydration

组 I Group I	时间 (min) Time	组 II Group II	时间 (min) Time	组 III Group III	时间 (min) Time	组 IV Group IV	时间 Time (min)
30%叔丁醇 30% Tertiary butanol	1 4	30%乙醇 30% Ethanol	1 4	70%叔丁醇 70% Tertiary butanol	1 4	70%乙醇 70% Ethanol	1 4
40%叔丁醇 40% Tertiary butanol	1 4	40%乙醇 40% Ethanol	1 4	80%叔丁醇 80% Tertiary butanol	1 4	80%乙醇 80% Ethanol	1 4
50%叔丁醇 50% Tertiary butanol	1 4	50%乙醇 50% Ethanol	1 4	90%叔丁醇 90% Tertiary butanol	1 4	90%乙醇 90% Ethanol	1 4
60%叔丁醇 60% Tertiary butanol	1 4	60%乙醇 60% Ethanol	1 4	95%叔丁醇 95% Tertiary butanol	1 4	95%乙醇 95% Ethanol	1 4
70%叔丁醇 70% Tertiary butanol	1 4	70%乙醇 70% Ethanol	1 4	100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4
80%叔丁醇 80% Tertiary butanol	1 4	80%乙醇 80% Ethanol	1 4	100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4
90%叔丁醇 90% Tertiary butanol	1 4	90%乙醇 90% Ethanol	1 4				
95%叔丁醇 95% Tertiary butanol	1 4	95%乙醇 95% Ethanol	1 4				
100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4				
100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4				

表 3 透明过程

Table 3 Process of transparency

组 II Group II	时间 (min) Time	组 IV Group IV	时间 (min) Time
乙醇-二甲苯 (1:1) Ethanol-Xylene (1:1)	2.5	乙醇-二甲苯 (1:1) Ethanol-Xylene (1:1)	2.5
二甲苯 Xylene	1	二甲苯 Xylene	1
二甲苯 Xylene	1	二甲苯 Xylene	1

2 结果

2.1 固定剂对切片效果的影响

参考斑马鱼成鱼组织的固定,采用应用较多的单一固定剂 4% PFA 和复合固定剂 Bouin's 液分别固定斑马鱼幼鱼。4%多聚甲醛固定的幼鱼,后续无论何种脱水条件,脑组织(图 1a、1b、1e、1f)都出现了明显的收缩和脆裂,骨骼肌纤维也出现不同程度的收缩,间隙异常增宽(图 2a、2b、2e、2f)。而经 Bouin's 液固定的幼鱼,都较好地保持组织的原形,低倍镜下没有观察到明显的组织脆裂的现象(图 1C、1D、1G、1H)。但对于幼鱼深部的器官,如肠道

等则受固定液影响较小,除 4% PFA 固定后乙醇梯度脱水 1 min 的幼鱼(图 2b)以外,其余 PFA 固定幼鱼的肠道没有出现类似脑和肌肉组织脆裂的现象。结果详见图 1。

此外,在固定过程中应注意,为避免机体出现自溶引起组织结构的变化,鱼施行安乐死后,应尽快进行固定;固定过程中,由于前期硬度不够,应确保幼鱼水平摆放,避免体轴弯曲而影响后续切片和观察。

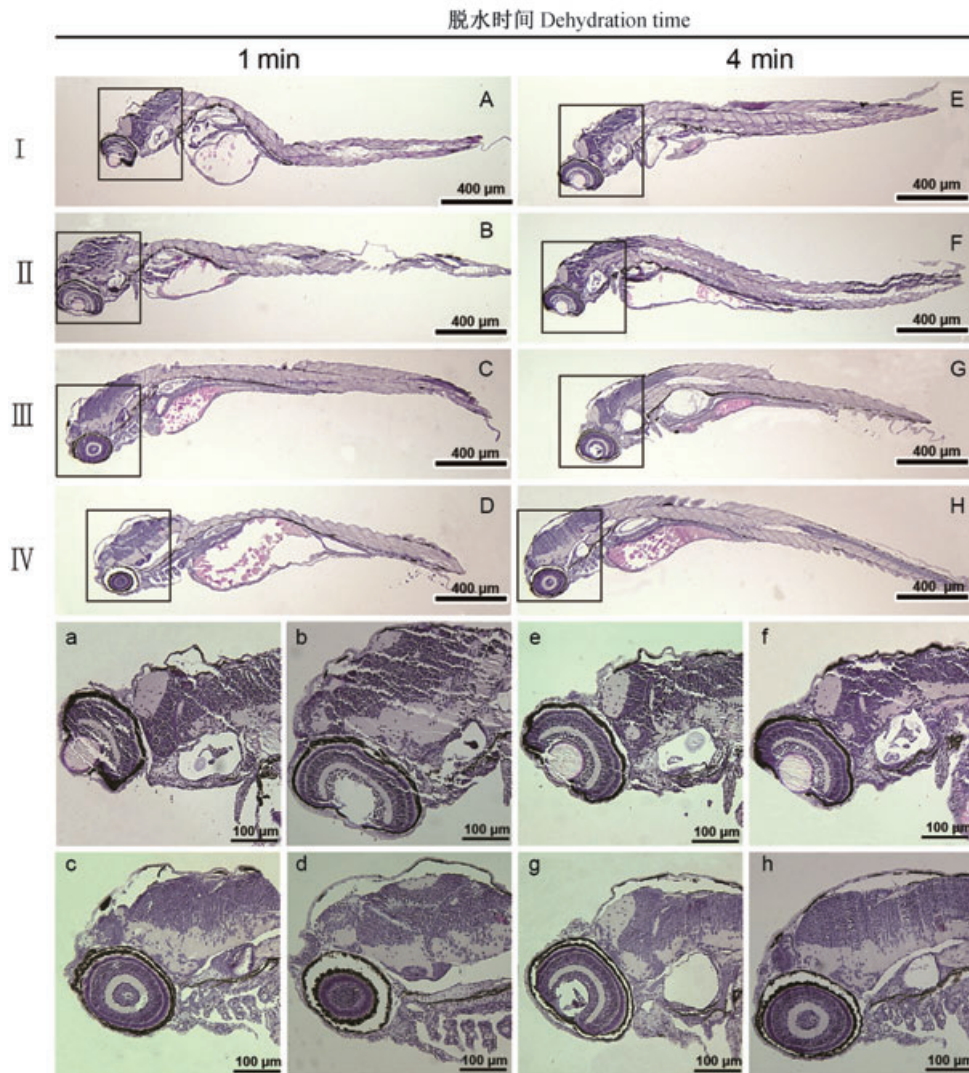
2.2 脱水对切片效果的影响

选用常规的脱水剂乙醇和脱水能力较弱的叔丁醇分别进行脱水。为防止高浓度脱水剂脱

水时间过长导致组织脆化,摸索脱水时间,分别进行 1 min 和 4 min 梯度脱水。乙醇属于非石蜡溶剂,脱水后选择二甲苯进行透明,叔丁醇为兼石蜡溶剂,无需进行透明,脱水后可直接浸蜡。

对于脑组织,经 PFA 固定的幼鱼,无论用叔丁

醇或乙醇作为脱水剂,脆裂都比较严重,叔丁醇脱水(图 1a、1e)的脆裂程度较乙醇脱水(图 1b、1f)稍轻。对于眼睛,经 PFA 固定的幼鱼,都出现了明显的裂痕,其中叔丁醇 1 min 梯度脱水的效果最差,裂纹非常严重(图 1a)。在 Bouin's 液固定的鱼中,对于脑组织和眼睛,无论是叔丁醇或是乙醇梯度脱



注:小写字母标记的图片是相应大写字母标记图片的局部放大图。A、a:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 1 min; E、e:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 4 min; B、b:4% PFA 固定,乙醇脱水 1 min; F、f:4% PFA 固定,乙醇脱水 4 min; C、c:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 1 min; G、g:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 4 min; D、d:Bouin's 液固定,乙醇脱水 1 min; H、h:Bouin's 液固定,乙醇脱水 4 min。

图 1 4 d 斑马鱼幼鱼不同实验分组的大体和局部切片效果

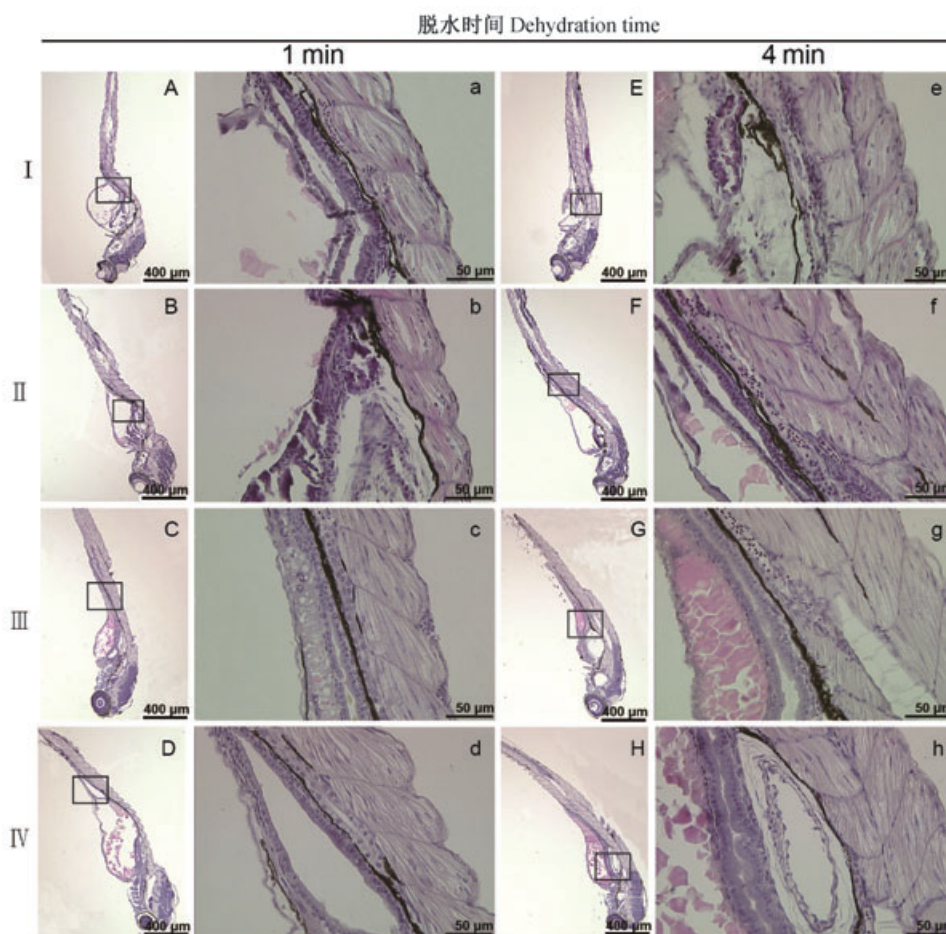
Note. The pictures marked with lower case letters are partial enlarged views of the pictures marked with corresponding upper case letters. A/a, 4% PFA fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. E/e, 4% PFA fixation, t-butanol dehydration for 4 min. B/b, 4% PFA fixation, ethanol dehydration for 1 min. F/f, 4% PFA Fixation, ethanol dehydration for 4 min. C/c, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 1 min; G/g, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 4 min. D/d, Bouin's solution fixation, ethanol dehydration for 1 min. H/h, Bouin's solution fixed, ethanol dehydrated for 4 min.

Figure 1 General and local sectioning effects of different experimental groupings of 4dpf zebrafish larva

水,都获得了较好的切片效果,切片无褶无裂痕。但乙醇脱水时间为 4 min 的样品,可观察到轻微的刀痕(图 1H、1h),可能与脱水时间较长,组织硬度较大有关系。因此,对于脑组织而言,Bouin's 液固定后,脱水时间不宜过长,叔丁醇或乙醇 1 min 梯度脱水即可获得较好的切片效果。

对于肌肉组织,经 PFA 固定的幼鱼,无论利用叔丁醇或乙醇作为脱水剂的切片效果差异不大,都出现不同程度的收缩,间隙增宽。对于 Bouin's 固

定的样品,使用乙醇进行脱水的样品出现轻微的肌纤维收缩(图 2d、2h),叔丁醇(图 2c、2g)的切片效果优于乙醇。观察脱水时间对肌肉组织切片效果的影响发现,脱水时间 4 min 样品(图 2e、2f、2g、2h)的收缩程度明显小于 1 min 梯度脱水的样品(图 2a、2b、2c、2d)。因此,对于肌肉组织,Bouin's 液固定后,使用叔丁醇脱水优于乙醇,且脱水时间不宜过短,4 min 的叔丁醇梯度脱水能达到较好的切片效果。结果详见图 2。



注:小写字母标记的图片是相应大写字母标记图片的局部放大图。A、a:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 1 min; E、e:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 4 min; B、b:4% PFA 固定,乙醇脱水 1 min; F、f:4% PFA 固定,乙醇脱水 4 min; C、c:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 1 min; G、g:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 4 min; D、d:Bouin's 液固定,乙醇脱水 1 min; H、h:Bouin's 液固定,乙醇脱水 4 min。

图 2 4 d 斑马鱼幼鱼不同实验分组的大体和局部切片效果

Note. The pictures marked with lower case letters are partial enlarged views of the pictures marked with corresponding upper case letters. A/a, 4% PFA fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. E/e, 4% PFA fixation, t-butanol dehydration for 4 min. B/b, 4% PFA fixation, ethanol dehydration for 1 min. F/f, 4% PFA Fixation, ethanol dehydration for 4 min. C/c, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. G/g, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 4 min. D/d, Bouin's solution fixation, ethanol dehydration for 1 min. H/h, Bouin's solution fixed, ethanol dehydrated for 4 min.

Figure 2 General and local sectioning effects of different experimental groupings of 4 dpf zebrafish larva

2.3 不同组织最佳的切片条件

对于斑马鱼幼鱼的不同组织,由于存在蛋白质、脂肪及水等含量的差异,对切片的条件有不同的要求^[12]。在本文摸索的条件中,对于斑马鱼幼鱼的脑组织,最佳的固定液为 Bouin's 液,后续使用乙醇或叔丁醇脱水 1 min 可以达到良好的切片效果;对于骨骼肌,最佳的固定液仍是 Bouin's 液,但是对于肌肉组织,叔丁醇脱水的效果明显优于乙醇,并且脱水 4 min 的效果优于脱水 1 min 的效果;消化道组织,受不同固定液和脱水液的影响较小,除 4% PFA 固定后,乙醇 1 min 梯度脱水出现了较明显的脆裂外,其余固定和脱水条件下,切片效果都较好,没有显著差异;对于幼鱼眼睛,4% PFA 固定后裂纹明显,而经 Bouin's 液固定后,除了乙醇梯度脱水 4 min 出现轻微刀痕外,都能获得良好的切片效果。结果详见表 4。

3 讨论

斑马鱼由于其独特的优势在生命科学领域得到了广泛的应用。相较于成鱼,斑马鱼胚胎和幼体具有身体透明,便于显微镜观察,数量多,有利于高通量实验等优点,在药物发育毒理学,环境毒理学,肿瘤异体移植,遗传学,疾病动物模型等方面应用更为广泛^[13-14]。研究者往往通过操作斑马鱼幼鱼或胚胎,观察表型变化,获得实验结论。而组织器官细胞水平的变化是表型变化的根本。组织切片技术克服了无法观察组织内部变化的不足,是反映组织实时状况最有效的手段,甚至是某些诊断和评价的金标准。

随着斑马鱼应用的日益广泛,笔者通过搜索引擎发现,研究人员对斑马鱼幼鱼石蜡切片方法有较大的需求。但经文献搜索,发现国内关于幼鱼石蜡切片的文献非常匮乏。仅有几篇关于斑马鱼成鱼石蜡切片的文献^[7, 14-15]。斑马鱼幼鱼具有与成鱼不同的组织特性,加之体型小,较难分离组织器官等特点,亟需一套适用于斑马鱼幼鱼整体石蜡切片的方法。

合适的染色前处理是获得优质组织病理切片的基础。笔者通过多轮实验和实验条件摸索,获得了良好的幼鱼整体石蜡切片结果。以下将重点讨论实验中需要注意的问题及解决办法。

染色前的固定、脱水、透明、浸蜡是影响切片质量至关重要的环节。处理不当,石蜡切片往往容易出现收缩,裂纹等问题,既不符合石蜡切片的要求,也影响结果的判断。

固定是石蜡切片制片的关键,良好的固定剂能迅速穿透组织,保持组织原形,不发生膨胀或收缩。多聚甲醛是甲醛的聚合物,性质比甲醛稳定,在传统的石蜡切片组织样本固定中广泛应用。但本实验结果显示,斑马鱼幼鱼经 4% PFA 过夜固定后,导致了幼鱼组织不可回复的硬化,无论后续脱水条件如何优化,脑组织和肌肉组织都出现了明显的裂痕,严重影响实验观察。可能与斑马鱼幼鱼组织器官的特性有关。Bouin's 固定液是一种混合固定剂,对幼鱼组织硬化作用适中,后续经过适当的脱水,透明和浸蜡等处理,能获得较满意的切片,与斑马鱼成鱼结果类似^[15]。

脱水就是除去组织内部水分以便后续石蜡的

表 4 不同组织在不同条件下的切片效果
Table 4 Effects among different tissues under different conditions

组织 Tissues	4% PFA				波恩氏液 Bouin's solution			
	乙醇 Ethanol		叔丁醇 Tertiary butanol		乙醇 Ethanol		叔丁醇 Tertiary butanol	
	1 min	4 min	1 min	4 min	1 min	4 min	1 min	4 min
脑组织 Brain tissue	收缩,脆裂严重 Severe contracted and brittle	收缩,脆裂严重 Severe contracted and brittle	稍收缩,脆裂 Slightly contracted and brittle	稍收缩,脆裂 Slightly contracted and brittle	良好 Good	轻微刀痕 Slightly cutter mark	良好 Good	良好 Good
骨骼肌 Skeletal muscle	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	轻微收缩 Slightly contracted	轻微收缩 Slightly contracted	轻微收缩 Slightly contracted	良好 Good
消化道 Digestive tract	脆裂 Brittle	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good
眼睛 Eye	裂纹明显 Obvious cracks	裂纹明显 Obvious cracks	严重裂纹 Severe cracks	裂纹明显 Obvious cracks	良好 Good	轻微刀痕 Slightly cutter mark	良好 Good	良好 Good

浸入,梯度乙醇是应用最广泛的脱水剂,但对于斑马鱼幼鱼的肌肉组织而言,即使是 30% 起始的梯度乙醇脱水都能引起肌肉纤维的收缩,说明对于幼鱼而言,乙醇作为脱水剂脱水能力过强。改用叔丁醇后,肌肉收缩现象显著改善。另外叔丁醇作为脱水剂兼透明剂,可以获得良好的脱水效果,同时避免二甲苯透明的环节,减少了导致组织硬化和脆裂的可能。对于肌肉组织,Bouin's 液固定后,无论使用乙醇或叔丁醇作为脱水剂,4 min 的脱水效果都优于 1 min,可能是与短时间内脱水不尽,残留在组织细胞中的水分无法与二甲苯相溶,导致石蜡无法完全渗入有关。

通过条件摸索和优化,本方法制备的石蜡切片能达到石蜡切片的质量要求,可供以斑马鱼幼鱼为研究对象的研究者参考。

参考文献:

- [1] 张博,李绍武.《遗传》与中国斑马鱼遗传发育研究共同成长[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1079-1081.
- [2] 尚春峰,穆宇,杜久林.以透明脑,观澄明心——斑马鱼神经功能研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2015, 45(3): 223-236.
- [3] 梁锦锋,朱勇,张洪瑶,等.斑马鱼模型在药物研发早期肾脏毒性中的应用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 30-35.
- [4] 于学慧,张世栋,张承梅.发育生物学的理想动物模型——斑马鱼[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 3(11): 45-48.
- [5] 邸亚男,朱丽英,沈婕,等.四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80.
- [6] 陈微,章琳俐,刘仪,等.斑马鱼中脑微细结构及相关免疫组化反应[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 89-93.
- [7] 王宁军,赵燕,刘娟.斑马鱼器官石蜡组织切片制作与观察[J]. 解剖学研究, 2019, 41(3): 240-241.
- [8] 林金杏,章琳俐,姚一琳,等.斑马鱼肠道显微和超微结构的研究[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(3): 60-66.
- [9] 杨国威,彭世泽,赵建元,等.基于海分枝杆菌感染斑马鱼模型的抗结核药物评价方法研究[J]. 药学报, 2019, 54(5): 854-860.
- [10] 苑朋辉,赵维超,胡南,等.低剂量率 γ 射线辐照对斑马鱼胚胎脑部发育形态学的影响[J]. 南华大学学报(自然科学版), 2019, 33(3): 28-32.
- [11] M W. The Zebrafish Book: A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio) [M]// Oregon: University of Oregon Press, 1995.
- [12] 徐玉环,刘颖,徐艳峰,等.小鼠整体胚胎和新生鼠石蜡切片技术的改进[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 39-41.
- [13] 戴明珠,黄燕烽,彭逸,等.斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
- [14] 郭胜亚,朱晓宇,周佳丽,等.斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 143-147.
- [15] 郑伟,严继舟.斑马鱼组织石蜡切片质量的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 260-263.

[收稿日期] 2020-06-18

李晓波,付瑞,王吉,等. 实验小鼠感染诺如病毒后组织病理变化及病毒含量分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 42-48.

Li XB, Fu R, Wang J, et al. Analysis of pathological changes and nucleic acid content in tissues of common laboratory mice infected with murine norovirus [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 42-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.007

实验小鼠感染诺如病毒后组织病理变化及病毒含量分析

李晓波[#], 付瑞[#], 王吉^{*}, 王淑菁, 王莎莎, 李威, 秦晓, 黄宗文,
贺争鸣, 岳秉飞^{*}

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629)

【摘要】 目的 研究常用实验小鼠在人工感染小鼠诺如病毒后组织病理改变及病毒含量变化情况。**方法** 使用 KM、BALB/c、NIH、C57BL/6 及 BALB/c-nu 等五个品系小鼠, 每个品系分为对照组和感染组, 感染组以灌胃方式接种小鼠诺如病毒液, 对照组灌同等体积生理盐水, 分别在感染后第 7、14、21、28、55 天采集肝、脾、肺、盲肠、结肠及小肠, 每个组织取 2 份, 分别进行病理诊断及病毒核酸含量检测, 最后对结果进行汇总分析。**结果** 肝、脾、肺病理改变总发生率分别为 8% (10/125)、5.6% (7/125) 和 4% (5/125), 盲肠、结肠及小肠均未发现病变, 其中 KM 及 BALB/c 小鼠病变主要发生在肝、脾和肺, C57BL/6 小鼠主要在肝和肺, NIH 及 BALB/c-nu 小鼠主要在肝和脾。在所观察的实验鼠中 KM 小鼠较易发生肺的病变; KM 及 NIH 小鼠发生病变较早, C57BL/6 小鼠较晚。所有实验鼠盲肠、结肠 MNV 核酸阳性率均为 100% (125/125), 小肠、肝、脾、肺及血阳性率分别为 71.2% (89/125), 17.6% (22/125), 39.2% (49/125), 3.2% (4/125) 和 1.6% (2/125); 病毒含量比较盲肠>结肠>小肠>脾>肺>肝; BALB/c-nu 小鼠结肠病毒含量显著高于其他品系小鼠 ($P<0.01$), 其它品系小鼠各组织病毒含量无统计学差异; C57BL/6 小鼠在感染 MNV 第 14 天盲肠及结肠病毒含量达峰值 ($P<0.05$), 其它品系小鼠不同时间点病毒含量无统计学差异; 组织器官病理检查及病毒核酸检测结果之间无相关性。**结论** 小鼠诺如病毒感染会引起组织病变, 建议进行病理有关的动物实验选择 MNV 阴性小鼠。

【关键词】 小鼠诺如病毒; 病理变化; 病毒组织分布

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0042-07

Analysis of pathological changes and nucleic acid content in tissues of common laboratory mice infected with murine norovirus

LI Xiaobo[#], FU Rui[#], WANG Ji^{*}, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao, HUANG Zongwen,
HE Zhengming, YUE Bingfei^{*}

(Laboratory Animal Institute, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To study the pathological changes and virus content of commonly used mice artificially infected with murine norovirus (MNV). **Methods** Five strains of common experimental mice (KM, BALB/c, NIH, C57BL/6 and BALB/c-nu) were used. Each strain was divided into a control group and an infection group. The infection

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2017ZX10304402)。

[作者简介] 李晓波(1980—), 副研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: lxb8493059@163.com

付瑞(1978—), 副研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: furui78@126.com [#]共同第一作者

[通信作者] 岳秉飞(1960—), 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: y6784@126.com

王吉(1974—), 女, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: wj_nd_jds@sina.com ^{*}共同通信作者

group was administered MNV solution by gavage and the control group was given saline. Liver, spleen, lung, cecum, colon, and small intestine tissues were collected on days 7, 14, 21, 28, and 55 after infection. Two samples were taken from each tissue; one was for pathological diagnosis and the other was tested for viral nucleic acid content. **Results** No lesions were found in the cecum, colon, and small intestine. The total incidence of liver, spleen, and lung pathological changes was 8% (10/125), 5.6% (7/125) and 4% (5/125), respectively. Pathological changes were found in the liver, spleen and lung of KM and BALB/c mice, the liver and lung of C57BL/6 mice, and the liver and spleen of NIH and BALB/c-nu mice. Among them, KM mice were more likely to develop lung lesion. Pathological changes occurred earlier in KM and NIH mice than in C57BL/6 mice. MNV nucleic acid positive rates in the cecum and colon were 100% (125/125), and the positive rates in the small intestine, liver, spleen, lung, and blood were 71.2% (89/125), 17.6% (22/125), 39.2% (49/125), 3.2% (4/125), and 1.6% (2/125), respectively. Comparison of virus contents showed the following order: cecum> colon> small intestine> spleen> lung> liver. BALB/c-nu mice had significantly higher colon virus contents than the other strains ($P < 0.01$), and there was no statistical difference among the remaining tissues of each strain. The cecum and colon virus contents in C57BL/6 mice peaked on day 14 after MNV infection ($P < 0.05$), but there was no statistical difference in virus contents at other time points in the other strains. There was no correlation between tissue and organ pathological examination and viral nucleic acid test result. **Conclusions** MNV infection in mice can cause pathological changes in tissues of commonly used experimental mice. It is recommended that MNV-negative mice be selected for pathologically related animal experiments.

【Keywords】 MNV; pathological changes; MNV tissue distribution

自小鼠诺如病毒(murine norovirus, MNV)2003年由 Karst 等人^[1]发现以来,世界各地的报道表明其在实验小鼠中有很高的感染率,并且各品系小鼠均对其易感^[2-5],免疫功能正常的小鼠感染 MNV 后大多无明显临床症状,但可持续通过粪便排毒长达数月^[6],表明 MNV 可在小鼠体内长期存在,易造成实验小鼠中的广泛传播。国际上一些实验动物权威监管和检测机构已将其列为实验小鼠需要常规监测的病原体^[7]。

MNV 感染致小鼠组织发生病理损伤的报道多集中在小鼠肠道疾病模型及免疫缺陷鼠,MNV 感染在不同的小鼠模型试验中产生的临床症状不相同,有的严重,有的几乎观察不到。同样,不同的小鼠实验造成的组织损伤也有所不同,损伤的严重程度除了与不同的疾病模型有关,还与所用病毒的毒株、感染时间、病毒接种途径及其他实验条件相关^[8]。

已报道的发现病理损伤的组织最常见的是肝、其他还见于肺、脾、胃肠道及肠系膜淋巴结等^[8],目前 MNV 感染免疫功能正常小鼠病理损伤研究较少,所研究的品系有限,主要为 129 小鼠^[1,9-12]。

本文通过对实验常用的 KM, BALB/c, C57BL/6, NIH, BALB/c-nu 等品系的小鼠人工感染 MNV, 研究感染后不同的时间点各组织脏器的病理改变及核酸含量变化情况,探讨 MNV 感染对小鼠实验可能存在的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

5 个品系 SPF 级小鼠,分别为 KM, BALB/c, NIH, C57BL/6 及 BALB/c-nu,均为 6 周龄,体重分别为 KM 30~32 g, BALB/c 18~20 g, NIH 20~22 g, C57BL/6 16~18 g, BALB/c-nu 16~18 g,每个品系 50 只,雌性,购自国家啮齿类实验动物种子中心[SCXK(京)2017-0005],经检测符合 SPF 等级实验动物国家标准且 MNV 为阴性。动物实验于中国食品药品检定研究院屏障动物设施进行[SYXK(京)2017-0013],实验所用鼠料、水及垫料等均经灭菌处理,已通过中国食品药品检定研究院实验动物福利伦理审查委员会审查(中检动(福)第 2018(B)020 号),按实验动物的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 病毒株

小鼠诺如病毒 BJ10-2062 株(GenBank: KM458057),本实验室分离并保存^[13],TCID₅₀为 10^{-4.625}/0.1 mL。

1.2 主要试剂与仪器

甲醛溶液(批号:20180104)购自国药化学试剂公司;红细胞裂解液(批号:R7218)购自天根生物;TaqMan Gene Expression Master Mix(批号:00701838)购自 ABI 公司;RNeasy Mini Kit(批号:157034469)购自 Qiagen 公司;逆转录试剂(批号:0000310558)购自

Promega;TB Green Premix Ex Taq GC、dNTP、无 RNA 酶水等购自 TaKaRa。荧光 PCR 仪(ABI 7500 Fast);生物组织包埋机(慧达 HD-310);切片机(MICROM HM315);全自动染色机(Leica autostainer XL);光学显微镜(OLYMPUS BX51)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理

每个品系的动物随机分为感染组和对照组,每组各 25 只,参考文献报道的剂量^[10-11],感染组经口灌胃 0.2 mL MNV 病毒液($TCID_{50} = 10^{-4.625}/0.1$ mL),对照组灌胃 0.2 mL 生理盐水。每日观察动物状态,分别在感染 MNV 后第 7,14,21,28,55 天于对照组和感染组各选取 5 只小鼠,二氧化碳麻醉后取抗凝血,处死后立即取肝、脾、肺、小肠、盲肠、结肠等组织,每个组织取 2 份,一份加入 3 倍体积 10% 甲醛溶液固定,进行组织病理学诊断;另外一份组织取 100 mg 加入 900 μ L 灭菌 PBS,匀浆机充分匀浆,12000 r/min 离心 5 min,取 200 μ L 上清进行组织核酸的提取。取 200 μ L 抗凝血加入 600 μ L 红细胞裂解液,颠倒混匀,室温放置 5 min,10000 r/min 离心 1 min,吸去上清,余下沉淀加入 200 μ L 灭菌 PBS,重悬后提取核酸。

1.3.2 病理学诊断:

步骤 1.3.1 所取组织在甲醛溶液中固定 1 周,每 48 h 换一次固定液,后经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE 染色等步骤制备病理切片,在光学显微镜下进行观察并采集数码图像。

1.3.3 组织 MNV 核酸含量测定

步骤 1.3.1 所取组织,匀浆机充分匀浆,12000 r/min 离心 5 min,取 200 μ L 上清液提取 RNA,先将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,逆转录体系包含 5 $\times$ RT buffer 5 μ L,dNTP(2.5 mmol/L)4 μ L,随机引物 1 μ L,逆转录酶 0.5 μ L,RNA 模板 8 μ L,去 RNA 酶水 6.5 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C 90 min,72 $^{\circ}$ C 15 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。按参考文献^[14]报道的荧光定量 PCR 法测定 MNV 核酸含量,20 μ L 的反应体系包含 TB Green Premix Ex Taq GC(2 $\times$)10 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L,ROX reference dye II(50 $\times$)0.4 μ L,待检 cDNA 2 μ L,无 RNA 酶水 6.8 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环,每个循环结束采集荧光信号。每次扩增设阳性对照和阴性对照,质粒标准品由 TaKaRa 合成,设

5 个浓度,分别为 $1.1 \times 10^3 \sim 1.1 \times 10^7$ copies/ μ L,每个浓度做 3 个平行,最后通过标准曲线进行定量。

1.3.4 结果分析

(1)比较各组织总的病理变化及核酸检测情况。

(2)比较不同品系小鼠之间各组织病理改变情况及核酸含量。

(3)比较小鼠感染 MNV 后不同时间各组织病理变化及核酸含量变化特点。

1.4 统计学方法

核酸含量以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同品系小鼠不同组织之间核酸含量的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。不同时间点核酸含量的比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

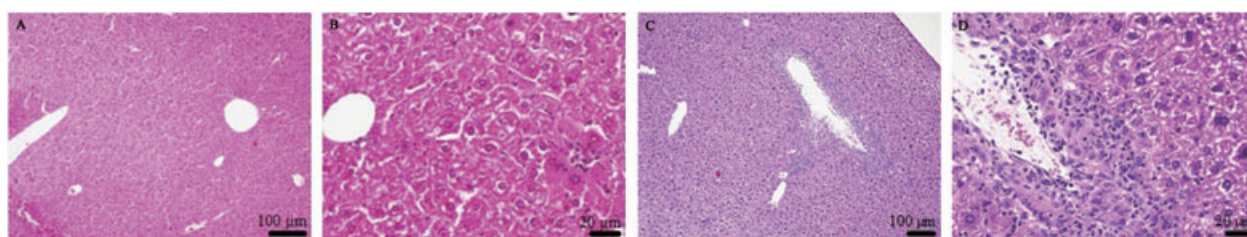
2.1 病理改变分析

2.1.1 不同组织病理改变分析

从发生病理改变的组织分布来看,感染组中肝、脾、肺均发现有不同程度的病理改变,其中肝病变更最高,为 8%(10/125),主要表现为血管边缘大量胞核圆形碱性蓝染的淋巴样细胞聚集,伴有胞核杆状的纤维细胞增生;管腔壁增厚,胞核扁平或三角状的枯否氏细胞增多(图 1)。脾病变率为 5.6%(7/125),主要表现为脾小结数量减少(图 2);肺病变率为 4%(5/125),主要表现为肺细支气管旁边有较多的嗜碱性蓝染的淋巴样细胞浸润(图 3),小肠、盲肠和结肠未发现病理变化(表 1)。对照组小鼠各组织均未发现病理改变。

2.1.2 不同品系动物病理改变分析

同一组织在不同品系小鼠的病理变化相似。KM 小鼠病变主要发生在肝和肺,发生率均为 12%(3/25),脾为 4%(1/25);BALB/c 小鼠肝、脾和肺均发生病变的发生率仅为 4%(1/25);C57BL/6 小鼠发生病变的部位主要是肝和肺,病变率分别为 8%(2/25)和 4%(1/25),脾未发现病变;NIH 小鼠发生病变的组织集中在肝和脾,发生率均为 12%(3/25),肺未发现病变;BALB/c-nu 小鼠肝和脾有病变发生,发生率分别为 4%(1/25)和 8%(2/25)。所有品系小鼠的肠道组织(盲肠、结肠和小肠)均未发现病理改变(表 1)。

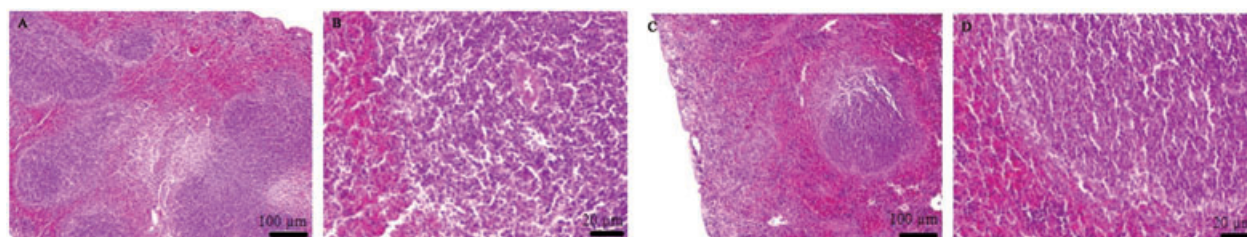


注:A、B;对照组;C、D;感染组。

图 1 肝病理变化

Note. A/B, Control group. C/D, Infection group.

Figure 1 Pathological changes of liver

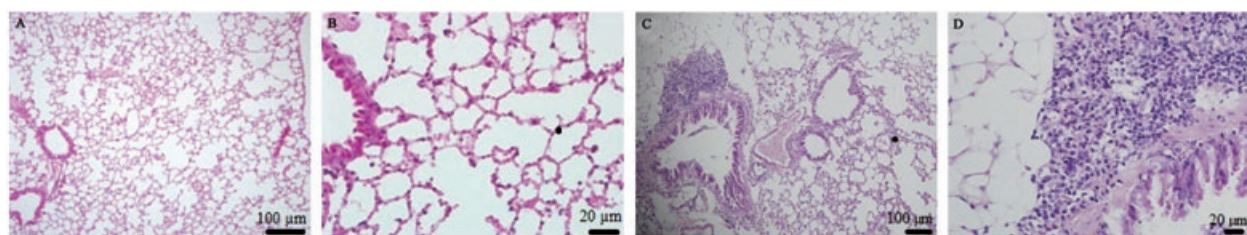


注:A、B;对照组;C、D;感染组。

图 2 脾病理变化

Note. A/B, Control group. C/D, Infection group.

Figure 2 Pathological changes of spleen



注:A、B;对照组;C、D;感染组。

图 3 肺病理变化

Note. A/B, Control group. C/D, Infection group.

Figure 3 Pathological changes of lung

2.1.3 感染 MNV 不同时间病理改变分析

从病变发生的时间看,在感染 MNV 第 7 天,KM 小鼠肝和肺各出现 1 例病变;NIH 小鼠有 1 例脾的脾小结数量减少;感染第 14 天,KM 小鼠和 NIH 小鼠各有 1 例肝发生病变,BALB/c、NIH 及 BALB/c-nu 小鼠各有 1 例脾发生病变;感染第 21 天,KM、BALB/c、NIH 及 BALB/c-nu 小鼠各有 1 例肝病变,同时 BALB/c 小鼠肺 1 例,NIH 小鼠脾 1 例发现病变;感染第 28 天,KM 小鼠有 2 例肺出现病变,NIH 小鼠 1 例肝,C57BL/6 小鼠 1 例肺,BALB/c-nu 小鼠 1 例脾发现病变。感染第 55 天,KM 小鼠 1 例脾、C57BL/6 小鼠 2 例肝发现病变,其余各品系无明显

病变。综上所述,KM 及 NIH 小鼠发生病变较早,其次为 BALB/c 和 BALB/c-nu 小鼠,而 C57BL/6 小鼠产生病变的时间较晚。

2.2 组织核酸的检测

2.2.1 不同组织核酸的检测

总体来看,盲肠、结肠 MNV 核酸阳性率均为 100% (125/125),其次为小肠,阳性率为 71.2% (89/125);各脏器中脾的阳性率最高,为 39.2% (49/125);肝阳性率为 17.6% (22/125),肺的阳性率为 3.2% (4/125),有 2 份血样检出核酸阳性 (2/125)。阳性组织核酸含量相比,肠道含量较高,其中盲肠含量最高,其次为结肠及小肠;脏器含量较

低,依次为脾>肺>肝。对照组所有组织 MNV 核酸均为阴性。

2.2.2 不同品系小鼠核酸含量的比较

比较不同品系小鼠各阳性组织 MNV 核酸含量,各品系小鼠肝、脾、小肠、盲肠核酸含量无统计学差异;BALB/c-nu 小鼠结肠核酸含量显著高于其他品系小鼠($P<0.01$)(表 2)。

2.2.3 感染 MNV 不同时间各品系组织核酸含量比较

经单因素方差分析,C57BL/6 小鼠感染 MNV

第 14 天盲肠 MNV 核酸含量显著高于其他时间($P<0.05$),第 7、14 天结肠含量极显著高于第 28、55 天($P<0.01$)。其余品系小鼠各组织 MNV 核酸含量各个时间点之间无显著差异(图 4)。

2.2.4 组织病变与 MNV 核酸检出率的关系

各组织病理与核酸检测的结果统计见表 3,结果表明 405 份组织样本病理检查为阴性,而核酸检测结果为阳性;13 份样品病理检查结果为阳性而核酸检测结果为阴性,说明病理检查与核酸检测结果并不一致,两者无相关性。

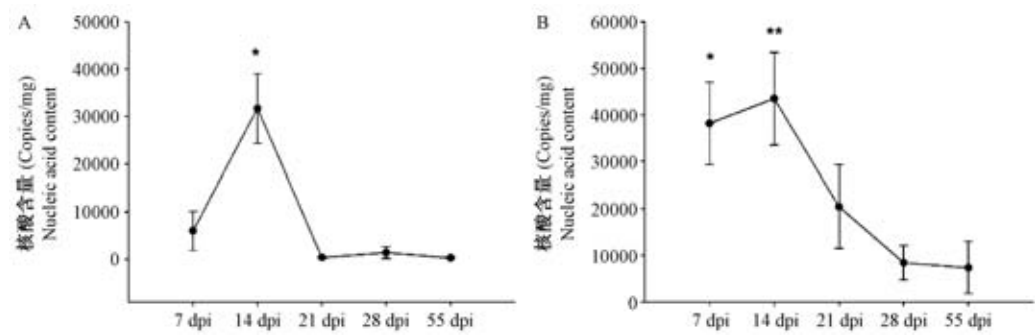
表 1 感染组各组织病理及核酸检测结果
Table 1 Pathology and nucleic acid test results of infection groups

品系 Strains	时间 Time	肝 Liver		脾 Spleen		肺 Lung		盲肠 Cecum		结肠 Colon		小肠 Small intestine		血 Blood
		病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	病理 Pathology	核酸 Nucleic acid	核酸 Nucleic acid
KM	7 dpi	1/5	1/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	14 dpi	1/5	4/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	21 dpi	1/5	1/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	3/5	0/5
	28 dpi	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	1/5	0/5
	55 dpi	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	1/5	0/5
	小计	3/25	6/25	1/25	11/25	3/25	0/25	0/25	25/25	0/25	25/25	0/25	15/25	0/25
BALB/c	7 dpi	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	14 dpi	0/5	3/5	1/5	5/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	21 dpi	1/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	28 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	1/5
	55 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	小计	1/25	3/25	1/25	11/25	1/25	1/25	0/25	25/25	0/25	25/25	0/25	17/25	1/25
C57BL/6	7 dpi	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	1/5
	14 dpi	0/5	4/5	0/5	5/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	21 dpi	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	28 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	2/5	0/5
	55 dpi	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	1/5	0/5
	小计	2/25	7/25	0/25	12/25	1/25	1/25	0/25	25/25	0/25	25/25	0/25	17/25	1/25
NIH	7 dpi	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	14 dpi	1/5	3/5	1/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	21 dpi	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	28 dpi	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	55 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	2/5	0/5
	小计	3/25	4/25	3/25	9/25	0/25	1/25	0/25	25/25	0/25	25/25	0/25	21/25	0/25
BALB/c-nu	7 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	3/5	0/5
	14 dpi	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	3/5	0/5
	21 dpi	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	28 dpi	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5
	55 dpi	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5	0/5
	小计	1/25	2/25	2/25	6/25	0/25	1/25	0/25	25/25	0/25	25/25	0/25	19/25	0/25
总计		10/125	22/125	7/125	49/125	5/125	4/125	0/125	125/125	0/125	125/125	0/125	89/125	2/125

表 2 不同品系小鼠各组织核酸含量($\bar{x} \pm s$, copies/mg)
Table 2 Nucleic acid content of different tissues

品系 Strains	肝 Liver	脾 Lung	盲肠 Cecum	结肠 Colon	小肠 Small intestine
KM	6.2±1.3	49.7±12.5	6510.6±788.9	1189.2±457.3	1985.4±139.8
BALB/c	3.7±0.9	40.1±10.9	7571.6±695.4	2355.4±583.7	1245.9±152.3
C57BL/6	4.0±1.2	44.9±8.9	7881.8±865.9	2291.1±614.1	1872.2±168.5
NIH	6.1±1.2	39.0±5.3	5864.0±588.0	1965.8±763.7	1031.8±111.2
BALB/c-nu	4.6±1.3	37.8±7.0	6462.7±653.1	9370.0±894.4 *	1238.9±105.9

注:与其他品系比较, * $P < 0.01$ 。
Note. Compared with other strains, * $P < 0.01$.



注:A:盲肠;B:结肠。与其他时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 4 C57BL/6 小鼠感染 MNV 不同时间盲肠和结肠核酸含量变化
Note. A, Cecum. B, Colon. Compared with other time points, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Nucleic acid contents in cecum and colon at different days post MNV infection of C57BL/6 mice

表 3 各组织病理检查与核酸检测结果比较
Table 3 Comparison of pathological examination and nucleic acid test results

病理检查 Pathological test	MNV 核酸检测 Nucleic acid detection of MNV	
	阴性 Negative	阳性 Positive
阴性 Negative	323	405
阳性 Positive	13	9

3 讨论

本文针对 MNV 感染国内常用的五个品系(包括封闭群和近交系)实验小鼠引起的组织病理改变情况进行了初步的研究,结果发现所有感染组小鼠中肝病变率最高,达 8%,主要表现为血管周围淋巴细胞浸润;其次为脾,病变率为 5.6%,主要表现为脾小结数量的减少,脾小结位于脾白髓中央动脉周围淋巴鞘的旁侧,为 B 细胞区,脾小结数量减少意味着淋巴细胞数量的减少,动物免疫力的降低,由于 MNV 对小鼠巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞具有感染亲嗜性^[15-16],而这些细胞与动物的免疫功能密切相关,表明 MNV 感染会影响动物的免疫系统,这在我们前面的研究中得到了证实^[17];肺的病变率为 4%,主要表现为支气管周围的淋巴细胞浸润;出

乎意料的是,虽然 MNV 是肠道病原体,但本研究所有动物均未发现存在盲肠、结肠及小肠(主要为十二指肠)的病变,推测 MNV 已经很好的适应了宿主的免疫系统,因而不引起或只引起轻微的肠道病变^[8,12,18]。最初的研究发现免疫缺陷小鼠(STAT1^{-/-}/IFN γ R^{-/-})感染 MNV 后容易造成较严重的组织损伤,如可造成肝和脾的炎症反应,组织细胞坏死及肺和肠组织的炎性损伤,并引起全身性的组织病变^[1],而本研究小鼠病理改变大多较轻微,表明固有免疫在防御 MNV 感染中发挥着重要作用。BALB/c-nu 小鼠发生的病理改变并未明显高于其他品系小鼠,说明胸腺依赖的 T 细胞免疫在 MNV 感染过程发挥的作用较轻微。

本研究通过检测 MNV 核酸来间接反映各组织中病毒的含量,从结果来看,除了肺,其余各组织核酸阳性率远远高于病理改变阳性率,其中盲肠和结肠核酸阳性率均为 100%,其次为小肠,脏器组织核酸阳性率较低,其中肺最低,我们在 2 份血样中检测到了核酸,表明病毒感染有可能引起动物的病毒血症。从核酸含量来看,基本与核酸阳性率成正相关,各组织核酸含量由高到低依次为:盲肠>结肠>小肠>脾>肺>肝;各品系相比,除了 BALB/c-nu 小鼠

结肠含量显著高于其他品系,其余均无统计学差异;分析核酸含量随感染 MNV 的时间变化情况发现,C57BL/6 小鼠盲肠与结肠的含量均在感染后第 14 天显著高于其他时间点,达到高峰,其余品系各组织的变化均未发现统计学差异。我们分析了病理检测与核酸检测的结果,发现两者并不一致,即病理改变阴性的样本核酸检测不一定为阴性,这一发现与已有研究相似^[19],推测可能的原因:病理改变的发生是动物机体抗病毒免疫应答的结果,通过免疫应答来清除组织中的病毒,同时造成了组织本身的炎性病理损伤,而病毒也会通过免疫逃逸机制来拮抗机体的免疫应答,最后动物的抗病毒免疫与病毒的拮抗之间达到平衡,病理损伤可随着时间修复,而病毒仍存在于组织中,从而造成观察到的病理改变的发生率远远低于病毒阳性率。

参考文献:

- [1] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. *Science*, 2003, 299 (5612): 1575-1578.
- [2] Hsu CC, Wobus CE, Steffen EK, et al. Development of a microsphere-based serologic multiplexed fluorescent immunoassay and a reverse transcriptase PCR assay to detect murine norovirus 1 infection in mice [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12 (10): 1145-1151.
- [3] Kim JR, Seok SH, Kim DJ, et al. Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities [J]. *J Vet Med Sci*, 2011, 73(5): 687-691.
- [4] Kitajima M, Oka T, Tohya Y, et al. Development of a broadly reactive nested reverse transcription-PCR assay to detect murine noroviruses, and investigation of the prevalence of murine noroviruses in laboratory mice in Japan [J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53(9): 531-534.
- [5] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Lab Anim*, 2009, 43(2): 165-173.
- [6] Hsu CC, Riley LK, Wills HM, et al. Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine novoviruses [J]. *Comp Med*, 2006, 56(4): 247-251.
- [7] Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. *Lab Anim*, 2014, 48(3): 178-192.
- [8] Hsu CC, Piotrowski SL, Meeker SM, et al. Histologic lesions induced by murine norovirus infection in laboratory mice [J]. *Vet Pathol*, 2016, 53(4): 754-763.
- [9] Basic M, Keubler LM, Buettner M, et al. Norovirus triggered microbiota-driven mucosal inflammation in interleukin 10-deficient mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(3): 431-443.
- [10] Kahan SM, Liu G, Reinhard MK, et al. Comparative murine norovirus studies reveal a lack of correlation between intestinal virus titers and enteric pathology [J]. *Virology*, 2011, 421(2): 202-210.
- [11] Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, et al. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses [J]. *J Virol*, 2007, 81 (7): 3251-3263.
- [12] Shortland A, Chettle J, Archer J, et al. Pathology caused by persistent murine norovirus infection [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95 (2): 413-422.
- [13] 李晓波,付瑞,岳秉飞,等. 鼠诺如病毒的体外分离与鉴定 [J]. *中国病毒学杂志*, 2011, 1(4): 293-296.
- [14] 高洁,贺争鸣. 小鼠诺如病毒荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(12): 70-76.
- [15] Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells [J]. *Science*, 2014, 346(6210): 755-759.
- [16] Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, et al. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(12): e432.
- [17] 李晓波,付瑞,王吉,等. 常用实验小鼠感染诺如病毒后外周血免疫指标分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7): 67-75.
- [18] Taube S, Kolawole AO, Höhne M, et al. A mouse model for human norovirus [J]. *mBio*, 2013, 4(4): e00450-e00453.
- [19] Perdue KA, Green KY, Copeland M, et al. Naturally occurring murine norovirus infection in a large research institution [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2007, 46(4): 39-45.

[收稿日期]2020-02-06

黄剑,马晓彤,张亚杰,等. 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 49-56.

Huang J, Ma XT, Zhang YJ, et al. Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and yang deficiency [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.008

真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究

黄 剑,马晓彤,张亚杰,李丽静,韩 冬,刘 佳*

(长春中医药大学药学院,长春 130117)

【摘要】 目的 研究真武汤对心肾阳虚大鼠心肌细胞保护的自噬机制。**方法** 手术摘除甲状腺及腹腔注射阿霉素,建立大鼠心肾阳虚模型,灌胃给药 10 d。检测并记录各组大鼠的自然情况,采用 ELISA 法检测血清三碘甲状腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)及心肌组织 BNP、LA 和 CaN 含量。Western blot 考察 LC3、ATG5、P62 蛋白表达。免疫组化法测定大鼠心肌组织 LC3 和 P62 表达。HE 染色观察心肌组织病理变化。**结果** 真武汤可以降低心肌组织 BNP 含量,升高心肌组织 LA 含量,降低 CaN 含量,升高心肌组织 LC3、ATG5、BECLIN1 含量,降低 P62 含量。**结论** 真武汤对心肾阳虚所致心力衰竭情况具有改善作用,并且能够改善心脏能量代谢,在心力衰竭初期可以通过调节自噬保护损伤的心肌细胞。

【关键词】 真武汤;自噬;心肌细胞;机制研究

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0049-08

Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and yang deficiency

HUANG Jian, MA Xiaotong, ZHANG Yajie, LI Lijing, HAN Dong, LIU Jia*

(Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

【Abstract】 Objective To study autophagy as the protective mechanism of Zhenwu decoction in cardiomyocytes of rats with heart-yang deficiency. **Methods** After removal of the thyroid and intraperitoneal injection of doxorubicin, to establish the rat heart and kidney yang deficiency model, rats were administered with corresponding drugs for 10 days. We measured serum triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), thyroid-stimulating hormone (TSH), and myocardial tissue BNP, LA, and CaN by ELISAs. LC3, ATG5, and P62 and protein expression was detected by western-blot. Inspected LC3 and P62 expression in rat myocardial tissue was examined by immunohistochemistry. The pathological changes of myocardial tissue were observed by HE staining. **Results** Zhenwu decoction reduced the BNP content in myocardial tissue of rats with heart-yang deficiency-induced heart failure, increased the LA content in myocardial tissue, decreased the CaN content, increased LC3, ATG5, and BECLIN1 contents, and decreased the P62 content in myocardial tissue of rats with heart failure. **Conclusions** Zhenwu decoction improves the heart failure condition and energy metabolism of the heart. In the early stage of heart failure, the damaged cardiomyocytes protected by regulating autophagy.

【Keywords】 Zhenwu decoction; autophagy; cardiomyocytes; mechanism research

【基金项目】 中国博士后基金(2018M631838);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20190476KJ)。

【作者简介】 黄剑(1995—),男,硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail: Huangjianccum@163.com

【通信作者】 刘佳(1982—),女,副教授,硕士生导师。E-mail: celiujia1002@126.com

心力衰竭又叫充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF), 现代医学研究表明, CHF 是心脏无法满足机体代谢所需要的血量进而引起的以循环功能障碍为主要表现的临床综合征, 包含身体多个方面改变, 最终出现心功能失代偿, 出现心力衰竭的症状^[1]。CHF 属于中医证候中的心肾阳虚证, 其具有本虚标实的特点, 表现为脾气虚、肺气虚、肾气虚和肝气虚, 以水停血瘀、阳虚水泛为发病机制, 以上表现属《伤寒论》中的真武汤证, 应以真武汤加以治疗。临床研究表明真武汤可以辅助西药进行慢性心力衰竭治疗, 可以辅助西药逆转心肌重构, 提高心脏供血能力, 改善心力衰竭患者心功能^[2-3]。因此, 本实验依据真武汤对心肌的保护作用, 通过注射阿霉素建立心肾阳虚型心力衰竭大鼠模型, 研究大鼠接受真武汤前后对心肾阳虚型心力衰竭大鼠行为体征、血流动力学以及相关自噬过程中蛋白表达水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 2 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 70 只, 体重 260~280 g 购自辽宁省长生生物技术有限公司 [SCXK(辽)-2016-0001]。甲状腺切除手术于长春中医药大学药学院中药药理实验室 [SYXK(吉)2016-0017] 进行。动物实验及操作流程严格遵守 3R 原则, 动物实验经长春中医药大学伦理委员会审查批准 (20190051)。动物饲养于清洁级动物室, 室温为 25℃, 相对湿度为 50%~70%, 饲喂大鼠维持饲料, 自由饮水。

1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸多柔比星 (161108), 购置于山西普德药业股份有限公司; 芪苈强心胶囊 (20160412), 购置于石家庄以岭药业股份有限公司; 大鼠 BNP、LA、CaN、TSH、T3、T4 试剂盒购置于上海源叶生物科技有限公司; 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、一抗二抗去除液、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Western 洗涤液、SDS-PAGE 电泳液 (干粉)、ECL 发光液购置于中国 wanleibio; LC3 (WL01506)、BECLIN 1 (WL02508)、P62 (WL02385)、ATG5 (WL02411)、羊抗兔 IgG-HRP (WLA023)、内参抗体 β -actin (WL01372) 购置于中国 wanleibio; 辣根酶标记链霉亲和素购置于中国碧云天生物技术有限公司; 山羊血清、DAB 显色液购

置于中国 Solarbio。

电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); 台式低温高速离心机 (上海飞鸽仪器厂); 酶标仪 (伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司); 水平摇床 (北京六一); 电泳装置 (北京六一); 凝胶成像系统 (北京六一); 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); 显微镜 (日本 OLUMPUS 公司); 16 道生理记录仪 (美国 Biopac 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建模及分组

腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg) 麻醉大鼠, BL-420F 生物信号采集分析系统记录胸前导联或 II 导联心电图^[4], 筛选并弃去 ST 段有异常变化者和心律失常者。本实验动物模型的建立, 参考中医证候心肾阳虚证以及吴向东^[5]用大鼠建立的该种证候动物模型并改进。取符合要求的健康 SPF 级的雄性 SD 大鼠 70 只, 随机分为正常组 (Control, 10 只)、模型组 (CHF, 60 只)。大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 (1 mL/kg), 麻醉后摘除双侧甲状腺。空白对照组行假手术。术后第 15 天起, 模型组大鼠尾静脉注射盐酸阿霉素 (4 mg/kg), 空白对照组注射等剂量生理溶液, 每周注射 1 次, 持续 5 周。术后第 35 天将存活下来模型组动物再次随机分为 5 组, 即模型对照组 (CHF)、芪苈强心胶囊组 (QL, 0.37 g/kg)、真武汤高剂量组 (ZWG, 1.35 g/kg)、真武汤中剂量组 (ZWZ, 0.81 g/kg)、真武汤低剂量组 (ZWD, 0.41 g/kg) 各 12 只。次日灌胃相应药物, 空白对照组和模型对照组灌胃蒸馏水, 连续 10 d。

1.3.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠一般情况影响

给药后每周测定大鼠体温、体重, 详细记录进食数量和饮水情况。

1.3.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心脏指数的影响

称取大鼠体重, 处死后, 迅速取出心脏组织, 以生理盐水清洗, 称取心脏重量, 公式如下: $CWI = \frac{\text{大鼠心脏重量}}{\text{大鼠体重}} \times 100\%$ 。

1.3.4 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血流动力学影响

第 10 天给药完毕 30 min 后, 打开已定标好的十六道生理记录仪及软件后, 以 20% 乌拉坦 0.5 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 通过十六导系统, 观

察并记录各组左室最大上升速率($+dp/dt_{max}$)、左室最大下降速率($-dp/dt_{max}$)等指标的变化情况。

1.3.5 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血清 T_3 、 T_4 和 TSH 含量影响

大鼠以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 平均麻醉剂量为 30 mg/kg, 等待大鼠被麻醉后, 用手术剪切开动物的腹腔, 迅速地剪断股动脉, 进行采血, 最后分离血清, 使用大鼠 T_3 、 T_4 、TSH 的 ELISA 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)测定大鼠血清中 T_3 、 T_4 、TSH 含量^[6]。

1.3.6 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌细胞 BNP、LA 和 CaN 含量影响

取心肌组织, 加入适量的蛋白萃取剂, 心肌组织标本匀浆化。300 r/min, 离心 20 min。收集上清。同上述检测方法类似, 经过稀释、加样、温育、洗涤等步骤, 通过标准曲线回归分析计算浓度。

1.3.7 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌 LC3、ATG5、P62 蛋白表达影响

称取心肌组织, 通过全蛋白提取试剂盒(中国 wanleibio)进行组织匀浆, 低温离心(4℃, 12000 r/min, 10 min)分离上清得到蛋白质抽提物。通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国 wanleibio)测定蛋白含量。加入 20 μ L 样品并在 10% 及 15% 聚丙烯酰胺凝胶上分离。转印至 PVDF 膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 用相应的抗体探测。使用对应的免疫球蛋白试剂通过凝胶成像系统(WD-9413B 型, 北京六一)观察印迹, 用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

1.3.8 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织 LC3 和 P62 表达影响

固定后的心肌组织依次进行包埋、透蜡、切片、抗原包被等程序, 封片后于显微镜 40 $\times$ 10 观察染色效果并拍照。

1.3.9 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织病理变化的影响

固定后的心肌组织进行脱水、透明、包埋、切片、染色等程序, 封片后于显微镜 40 $\times$ 10 下观察染色效果并拍照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件, 进行多组间差别用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行统计, 组间两两比较用方差分析后的 LSD 检验。实验数据

以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 检验结果以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计学有明显统计学意义。

2 结果

2.1 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠一般情况影响

2.1.1 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠自然情况影响

各给药组和模型对照组比较状态较好, 活动较自如, 症状有了明显改善, 饮食、饮水基本恢复正常, 皮毛相对柔顺而略有光泽, 颜色由黄变淡, 体重下降不明显, 精神状态良好, 较为活泼好动, 生命体征总体好于模型对照组, 结果见表 1。

2.1.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠体重、体温的影响

CHF 大鼠在造模后, 体重下降趋势显著, 与正常组比较有统计学意义($P < 0.05$), 虽然芪苈强心胶囊和真武汤高中剂量可以改善体重的降低, 但并无明显差别($P > 0.05$)。体温也随着静脉注射阿霉素时间的增加有所下降, 但无统计学意义($P > 0.05$), 结果见表 2。

2.1.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心脏指数的影响

与空白组相比, 心肾阳虚型心力衰竭大鼠心脏心脏指数虽有所增加, 但无明显变化($P > 0.05$), 结果见表 3。

2.2 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血流动力学的影响

血流动力学方面, 模型对照组与空白对照组比较 $\pm dp/dp_{max}$ 变化十分明显($P < 0.01$), $+dp/dp_{max}$ 下降至空白对照组值的 35.5%, 说明造模成功^[7]。芪苈强心胶囊和真武汤各剂量都能够显著抑制 $\pm dp/dp_{max}$ 变化($P < 0.05$), 说明真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌的收缩和舒张功能均有明显改善作用, 结果如表 4。

2.3 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠血清 T_3 、 T_4 、TSH 含量的影响

除空白组外, T_4 的含量均较低($P < 0.05$), 说明甲状腺清除完整, 各给药组可提高血清中 T_4 含量, 证明各给药组可以改善心肾阳虚型 CHF 大鼠甲状腺功能; 造模后大鼠血清 TSH 的含量高于空白组($P < 0.05$)。证明造模后甲状腺功能降低, 机体需要通

过增加 TSH 来刺激 T_4 产生。结果见表 5。

2.4 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌 BNP、LA、CaN 含量的影响

与正常组比较,心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织

LA 水平有所降低 ($P<0.05$), CaN、LA 含量有所升高 ($P<0.05$), 而各给药组均可对三个指标具有不同程度调节作用, 其中高剂量组作用最强 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 结果见表 6。

表 1 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠自然情况影响 ($n=10$)

Table 1 Physiological state of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	活动量 Activity		饮食饮水 Diet		毛发 Hair		粪便 Faeces		精神状态 Mental state	
	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating	造模后 After establishing model	给药后 After administrating
正常组 Control	多 More	多 More	增加 Increase	增加 Increase	有光泽 Glossy	有光泽 Glossy	正常 Common	正常 Common	活泼 Active	活泼 Active
模型对照组 CHF		少 Less		减少 Reduce		枯槁 Withered		便溏 Loose stool		萎靡 Torpor
芪苈强心 胶囊组 QL		多 More		增加 Increase		光泽 Glossy		正常 Common		活泼 Active
真武汤高 剂量组 ZWG	少 less	多 More	减少 Less	增加 Increase	枯槁 Withered	有光泽 Withered	便溏 Loose stool	基本正常 Basically normal	萎靡 Torpor	正常 Common
真武汤中 剂量组 ZWZ		较多 Major		增加 Increase		欠光泽 Withered		正常 Common		基本正常 Basically normal
真武汤低 剂量组 ZWD		较多 Major		增加 Increase		欠光泽 Withered		基本正常 Basically normal		基本正常 Basically normal

表 2 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠体重、体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Body weight and temperature of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	体重(g) Weight	体温(℃) Body temperature
正常组 Control	304.43±17.78 *	38.47±0.17
模型对照组 CHF	248.40±32.80	37.42±0.50
芪苈强心胶囊组 QL	275.24±57.30 *	37.08±0.62
真武汤高剂量组 ZWG	248.67±32.01 *	37.00±0.33
真武汤中剂量组 ZWZ	251.62±56.30 *	36.97±0.66
真武汤低剂量组 ZWD	209.61±19.33 *	37.45±1.18

注:与模型对照组比较, * $P<0.05$

Note. Compare with model group, * $P<0.05$.

表 3 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Cardiac index of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量 Dose	心脏指数(g/kg) CWI
正常组 Control	—	2.6726±0.2064
模型对照组 CHF	—	2.8408±0.7152
芪苈强心胶囊组 QL	0.30 g/kg	2.8143±0.3638
真武汤高剂量组 ZWG	1.35 g/kg	2.9043±0.1667
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81 g/kg	3.3972±0.1171 *
真武汤低剂量组 ZWD	0.41 g/kg	3.0415±0.3002

注:与模型对照组比较, * $P<0.05$ 。

Note. Compare with model group, * $P<0.05$.

表 4 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血流动力学影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Hemodynamics of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	左室最大上升速率(mmHg/s) +dp/dtmax	左室最大下降速率(mmHg/s) -dp/dtmax
正常组 Control	—	5234.86±187.02 **	-5219.60±194.21 **
模型对照组 CHF	—	1859.85±163.13	-1764.93±182.27
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	3786.41±181.17 **	-3577.87±128.38 **
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	2943.28±153.96 **	-2839.27±173.52 **
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	2441.53±149.23 *	-2521.64±160.86 *
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	2236.41±110.46	-2377.87±128.38

注:与模型对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

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

2.5 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌自噬相关蛋白的影响

Western blot 结果表明,与对照组比较,心肾阳虚模型 CHF 大鼠心肌 LC3、ATG5、BECLIN1 水平明显降低,而各给药组均能提高大鼠心肌组织中 LC3、ATG5、

BECLIN1 蛋白表达量。与对照组比较,心肾阳虚模型 CHF 大鼠心肌 P62 水平变化不大,但各给药组均能降低 P62 蛋白表达量,其中真武汤各组降低作用明显,结果见图 1,由左至右依次为正常组,模型对照组,芪苈强心胶囊组,真武汤高、中、低剂量组,详见表 7。

表 5 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血液中 T3、T4、TSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 T3, T4, TSH of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	三碘甲状腺原氨酸 T3 (nmol/L)	血清总甲状腺素 T4 (nmol/L)	促甲状腺激素 TSH (nmol/L)
正常组 Control	—	0.04±0.01	0.75±0.09 *	0.68±0.16 *
模型对照组 CHF	—	0.05±0.01	0.51±0.01	0.80±0.12
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	0.05±0.02	0.55±0.00 *	0.82±0.09 *
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	0.05±0.01	0.57±0.02 *	0.85±0.17
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	0.04±0.02	0.55±0.05 *	0.83±0.19
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	0.03±0.01	0.53±0.00 *	0.83±0.19

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model group, * $P < 0.05$.

表 6 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠血液中 LA、CaN、BNP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 LA, CaN, BNP of heart-kidney yang deficiency and heart failure rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	乳酸 LA (nmol/L)	钙调神经磷酸酶 CaN (nmol/L)	脑钠肽 BNP (nmol/L)
正常对照组 Control	—	16.96±0.76 *	1.35±0.30 *	1.07±0.22 *
模型对照组 CHF	—	16.30±0.37	1.83±0.29	1.31±0.22
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	17.96±1.88 *	1.45±0.30 *	0.91±0.38 *
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	16.85±0.70 *	1.33±0.29 **	0.96±0.25 **
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	16.57±0.57	1.49±0.25 *	1.02±0.25 **
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	16.33±0.67	1.55±0.21 *	1.26±0.24

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

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

表 7 真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌自噬相关蛋白相对蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Autophagy related protein of heart-kidney yang deficiency CHF rats by ZW

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	LC3	ATG5	Beclin1	P62
正常对照组 Control	—	1.00±0.00 ***	1.00±0.00 ***	1.00±0.00 *	1.00±0.00 *
模型对照组 CHF	—	0.66±0.11	0.71±0.23	0.95±0.07	1.13±0.18
芪苈强心胶囊组 QL	0.30	1.80±0.13 ***	1.69±0.23 ***	1.70±0.21 ***	0.97±0.13 *
真武汤高剂量组 ZWG	1.35	2.77±0.15 ***	1.73±0.24 ***	1.73±0.18 ***	0.81±0.24 **
真武汤中剂量组 ZWZ	0.81	2.83±0.13 ***	2.01±0.23 ***	1.20±0.22 **	0.68±0.16 ***
真武汤低剂量组 ZWD	0.41	2.52±0.12 ***	2.02±0.28 ***	1.73±0.14 ***	0.81±0.17 ***

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

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

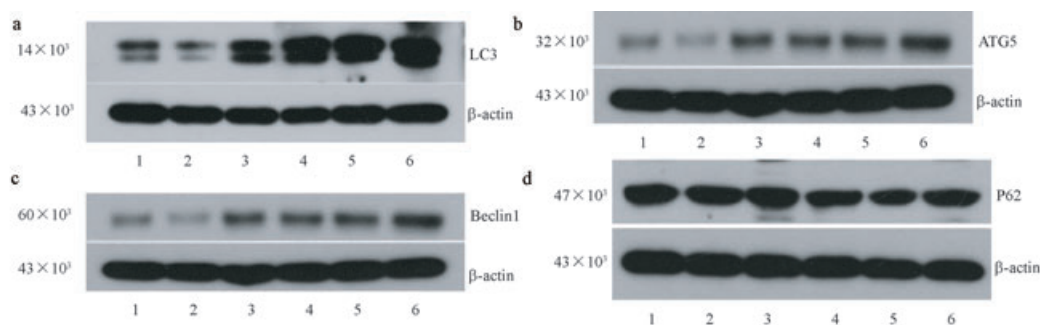


图 1 心肌组织 LC3(a)、ATG5(b)、BECLIN1(c)、P62(d) 表达结果

Figure 1 Results of LC3 (a), ATG5 (b), BECLIN1 (c), P62 (d) in myocardial tissue

2.6 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织 LC3 和 p62 表达影响

免疫组织化学染色结果显示,与空白对照组比较,模型对照组心肌 BECLIN1、P62 表达量降低,各给药组可以升高心肾阳虚型 CHF 导致的 P62 表达量的降低,见图 2。

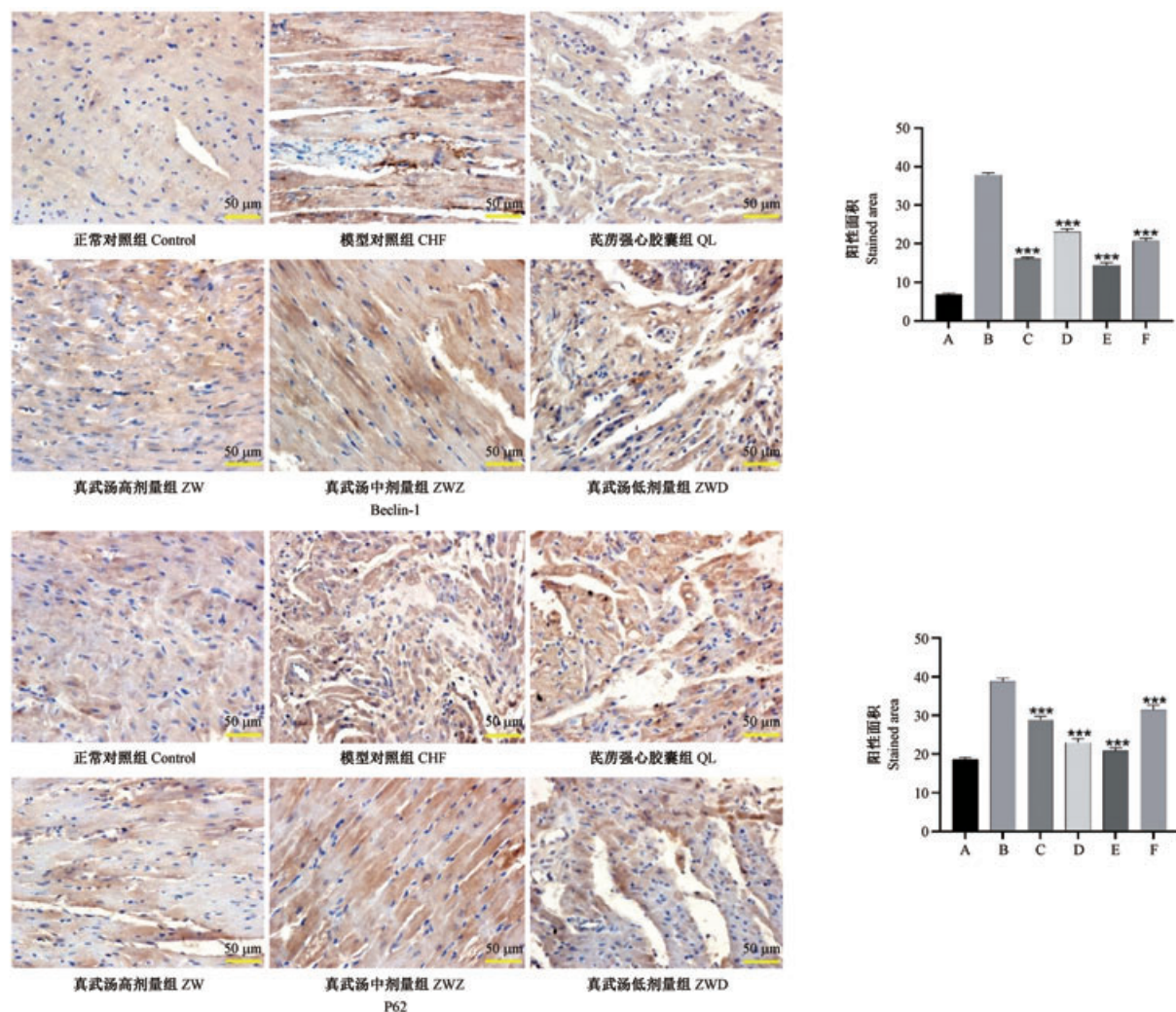
2.7 真武汤对心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌组织影响

HE 染色结果可见:空白对照组心肌纤维间连接密集、纤维间分布平整,细胞与细胞之间距离正常;模型对照组心肌细胞边缘不整,大面积心肌纤维溶断,细胞间距加宽,心肌纤维排列混乱,存在局部炎性细胞浸润现象,心肌组织产生局部水肿;各

给药组可使模型对照组的心肌细胞得到好的治疗改善,结果见图 3。

3 讨论

慢性心力衰竭中医证型分类方式繁多各有侧重,目前还没有统一的标准。相对比较权威的《中医新药临床研究指导原则》^[8]辨证标准将本病分为 7 个证型。疾病的初期病理变化是心肺气虚。病情进一步进展则是气阴两亏、气虚血瘀。而慢性心力衰竭较严重的阶段则是心肾阳虚、阳虚水泛、痰饮阻肺。在实验的过程中,我们通过手术将实验用大鼠两侧甲状腺切除,再对它进行尾部静脉注射阿霉素之后,实验大鼠主要表现出毛皮灰黄、呼吸微弱、



注:A:正常对照组;B:模型对照组;C:芪苈胶囊组;D:真武汤高剂量组;E:真武汤中剂量组;F:真武汤低剂量组。与模型对照组比较,*** $P < 0.001$ 。

图2 免疫组化检查结果

Note. A, Control. B, Model. C, QL. D, ZWG. E, ZWZ. F, ZWD. Compared with the model group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Results of IHC

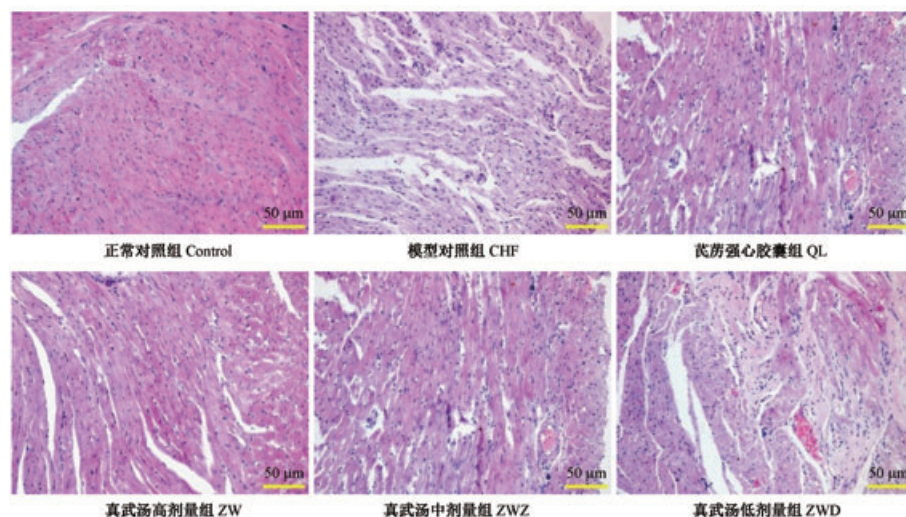


图 3 光镜检查结果

Figure 3 Results by light microscopy

精神萎靡、畏寒蜷缩、大便溏泻的症状,这些生命体征与人类中医证候心肾阳虚证型非常相像^[9]。基于此,我们认为这组大鼠的表现与模拟的心肾阳虚证候十分吻合,根据上述研究内容,我们在建立心肾阳虚证的动物模型时,可以参考上述方案。

经过大量的临床和动物实验已经证实,阿霉素在长期应用时可出现难以恢复的心脏毒性作用,而且由于阿霉素与心肌组织亲和力显著强于其他组织,因此可出现剂量不可逆的依赖性心肌损伤^[10],可能与其机制相关的因素有:基因突变^[10-11];核酸、脂质过氧化^[12];Ca²⁺超载^[13];能量代谢障碍^[14-15];自由基损伤^[16];产物的直接性损害^[17]等。目前,腹腔间断性注射阿霉素已经被广泛应用于慢性心力衰竭大鼠模型的建立^[18-19],并被认为是能够高度模仿人体慢性心力衰竭的神经-内分泌机制和血流动力学的改变,与其它造模方法相比,该法具有方法简单和复制性高的优点。因此本研究认为尾静脉注射阿霉素造成的心力衰竭模型能更好地用于益气温阳抗心衰的治疗性研究。

本研究结果显示,真武汤可以降低心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌组 BNP 含量,说明其对心衰症状具有改善功能。LA 作为运动时物质代谢的产物,模型动物 LA 含量降低说明心肌细胞功能下降,而真武汤能够升高心肌组织 LA 含量,降低 CaN 含量,说明真武汤能够改善心脏能量代谢。心肾阳虚型 CHF 大鼠心肌自噬相关蛋白 LC3、ATG5、BECLIN1 含量降低,P62 含量升高,说明心力衰竭初期心肌细胞有大量细胞发生自噬,真武汤可以升高心力衰竭

大鼠自噬相关指标 LC3、ATG5、BECLIN1 含量,降低 P62 含量,说明真武汤在心力衰竭初期可以通过调节自噬保护损伤的心肌细胞。

综上所述,在进行有关针对心肾阳虚型 CHF 模型的构建的研究时,可以应用阿霉素尾静脉注射的方法,本研究认为尾静脉注射阿霉素造成的心力衰竭模型能更好地用于益气温阳抗心衰的治疗性研究,并且,在临床中针对本有不同程度符合心肾阳虚证型的慢性心力衰竭的患者,可以加以应用真武汤进行辨证论治。

参考文献:

- [1] 李立志,陈可冀. 治疗充血性心力衰竭经验[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(2): 136-138.
- [2] 王金梁. 真武汤治疗心力衰竭临床观察[J]. 光明中医, 2019, 34(14): 2110-2112.
- [3] 周蔓菁,唐其柱. 真武汤对老年慢性心力衰竭患者血流动力学、MMP-9 和心功能的影响[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 926-930.
- [4] Pfisterer M, Buser P, Rickli H, et al. BNP-guided vs symptom-guided heart failure therapy: the trial of intensified vs standard medical therapy in elderly patients with congestive heart failure (TIME-CHF) randomized trial[J]. JAMA, 2009, 301(4): 383-392.
- [5] 邓文龙. 中医方剂的药理与应用[M]. 重庆:重庆出版社, 1990.
- [6] 李琰,李介鸣. 治疗心力衰竭经验[J]. 中医杂志, 2001, 42(3): 14-15.
- [7] 刘俊保. 真武汤治疗慢性充血性心力衰竭 30 例[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17(12): 1794-1795.
- [8] Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgärtner M, et al. Re-sistance

- of p53 knockout cells doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling [J]. DNA Repair (Amst), 2003, 2(1): 49-60.
- [9] 郑筱英. 中药新药临床指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- [10] Momparler RL, Karon M, Siegel SE, et al. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells [J]. Cancer Res, 1976, 36(8): 2891-2895.
- [8] Dunkern TR, Wedemeyer I, Baumgärtner M, et al. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling [J]. DNA Repair (Amst), 2003, 2(1): 49-60.
- [11] Ferrans VJ, Clark JR, Zhang J, et al. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy [J]. Tsitolgia, 1997, 39(10): 928-937.
- [12] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin [J]. Yakugaku Zasshi, 2003, 123(10): 855-866.
- [13] Fu J, Yamamoto K, Guan ZW, et al. Human neuronal nitric oxide synthase can catalyze one-electron reduction of adriamycin: role of flavin domain [J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 427(2): 180-187.
- [14] Al-Nasser IA. *In vivo* prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporin A or FK506 [J]. Toxicology, 1998, 131(2-3): 175-181.
- [15] Zhou S, Heller LJ, Wallace KB. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 175(1): 60.
- [16] Rabelo E, De Angelis K, Bock P, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure [J]. Hypertension, 2001, 38(3 Pt 2): 576-580.
- [17] 徐萌, 积仁, 许少珍. 阿霉素心脏毒性的发生机制及其防治 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(7): 532-534.
- [18] 杨建业, 张迎春, 唐俊明, 等. 阿霉素诱导大鼠心衰模型的建立 [J]. 邵阳医学院学报, 2005, 24(5): 268-271, 321.
- [19] 李秀梅, 田国忠, 欧叶涛, 等. 大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定 [J]. 解剖学研究, 2005, 27(3): 176-178.

〔收稿日期〕2020-04-10

(上接第 28 页)

- [18] White M, Courtemanche M, Stewart DJ, et al. Age and gender-related changes in endothelin and catecholamine release and in autonomic balance in response to head-up tilt [J]. Clin Sci (Lond), 1997, 93(4): 309-316.
- [19] Reis Filho JR, Cardoso JN, Cardoso CM, et al. Reverse cardiac remodeling: a marker of better prognosis in heart failure [J]. Arq Bras Cardiol, 2015, 104(6): 502-506.
- [20] Wagner HR, Crutcher KA, Davis JN. Chronic estrogen treatment decreases beta-adrenergic responses in rat cerebral cortex [J]. Brain Res, 1979, 171(1): 147-151.
- [21] Khasar SG, Dina OA, Green PG, et al. Estrogen regulates adrenal medullary function producing sexual dimorphism in nociceptive threshold and beta-adrenergic receptor-mediated hyperalgesia in the rat [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(12): 3379-3386.
- [22] Chu SH, Goldspink P, Kowalski J, et al. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, beta-adrenergic receptors, and function in rat heart [J]. Life Sci, 2006, 79(13): 1257-1267.
- [23] Grohé C, Kahlert S, Löbbert K, et al. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors [J]. FEBS Lett, 1997, 416(1): 107-112.
- [24] Klangkalya B, Chan A. The effects of ovarian hormones on beta-adrenergic and muscarinic receptors in rat heart [J]. Life Sci, 1988, 42(23): 2307-2314.
- [25] Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond [J]. Circulation, 2005, 111(21): 2837-2849.

〔收稿日期〕2020-07-02

林臻,陈洪志,赵航,等. MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 57-62,85.

Lin Z, Chen HZ, Zhao H, et al. Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson's model induced by MPTP [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 57-62,85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.009

MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估

林 臻,陈洪志,赵 航,刘 辉,许妍妍,刘海岩,张 浩*

(吉林大学基础医学院人体解剖学系,长春 130021)

【摘要】 目的 建立稳定的1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导C57BL/6小鼠帕金森模型,并对模型进行行为学评估。**方法** 建立给药组,给药剂量分别为35 mg/kg、30 mg/kg、25 mg/kg和给予30 mg/kg生理盐水的对照组。分别进行震颤麻痹评分、旷场实验、爬杆实验、悬挂实验、游泳实验,并进行综合统计。分析给药组与对照组间以及各给药组间的差异。同时进行HE和免疫组化TH抗体染色,观察黑质和纹状体区域神经元和神经纤维的改变。**结果** 与对照组相比,给药组评分均明显增高,但25 mg/kg剂量组行为学评分明显低于35 mg/kg和30 mg/kg剂量组,35 mg/kg与30 mg/kg剂量组间无显著性差异。黑质区域TH阳性神经元数量减少,纹状体TH阳性神经纤维减少。**结论** 建立了一个可以通过行为学数据评估小鼠帕金森病模型效果的简便途径。

【关键词】 帕金森病;动物模型;1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)08-0057-06

Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson's model induced by MPTP

LIN Zhen, CHEN Hongzhi, ZHAO Hang, LIU Hui, XU Yanyan, LIU Haiyan, ZHANG Hao*

(Department of Human Anatomy, Basic Medical College of Jilin University, Changchun 130021, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable Parkinson's model in C57BL/6 mice by MPTP and assess behavioral scores of the model. **Methods** Dosing groups (35, 30, and 25 mg/kg body weight MPTP) and control group (30 mg/kg body weight physiological saline) were established. We conducted the paralysis agitans score, open field test, pole test, traction test, swim test, and comprehensive statistical analysis. We then analyzed the differences between each group and the control group. HE staining and TH immunohistochemical staining were performed to observe the substantia nigra, striatum neurons, and nerve fibers. **Results** Compared with the control group, the scores of drug administration groups were significantly higher. The ethology score of the 25 mg/kg dose group was significantly lower than those of 35 and 30 mg/kg groups. No significant difference was found between 35 mg/kg and 30 mg/kg groups. Substantia nigra TH-positive neurons and striatum TH-positive nerve fibers were decreased. **Conclusions** A simple method was established to evaluate a Parkinson's disease model in mice by behavioral data.

【Keywords】 Parkinson's disease; animal models; MPTP

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的中老年神经退行性病变,随着人口老龄化的加

剧,患病人口日益增加^[1]。其病理学表现为中脑纹状体和黑质区域多巴胺能神经元进行性减少。现

【基金项目】 吉林省医学实验动物科学研究开放课题(20170623093-08TC)。

【作者简介】 林臻(1993—),女,硕士研究生,研究方向:人体解剖与组织胚胎学。E-mail:879657728@qq.com

【通信作者】 张浩(1984—),男,工程师,研究方向:神经解剖学。E-mail:zhanghao009@jlu.edu.cn

有多种机理的动物模型可以模拟帕金森病的发生和进展,其中药物诱发化学损毁模型以其简便、快捷和较为经济的优势,成为广泛应用的模型制备方法。1-甲基-4 苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)经腹腔注射后可造成小鼠黑质和纹状体区域多巴胺能神经元死亡,酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞和神经纤维减少,能够模拟帕金森病的病理学表现,是一种常见的帕金森病模型诱导药物^[2]。本研究拟通过对多种行为学表现的统计和评价,以及将行为学和形态学数据相互印证,初步建立一个可以通过行为学数据评估小鼠帕金森模型效果的简便途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 35 只,年龄 3~9 月龄,体重 25~26 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[SCXK(辽)2015-0001]。饲养于吉林大学(基础医学院动物实验中心)[SYXK(吉)2018-0001]。本实验通过吉林大学基础医学院实验动物伦理审查((2016 年)研审第 001 号),依据优化、减少、替代的 3R 原则进行实验设计。

1.2 主要试剂与仪器

MPTP 购自 Sigma 公司(货号:MO896,中国);亚克力材质行为学评估水箱、支架、旷场环境,由吉林大学人体解剖学系自行制作。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的制作

雄性 C57BL/6 小鼠 35 只随机分为 4 组,Ⅰ组为对照组 5 只,给予计量为 30 mg/kg 体重生理盐水,持续 7 d。Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组为模型组,每组 10 只,分别给予计量为 35 mg/kg、30 mg/kg、25 mg/kg 体重的 MPTP 持续 7 d、8 d、10 d。

1.3.2 行为学检测

(1)震颤麻痹评分

小鼠采用腹腔注射给药,立即进行观察,持续 3 h。评分标准为:0 分,与正常小鼠相似,无任何症状;1 分,出现竖毛、弓背、间断性细小震颤,但活动自如;2 分,出现吞咽频繁,频繁性震颤,后肢张开,颤尾,活动逐渐受限;3 分,出现流涎、持续性震颤,四肢僵硬,活动受限;4 分,因全身麻痹而死亡。

(2)旷场实验

给药结束后第 3 天开始,每天进行一次实验,持续到第 7 天。采用亚克力材质 50 cm×50 cm×50 cm

方盒作为场地,均匀划分为 9 格,将小鼠放入旷场的正中格内,记录小鼠三爪以上跨入邻格的次数,观察持续 2 min。评分标准为:0 分,跨入次数>40 次;1 分,跨入次数为 31~40 次;2 分,跨入次数为 21~30 次;3 分,跨入次数<21 次。

(3)爬杆实验

给药前 3 d,每天进行一次爬杆训练。给药结束后第 3 天开始,每天一次测量,持续到第 7 天。将一直径为 2.5 cm 的塑料球固定于长 50 cm、粗 1.5 cm 的亚克力杆顶端,缠上纱布以防打滑,然后将被测小鼠置于球上,记录由球上爬至杆子底部所需时间。评分标准为:0 分,爬杆时间<4.01 s;1 分,爬杆时间为 4.01~8.0 s;2 分,爬杆时间为 8.01~12.0 s;3 分,爬杆时间>12.00 s。

(4)悬挂实验

给药结束后第 3 天开始,每天进行一次实验,持续到第 7 天。被测小鼠倒置悬挂,将两前爪置于 30 cm 长、25 cm 高水平电线中点,而后放开小鼠,记录其抓握情况。评分标准为:0 分,两后爪均可抓住电线;1 分,一只后爪可抓住电线;2 分,两只后爪均不能抓住电线。如出现后爪反复抓取电线,间断可抓住现象,可记为 0.5 分。

(5)游泳实验

给药结束后第 3 天开始,每天进行一次实验,持续到第 7 天。小鼠放于 40 cm×25 cm×16 cm 的水箱中,水深 15 cm,水温为(27±2)℃,记录 3 min 内小鼠的漂浮时间。评分标准为:0 分,漂浮 0~30 s;1 分,漂浮 31~90 s;2 分,漂浮 91~150 s;3 分,漂浮 151~180 s。

1.3.3 形态学检测

全部行为学测试结束后第 1 天,将小鼠麻醉后,37℃ 80 mL 生理盐水灌流,4℃ 100 mL 4% 甲醛固定,取出全脑。4% 甲醛外固定 3 d,后进行常规石蜡包埋切片,厚度为 4 μm。石蜡切片分别进行 HE 染色和免疫组化染色。

HE 染色:常规梯度乙醇脱蜡,PBS 冲洗 3 min×3 次,经苏木精染色、氨水反蓝、伊红染色后,脱水透明封片。观察小鼠纹状体和黑质部分神经细胞的形态、数量和分布。

免疫组织化学染色:按照免疫组化检测试剂盒步骤进行脱蜡、PBS 冲洗、3% H₂O₂ 抗原修复和血清封闭。滴加一抗 TH 抗体(1:300),4℃ 过夜后顺次滴加试剂 1(放大信号)和试剂 2(二抗),各孵育

15 min, PBS 冲洗后进行 DAB 显色、苏木精复染,脱水透明封片。观察小鼠纹状体和黑质部分 TH 阳性细胞的形态、数量和分布。

1.4 统计学方法

所有实验数据采用 3 次测量取平均值的方式进行采集,使用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组之间的差异用 t 检验比较分析, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 震颤麻痹评分

腹腔注射 MPTP 后 5~30 min, 小鼠相继出现竖毛、弓背、间歇性小震颤,继而可出现吞咽频繁至流涎,后肢张开至四肢僵硬,震颤频率逐渐增加,直至出现可持续数十秒的持续性震颤,60 min 后出现活动减低。由于连续 7~10 d 给药,随着体内积累药量增加,小鼠出现活动减低现象时间逐渐提前,其他现象则渐不明显,所以将第一次给药评分作为震颤麻痹评分,各剂量组均数作为该组震颤麻痹评分。可见对照组无震颤麻痹现象,随单体次药剂量增加,小鼠震颤麻痹现象加重。各组震颤麻痹评分见表 1。给药过程中有小鼠由于药物反应死亡,后续检测中 30 mg/kg 组和 35 mg/kg 组实际测量分别为 7 只、9 只。

2.2 旷场实验

将旷场实验连续测量 5 d 的评分计算均数,作为单只受试鼠的评分,将各剂量组均数作为该组旷

场实验评分,具体结果见表 2。可见与对照组相比,给药组的评分明显增高,但 30 mg/kg 组评分高于 35 mg/kg 组。

2.3 爬杆实验

通过预实验发现,随着不断训练,小鼠爬杆实验完成时间会不断变短,所以将停药后第三天的爬杆实验评分作为最终记录评分,各剂量组均数作为该组爬杆实验评分,见表 3。可见与对照组相比,给药组的评分明显增高,30 mg/kg 组与 35 mg/kg 组无显著性差异。

2.4 悬挂实验

小鼠由停药第 6 天开始,悬挂实验症状逐渐恢复,现将悬挂实验停药第 3~5 天的评分计算均数,作为单只受试鼠的评分,将各剂量组均数作为该组悬挂实验评分,具体结果见表 4。可见与对照组相比,给药组的评分明显增高,且随着给药剂量的增加,评分也随之增高。

2.5 游泳实验

将游泳实验连续测量 5 d 的评分计算均数,作为单只受试鼠的评分,将各剂量组均数作为该组游泳实验评分,具体结果见表 5。可见与对照组相比,给药组的评分明显增高,但 30 mg/kg 组评分高于 35 mg/kg 组。

2.6 综合统计

将各受试鼠的五项行为学测试评分加和,统计各组每只受试鼠行为学总得分。见表 6。

表 1 震颤麻痹评分
Table 1 Paralysis agitans score

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	0
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	2	1.5	1.5	2.5	2	2.5	2.5	1.5	2	1.5	1.95 $\pm$ 0.44 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	2	2.5	1.5	4	3	3	4	2	4	2	2.80 $\pm$ 0.95 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	3	2.5	3.5	2.5	4	2.5	2.5	3	3	2.5	2.90 $\pm$ 0.52 ^{*#}

注:与对照组比较, $^* P < 0.05$;与 25 mg/kg 组比较, $^{\#} P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, $^* P < 0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, $^{\#} P < 0.05$.

表 2 旷场实验
Table 2 Field test

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0.33	1.33	1	1.33	1	—	—	—	—	—	1 $\pm$ 0.41
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	1.93	1.06	1.8	2.13	2.13	2.47	1.27	1.87	0.93	1	1.45 $\pm$ 0.55 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	2.6	1.6	1.73	—	2.72	2.54	—	1.8	—	2.8	2.26 $\pm$ 0.52 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	2.6	2.13	2.33	2.6	—	2.26	2.2	2	1.53	1.73	2.15 $\pm$ 0.36 ^{*#}

注:与对照组比较, $^* P < 0.05$;与 25 mg/kg 组比较, $^{\#} P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, $^* P < 0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, $^{\#} P < 0.05$.

表 3 爬杆实验
Table 3 Pole test

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0.33	0	0	0.67	0	—	—	—	—	—	0.20±0.30
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	1	1	1	1	1	1.33	1	1	1	0	0.93±0.34 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	1	2.67	1.33	—	2.33	1.33	—	1.67	—	2.33	1.81±0.63 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	1.67	2	2	2	—	2	1.67	2.67	1.67	1.33	1.78±0.37 ^{*#}

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 25 mg/kg 组比较, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, # $P<0.05$.

表 4 悬挂实验
Table 4 Traction test

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	0
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	1.33	1	1.33	1.33	1	0.33	0.67	2	1.17	0.17	1.03±0.54 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	1.17	1.33	0.83	—	1.83	1.17	—	1	—	1.5	1.26±0.33 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	0.83	1.17	1.83	1.83	—	2	2	1.5	2	1.33	1.61±0.43 ^{*#}

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 25 mg/kg 组比较, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, # $P<0.05$.

表 5 游泳实验
Table 5 Swim test

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0	0.67	0	0	0.67	—	—	—	—	—	0.27±0.37
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	0.8	1.53	1.53	1.93	1.73	1.47	2	1.53	2	1.6	1.61±0.35 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	3	2.8	2.93	—	2.73	2.47	—	1.6	—	2.87	2.21±0.48 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	2.47	2.6	1.93	2.33	—	1.47	2.07	2.27	1.87	1.87	2.10±0.35 ^{*#}

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 25 mg/kg 组比较, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, # $P<0.05$.

表 6 综合得分
Table 6 Comprehensive score

编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x} \pm s$
组别 Groups											
对照组 Control group	0.66	2	1	2	1.67	—	—	—	—	—	1.47±0.61
25 mg/kg 组 25 mg/kg group	7.06	6.09	7.16	8.89	7.86	8.1	7.44	7.9	7.1	4.27	6.97±1.27 [*]
30 mg/kg 组 30 mg/kg group	9.77	10.9	8.32	4	12.61	10.51	4	8.07	4	11.5	10.34±3.30 ^{*#}
35 mg/kg 组 35 mg/kg group	10.57	10.4	11.59	11.26	4	10.23	10.44	11.44	10.07	8.76	10.54±2.22 ^{*#}

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 25 mg/kg 组比较, # $P<0.05$ 。

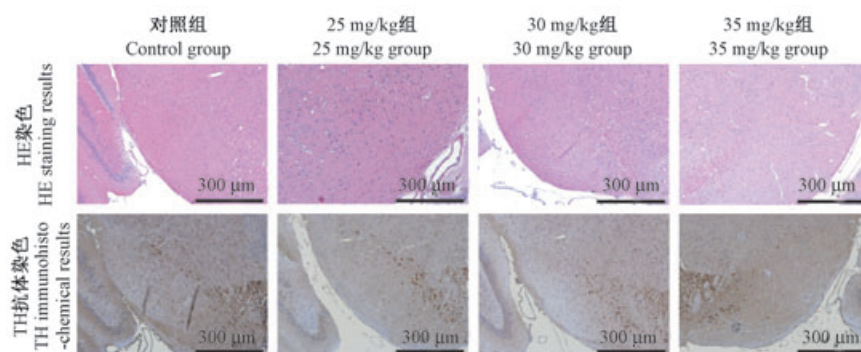
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the 25 mg/kg group, # $P<0.05$.

2.7 形态学检测

将各组小鼠分别取脑,对黑质和纹状体分别行 HE 和 TH 抗体免疫组化染色,见图 1、图 2。

通过 HE 染色,可以确定黑质区域神经元细胞以及纹状体神经纤维的分布和形态。进一步行 TH

抗体免疫组化染色,发现模型组在黑质区域存在多巴胺能神经元数量减低,纹状体区域出现 TH 阳性神经纤维数量减少的现象,能够在形态学上认定帕金森模型制作成功。

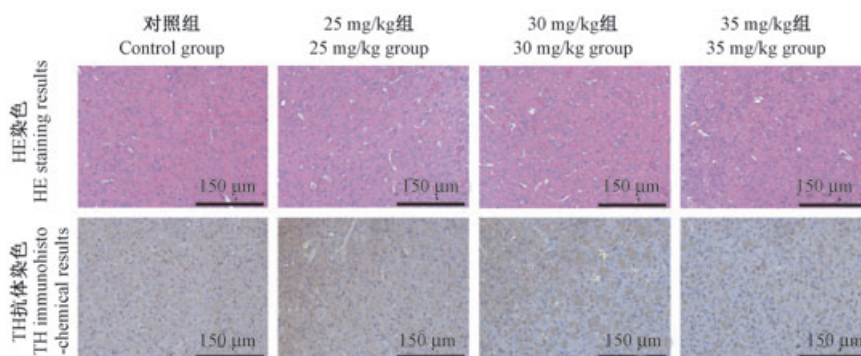


注:上行分别为 Control 组、25~35 mg/kg 组 HE 染色结果;下行分别为 Control 组、25~35 mg/kg 组 TH 抗体免疫组化染色结果。

图 1 黑质 HE 和 TH 抗体免疫组化染色

Note. The upper line corresponds to the HE staining results of control group and 23 ~ 35 mg/kg groups, respectively. The next line corresponds to the TH immunohistochemical results of control group and 23 ~ 35 mg/kg groups, respectively.

Figure 1 HE staining results and TH immunohistochemical results of the substantia nigra



注:上行分别为纹状体 Control 组、25~35 mg/kg 组 HE 染色结果;下行分别为 Control 组、25~35 mg/kg 组 TH 抗体免疫组化染色结果。

图 2 纹状体 HE 和 TH 抗体免疫组化染色

Note. The upper line corresponds to the HE staining results of control group and 23 ~ 35 mg/kg groups, respectively. The next line corresponds to the TH immunohistochemical results of control group and 23 ~ 35 mg/kg groups, respectively.

Figure 2 HE staining results and TH immunohistochemical results of the corpus striatum

3 讨论

MPTP 自上世纪 80 年代发现以来,已广泛应用于帕金森化学损毁模型的制备。其可以引起灵长类和啮齿类动物脑内黑质和纹状体区域多巴胺能神经元死亡,这与帕金森病的病理改变较为类似,由此也引起该动物模型产生与帕金森病相类似的形态学表现^[3]。TH 在多巴胺能神经元中含量较高,其水平能够反应该神经元的位置和功能,因此,检测黑质和纹状体区域 TH 表达的区域和变化,可以反映出多巴胺能神经元的位置和数量,由此判断 MPTP 诱导的帕金森模型的严重程度^[4]。

帕金森病症状是由多种原因相互影响产生的,例如肌张力增强可导致协调障碍,进而引起运动减低。而动物的行为学表现又同时受到客观能力和主观意愿的影响,所以单一的行为学实验很难准确的反映出帕金森动物模型是否成功及其严重程度^[5]。本实验选取了与帕金森病相关且较为常见和简便易测的五种行为学评价方法^[6-9],包括了运动能力、协调性、肌力、主观意愿等各个方面,以期通过多个实验来综合评价,为分析行为学检测和形态学指标的关联性奠定基础。

震颤麻痹评分是与给药剂量直接相关的指标,多数研究对其以观察现象为主,少有通过量表进行

评分^[10],这主要由两个因素造成,一是随着给药的次数增加,小鼠活动减低时间前提并延长,很多症状趋于隐匿;二是相同给药剂量情况下,小鼠表现较为相近,长时间观察区分较为困难。针对这两个问题,本研究选取了多个给药剂量,且以表现最为明显的给第一次给药作为观察点,震颤麻痹评分的区分度较好。给药组与对照组差别显著,且剂量依赖性明显,增大剂量后,评分也随之增高,但同时发现 30 mg/kg 以上剂量,会出现由于不耐受药物而产生的动物死亡,两组累计死亡 4 只,这与国外一般认为的 45 mg/kg MPTP 剂量以内不会出现实验动物死亡的报道不相符^[11]。

旷场实验、爬杆实验和游泳实验中,除与对照组存在显著性差异外,25 mg/kg 的低剂量组与 30 mg/kg 和 35 mg/kg 的中高剂量组也存在较为明显的差异。同时 30 mg/kg 和 35 mg/kg 间差别不明显,反而出现个别评分与剂量相反的情况,说明给药剂量存在一个较为明显的阈值,超过该阈值后,这三个实验的行为学表现没有明显的增强趋势。此外由于小鼠对爬杆实验适应性较强,反复测量会明显降低评分^[12],本研究在给药前 3 d 开始每天对小鼠进行训练,使其适应爬杆环境,间隔 7~10 d 的给药期和 2 d 的稳定期后,在给药结束后第 3 天直接测量爬杆实验评分,力求避免小鼠适应性对爬杆实验评分的影响。

有研究显示悬挂实验的稳定性较好,一般可以持续到给药结束一到二周才会出现明显的症状消退^[13],本研究发现在悬挂实验评分在第 6 天即出现明显降低,模型动物力量明显升高,因此仅统计了停药后 3~5 d 的评分。在每天评价中的三次测量基本得分一致,在停药 5 d 的跨度中变化也较小。悬挂实验主要反应了小鼠的肌力情况,与对照组相比,给药组有明显的评分增高,而在给药组内,三个剂量组也均有显著差别,说明肌力随给药剂量增加而持续下降。但是抓握能力下降也与协调性和精细运动障碍有关,所以此实验仍有其他因素加入,不能认为仅反映肌力情况。

本研究将五个行为学实验整合起来,统计综合得分,进行组间对比,可见三个给药组与对照组均存在显著性差异,说明即使给予低剂量药物,也能引起动物模型类帕金森病的行为学改变。低剂量组与中高剂量组间也存在显著性差异,说明给予中高剂量药物会使此类行为学改变显著增强。但是

中高剂量组间无显著性差异则说明,给药剂量存在某一阈值,给予超过阈值剂量的 MPTP,行为学改变不会进一步出现显著性增强,但会出现药物致死现象。

以往研究中由于单一行为学评估手段的不稳定性,多采用形态学手段进行模型判定^[3-5]。这就要求必须抽样处死一批造模动物进行判定,既增加了实验的复杂性,也不能保证存活动物一定能够达到模型成功标准。本研究进行整合行为学评分与形态学表现关联分析,以形态学结果为判定标准,进一步分析发现整合评分达到 7.5 分以上的模型可以确定造模成功,6 分以下可以确定造模失败,提示整合行为学评估手段对模型判定较以往单一行为学检测方法更为准确,与形态学检测结果一致性更强。同时在总体趋势上整合行为学评分较高的个体形态学表现也更为明显,可以认为帕金森病严重程度较高,进一步可以对模型的严重程度进行简单的划分。

因此,本研究采用的整合行为学评分方法可以提高 MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森动物模型制备标准及其以此动物模型为基础的相关科学研究的科研数据的可靠性。在今后的研究中,以此为切入点,增强模型稳定性,优化整合评估手段,可以使 MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估更加简便准确。

参考文献:

- [1] Kouli A, Torsney KM, Kuan WL. Parkinson's disease [M]. Brisbane (Australia): Codon Publications, 2018.
- [2] Vingill S, Connor-Robson N, Wade-Martins R. Are rodent models of Parkinson's disease behaving as they should? [J]. Behav Brain Res, 2018, 352(10): 133-141.
- [3] Cenci MA, Crossman AR. Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2018, 33(6): 889-899.
- [4] 陈毅美, 李琳, 张彦芳, 等. 京尼平苷对 MPTP 所致帕金森病小鼠模型的神经保护作用研究 [J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(5): 629-634.
- [5] Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Behav Brain Res, 2001, 125(1-2): 109-125.
- [6] Dehmer T, Heneka MT, Sastre M, et al. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I kappa B alpha induction and block of NF kappa B and iNOS activation [J]. J Neurochem, 2010, 88(2): 494-501.

(下转第 85 页)

李祥磊,孙秀萍. C57BL/6J、BALB/c、ICR 品系小鼠学习记忆能力的行为学差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 63-69.

Li XL, Sun XP. Evaluation of learning-memory ability in C57BL/6J, BALB/c, and ICR mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 63-69.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.010

C57BL/6J、BALB/c、ICR 品系小鼠学习记忆能力的行为学差异

李祥磊,孙秀萍*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,国家中医药管理局人类动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 比较 C57BL/6J、BALB/c、ICR 品系小鼠学习记忆能力的行为学差异。**方法** 按品系将 10 周雄性 C57BL/6J、BALB/c、ICR 品系小鼠分为三组,每组 10 只,进行旷场实验、Barnes 迷宫实验、Y 迷宫实验、条件恐惧实验,比较三个品系小鼠学习记忆能力。**结果** 旷场实验,C57BL/6J 组总移动距离、大移动距离、速度、中央区移动距离百分比、中央区停留时间少于 ICR 组和 BALB/c 组,差异具有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.05$);C57BL/6J 组小运动移动距离多于 ICR 组和 BALB/c 组,差异具有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.01$);Barnes 迷宫实验测试阶段,C57BL/6J 组与 ICR 组在目标区域停留时间大于 BALB/c 组,差异具有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。Y 迷宫实验三组小鼠自发转换率,进臂停留时间与次数等差异均无统计学意义。条件恐惧实验中三组小鼠僵直时间百分比差异均无统计学意义。**结论** 三个品系中,C57BL/6J 小鼠自发活动最低,旷场实验焦虑水平最高,空间参考记忆优于 ICR 组和 BALB/c 小鼠,三个品系空间工作记忆及空间识别记忆无显著性差异。

【关键词】 小鼠;行为学实验;学习记忆

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0063-07

Evaluation of learning-memory ability in C57BL/6J, BALB/c, and ICR mice

LI Xianglei, SUN Xiuping*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC), and Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To compare learning-memory ability in C57BL/6J, BALB/c, and ICR mice. **Methods** Adult male mice were divided into three groups with 10 C57BL/6J, BALB/c, or ICR mice in each. The learning-memory ability of the three mice strains was evaluated via the open-field test, Barnes maze test, Y-maze test, and fear-conditioning test. **Results** In the open-field test, the total distance, largest distance, velocity, center distance/total distance, and the center time were significantly lower in the C57BL/6J group compared with the BALB/c and ICR groups ($P<0.01$, $P<$

【基金项目】 国家科技重大专项课题(2017ZX09301029)。

【作者简介】 李祥磊(1992—)男,本科,研究方向:行为学。E-mail: 335745944@qq.com

【通信作者】 孙秀萍(1974—)女,博士,研究方向:行为学。E-mail: supering_sun@126.com

0.05)。The small distance in the C57BL/6J group was significantly greater than that in the BALB/c and ICR groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。In the Barnes maze test, the latency to reach the entry zone was significantly lower in the C57BL/6J group compared with the BALB/c and ICR groups in the learning stage on the second and fourth days ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。In the test phase, the time spent in the entry zone in the C57BL/6J and ICR groups was significantly greater than that in the BALB/c group ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。In the Y maze test, we found no significant differences in spontaneous alternations, time spent in each arm, and number of arm visits among the three groups。In the fear-conditioning test, the percentage of freezing time among the three groups was not significantly different。**Conclusions** In the open-field test, C57BL/6J mice exhibited the lowest spontaneous activity level and the highest anxiety level。In the maze test, spatial reference memory in C57BL/6J mice was superior to that of BALB/c and ICR mice。There were no statistically significant differences in spatial working memory or spatial recognition memory among the 3 strains。

【Keywords】 mice; behavioral experiments; learning-memory

基于体积小,生殖周期短,易观察且基因组与人类基因组高度同源等优势,实验小鼠是复制人类疾病和研究基因功能的首选动物模型^[1]。在生命科学,尤其是基础医学、制药等研究领域广泛应用^[2-4]。实验小鼠在培育过程中已分为多个品系,根据基因纯合程度,可分为近交系、封闭群、杂交群三类^[5]。C57BL/6J、BALB/c 小鼠属于近交系,ICR 小鼠属于封闭群,这三个品系小鼠在神经精神等各类疾病模型中广泛应用^[6]。不同品系的小鼠,由于遗传背景等差异,其生物学特点和行为表型差异也较大^[7],导致在同一模型的建立中敏感度不同,三个品系小鼠在学习记忆能力方面研究数据又较少。故本文对这三个品系小鼠学习记忆的本底行为进行研究,以期为神经精神疾病动物模型的品系选择提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 周龄体重 25~30 g SPF 级雄性 C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠各 10 只,购于北京华阜康科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。实验在中国医学科学院医学实验动物研究所行为学分析平台进行[SYXK(京)2018-0019],实验经本单位动物伦理批准(QC18006),实验动物的使用依据 3R 原则给予人道的关怀,动物设施室内温度 23℃~25℃,相对湿度 55%±10%。维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。

1.2 主要仪器

EthoVision XT9(Noldus,荷兰);条件恐惧实验系统(MED,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠按品系分为 3 组,每组 10 只。开始实验前将动物放入检测间适应 1 h,实验在 9:00~17:00 之间进行,每轮实验后均需清除仪器内残留气味,使用 75% 乙醇擦拭检测仪器。

1.3.2 旷场实验

旷场为边长 50 cm,高 30 cm 正方体开口测试箱,测试箱顶部安装摄像头,监测动物的活动状态并将动物的行为信息采集传输至计算机系统,图像采集分析系统为 EthoVision XT 9。测试箱分为中央区、过渡区、边缘区三个区域,中央区中心点为动物投放点,每只小鼠在测试箱内自由探索,记录小鼠 5 min 内的移动距离、速度、中央区移动距离百分比、中央区停留时间、大运动(速度大于 6.6 cm/s)移动距离及小运动(速度介于 2.2 cm/s~6.6 cm/s 之间)移动距离。

1.3.3 Barnes 迷宫实验

Barnes 迷宫为直径 88 cm 圆盘,为避免灯光反射,设置为哑光材质,圆盘上有等距分布在圆盘边缘的 12 个直径 5 cm 圆洞,圆盘下固定逃避盒,规格为 15 cm×6 cm×6 cm(长×宽×高),起始盒规格为 10 cm×10 cm。实验图像记录分析软件为 EthoVision XT 9。实验时伴有噪音刺激(噪音录音,80 db)和强光刺激(直射灯,250 lux)。在 Barnes 迷宫周围放置几何空间标记物,方便小鼠空间定位,检测间人员位置与物品摆放位置不变。实验分为适应期、学习期和测试期。适应期,在迷宫中心放置实验小鼠,扣上起始盒 10 s 后,开启噪音,随之撤掉起始盒,人为干预引导小鼠行动路径,进入目标洞后,立即关闭噪音。小鼠在逃避盒适应 3 min 后取出,适应期为 1 d;学习期,在迷宫中心放置实验小鼠,扣上起始盒 10 s 后开启噪音,随之撤掉起始盒,开始实验。

每只实验小鼠一次训练 3 min, 一天训练 3 次, 共 4 d。3 min 内小鼠进入目标洞, 程序停止, 看作训练成功, 小鼠从起始盒到进入目标洞时间为潜伏期 (latency), 如若 3 min 内没有进入目标洞, 潜伏期为 3 min。无论是否训练成功, 均需将实验小鼠放置在逃避盒里, 适应环境 1 min; 测试期, 撤除逃避盒, 实验小鼠测试 1 次, 时间为 1.5 min, 操作方法同学习阶段, 共测试 1 d, 记录目标洞潜伏期和停留时间。

1.3.4 Y 迷宫实验

Y 迷宫规格为 30 cm×8 cm×15 cm (长×宽×高) 的三个长方体拼接而成, 角度互为 120°, 背景为白色。图像采集分析系统为 EthoVision XT 9。Y 迷宫基于动物喜爱探索新环境的特性而设计, 在迷宫内贴有 3 个不同颜色, 形状标记物, 帮助小鼠进行空间定位, 检测间人员位置与物品摆放位置不变。

自发性交替实验 实验周期为 1 d, 将小鼠面壁放入起始区, 时间为 5 min, 记录小鼠探索轨迹。小鼠在 Y 迷宫中, 倾向于交替探索三个不同臂 (分为 A、B、C 三个臂), 例如 ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA 等作为实际转换次数 (alternation), BCB、ACA、BAB 等不计入, 探索进臂总次数减两次作为最大转换数。并计算转换率 = [正确交替反应次数 / (N-2)] × 100%。

新异臂探索实验一周后进行新异臂探索实验。将 Y 迷宫三个臂分别命名为起始臂 (start)、新异臂 (novel)、其他臂 (other)。该实验分为训练期和测试期。训练期将新异臂用隔板挡住, 将小鼠放入起始臂, 在起始臂和其他臂中自由活动 5 min, 训练结束后归笼。15 min 后进行测试期实验。测试期将新异臂挡板抽离, 将小鼠放置起始臂, 在三个臂中自由活动 5 min, 记录每只小鼠在各个臂停留时间和次数。

1.3.5 条件恐惧实验

实验硬件由测试箱, 控制器, 电击与声音装置构成, 计算机, 红外摄像头。实验周期为 4 d, 适应期 1 d, 测试箱内放入实验小鼠, 适应 10 min, 不给予电击和声音刺激, 学习期 1 d, 适应 3 min, 确定三个品系小鼠之间的基线。后对小鼠训练 5 个循环, 每个训练包括声音刺激 (70 db, 5000 Hz, 30 s, 条件性刺激) 以及最后 1 s 电击刺激 (0.5 mA, 1 s, 非条件性刺激), 每轮训练间隔 30 s~60 s, 训练结束 30 s 后取出实验小鼠; 场景性条件恐惧实验 1 d, 不给予电击和声音刺激, 将小鼠放入测试箱 5 min, 结束后让

小鼠在箱内停留 30 s; 线索性条件恐惧实验 1 d, 改变测试箱气味与环境条件, 只给予声音刺激, 操作方法同训练期。统计三个阶段实验小鼠的僵直时间。僵直是啮齿类动物的一种防御行为, 通常呈现出较为刻板的蹲伏及摇摆, 除正常呼吸外没有其他肌肉活动, 表达动物的恐惧行为^[8]。除实验动物正常呼吸外, 所处静止状态的时间, 是僵直时间判断的标准, 它表明小鼠对条件恐惧刺激的记忆程度^[9]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。实验结果以平均数±标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 形式表示。采用单因素方差分析进行多组间比较, 当多组间有差异时, 两两比较采用 Fisher's LSD post hoc 多重比较方法。P < 0.05 认为具有统计学显著性差异。

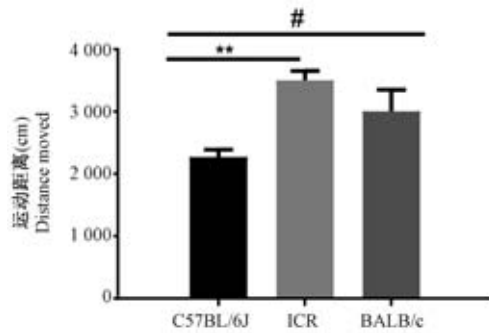
2 结果

2.1 C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠旷场实验数据比较

如图 1、2 所示, C57BL/6J 组小鼠移动距离与速度少于 ICR 组小鼠和 BALB/c 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), ICR 组和 BALB/c 组小鼠差异无统计学意义; 如图 3 所示, C57BL/6J 组小鼠大运动移动距离少于 ICR 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), C57BL/6J 组小鼠大运动移动距离少于 BALB/c 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), ICR 组和 BALB/c 组小鼠, 但差异无统计学意义; 如图 4 所示, C57BL/6J 组小鼠小运动移动距离多于 ICR 组小鼠和 BALB/c 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), ICR 组和 BALB/c 组小鼠差异无统计学意义。如图 5 所示, C57BL/6J 组小鼠在中央区移动距离百分比最小、ICR 组小鼠其次, BALB/c 组小鼠最大, 三组小鼠两两比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 如图 6 所示, C57BL/6J 组小鼠在中央区停留时间少于 BALB/c 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), ICR 组小鼠在中央区停留时间少于 BALB/c 组小鼠, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), C57BL/6J 和 ICR 组小鼠差异无统计学意义。

2.2 C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠 Barnes 迷宫实验数据比较

如图 7 所示, 在学习期, C57BL/6J 组小鼠进洞潜伏期最短, 其次是 ICR 组小鼠, BALB/c 组小鼠最长,



注: C57BL/6J 组与 ICR 组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; C57BL/6J 组与 BALB/c 组相比, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$; ICR 组与 BALB/c 组相比, §§ $P < 0.01$, § $P < 0.05$ 。下同。

图 1 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验运动距离的表现

Note. C57BL/6J group compared with ICR group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. C57BL/6J group compared with BALB/c group, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$. ICR group compared with BALB/c group, §§ $P < 0.01$, § $P < 0.05$. The same as below.

Figure 1 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the open field experiment

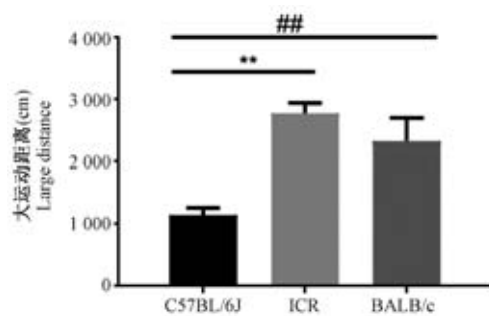


图 2 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验大运动距离的表现

Figure 2 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in large range of movement in an open field experiment

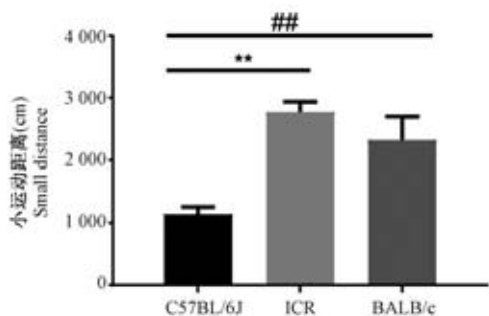


图 3 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验小运动距离的表现

Figure 3 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in small distance of movement in an open field experiment

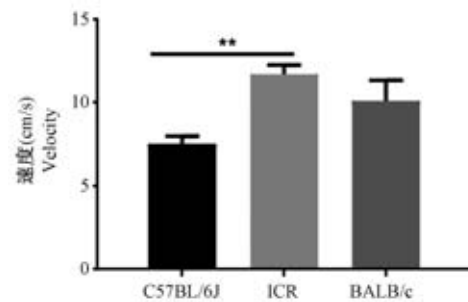


图 4 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验运动速度的表现

Figure 4 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the field experiment

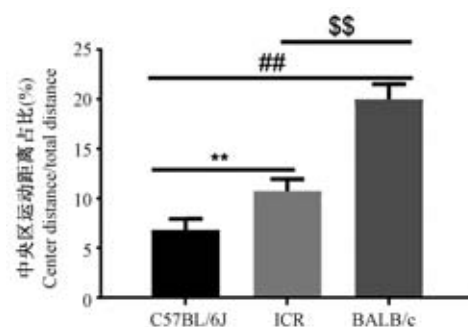


图 5 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验中央区运动距离占总距离的百分比的表现

Figure 5 The performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the percentage of the total distance in the central area of the open field experiment

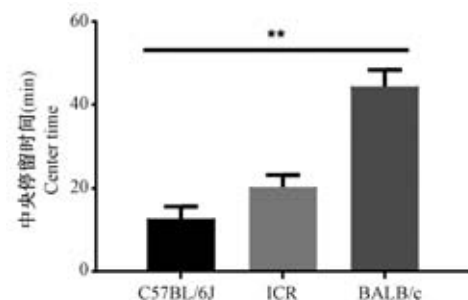


图 6 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在旷场实验中央区停留时间的表现

Figure 6 Residence time of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the central area of the empty field experiment

三组小鼠第 1 天与第 3 天进洞潜伏期差异无统计学意义,第 2 天与第 4 天进洞潜伏期差异具有统计学意义($P < 0.05$);如图 8 所示,在测试期, C57BL/6J 组小鼠在目标区探索时间多于 ICR 组小鼠,差异无统计学意义, C57BL/6J 组小鼠在目标区探索时间多于 BALB/c 组小鼠,差异具有统计学意义($P < 0.01$), ICR

组小鼠在目标区探索时间多于 BALB/c 组小鼠,但差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠 Y 迷宫实验数据比较

如图 9、图 10 和图 11 所示,三组小鼠在自发转换率,进臂停留时间与次数等实验数据差异均无统计学意义。

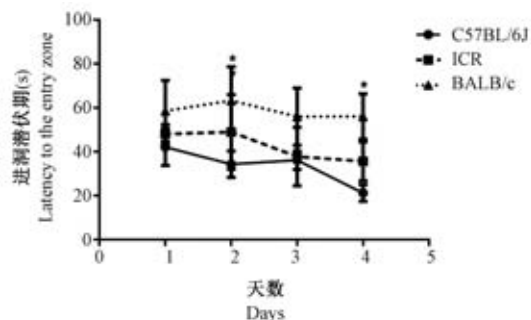


图 7 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在 Barnes 迷宫实验进洞潜伏期的表现

Figure 7 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in Barnes maze experiment during burrow incubation period

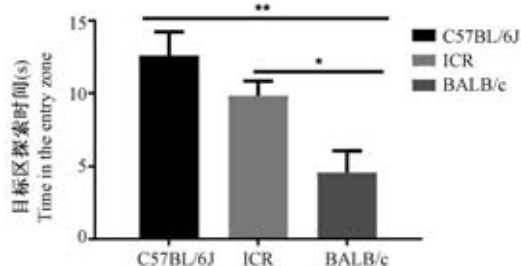


图 8 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在 Barnes 迷宫实验目标去探索时间的表现

Figure 8 Performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice during Barnes maze experiment

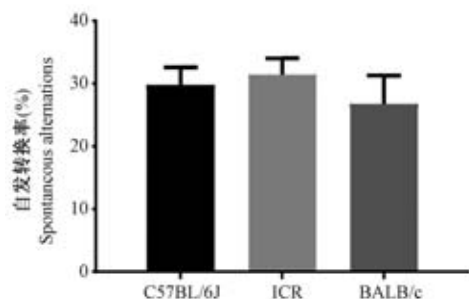


图 9 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在 Y 迷宫自发性交替实验转换率的表现

Figure 9 Spontaneous alternation rates of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the Y maze spontaneous alternating experiment

2.4 C57BL/6J、BALB/c、ICR 小鼠条件恐惧实验数据比较

如图 12 所示为学习期前的适应期,图中僵直时间,作为三组小鼠的基线,差异无统计学意义;如图 13、图 14 和图 15 所示,三组小鼠在条件恐惧实验学习期、场景性条件恐惧和线索性条件恐惧僵直时间,差异均无统计学意义。

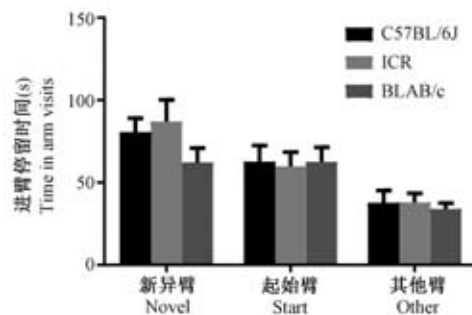


图 10 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在 Y 迷宫新异臂探索实验进臂停留时间的表现

Figure 10 Time in arm visits of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the Y maze experiment

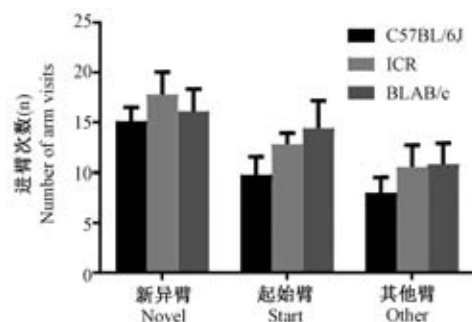


图 11 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在 Y 迷宫新异臂探索实验进臂次数的表现

Figure 11 The performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the experiment of Y maze new different arm exploration

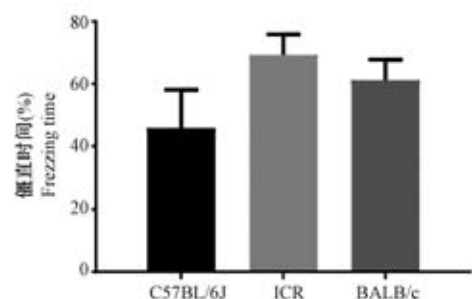


图 12 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在条件恐惧实验学习期的僵直时间基线

Figure 12 Rigid time baseline of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice during conditioned fear experimental learning period

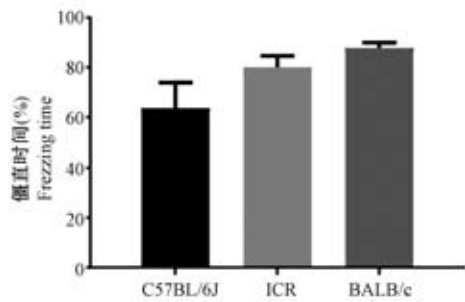


图 13 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在条件恐惧学习期的僵直时间表现

Figure 13 Freezing time of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice during conditioned fear learning period

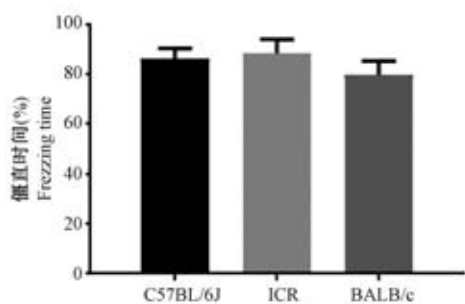


图 14 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在场景性条件恐惧实验的僵直时间表现

Figure 14 Freezing time performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the contextual fear conditioning experiment

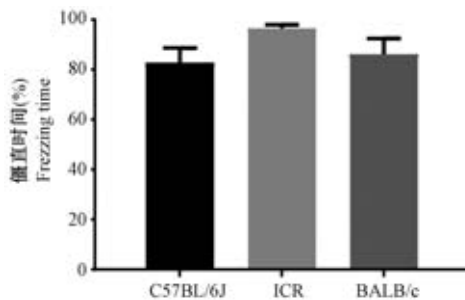


图 15 C57BL/6J、ICR、BALB/c 小鼠在线索性条件恐惧实验的僵直时间表现

Figure 15 Freezing time performance of C57BL/6J, ICR, and BALB/c mice in the cued fear conditioning experiment

3 讨论

旷场实验因其操作相对简单、应激刺激小的特点,用于检测动物自发活动以及焦虑水平,在神经精神疾病和神经精神药理方面应用最多^[10]。本实验结果表明,C57BL/6J 小鼠运动距离、运动速度及运动时间均显著低于其他两组小鼠,说明其自发活

动低于 ICR 与 BALB/c 小鼠。基于啮齿类动物的趋触性,将实验区域分为边缘区和中央区,发现 C57BL/6J 小鼠中央区运动距离与中央区时间均显著低于 ICR 与 BALB/c 小鼠,说明在旷场实验中其焦虑水平高于 ICR 与 BALB/c 小鼠,与李腾飞实验结果一致^[11]。但也与另一些文献^[12-13]报道不一致。可能与行为学测试方法不同等有关。需要结合高架十字迷宫实验、埋珠实验等进行进一步分析。每一种行为学检测方法都需要实验动物进行运动,旷场实验虽然不能测试小鼠学习记忆能力,但可以测试小鼠的运动能力是否正常,以免影响后续实验结果。

1979 年美国学者 Carol A Barnes 发明 Barnes 迷宫实验,用于检测海马依赖的空间参考记忆^[14]。与水迷宫实验利用啮齿类动物惧怕水的特性不同,Barnes 迷宫利用啮齿类动物爱探索且避光的特性而设计,对动物应激刺激较小。实验不需要水源,将动物放在空旷的 Barnes 迷宫中央,通过使用躁声与强光作为刺激手段,促使动物寻找目标洞。学习期结果表明,C57BL/6J 小鼠在进洞潜伏期方面优于 ICR 小鼠和 BALB/c 小鼠;测试期结果表明,C57BL/6J 小鼠在目标区停留时间方面优于 ICR 小鼠和 BALB/c 小鼠。综合结果,C57BL/6J 小鼠展示出的空间参考记忆能力优于 ICR 小鼠和 BALB/c 小鼠。与刘雪芹等的^[15]水迷宫测试结果一致。

Y 迷宫由 Dellu 等发明,针对啮齿类动物,Y 迷宫自发性交替实验研究空间工作记忆能力,利用啮齿类动物喜爱探索新环境,动物每次转换探索方向时都要记住前一次探索的方向,而下一次就会探索另一方向^[16]。自发性交替转换率越高,说明动物的工作记忆能力越强。Y 迷宫新异臂探索实验研究空间识别记忆能力,同样利用啮齿类动物喜爱探索新环境,倾向于探索新异臂的偏好。对新异臂探索时间越长,次数越多,说明动物的空间识别记忆能力越强。实验中三组小鼠在自发性交替实验的转换率,没有显著性差异,提示三组小鼠在空间工作记忆没有显著性差异;新异臂探索实验中,进入各臂的次数与时间上均没有显著差异,表明在空间识别记忆能力上三组小鼠没有显著性差异。

条件性恐惧实验三组小鼠僵直时间的基线没有显著差异;三组小鼠在学习阶段、场景性条件恐惧测试和线索性恐惧测试中,僵直时间均没有显著性差异,三个测试阶段没有显著差异,提示三组小

鼠在条件性恐惧记忆的生成没有显著差异性。

本研究比较了三个品系小鼠焦虑水平、空间参考记忆能力、空间工作记忆能力以及条件性恐惧记忆能力。丰富了实验小鼠的生物学特性数据,对动物实验中小鼠品系选择提供参考依据;尤其为神经精神疾病动物模型的品系选择提供数据支撑。

参考文献:

- [1] 施俊巍, 邹洪, 金玫蕾. 用适应性实验对 ICR、BALB/c 和 C57BL/6 小鼠探索行为及记忆能力的评价 [J]. 动物学研究, 2008, 29 (1): 49-55.
- [2] 刘友平, 刘田, 毕航, 等. 品系、性别和生物节律对小鼠旷场实验的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2014, 35 (5): 634-638.
- [3] Shu GW, Yang TM, Wang CY, et al. Gastrodin stimulates anticancer immune response and represses transplanted H22 hepatic ascitic tumor cell growth: Involvement of NF- κ B signaling activation in CD4⁺T cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 269(3): 270-279.
- [4] Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: What does it mean [J]. Ann N Y Acad Sci, 1969, 159(3): 852-859.
- [5] 翟国元, 秦建, 刘杨, 等. 实验动物及其在科学研究中的应用 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2018, 48(7): 14-16.
- [6] 魏秀岩. 油酰胺对孤养模型小鼠行为学改变的影响及机制探讨 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [7] Upchurch M, Wehner J. Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance [J]. Behav genet, 1988, 18(1): 55-68.
- [8] 赵永才, 吴耿安, 黄亨奋. 运动与记忆: N-甲基-D-天冬氨酸受体和谷氨酸在学习记忆中的作用 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(37): 101-103.
- [9] 张娟, 黄伏连, 钟小林, 等. 大鼠场景性恐惧记忆再激活过程中海马 HDAC2 的表达变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(2): 154-160.
- [10] 买文丽, 刘行海. 空场实验诸影响因素对啮齿动物行为的影响 [J]. 四川解剖学杂志, 2009, 17(2): 36-37.
- [11] 李腾飞, 孙秀萍, 石哲, 等. 不同品系小鼠在三种常见抑郁检测方法中的行为学表现 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (8): 20-23.
- [12] Pilotto E, Frizziero L, Daniele AR, et al. Early OCT angiography changes of type 1 CNV in exudative AMD treated with anti-VEGF [J]. Br J Ophthalmol, 2019, 103(1): 67-71.
- [13] Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL, et al. Anxiety responses in BALB/c, c57 and CD-1 mice exposed to a novel open space test [J]. Behav Brain Res, 2010, 207(2): 402-417.
- [14] Ardeshiri MR, Hosseinmardi N, Akbari E. The basolateral amygdala orexin 1 and 2 receptors' involvement in modulating spatial reference memory [J]. Brain Res, 2019, 1704: 16-25.
- [15] 刘雪芹, 李睿, 崔佳彬, 等. 自主运动后 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠学习记忆行为学指标的分析比较 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18): 2661-2667.
- [16] Kraeuter AK, Guest PC, Samyai Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1916: 105-111.

[收稿日期] 2020-02-12

武晏屹,田硕,苗明三. 基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 70-75.

Wu YY, Tian S, Miao MS. Analysis of the use of animal models of chloasma based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 70-75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.011

基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析

武晏屹,田硕,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450000)

【摘要】 目的 分析黄褐斑动物模型应用现状,为探讨黄褐斑理论知识、探究新疗法、研制新药物打好动物实验基础,提高治疗黄褐斑的科学性、严谨性、安全性。**方法** 以“黄褐斑”为主题,检索中国知网、万方数据库、维普数据库中关于黄褐斑的实验研究文献,时间范围分别为“1960-2019、1990-2019、1979-2019”。归纳分析文献中动物模型的应用、相关指标的检测等。**结果** 共筛选出104篇实验研究文献,以采用雌性KM小鼠复制黄褐斑动物模型最为常见,其造模方法以紫外线照射最为常用;造模时间以30 d最为常见,最短不少于7 d;给药时间大多分布在28~31 d。在指标的测量中,可分为表观指标、生化指标及病理指标,以生化指标的检测为主,侧重于皮肤及血清中氧化相关因子的变化。**结论** 目前对黄褐斑的实验研究及理论探讨与黄褐斑发病现状严重失衡,应增加动物实验研究;建立复合动物模型、具有中医病症特点的动物模型是未来重要发展方向。此外,对药物作用机制的研究仅局限于体内、体表氧化与抗氧化失衡,忽略内分泌失调等相关因素,随着体表“神经-内分泌-免疫”(NEI)网络的提出与深入研究,探讨在黄褐斑的治疗中,是否可以通过调节体内、体表NEI网络而发挥整体、局部疗效可能是未来重要研究方向,值得进一步深入探讨。

【关键词】 黄褐斑;模型;数据挖掘

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)08-0070-06

Analysis of the use of animal models of chloasma based on data mining

WU Yanyi, TIAN Shuo, MIAO Mingsan*

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Objective To analyze the use of animal models of chloasma, and to lay a good foundation for future animal studies designed to explore the basic biology of chloasma, test new therapies, and develop new drugs, so as to generate scientific, rigorous, and safe treatment approach for chloasma. **Methods** The CNKI, Wanfang and Weipu databases were searched for all publication pertaining to the key word “chloasma”, with the following time ranges: 1960 - 2019, 1990 - 2019, and 1979 - 2019. The application of animal models in the literature and the detection of relevant indicators were analyzed and summarized. **Results** A total of 104 experimental studies were retrieved. Female KunMing (KM) mouse models of chloasma were the most common, and UV irradiation was the most common method used to induce chloasma. The most common experimental duration was 30 days, and all of the studies lasted for at least 7 days. Drugs were typically administered for between 28 and 31 days. The indicators that were assessed can be divided into apparent indicators, biochemical indicators, and pathological indicators. Assessment of biochemical indicators was most common,

【基金项目】 国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11);国家国际合作基地(2016-65);河南中医药大学创新创业团队(2019CXY003)。

【作者简介】 武晏屹,女,硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail: wuyanyi111@163.com

【通信作者】 苗明三,男,教授,博士,主要从事中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

primarily focusing on changes in oxidation-related factors in the skin and serum. **Conclusions** There is a serious imbalance between experimental research and theoretical discussions related to chloasma and the clinical need for chloasma treatments. The establishment of a compound animal model and an animal model with TCM disease characteristics will be an important focus for future research. Existing studies of the mechanisms of drug activity are limited to imbalances in the body, surface oxidation, and anti-oxidation, and ignore factors related to endocrine disorders. In-depth studies of body surface NEI networks to identify factors that can alter body properties may be an important research direction for developing new treatments for chloasma, whether they exhibit full or partial effectiveness.

【Keywords】 chloasma; model; data mining

黄褐斑又称“妊娠斑”、“肝斑”、“黧黑斑”、“蝴蝶斑”等^[1],由于皮肤黑色素的增加,形成褐色或黑色斑点,是一种色素沉着性、损容性皮肤病,多发于面部,尤以眼眶、两颊、额部、口角等处最为常见^[2]。其发病机制复杂,虽无明显不适,但对患者的容貌、生活质量等有一定的影响^[3]。在多因素影响下,黄褐斑的发病率呈逐年上升趋势^[4],虽治疗方法多样,仍欠缺有效手段,是临床上典型的易诊难治性疾病。黄褐斑理论研究、新药筛选、中医疗法研究,与黄褐斑动物实验的开展息息相关,故成功复制动物模型、选择适宜的给药方式及时间、合理检测相关指标是顺利进行动物实验的必备条件。同时文献计量既能体现学科量化的趋势,又有助于科研人员了解相关领域的研究现状^[5],故本文以数据挖掘为主要手段,以“黄褐斑”为主题,检索中国知网、万方数据库、维普数据库中关于黄褐斑的实验研究文献,对已开展的黄褐斑模型应用现状进行综述、分析,为黄褐斑实验研究提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 文献筛选

1.1.1 检索标准

以“黄褐斑”为主题,检索中国知网、万方数据库、维普数据库中关于黄褐斑的实验研究文献,时间范围分别为“1960-2019、1990-2019、1979-2019”。文献来源为“全部期刊”。

1.1.2 纳入标准

为动物实验研究文献。

1.1.3 排除标准

排除临床研究文献、细胞实验、动物用药、临床用药举偶或临床验方、研究进展等文献;重复的动物实验研究报导只纳入一次。

1.2 方法

详细阅读文献,对文献中涉及的实验动物品种、模型复制方法、造模时间、给药方式及时间、指

标检测等逐一输入 Excel 2013 建立数据库,进一步对数据库进行分析并绘制相关图形进行展示。

2 结果

2.1 实验动物应用概况

在中国知网数据库、万方数据库、维普数据库进行检索,以主题为“黄褐斑”,时间范围分别为“1960-2019、1990-2019、1979-2019”,文献来源为“全部期刊”共筛选出 104 篇黄褐斑动物实验研究文献,在复制动物模型时,以大鼠、小鼠、豚鼠最为常见,以小鼠应用居多,占 52.88%;其次为豚鼠,占比 35.58%。其中尤以 KM 小鼠应用最多,占比 44.23%,详情见表 1。此外,在动物性别的选择上也有显著差异,其中 82.69% 文献选用雌性动物,仅有 13.46% 的文献选用雄性动物。

表 1 黄褐斑模型实验动物品种分布表

Table 1 Experimental animal models of chloasma

动物品种 Animal varieties	文献数 Document number	百分比 Percentage
KM 小鼠 KM mouse	46	44.23%
豚鼠 Guinea pig	37	35.58%
SD 大鼠 SD rats	11	10.58%
ICR 小鼠 ICR mouse	4	3.85%
小鼠 Mouse	3	2.88%
NIH 小鼠 NIH mouse	1	0.96%
Wister 大鼠 Wister rats	1	0.96%
BALB/C-nu/nu 裸小鼠	1	0.96%
BALB/C-nu/nu nude mouse		

2.2 模型复制方法概况

2.2.1 造模方法

目前常用的黄褐斑的造模方法大致可分 6 种:黄体酮全身攻击、紫外线照射、黄体酮全身攻击联合紫外线照射、紫外线照射联合雌二醇局部涂抹、紫外线照射联合束缚,以及可在联合造模的基础上增加动物慢性束缚来制备肝郁气滞型黄褐斑模型。通过分析纳入的 104 篇实验研究文献,以紫外线照射最为常用(43.27%),其次为采用黄体酮全身攻击联合紫外线照射的方法复制模型(28.85%),详

情见表 2。

在使用紫外线复制模型时,紫外线波长全部在 275~320 nm 之间,属于中波紫外线,以 320 nm 应用最多,占 58.02%。紫外线的照射时长与模型是否成功密切相关,其照射时间多在 20~60 min 之间,最短为每天照射 30 s,最长为 60 min。其中以照射 60 min 最为常见,占 37.04%,详情见图 1。

在黄体酮全身攻击时,所选用动物品种的不同,其肌肉注射的量也有区别,大鼠(3 篇)黄体酮注射量常用剂量为 25 mg/kg,小鼠(29 篇)常用剂量为 20 mg/kg;豚鼠(4 篇)常用剂量为 20 mg/kg,最大剂量达到 100 mg/kg。

2.2.2 造模时间

黄褐斑是一种慢性、获得性色素增加性皮肤病,故无论采用何种造模方法,造模时间相对较长,以 30 d 最为常见(48.08%),最长可达 60 d,最短不少于 7 d 成模,详情见表 3。

2.3 给药及时间

临床上主要采用中药内服及外用、针灸等方法治疗黄褐斑,分析纳入的实验研究文献可知,其

表 2 黄褐斑造模方法统计表

Table 2 Statistical analysis of chloasma modeling methods

造模方法 Methods	文献数 Document number	百分比 Percentage
紫外线照射 Ultraviolet irradiation	45	43.27%
黄体酮注射液+紫外线照射 Progesterone injection+Ultraviolet irradiation	30	28.85%
黄体酮注射液 Progesterone injection	23	22.12%
紫外线照射+束缚 Ultraviolet irradiation+bound	3	2.88%
黄体酮注射液+紫外线照射+束缚 Progesterone injection+Ultraviolet irradiation+bound	2	1.92%
紫外线照射+雌二醇局部涂抹 Ultraviolet irradiation+Estradiol is applied topically	1	0.96%

给药方法主要涉及灌胃、局部外用、局部激光照射或配合激光导入药物、皮下注射及针灸等。其给药方式也可分为造模后给药、造模前给药、边造模边给药,其中造模后给药应用相对较多(54.81%),详情见表 4。在验证疗效的过程中,常以临床上公认的药物为阳性对照药,其中内服给药多选用维生素 C(25.96%)、百消丹等(3.85%);外用给药则以氢醌乳膏(18.27%)应用最多,此外也有文献采用氨甲环酸注射液、壬二酸等。无论外用还是内服,其给药时间大多分布在 28~31 d(58.65%),最长给药 56 d,最短为脉冲照射等,仅给药 1 次,详情见表 5。

2.4 实验相关检测指标概况

对于黄褐斑指标的检测,可分为表观指标、生化指标、病理指标,此外也有文献对动物血液流变学特点的变化进行检测。不同的指标从表观、微观及分子生物角度分析药物的作用效果及相关作用机制。所分析的文献中,有 75.96% 对动物皮肤、血清或肝中的相关生化指标进行分析;75.00% 的文献对病变局部皮肤状况进行微观定性或定量分析;仅有 33.65% 的文献对皮肤局部的表观状态进行积分统计分析。详情见图 2。

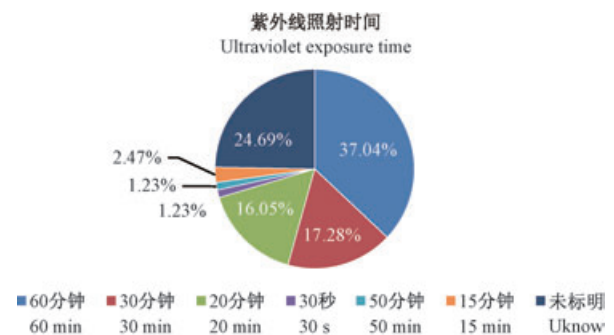


图 1 紫外线照射时间分布图

Figure 1 UV exposure time

表 3 黄褐斑模型造模时间统计表

Table 3 Statistical analysis of the duration of chloasma model experimental periods

造模时间 Building time	文献数 Document number	百分比 Percentage	造模时间 Building time	文献数 Document number	百分比 Percentage
30 d	50	48.08%	36 d	1	0.96%
28 d	21	20.19%	35 d	1	0.96%
21 d	11	10.58%	31 d	1	0.96%
56 d	6	5.77%	20 d	1	0.96%
45 d	6	5.77%	14 d	1	0.96%
60 d	2	1.92%	10 d	1	0.96%
50 d	1	0.96%	7 d	1	0.96%

2.4.1 表观指标

表观指标可直观、清晰的反映药物对黄褐斑的疗效,在疗效的判断中占有重要地位^[6]。有 33.65% 的文献对动物局部皮肤进行观察并统计,主要观察皮肤是否出现红斑、增厚、脱屑、干燥、点状斑块、皮肤变硬、结痂、晒伤等情况,并对色斑面积、色斑颜色进行积分统计。

2.4.2 病理指标

病理是诊断的金标准,可从微观角度反映具体条件下疾病的本质,揭示组织异质性,反映组织病理生理学的微观变化,可进一步揭露局部变化^[7-8]。有 75.00% 的文献通过 HE 染色、Masson-Fontana 染色及免疫组化等方法对局部皮肤情况进行定性、定量分析。对局部皮肤中黑色素细胞数目、脂褐质的含量、黑色素颗粒的面积、基底细胞层黑色素的沉着情况等进行定量分析;对表皮层中角质层是否增厚、胶原纤维是否变性、是否有炎症细胞浸润、毛细血管是否增多等情况进行定性分析。

2.4.3 生化指标

生化指标则能够从分子水平反映病症变化,是组织、器官机能状态变化的一个重要指标,同时能够进一步揭露药物作用机制。已有的实验研究文献对生化指标的检测共可分为 3 个方面:血清、皮肤匀浆、肝匀浆。

皮肤为黄褐斑病灶局部,其指标变化可揭示证型和微观量化之间的某种联系,可更加准确的反应局部病灶的病变情况及愈合情况,为探讨药物局部作用机制提供基础。已有的实验研究文献中,有 75.96% 的文献测量皮肤匀浆中相关生化因子,共涉及 20 种生化因子,其中以测量皮肤匀浆中的超氧化物歧化酶、丙二醛最为常见。

表 4 给药方式分布表

Table 4 Types of drugs administered

给药方式	文献数	百分比
Delivery way	Document number	Percentage
造模后给药	57	54.81%
After modeling		
边造模边给药	46	44.23%
At the same time		
造模前给药	1	0.96%
Before the modeling		

表 5 给药时长分布表

Table 5 Duration of drug administration

给药时长	文献数	百分比
Delivery time	Document number	Percentage
28~31 d	61	58.65%
1~27 d	25	24.04%
32~56 d	18	17.31%

中医认为黄褐斑病在皮,其病在内,与机体整体功能状态密切相关,从其发病机制来看,多与机体内分泌失调、氧化与抗氧化失衡等有关,故在判断疗效及探讨机制时,也常以血清中相关指标的变化来反应整体疗效与机制。已有的实验研究文献中,有 30.61% 的文献测量血清中相关指标,包括氧化功能相关指标超氧化物歧化酶、丙二醛等,内分泌相关指标雌二醇、睾酮、孕酮等。

黄褐斑在中医学上又称“肝斑”,其疏泄功能异常是导致黄褐斑发病的主要原因。此外,肝作为性激素结合球蛋白的主要合成场所,参与性腺激素的合成、转化和灭活;肝也是生物体内重要的氧化还原反应场所^[9],而氧化还原失衡及内分泌是黄褐斑主要的发病因素,故肝功能的调节在黄褐斑的发生、发展、加重上起着至关重要的作用。已有的实验研究文献中,有 34.69% 的文献涉及肝匀浆中相关生化因子的测量,主要包括超氧化物歧化酶、丙二醛、酪氨酸酶等。详情见表 6。

3 讨论

黄褐斑是一种色素代谢障碍性皮肤病^[10],与内分泌失调、紫外线照射、皮肤屏障功能障碍、氧化与抗氧化失衡等密切相关^[11-14],目前治疗黄褐斑的方法包括口服预防紫外线辐射、局部增白剂、化学换肤、光疗法和激光疗法等^[15]。从中医角度来讲,黄褐斑以血脉不通为标,面部及体表色素沉着为主症,与肝、脾、肾三大脏器息息相关,此外黄褐斑与血瘀密切相关,素有“有斑必有瘀,无瘀不成斑”之说^[16]。故中医常以瘀、肝、脾、肾、肺论治^[17-20],采用穴位注射、中药面膜、或联合舒肝颗粒进行治疗^[21-22],也有学者根据月经周期不同时期阴阳、气

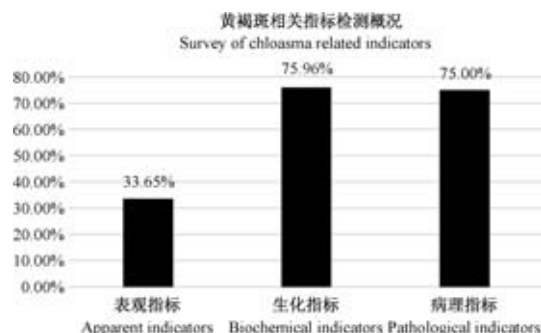


图 2 黄褐斑相关指标检测概况

Figure 2 Overview of the detection of chloasma-related indicators

表 6 黄褐斑动物模型检测指标分布表
Table 6 Index of animal models of chloasma

检测部位 Measuring position	检测指标 Measurements
皮肤相关指标 Indicators in the skin	超氧化物歧化酶(SOD, 52.88%); 丙二醛(MDA, 49.04%); 酪氨酸酶(TYR, 25.96%); 一氧化氮(NO, 7.69%); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 5.77%); 过氧化脂质(LPO, 3.85%); 总抗氧化能力、一氧化氮合酶、羟脯氨酸(T-AOC、NOS、HYP, 1.92%); 前列腺素 E2、干细胞因子、核因子 E2 相关因子 2、 α -黑色素细胞刺激素、乙酰化酶 p300、环加氧酶-2、c-myc、锌、铜、黑素皮质素受体 1、过氧化氢酶、酪氨酸酶相关蛋白 2、雌二醇(PGE2、SCF、N γ F2、 α -MSH、P300HAT、COX-2、Zn、Cu、MC1R、CAT、TRP-2, 0.96%)
血清相关指标 Indicators in serum	超氧化物歧化酶(SOD, 19.23%); 丙二醛(MDA, 18.27%); 酪氨酸酶(TYR, 8.65%); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 4.81%); 雌二醇、睾酮(E2、T, 1.92%); 孕酮、一氧化氮(P、NO, 0.96%)
脏器相关指标 Indicators in organs	超氧化物歧化酶(SOD, 26.92%); 丙二醛(MDA, 25.00%); 酪氨酸酶(TYR, 11.54%); 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 5.77%); 一氧化氮(NO, 3.85%); 过氧化脂质(LPO, 2.88%); 乙酰化酶 p300、环加氧酶-2、核因子 E2 相关因子 2、锌、铜、总抗氧化能力(P300HAT、COX-2、N γ F2、Zn、Cu、T-AOC, 0.96%)

血的变化规律,采用周期序贯的疗法^[23]。此外也有采用中西医结合如口服红花逍遥片联合外用氢醌乳膏等方法^[24]。虽临床上治疗黄褐斑的方法多样,但其效果不尽人意,仍是典型的易诊难治性疾病,且疗程绵长,易反复^[25]。故寻找安全、高效的治疗方法仍是各医家不断努力的方向,而动物实验是探讨黄褐斑理论知识、探究新疗法、研制新药物的基础,打好动物实验基础,可提高治疗黄褐斑的科学性、严谨性、安全性。

黄褐斑动物模型的建立至今无国内外公认的标准^[26],本文通过分析中国知网、万方数据库、维普数据库中黄褐斑相关文献发现,黄褐斑实验研究性文献仅有 104 篇文献,与黄褐斑的高发病率、高波及率、易诊难治性、易复发性有较大出入。在模型复制方面,目前尚未发现与黄褐斑发病过程完全相同的动物自发性黄褐斑模型,在实验研究中多采用鼠类动物进行复制,目前选用的实验动物主要有 KM 小鼠、豚鼠等。鼠类动物与人类皮肤结构相近,且廉价易得,是复制黄褐斑模型的理想动物。小鼠以其皮肤角化程度较低、皮肤及角质层厚度较小^[27],更易受到紫外线照射的影响,且廉价易得,容易饲养^[28-29],是研究者的首选动物。此外,豚鼠皮肤结构与厚度与人的皮肤极为相似^[30],其皮肤黑色素细胞和黑色素体的分布形态与人类更为相似^[31],但其饲养成本相对较高、对饲养环境要求严格,指标检测相关的抗体相对不足^[32-33],因此其应用频率仅次于 KM 小鼠。结合黄褐斑在临床上具有显著的性别差异^[34],女性雌、孕激素变化水平明显较男性活跃,故而发病率较高,因此在实验研究中多选用雌性实验动物,以更加贴近临床实际。

复制黄褐斑动物模型主要是通过增加机体黑色素的产生及沉着,导致黄褐斑的形成。经统计发现目前已有的实验研究中,以单纯的紫外线照射复

制黄褐斑模型最为普遍,其操作简便,模型成功率较高,基本符合黄褐斑临床症状,但结合黄褐斑发病机制及影响因素,单纯紫外线照射与发病过程存在较大差异,因此该方法更加适合药效评价性实验。黄体酮注射液+紫外线照射法结合内分泌因素与紫外因素,更加贴近黄褐斑多因素致病发病过程,是黄褐斑发病机制及药物作用机制研究的较理想模型。在紫外线波长的选择中,多采用中波紫外线(275~320 nm),能够增加黑色素细胞的受体活性,其中以 320 nm 最为常见;不同动物照射时间略有差异,小鼠皮肤角质层相对较薄,照射时间可适当缩短,豚鼠、大鼠则可适当延长,但一般集中在 30~60 min 左右;不同动物黄体酮注射量也有一定差异,大鼠常注射 25 mg/kg,小鼠及豚鼠的注射量则集中在 20 mg/kg。造模时间以 30 d 最为常见,最短不少于 7 d。其给药方式以造模后给药应用相对较多,该给药方式更加符合临床实际。此外,黄褐斑属于慢性皮肤病,病程相对较长,给药时间大多分布在 28~31 d。在阳性对照药的选择上,内服给药以维生素 C 较为常见,外用则以局部涂抹氢醌乳膏为多。在指标的测量中,仅有 33.65% 的文献涉及表观指标的分析,表观指标是对药效的直观反映,应在药效评价中占有重要地位;75.96% 的文献以生化指标为主,侧重于皮肤、血清、肝匀浆中的超氧化物歧化酶、丙二醛等氧化相关指标含量的变化,现代研究分析,黄褐斑的发病与内分泌的失衡密切相关,但仅 6 篇文献涉及激素相关指标,并以探讨血清中含量的变化为主;71.43% 的文献涉及局部皮肤病理变化的检测,通过定量与定性观察,从微观角度评价药物疗效及潜在作用机制。

综上所述,对黄褐斑的实验研究及理论探讨与黄褐斑发病现状严重失衡,未来应增加动物实验研究,以进一步明确黄褐斑的发病机理、药物疗效及

作用机制,为临床研究提供确凿的理论依据。在模型复制方面,已有的模型制备方法缺乏中医致病因素的干预,缺少不同证型的黄褐斑动物模型建立方法,因此建立复合动物模型、具有中医病症特点的动物模型是未来重要的研究方向。目前对药物作用机制的研究仅局限于体内、体表氧化与抗氧化失衡,忽略内分泌失调等相关因素。此外,大量理论探讨及实验研究发现,黄褐斑与体内 NEI 网络的紊乱密切相关^[35],随着体表 NEI 网络的提出与深入研究,皮肤作为人体最大的器官,同样存在着分泌、代谢黄褐斑相关生化因子,具备相应的受体,如 α -黑色素细胞刺激素、白介素-1,白介素-6、一氧化氮、孕酮、雌二醇等^[36],故在黄褐斑的治疗中,是否通过调节体内、体表 NEI 网络而发挥整体、局部疗效可能是未来重要研究方向,值得进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 曾培, 闫敏, 崔鑫. 崔鑫临床应用妇科得生丸验案举隅 [J]. 湖北中医杂志, 2019, 41(5): 25-27.
- [2] 黄亚华, 叶向阳. 氨甲环酸联合微针针灸治疗黄褐斑的临床疗效 [J]. 江苏医药, 2019, 45(10): 1044-1047.
- [3] 于川. 刮痧疗法治疗肝郁气滞型黄褐斑的疗效观察 [J]. 上海针灸杂志, 2019, 38(9): 1027-1029.
- [4] 庾馨予, 严莉, 陈冬平, 等. 针刺结合中药熏蒸治疗黄褐斑体会 [J]. 江西中医药, 2018, 49(6): 65-67.
- [5] 张薇, 胡波, 易铭, 等. 中医药治疗黄褐斑的文献计量分析 [J]. 中国药房, 2017, 28(17): 2422-2425.
- [6] 苗明三, 付珍娜, 曹利华. 黄褐斑动物模型制备规范(草案) [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 649-653.
- [7] 金佳熹, 周冰玉, 李柳蓉, 等. 新鲜山药提取物对小鼠胃溃疡的预防作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 8-13.
- [8] 何宏星, 陈洁, 黄芳, 等. 高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 648-653.
- [9] 许明明. 肝肠间氧化应激的相关性及食品的调节作用 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2016.
- [10] 张金芳, 王强, 张立欣, 等. 田淑霄巧用麻黄治黄褐斑经验介绍 [J]. 新中医, 2019, 51(11): 331-333.
- [11] Lyons A, Stoll J, Moy R. A randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face study of the efficacy of topical epidermal growth factor for the treatment of melasma [J]. J Drugs Dermatol, 2018, 17(9): 970-973.
- [12] Becker S, Schiekofe C, Vogt T, et al. Melasma: An update on the clinical picture, treatment, and prevention [J]. Hautarzt, 2017, 68(2): 120-126.
- [13] Gao YL, Jia XX, Wang M, et al. Melanocyte activation and skin barrier disruption induced in melasma patients after 1064nm Nd: YAG laser treatment [J]. Lasers Med Sci, 2019, 34(4): 767-771.
- [14] Liao CF, Liao HC, Lee M, et al. Intense pulsed light combined with alpha-hydroxy acid peels in treatment of chloasma [J]. Int J Clin Exp Med, 2018, 11(11): 12474-12480.
- [15] Zhou LL, Baibergenova A. Melasma: systematic review of the systemic treatments [J]. Int J Dermatol, 2017, 56(9): 902-908.
- [16] 杜桂营. 桂枝茯苓丸加味治疗女性黄褐斑疗效观察 [J]. 山西中医, 2018, 34(3): 17-18.
- [17] 卢永屹. 从瘀论治黄褐斑的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(7): 176-178.
- [18] 郭开元, 李俊慧, 高明周, 等. 从肝论治黄褐斑的理论认识和临床实践进展 [J]. 山东中医杂志, 2018, 37(2): 167-169.
- [19] 刘恒炼, 夏敏, 王加俊, 等. 段亚亭教授从脾论治女性黄褐斑的学术经验 [J]. 河北中医, 2018, 40(2): 170-173.
- [20] 常忠莲, 常中飞, 韦薇, 等. 从肺论治黄褐斑临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2867-2868.
- [21] 李艳青, 陈璐, 杨琦, 等. 舒肝颗粒辅助治疗黄褐斑伴月经不调的临床观察 [J]. 中国药房, 2016, 27(26): 3692-3694.
- [22] 朱进, 叶伟, 李宗超. 穴位注射丹参联合中药面膜及左旋维生素 C 外用治疗黄褐斑的临床观察 [J]. 中国药房, 2014, 25(23): 2162-2164.
- [23] 邓梦琪, 林爽, 丁慧. 丁慧根据“月经周期”论治女性黄褐斑 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4643-4645.
- [24] 季艳芳, 张玉红. 红花逍遥片联合维生素 C 及 2% 氢醌乳膏治疗黄褐斑的疗效观察 [J]. 中国药房, 2013, 24(40): 3784-3785.
- [25] 金亚蓓, 郑利芳, 孙占玲. 穴位埋线改善肝郁气滞型绝经前期女性黄褐斑临床症状及机制研究 [J]. 中国针灸, 2019, 39(9): 932-935.
- [26] 付珍娜, 白明, 翟凤霞, 等. 基于中西医临床病症特点的黄褐斑动物模型分析 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 208-211.
- [27] 秦永红. 氨氯地平经皮给药对缺血随意皮瓣成活的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2007.
- [28] 孟星君, 李孝东, 刘俊, 等. C57BL/6J 小鼠黑色素瘤肺转移模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 139-144.
- [29] 陈尔净, 刘晓伟, 卢丹, 等. 小鼠痤疮模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 117-121.
- [30] 张晓宇. 橙皮素胶束处方工艺优化及其作为护肤品的安全功效评价 [D]. 晋中: 山西医科大学, 2016.
- [31] 郑爽. 松茸液体发酵产物的美白作用的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [32] 余曼, 李炳, 李涛, 等. 豚鼠频闪光诱导性近视和形觉剥夺性近视外侧膝状体多巴胺含量的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 86-90.
- [33] 吴瑞, 李秀敏, 苗明三. 基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 89-93.
- [34] 张金芳, 王强, 张立欣, 等. 田淑霄巧用麻黄治黄褐斑经验介绍 [J]. 新中医, 2019, 51(11): 331-333.
- [35] 田硕, 苗明三. 基于神经-内分泌-免疫网络探讨中药外用作用机制——“三微调平衡” [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 6-12.
- [36] 吕中茜, 郭义. 反观中医临床提出“皮肤是人的第三大脑” [J]. 江西中医药, 2016, 47(7): 11-13, 19.

[收稿日期] 2019-12-28

张诗渊. miR-181b 调控 Mex3B 蛋白对动脉粥样硬化斑块形成及分子机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 76-85.

Zhang SY. miR-181b regulates atherosclerotic plaque formation by targeting Mex3B expression [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 76-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.012

miR-181b 调控 Mex3B 蛋白对动脉粥样硬化斑块形成及分子机制研究

张诗渊*

(南昌大学第二附属医院超声科, 南昌 330006)

【摘要】 目的 探讨 miR-181b 靶向调控肌肉过量蛋白-3B (muscle excess protein-3, Mex3B) 的表达在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 斑块的形成及其分子作用机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分成正常组、模型组、对照组和实验组。对照组和实验组分别尾静脉注射 miR-181b-inhibitor-NC、miR-181b-inhibitor 的混合液, 正常组、模型组注射等剂量的生理盐水; 注射完毕 24 h 后将维生素 D3 以 600000 U/kg 的剂量一次性腹腔注射进模型组、对照组、实验组大鼠体内后, 每日以 100 g 高脂饲料喂养构建 AS 模型大鼠, 正常组大鼠始终以等量基础饲料喂养。喂养 60 d 后, 对大鼠进行颈动脉超声检查, 测量管腔动脉后壁内膜-中层厚度 (intima-media thickness of the posterior wall of the artery, IMT) 和斑块面积 (square, S) 参数。RT-PCR 检测各组 miR-181b 和 Mex3B 蛋白的 mRNA 的表达; Western blot 检测各组 Mex3B 蛋白的表达水平; 荧光素酶报告基因分析 miR-181b 和 Mex3B 的调控关系。**结果** 与正常组相比, 模型组大鼠颈动脉内膜增生明显, 颈动脉 IMT、斑块 S、miR-181b 和 Mex3B 蛋白的 mRNA 和蛋白的表达明显增大, 与模型组相比, 实验组大鼠颈动脉内膜增生明显减小, 颈动脉 IMT、斑块 S、miR-181b 和 Mex3B 蛋白的 mRNA 和蛋白的表达明显减小, 差异均具有统计意义 ($P < 0.05$)。荧光素酶报告基因分析证明 miR-181b 与 Mex3B 靶向结合。**结论** miR-181b 通过靶向调控 Mex3B 的表达参与动脉粥样硬化中的炎症应激反应, 抑制 miR-181b 的表达能明显抑制炎症反应, 抑制 AS 中斑块的形成。

【关键词】 miR-181b; 动脉粥样硬化; 肌肉过量蛋白-3B; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0076-10

miR-181b regulates atherosclerotic plaque formation by targeting Mex3B expression

ZHANG Shiyuan*

(Ultrasonic Department the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

【Abstract】 Objective We investigated the role of miR-181b in regulating atherosclerotic plaque formation in atherosclerosis (AS) by targeting Mex3B expression. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, model group, control group, and experimental group. A mixture of miR-181b-inhibitor-NC and miR-181b-inhibitor was injected into the control group and the experimental group, while rats in the normal group and model group received the same amount of saline. At 24 hours after the injection, a 600,000 U/kg dose of vitamin D3 was intraperitoneally injected into the rats in the model group, control group, and experimental group, which then received a daily 100 g high-fat diet. The rats in the normal group always received the same amount of a basic diet. After 60 days of feeding, the rats underwent carotid ultrasound examination to measure the intima-media thickness of the posterior wall of the artery (IMT) and the plaque area (square, S). RT-PCR was used to detect miR-181b expression and the mRNA of Mex3B

protein, and a Western blot was used to detect the expression of Mex3B protein. A luciferase reporter gene analysis was used to examine the regulatory relationship between miR-181b and Mex3B. **Results** Compared with the normal group, carotid intima hyperplasia was evident in the model group, and we observed significant increases in carotid IMT, plaque S, miR-181b and Mex3B mRNA expression, and Mex3B protein expression ($P < 0.05$). Compared with the model group, carotid intima hyperplasia was evident in the experimental group, and we observed significant decreases in carotid IMT, plaque S, miR-181b and Mex3B mRNA expression, and Mex3B protein expression ($P < 0.05$). Luciferase reporter gene analysis demonstrated that miR-181b targets Mex3B. **Conclusions** miR-181b is involved in the inflammatory stress response in atherosclerosis by targeting Mex3B expression. Inhibition of miR-181b expression may significantly inhibit inflammatory responses and reduce plaque formation in AS.

[Keywords] miR-181b; atherosclerosis; Mex3B; rat

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作为一种具有潜在致命性的累及全身动脉脂质代谢紊乱的慢性炎症疾病,是造成心脑血管恶性事件的主要原因之一,其中颈动脉为多发部位。颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)是缺血性脑卒中的危险因素。研究表明^[1] AS 是一种炎症性疾病,其发生、发展与动脉内膜中的脂质沉积密切相关,但目前 AS 的病理生理机制尚未完全明确。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一种内源性的具有调控功能的非编码 RNA。研究表明^[2] 多种 miRNA 参与调节心脑血管系统中细胞的增殖、分化、凋亡、衰老等细胞生物学行为。Li 等^[3] 研究表明 miRNA-21 增强血管平滑肌的细胞增殖,推动 AS 的进程。Gao 等^[4] 报道血浆中的 miR-126 和 miR-143 的含量可以作为动脉粥样硬化的新型生物标志物。近来 miR-181b 与 AS 的关系引起关注。Sun 等^[5] 研究表明 miR-181b 调控 Notch1 通路影响 AS 血管内皮组织的炎性反应。Zhong 等^[6] 研究证实 miR-181b 联合 STAT3 通路影响 AS 细胞模型的凋亡率,但关于 miR-181b 对 AS 斑块形成的作用机制未见报道。肌肉过量蛋白-3(muscle excess protein-3, Mex3)作为早期胚胎发展中的一种 RNA 结合蛋白,可以抑制细胞内蛋白的表达。研究表明^[7] 在四种人类 Mex3 蛋白中, Mex3B 的表达与机体炎症应激密切相关。本研究通过维生素 D3 联合高脂饮食法构建动脉粥样硬化大鼠模型,探讨 miR-181b 和 Mex3B 对动脉粥样硬化斑块形成的调控机制,以期为临床研究提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

7~8 周无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 SD 大鼠 40 只, (200±20) g, 由江西中

医药大学医学实验动物科学部提供[SCXK(赣)2018-0003], 动物实验在南昌大学生命科学研究院[SYXK(赣)2015-0002]进行;依照南昌大学医学院医学实验动物科学部实验动物管理办法, 室温 21℃~25℃ 下, 湿度维持在 60% 左右, 自然光照、标准饲料、自由饮水、单笼饲养一周后用于实验。所有动物福利和实验程序均严格遵守我院的《实验动物的护理和使用指南》及相关道德规范, 本研究中涉及动物的使用及操作按 3R 原则给与动物人道的关怀, 并经本院实验动物管理伦理委员会批准(IACUC(赣)-2019-076)。

1.2 主要试剂与仪器

miR-181b 抑制物 miR-181b-inhibitor 及 miR-181b 抑制物阴性对照 miR-181b-inhibitor-NC 由上海吉玛技术有限公司设计完成。

维生素 D3 注射液(上海通用药业有限公司, 国药准字: H31022404, 规格: 1 mL: 7.5 mg, 以维生素 D3 计); 高脂饲料(81.3%基础饲料+10%猪油+5%白糖+3%胆固醇+0.5%胆酸钠+0.2%丙基硫氧嘧啶, 总能量为 6 kcal/g。等级: A 级)由我院医学实验动物中心提供。

Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂(德国 QIAGEN 公司); 全蛋白抽提试剂盒(日本 TOYOBO 公司); PBS 缓冲溶液、双荧光素酶测定试剂盒、苏木精伊红(hematoxylin eosin, E)试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotein, MMP-9)抗体(美国 Abcam 公司); 麻醉剂、Mex3B 抗体(美国 Jackson 公司); 反转录试剂盒、Western blot 试剂盒(美国 sigma 公司); 油红 O 染色试剂盒(美国 R&D 公司); 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl

transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 试剂盒 (美国 Amresco 公司); 增强化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 化学发光显色试剂盒 (美国 Millipore 公司)。

YJ-875 A 医用净化工作台、高速低温离心机 (北京六一仪器厂); LIOOS600T 荧光显微镜 (日本尼康公司); Bio-rad 凝胶成像系统 (Bio-rad 公司); -80℃ 深冷冰箱 (德国维根斯公司); Leica RM2135 组织切片机 (德国 Leica 公司); RT-PCR 仪 (美国 Palo Alto 公司); LOGIQ7 型彩色多普勒超声成像系统 (美国 GE 公司); Vevo 2100 高分辨率小动物超声仪 (加拿大 Visual Sonic 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动脉粥样硬化动物模型构建及实验分组

将 40 只 SD 大鼠随机分成 4 组, 每组 10 只, 分别为: 正常组、模型组、miR-181b-inhibitor-NC 组 (对照组) 和 miR-181b-inhibitor 组 (实验组)。

准确量取 2.5 μ L 的 Lipofectamine™ RNAiMAX 分别与 9 μ L 的 miR-181b-inhibitor-NC 和 miR-181b-inhibitor 混合均匀, 37℃ 下静置 2 h。通过尾静脉分别注射 7 μ L 混合液到对照组和实验组动物体内, 注射速度维持在 2 μ L/min, 留针时长 5 min, 正常组和模型组注射等剂量的生理盐水, 注射完毕 24 h 后, 模型组、对照组、实验组大鼠采用维生素 D3 联合高脂饮食法构建动脉粥样硬化模型^[8]。具体操作如下: 将维生素 D3 以 600000 U/kg 的剂量一次性腹腔注射进大鼠体内后每日以 100 g 高脂饲料喂养, 正常组大鼠始终以等量基础饲料喂养。饮水、光照、温度恒定不变。

1.3.2 Vevo 2100 超声仪对各组大鼠的动脉检测

喂养 60 d 后, 颈动脉超声检查观察各组大鼠颈动脉内膜是否光滑、有无增生或者斑块、斑块部位、大小和回声点。沿血管长轴测量管腔动脉后壁内膜-中层厚度 (intima-media thickness of the posterior wall of the artery, IMT); 将探头在中点采样, 维持血流和声速小于 60 度, 测量大鼠血流动力学参数指标斑块面积 (square, S) 等。

1.3.3 HE 染色、油红 O 染色检测各组大鼠 AS 病理改变

超声检查完毕后, 大鼠禁食 12 h, 麻醉处理并在显微镜下无菌剥离各组大鼠的全主动脉, 剔除外膜的脂肪组织, 80% 的组织标本进行液氮封存, 20% 的组织标本, 56℃ 水浴 1 h, 生理盐水冲洗 10 min, 10%

甲醛溶液固定 1 h, 石蜡包埋 10 min, 切片, 蒸馏水清洗 3 次, 依次进行 HE、油红 O 染色光镜下观察 AS 病变程度。

1.3.4 TUNEL 染色检测各组大鼠中动脉组织的细胞凋亡

取出 10% 各组组织标本, 10% 甲醛固定, 二甲苯浸洗两次, 梯度乙醇浸洗 5 min, 风干后 3% 双氧水-甲醇浸泡 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 然后 4℃ 预冷乙醇上进行如下操作: 0.1% TritonX-100、0.1% 缓冲液处理 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min, 加入 TUNNEL 反应混合液, 加封口膜在暗湿盒中反应 1 h, 温度 37℃, PBS 漂洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察。

1.3.5 免疫组化检测各组大鼠中动脉组织中 IL-6、TNF- α 和 MMP-9 的表达

取出 10% 各组组织标本, 常规方法固定, 包埋, 切片, 脱蜡, 修复, 双氧水封闭, 加入一抗, 维持 4℃ 孵育过夜, 次日加入二抗, 室温孵育 30 min, 清洗。加适量显色剂, 苏木素复染, PBS 清洗, 脱水, 中性树脂胶封片, 显微镜下观察并记录实验结果; 染色评判标准以肿瘤细胞细胞膜和细胞质内出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。

1.3.6 qRT-PCR 检测 miR-181b 和 Mex3B 蛋白的 mRNA 的表达

取出 10% 各组组织标本, 提取标本中细胞的总 RNA, 法测定 RNA 浓度和检测 RNA 完整性后^[9], 上 RT-PCR 仪检测。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因相对表达量; 每个样本独立重复测量 3 次, 引物序列详见表 1。

表 1 基因的引物序列
Table 1 Primer Sequences

基因 Gene	序列 Sequence
miR-181b	F: 5'-TGACGTCAGTGGAGTTGTACG-3'
	R: 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
Mex3B	F: 5'-TCTCTGATGCTGTGCTGCT-3'
	R: 5'-CGTGGAACGGTTGAGGTAGT-3'
GAPDH	F: 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3'
	R: 5'-AACTGCATCATCGTTGTCATACA-3'

1.3.7 荧光素酶报告基因分析

取出 10% 各组组织标本, 采用 TRIzol 提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA, PCR 扩增 Mex3B 的 3'-非翻译区, 并构建 pGL3 (pGL3-Mex3B-WT) 载体, 利用 TaKaRa 技术在 pGL3 (pGL3-Mex3B-WT) 上 miR-181b 结合位点上构建 (pGL3-Mex3B-MUT) 载体, 利用转染试剂 Lipofectamine 2000 将报告载体、mimic

control、miR-181b mimic 转染至人主动脉内皮细胞 (human aortic endothelial cells, HAEC) 中, 转染成功 48 h 后, 用双重荧光素酶报告分析系统 (dual-luciferase reporter assay system) 检测不同重组质粒的荧光活性从而评估启动子活性检测相对荧光素酶活性, 报告基因活性为萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶活性值。

1.3.8 Western blot 检测各组标本中 Mex3B、IL-6、TNF- α 和 MMP-9 蛋白的表达

取出 10% 各组组织标本, 采用常规方法提取目标蛋白 Mex3B、IL-6、TNF- α 和 MMP-9, 经 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后, 准确量取 50 μ g, 电泳结束后, 将样品蛋白经湿转法转至 PVDF 转膜上, 加入 10% 脱脂奶粉封闭 3 h, 以 (1:1500) 比例稀释后, 维持 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤加入二抗孵育 3 h, 增强化学发光 ELC 显色 30 min, 经曝光、显影、定影后, 以 GAPDH 为内参来表示蛋白的表达水平。

1.4 统计学方法

本实验采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析, 采用 Graphpad 5.0 软件作图, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的颈动脉超声检测结果

各组大鼠颈动脉超声结果如图 1 所示, 与正常组相比, 模型组大鼠颈动脉内膜增生明显, 颈动脉 IMT 明显增大, 斑块 S 明显增大; 与模型组相比, 实验组大鼠颈动脉内膜增生明显减小, 颈动脉 IMT 明显减小, 斑块 S 明显减小, 差异均具有统计意义 ($P <$

0.05); 模型组和对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

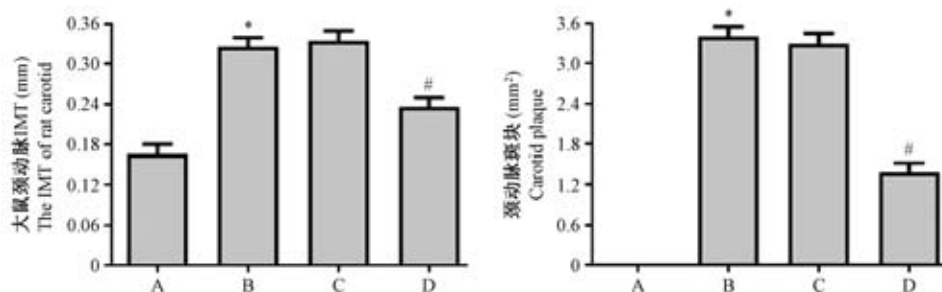
2.2 各组大鼠动脉病理改变检测结果

HE 染色结果如图 2 所示, 正常组动脉结构完整, 胞核性状规则, 内膜、中膜以及外膜界限清晰; 模型组动脉管壁明显增厚, 僵硬增加, 管腔内可见粥样或者纤维斑块, 内膜可见白色条纹或者黄白色斑块; 对照组动脉内膜细胞增厚明显, 泡沫状的细胞大量填充; 实验组动脉壁弹性明显恢复, 内膜细胞性状较模型组明显好转, 泡沫细胞的数量明显减少, 管腔内脂斑沉积明显减少。

油红 O 染色结果如图 3 所示, 正常组主动脉结构完整, 未见斑块形成; 模型组血管壁质地脆, 弹性较差, 主动脉内膜中可见大量破损的泡沫细胞, 在动脉壁的中膜、内膜均产生明显的大小不等的 AS 斑块, 管腔明显变窄小; 对照组斑块脂质沉积明显, 斑片状或点状的斑块向管腔凸起。实验组的动脉壁斑块分布范围明显减小, 内膜基本没有泡沫细胞, 血管的弹性有所改善。

2.3 免疫组化检测各组大鼠 AS 中斑块的稳定

MMP-9 是 AS 的形成和维系斑块稳定性中起关键性调节作用的酶。本研究中采用免疫组化和 Western blot 法检测各组大鼠动脉中 MMP-9 的表达情况, 结果如图 4 所示, 与正常组相比, 模型组大鼠 MMP-9 的表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 实验组大鼠动脉中 MMP-9 的表达明显下降, 差异均具有统计意义 ($P < 0.05$); 模型组和对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。推断抑制 miR-181b 的表达, 能抑制 MMP-9 的表达, 减小 AS 中斑块的形成。

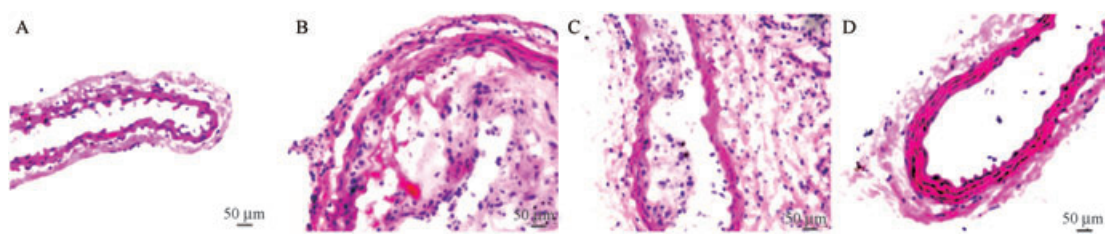


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠颈动脉超声结果 ($n = 10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

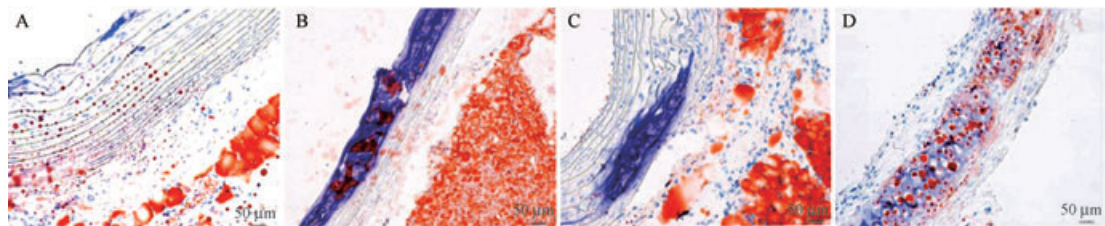
Figure 1 Carotid ultrasound results of rats in each group



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。
图 2 HE 染色检测 AS 病理改变($n=10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group.

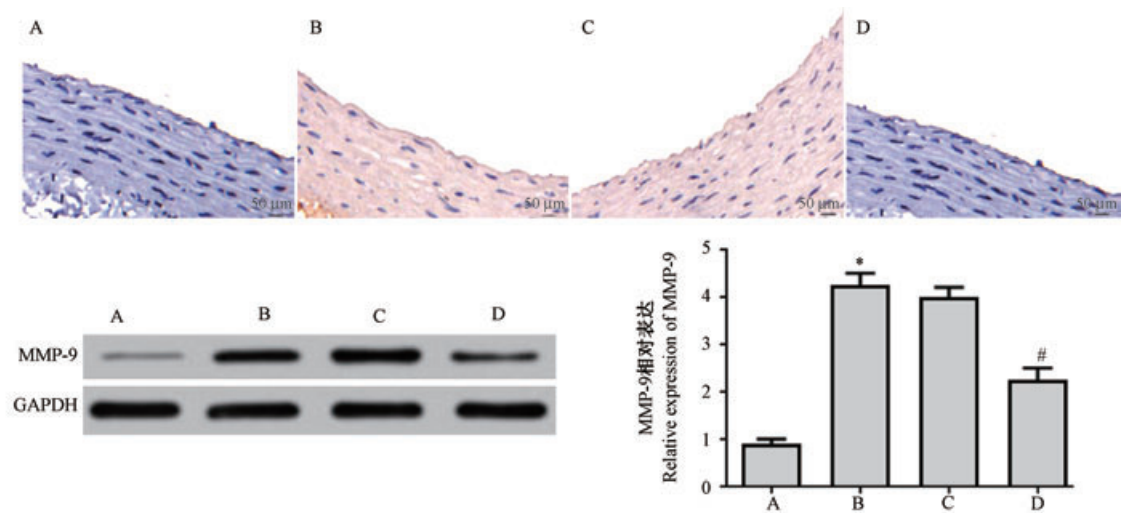
Figure 2 HE staining to detect AS pathological changes



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。
图 3 油红 O 染色检测各组大鼠动脉壁上的脂质沉积($n=10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group.

Figure 3 Oil red O staining to detect lipid deposition on the arterial wall of each group of rats



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 免疫组化和 Western blot 法检测各组大鼠动脉中 MMP-9 的表达($n=10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 4 Detection the expression of MMP-9 in the arteries of rats in each group by immunohistochemistry and Western blot

2.4 TUNEL 染色检测各组大鼠动脉细胞的凋亡

TUNEL 染色结果如图 5 所示,与正常组相比,模型组大鼠动脉上的细胞凋亡率明显上升($P<0.05$);与模型组相比,实验组大鼠动脉上的细胞凋亡率明显下降,差异均具有统计意义($P<0.05$);模型组和对照组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 各组大鼠动脉中 IL-6 和 TNF- α 的表达

IL-6 和 TNF- α 作为在 AS 中炎症反应的代表因子,本研究中采用免疫组化和 Western blot 法检测各组大鼠动脉中 IL-6 和 TNF- α 的表达情况,结果如图 6、图 7 所示,与正常组相比,模型组大鼠 IL-6 和 TNF- α 的表达明显升高,与模型组相比,实验组大鼠动脉中 IL-6 和 TNF- α 的表达明显下降,差异均具有统计意义($P<0.05$),模型组和对照组相比,无明显差异,不具有统计学意义($P>0.05$)。

2.6 Western blot 检测各组大鼠动脉中 Mex3B 蛋白的表达

Western blot 法检测各组大鼠动脉中蛋白 Mex3B 的表达水平如图 8 所示;与正常组相比,模型组动脉中蛋白 Mex3B 的表达明显升高($P<0.05$),与模型组相比,实验组大鼠动脉中蛋白 Mex3B 的表达明显下降($P<0.05$)。模型组和对照组相比,无明显差异,不具有统计学意义($P>0.05$)。

2.7 qRT-PCR 检测各组大鼠动脉中 miR-181b 和 Mex3B 蛋白的 mRNA 的表达

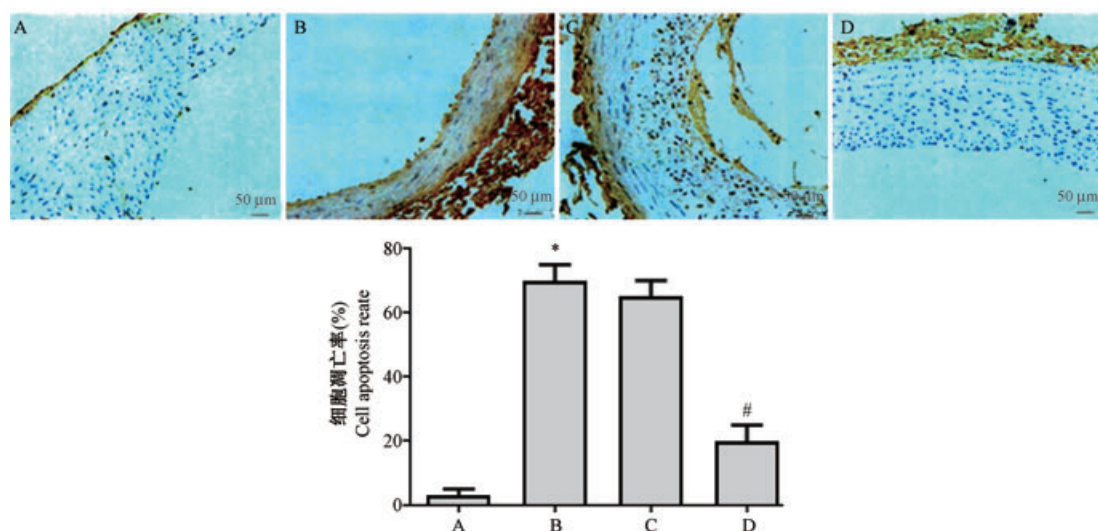
本研究中采用 RT-PCR 检测各组大鼠动脉中 miR-181b 和 Mex3B 的 mRNA 表达水平,如图 9 所示;与正常组比较,模型组 miR-181b 和 Mex3B 的 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$);转染 miR-181b-inhibitor 后,与模型组和对照组相比,实验组 miR-181b 和 Mex3B 的 mRNA 表达水平明显降低($P<0.05$);模型组和对照组相比,无明显差异,不具有统计学意义($P>0.05$)。

2.8 荧光素酶报告基因分析结果

miR-181b 和 Mex3B 蛋白的表达和 mRNA 的变化趋势一致,通过生物信息网站(www.microrna.org)上查询 miR-181b 和 Mex3B 存在结合位点(如图 10 示)。采用双荧光素酶报告基因分析来观察两者的关系结果如图 11 示,转染 miR-181b 后,野生型 Mex3B 的荧光素酶活性被抑制($P<0.05$),突变型 Mex3B 的荧光素酶活性无明显变化($P>0.05$),说明 miR-181b 与 Mex3B 具有靶向调控关系。

3 讨论

AS 能通过引起动脉血管管腔狭窄、循环血流量减少等进而导致机体器官因供血不足而出现各种功能障碍。因 AS 而造成的易损斑块、血栓脱落当

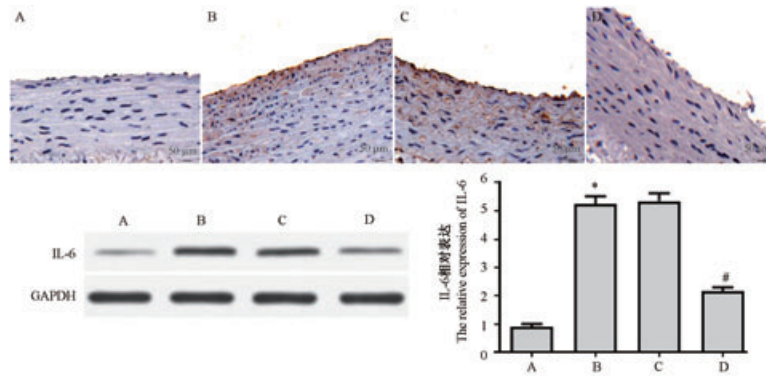


注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 5 TUNEL 染色检测各组细胞的凋亡($n=10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 5 TUNEL staining to detect cell apoptosis in each group

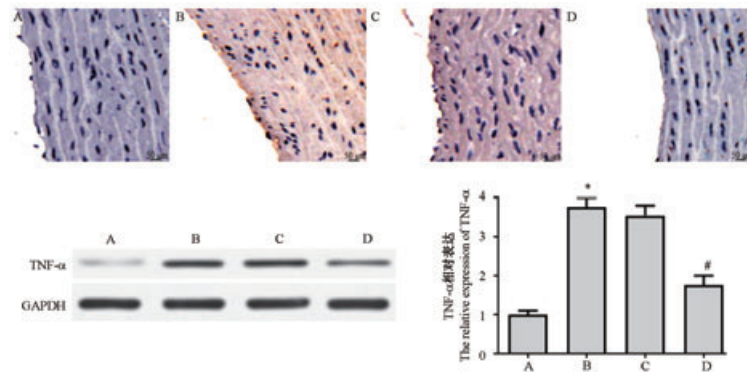


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 免疫组化和 Western blot 法检测各组大鼠动脉中 IL-6 的表达 ($n = 10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 6 Detection the expression of IL-6 in the arteries of rats in each group by immunohistochemistry and Western blot

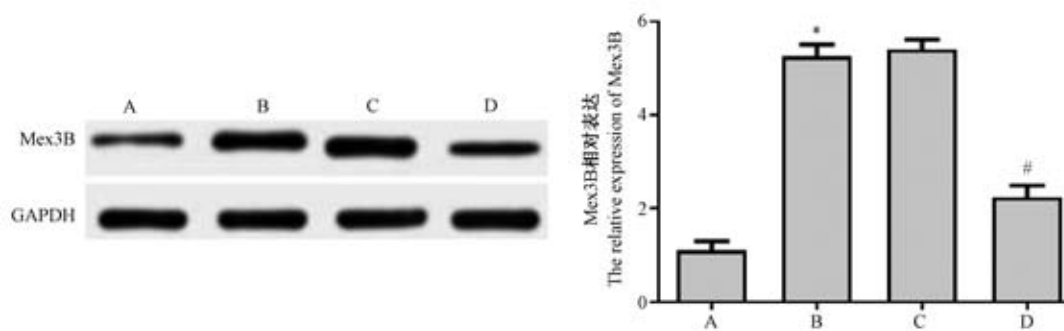


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 免疫组化和 Western blot 法检测各组大鼠动脉中 TNF-α 的表达 ($n = 10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Detection the expression of TNF-α in the arteries of rats in each group by immunohistochemistry and Western blot

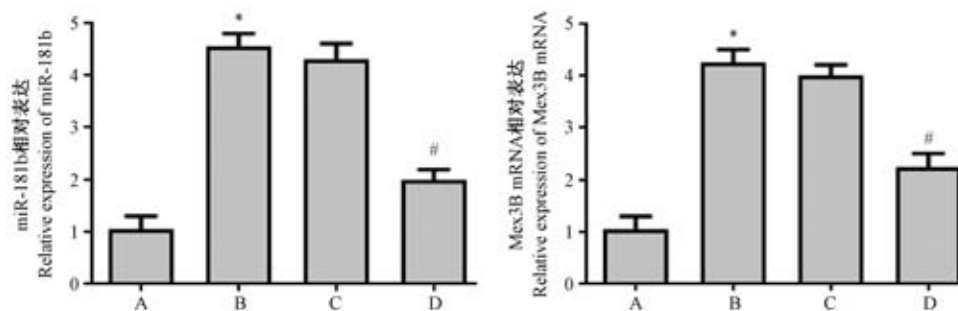


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 对照组; D: 实验组。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 8 各组大鼠动脉中 Mex3B 蛋白的表达 ($n = 10$)

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 8 Protein expression of Mex3B in the arteries of each group of rats



注:A:正常组;B:模型组;C:对照组;D:实验组。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图9 各组大鼠动脉中 miR-181b 和 Mex3B 的 mRNA 表达水平

Note. A, normal group. B, model group. C, control group. D, experimental group. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 9 mRNA expression levels of miR-181b and Mex3B in the arteries of rats in each group

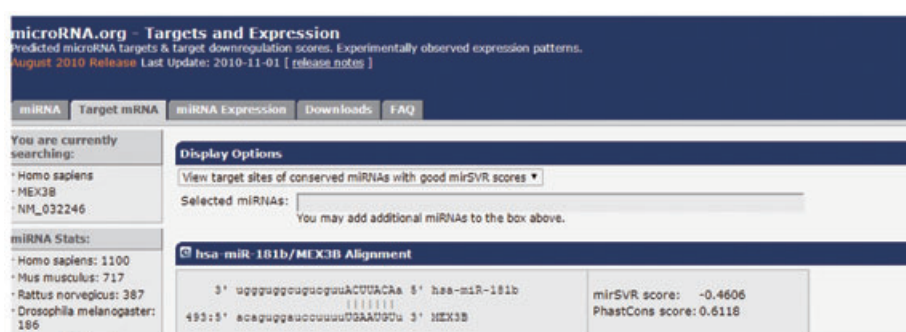


图10 生物信息网站预测 miR-181b 和 Mex3B 的关系

Figure 10 Relationship between miR-181b and Mex3B predicted by bioinformatics websites

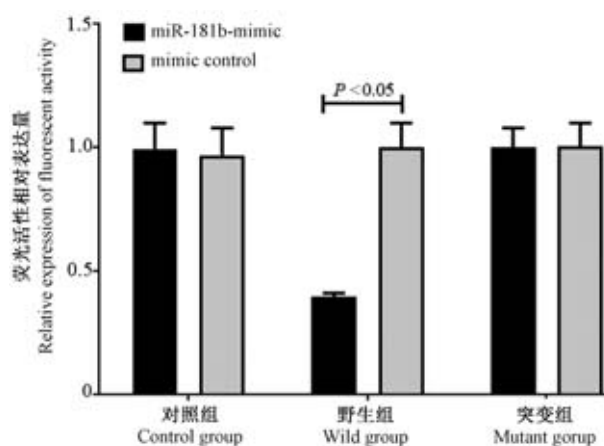


图11 双荧光素酶报告基因检测结果

Figure 11 Detection results of the double luciferase reporter gene

发生脑部位时极易诱发短暂性缺血性脑卒中危及患者生命^[10]。目前临床上主要通过改善患者的生活方式、调节患者血脂、血糖和血压缓解病程进展,但尚无根治性手段。因此开展针对 AS 的靶向治疗的研究在临床上具有重大研究意义。

目前,针对 AS 的靶向治疗尚处于实验室研究阶段。研究证实^[11]miRNA 不仅在 AS 中细胞增殖

与凋亡、自噬与分化中扮演重要角色,miRNA 作为调控因子影响 AS 的各个阶段,诸如动脉内皮细胞损伤与功能障碍、泡沫细胞形成与表型转换、脂质沉积和斑块形成等^[12]。Ma 等^[13]研究证实 miRNA-155 参与 ApoE^{-/-}小鼠颈动脉粥样硬化中的细胞自噬。miR-181b 是 miR-181 家族中与心血管疾病关系密切的成员。研究表明^[14]miR-181b 主要通过对血管炎症以及免疫反应的调控来参与 AS 进程。Di 等^[15]研究表明 miR-181b 能调控基质金属蛋白酶组织抑制剂-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP-3) 的表达,影响 AS 中微血管壁的稳定。Sun 等^[16]研究报道 miR-181b 参与调控 ApoE^{-/-}小鼠 AS 中由炎症诱导的细胞凋亡。黄志勇等^[17]研究证实抑制 miR-181b 的表达能明显减轻 ox-LDL 诱导的人脐静脉细胞炎症损伤。本研究中转染 miR-181b-inhibitor 后采用维生素 D3 联合高脂饮食法构建动脉粥样硬化大鼠模型,结果表明抑制 miR-181b 的表达能明显改善大鼠 AS 病理症状,改善大鼠动脉的脂质沉积情况,降低动脉中 MMP-9 的表达,缩小动脉中斑块的面积。

研究表明^[18]动脉血管壁进展性、慢性的炎症反应是导致 AS 累及全身动脉血管形成斑块的重要原因。Zampino 等^[19]报道内毒素诱导的炎症反应更容易导致动脉血管发生 AS 斑块病变。Yang 等^[20]研究表明降低炎症因子的表达有助于改善 AS 动物模型的症状。Gong 等^[21]研究证实抑制 AS 中炎症的发展能明显改善 AS 的斑块的病变面积,促进斑块的消退。纪利利等^[22]临床研究结果表明抑制炎症反应能明显降低颈动脉粥样硬化患者发生脑梗死的风险。而 *MEX3B* 基因是四种人类同源 *MEX3* 基因的一种。最新研究表明^[23]*Mex3B* 蛋白是新近发现的细胞质小体的组成部分,与炎症因子的 mRNA 转录、降解等生理过程密切相关。He 等^[24]研究表明在食管癌中,miR-181b 能够与 *Mex3B* 特异性结合影响癌细胞 DNA 的复制以及细胞增殖。Moududee 等^[25]研究指出 *Mex3B* 蛋白中环指结构域是泛素 E3 连接酶的特征结构域,*Mex3B* 蛋白能通过泛素化作用参与细胞的炎症应激。Sun 等^[26]研究指出 miR-181b 影响泛素 E3 连接酶的表达降低动脉粥样硬化中血管内皮中炎症因子的表达。本研究中 RT-PCR 和 Western blot 结果表明在 AS 模型组中 *Mex3B* 的 mRNA 和蛋白的表达升高,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 大量表达,AS 损伤明显。通过生物信息网站预测 miR-181b 和 *Mex3B* 存在靶向结合位点,荧光素酶报告基因分析证实 miR-181b 靶向调控 *Mex3B* 的表达,Western blot 法结果表明抑制 miR-181b 的表达后,*Mex3B* 的表达明显下降,炎症因子表达下调。推断说明 miR-181b 通过靶向调控 *Mex3B* 的表达参与 AS 中炎症应激,来抑制由炎症导致的 AS 斑块病变。

综合上述,miR-181b 通过靶向调控 *Mex3B* 的表达参与动脉粥样硬化中的炎症应激,抑制 miR-181b 的表达能明显抑制炎症反应,减小动脉粥样硬化中斑块的形成。但如何将 miR-181b 的靶向作用应用到临床对动脉粥样硬化的治疗中还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Fava C, Montagnana M. Atherosclerosis is an inflammatory disease which lacks a common anti-inflammatory therapy: how human genetics can help to this issue. A narrative review [J]. Front Pharmacol, 2018, 9(6): 55-64.
- [2] 翟科峰,段红,李洁,等. 涉及脂质代谢的 miRNA 及其对动脉粥样硬化发展和治疗的进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(12): 5692-5698.
- [3] Li FP, Lin DQ, Gao LY. LncRNA TUG1 promotes proliferation of vascular smooth muscle cell and atherosclerosis through regulating miRNA-21/PTEN axis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(21): 7439-7447.
- [4] Gao J, Yang S, Wang K, et al. Plasma miR-126 and miR-143 as potential novel biomarkers for cerebral atherosclerosis [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(1): 38-43.
- [5] Sun P, Li L, Liu Y Z, et al. miR-181b regulates atherosclerotic inflammation and vascular endothelial function through Notch1 signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3051-3057.
- [6] Zhong X, Ma X, Zhang L, et al. MIAT promotes proliferation and hinders apoptosis by modulating miR-181b/STAT3 axis in ox-LDL-induced atherosclerosis cell models [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97(1): 1078-1085.
- [7] Zhu SJ, Hallows SE, Currie KW, et al. A mex3 homolog is required for differentiation during planarian stem cell lineage development [J]. Elife, 2015, 4: e07025.
- [8] 张红珍,李丽,焦瑞,等. 补阳还五汤对动脉粥样硬化模型大鼠主动脉 Rho 激酶及 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1495-1500.
- [9] 张笑添,常新剑,宋林林. miR-181b-5p 对胃癌细胞 HGC-27 增殖和凋亡的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(2): 140-147.
- [10] Bäck M, Yurdagul A Jr, Tabas I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(7): 389-406.
- [11] Yang Y, Wang SY, Huang ZF, et al. The RNA-binding protein *Mex3B* is a coreceptor of Toll-like receptor 3 in innate antiviral response [J]. Cell Res, 2016, 26(3): 288-303.
- [12] Li M, Liu Q, Lei J, et al. MiR-362-3p inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis by targeting ADAMTS1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 270-276.
- [13] Ma J, Yang S, Ma A, et al. Expression of miRNA-155 in carotid atherosclerotic plaques of apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice and the interventional effect of rapamycin [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 100(46): 70-74.
- [14] 李晓丽,曹国良. 动脉粥样硬化患者血清微小 RNA-181b 的异常表达及其作用 [J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(6): 516-520.
- [15] Di Gregoli K, Mohamad Anuar N N, Bianco R, et al. MicroRNA-181b controls atherosclerosis and aneurysms through regulation of TIMP-3 and elastin [J]. Circ Res, 2017, 120(1): 49-65.
- [16] Sun X, He S, Wara AKM, et al. Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor- κ B activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circ Res, 2014, 114(1): 32-40.
- [17] 黄志勇,田广永,曹玲,等. 藻内酯上调 miR-181b 减轻氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞炎症损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 18-23.

- [18] Lu J, Sun M, Wu X, et al. Urate-lowering therapy alleviates atherosclerosis inflammatory response factors and neointimal lesions in a mouse model of induced carotid atherosclerosis [J]. FEBS J, 2019, 286(7): 1346–1359.
- [19] Zampino R, Marrone A, Rinaldi L, et al. Endotoxemia contributes to steatosis, insulin resistance and atherosclerosis in chronic hepatitis C: the role of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress [J]. Infection, 2018, 46(6): 793–799.
- [20] Yang Q, Yuan H, Chen M, et al. Metformin ameliorates the progression of atherosclerosis via suppressing macrophage infiltration and inflammatory responses in rabbits [J]. Life Sci, 2018, 198(4): 56–64.
- [21] Gong FH, Cheng WL, Wang H, et al. Reduced atherosclerosis lesion size, inflammatory response in miR-150 knockout mice via macrophage effects [J]. J Lipid Res, 2018, 59(4): 658–669.
- [22] 纪利利, 李美杰, 姚丽娜, 等. 他汀类药物急性脑梗死对患者颈动脉粥样硬化斑块及炎症反应的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(22): 2491–2494.
- [23] Oda T, Yamazumi Y, Hiroko T, et al. Mex-3B induces apoptosis by inhibiting miR-92a access to the Bim-3' UTR [J]. Oncogene, 2018, 37(38): 5233–5247.
- [24] He SL, Wang WP, Yang YS, et al. FAM3B promotes progression of oesophageal carcinoma via regulating the AKT-MDM2-p53 signalling axis and the epithelial-mesenchymal transition [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 1375–1385.
- [25] Moududee SA, Jiang Y, Gilbert N, et al. Structural and functional characterization of hMEX-3C Ring finger domain as an E3 ubiquitin ligase [J]. Protein Sci, 2018, 27(9): 1661–1669.
- [26] Sun P, Li L, Liu YZ, et al. MiR-181b regulates atherosclerotic inflammation and vascular endothelial function through Notch1 signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3051–3057.

[收稿日期]2020-01-02

(上接第 62 页)

- [7] Kawai H, Makino Y, Hirobe M, et al. Novel endogenous 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism [J]. J Neurochem, 1998, 70(2): 745–751.
- [8] Xu R, Zhou Y, Fang X. The possible mechanism of Parkinson's disease progressive damage and the preventive effect of GM1 in the rat model induced by 6-hydroxydopamine [J]. Brain Res, 2014, 1592(12): 73–81.
- [9] Bourdy R, Sánchez-Catalán MJ, Kauffling J, et al. Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area [J]. Neuropsychopharmacology, 2014, 39(12): 2788–2798.
- [10] Sim Y, Park G, Eo H, et al. Protective effects of a herbal extract combination of Bupleurum falcatum, Paeoniasuffruticosa, and Angelica dahurica against MPTP-induced neurotoxicity via regulation of nuclear receptor-related 1 protein [J]. Neuroscience, 2016, 340: 166–175.
- [11] Petroske E, Meredith GE, Callen S, et al. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment [J]. Neuroscience, 2001, 106(3): 589–601.
- [12] Wang P, Niu L, Gao L, et al. Neuroprotective effect of gypenosides against oxidative injury in the substantia nigra of a mouse model of Parkinson's disease [J]. J Int Med Res, 2010, 38(3): 1084–1092.
- [13] Zhang QS, Heng Y, Mou Z, et al. Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38(10): 1317–1328.

[收稿日期]2020-04-16

李应明,陈华,伍燕. 小鼠模型中神经酰胺对血小板介导的输血相关急性肺损伤的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (8): 86-91.

Li YM, Chen H, Wu Y. Effect of ceramide on platelet-mediated transfusion-related acute lung injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 86-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.013

小鼠模型中神经酰胺对血小板介导的输血相关急性肺损伤的作用

李应明, 陈 华, 伍 燕*

(海南省海口市人民医院输血科, 海口 570208)

【摘要】 目的 评价老化的血小板中的神经酰胺对输血相关急性肺损伤(transfusion-related acute lung injury, TRALI)的作用机制。**方法** 通过脂多糖预刺激,随后输注 10 mL/kg 储存 1~5 d 的血小板,在 BALB/c 小鼠体内构建 TRALI 的二次打击模型。采用酸性鞘磷脂酶特异性抑制剂 ARC39 或输注来自酸性鞘磷脂酶缺乏小鼠的血小板对 TRAIL 模型小鼠进行干预,评价不同时间点小鼠血小板中鞘磷脂成分,以及 TRAIL 模型小鼠肺中性粒细胞积聚情况,内皮屏障功能,肺组织病理学损伤程度。**结果** 存储 1~5 d 的血小板输注到脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)预刺激后的 C57/B6 小鼠体内能够引起肺组织的特征性损伤,且损伤严重程度随血小板储存时间的增加而加剧。血小板中的神经酰胺在储存过程中不断积累和释放。与对照组相比,输注 ARC39 预处理后的血小板或酸性鞘磷脂酶缺乏的血小板可明显缓解肺组织的损伤。**结论** 老化的血小板会导致小鼠发生 TRALI,但这种损伤可以通过酸性鞘磷脂酶抑制剂或特异性敲除酸性鞘磷脂酶基因来逆转和治疗,针对鞘磷脂形成的干预措施有望成为增加血制品存储安全性和寿命的有效策略。

【关键词】 输血相关性急性肺损伤;神经酰胺;酸性鞘磷脂酶;血小板

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0086-06

Effect of ceramide on platelet-mediated transfusion-related acute lung injury in mice

LI Yingming, CHEN Hua, WU Yan*

(Department of Blood Transfusion, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the mechanism of ceramide in aged platelets mediated by transfusion-related acute lung injury (TRALI). **Methods** The second hit model of TRALI was established in mice via lipopolysaccharide prestimulation, and platelets were transfused and stored for 1-5 days. ARC39 (a specific acid sphingomyelinase inhibitor) or platelets from acid sphingomyelinase-deficient mice were used to treat BALB/c mice. Temporal changes in platelet sphingomyelin composition were analyzed. We examined the accumulation of neutrophils in the lungs of TRALI mice, as well as the function of the endothelial barrier and the histology of injured lung tissue. **Results** Platelets were collected and stored for 1~5 days from mice prestimulated by LPS, which caused characteristic lung injury, and the severity of lung injury increased with time. Ceramide in platelets accumulated and decreased during storage. Compared with the control

[作者简介] 李应明(1982—),主管技师,研究方向:临床输血。E-mail:liqingyu111@163.com

[通信作者] 伍燕(1964—),副主任技师,研究方向:临床输血。E-mail:13389839601@163.com

group, transfusion of ARC39 preconditioned platelets or acid sphingomyelinase deficient platelets significantly alleviated lung injury. **Conclusions** Aging platelets can lead to TRALI in mice, but this damage can be reversed and treated by an acid sphingomyelinase inhibitor or specific knockout of the acid sphingomyelinase gene. Such intervention measures for sphingolipid formation are expected to be an effective strategy for increasing the storage safety and shelf life of blood products.

【Keywords】 transfusion-related acute lung injury; ceramide; acid sphingomyelinase; platelets

输血相关急性肺损伤 (transfusion-related acute lung injury, TRALI) 定义为输血后前 6 h 内发生的非心源性肺水肿, 是严重的输血不良反应, 也是输血相关死亡的首要原因^[1-2]。根据 2015 年美国食品药品监督管理局报道, 输血引起的病毒感染显著下降, 而输血导致的致死性不良反应中位居前三位的依次是输血相关急性肺损伤、溶血性输血反应和输血相关脓毒血症。多项研究发现血小板制品中含有的多种免疫调节因子, 诸如如血小板衍生的生长因子、可溶性 CD40 配体、白介素-6 和白介素-8 等, 在血小板存储过程中不断积累, 在其活化后会参与 TRALI 等多种输血不良反应的发生。

血小板在 TRALI 中的具体作用机制一直存在疑问。目前的研究表明血小板对 TRALI 的致病过程具有促进作用。采用大剂量阿司匹林或血小板膜糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 抑制剂, 阻断血小板后能有效遏制肺的病理损伤和死亡。对大鼠输注来自老化血小板的无细胞上清后能够诱发严重的 TRALI^[3-5]。以上研究均说明来自血小板分泌的可溶性介质可能触发和推动了 TRALI 的发生。存储的血液制品中的可溶性介质主要为具有生物活性的脂质, 对存储 5 d 后的血小板脂质成分分析发现鞘磷脂神经酰胺含量最为丰富, 神经酰胺主要由鞘磷脂经酸性鞘磷脂酶在体内进行生物合成, 是造成 TRALI 的关键性物质^[6]。因此, 本研究推测, 储存后的血小板可能通过酸性鞘磷脂酶增加神经酰胺的形成而诱导抗体非依赖性 TRALI 的发生。

为了检验这个假设, 本研究首先 LPS 预刺激小鼠后, 输注含有酸性鞘磷脂酶特异性抑制剂 ARC39 或酸性鞘磷脂酶特异性基因缺失的老化血小板构建 TRALI 的二次打击模型, 分析血小板中的脂质成分和肺损伤程度, 评估神经酰胺在血小板介导的 TRALI 发病过程中的具体作用机制, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择近交系 8~10 周龄/雄性, SPF 级 BALB/c 小鼠, 共 35 只 [SCXK (川) 2018-0032], 每只小鼠体重 22~30 g; 以及 8~10 周龄, SPF 级酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, *Asm*) 基因敲除小鼠, 共 35 只 [SCXK (川) 2016-0030], 每只小鼠体重 22~30 g。所有实验动物由中南大学湘雅医学院大学实验动物中心提供和饲养 [SYXK (湘) 2018-0025]。实验前 1 周所有动物饲养于实验动物中心 SPF 级饲养间, 小鼠饲料、饮水及垫料均经标准化消毒灭菌处理, 自由饮水, 12 h 昼夜节律。所有动物实验内容符合中南大学湘雅医学院大学动物伦理和保护指南, 实验经过本单位伦理审批 (2018HK0342), 全部实验内容遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂

LPS (货号: L2630) 购自美国 sigma 公司; 巨噬细胞炎性蛋白 MIP-2 的 ELISA 检测试剂盒 (货号: MM200) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (货号: MTA00B) 购买自加拿大 R&D 生物公司; 凝血酶-抗凝血酶复合物 ELISA 检测试剂盒 (货号: 2013-1727) 购买自上海广锐生物技术有限公司; 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性检测试剂盒 (货号: ab144077) 购买自美国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 血小板的获取和存储

5 只雄性 8 周龄 BALB/c 小鼠及相同数量、性别、年龄的 *Asm* 基因缺失小鼠经麻醉后通过心脏穿刺收集全血标本, 全血在室温下 1200 r/min 离心 15 min 三次后富集获得富含血小板血浆并对其中的血小板进行计数, 再以无菌 PBS 溶液将血小板浓度标化为终浓度每毫升 1×10^9 个, 血小板存储液为 10% 柠檬酸-磷酸-葡萄糖-腺嘌呤混合而成的 CPDA 缓冲液, 其中一部分添加 ASM 抑制剂 ARC39 (10 mol/L) 后在无菌生物安全柜中存储。

1.3.2 小鼠 TRALI 的二次打击模型构建及血小板输注

BALB/c 小鼠经腹腔注射 2 mg/kg LPS 或等效体积的生理盐水,2 h 后经尾静脉缓慢注射 10 mL/kg 剂量、浓度为每毫升 1×10^9 个,存储 1~5 d 的 BALB/c 小鼠血小板,或添加 ASM 抑制剂 ARC39 的 BALB/c 小鼠血小板,或 *Asm* 基因缺失小鼠血小板,对照组输注相同体积生理盐水。小鼠于室温下在笼子中观察 6 h。

1.3.3 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测肺泡灌洗液中炎症介质表达水平。

处死小鼠后,进行气管插管,肺内注射 1 mL 无菌 PBS 溶液后回收支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage, BALF),2000 r/min 离心 5 min 去除细胞获取上清得到 BALF,检测 BALF 中 TNF- α 、凝血酶-抗凝血酶复合物角和巨噬细胞炎症蛋白 2 (macrophage-inflammatory protein 2, MIP-2) 水平,大致步骤如下:每孔加入 50 μ L 样品稀释液,然后分别加入相应的 50 μ L 标准品及各组小鼠样品,轻轻摇匀,封上膜后室温孵育 2 h;配置好洗液并洗板 5 次,将孔中的液体拍打干净之后,每孔加 100 μ L 生物素耦联抗体,再封上新膜后室温孵育 2 h,洗板 5 次,每孔加入 100 μ L 显色底物,室温避光孵育 30 min 显色,每孔加入 100 μ L 反应终止液,读取 450 nm 和 540 nm 的吸光度值。根据标准品的浓度与 OD 值做标准曲线,根据标准曲线拟合出方程,并计算得到相应的指标浓度。

1.3.4 肺组织 MPO 活性定量检测

分别取各组小鼠的肺组织,在冰上使用匀浆器充分匀浆组织后 10000 r/min 离心 10 min,收集离心后上清,即为肺组织匀浆液。依照试剂盒说明书的操作步骤测定组织匀浆液在 480 nm 处的吸光度值,根据吸光度值计算不同肺组织的 MPO 活性。

1.3.5 肺组织 MPO 活性定量检测

输注血小板观察 6 h 后颈椎脱臼法处死各组小鼠,取小鼠左肺组织进行湿/干重比值测定:将肺组织置于电子天平上称量总质量 W1,随后置于 70℃ 恒温烘干箱烘干 72 h 使其水分完全蒸发。再次称量干燥后的组织记录为 W2。计算时采用公式“(湿重)/(干重) $\times 100\%$ =(W1)/(W2) $\times 100\%$ ”计算出数值。取右肺组织进行石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色后,用树胶封固,放在温箱中烤干后,

在光学显微镜下根据肺泡或间质中性粒细胞、透明膜、空隙碎片和肺泡间隔增厚等指标,使用组织学肺损伤评分对肺损伤进行分级。

1.3.6 血小板脂质谱成分分析

从储存后的血小板上清液中提取神经酰胺并采用液相色谱法进行定量测定,主要步骤如下:将冷冻后的血小板解冻并以 3000 r/min 离心 15 min,以四氯甲醇萃取收集脂质。采用 Q-TOF 6530 质谱仪(Agilent Technologies, Waldbron, 德国)及串联质谱对鞘磷脂成分进行分析,使用 Mass Hunter 软件(Agilent Technologies)进行量化处理。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 及 Prism 7.01 (美国 Graph Pad Software 公司)软件进行统计学分析,计量数据表示为“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)”,多组间比较采用单因素方差分析,以 Dunnett 检验进行事后两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 伴随血小板存储时间的增加 TRALI 肺损伤加剧

为了明确血小板储存时间对于 TRALI 的影响,本研究对 BALB/c 小鼠进行 LPS 腹腔注射后,分别输注存储 0、1、3、5 d 的血小板。6 h 后处死小鼠,观察小鼠肺发现,输注血小板后小鼠肺出现了严重的特征性损伤。肺组织病理切片出现了明显的肺水肿和组织损伤。湿/干肺重量比值在输注储存 3、5 d 血小板的小鼠中显著上调(图 1A)。BAL 蛋白含量在输注储存 5 d 血小板的小鼠体内增加明显(图 1A)。肺 MPO 活性在输注储存 1、3、5 d 血小板的小鼠中均显著上调超过 1 倍(图 1A)。HE 染色显示输注储存 1、3、5 d 血小板的小鼠肺组织损伤加重(图 1B)。以上结果表明,输注老化的血小板会导致肺水肿形成、血管屏障衰竭、肺中性粒细胞浸润和肺组织病理学损伤;并且 TRALI 的损伤程度与血小板储存时间呈现正相关。

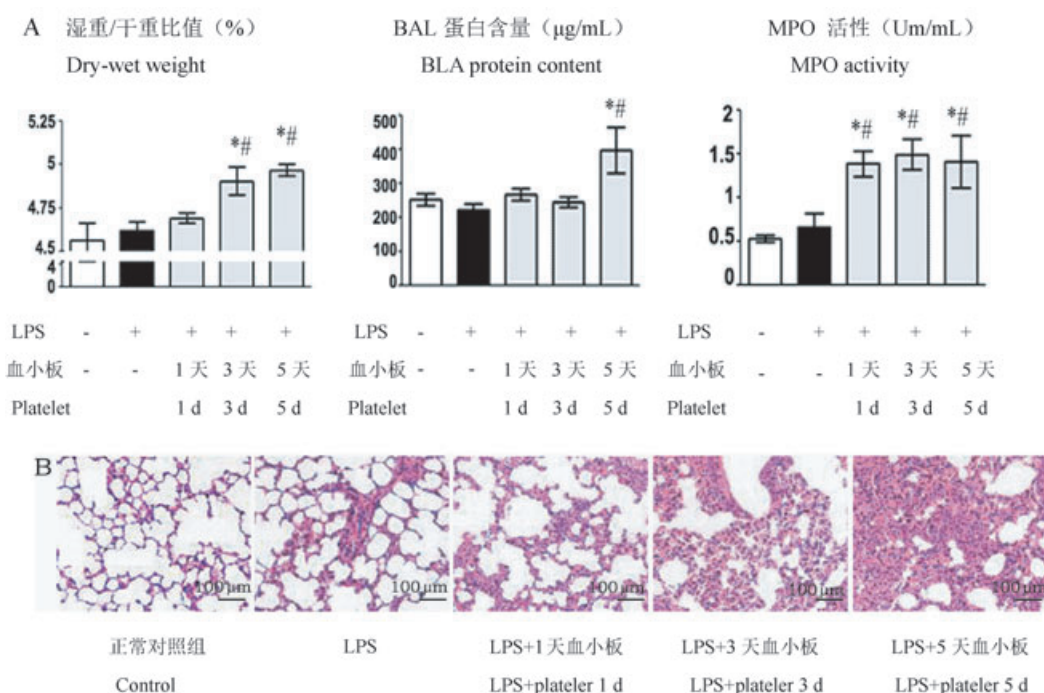
2.2 神经酰胺随着存储时间的增加在小鼠血小板中的含量增加

为了明确是否由于血小板中神经酰胺可以随储存时间的增加而积累,本研究通过液相色谱-质谱对存储后的血小板样品中神经酰胺成分的定量分析显示:神经酰胺随着存储时间的延长在血小板中不断增加,存储第 7 天的血小板中神经酰胺的含

量是第 0 天的 1.6~2.9 倍(如图 2 所示)。以上结果表明随着血小板储存时间的延长,神经酰胺会持续积累,从而加剧小鼠 TRALI。

2.3 ASM 抑制或缺失后,老化血小板介导的 TRALI 明显减弱

为了进一步探讨鞘磷脂在老化血小板介导的

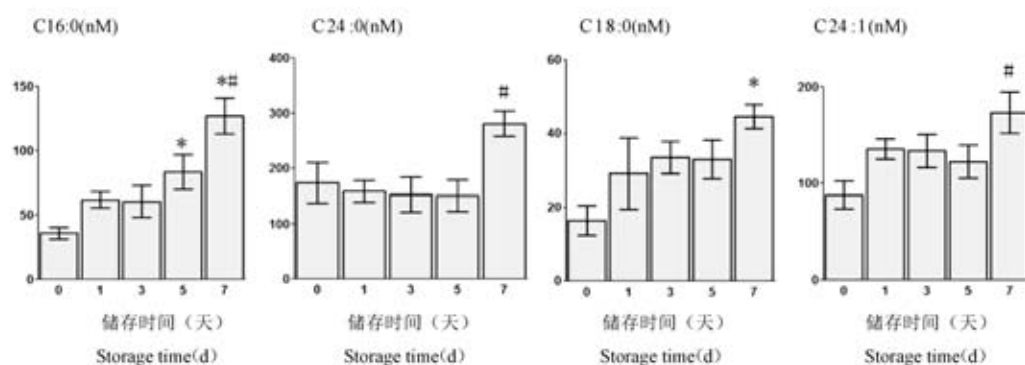


注:A;输注不同储存时间的血小板后,小鼠的湿重/干重量比值,BAL 中的蛋白浓度,肺组织中 MPO 活性;B;输注不同储存时间的血小板后小鼠肺组织的组织病理改变(HE 染色)。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与存储 1 d 血小板组比较,# $P<0.05$ 。

图 1 老化的血小板输注到 LPS 预刺激后的小鼠体内中会加剧 TRALI 的组织病理损伤

Note. A, Ratio of wet weight to dry weight of mice, the concentration of protein in BAL and the activity of MPO in lung tissue. B, Histopathological photos of HE staining of lung tissue after transfusion of platelets with different storage time. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet storage group, # $P<0.05$.

Figure 1 The ratio of wet weight to dry weight, the concentration of protein in BAL and the activity of MPO in lung tissue of mice after transfusion of aged platelets into LPS pre-stimulated mice with different storage time of TRALI



注:高效液相色谱法对存储后的血小板样品中不同种类的神经酰胺含量的定量分析:C16:0,C18:0,,C24:0和 C24:1 的浓度随存储时间的增加而增加。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与存储 1 d 血小板组比较,# $P<0.05$ 。

图 2 不同种类的神经酰胺随储存时间的增加在小鼠血小板中的积累

Note. The contents of different kinds of ceramides in stored platelet samples were quantitatively analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet storage group, # $P<0.05$.

Figure 2 Accumulation of different kinds of ceramides in mouse platelets with the increase of storage time

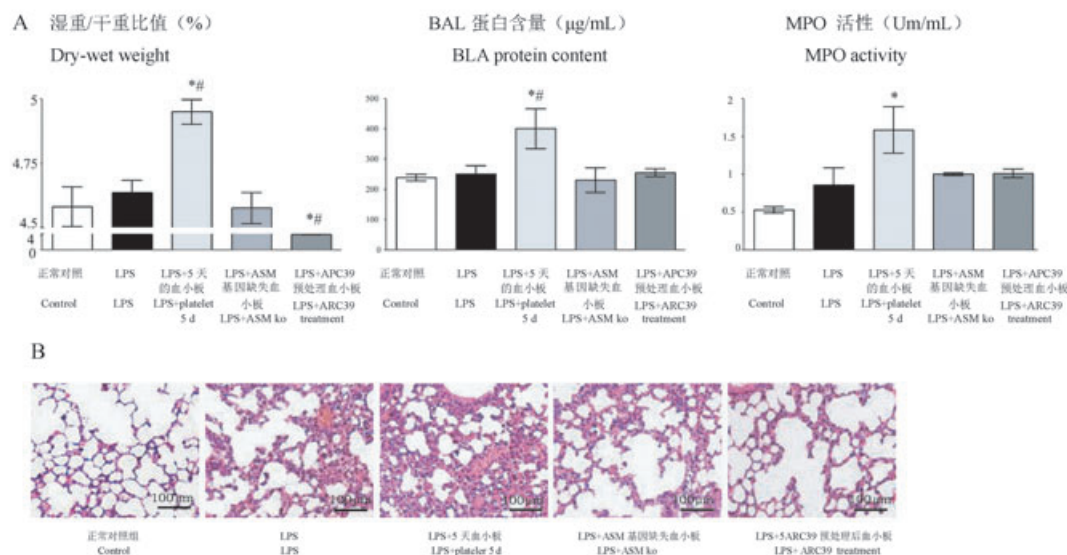
TRALI 中的具体机制,本研究通过两种不同的途径阻断鞘磷脂的生成:药物抑制鞘磷脂形成(ASM 的抑制剂 ARC39 预处理血小板)和输注 *Asm* 基因缺失小鼠来源的血小板。我们观察到抑制或阻断鞘磷脂的生成后,肺 MPO 活性和肺组织病理学损伤显著好转,湿/干肺重量比和 BAL 蛋白含量降低(图 3A)。HE 染色也显示小鼠肺在输注 *Asm* 基因缺失血小板或 ARC39 预处理后的血小板后显著改善了肺损伤(图 3B)。

3 讨论

通过本研究,我们发现存储后的血小板中累计产生的神经酰胺是触发血小板介导的抗体非依赖性 TRALI 的新机制,特异性的通过抑制 ASM 活性减少神经酰胺的产生能够明显减轻 TRALI 症状,潜在延长血小板的存储时间并增加输血的安全性,为临床血制品的存储开辟了新的前景。

血小板是一种临床稀缺的血液制品,因此常常需要尽可能延长其存储时间和最大限度的提高其临床利用率,但是长时间存储的血小板会增加 TRALI 的风险^[7]。我们通过构建小鼠 TRALI 的二次打击模型,在输注血小板 6 h 后即触发 TRALI 的

特征性临床表现:肺水肿形成、血管屏障衰竭、肺中性粒细胞积聚和肺组织学损伤,并且发现 TRALI 病情的严重程度呈现血小板的储存时间的依赖性。既往的研究已经证明神经酰胺是内皮屏障失效和肺损伤的重要介质。在肺组织和细胞中鞘脂类相关酶类的表达量非常高,当机体受到诸如肿瘤坏死因子- α 和血小板活化因子等刺激时,支气管肺泡灌洗液中酸性鞘磷脂酶的活性增高,神经酰胺量也相应增加。并且 ASMase 的活性与神经酰胺量的同步增加,而应用 ASMase 抑制剂后,神经酰胺的生成显著减少,肺功能得到了改善^[8-9]。神经酰胺通过抑制内皮细胞一氧化氮合酶活性增加肺内皮细胞通透性,导致内皮细胞 Ca^{2+} 内流以及内皮屏障破坏和肺水肿形成^[10-12]。此外,神经酰胺可以促进内皮细胞凋亡,从而进一步加重肺中的内皮屏障破坏^[13-15]。我们通过鞘磷脂成分分析发现在长时间存储的血小板中神经酰胺的含量增加最为显著,提示在 TRALI 的致病过程中,神经酰胺可能发挥重要作用,进一步通过 ASM 抑制剂或输注 ASM 基因缺陷小鼠来源的血小板可以明显缓解 TRALI 症状。因此,我们的动物实验成功证实神经酰胺可能是血小板介导的抗体非依赖性 TRALI 的重要分子,而且



注:A:如图标注处理后的各组小鼠的肺湿重/干重比值,BAL 中的蛋白质浓度,肺组织中的 MPO 活性;B:如图标注处理后的各组小鼠肺的组织病理分析(HE 染色)。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与输注存储 5 d 血小板组比较,# $P<0.05$ 。

图 3 输注 *Asm* 基因缺失小鼠来源的血小板或 ASM 特异性抑制剂处理后的存储血小板可明显减弱 TRALI 损伤

Note. A. Ratio of lung wet weight to dry weight, the protein concentration in BAL and the activity of MPO in lung tissue of each group of mice were marked as shown in the figure. B. HE staining tissue sections of the lungs of each group of mice. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet transfusion group, # $P<0.05$.

Figure 3 Transfusion of platelets derived from *Asm* gene deleted mice or stored platelets treated with ASM specific inhibitors could significantly attenuate TRALI damage

靶向抑制 ASM 依赖的神经酰胺的形成可以降低老化血小板介导 ALI 的风险,从而增加储存血液制品的安全性。

在早期研究中,通过输注针对小鼠血小板的兔多克隆血清耗竭血小板或者高剂量阿司匹林可以有效遏制 TRALI 的发生发展。我们前期实验发现:这种高剂量的阿司匹林仅能降低 TRALI 小鼠的死亡率,而在药理学剂量(10 mg/Kg)下并没有观察到保护作用。鉴于阿司匹林对 COX-1 有抑制作用,这表明大剂量阿司匹林的保护作用可能源于其血小板非依赖性的抗炎和抗氧化特性,或来自代谢衍生物水杨酸盐的特性,而不是其抗血小板活性。此外,临床上血小板常规的存储时间为 3~5 d,在美国基于预防细菌污染的考虑,血小板存储时间限定在 5 d 以内^[16]。在本研究中,靶向抑制 ASM 活性,不仅能够缓解输注存储 5 d 的血小板之后的 TRALI 症状,并且可成功将小鼠血小板的储存时间延长至 7 d,有助于提高临床血小板使用率,缓解血制品的供需矛盾。

参考文献:

- [1] Roubinian NH, Triulzi DJ. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury: etiology and prevention [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2019, 33(5): 767-779.
- [2] Vlaar APJ, Kleinman S. An update of the transfusion-related acute lung injury (TRALI) definition [J]. *Transfus Apher Sci*, 2019, 58(5): 632-633.
- [3] Hechler B, Maître B, Magnenat S, et al. Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(6): 1255-1267.
- [4] Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, et al. Evidence of CD40L/CD40 pathway involvement in experimental transfusion-related acute lung injury [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12536.
- [5] Tong S, Wang H, Zhang T, et al. Accumulation of CD62P during storage of apheresis platelet concentrates and the role of CD62P in transfusion-related acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7777-7781.
- [6] McVey MJ, Kim M, Tabuchi A, et al. Acid sphingomyelinase mediates murine acute lung injury following transfusion of aged platelets [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(5): L625-L637.
- [7] Levy JH, Rossaint R, Zacharowski K, et al. What is the evidence for platelet transfusion in perioperative settings? [J]. *Vox Sang*, 2017, 112(8): 704-712.
- [8] Hoehn RS, Jernigan PL, Japtok L, et al. Acid sphingomyelinase inhibition in stored erythrocytes reduces transfusion-associated lung inflammation [J]. *Ann Surg*, 2017, 265(1): 218-226.
- [9] Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, et al. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation [J]. *Circ Res*, 2014, 115(5): 525-532.
- [10] Fu M, Li Z, Tan T, et al. Akt/eNOS signaling pathway mediates inhibition of endothelial progenitor cells by palmitate-induced ceramide [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(1): H11-H17.
- [11] Medler TR, Petrusca DN, Lee PJ, et al. Apoptotic sphingolipid signaling by ceramides in lung endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(6): 639-646.
- [12] Kuebler WM, Wittenberg C, Lee WL, et al. Thrombin stimulates albumin transcytosis in lung microvascular endothelial cells via activation of acid sphingomyelinase [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(8): L720-L732.
- [13] Niaudet C, Bonnaud S, Guillonnet M, et al. Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2017, 33: 10-21.
- [14] Li W, Yang X, Xing S, et al. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 823071.
- [15] Wang A, Li C, Liao J, et al. Ceramide mediates inhibition of the Akt/eNOS pathway by high levels of glucose in human vascular endothelial cells [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 26(1-2): 31-38.
- [16] Lacerda SH, Semberova J, Holada K, et al. Carbon nanotubes activate store-operated calcium entry in human blood platelets [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(7): 5808-5813.

[收稿日期] 2020-01-06

孙孟军,董泽飞,王宏. 海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达与慢性应激所致小鼠抑郁的相关性 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 92-97.

Sun MJ, Dong ZF, Wang H. Relationship between chronic stress-induced depression and BDNF/VEGF expression in the mouse hippocampus and forebrain cortex [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 92-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.014

海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达与慢性应激所致小鼠抑郁的相关性

孙孟军¹, 董泽飞^{1*}, 王 宏²

(1. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000; 2. 华北理工大学附属医院精神科, 河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 探究海马和前脑皮层脑源性神经营养因子(BDNF)和血管内皮生长因子(VEGF)表达与慢性应激所致小鼠的抑郁的相关性。**方法** 选取 SPF 级 KM 小鼠 58 只, 雌雄小鼠各 29 只。将小鼠随机分为对照组与观察组, 观察组小鼠采用禁食、电击足底等多种应激因子刺激, 每天随机选择一种, 共 20 d。对照组小鼠不接受实验应激原, 以同样条件饲养。应激前、应激后 10 d、20 d 均测定小鼠体重。两组小鼠均进行 morris 水迷宫实验、旷场实验测试, 并观察记录结果。测定各组小鼠海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达情况, 并分析其相关性。**结果** 应激前, 两组小鼠体重水平相差不大 ($P>0.05$), 应激后, 观察组小鼠体重明显低于对照组 ($P<0.01$)。观察组小鼠逃避潜伏期、游泳路程及在第二象限的停留时间明显高于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而在其他象限的停留时间无明显差异 ($P>0.05$)。观察组小鼠修饰次数、垂直运动得分明显低于对照组, 中央区停留时间明显高于对照组 ($P<0.01$), 排便粒数无明显差异 ($P>0.05$)。与对照组相比, 观察组海马 CA1 区及前脑皮层 BDNF、VEGF 表达水平明显降低 ($P<0.05$), 而两组 CA3 区 BDNF 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 慢性应激会导致小鼠出现抑郁样行为, 这可能与海马及前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达下降有关。

【关键词】 海马; 前脑皮层; BDNF; VEGF; 慢性应激; 抑郁; 相关性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0092-06

Relationship between chronic stress-induced depression and BDNF/VEGF expression in the mouse hippocampus and forebrain cortex

SUN Mengjun¹, DONG Zefei^{1*}, WANG Hong²

(1. Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China.

2. Department of Psychiatry, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the hippocampus and forebrain cortex and depression induced by chronic stress in mice. **Methods** We randomly divided 58 SPF KM mice (29 male, 29 female) into a control group and observation group. We induced stress in the mice in the observation group via fasting, electric shock, and other techniques. The mice in the control group were not exposed to experimental stressors. We weighed the mice before stress induction, 10 days after, and 20 days after stress induction. We then observed and recorded the result of the Morris water

[作者简介] 孙孟军 (1976—) 男, 汉族, 本科, 讲师, 研究方向: 基础医学。E-mail: 1711798975@qq.com

[通信作者] 董泽飞 (1980—) 男, 汉族, 本科, 讲师, 研究方向: 基础医学。E-mail: dongzefei1@163.com

maze test and open field test in both groups. We measured BDNF and VEGF expression in the hippocampus and forebrain cortex in each group, and analyzed the correlation. **Results** Before stress induction, there were no significant differences between the two groups ($P > 0.05$). After stress induction, the mice in the observation group weighed significantly less than those in the control group ($P < 0.01$). The escape latency, swimming distance, and time spent in the second quadrant were significantly higher in the observation group vs. the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but there were no significant differences in the time spent in the other quadrants ($P > 0.05$). The modification times and vertical movement scores of the mice in the observation group were significantly lower than those in the control group, and the retention time in the central area was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the number of defecation particles ($P > 0.05$). The BDNF and VEGF expression levels in the CA1 area of the hippocampus and forebrain cortex were lower in the observation group vs. control group, but this difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** Chronic stress can induce depressive behavior in mice, which may be related to decreased BDNF and VEGF expression in the hippocampus and forebrain cortex.

【Keywords】 hippocampus; forebrain cortex; BDNF; VEGF; chronic stress; depression; correlation

抑郁症是情感性精神障碍的一种临床表现,主要表现为显著而持久的情绪低落、思维迟缓等,严重者甚至会出现自杀的念头或行为^[1]。近年来抑郁症的发病率正不断提高,但其发病机制较为复杂,尚未明确,一般认为其可能与遗传因素、神经介质及环境等有关^[2]。有研究发现,抑郁症的发生、发展与脑内神经营养因子及神经可塑性改变等因素关系密切。神经营养因子对促进突触生长、维持神经元生存具有重要作用^[3]。据国外相关研究报告,海马与前脑皮层相关神经营养因子的表达与抑郁的发生密切相关^[4]。若海马、前脑皮层等脑区缺少神经营养因子,相应的脑功能会受到抑制,最终导致抑郁症的发生^[5]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是由 Zhang 等^[6]首先在猪脑中发现的一种具有神经营养作用的蛋白质。有研究发现,心理学、物理学应激、长期注射皮质酮或束缚应激的大鼠海马 BDNF 水平明显降低,同时大鼠出现抑郁样行为。BDNF 水平与抑郁症严重程度关系密切^[7]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异性的促血管内皮生长因子,能够使血管通透性增加,刺激血管再生,保护缺血及退变的神经元,促进大脑神经元的再生。Turner 等^[8]研究发现在抑郁症患者发作期,VEGF 水平明显升高。抑郁症的发病机制较为复杂,单一理论或是单一因子治病方面已有多方面研究,但从几个方面联合研究致抑郁的较少。本组研究采用不同的应激因子建立小鼠应激抑郁模型,从 BDNF 及 VEGF 两种因子的角度出发,旨在探讨海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达与慢性应激所致的小鼠抑郁的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 58 只,2 月龄,雌雄小鼠各 29 只,体重 18~19 g,购自上海睿太莫斯生物科技有限公司[SCXK(沪)2016-0011],无菌手术在上海睿太莫斯生物科技有限公司屏障动物实验设施[SYXK(沪)2017-0033]进行,经本校伦理委员会审批通过(IACUC-2018-008)。于本实验室温度(22 ± 5)℃,湿度(57 ± 8)%,光暗交替各 12 h 的环境下饲养,自由摄食、饮水。实验过程中坚持 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,生产批号:20166626,规格:100 mL);VEGF 抗体(武汉默沙克生物科技有限公司);BDNF 抗体(上海赛默飞世尔科技有限公司);戊巴比妥钠(上海新亚药业有限公司,生产批号:31160240,规格:25 g)。电子秤(山东畅欧商贸有限公司,型号:HZ-A50001);旷场行为检测箱(使用不透明材料制成底面为 75 cm×75 cm 的正方形,将其等位成 25 个等边方格,底面为白色,周围为黑色,在距箱顶 50 cm 处放一 60 W 灯光);秒表(深圳市鑫宏茂科技发展有限公司,型号:HS-70 W);冰箱(山东博科科学仪器有限公司,型号:BYC-250);小鼠避暗箱(上海软隆科技发展有限公司,规格:BW-YLS-17B);morris 水迷宫(江上海欣软信息科技有限公司,型号:XR-XM101-Z);石蜡切片机(上海聚慕医疗器械有限公司,型号:HM3555);恒温水浴箱(上海赫田科学仪器有限公司,型号:HH-US)。

1.3 实验方法

建立抑郁症小鼠模型:将小鼠随机分为对照组

与观察组两组,观察组小鼠采用禁食(24 h 内不提供饲料,正常饮水)、禁饮(24 h 内不提供饮水,正常提供饲料)、电击足底(采用小鼠避暗箱进行操作:35 V 电压,每次 1 min,每次 6 s,共 20 次)、高台(将小鼠置于高 150 cm,宽 2.5 cm 的高台上 60 min)、冰水游泳(使用自制的高 16 cm 的水桶中,内有 5℃ 冷水,水深 14 cm,将小鼠放入其中,5 min 后取出)等多种应激因子刺激,每天随机选择一种,共 20 d。对照组小鼠不接受实验应激原,以同样条件饲养。

应激前、应激后 10 d、20 d 均测定小鼠体重。

Morris 水迷宫实验:将水迷宫分为四个区域,在每个区域内进行入水点标记设置,将一隐蔽的圆形平台放于第四区域。在定向航行实验中(每天 3 次,共 3 d),每次随机选取一个区域入水,在 90 s 内找到圆形平台的时间为逃避潜伏期。观察并记录小鼠找到并爬上平台所需时间。第 4 天时将平台撤去进行空间探索实验,从原区域入水,记录小鼠在 90 s 内找到原平台区域的探索时间,若在 90 s 内未找到平台,则需将小鼠引到平台。48 h 后重复实验,观察小鼠的逃避潜伏期、游泳路程及在各象限停留时间变化。

旷场实验:于应激第 20 天进行旷场实验,将小鼠放入旷场行为实验箱中,观察小鼠在 10 min 内的行为表现,每只小鼠实验结束后彻底清洗实验箱,

观察两组小鼠的洗脸、舔足等修饰次数、排便粒数、中央区停留时间以及垂直运动得分。

海马及前脑皮层 BDNF 及 VEGF 表达:采用 Motic Images Advanced 3.3 系统对海马及前脑皮层 BDNF 及 VEGF 免疫组化阳性神经元结果进行分析,计算其平均光密度值。采用免疫组化法观察慢性应激后小鼠海马及前脑皮层 BDNF 及 VEGF 的表达情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件包进行统计学数据分析,计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验。统计所得结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠体重变化比较

结果显示,两组小鼠体重均呈上升趋势,但对照组小鼠体重增加明显优于观察组。应激前,两组小鼠体重水平相差不大($P > 0.05$),应激后,观察组小鼠体重明显低于对照组($P < 0.01$),见表 1。

2.2 morris 水迷宫实验结果比较

观察组小鼠逃避潜伏期、游泳路程及在第二象限的停留时间明显高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而两组在其他象限的停留时间无明显差异($P > 0.05$),见表 2。

表 1 两组小鼠体重变化比较($\bar{x} \pm s, n = 29$)

Table 1 Comparison of body weight changes between two groups of mice

分组 Groups	应激前 Before stress	应激后 10 d Post-stress 10 d	应激后 20 d Post-stress 20 d
观察组 Observation group	25.49±0.46	25.72±0.55	26.71±0.61
对照组 Control group	25.79±0.74	34.56±1.08	40.76±1.65
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	-1.854	-39.279	-43.010
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.069	<0.001	<0.001

表 2 Morris 水迷宫实验结果比较($\bar{x} \pm s, n = 29$)

Table 2 Comparison of morris water maze test results

分组 Groups	逃避潜伏期(s) Escape latency		游泳路程(cm) Swimming distance		象限停留时间 Quadrant dwell time(s)		
	训练周期 1 Training cycle 1	训练周期 2 Training cycle 2	训练周期 1 Training cycle 1	训练周期 2 Training cycle 2	第一象限 First quadrant	第二象限 Beta quadrant	第三象限 Third quadrant
观察组 Observation group	59.26±5.26	35.54±2.46	824.21±217.49	692.75±119.17	24.21±1.61	34.58±1.94	31.49±1.15
对照组 Control group	37.14±2.67	22.36±1.59	671.52±165.42	493.16±98.82	23.75±1.17	43.93±2.75	30.58±2.17
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	20.194	24.231	3.009	6.943	1.245	-14.961	1.995
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	<0.001	0.004	<0.001	0.218	<0.001	0.051

2.3 旷场实验结果比较

观察组小鼠修饰次数、垂直运动得分明显低于对照组,中央区停留时间明显高于对照组 ($P < 0.01$),两组小鼠排便粒数无明显差异 ($P > 0.05$),见表 3。

2.4 海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达情况

与对照组相比,观察组海马 CA1 区及前脑皮层 BDNF、VEGF 表达水平明显降低 ($P < 0.05$),而两组 CA3 区 BDNF 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4,图 1。显微镜下观察发现,对照组小鼠细胞核完整,细胞质成条状或聚集分布,观察组小鼠神经元细胞核固缩、碎裂,细胞明显变圆。见图 2,图 3。

表 3 旷场实验结果比较 ($\bar{x} \pm s, n = 29$)

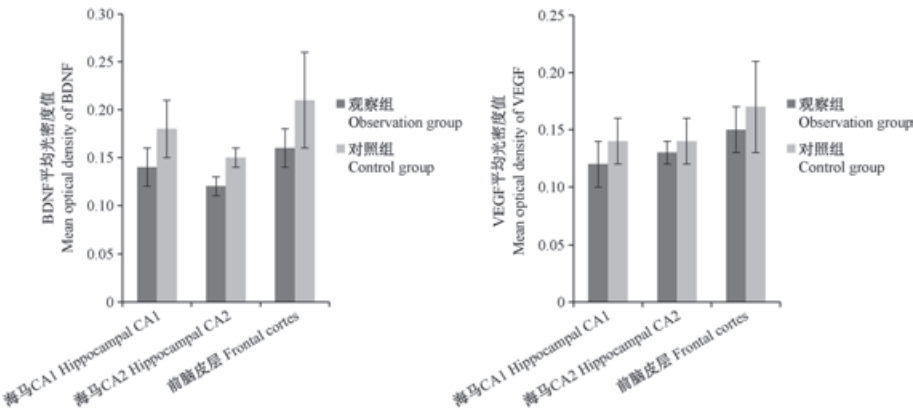
Table 3 Comparison of open-field experimental results

分组 Groups	修饰次数 Number of modifications	排便粒数 Number of defecation granules	中央区停留时间 Central residence time	垂直运动得分 Vertical motion score
观察组 Observation group	1.45±0.31	2.34±0.52	15.59±2.57	15.03±3.45
对照组 Control group	2.41±0.28	2.39±0.91	7.36±1.49	32.02±3.44
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	-12.376	-0.257	14.919	-18.779
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	0.798	<0.001	<0.001

表 4 海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 29$)

Table 4 Expression of BDNF and VEGF in hippocampus and forebrain cortex

分组 Groups	BDNF			VEGF		
	海马 CA1 Hippocampal CA1	海马 CA3 Hippocampal CA3	前脑皮层 Frontal cortex	海马 CA1 Hippocampal CA1	海马 CA3 Hippocampal CA3	前脑皮层 Frontal cortex
观察组 Observation group	0.14±0.02	0.12±0.03	0.16±0.02	0.12±0.02	0.13±0.01	0.15±0.02
对照组 Control group	0.18±0.03	0.14±0.05	0.21±0.05	0.14±0.02	0.14±0.02	0.17±0.04
<i>t</i> 值 <i>t</i> value	5.974	1.847	5.000	3.808	2.408	2.408
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	<0.001	0.070	<0.001	<0.001	0.019	0.019

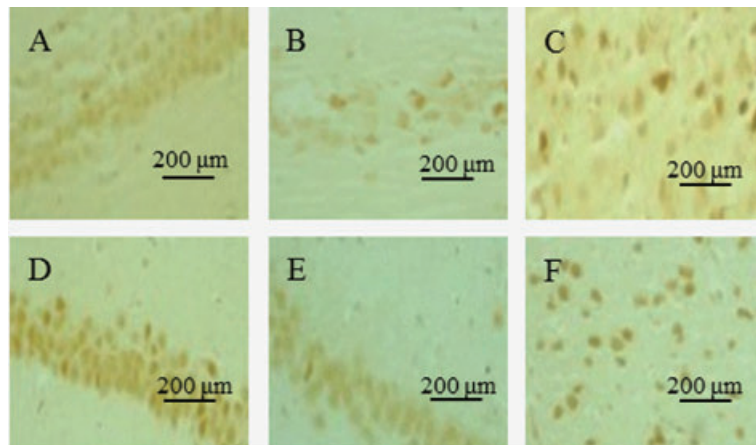


注:A:海马和前脑皮层 BDNF 表达情况;B:海马和前脑皮层 VEGF 表达情况。

图 1 海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达情况

Note. A, Expression of BDNF in hippocampus and forebrain cortex. B, Expression of VEGF in hippocampus and forebrain cortex.

Figure 1 Expression of BDNF and VEGF in hippocampus and forebrain cortex

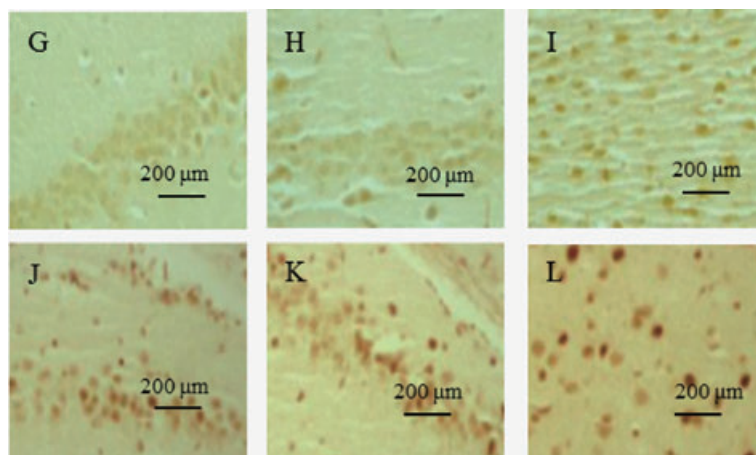


注:A:BDNF 在观察组小鼠海马 CA1 区表达;B:BDNF 在观察组小鼠海马 CA2 区表达;C:BDNF 在观察组小鼠前脑皮质表达;D:BDNF 在对照组小鼠海马 CA1 区表达;E:BDNF 在对照组小鼠海马 CA2 区表达;F:BDNF 在对照组小鼠前脑皮质表达。

图 2 BDNF 在海马和前脑皮层的表达情况

Note. A, Expression of BDNF in the hippocampal CA1 region of the observation group mice. B, Expression of BDNF in the hippocampal CA2 region of the observation group mice. C, Expression of BDNF in the forebrain cortex of the observation group mice. D, Expression of BDNF in the hippocampal CA1 region of the control group mice. E, Expression of BDNF in the hippocampal CA2 region of the control group mice. F, Expression of BDNF in the forebrain.

Figure 2 BDNF expression in hippocampus and forebrain cortex



注:G:VEGF 在观察组小鼠海马 CA1 区表达;H:VEGF 在观察组小鼠海马 CA2 区表达;I:VEGF 在观察组小鼠前脑皮质表达;J:VEGF 在对照组小鼠海马 CA1 区表达;K:VEGF 在对照组小鼠海马 CA2 区表达;L:VEGF 在对照组小鼠前脑皮质表达。

图 3 VEGF 在海马和前脑皮层的表达情况

Note. G, Expression of vascular endothelial growth factor in the hippocampal CA1 region of the observation group mice. H, Expression of vascular endothelial growth factor in the hippocampal CA2 region of the observation group mice. I, Expression of vascular endothelial growth factor in the forebrain cortex of the observation group mice. J, Expression of vascular endothelial growth factor in the hippocampal CA1 region of the control group mice. K, Expression of vascular endothelial growth factor in the hippocampal CA2. L, Expression of vascular endothelial growth factor in the forebrain cortex of the control group mice.

Figure 3 Expression of vascular endothelial growth factor in hippocampus and forebrain cortex

3 讨论

抑郁症是一种情绪障碍性精神病,其主要特点是情绪低落、思维迟钝、语言运动减少、自责自责、得失受挫,甚至有自杀倾向,严重影响了人们的身心健康及生活质量。随着社会的发展,社会竞争更加激烈,人们的精神压力倍增,抑郁症的发病几率大大增加,现逐渐得到人们的广泛关注。据报道,

强烈应激或长期处于应激状态会对人们的健康产生严重影响^[9]。经多项研究表明,电击足底、高台、禁食、孤独等多种应激原均可引起动物脑内神经递质、神经激素等的改变,导致动物行为及学习记忆功能的损害^[10]。本组实验以小鼠为研究对象,采用多种应激原刺激建立慢性刺激随之的小鼠抑郁模型,观察海马和前脑皮质 BDNF 和 VEGF 的表达情况,并分析海马和前脑皮质 BDNF 和 VEGF 表达与

慢性应激所致小鼠抑郁的相关性。

海马中含有多种信使受体,特别是皮质类固醇、兴奋性氨基酸和血清素受体,它们是对应激最敏感的区域。有研究发现,慢性应激会对海马结构产生严重影响,使海马结构产生器质性改变,可能与肾上腺素分泌的糖皮质激素对海马的直接作用有关^[11]。本组研究中,观察组小鼠中央区停留时间、逃避潜伏期、游泳路程及在第二象限的停留时间明显高于对照组,修饰次数、垂直运动得分明显低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示慢性应激能够导致学习记忆的损伤,降低小鼠的兴奋性、适应性以及对环境的警觉性。这可能与慢性应激会使小鼠出现脑体积缩小,海马容量降低等脑内改变有关。海马区是空间记忆形成和保持的部位,空间学习记忆能力可以作为反应抑郁的重要指标^[12]。

近年来,神经营养因子与抑郁症的关系备受人们关注,BDNF 表达水平与抑郁症的发生关系密切。BDNF 是神经营养因子家族的一员,主要表达于中枢神经系统,包括大脑皮层、下丘脑、海马等,是脑内分布最广泛的神经营养因子^[13]。本组研究中,观察组海马 CA1 区、CA3 区及前脑皮层 BDNF 表达水平明显低于对照组($P<0.05$),提示 BDNF 可能参与了慢性应激对小鼠海马及前脑皮层的损伤。BDNF 是一种小分子多肽物质,能够维持神经元功能、促进神经元再生、修复以及预防神经元退行性疾病,而慢性应激会明显减少海马神经元的数量,降低 BDNF 表达水平。与 Sobreviela 等^[14]研究结果相同。

VEGF 一种高度保守的同源二聚体糖蛋白,能够直接作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞的增殖,提高血管通透性。Glat 等^[15]认为血管系统是构成海马神经元再生的重要微环境,VEGF 发生可能对抑郁症的发生具有一定影响。本组研究结果中,观察组海马 CA1 区、CA3 区及前脑皮层 VEGF 表达水平明显低于对照组($P<0.05$)。提示 VEGF 具有抗抑郁样作用,VEGF 表达下降能够导致抑郁症的发生。这可能与慢性应激能够明显抑制血管内皮细胞增殖,抑制海马齿状回颗粒细胞层下区的神经祖细胞表达神经元和胶质细胞有关^[16]。

综上所述,慢性应激会导致小鼠出现体重减轻、学习记忆损伤、环境警觉性降低等抑郁样行为,慢性应激后,小鼠海马及前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达水平明显降低,其表达与慢性应激所致小鼠的抑郁具有一定相关性。

参考文献:

[1] Kessler RC, Barber C, Birnbaum HG, et al. Depression in the

workplace: effects on short-term disability [J]. Health Aff (Millwood), 1999, 18(5): 163-171.

- [2] Kohout FJ, Berkman LF, Evans DA, et al. Two shorter forms of the CES-D depression symptoms index [J]. J Aging Health, 2016, 5(2): 179-193.
- [3] Degenhardt L, Hall W, Lynskey M. Exploring the association between cannabis use and depression [J]. Addiction, 2003, 98(11): 1493-1504.
- [4] Chibowska K, Korbecki J, Gutowska I, et al. Pre- and neonatal exposure to lead (Pb) induces neuroinflammation in the forebrain cortex, hippocampus and cerebellum of rat pups [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 1083.
- [5] Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, et al. Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. JAMA Neurol, 2016, 73(3): 337-344.
- [6] Zhang MD, Barde S, Yang T, et al. Orthopedic surgery modulates neuropeptides and BDNF expression at the spinal and hippocampal levels [J]. Proc Natl Acad U S A, 2016, 113(43): E6686-E6695.
- [7] Fusco FR, Zuccato C, Tartari M, et al. Co-localization of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and wild-type huntingtin in normal and quinolinic acid-lesioned rat brain [J]. Eur J Neurosci, 2015, 18(5): 1093-1102.
- [8] Turner CA, Calvo N, Frost DO, et al. The fibroblast growth factor system is downregulated following social defeat [J]. Neurosci Lett, 2008, 430(2): 147-150.
- [9] 徐龙进, 王可洲. 小鼠慢性应激性抑郁症易感品系筛选及其机制初步研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(4): 257-262.
- [10] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, et al. spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor [J]. Exp Neurol, 2017, 174(2): 201-214.
- [11] Adlard PA, Perreau VM, Engesser-Cesar, et al. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise [J]. Neurosci Lett, 2017, 363(1): 43-48.
- [12] Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance [J]. J Neurosci, 2016, 23(17): 6690-6694.
- [13] Fernandes BS, Molendijk ML, Köhler CA, et al. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: a meta-analysis of 52 studies [J]. BMC Med, 2015, 13(1): 289.
- [14] Sobreviela T, Pagcatipunan M, Kroin JS, et al. Retrograde transport of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) following infusion in neo- and limbic cortex in rat: relationship to BDNF mRNA expressing neurons [J]. J Comp Neurol, 1996, 375(3): 417-444.
- [15] Glat MJ, Benninger F, Barhum Y, et al. Ectopic muscle expression of neurotrophic factors improves recovery after nerve injury [J]. J Mol Neurosci, 2016, 58(1): 39-45.
- [16] Wallensten J, Åsberg M, Nygren Å, et al. Possible biomarkers of chronic stress induced exhaustion - a longitudinal study [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0153924.

[收稿日期]2019-07-06

张彩勤,白冰,赵勇,等. 新冠疫情下的实验动物学线上教学体会 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 98-101.
Zhang CQ, Bai B, Zhao Y, et al. Experience of online teaching for laboratory animal science during the COVID-19 epidemic situation [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 98-101.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.015

新冠疫情下的实验动物学线上教学体会

张彩勤,白冰,赵勇,师长宏*

(空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 新冠疫情下开展实验动物学的线上教学是对传统教学模式的有效补充和完善,需要熟悉网络软件的操作,熟练运用网络实现授课意识的转变;教员应保持授课思路的连贯性,重点关注 PPT 的讲述,充分利用现有的慕课资源展示动物实验操作,完成实践课教学,教会学员在网络环境中如何有效掌握授课内容;同时在授课中应及时增加与新冠病毒相关的内容,激发学员的学习兴趣;完善课程学业考核方式,积极推进实验动物学教学改革,不断提升实验动物学网上教学效果。

【关键词】 网络教学;实验动物学;新型冠状病毒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0098-04

Experience of online teaching for laboratory animal science during the COVID-19 epidemic situation

ZHANG Caiqin, BAI Bing, ZHAO Yong, SHI Changhong*

(Laboratory Animal Center of the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Online teaching of laboratory animal science during the COVID-19 epidemic situation is an effective supplement and improvement to the traditional teaching model. It is necessary to know the operation of network software packages and apply them to realize the transformation of teaching consciousness. Teachers should maintain continuity of teaching ideas, focusing on the presentation of PPT, and demonstrate animal experimental operations using the existing Massive Open Online Course (MOOC) resources. All efforts are to teach students how to effectively master the content of lectures in the network environment. Moreover, the content related to COVID-19, especially for animal experiments, should be included in lectures to stimulate the students' interest in learning. We should also improve course evaluation method, promote the reform of laboratory animal science teaching, and constantly enrich the teaching model of laboratory animal science.

【Keywords】 online teaching; laboratory animal science; COVID-19

2019年年底以来席卷全球的新冠病毒感染事件对人们的生活产生了严重影响。受此波及,各类院校的教学也由传统的课堂讲授彻底转化为线上授课,教学模式发生了根本性变化,相应的教学设

计必须做出适应性调整^[1]。在此期间我们进行了本科生《医学实验动物学》教学,根据网络课程的要求,结合实验动物学的特点对教学内容进行适当的完善和丰富,以期达到良好的教学效果。现将有关

[作者简介] 张彩勤(1981—),女,硕士,副教授,研究方向:实验动物学疾病模型制备和评价。E-mail: zhangcaiqin-beibei@163.com

[通信作者] 师长宏(1973—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型制备。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

体会总结如下。

1 作好必要的准备工作

开课前的准备至关重要,重点是根据网络课程的特点和要求,进行适应性调整,重点要培训教员熟悉各种授课软件的使用,了解其功能,熟练操作,迅速实现教学所需的各种职能;同时强化授课意识的转化,明确网络授课的基本点。

1.1 熟悉网络软件的操作

客观方面,因为是线上授课,要求我们授课教员必须熟悉授课软件的操作,熟练应用软件完成预想的各种功能。目前选择的网课媒体主要有超星、腾讯会议和钉钉等网络平台,QQ 和微信可以作为辅助工具。如何上传资料,如何操作签到,如何录制课程,如何同步投屏等一系列操作必须熟知,确保在较短时间内实现我们的教学目的。

1.2 教员授课意识的转变

主观方面,不同于线下面对面的直接授课,大量的课上时间教员必须面对显示屏,教员需要找一下画面感,要感觉对面真的坐着学生,授课过程中必须保持思维连贯和清晰,不能出现思维断片或突然讲授停止的状况,不能被外界环境所干扰,要做到始终保持如课堂授课一样的饱满的精神状态。

2 教学设计的调整

无论是网络线上教学还是现场授课,教学设计均是有效实施授课内容的重要纲领和手段^[1]。应针对线上授课的特点,结合实验动物学的实际,将尽可能多的实践操作转化成理论讲述,增加实践操作的视频学习,同时适时补充新冠病毒与动物实验相关的内容,增强课程的时效性,激发学员的学习兴趣^[2]。

2.1 理论教学成为课程的主题

传统的实验动物学教学分为理论课程和实践课程两部分,由于实验动物学偏重技能培养,因此实践课程在教学中占据了较大比重^[3]。疫情发生后,线上教学就无法开展操作实习,必须将更多的操作转化成理论讲述,需要大量的幻灯、微课和短视频片去展示实验操作的细节^[4-5],因此需要将所有的授课内容尽可能体现为线上 PPT。

2.2 增加动物实验生物安全课程内容

为了增强课程的时效性,激发学员的学习兴趣,在原定课程内容中,增加与新冠病毒相关的内容,比如:实验用动物与实验动物的比较、实验动物

的微生物学分类与控制、生物安全动物实验室(ABSL)、动物实验室生物安全防护等,让学生明确实验动物的教学内容与我们的现实生活息息相关。

3 教学模式的转换

线上教学由于无法与学生见面,一直由教员授课,课堂气氛无法把控,学员的学习状态无法及时获取,缺乏有效的互动,因此需要教员在教学模式方面进行调整,间接提升课堂授课效果。重点关注 PPT 的设计,采取适当的方式增强师生之间的互动,调动学员的课堂氛围。同时,直播授课与录播授课可以穿插应用,实现教学模式的随机转化。

3.1 如何讲好 PPT

讲课的时候可将 PPT 内容模块化,可以将一整节课的内容进行有目的的拆分组合,拆分成约 15~20 min 的内容模块,并及时进行模块内容小结,不仅可以依据学员的记忆疲劳时间规律,可以提醒学员有新的知识点切入,不时地提起学生的兴趣点,便于学生有效掌握各个知识点。由于网络显示的原因,屏幕较小,学生可能需要花费比课堂教学多的时间对 PPT 仔细进行阅读和消化,因此每个幻灯片的内容不宜太多,多一些时间进行讲解,特别是要避免出现一晃而过的幻灯,使学生根本没有时间去连续学习幻灯的知识点。这样就对教员制作的 PPT 质量提出了更高的要求。

3.2 如何调动学员的课堂情绪

首先可在上课前的 10 min 内,利用调试设备的时间,和学生互动讨论每个人所在地区的天气情况,或所在地区的防疫现状等各种话题,将学生拉回到课堂授课的氛围中,增强学员的课堂参与度。同时要充分利用网络资源,利用线上教学 APP 的各种功能,如设置开始上课的铃声提示,可调动学员立即进入上课状态。

第二,要积极感染学生。教员应该保持如同现场授课的状态,情绪饱满、精力旺盛、充满激情的讲述课程,学生必然会受到感染。如果因为看不到学生,教员情绪平淡,甚至低落,一味地为了完成任务而机械地讲解,学生必然会受教员的感染,自然也就没有听课的情绪了,注意力就很难集中,网络讲述的效果自然就不会好。

第三,要学会寓教于乐。枯燥乏味的讲解任何一个学生都不愿意听,因此采用多种灵活的教学方法可以达到寓教于乐的目的^[6]。必要时讲一些现

实发生的例子,如新冠疫情中的相关报道,或是结合学生实际生活中与实验动物相关的话题,比如宠物猫或犬是否可以成为中间宿主传播新冠病毒,新冠疫情期间如何做好动物实验室的消毒等问题。有时适当地设疑、提问也能促使学生注意力集中,达到调动学生课堂注意力的目的。

3.3 如何增强师生之间的互动

由于网络传输的问题,可以在一堂课中让部分学生连一次麦,听到学生的声音。学生也可在讨论区留言提问,教师可在每次小结后针对这些问题做出解答。也可以点名提问部分学生,不过,互动的量得适度控制,如果互动与课程流畅度有冲突,先以流畅为主,同时不能影响课程进度。

3.4 如何选择直播与录播

直播与录播的选择主要取决于教员对课程的把握、熟悉程度。作为现在网络教学的绝对主流与大势,直播可以实时把握课堂进度,了解学员状态,是网络教学的绝对主流和趋势,因其互动性、时效性、调动学生积极性,在线直播受到无数老师和学生的喜爱,但可能受网络影响会出现异常状况。录播可以顺畅地完成整体教学内容,像现在的慕课、公开课等,都是录播的形式,这更加方便我们对于具体的知识点的学习和稳固,或者对于参考学习内容,采用录播的方式也能满足学员的广泛需要,随时随地的可以观看学习。但录播缺乏互动性,对于学员反应和教学效果无法掌控。

同时,无论直播还是录播必须关注授课的速度,可以结合网速进行调整,网速好的,可以语速快一些,如果网速不理想,可以比平时上课的语速慢。但是,一定不能让讲述的句子断断续续,更不要造成冷场,老师必须带着学生们的思维走,这和面对面授课有很大的不同,老师可能需要适时调整。也可以根据教学的进展情况,连续动态观察学员的表现,收集总结网课教学效果,将直播和录播穿插在教学中,使学生能够有与教员互动的机会和感觉。

4 实验动物学的特色教学

新冠疫情发生,与之相关的动物实验在全国迅速展开,无论是生物安全领域,还是动物模型创制领域,以及资源库建设等方面均取得显著成果,且在不断的丰富和完善,在实验动物学的教学中适时加入相应的研究成果和进展,可有效提升学员对实验动物重要性的认识;同时结合实验动物学实践教

学的特点,引入尽可能多的网络慕课资源,提升学员对技术环节的直观感性认识。

4.1 如何结合新冠病毒研究的进展讲好实验动物

实验动物在本次新冠疫情中发挥了重要的作用,结合 2020 年 5 月 Science 在线发表的文章^[7]可以向学员介绍小鼠、大鼠和非人灵长类在病毒疫苗评估中的作用;结合 2020 年 5 月 Nature 在线发表的文章^[8]可以讲述人源化转基因动物在感染性疾病动物模型研究中的应用;结合科技部批准在医科院动物所建立了国家人类疾病动物模型资源库(2020 年 4 月 16 日批准建设),强调说明动物模型资源的重要性,提升学员对实验动物资源重要性的认识。由于新冠病毒的细胞结合受体为 hACE2^[9],因此转入人 ACE2 的基因修饰小鼠为理想的感染动物模型,该类动物的特点和应用补充在授课内容中,使学员对实验动物的应用有更加深刻的认识和了解。

4.2 如何更好地实施实验动物学实践教学

实践教学是此次网课教学中最难实施的环节。每次设计的操作必须有理论讲述,同时尽量收集相应的操作影像资料,在课堂播放或是存放在资料库中供学生自主学习。充分利用现有的慕课资源展示动物实验操作。目前有许多微信公众号展示动物实验操作技术,例如“实验动物加(Lapulus)”,其内容就涉及注射给药、组织取材、胚胎操作、麻醉和动物实验小手术等常用技术操作方法,视频和图文资料丰富、清晰,实用性强,具有较好的指导性。

5 考核方式的思考

课程评价采用学员评价、教研室自我评价及督导组评价等方式。为客观全面反映学员在本课程学习中的学习水平、态度、能力及成效,在课程实施过程中不定期组织学员问卷调查,结合评价意见不断完善课程设计。最终采用闭卷、笔试的方式,考核学员课堂知识的学习水平和解决实际问题的能力^[10]。

5.1 教员授课质量评价

建立教员授课质量评价体系,可从学生评价、同行评价和教学管理部门评价等进行“三位一体”的总体评价^[9]。评价的指标主要包括:课堂内容融会贯通,讲解精炼;理论联系实际,易于理解;层次分明,重点突出,不照本宣科,语言生动,快慢适中;熟练应用专业外语词汇,注重双语教学和启发式教学,调动学生积极思维;结合教学内容重视素质和辩证唯物主义;教学内容丰富,反映学科进展。

5.2 学员课程学业考核

课程考试方式主要采用闭卷、笔试的方式,根据教学内容设计进行命题,并实行教考分离,力求公正客观地考核学员课堂知识的学习水平、应用理论知识分析和解决实际问题的能力。以百分制评分,60 分及格,满分为 100 分。除了理论课的内容,还安排有实践课的内容考核,重点考察学员对动物实验基本技能的理解,综合反映学生的实验理论水平和学习态度。课程结束后认真做好学员考试成绩统计分析和试卷质量分析报告,并进行教学档案归档管理。

6 结语

总之,在新冠疫情发生的背景下,为了作好实验动物学线上教学,必须首先熟悉网络软件的操作,熟练运用网络实现授课意识的转变;教员应保持授课思路的连贯性,重点关注 PPT 的讲述,充分利用现有的慕课资源展示动物实验操作,学员应学会在网络环境中如何有效掌握授课内容;同时在授课中增加与新冠病毒相关的内容,增强课程的时效性,激发学员的学习兴趣;在考核环节可从学生评价、同行评价和教学管理部门评价等进行“三位一体”的总体评价。

新冠疫情的发生是对传统教学模式的挑战,对实验动物学教学也是一个机遇,我们应充分利用这次疫情特征,积极推进实验动物学教学改革,结合实验动物学教学特征,积累线上教学经验,不断完善实验动物学教学模式。

参考文献:

- [1] 吴艳玲, 张先, 崔振宇, 等. “双一流”模式下高校研究生实验动物学课程教学模式探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 111-114.
- [2] 罗红, 沈祥春, 智妍, 等. 突出“趣味”教学理念的实验动物学课程教学改革 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4): 334-336.
- [3] 肖春兰, 盛雅洁, 王禹斌, 等. 医学院校实验动物学课程改革的几点建议 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(6): 496-498, 504.
- [4] 张爱华, 曾文滔. 医学院校实验动物学教学改革实践与探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 93-95.
- [5] 杨丽, 楚元奎, 杨文, 等. 微视频在医学实验动物学教学中的应用优势 [J]. 教育教学论坛, 2020, 7: 251-252.
- [6] 刘念, 赵薇. 医学院校《医学实验动物学》课堂教学模式改革初探 [J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(15): 8-10.
- [7] Gao Q, Bao L, Mao H, et al. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 [J]. Science, 2020, 369(6499): 77-81.
- [8] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature [EB/OL]. [2020-05-07]. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2312-y>.
- [9] Bao L, Gao H, Deng W, et al. Transmission of SARS-CoV-2 via close contact and respiratory droplets among hACE2 mice [J]. J Infect Dis, 2020, 222(4): 551-555.
- [10] 崔亚利, 耿梅英, 徐瑞涛, 等. “实验动物学”教学中培养本科生专业能力的实践与思考 [J]. 河北农业大学学报(农林教育版), 2017, 19(1): 92-95.

[收稿日期] 2020-06-22

刘梦迪,张连峰,吕丹. 心肌肥厚动物模型及代偿机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 102-106.

Liu MD, Zhang LF, Lyu D. Research progress on animal models of cardiac hypertrophy and compensation mechanisms [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 102-106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.016

心肌肥厚动物模型及代偿机制研究进展

刘梦迪¹, 张连峰², 吕丹^{1*}

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

【摘要】 心肌肥厚是一种缓慢发展的有效代偿功能, 主要发生在长期压力负荷的情况下, 是对血流动力学或心肌损伤的适应性反应, 心肌肥厚失代偿最终会增加心力衰竭和猝死的发生率, 目前尚无有效的治愈方法。本文就心肌肥厚动物模型, 包括小鼠、大鼠及大型动物的制备方法及各自特点, 进行总结和比较。同时对心肌肥厚经典分子信号机制, 包括有丝分裂蛋白激酶(MAPKs)信号通路及 Ca^{2+} 介导的信号通路等, 以及心肌肥厚引发的失代偿分子机制, 包括儿茶酚胺及心肌细胞凋亡等信号通路进行的总结和比较。

【关键词】 心肌肥厚; 动物模型; 机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0102-05

Research progress on animal models of cardiac hypertrophy and compensation mechanisms

LIU Mengdi¹, ZHANG Lianfeng², LYU Dan^{1*}

(1. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China.
2. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【Abstract】 Cardiac hypertrophy is a slow and effective compensatory function that mainly occurs under long-term stress loads. It is an adaptive response to changes in hemodynamics or myocardial injury. Decompensation of myocardial hypertrophy can eventually lead to an increased incidence of heart failure and sudden death, and no effective treatments have been established. In this paper, we summarize and compare the preparation method and characteristics of animal models of cardiac hypertrophy, including mice, rats, and large animals. We also summarize and compare the classical molecular signaling mechanisms of cardiac hypertrophy, including the mitotic protein kinase signaling pathway and the Ca^{2+} mediated signaling pathway, as well as the molecular mechanisms of decompensation induced by cardiac hypertrophy, including catecholamine and the cardiomyocyte apoptosis signaling pathway.

【Keywords】 cardiac hypertrophy; animal model; mechanism

心肌肥厚通常是作为对血流动力学压力或心肌损伤的适应性反应而引发的^[1-2], 表现为心肌质

量增加, 收缩力增加, 对增强心脏功能、降低心室壁张力和耗氧量具有补偿作用, 有助于维持心输出

【基金项目】 国家自然科学基金(31872314)。

【作者简介】 刘梦迪(1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事心血管相关动物模型及其机制的研究。E-mail: liumengdi@cnilas.org

【通信作者】 吕丹(1980—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事心血管相关动物模型创制, 发病机制及基因功能分析。

E-mail: lvd@cnilas.org

量,维持正常的血液循环,是一种缓慢发展的有效代偿功能。在细胞学方面,心肌肥厚的特点是心肌细胞变大,肌节结构分离,蛋白质合成增强以及胎儿基因重新表达。在心肌肥厚的超声心动图中可观察到增厚的室间隔,缩小的左心室腔,变窄的左室流出道,且二尖瓣前叶收缩期前移,主动脉瓣收缩中期呈现出部位性关闭等。虽然心肌肥厚最初可能是代偿性和适应性的,在心血管疾病的早期阶段可以提供某些益处,但长期病理学心肌肥厚将改变心脏基因的表达,细胞间肌纤维和血管周围纤维化及功能障碍,从而导致失代偿,心力衰竭和猝死的发生率增加。目前的研究表明,肾素-血管紧张素系统抑制剂 (renin-angiotensin system inhibitor, RASI)、 β 受体阻滞剂 (beta blocker, BB)、血管紧张素转化酶抑制剂、他汀类药物等对心肌肥厚有一定的治疗效果。RASI 和 BB 联合拮抗交感神经和肾素-血管紧张素系统,对心室的重构、新功能的改善以及远期预后等方面有益^[3-7]。本文对心肌肥厚动物模型及代偿失代偿分子机制的研究进展进行了归纳总结。

1 心肌肥厚动物模型及制备方法

心肌肥厚动物模型已经在小鼠、大鼠、犬、羊、猪等物种中建立,小鼠及大鼠的优点是基因背景信息齐全,商品化试剂丰富,同时经济且易饲养。大动物的优点是操作容易,重复性好,对动物造成的损伤较小,存活率高,并且更符合人体解剖和血流动力学的特点,尤其是猪。

1.1 大鼠心肌肥厚模型

目前大鼠模型在心脏损伤相关研究中仍占主导地位,它们较大的尺寸极大地促进了手术操作和术后研究,其心肌肥厚模型的建立采取物理法、化学法和生物法。

1.1.1 物理法

物理法包括压力超负荷法、容量负荷法、心肌梗死和运动致心肌肥厚^[3]。

压力超负荷法主要包括:(1)主动脉缩窄法 (transverse aortic constriction, TAC):在大鼠无名动脉和左颈总动脉之间结扎主动脉弓,经过 4 周形成明显的左心室心肌肥厚;(2)腹主动脉缩窄法 (abdominal aortic constriction, AAC):在大鼠的腹腔动脉和肠系膜前动脉之间进行结扎,得到重建后的直径为 0.55 mm。在 AAC 术后进行超声心动图检查,同时结合组织学和血浆脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 水平综合评判,术后第 4 周诱导左心

室心肌肥厚。(3)肾型高血压法^[8-10]:把左肾动脉用内径为 0.2 mm 的银夹夹住,造成肾缺血,使肾内产生肾素,增加血内的血管紧张素 II 含量,致使高血压形成,长期刺激而产生心肌肥厚。术后避免感染需给予青霉素,4 周后在清醒状态无创收缩压 ≥ 160 mmHg 者为造模成功。该方法的优点在于同人类的病理模型相似,由于高血压比较稳定,可逐渐形成心肌肥厚,因此该模型也常被用来研究心肌肥厚。

容量负荷法包括:(1)动静脉造瘘法:腹部正中中进行切口,在其左肾动脉下面分离出腹主动脉和下腔静脉,血管夹夹断血流。9 号静脉注射针依次穿过下腔静脉壁和动静脉联合壁,鲜红色动脉血流出后将针头退出,然后进行缝合。造瘘成功的标志为松开血管夹后,见下腔静脉红色血流,这种方法 4~5 周可形成心肌肥厚;(2)DOCA 盐敏感性高血压法^[11]:切除大鼠的左肾,在术后 1 周皮下植入含去氧皮质醇 (deoxycortisol, DOCA) 的微泵或注射 DOCA,按照 50 mg/kg 连续每天给药,持续 9 周,术后 8 周便可形成心肌肥厚。

心肌梗死致心肌肥厚采用冠状动脉结扎、堵塞或促进冠状动脉血栓形成等方法^[12-13],有研究显示在结扎冠状动脉左前降支一周后可见心肌肥厚。

运动致心肌肥厚^[13-14]包括:(1)跑轮训练致心肌肥厚:在有一定阻力的跑轮上无外界干扰进行自主训练,跑步距离在 2~4 周达到每天 10~15 km,此时距离最长,之后为每天小于 4 km,3~4 周可观察到心肌肥厚;(2)游泳训练致心肌肥厚:对大鼠进行每日 2 次,每次 1 h,每周 5 d,为期 8 周的游泳训练,可见发生显著的心肌肥厚。

1.1.2 化学法

化学法是利用化学试剂或药物对动物机体产生作用而诱发动物疾病^[15-17]。化学法诱发心肌肥厚主要是药物诱导法,该方法需要的时间短、操作简便且心肌肥厚可很快形成、出现明显的心肌病变。具体操作过程即给受试动物注射或在皮下植入渗透泵等,使其在某一种药物的持续刺激下形成心肌肥厚。主要用的药物有去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、去氧肾上腺素 (phenylephrine, PE)、异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO)、甲状腺素、血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 等。

1.1.3 生物法

生物法目前有自发性高血压大鼠模型^[10]。自发性高血压大鼠在出生之后,随着时间变化,血压不断升高,心肌质量在 4 周时开始增加,血压在 3~4

个月时稳定升高,心肌肥厚加重。

1.2 小鼠心肌肥厚模型

上面阐述的大鼠制备方法,在小鼠上亦可获得心肌肥厚,同时,小鼠是目前基因修饰种类最为丰富的物种,在研究基因功能及相关发病机制方面应用最为广泛,通过基因修饰可以获得遗传性心肌肥厚模型。此外,在感兴趣基因的基础修饰小鼠上给予心肌肥厚刺激,是小鼠心肌肥厚模型未来的主要研究方向。

基因修饰获得心肌肥厚包括:1)肌球蛋白突变模型:2条重链(MHC)和2条轻链(MLC)一同构成肌球蛋白,MHC又有 α 和 β 两种亚型。小鼠 α -MHC基因第403密码子错义突变会致使其左心房间肌肥厚;2)肌球蛋白结合蛋白C(MYBPC)突变模型:小鼠的心肌肥厚可由MYBPC的缺失、插入或剪接位点的突变等致使;3)肌钙蛋白突变^[18]:小鼠TnT突变,该突变导致TnT外显子缺失小鼠表现出较小的左心室,严重的舒张期和较轻的收缩功能障碍。

1.3 大型动物心肌肥厚模型

啮齿类动物与人类的心脏在结构、心率、耗氧量、收缩力、蛋白质表达等方面都存在差异,因此,大型动物心肌肥厚及代偿失代偿模型的建立具有重要研究价值。

大型动物除了上面阐述的DOCA盐敏感性高血压法、化学法外,其特有的心肌肥厚模型建立方法有:1)二尖瓣返流(mitral regurgitation, MR)致心肌肥厚:常用的实验动物为犬或羊。该方法采用胸内或开胸手术断裂动物瓣膜上的腱索来破坏二尖瓣,前者借助超声定位,用心肌活检钳将二尖瓣前叶缘上一条腱索夹断;后者需在胸骨正中切口,将心包切除,金属器械插进左心室心尖或切开心房来将腱索破坏,从而造成二尖瓣关闭不全,致使心肌肥厚;2)主动脉束带法^[19]:常用的实验动物为猪。该方法是进行手术干预,通过结扎或夹子(主动脉束带)部分阻塞升主动脉或降主动脉,然后突然增加闭塞前压力,通过束带逐渐形成主动脉缩窄以及肺动脉或肾动脉狭窄,从而引起左心室肥厚。

2 心肌肥厚分子机制研究进展

心肌肥厚通常是作为对血流动力学压力或心肌损伤的适应性反应而引发的,即心脏为适应各类刺激而发生的心肌质量增加,体积增大。在初始的代偿阶段,心室容积轻微增大,肥大的心肌细胞收缩和舒张的时间变长,速度变慢,但仍可保持良好

的肌纤维缩短和心室排空能力。心肌肥厚是很多心脏疾病发展的一个重要阶段,但它的形成机制仍不完全清楚,目前有关的研究都集中在一些通路上。

2.1 有丝分裂蛋白激酶(MAPKs)信号通路

MAPK信号通路包括以下分支:1)细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERKs):ERK分支的信号通常在细胞膜上与Ras激活协同启动。Ras与Raf偶联,之后偶联MAPK激酶MEK1和MEK2,MEK1/2作为双重特异性激酶起作用,可直接磷酸化ERK1和ERK2激酶中的TEY基序;2)c-Jun N末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNKs):MAPK激酶激酶的激活,如MEKK1,促进双重特异性激酶MKK4和MKK7的激活,进而直接磷酸化JNK蛋白中的TPY基序;3)p38激酶^[20]:p38激酶中的TGY基序可以通过激酶之间的偶联被磷酸化而发挥作用。在心肌细胞中,上述三个MAPK分支中的每一个都由G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)通过神经内分泌因子如血管紧张素II、内皮素-1和儿茶酚胺来调节,此类激活特征表明MAPK信号介导或调节心脏肥大反应。

2.2 Ca^{2+} 介导的信号通路

在细胞内,增多的 Ca^{2+} 可致使心肌肥厚,这可以作为最基本的信号。其主要机制有:(1)钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)信号通路^[21-23]:CaN直接与细胞质中活化T细胞(nuclear factor of activated T cells, NFAT)转录因子的核因子结合并使其去磷酸化,从而使它们易位至细胞核中,介导肥大基因的表达;(2)钙调素依赖性蛋白激酶信号通路:钙调蛋白依赖性激酶II受 Ca^{2+} 钙调蛋白复合物和ROS的调节,交换蛋白被cAMP激活,直接诱导心脏肥大。

2.3 蛋白激酶信号通路

蛋白激酶信号通路有^[24-26]:1)磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶(protein kinase B, Akt)信号通路:Akt1短期激活通过协调上调VEGF的表达诱导生理性肥大,而Akt1长期激活促进病理性肥大;2)蛋白激酶C(protein kinases C, PKC)及其介导的信号通路:PKC在发挥作用时,一方面可以直接移入细胞核调节核基因的表达,另一方面可以在胞浆内通过活化Raf-1与MAPK信号通路偶联。有研究表明, α -肾上腺素能受体通过Gq-磷脂酶C途径激活PKC,这是对心脏肥大的有效刺激。

2.4 Janus 激酶(JAK)/信号转导子和转录激活子(STAT)信号通路

心肌表达多种IL-6家族细胞因子^[26-27]。JAK/STAT通路可以在IL-6细胞因子与糖蛋白130结合

之后被激活,进而参与细胞生物过程。研究证实,激活的 JAK-STAT 通路可以致使心肌肥厚,并与心肌梗死、扩张性心肌病等相关。

2.5 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路

AMPK 是细胞中的节点能量传感器,可以随着营养利用而协调代谢输出的增加。AMPK 是一种异源三聚体蛋白激酶,由催化性 α 亚基、连接 α 和 γ 的 β 亚基和结合糖原组成, γ 亚基以相互排斥的方式结合 AMP、ADP 或 ATP。AMPK 通过构象变化导致其活化^[28]。能量水平下降导致 AMP 激活 AMPK,通过刺激脂肪酸氧化,葡萄糖摄取和糖酵解及减少依赖于 ATP 的过程来促进转录和蛋白质合成。因此,AMPK 对心脏动态平衡至关重要,大多数研究表明,长期抑制 AMPK 会加剧病理性肥大,导致心力衰竭,而间歇性 AMPK 激活可能具有心脏保护作用。

2.6 MicroRNAs(miRNAs)信号通路

MicroRNA(miRNA)的功能是使特定的 mRNA 转录功能沉默^[29]。单个 miRNA 可能具有数十至数百个靶基因,并且有越来越多的证据表明 miRNA 在心脏发育、肥厚和衰竭中起作用。

3 心肌肥厚失代偿分子机制研究进展

流行病学的研究表明,心脏正常的心肌肥大随着时间的推移会降低心脏的功能,导致组织学纤维化、 Ca^{2+} 处理蛋白失调、线粒体功能异常、心肌细胞损伤、舒张功能障碍和纵向收缩功能均恶化,发展为“心肌肥厚失代偿”,并在临床上会导致心力衰竭。心肌肥厚失代偿的分子机制研究主要集中在经典信号传导通路、细胞的生长与凋亡以及心肌细胞的钙代谢等方面。

3.1 经典信号传导通路

3.1.1 血管紧张素 II 系统及其信号通路

受体 1(AT1)和受体 2(AT2)是 Ang II 的受体^[30-31],一些通路可在 Ang II 与 AT1 结合后活化,而细胞生长的抑制及细胞凋亡均与 AT2 有关。

3.1.2 G 蛋白和环磷酸腺苷(cAMP)

研究表明,Gq 通过参与 Ang II 等诱导的信号传递来阻止 Akt 磷酸化,则致使心肌细胞凋亡增强,造成心脏的功能失调。在 β 肾上腺能受体激活后,腺苷酸环化酶被 $\text{Gs}\alpha$ 亚单位激活产生 cAMP,可以活化蛋白激酶 A(protein kinases A,PKA)。PKA 可以磷酸化多种与心肌功能有关的蛋白质^[32-33]。

3.1.3 生长因子及其信号传导通路

多数生长因子受体是跨膜受体酪氨酸激酶,经

过 Ras、Raf、MEK、ERK 途径活化转录因子,调节核内基因的表达。生长因子 FGFs、IGFs、PDGFs、TGFs^[34],均会使得心肌细胞肥大。

3.2 细胞凋亡

细胞凋亡在调节细胞数量和结构重塑中发挥重要作用^[35]。有研究显示,细胞凋亡致使的心肌细胞丢失,会引发心功能失调,发展下去致使心衰,这说明细胞凋亡在心肌肥厚代偿向失代偿发展的过程之中起作用。

3.3 心肌细胞的钙代谢

钙代谢与心肌细胞舒缩联系紧密^[36]。心肌钙的钙释放是钙离子通过细胞表面的 L-型钙离子通道(LCC)内流,激活肌质网上的雷诺定受体(ryanodine receptor,RyR),促进肌质网内的钙离子流入胞质,从而引起胞内钙离子浓度瞬时增加,其控制着心肌收缩的力量,研究表明在心脏肥大及失代偿进程中心肌钙释放失调发挥了重要作用。

4 结语

多年来,国内外文献报道了很多种心肌肥厚动物模型的建立方法,即压力超负荷法、容量负荷法、药物诱导法、基因修饰法等。心肌肥厚动物模型的成功率、和人的相似程度都在逐渐提高,这对心肌肥厚的研究具有推动作用。

心肌肥厚可致使血压降低、心肌细胞肥大和凋亡,心室顺应性下降以及射血功能受损,从而使得心脏功能恶化。总而言之,心肌肥厚已经是心血管疾病领域内越来越重要的因素,所以探索其机制尤为重要。很多研究证明其过程与一些信号通路有关,这些信号通路交织在一起,信号通路效应因子之间相互作用,形成一个复杂的网络。虽然在分子机制方面已经取得很大进展,但许多问题仍未完全清楚,需要进一步探究。

参考文献:

- [1] Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, et al. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis [J]. Med Sci Monit Basic Res, 2016, 22: 75-79.
- [2] Deng KQ, Wang A, Ji YX, et al. Suppressor of IKK ϵ is an essential negative regulator of pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11432.
- [3] Bang CN, Greve AM, Køber L, et al. Renin - angiotensin system inhibition is not associated with increased sudden cardiac death, cardiovascular mortality or all-cause mortality in patients with aortic stenosis [J]. Int J Cardiol, 2014, 175(3): 492-498.

- [4] Bratsos S. Efficacy of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor-neprilysin inhibitors in the treatment of chronic heart failure: a review of landmark trials [J]. *Cureus*, 2019, 11(1): e3913.
- [5] Krogager ML, Mortensen RN, Lund PE, et al. Risk of developing hypokalemia in patients with hypertension treated with combination antihypertensive therapy [J]. *Hypertension*, 2020, 75(4): 966–972.
- [6] Vítovec J, Špinar J, Špinarová L. Innovations in pharmacological treatment of heart failure [J]. *Vnitr Lek*, 2019, 65(10): 611–619.
- [7] 边素艳, 刘宏斌. 523 例老年心血管内科门诊患者用药情况调查 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(8): 827–830, 866.
- [8] Li B, Chi RF, Qin FZ, et al. Distinct changes of myocyte autophagy during myocardial hypertrophy and heart failure: association with oxidative stress [J]. *Exp Physiol*, 2016, 101(8): 1050–1063.
- [9] Dai WJ, Dong Q, Chen MS, et al. Alterations in cardiac structure and function in a modified rat model of myocardial hypertrophy [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(5): 626–633.
- [10] 程杰坤, 李乐. 心肌肥厚动物模型建立方法研究进展 [J]. *中国药房*, 2015, 26(25): 3584–3587.
- [11] 李峰, 冯耀光. 大鼠心肌肥厚模型概述 [J]. *中国现代医生*, 2010, 48(32): 6–7, 11.
- [12] Henderson KK, Danzi S, Paul JT, et al. Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(3): 243–252.
- [13] Konhilas JP, Maass AH, Luckey SW, et al. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(6): H2768–H2776.
- [14] 余良主, 韩璐, 王柏军等. 牛磺酸对游泳训练诱导大鼠心肌肥厚的影响 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2013, 27(3): 185–187.
- [15] Zhao L, Cheng G, Jin R, et al. Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction [J]. *Circ Res*, 2016, 118(12): 1918–1929.
- [16] Gesmundo I, Miragoli M, Carullo P, et al. Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(45): 12033–12038.
- [17] Wang J, Liu Z, Feng X, et al. Tumor suppressor gene ING3 induces cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of AMPK and activation of p38 MAPK signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 562: 22–30.
- [18] Maass A, Leinwand LA. Animal models of hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2000, 15(3): 189–196.
- [19] Gyöngyösi M, Pavo N, Lukovic D, et al. Porcine model of progressive cardiac hypertrophy and fibrosis with secondary postcapillary pulmonary hypertension [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 202.
- [20] Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63(3): 467–475.
- [21] 刘丽娜, 李法琦. 心肌肥厚相关信号通路的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(20): 2805–2808.
- [22] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(8): 589–600.
- [23] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 245–262.
- [24] Oka T, Akazawa H, Naito AT, et al. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 565–571.
- [25] Pillai VB, Sundaresan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging [J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 368–378.
- [26] 熊肇军, 董吁钢. 心肌肥厚的研究进展 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2013, 5(4): 17–22.
- [27] 陈浩, 李七一, 陆曙. 中医药调控 JAK/STAT 信号通路的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(19): 2258–2262.
- [28] Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 38–48.
- [29] Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 2023–2039.
- [30] Diwan A, Dorn GW 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets [J]. *Physiology*, 2007, 22: 56–64.
- [31] Paull JR, Widdop RE. Persistent cardiovascular effects of chronic renin-angiotensin system inhibition following withdrawal in adult spontaneously hypertensive rats [J]. *J Hypertens*, 2001, 19(8): 1393–1402.
- [32] Antos CL, Frey N, Marx SO, et al. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase A [J]. *Circ Res*, 2001, 89(11): 997–1004.
- [33] 李晓涛, 郭喜朝. 心力衰竭分子机制的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2008, 29(3): 444–448.
- [34] Molkentin JD, Dorn GW 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 391–426.
- [35] 姜立群. 心力衰竭分子机制研究的新进展 [J]. *中国循环杂志*, 2002, 17(6): 77–79.
- [36] 高玲. 揭开心衰的分子机制 [J]. *国际药学研究杂志*, 2007, 34(4): 314–315.

[收稿日期] 2020-02-01

钟健,朱佳瑞,何欣宇,等. 斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用与进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 107-113,118.

Zhong J, Zhu JR, He XY, et al. Application of zebrafish models for nanotoxicology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 107-113,118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.017

斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用与进展

钟 健,朱佳瑞,何欣宇,马婧怡,李睿祺,张金波*

(佳木斯大学医学部基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007)

【摘要】 斑马鱼(*Danio rerio*)具有体型小、易于饲养、繁殖率高、繁殖周期短、体外受精、胚胎透明易于观察等诸多优势,是纳米毒理学研究当中较为理想的模式生物。本文综述了纳米材料对斑马鱼的毒性作用,包括:消化系统毒性、生殖系统毒性、神经系统毒性和胚胎毒性;其毒性机制包括:氧化应激、细胞凋亡、影响基因表达、影响细胞周期,并分析了纳米材料对斑马鱼毒性的主要影响因素,包括:化学组成、浓度或剂量、粒径、形状、给药方式以及材料制备方法。为进一步进行纳米毒理学研究以及斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用提供了参考依据。

【关键词】 纳米材料;斑马鱼;纳米毒理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0107-07

Application of zebrafish models for nanotoxicology

ZHONG Jian, ZHU Jiarui, HE Xinyu, MA Jingyi, LI Ruiqi, ZHANG Jinbo*

(Basic Medical College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

【Abstract】 *Danio rerio* has many advantages as a model animal for nanotoxicology research, such as small size, easy propagation, high reproduction rate, short reproduction cycle, amenable to *in vitro* fertilization, transparent embryo and easy observation. We review the toxic effects of nanomaterials on *Danio rerio*, including digestive toxicity, reproductive toxicity, neurological toxicity and embryonic toxicity. The mechanisms of toxicity include oxidative stress, apoptosis, and perturbed gene expression and cell cycle. The main factors influencing the toxicity of nanomaterials are analyzed, including chemical composition, concentration or dose, particle size, shape, drug administration and material preparation method. This review provides a reference for the use of zebrafish as a model for nanotoxicology research.

【Keywords】 nanomaterials; zebrafish; nanotoxicology

由于纳米材料具有优良的理化性质,越来越广泛的被应用到催化、材料、军事、机械、电子、生物医药等领域。纳米材料在生物医药领域表现出了独特的优势,在构建药物载体、药物的控释缓释等方面拥有巨大的应用前景。随着纳米材料日益广泛的应用,人们接触到纳米材料的机会越来越多,对

纳米材料的生物安全性研究也越来越迫切。目前,已有不少纳米材料的毒理学研究^[1-3],但许多纳米材料的毒性效应或体内毒性机制仍不明确,纳米材料的生物安全性需更进一步的研究和探讨。

目前,已有诸多研究表明斑马鱼是纳米毒理学较为理想的模式生物。斑马鱼作为一种脊椎动物,

【基金项目】 黑龙江省卫生计生委立项科研课题(2014-265);2018年黑龙江省大学生创新训练计划项目(201810222068);黑龙江省卫生计生委立项科研课题(2019-309)。

【作者简介】 钟健(1998—),男,本科生,研究方向:纳米毒理学。E-mail:1219138717@qq.com

【通信作者】 张金波(1974—),女,硕士,副教授,研究方向:纳米毒理学。E-mail:jinbojin1234@163.com

与人类基因的相似度高达 87%^[4],其生理或药理反应与人类具有很高的相似性,所以其在毒理学的研究当中具有很强的说服力。相比大鼠、小鼠,斑马鱼具有体外受精、胚胎在体外发育且透明易于观察的优势,另外,其体型小易于饲养,繁殖率高(成熟雌鱼每次可产卵 100~300 枚)为统计学计算提供了充足的样本数量;发育速度快且不同的发育阶段特征明显,可在胚胎发育的不同阶段做不同的毒理学实验且试验周期短。所以斑马鱼是一种理想的毒理学模式生物,且已经在胚胎发育毒理学和环境毒理学中得到了广泛应用^[5-6]。如今斑马鱼模型也愈来愈多的被应用到纳米毒理学的研究当中。

1 纳米材料对斑马鱼的毒性作用

由于斑马鱼的基因与人类基因相似度极高,将斑马鱼作为模式生物进行纳米毒理学研究具有很高的准确性和可信度。在实验中,纳米材料对斑马鱼所造成的各方面毒性作用也更贴近人类,实验结果对临床实践具有一定的指导意义。研究表明,纳米材料可对斑马鱼造成的毒性作用包括消化系统毒性、生殖系统毒性、神经系统毒性、胚胎毒性等。

1.1 消化系统毒性

研究表明,引起消化系统的毒性损伤是纳米材料最普遍的毒性效应之一,纳米材料进入斑马鱼体内后,富集于肝和肠道最为多见,因此对肝和肠道的损伤也更为显著。

1.1.1 肠道损伤

Løvmo 等^[7]研究表明,纳米颗粒作用于成年斑马鱼,经口腔摄入并进入肠道,经切片定位成像显示,纳米颗粒在肠道内被迅速吸收,使肠道内出现炎症反应,并转移到肝和脾。Sung 等^[8]分别将 30 nm 和 80 nm 的纳米金和银(nano-Au/nano-Ag)作用于成年斑马鱼,显示大部分纳米粒子均在肝、肠、鳃组织中被摄取,其中大粒径(80 nm)纳米粒子在肝和肠道组织中积累分布,小粒径(30 nm)纳米粒子在鳃中被过滤而聚集。而 Osborne 等^[9]关于纳米粒子粒径和分布关系的研究发现与 Sung 正好相反,Osborne 等^[9]将成年斑马鱼分别暴露于两种不同粒径(20 nm、110 nm)柠檬酸钠包被的 nano-Ag,研究显示,在 20 nm 粒径组的斑马鱼肠道中基底外侧膜可观察到明显的纳米粒子沉积,在 110 nm 粒径组则未观察到明显沉积。Osborne 等^[9]认为 nano-Ag 在肠道基底外侧膜沉积的机制与肠道基底外侧膜上

的 Na^+/K^+ 离子通道的破坏和 ATP 酶活性降低有关。说明粒径大小和在器官分布的关系并非绝对,其分布的影响还与其他因素相关。Chen 等^[10]将浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的纳米氧化钛(nano- TiO_2)作用于成年斑马鱼,研究显示,nano- TiO_2 可影响肠道神经调节、增加肠上皮屏障渗透性、引起炎症和氧化应激等。另外 nano- TiO_2 的长期暴露会引起斑马鱼肠道内菌群失调,造成损伤。Kang 等^[11]将浓度为(0.156、0.313、0.625、1.25、2.5 mg/mL)的碳量子点(C-QDs)溶液通过浸泡法作用于斑马鱼胚胎,实验表明,C-QDs 主要聚集在斑马鱼胚胎的头部、肠道和尾巴,其中肠道的聚集最为显著。经染毒的斑马鱼胚胎在纯水中静置 24 h 后,低浓度组(0.156、0.313、0.625 mg/mL)的 C-QDs 已完全清除出体外,仅在高浓度组(1.25、2.5 mg/mL)中有少量残留并伴有肠道轻微损伤,48 h 后,所有实验组斑马鱼胚胎肠道内的 C-QDs 均已消除。说明在肠道内富集的 C-QDs 可完全经代谢清除,但高浓度处理时仍会对肠道造成轻微损伤。虽然目前关于纳米粒子在肠道内分布情况和影响其分布或毒性损伤的机制尚不明确,但已有充分证据说明肠道是纳米粒子的毒性靶器官之一。

1.1.2 肝损伤

肝是机体内重要的解毒器官,也是纳米粒子最易发生富集的部位之一。在众多研究中,纳米粒子在肝当中聚集可破坏肝结构、影响肝功能。Ren 等^[12]将 0.9 mg/L 的 nano- TiO_2 连续 21 d 作用于成年斑马鱼,发现 nano- TiO_2 在斑马鱼体内呈富集状态,主要集中分布于大脑、性腺和肝,其中肝的含量最高,其次是大脑和性腺。段延芳^[13]将 6 种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的三种上转换纳米材料(铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)作用于受精后 24 h (hours post-fertilization, hpf)的斑马鱼胚胎,结果显示,以上三种纳米材料均易富集在心脏和肝,其中对于肝的毒性损伤最为显著,可引起肝发育畸形;引起肝细胞水肿、坏死。染毒浓度越大,引起的肝损伤越严重。Souza 等^[14]将成年斑马鱼分别暴露于三种浓度(2、10、20 mg/L)的氧化石墨烯(GO)中,研究显示,GO 可使肝细胞出现核碎裂、核固缩、形成液泡、细胞破裂和坏死,作用浓度越高,肝细胞损伤越显著。

Gao 等^[15]发现暴露于纳米二氧化锰(nano-MnO_2)的成年斑马鱼肝细胞出现转录功能障碍, α 淀粉酶、羧酸酯水解酶、羧肽酶等代谢酶类合成受到抑制,使肝功能受损。刘林等^[16]将成年斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.05、0.1、5、10、25、50 mg/L)的纳米氧化锌(nano-ZnO)中分别处理 4 h、24 h、96 h,结果显示肝细胞出现水肿、气球样变,核固缩;肝巨噬细胞数量显著增加;丙二醛(MDA)含量增加,超氧化物歧化酶(SOD)活性增强,但过氧化氢酶(CAT)活性下降;基因 *Bax/Bcl-2* 比值、*p53* 表达水平上调。说明 nano-ZnO 能引起肝细胞变性坏死、引起氧化应激、诱导细胞凋亡,使斑马鱼肝严重损伤。以上研究表明,纳米材料可以在肝当中大量聚集,并能引起组织和功能损伤,肝中的各种酶活性发生变化和基因表达的改变是引起肝损伤的主要原因。

1.2 生殖系统毒性

众多研究指出,性腺也是纳米材料易于富集的脏器,纳米材料可对斑马鱼的生殖系统产生毒性作用。Fang 等^[17]将浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 nano-TiO_2 作用于成年斑马鱼(雌雄各半),研究显示, nano-TiO_2 被吸收后可转移聚集到性腺,使斑马鱼血浆雌二醇(E2)、睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)浓度降低,卵黄原蛋白(VTG)浓度显著升高。虽然在 nano-TiO_2 作用下,斑马鱼的卵巢和睾丸并未出现显著的形态改变,但各种激素水平不同程度改变导致了内分泌的失调和生殖障碍。Kotil 等^[18]将成年斑马鱼暴露于三种浓度(1、2、4 mg/L)的 nano-TiO_2 ,取斑马鱼睾丸组织检测,结果表明, nano-TiO_2 可使斑马鱼睾丸间质细胞和精原细胞有丝分裂紊乱,伴有细胞变性,在睾丸间质细胞可见自噬泡大量聚集。随着 nano-TiO_2 处理浓度增加,细胞和组织损伤也越严重,引起间质细胞、生精细胞、精原细胞的细胞自噬、坏死,造成生殖毒性。以上研究说明纳米粒子可以通过改变斑马鱼各激素水平或直接对性腺造成组织损伤,从而对生殖系统造成毒性影响。

1.3 神经系统毒性

研究表明,脑是纳米粒子易于聚集的器官之一,纳米材料可对斑马鱼脑组织及神经系统造成毒性损伤。Sheng 等^[19]将成年斑马鱼暴露于 5 种浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO_2 45 d,研究显示 nano-TiO_2 可使斑马鱼去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺的水平显著降低,NO 水平显著升高,胶质细

胞过度增殖,神经元凋亡,同时 nano-TiO_2 能显著激活原癌基因 *C-fos*、*C-jun*、*BDNF* 基因表达,抑制 *p38*、*NGF*、*CREB*、*NR1*、*NR2ab*、*GluR2* 基因表达。说明 nano-TiO_2 可对斑马鱼的神经系统造成毒性损伤。Wu 等^[20]将鱼龄 4 个月的斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.5、4、32 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO_2 中,结果显示,出现神经胶质瘢痕形成和脑室增大等明显的脑损伤。 nano-TiO_2 引起的脑损伤机制主要引起了脑内 ROS 的大量产生,脑内 *MAD*、*SOD*、*GSH* 活性降低,使脑组织倾向与发生氧化应激,造成了斑马鱼大脑的严重损伤,并出现游泳和社会行为异常。以上研究说明脑是纳米粒子的毒性靶器官之一,可对神经系统造成毒性损伤,并引起功能障碍。

1.4 胚胎毒性

研究表明,纳米材料可引起斑马鱼胚胎显著的毒性损伤,影响斑马鱼胚胎正常发育、引起不同程度的畸形。Kang 等^[11]分别将(0.5、1.0、1.5、2.5 mg/mL)的 C-QDs 溶液作用于斑马鱼胚胎,结果表明,(0.5、1.0、1.5 mg/mL)组的胚胎存活率均高于 80%,略低于对照组存活率 95%,而 2.5 mg/mL 组的存活率仅为 55%。说明 C-QDs 在低浓度作用下,毒性较小。段延芳^[13]将 6 种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g/mL}$)的三种上转换纳米材料铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)分别作用于 24 hpf 的斑马鱼胚胎,结果显示,随作用剂量的增大,斑马鱼胚胎的畸形率随之增加。其引起的畸形主要有:鱼鳔发育缓慢或异常、脊柱弯曲、肝畸形、心包囊水肿、卵黄囊异常。其中以鱼鳔发育缓慢及肝畸形最为常见。Ahmad 等^[21]将平均粒径为 40 nm 的 CoFe_2O_4 纳米粒子($\text{nano-CoFe}_2\text{O}_4$)作用于斑马鱼胚胎(96 hpf),观察发现,能引起斑马鱼胚胎严重心脏水肿、代谢下调、孵化延迟、尾巴/脊髓弯曲,另外 $\text{nano-CoFe}_2\text{O}_4$ 的聚集和离子溶解对胚胎细胞膜造成严重的机械损伤和氧化应激,其中头部、心脏、尾部细胞最为显著。李翔^[22]将斑马鱼受精卵暴露于两种不同粒径(15 nm、50 nm)浓度范围在(50–1000 $\mu\text{g/mL}$)的纳米二氧化硅(nano-SiO_2),结果显示经两种粒径处理后受精卵的孵化率都出现降低、死亡率和畸形率均显著增加,且随纳米粒子处理浓度的增高,畸形率升高的越显著。其中在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理时,受精卵畸形率高达 60%,并

出现轻微心包水肿,当处理浓度大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,受精卵畸形率大于 95%。随处理浓度的增加,畸形程度越严重,其中畸形的种类包括:心包水肿(PE),卵黄膜畸形(YM),脊柱弯曲(BS),小头(SH),小眼(SE),尾部畸形(TM),发育不良(SG)。Choi 等^[23]将 96 hpf 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的(0.01、0.1、1、10 mg/L) nano-ZnO 中,研究发现心包水肿和卵黄囊水肿是 nano-ZnO 所导致的主要畸形,使用微阵列的基因表达谱显示在暴露于 nano-ZnO 后,689 个基因中有 498 个上调,191 个下调。所以其至畸原因可能与斑马鱼基因上调、下调密切相关。Ong 等^[24]将斑马鱼受精卵暴露于多种纳米粒子(纳米硅(nano-Si)、纳米银(nano-Ag)、纳米氧化锌(nano-ZnO)、纳米硒化镉(nano-CdSe)、单壁碳纳米管(SWCNT)),研究显示暴露于 10 mg/L nano-Ag 和 nano-CdSe 可延迟斑马鱼孵化,100 mg/L nano-CdSe 以及 10 mg/L 和 100 mg/L nano-ZnO 可完全抑制孵化,使胚胎在绒毛膜内死亡。经研究证实,抑制斑马鱼孵化的是纳米粒子本身,而非其金属溶解成分。以上研究表明,纳米粒子可对斑马鱼胚胎造成较显著的毒性作用。另外,斑马鱼胚胎对于纳米粒子的毒性十分敏感、效应显著,是纳米毒理研究的理想模型。

2 纳米材料对斑马鱼造成毒性的作用机制

为使纳米材料在日益广泛的研究和应用中具有安全性,势必要清楚其对机体的毒性机制。但纳米粒子对机体的毒性机制研究尚不充分,目前,众多以斑马鱼为模型研究纳米粒子毒性机制的研究表明,发生氧化应激、细胞凋亡、基因表达改变、细胞周期改变是纳米粒子引起斑马鱼毒性的主要机制。

2.1 氧化应激

已有研究表明,纳米粒子引起机体细胞最主要、最显著的毒性影响即引起氧化应激。Xiong 等^[25]分别将 50 mg/L 纳米二氧化钛(nano-TiO₂)和 5 mg/L 纳米氧化锌(nano-ZnO)作用于成年斑马鱼,结果表明 nano-TiO₂ 和 nano-ZnO 可使斑马鱼鳃、消化道、肝的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)发生不同程度的改变,使机体发生氧化应激。Shih 等^[26]将金红型 nano-TiO₂ 染毒斑马鱼成鱼,表明 nano-TiO₂ 使斑马鱼鳃和肝组织的 SOD 活性显著降

低,发生氧化应激,造成鳃、肝的氧化损伤。高悦^[27]将斑马鱼尾鳍伤口暴露于平均粒径为 10 nm 的经柠檬酸钠包被的纳米银颗粒(nano-Ag),发现活性氧(reactive oxygen species,ROS)在暴露的尾鳍伤口细胞大量产生,引起氧化应激,中性粒细胞超过正常水平约 50%,使再生尾鳍增殖细胞显著减少,凋亡细胞增多,造成毒性作用。Wu 等^[20]将鱼龄 4 个月的斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.5、4、32 $\mu\text{g/L}$)的纳米 TiO₂ 中,发现能使斑马鱼脑内的 ROS 大量生成,同时脑内 MAD、SOD、GSH 等含量均出现变化,证实脑组织发生氧化应激,造成斑马鱼脑组织损伤。Zhu 等^[28]将受精后 2 h(hours post-fertilization, hpf)的斑马鱼胚胎分别暴露于粒径为 15 和 30 nm 的纳米二氧化硅(nano-SiO₂),用三种浓度(25、50、100 mg/L)分别处理 5 d,结果表明,粒径越小、浓度越大的 nano-SiO₂ 对斑马鱼胚胎体内的 ROS 含量影响越大,引起斑马鱼胚胎的氧化应激也越严重。以上研究表明,不同的纳米粒子均可以造成斑马鱼发生氧化应激,引起毒性作用。

2.2 细胞凋亡

细胞凋亡是一种为维持体内稳态而主动发生的细胞程序性死亡,许多研究表明纳米粒子可引起斑马鱼细胞凋亡,造成机体的毒性损伤。Du 等^[29]将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度(0、12.5、25、50 mg/L)的 nano-ZnO 溶液中,随着处理浓度的升高,斑马鱼胚胎体内的 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)和 Caspase-9 酶的活性显著升高, CAT 酶活性被抑制,同时,细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* 相关 X 蛋白(*Bcl-2* Associated X Protein, BAX)、肿瘤抑制基因 *P53*、B 淋巴细胞瘤-2 基因(*B-cell lymphoma-2*, *Bcl-2*)表达改变,斑马鱼胚胎氧化损伤并引起细胞凋亡。马爽^[30]将 nano-SiO₂ 作用于斑马鱼胚胎,研究显示 SiO₂ 可引起内质网应激关键基因 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、免疫球蛋白结合蛋白(BIP)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、磷酸化真核细胞起始因子 2 α (eIF2 α)表达,引起内质网应激反应;细胞凋亡和抗细胞凋亡相关基因 *BAX*、*BID*、*Bcl-2*、*Mcl-1b* 表达量改变,引起细胞凋亡,造成斑马鱼胚胎的毒性损伤。Zhao 等^[31]使用 5 种浓度(10、30、60、90、120 mg/L)的 nano-ZnO 处理斑马鱼胚胎,显示 nano-ZnO 可使

促凋亡基因(*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*)上调,而抗凋亡基因 *Bcl-2* 下调,且凋亡细胞的百分率呈剂量依赖性增加(0.41% ~ 4.21%)。另外,斑马鱼胚胎细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)发生变化,以及 *Caspases-9* 和 *Caspases-3* 被激活,说明 nano-ZnO 可激活线粒体通路引起细胞凋亡,引起斑马鱼胚胎细胞毒性作用。已有研究表明,线粒体是纳米材料生物毒性的主要作用靶点,所以线粒体介导的细胞凋亡通路是纳米粒子引起细胞凋亡的主要途径之一^[32]。Gao 等^[33]将斑马鱼胚胎暴露于粒径为 50 nm 的 nano-Ag 当中,显示可干扰氧在胚胎血管细胞内的扩散,造成细胞缺氧,同时引起内质网应激反应并造成胚胎血管上皮细胞凋亡,影响斑马鱼胚胎血管的发育。Zhou 等^[34]使用聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束(PEG-b-PCL)作用于斑马鱼胚胎,结果显示,能引起 *p53* 基因上调,血管生成区细胞促凋亡通路被激活,抑制血管生成,对斑马鱼胚胎心血管发育具有毒性作用。综上所述,纳米粒子可通过引起细胞氧化应激、改变酶的活性、影响基因表达、激活内质网应激通路或线粒体途径引起细胞凋亡,造成斑马鱼毒性损伤。

2.3 影响基因表达

目前有研究表明,斑马鱼体内基因的表达情况会受纳米粒子影响,对斑马鱼造成毒性损伤。Gao 等^[33]将 50 nm 的 nano-Ag 作用于斑马鱼胚胎,研究显示, nano-Ag 可抑制血管内皮生长因子(VEGF)信号通路基因表达,使酪氨酸激酶(*Src*)受抑制,磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, *PI3K*)/蛋白激酶 B(*protein kinase B*, *Akt*)通路中 *Akt* 磷酸化,抑制血管生成,导致斑马鱼胚胎血管发育的异常迟缓,造成胚胎发育毒性。Ladhar 等^[35]将斑马鱼暴露于粒径为 8 nm 和 50 nm 的硫化镉纳米颗粒(*CdSNPs*)中,随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, *RAPD*)PCR 基因毒性试验结果显示 *CdSNPs* 可使 *RAPD* 探针的杂交位点数量明显改变,即基因组发生改变,引起线粒体功能障碍。Du 等^[29]将斑马鱼胚胎暴露于三种浓度(12.5、25、50 mg/L)的 nano-ZnO 中,结果表明 *Bax*、*p53*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 等凋亡通路相关基因均出现显著上调,而抗凋亡基因 *Bcl-2* 显著下调,引起斑马鱼胚胎出现严重的细胞凋亡,造成显著的胚胎毒性。Sheng 等^[19]将四种浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO₂ 连续 45 d 作用于成年斑马鱼,结果显示,

nano-TiO₂ 可显著激活 *C-fos*、*C-jun*、*Bdnf* 基因表达,抑制 *p38*、*Ngf*、*Creb*、*Nr1*、*NR2ab*、*GluR2* 基因表达,对斑马鱼大脑产生一定程度的损伤,具有神经毒性。以上研究表明,纳米材料影响斑马鱼基因的表达是纳米材料引起斑马鱼毒性损伤的重要机制之一。

2.4 细胞周期

近年来有研究表明,纳米粒子可以通过影响斑马鱼细胞周期,影响斑马鱼的生长发育。Hou 等^[36]将 nano-ZnO 作用于斑马鱼胚胎,研究发现, nano-ZnO 可抑制细胞周期蛋白(*Cycs*)、细胞周期蛋白依赖性激酶(*CDK*)的表达,使微脂质体(*MCM*)被破坏,激活了 *Cyc/CDK* 复合物(*CycD/CDK4*, 6; *CycE/CDK2*; *CycA/CDK2*),使细胞周期的不同时期(*G1* 期、*M* 期和 *G2* 期)均受到影响,导致 DNA 复制紊乱,个体的细胞分裂、分化、增殖等正常活动及 DNA 合成和细胞内转移功能受到干扰,造成一定程度的细胞毒性作用。

3 纳米材料对斑马鱼的毒性影响因素

有研究表明,纳米粒子的化学组成、粒径、浓度或剂量、形状、给药方式以及纳米材料的制备方法等,都可以影响纳米材料对机体的毒性。

3.1 化学组成

Xiong 等^[25]将两种粒径相同(50 nm)而化学组成不同的纳米粒子(nano-TiO₂、nano-ZnO)作用于成年斑马鱼(作用浓度为 5 mg/L、50 mg/L),检测斑马鱼在鳃、消化道及肝的各项指标(*SOD*、*CAT*、*GSH*、*MDA*),表明 5 mg/L 的 nano-ZnO 对斑马鱼的毒性作用要显著强于 5 mg/L nano-TiO₂,另外 5 mg/L 的 nano-ZnO 和 50 mg/L 的 nano-TiO₂ 对斑马鱼的毒性效应几乎相当,说明在相同粒径、相同浓度下, nano-ZnO 的毒性要显著大于 nano-TiO₂。Liu 等^[37]分别将 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 SiO₂ 纳米球和 C-QDs 作用于 6 hpf 的斑马鱼胚胎,结果表明 SiO₂ 纳米球会引起胚胎严重的畸形,而经 C-QDs 处理的斑马鱼胚胎则能够正常发育,其畸形率与对照组基本相同。因此, C-QDs 较 SiO₂ 纳米球的致畸毒性小。

3.2 浓度或剂量

Zhu 等^[28]将三种不同浓度(25、50、100 mg/L)的 nano-SiO₂ 作用于 2 hpf 的斑马鱼胚胎,结果表明, nano-SiO₂ 浓度越大,对斑马鱼胚胎体内的 ROS 含量影响越大,引起斑马鱼胚胎的氧化应激也越严重。Souza 等^[14]将成年斑马鱼分别暴露于三种浓度

(2、10、20 mg/L)的氧化石墨烯(GO)中,研究显示,GO可使肝细胞出现核碎裂、核固缩、形成液泡、细胞破裂和坏死,作用浓度越高,肝细胞损伤越显著。段延芳^[13]将6种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g/mL}$)的三种上转换纳米材料(铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$)分别作用于24 hpf的斑马鱼胚胎,结果表明,其半数致死量为200 $\mu\text{g/mL}$,随作用浓度的增大,斑马鱼胚胎的畸形率和死亡率都随之增加。

3.3 粒径

通常情况下,粒径越小的纳米粒子毒性越强。Zhu等^[28]将两种不同粒径(15 nm、30 nm)的 nano- SiO_2 作用2 hpf的斑马鱼胚胎,结果表明 nano- SiO_2 粒径越小,聚集在斑马鱼胚胎内的纳米粒子就越多,排出的时间也越长,毒性效应越显著。李翔^[22]将斑马鱼受精卵暴露于两种不同粒径(15 nm、50 nm)浓度范围在(50~1000 $\mu\text{g/mL}$)的纳米二氧化硅(nano- SiO_2),研究显示,在处理浓度相同时,15 nm(小粒径组)的 nano- SiO_2 更易被机体摄取,富集含量更多,造成的毒性影响也更显著,斑马鱼受精卵的死亡率和畸形率也显著增加。

3.4 形状

Hua等^[38]将不同形状的 nano-ZnO(纳米球、纳米棒、亚微米立方体型)作用于斑马鱼胚胎,研究表明,不同形状的 nano-ZnO可造成不同程度的胚胎毒性,其中纳米棒的毒性作用最强,其机制可能为纳米棒结构尖而细,对生物膜有较强的损伤和破坏能力,且可以延长其在机体内分布时间,难以代谢排除,对机体造成较强毒性作用。Ispas等^[39]将树枝状和球形的纳米Ni作用于斑马鱼,经对比发现,树枝状的纳米Ni在斑马鱼体内的停留时间要远长于球形纳米Ni,使树枝状纳米Ni在体内分布的量更多,其毒性效应也越显著,对斑马鱼的肠道和骨骼肌造成严重的组织损伤。

3.5 给药方式

Kang等^[11]分别将(0.5、1.0、1.5、2.5 mg/mL)的C-QDs溶液通过微注射法和浸泡法作用于斑马鱼胚胎。实验表明,通过微注射法和浸泡法给药的(0.5、1.0、1.5 mg/mL)组的胚胎存活率均超过80%,通过浸泡法给药的2.5 mg/mL组存活率为60%,而通过微注射法给药的2.5 mg/mL组存活率

仅为55%。说明,在相同的作用剂量下,微注射法比浸泡法对斑马鱼胚胎有更强的毒性损伤。

3.6 制备方法

Peng等^[40]分别将自顶向下法和自底向上法合成的碳点(C-dots)通过微注射法作用于受精后6 d的斑马鱼胚胎腹腔。结果显示,自顶向下法合成的C-dots可在斑马鱼骨骼中大量沉积,即对钙化骨具有极好的亲和力。而自底向上法合成的C-dots则并不能在骨骼中观察到,即无骨亲和特性。自顶向下法合成的C-dots与斑马鱼骨骼良好的亲和性可能与其制备过程中表面产生的大量极性基团有关。

综上所述,通常情况下,在其他变量都相同时:粒径越小的纳米粒子毒性越强;浓度或剂量越大毒性越强;不同化学组成的纳米粒子性质差异较大,如不含金属的纳米材料(如碳量子点等)较含金属或金属氧化物的纳米粒子毒性小,引起的毒性效应和毒性机制不甚相同;不同形状的纳米粒子也可能具有不同的毒性机制;纳米材料制备方法的差异抑或是给药方式的差异都可导致不同的体内效应。但目前对于纳米粒子毒性机制的研究尚不深入,影响纳米粒子毒性的因素依然有待探讨。

4 结语

目前,斑马鱼作为毒理学研究的重要模式生物,已经在环境毒理学、胚胎发育毒理学当中得到了十分广泛的研究和应用,因其具备的许多哺乳动物所没有的独特优势,斑马鱼在纳米毒理学中日益受到各国专家学者的重视。当前大部分关于斑马鱼的纳米毒理学研究主要集中在毒性机制(如氧化应激、细胞凋亡、基因表达改变等)和毒性效应(如对消化系统、神经系统、生殖系统的损伤),但由于大部分研究仍然停留在表面,而且不全面、不彻底,人们对纳米粒子的毒性机制和影响毒性因素依然所知甚微。未来,纳米粒子使斑马鱼各个系统损伤的发生损伤的具体分子机制是一个重要的研究方向^[41-42],另外,如何降低纳米粒子的毒性作用、对纳米粒子的安全粒径、浓度或剂量范围的寻找依旧需要不断研究探索,为纳米粒子在临床应用打下重要基础。

参考文献:

- [1] Anand AS, Gahlot U, Prasad DN, et al. Aluminum oxide nanoparticles mediated toxicity, loss of appendages in progeny of

- Drosophila melanogaster* on chronic exposure [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(7): 977-989.
- [2] Li L, Zhou X, Yu Y, et al. Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca^{2+} /CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(3): 369-391.
- [3] Lewis RW, Bertsch PM, McNear DH. Nanotoxicity of engineered nanomaterials (ENMs) to environmentally relevant beneficial soil bacteria - a critical review [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(3): 392-428.
- [4] Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity [J]. *J Nanobiotechnology*, 2016, 14(1): 65.
- [5] Komoike Y, Matsuoka M. Application of zebrafish model to environmental toxicology [J]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 2016, 71(3): 227-235.
- [6] Bambino K, Chu J. Zebrafish in toxicology and environmental health [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 124: 331-367.
- [7] Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, et al. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system [J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 67: 508-518.
- [8] Sung HK, Jo E, Kim E, et al. Analysis of gold and silver nanoparticles internalized by zebrafish (*Danio rerio*) using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 815-822.
- [9] Osborne OJ, Lin S, Chang CH, et al. Organ-Specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(10): 9573-9584.
- [10] Chen L, Guo Y, Hu C, et al. Dysbiosis of gut microbiota by chronic coexposure to titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A: Implications for host health in zebrafish [J]. *Environ Pollut*, 2018, 234: 307-317.
- [11] Kang YF, Li YH, Fang YW, et al. Carbon quantum dots for Zebrafish fluorescence imaging [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11835.
- [12] Ren X, Zhao X, Duan X, et al. Enhanced bio-concentration of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate in the presence of nano-TiO₂ can lead to adverse reproductive outcomes in zebrafish [J]. *Environ Pollut*, 2018, 233: 612-622.
- [13] 段延芳. 稀土上转换纳米材料的发光特性及其生物相容性的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学; 2016.
- [14] Souza JP, Baretta JF, Santos F, et al. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2017, 186: 11-18.
- [15] Gao M, Lv M, Liu Y, et al. Transcriptome analysis of the effects of Cd and nanomaterial-loaded Cd on the liver in zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 164: 530-539.
- [16] 刘林, 赵群芬, 金凯星, 等. 纳米氧化锌对斑马鱼肝脏的毒性效应 [J]. *环境科学*, 2015, 36(10): 3884-3891.
- [17] Fang Q, Shi Q, Guo Y, et al. Enhanced bioconcentration of bisphenol a in the presence of Nano-TiO₂ can lead to adverse reproductive outcomes in zebrafish [J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(2): 1005-1013.
- [18] Kotil T, Akbulut C, Yönd ND. The effects of titanium dioxide nanoparticles on ultrastructure of zebrafish testis (*Danio rerio*) [J]. *Micron*, 2017, 100: 38-44.
- [19] Sheng L, Wang L, Su M, et al. Mechanism of TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(2): 163-175.
- [20] Wu Q, Yan W, Liu C, et al. Co-exposure with titanium dioxide nanoparticles exacerbates MCLR-induced brain injury in zebrafish [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 693: 133540.
- [21] Ahmad F, Liu X, Zhou Y, et al. An *in vivo* evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, 166: 21-28.
- [22] 李翔. 二氧化硅纳米粒子对斑马鱼的发育与神经的影响 [D]. 天津: 南开大学; 2014.
- [23] Choi JS, Kim RO, Yoon S, et al. Developmental toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*): a transcriptomic analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160763.
- [24] Ong KJ, Zhao X, Thistle ME, et al. Mechanistic insights into the effect of nanoparticles on zebrafish hatch [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(3): 295-304.
- [25] Xiong D, Fang T, Yu L, et al. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage [J]. *Sci Total Environ*, 2011, 409(8): 1444-1452.
- [26] Shih YJ, Su CC, Chen CW, et al. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching [J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 109-117.
- [27] 高悦. 纳米银对成年斑马鱼尾鳍再生的毒理学效应研究 [D]. 武汉: 江汉大学; 2019.
- [28] Zhu B, He W, Hu S, et al. The fate and oxidative stress of different sized SiO₂ nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 705-712.
- [29] Du J, Cai J, Wang S, et al. Oxidative stress and apoptosis to zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and ZnO nanoparticles [J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 2017, 30(2): 213-229.
- [30] 马爽. 纳米二氧化硅对斑马鱼胚胎发育的影响研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学; 2015.
- [31] Zhao X, Ren X, Zhu R, et al. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos [J]. *Aquat Toxicol*, 2016, 180: 56-70.
- [32] 陈芳, 唐瑛, 杨李. 线粒体-纳米材料生物毒性的主要作用靶点 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10): 83.
- [33] Gao J, Mahapatra CT, Mapes CD, et al. Vascular toxicity of silver nanoparticles to developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(9): 1363-1372.

孙洪宇,原丹妮,周昊函,等. 人与动物的共同健康:One Health——浅谈从动物实验室安全管理到全民健康[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 114-118.

Sun HY, Yuan DN, Zhou HH, et al. Common health of humans and animals: One Health- a brief discussion on the management of experimental animal safety and national health[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 114-118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.018

人与动物的共同健康:One Health ——浅谈从动物实验室安全管理到全民健康

孙洪宇,原丹妮,周昊函,孙连坤,张大维*

(吉林大学基础医学院,长春 130000)

【摘要】 “同一健康”(One Health)理念是一种旨在通过地方、国家和全球范围内的多学科共同努力,来实现人、动物和环境共同健康的健康理念。其雏形最早出现于十八世纪欧洲的比较医学,经历百余年的发展在二十一世纪逐渐成熟。在该理念的指导下,多国家和地区对含抗生素的动物促生长剂的使用政策以及人兽共患病的预防方案上进行了不同程度的调整,并取得了一定成效,这证明了 One Health 对解决公共卫生问题,实现全民健康的积极影响。此外,实验动物由于其特殊性,其使用不当所引起的生物实验室安全事故会对公众健康构成威胁,因此杜绝动物实验室安全隐患必然是实现全民健康的重要一环。本文梳理了 One Health 理念的发展历史和内涵,就其在公共卫生问题和动物实验室安全管理的发展现状做一综述。

【关键词】 One Health;实验动物;动物实验室安全;人兽共患病;抗生素耐药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0114-05

Common health of humans and animals: One Health- a brief discussion on the management of experimental animal safety and national health

SUN Hongyu, YUAN Danni, ZHOU Haohan, SUN Liankun, ZHANG Dawei*

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130000, China)

【Abstract】 “One Health” is a health concept that aims to achieve common health for people, animals and the environment through the joint efforts of multiple disciplines at local, national and global levels. Its embryonic form first appeared in 18th century European comparative medicine. It has gradually matured in the 21st century after more than 100 years of development. Under the guidance of this concept, many countries and regions have adjusted the use of antibiotic-containing animal growth promoters and zoonotic disease prevention programs to varying degrees. This has achieved many positive result, showing that "One Health" has a positive impact on national health. In addition, because of the special nature of laboratory organisms, improper use may lead to biological accidents that could pose a huge threat to public health. Therefore, the elimination of safety hazards concerning laboratory organisms is an important part of achieving universal health. This article summarizes the development of "One Health" with respect to public health issues and safety management of laboratory organisms and discusses connotations of its application.

【Keywords】 One Health; experimental animals; animal laboratory safety; zoonoses; antibiotic resistance

[作者简介] 孙洪宇(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:病理生理学。E-mail:1378617244@qq.com

[通信作者] 张大维(1965—),男,研究员。E-mail:dwzhang@jlu.edu.cn

人类虽然有着与其他动物不同的特征,但从生物角度来看,人类也只是自然界诸多物种中的一种。人和其他生物有很多共同的特征,而这些特征在论及某些健康问题时,如引起全世界关注的埃博拉病毒^[1],人与动物是有着密切联系的。近年来,抗药性疾病和新兴传染病对人类健康造成威胁,其中很多疾病的病因是抗生素耐药性细菌、人兽共患病原体等。据统计,在新兴病原体中,有约占 75% 的是人兽共患病原体^[2]。每年排名前 13 位的人兽共患病导致 220 万人死亡和 24 亿例疾病的发生^[3]。为了维护人类、动物和环境的共同健康,“同一健康”(One Health)理念应运而生。One Health 理念的定义是通过地方、国家和全球范围内的多学科的努力,来实现人、动物和环境的共同健康。

One Health 理念的雏形初现于比较医学。当时的欧洲刚经历过十四世纪爆发的鼠疫和 1613 年在南欧致死六万人的炭疽大爆发,医学工作者们开始关注人类健康和动物与环境的联系。Sournia 在十八世纪对欧洲牛瘟的研究中将人类和动物的流行病与气候和地理条件联系了起来^[4]。其后细胞病理学之父 Rudolf Virchow (1821–1902) 和现代医学之父 William Osler (1849–1919) 发现了比较医学在医学研究中的重要性^[5]。Zinsstag^[6] 在 1960 年首次提出了 One Medicine 的理念,其说明了人类医学与动物医学的共性。1975 年,世界卫生组织(WHO),国际兽疫局和联合国粮食及农业组织共同确定了兽医公共卫生的概念^[7],这为现代 One Health 的概念奠定了基础。21 世纪以来,Gibbs 等人^[8] 在世界范围内组织了一次以“One World, One Health”为主题的会议,它将人类健康、动物健康、环境健康三者统一为一个健康整体,倡导通过促进公共卫生专业人员、兽医、环境专家以及其他学科专业人员间的合作与交流从而改善人类、动物健康和环境卫生。

目前,One Health 理念已从多方面引导医学研究和疾病治疗的发展方向,其在抗生素耐药控制、人兽共患病预防以及动物实验室安全等方面已取得一定成效,在维护全民健康上发挥着重要作用。下面,本文就以在 One Health 理念的指导下的全民健康和公共卫生问题发展现状的几个方面做一综述。

1 One Health 理念与全民健康

全民健康是实现“健康护小康”的重要工作,目

的是提高国民整体健康水平。坚持“预防为主,防治结合”的方针,加强对公共卫生隐患的防控工作是实现全民健康的基本要求,以下将就三个不同方面的公共卫生问题,结合国内外实际案例,阐释 One Health 理念对全民健康的意义。

1.1 One Health 理念影响下的抗生素控制

抗生素耐药性主要是由于人和动物过量使用抗生素,从而导致人为的对细菌进行筛选,它一方面提高了医疗难度,一方面也容易产生超级细菌^[9]。而食用动物如果长期使用含抗生素的生长促进剂,会使动物体内的细菌产生抗药性,这些抗药性细菌可直接或者间接地传播给人类^[10]。

从上世纪 90 年代以来,各国陆续出台了禁止使用含抗生素的生长促进剂的法案。1986 年瑞典最早禁止使用所有含抗生素的生长促进剂^[11]。1999 年欧盟(EU)基于预防考虑,继 1997 年禁用阿伏帕星后禁用了四种抗生素在生长促进剂中的使用^[10]。尽管在 2003–2013 年韩国对于抗生素耐药性的控制未得到显著成效^[12],韩国政府于 2016 年 8 月仍制定了新的 5 年抗生素耐药行动计划^[7]。中国农村农业部也拟定从 2020 年开始,全面禁止向动物饲料中添加抗生素^[13]。

上述政策和法规的颁布体现了各国政府对牲畜安全和健康的逐渐重视。我们对通过关注动物健康来解决人类健康问题新思路的形成正是基于 One Health 理念。

1.2 One Health 理念影响下的人兽共患病防治

在一些中低收入的国家中,由于畜牧业中对人和动物管理不善,对人和动物的健康造成了巨大威胁,而贫困又与公众的健康问题的发生形成了恶性循环^[14]。布鲁氏菌病、钩端螺旋体病、立克次体病等人兽共患病,由于其非特异的临床表征,使这些疾病在某些中低收入国家肆虐^[15]。在一项对坦桑尼亚北部发烧住院患者的研究中发现,人兽共患病原体在 26.2% 的病例中被确认为疾病的原因。疟疾虽然会被临床诊断(60.7%),但只有极少数(1.6%)从最初就被认为是发烧原因^[16]。在坦桑尼亚的一项临床研究中,总共约三分之一的系统性发热感染病例中被确诊为人兽共患病(11.6% 的患者被确诊为急性钩端螺旋体病,13.0% 的确诊为钩端螺旋体病,7.0% 的患者为布鲁氏菌病)^[17]。

基于 One Health 的理念,针对布鲁氏菌病和钩端螺旋体病的牲畜疫苗接种已经成为了目前在东

欧和中亚实施的布鲁氏菌病控制和消除的主要策略^[18]。在一些实行了绵羊和山羊疫苗接种的国家,例如,波斯尼亚和吉尔吉斯斯坦,布鲁氏菌病病例明显减少。这些动物疫苗的接种策略在坦桑尼亚也取得了较好的效果^[18]。

在疾病面前,人、动物和环境是一个统一的整体。而在 One Health 理念的指导下,对于动物的防疫工作,也会保障人类的健康和生命安全。我们的公共卫生工作不仅是治疗患者的健康问题,更应该从源头入手,通过预防动物疾病来做到对人类疾病的预防工作。

1.3 One Health 影响下的动物实验室安全建设

实验动物作为一种连接基础生命科学研究和临床医学的特殊动物,它们中的大部分都是经过现代生物技术处理的,尤其是基因工程技术培育的特殊动物,对其滥用和违规操作都可能对人类健康和自然环境造成巨大的安全隐患。因此,严谨地进行动物实验、完善实验动物安全管理对医学研究工作非常重要。而动物实验室由于涉及动物饲养、解剖、采样等诸多实验操作,存在很多潜在风险^[19]。

严重的生物实验室事故案例譬如 1967 年德国马尔堡实验室病毒泄露事故^[20]和 1979 年俄罗斯维尔德洛夫斯科实验室炭疽杆菌泄露事故^[21]引起了人们对实验室设备安全以及规范实验操作的高度关注。在 1984 年美国出版的《Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)》^[22]中首次提出将病原微生物和实验活动分为四级的概念。1988 年世界卫生组织发布《实验室生物安全手册》^[23]对生物实验室的操作和规章制度进行了更加详细的规定。2004-2006 年中国国务院和卫生部相继颁布了《病原微生物实验室生物安全管理条例》^[24]和《人间传染的病原微生物名录》^[25],其中详细规定了各种病原体的不同实验操作需要在对应等级的生物安全实验室中进行。有了相关法律法规的保障,动物实验室安全设施建设日益完善。

然而二十一世纪以来,国内外动物实验室安全事故依旧层出不穷^[26-29],仅靠实验室设施建设并未杜绝动物实验室安全隐患。实验动物安全还需要以健康理念和安全意识建设作为基础,只有设施和理念建设兼备才能防患于未然。

为了评估医学高校中动物实验室安全理念建设程度,在我们对吉林大学基础医学院中 349 名师

生所进行的“One Health 与动物实验室安全调查问卷”得到的结果显示 87.50% 的受访学生表示会熟练操作三种及以上的动物实验室安全设施。在对 One Health 理念的调查中,有 50.72% 的受访者对该理念并不了解;在普及程度上,55.09% 的硕士研究生表示对 One Health 理念理解或已熟知,该比例在博士研究生中更高,为 60.42%;而在 172 名了解该理念的受访者中,仅有 24.41% 的受访者是通过讲座和培训的方式系统学习了 One Health 理念;而在实验动物福利方面,74.67% 的受访者表示会注意 3R 原则,但该比例在受访的本科学生中仅有 64.82%。可见虽然动物实验室设施的建设和培训已经有所成效,但对动物实验的安全意识和健康理念的培训并不到位,本研究对于 One Health 理念的理解和普及程度不足,在实践和科研工作中也未落实。

动物实验室安全的保障需要强化对实验室工作人员的安全培训和理念宣教工作。对于实验室工作人员的健康管理和安全培训应该从人员筛选、操作培训、工作实践、有效使用工程控制、选择和使用个人防护设备以及应急响应预案等方面入手^[30]。重点应放在对于面临风险和危害的实验人员培训,包括人体工程学原理、生物安全柜或化学通风柜的有效使用、尖锐物的安全处理、灭菌消毒程序和应急响应程序。实验室人员必须接受任何可能涉及风险或造成危害的设备的使用培训,如高压灭菌器、密封设备、通风笼式系统等^[28]。

同时应注意实验动物的日常饲养以及实验操作,实验动物须经过严格检疫,不同物种、不同水平的实验动物应遵循单独饲养的原则^[31]。动物实验操作的过程应在相对独立的功能单元中进行,严格按照国家标准配置和使用高效过滤器、动物负压饲养装置、熏蒸灭菌器、污水处理系统、高压灭菌器、生物安全柜、负压解剖台等设施,并定期对相关实验设施进行检修、维护和更换工作^[32]。

在思想建设方面,要加强 One Health 理念和实验动物安全意识的培训和宣教工作,系统地加强科研工作者们对实验动物的安全理念和思想建设,贯彻 One Health 理念和实验动物安全意识。在科学的安全理念的指导下,动物实验室安全的物质建设和制度建设才能发挥作用。

动物实验室的安全建设不仅是对实验动物和实验工作者的生命健康负责,也是对民众的健康和

安全负责。因此动物实验室安全建设和实验人员的安全意识应在更加重要位的位置。只有牢固树立 One Health 理念,在平时的科研工作中防微杜渐,才能消除动物实验室对全民健康的潜在风险。

2 结语

One Health 理念为我们应对公共卫生问题提供了新思路。在减少抗生素耐药方面,多国陆续出台了禁止使用含抗生素的生长促进剂的相关法规,以避免抗生素耐药细菌的产生;对于人兽共患病,诸多依靠畜牧业的国家和地区已经通过健全动物防疫工作,合理接种动物疫苗来预防人兽共患病的传播;在实验室安全方面,自二十世纪下半叶,动物实验室安全建设和相关法律法规日趋严格,实验室设施建设日趋完善,但在加强动物实验室物质投入的同时,科研工作者们也要树立好安全意识和 One Health 理念,深刻认识到实验动物安全对于公共健康的重要性,实验动物必须经过严格检疫,实验操作和日常饲养工作应该严格遵循实验室规章制度。综上所述,One Health 理念的践行对保护好科研工作者和人类社会环境的健康和安全起到了重要作用,是实现全民健康不可忽略的一个环节。

参考文献:

- [1] Cleaveland S, Sharp J, Abela-Ridder B, et al. One Health contributions towards more effective and equitable approaches to health in low- and middle-income countries [J]. *Philos Trans R Soc Lond*, 2017, 372(1725): 160–168.
- [2] Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence [J]. *Philos Trans R Soc Lond*, 2001, 356(1411): 983–989.
- [3] International Livestock Research Institute. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots: report to the department for international development [R]. Kenya: ILRI, 2012.
- [4] Sourmia JC. Félix Vicq d' Azyr, inventeur de l' académie de médecine (1748–1794) [J]. *Bull Acad Natl Med*, 1994; 178(7): 1237–1244.
- [5] Lerner H. Philosophical roots of the one medicine movement: an analysis of some relevant ideas by rudolf virchow and calvin schwabe with their modern implications [J]. *Studia Philosophica Estonica*, 2013, 6(2): 97–109.
- [6] Zinsstag J, Meisser A, Schelling E, et al. From 'two medicines' to 'One Health' and beyond [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 2012, 79(2): 492.
- [7] Ryu S, Kim BI, Lim JS, et al. One Health perspectives on emerging public health threats [J]. *Prev Med Public Healt*, 2017, 50(6): 411–414.
- [8] Gibbs EP. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future [J]. *Vet Rec*, 2014, 174(4): 85–91.
- [9] Rao GG. Risk factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria [J]. *Drugs*, 1998, 55(3): 323–330.
- [10] Casewell M, Friis C, Marco E, et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health [J]. *Antimicrob Chemother*, 2003, 52(2): 159–161.
- [11] McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial resistance: a One Health perspective [J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(2): 10.
- [12] Ryu S, Head MG, Kim BI, et al. Are we investing wisely? A systematic analysis of nationally funded antimicrobial resistance projects in Republic of Korea, 2003–2013 [J]. *Glob Antimicrob Resist*, 2016, 6: 90–94.
- [13] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第 194 号 [EB/OL]. [2020–01–03]. http://www.moa.gov.cn/nygbh/2019/201907/202001/t20200103_6334292.html.
- [14] Halliday JE, Allan KJ, Ekwem D, et al. Endemic zoonoses in the tropics: a public health problem hiding in plain sight [J]. *Vet Rec*, 2015, 176(9): 220–225.
- [15] Zhang HL, Mnzava KW, Mitchell ST, et al. Mixed methods survey of zoonotic disease awareness and practice among animal and human healthcare providers in Moshi, Tanzania [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(3): e0004476.
- [16] Crump JA, Morrissey AB, Nicholson WL, et al. Etiology of severe non-malaria febrile illness in Northern Tanzania: a prospective cohort study [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(7): e2324.
- [17] Chipwaza B, Mhamphi GG, Ngatunga SD, et al. Prevalence of bacterial febrile illnesses in children in Kilosa district, Tanzania [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(5): e0003750.
- [18] FAO. Regional workshop on brucellosis control in Central Asia and Eastern Europe [M]. Izmir: International Agricultural Research and Training Center Press, 2013.
- [19] 马春峰, 郭振东, 汤文庭. 动物生物安全实验室常见生物危害及控制措施 [J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(9): 119–124.
- [20] Bausch DG, Geisbert TW. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2007, 6(1): 57–74.
- [21] Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979 [J]. *Science*, 1994, 266(5188): 1202–1208.
- [22] Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories [M]. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services Press, 2009.
- [23] 世界卫生组织. 实验室生物安全手册 [M]. 日内瓦: 世界卫生组织, 2004.
- [24] 中华人民共和国国务院. 《病原微生物实验室生物安全管理

- 条例》[国务院令第 424 号] [Z]. 北京: 中华人民共和国国务院, 2004.
- [25] 中华人民共和国卫生部.《人间传染的病原微生物名录》[卫科教发[2006]15 号] [Z]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2006.
- [26] Ling AE. Editorial on laboratory-acquired incidents in Taipei, Taiwan and Singapore following the Outbreak of SARS coronavirus [J]. *Applied Biosafety*, 2007, 12(1): 17.
- [27] 赵鲁. 实验室 SARS 病毒泄漏事故回顾 [EB/OL]. 中国科学报 [2014-07-25]. <http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2014/7/299630.shtm>.
- [28] 王帝. 东北农业大学 28 名师生因动物实验感染严重传染病 [EB/OL]. 中国青年报[2011-09-03]. http://zqb.cyol.com/html/2011-09/03/nw.D110000zgqnb_20110903_3-03.htm.
- [29] Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA, USA. CDC Report on the potential exposure to anthrax [J]. *Int Microbiol*, 2014, 17(2): 119-127.
- [30] 卢选成, 李晓燕, 姜孟楠, 等. 感染性动物实验设施的设计与建设[J]. 中国公共卫生管理, 2009, 25(2): 153-154.
- [31] 章欣. 生物安全 4 级实验室建设关键问题及发展策略研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [32] Fontes B. Institutional responsibilities in contamination control in research animals and occupational health and safety for animal handlers [J]. *ILAR J*, 2008, 49(3): 326-337.

[收稿日期]2020-04-08

(上接第 113 页)

- [34] Zhou T, Dong Q, Shen Y, et al. PEG-b-PCL polymeric nanomicelle inhibits vascular angiogenesis by activating p53-dependent apoptosis in zebrafish [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 6517-6531.
- [35] Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, et al. Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(6): 676-685.
- [36] Hou J, Liu H, Zhang S, et al. Mechanism of toxic effects of Nano-ZnO on cell cycle of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2019, 229: 206-213.
- [37] Liu Y, Liu B, Feng D, et al. A progressive approach on Zebrafish toward sensitive evaluation of nanoparticles' toxicity [J]. *Integr Biol*, 2012, 4(3): 285-291.
- [38] Hua J, Vijver MG, Richardson MK, et al. Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33(12): 2859-2868.
- [39] Ispas C, Andreescu D, Patel A, et al. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(16): 6349-6356.
- [40] Peng Z, Miyajima EH, Zhou Y, et al. Carbon dots: promising biomaterials for bone-specific imaging and drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(44): 17533-17543.
- [41] 王小琦, 孙岩, 张洋, 等. 斑马鱼模型在常见骨疾病研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(6): 86-91.
- [42] 汪玲, 陈朝红. 斑马鱼: 人类肾脏疾病治疗药物筛选的新工具 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 113-118.

[收稿日期]2020-04-20

邵红莲, 谭韬. 小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 119-124.

Shao HL, Tan T. Advances in the application of an *in vitro* culture system of mouse post-implantation embryos [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 119-124.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.019

小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的应用进展

邵红莲¹, 谭韬^{1,2*}

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 昆明 650500; 2. 昆明理工大学 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 小鼠是研究哺乳动物中一种小型的模式生物, 在研究非人灵长类以及人类胚胎之前, 需要先在小鼠体内确定实验能否进行再转移到高等哺乳动物。现有体系的限制使小鼠胚胎只能在体外培养至 E6.5, 小鼠胚胎体外延时培养体系的建立对于理解胚胎植入后的关键事件以及分子机制有着非常重要的作用, 更为人胚胎的发育研究提供有效平台。单细胞测序技术的发展为小鼠胚胎体外延时培养提供了新的可能, 在这里我们介绍了小鼠植入后胚胎的普通体外延时培养体系、3D 培养体系、单细胞测序技术在胚胎领域的应用, 以及其未来可能的发展方向。

【关键词】 小鼠胚胎发育; 体外延时培养体系; 3D 培养体系; 单细胞转录组测序

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0119-06

Advances in the application of an *in vitro* culture system of mouse post-implantation embryos

SHAO Honglian¹, TAN Tao^{1,2*}

(1. Faculty of Metallurgical and Energy Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China.

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

【Abstract】 Mice are a small mammal model for scientific research. Before studying non-human primates and human embryos, it must be determined whether the experiment can be carried out in mice and then employ higher mammals. The limitation of the existing system is that mouse embryos can only be cultured *in vitro* to E6.5. Establishment of a mouse embryo *in vitro* culture system is very important to understand the critical events and molecular mechanisms of embryo peri-implantation. The development of single-cell RNA sequencing technology provides new possibilities for *in vitro* time-lapse culture of mouse embryos. Here, we introduce an *in vitro* time-lapse culture system and 3D culture system for mouse embryo implantation, the application of single-cell RNA sequencing technology in the field of embryos, and its possible future direction of development.

【Keywords】 mouse embryonic development; *in vitro* time-lapse culture system; 3D culture system; single cell RNA sequencing

哺乳动物植入后胚胎发育的相关机制是发育学领域的关注热点, 小鼠是最易获得且最具特征的

哺乳动物胚胎发育模型。哺乳动物的早期胚胎发育经历: 受精卵→2-细胞→4-细胞→8-细胞→桑椹

[作者简介] 邵红莲(1994—), 女, 硕士, 研究方向: 小鼠胚胎体外培养体系的建立及优化。E-mail: 2075543557@qq.com

[通信作者] 谭韬(1981—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 早期胚胎发育的表现遗传学研究。E-mail: tant@lpbr.cn

胚→囊胚→原肠胚几个阶段,植入后早期胚胎发育是指囊胚由输卵管进入子宫着床并继续发育的过程^[1-5]。小鼠胚胎体外培养体系的成功建立,可以作为一个深入研究小鼠植入后胚胎发育的相关机制平台,也可以作为其他哺乳动物胚胎体外培养体系的建立及优化的参考依据。

现阶段已有较多小鼠植入前胚胎发育机制的相关研究,植入前胚胎发育过程的核基因组、转录组、蛋白表达变化等问题都得到了比较详细的解答^[6]。Xue 等^[7]研究发现,受精卵胚胎处于转录静止状态,其发育完全由母系提供的蛋白质和来自卵浆的 RNAs 控制,2 细胞期才发生重要的基因激活。桑椹胚时期内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblastic ectoderm, TE)分化形成囊胚的分子机制也较为详尽^[8-9]。

相较于众多的植入前形态发生和信号通路的研究,植入期和植入后期的研究非常有限。尤其是人类及非人类灵长类动物的胚胎,其植入期、植入后期的形态发生、转录组和表观基因组的特异性调控都未得到系统的研究。由于人类胚胎 14 d 原则的伦理限制以及难以获取胚胎,小鼠胚胎成为众多基础研究的常用胚胎模型。小鼠胚胎的体外延时培养体系不仅能够解释植入过程和植入后的胚胎发生事件,更为探索高级哺乳动物体外培养体系建立基础。该篇综述对小鼠植入后胚胎体外延时培养体系进行总结,并对更高等的哺乳动物的体外培养体系发展提供更好的思路。

1 普通培养体系

目前常用的体外培养体系(*in vitro* culture, IVC)可大致分为两类:IVC1 与 IVC2。IVC1 用于滋养层细胞(trophoblast cells, TS)贴壁前的培养,IVC2 用于 TS 贴壁后的培养。目前很多实验室都在进行小鼠的体外延时培养,培养体系在不停的优化,但依旧不能获得稳定的体系。

1.1 基于 DMEM、Whitten 的体外培养体系

2011 年, Takaoka 等^[10]使用 DMEM、Whitten 培养基培养 E5.0-E5.5 和 E3.7 胚胎。首先在添加 50% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 25 mm HEPES-NaOH (pH 7.2)的 DMEM 中恢复胚胎。随后将 E5.0-E5.5 胚胎转移到培养基中,该培养基由 75% 大鼠血清和 25% DMEM 缓冲 44 mM NaHCO₃ (pH 7.2)组成。将 E3.7 胚胎转移到改良的 Whitten 培养基中。胚胎在 35 mm 的玻璃底塑料培养皿中培养。

1.2 基于 CMRL1066 的体外培养体系

2012 年, Morris 等^[11]人为了研究小鼠植入后胚胎前后轴的形成,建立了一套体外培养体系。在该体系中, IVC1 的基础成分为 CMRL1066、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、双抗(青霉素和链霉素)、胎小牛血清(fetal calf serum, FCS)等。IVC2 基础成分与 IVC1 相同,但使用人脐带血清(human cord serum, HCS)替代了 FCS。该培养体系使用了聚丙烯酰胺凝胶与玻璃结合,并覆盖各种蛋白质涂层,以便能够清晰地跟踪前内胚层内胚层的逐步发育。但是凝胶制备的复杂性和 HCS 分离难度使该方法难以广泛应用,而且来源不同的 HCS 可能会导致培养结果的不同。

1.3 基于 Advanced-DMEM/F12 的体外培养体系

2014 年, Bedzhov^[12]团队描述了一个支持小鼠胚胎发育至囊胚之后的体系,提供了一个新的分步培养方案,奠定了小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的发展基础。在该研究中,采用 Advanced-DMEM/F12 代替 CMRL-1066,同时添加双抗(青霉素和链霉素)、L-谷氨酰胺、 β -雌二醇、孕酮、N-乙酰-L-半胱氨酸等成分。为进一步降低 HCS 的需求,他们还添加了 ITS-X 和敲除血清替代品(KnockOut serum replacement, KSR)。IVC1 与 IVC2 均基于以上成分,二者最主要的区别在于, IVC1 使用 FBS 作为胚胎的营养成分,而 IVC2 使用 KSR 替代 FBS。该研究还采用了特殊的光学材料(ibiTreat μ -plates, eight-well)作为基质,在体外将小鼠囊胚培养到卵圆柱阶段,体外培养的胚胎形态以及谱系标志物的检测和正常体内 E6.5 相同。

在该研究中, Bedzhov 等^[12]还尝试了两种培养方法。第一种方法从早期囊胚开始,去除透明带后,囊胚可以附着在基质上,5 d 后发育成卵圆柱体;第二种方法是从晚期囊胚开始,在 3 d 内分离出的附壁 TE 形成卵圆柱体,通过这种方法可以观察到以前隐藏的发育时期。他们使用的培养体系可用于直接监测小鼠植入期胚胎谱系发生,胚胎生长等情况。至此,小鼠胚胎体外延时培养体系已初见规模,能够很好的支持众多小鼠胚胎研究。

2 3D 培养体系

早在几十年前,研究者就观察到,细胞在活体内和培养皿中所处的微环境截然不同。当细胞系嵌入 3D 基质或标准组织培养板中时^[13],细胞表现出显著的不同形态和生长特征^[14]。自此,细胞培养技术的一个重要进展是引入了 3D 培养系统。与二维方法相比,3D 方法的一个主要优点是减少了细胞

培养系统和体内环境之间的差距,显示出更接近复杂的体内条件特征^[15-17]。在传统的 2D 条件下,对分化、增殖和细胞功能非常重要的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分、细胞间相互作用都会丢失^[18]。在 3D 培养系统中,未分化细胞的存活率也得到了提高,这对研究与环境相关的物理化学因素对胚胎细胞的影响是有帮助的。

3D 支架是用各种天然(胶原蛋白、明胶、弹性蛋白、丝素蛋白、壳聚糖、甲壳素、纤维蛋白、纤维蛋白原等)和合成聚合物制成的,同时也包括一些公认的天然和合成物质的混合物。常用的 3D 支架材料有琼脂糖、胶原、纤维连接蛋白、明胶、层粘连蛋白和卵黄蛋白。这些复合材料在孔隙率、纤维、渗透性和机械稳定性等物理特性方面模拟天然 ECM。微结构增强了胚胎中粘附细胞的生物物理学和生物化学相互作用,使其在体外更好的表达相应的基因。3D 基质为胚胎增殖、分化和分泌细胞特异性 ECM 提供了一个生物活性环境^[19]。以下介绍了常用 3D 基质及其在胚胎培养当中的用途。

2.1 基质胶(matrigel)

Matrigel 在干细胞领域已经有了充分的应用,在胚胎培养当中也有所尝试。Bedzhov 等^[20]使用 Matrigel 培养 E3.5 胚胎的 ICM。该研究将单个 ICMs 滴入 ibiTreat 显微术塑料 m 板中的基质凝胶中,37℃ 孵育 2~3 min,直至基质凝胶凝固。然后用加热过的 IVC1 培养基填充培养皿。在以 Matrigel 为基质的 3D 培养体系当中,TS 的发育更加接近于体内的状态,可以在一定程度上模拟体内的着床过程。

2.2 聚丙烯酰胺胶

Niu 等^[21]评估了与玻璃结合并覆盖各种蛋白质涂层的聚丙烯酰胺水凝胶在 3D 胚胎延时培养体系中的使用。在该研究中,首先通过改变 N'-N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺的比例来优化聚丙烯酰胺水凝胶的表面硬度,其次使用了不同的蛋白质涂层。采用 I 型大鼠尾胶原涂层时,87%(13/15)的胚胎可附着在基质上,38%(5/13)的胚胎可发育成卵圆柱。相比之下,层粘连蛋白或纤维蛋白-布朗宁与胶原结合使用时,80%(12/15)的胚胎可以附着,41%(5/12)的胚胎可形成卵圆柱。这些胚胎发育出正确的形态和外胚层(epiblast, EPI)、TE 和原始内胚层(primitive endoderm, PrE),并且表达相应的组织标记基因。

2.3 3D 培养体系在其他哺乳动物中的应用

Shao 等^[22]基于人多能干细胞(pluripotent stem cells, PSC)的模型,建立了称为植入后羊膜囊胚状

体(post-implantation amniotic sac embryoid, PASE),它能够概括围绕羊膜囊发育的多个植入后胚胎发生事件。在没有母体或胚胎外组织的情况下,PASE 自组织形成一个具有不对称羊膜 EPI 的上皮囊肿,类似于人类羊膜囊。在进一步的发育过程中,PASE 以 SNAI1 依赖的方式启动一个类似于后原条发育的过程。此外,他们还发现到非对称 BMP-SMAD 信号与 PASE 的发展同步,并证实 BMP-SMAD 的激活/抑制调节了 PASE 的稳定发展。该研究为小鼠胚胎体外延时培养提供了新的思路,即构建 3D 的培养体系,为胚胎着床及着床后的发育提供可能的条件。他们采用 3D 培养体系来培养植入后人羊膜囊,其在 8 孔板底部铺有一层 Matrigel,且在日常培养基中添加了 ECM。Matrigel 能够向 EPI 细胞提供极化信号,胚胎干细胞在 Matrigel 内培养后能够形成类似体内胚胎花环的 EPI 结构,凋亡细胞数量也少于一般的二维培养^[22]。

3D 培养体系在体外通过细胞外基质构建类体内环境,有效促进了哺乳动物胚胎在体外的发育过程,进而促进胚胎前后轴形成动力学、胚胎滋养巨细胞与子宫内层相互作用等问题的理解^[23]。但 3D 体系仍然不够成熟,不能够完全模拟小鼠胚胎体内着床以及着床后的进一步发育。寻找更合适的 3D 体系材料及其构建方法、并将其与已知的维持胚胎的培养体系结合是该领域的重点研究方向。现如今,3D 打印技术逐渐成熟,能够建立更加精细的结构,该技术将来可以被应用于小鼠胚胎体外延时培养的 3D 体系的建立,也有可能进一步为非人类灵长类动物和人类的胚胎的体外培养提供技术支持和研究基础。

3 培养体系添加物

有研究者报道了小鼠囊胚到卵圆柱转变过程中的关键形态发生事件,这些步骤将简单的 EPI 细胞球转化为杯状上皮细胞^[12]。Copp^[24]揭示了体外囊胚着床后,TS 与 ECM 的粘附强度随时间而发生变化,这限制了极性细胞进一步的体外发育,从而导致卵圆柱的形成。Bedzhov 等^[20]人发现,胚胎外细胞系分泌的基底膜成分为 PSC 提供了极化信号。这导致 EPI 整体重组为玫瑰花状结构,并伴随管腔发生。除了 3D 体系,胚胎发育过程中,胚胎外细胞系分泌的细胞因子也会决定胚胎发育的质量。因此体外培养体系中的各类添加物对胚胎发生也发挥重要作用。

3.1 细胞因子

在囊胚(E3.5)中三种不同的细胞系 TE、ICM

中的 EPI 和 PrE 发育过程中,许多关键的谱系因子,如 CDX2、POU5F1 和 SOX17,分别在小鼠胚胎发育过程中表现出保守表达。在小鼠体内胚胎发育过程中,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号和随后的细胞内丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径激活 EPI 和 PE 细胞的分化,最终分别产生胚胎固有细胞和卵黄囊。在小鼠胚胎培养过程中抑制 FGF/MAPK 信号可增加 ICM 内表达 NANOG 细胞的比例,FGF 受体上调可导致 ICM 细胞转化为 GATA6 阳性 PE 前体。IGF1 受体、IGF1 和胰岛素受体分别在人 PE 和 EPI 中表达,通过磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)/mTOR,可以维持胚胎内细胞干性的通路,如对 PE 发育有重要作用的 FGF 通路^[25]。在小鼠胚胎培养基中,添加 IGF 和 EGF 有利于胚胎从透明带孵出。对小鼠胚胎研究表明,TGF- α 和 EGF 能分别通过自分泌作用和旁分泌作用促进囊胚腔的扩张膨大。IL-1、IL-6、CSF-1 以及 TNF- α 等生长因在人早期胚胎植入过程中担任不同的角色,最终促进胚胎成功着床以及后续的胚胎发育。Niu 等^[21]在体外建立了一个培养体系,在人胚胎培养体系的基础上进行优化,能够将高级哺乳动物食蟹猴的胚胎延时培养至 20 d,获得的胚胎能够出现谱系分化、胎盘形成、羊膜囊和卵黄囊成腔化以及原始生殖细胞分化等哺乳动物胚胎发育过程中的关键事件。他们通过 ROCK 抑制剂 Y-27632 促进了猴胚胎的发育,减少胚胎内细胞的凋亡。因此细胞因子及其作用通路是优化胚胎体外延时培养体系的重要研究方向。

3.2 激素及有机物

胚胎环境中的激素以及体内环境中的有机物质也对胚胎发育有着重要的作用。人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)在体内可以吸附于 TS 表面,保护 TS 免受母体淋巴细胞的攻击。体内 hCG 的浓度也与囊胚发育质量有显著相关性。在体外,孕马血清促性腺激素和 hCG 的合用可以在一定范围内增加小鼠胚胎的发育数量和发育率^[26]。雌激素也在小鼠早期胚胎发育过程中发挥重要作用,其小鼠胚胎的体外培养体系中都有添加。牛磺酸和 EDTA 可以克服二细胞阻滞,一些氨基酸如谷氨酰胺也会参与蛋白质、DNA 的合成,成为胚胎发育最初 48 h 内的重要能量来源,而且谷氨酰胺具有防止细胞氧化的功效,一些研究表明,在培养液中添加谷氨酰胺,可提高小鼠在体外

的囊胚孵化率^[27]。

4 单细胞转录组测序对胚胎发育的启示

小鼠植入前胚胎体外培养体系较为成熟,能够培养至原条出现阶段。但随着囊胚的发育进行,胚胎内的细胞逐渐分化,所需求的信号分子也随之发生改变。这也对体外环境是否能够支持不同细胞系的发育提出了更高的要求。研究表明转录因子网络的协同作用对于胚胎发育成功的谱系分离是必不可少的^[28-31]。对早期胚胎的单细胞转录组分析(single cell RNA sequencing, scRNA-seq)给胚胎发育领域带来了很多新的启发^[25]。scRNA-seq 在不到 10 年的时间里飞速发展,该技术能够揭示胚胎内的每一个细胞各自的发育事件及其产生的变化,详细研究特定基因和调控序列在发育中的作用。

4.1 胚胎发育的基因表达

Smart-seq2 技术的出现及优化为胚胎发育的单细胞转录组学提供了一个很好的平台^[32-34]。Mohammed 等^[35]人通过对 E3.5 到 E6.5 小鼠胚胎进行 scRNA-seq 来研究从着床期到早期原肠胚形成的调控环境,以探索从植入前到早期原肠胚早期的小鼠发育。有研究者将该方法直接应用于 E3.5 小鼠囊胚未分化 ICM 中的单个细胞,发现存在两个细胞群,一个具有 PrE 表达,另一个具有多能性 EPI 样基因表达。两个群体间差异表达的基因在胚胎中 E4.5 在形态分化的 PE 和 EPI 中得到了很好的保存,表明该方法成功地检测到了表面上同质的细胞群体在单细胞水平上细微但本质的差异^[36-37]。为了建立小鼠囊胚 ICM 内 EPI 与 PrE 谱系分离的图谱,Ohnishi 等^[38]描述了单个 ICM 细胞的基因表达谱。这项研究提出了一个模型,即 ICM 中细胞基因的表达水平出现随机变异,且彼此独立,随后通过一系列信号通路增强支持了 ICM 谱系分离。众多胚胎 scRNA-seq 是胚胎内细胞群体的鉴定强有力的工具,为细胞命运的溯源提供证据。

4.2 胚胎发育的细胞命运图谱

体内哺乳动物细胞分化轨迹的全面描绘代表胚胎发育过程中基因表达变化的基线,其可用于再生医学的优化体外分化方案的参照^[39]。Scialdone 等^[39]通过单细胞转录组分析小鼠胚胎早期中胚层分化的问题。传统的多细胞 DNA 分析的实验方法依赖于细胞数较多的样本,不适合胚胎早期谱系多样性的研究。为了解决这个问题,他们使用 scRNA-seq 研究了 1205 个中胚层单细胞向造血系统的分化过程,涵盖了从 E6.5 早期原肠胚形成到 E7.75 原

始红细胞生成的时间过程。在 E6.5 小鼠胚胎中,位于 PrE 和 EPI 交界处的细胞经历上皮-间充质转化。随后,细胞发生迁移进而获得不同的细胞命运,或围绕着 EPI,或进入 PrE 形成卵黄囊、脐带和胎盘。细胞命运图谱显示,成熟组织,如血液和心脏,起源于原肠胚前成纤维细胞的特定区域,但仍然不清楚胚胎中众多细胞的命运是如何决定的^[40]。

Pijuan-Sala 等^[40]报告了在受精后 6.5~8.5 d 的九个连续时间点收集的来自小鼠胚胎的 116,312 个单细胞的转录谱。构建了从多能性向所有主要胚胎谱系的细胞分化的分子图谱,并探讨了内脏和原条衍生、内胚层融合的复杂事件^[39]。Cao 等^[41]分析了在妊娠 9.5~13.5 d 之间的 61 个胚胎大约 200 万个细胞的转录体。由此产生的“小鼠器官发生细胞图谱”(MOCA)提供了这一关键时期发育过程的全局视图^[41-42]。scRNA-seq 为追踪胚胎发育过程的所有细胞命运提供了可能,而且该领域还需要更深入的研究去完善其他哺乳动物胚胎谱系分化图谱。

4.3 其他哺乳动物胚胎发育的单细胞测序研究

与此同时,众多研究者对高级哺乳动物的胚胎也进行了单细胞转录组的研究,探索胚胎发育的复杂机制。EPI 是哺乳动物所有体细胞和生殖细胞的起源。为了探索人类和灵长类多能性的个体发育,Nakamura 等人^[43]对食蟹猴(*Macaca fascicularis*)植入前和植入后的 EPI 进行了全面的 scRNA-seq。结果表明,在囊胚发育过程中,食蟹猴 EPI 在着床过程中发生了重要的转录组变化。该研究不仅揭示了 EPI 发育的差异性和一致性,而且确定了关键物种间多能性谱的发育坐标,为更好地建立人胚胎的培养体系提供了线索。Zhou 等人^[44]结合体外培养的胚胎发育和 scRNA-seq,系统分析了来自人的 65 个移植前后胚胎的 8000 多个单个细胞。转录组数据的无监督降维和聚类算法显示了 EPI、PrE 和 TE 谱系的逐步植入路径,表明胚胎在植入过程中为着床于子宫内膜做好了充分准备。该研究提供了对调节人类胚胎植入的复杂分子机制的理解,并有助于推进未来对早期胚胎发育和生殖医学的理解。众多的测序研究结果揭示了小鼠、高级哺乳动物以及人胚胎发育过程中的复杂路径,同时其详尽的转录组信息为体外延时培养获得的胚胎发育谱系提供了很好的参照标准,也为解析发育过程的分子机制提供了有力的支持。

5 结论与展望

胚胎是生命的起源,理解胚胎的发育历程有助

于研究高等动物的发育过程。小鼠胚胎以其哺乳动物的胚胎特性和较短的发育时间等优势,成为了很好的胚胎研究的模型。猴胚胎、人胚胎的植入发育研究都是建立在小鼠胚胎的模型上来开展的。建立体外延时培养的小鼠胚胎体系,有助于我们更好的理解哺乳动物在着床后所经历的事件,揭示胚胎发育的过程。高级哺乳动物以及人胚胎的延时培养研究能够反哺小鼠胚胎体外延时培养体系的有效建立。

总之,植入后胚胎体外培养这个领域在胚胎发育过程的研究中是至关重要的。目前针对胚胎的体外培养技术还存在不足,需要更多的研究投入。未来的研究需要更多地理解胚胎发育的机制以及发育过程中的事件,这可以为生殖医学等相关领域提供相应的基础,也可以帮助我们理解生殖医学中的多种问题,例如胚胎受孕后的流产、胚胎与子宫内膜的交互作用以及移植胚胎吸收等相关事件。

参考文献:

- [1] Bischof P, Campana A. Trophoblast differentiation and invasion: its significance for human embryo implantation [J]. *Early Pregnancy*, 1997, 3(2): 81-95.
- [2] Zernicka-Goetz M, Morris SA, Bruce AW. Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(7): 467-477.
- [3] Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse [J]. *Development*, 2009, 136(5): 701-713.
- [4] Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 91-103.
- [5] Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo [J]. *Development*, 1991, 113(3): 891-911.
- [6] Rossant J. Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences [J]. *Development*, 2015, 142(1): 9-12.
- [7] Xue Z, Huang K, Cai C, et al. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Nature*, 2013, 500(7464): 593-597.
- [8] Leung CY, Zernicka-Goetz M. Mapping the journey from totipotency to lineage specification in the mouse embryo [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 34: 71-76.
- [9] Paranjpe SS, Veenstra GJ. Establishing pluripotency in early development [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(6): 626-636.
- [10] Takaoka K, Yamamoto M, Hamada H. Origin and role of distal visceral endoderm, a group of cells that determines anterior-posterior polarity of the mouse embryo [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(7): 743-752.
- [11] Morris SA, Grewal S, Barrios F, et al. Dynamics of anterior-

- posterior axis formation in the developing mouse embryo [J]. Nat Commun, 2012, 3: 673.
- [12] Bedzhov I, Leung CY, Bialecka M, et al. *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages [J]. Nat Protoc, 2014, 9(12): 2732–2739.
- [13] Montesano R, Schaller G, Orci L. Induction of epithelial tubular morphogenesis *in vitro* by fibroblast-derived soluble factors [J]. Cell, 1991, 66(4): 697–711.
- [14] Zhang K, Manninen A. 3D cell culture models of epithelial tissues [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1926: 77–84.
- [15] Cukierman E, Pankov R, Stevens DR. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension [J]. Science, 2001, 29(5547): 1708–1712.
- [16] Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR. 3D cell culture systems - advantages and applications [J]. J Cell Physiol, 2015, 230(1): 16–26.
- [17] Vinci M, Gowan S, Boxall F. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation [J]. BMC Biol, 2012, 10: 29.
- [18] Mazzoleni G, Lorenzo DD, Steinberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research [J]. Genes Nutr, 2009, 4(1): 13–22.
- [19] Gu Z, Guo J, Wang H, et al. Bioengineered microenvironment to culture early embryos [J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12754.
- [20] Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation [J]. Cell, 2014, 156(5): 1032–1044.
- [21] Niu Y, Sun N, Li C, et al. Dissecting primate early post-implantation development using long term *in vitro* embryo culture [J]. Science, 2019, 366(6467): eaaw5754.
- [22] Shao Y, Taniguchi K, Townshend RF, et al. A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 208.
- [23] Ruane PT, Berneau SC, Koeck R, et al. Apposition to endometrial epithelial cells activates mouse blastocysts for implantation [J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(9): 617–627.
- [24] Copp AJ. The mechanism of mouse egg-cylinder morphogenesis *in vitro* [J]. J Embryol Exp Morphol, 1981, 61: 277–287.
- [25] Guo G, Huss M, Tong GQ. Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst [J]. Dev Cell, 2010, 18(4): 675–685.
- [26] 姚瀛, 徐营, 陈毅斐. 激素对小鼠胚胎体外发育的影响 [J]. 现代农业科技, 2010, 3: 319–321, 323.
- [27] 衣少莉. 牛磺酸、EDTA 和类固醇激素对小鼠胚胎体外发育的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [28] Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, et al. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo [J]. Genes Dev, 2008, 22(19): 2692–2706.
- [29] Kang M, Piliszek A, Artus J, et al. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse [J]. Development, 2013, 140(2): 267–279.
- [30] Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo [J]. Dev Biol, 2008, 313(2): 614–629.
- [31] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation [J]. Cell, 2005, 123(5): 917–929.
- [32] Ramsköld D, Luo S, Wang YC, et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(8): 777–782.
- [33] Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(5): e42.
- [34] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2 [J]. Nat Protoc, 2014, 9(1): 171–181.
- [35] Mohammed H, Hernando-Herraez I, Savino A, et al. Single-cell landscape of transcriptional heterogeneity and cell fate decisions during mouse early gastrulation [J]. Cell Rep, 2017, 20(5): 1215–1228.
- [36] Rossant J, Chazaud C, Yamanaka Y. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 358(1436): 1341–1349.
- [37] Picelli S, Björklund ÅK, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. Nat Methods, 2013, 10(11): 1096–1098.
- [38] Ohnishi Y, Huber W, Tsumura A, et al. Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 27–37.
- [39] Scialdone A, Tanaka Y, Jawaid W, et al. Resolving early mesoderm diversification through single-cell expression profiling [J]. Nature, 2016, 535(7611): 289–293.
- [40] Pijuan-Sala B, Griffiths JA, Guibentif C, et al. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 490–495.
- [41] Cao J, Spielmann M, Qiu X, et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 496–502.
- [42] Shahbazi MN, Zernicka-Goetz M. Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(8): 878–887.
- [43] Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans [J]. Nature, 2016, 537(7618): 57–62.
- [44] Zhou F, Wang R, Yuan P, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation [J]. Nature, 2019, 572(7771): 660–664.

[收稿日期]2020-07-03

巫丹,尹宇. 人脐带间充质干细胞治疗不同疾病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 125-130.

Wu D, Yin Y. Research progress of human umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of various diseases [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 125-130.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.020

人脐带间充质干细胞治疗不同疾病的研究进展

巫 丹,尹 宇*

(昆明理工大学灵长类转化医学研究院,昆明 650000)

【摘要】 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类起源于早期中胚层,并且能够自我更新和具有多向分化潜能的成体干细胞。大量的研究证明, MSCs 在再生医学领域中具有巨大潜力,未来可被用于治疗多种类型疾病,如脊髓损伤、肝损伤、肾损伤及自身免疫性疾病等。MSCs 一般来源于胎盘、脂肪、骨髓、骨髓以及脐带和胎儿内脏等器官组织。其中,脐带作为在母体和胎儿之间运输营养物质的纽带,同样含有大量的间充质干细胞。并且相较于易受供体的年龄因素影响的骨髓间充质干细胞和易受到医学伦理限制的胎儿来源的间充质干细胞而言,增殖效率高、供体广泛、病毒感染率低的脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)可能是临床应用时的更好的选择,这些优势也使得 hUCMSCs 在再生医学领域备受关注。本文重点对 hUCMSCs 目前与疾病治疗相关的研究进展作一综述。

【关键词】 脐带间充质干细胞;干细胞移植;组织修复

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0125-06

Research progress of human umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of various diseases

WU Dan, YIN Yu*

(Kunming University of Science and Technology, Primates Translational Medicine Research Institute, Kunming 650000, China)

【Abstract】 Mesenchymal stem cells (MSCs) are a type of adult stem cell that originates in the early mesoderm, which are capable of self-renewal and multi-directional differentiation. A large number of studies have shown that MSCs have great potential in the field of regenerative medicine. MSCs can be used to treat many types of diseases such as spinal cord injury, liver damage, kidney damage and autoimmune diseases. They are generally derived from placenta, fat, dental pulp, bone marrow, umbilical cord, and fetal internal organs as well as other organs and tissues. Among them, the umbilical cord as a link between the mother and fetus to transport nutrients contains a large number of MSCs. Compared with bone marrow mesenchymal stem cells that are affected by the donor's age and fetal mesenchymal stem cells that have ethical issues, umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) have a high proliferation efficiency and wide range of donor sources, and low virus infection rate. Therefore, hUCMSCs are considered to be a better choice for treatment of various diseases. These advantages also make hUCMSCs attractive in the field of regenerative medicine. This article focuses on the current research progress of hUCMSCs related to disease treatment.

【Keywords】 umbilical cord mesenchymal stem cells; stem cell transplantation; tissue repair

[作者简介] 巫丹(1995—),女,硕士,主要从事人脐带间充质干细胞相关研究。E-mail: wud@lprb.cn

[通信作者] 尹宇(1988—),男,博士,主要从事干细胞和发育生物学研究。E-mail: yiny@lprb.cn

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最早起源于早期中胚层,能够自我更新并具有多向分化的潜能,可从成体骨髓、牙髓、脂肪组织、脐带等组织中分离^[1-2]。由于 MSCs 具有免疫调节的作用,因此 MSCs 在损伤组织修复和自身免疫性疾病的细胞治疗领域备受青睐^[3-4]。其中,来源于脐带的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)因具有多能性、低致瘤性、低免疫原性、增殖率高和获取方便等特点^[5-6],成为了同种异体环境中细胞移植的重要适用细胞来源,其亦可能成为干细胞治疗的优先选择。

1 hUCMSCs 的来源及生物学特征

脐带由三部分构成:脐血管,羊膜被覆上皮以及华通氏胶(Wharton's Jelly)^[7]。根据脐带的组成结构,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)的来源大致可以分为 4 种:(1)从人脐带华通胶中得到的间充质干细胞(human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells, hWJMSCs), (2)来源于人脐带血的间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs), (3)来自人脐带血管周围组织的间充质干细胞(human umbilical cord perivascular mesenchymal stem cells, hUCPV-MSCs), (4)从羊膜中获得的间充质干细胞(mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord amnion, hAMSCs)。

hWJMSCs 高表达白细胞分化抗原(cluster differentiation, CD), 如 CD29、CD90、CD44、CD105 等,低表达人白细胞 DR 抗原(human leukocyte antigen-DR, HLA-DR),且极少表达 CD45 抗原,因此其免疫原性较低,可用于损伤组织修复和治疗自身免疫缺陷病^[8-9];脐带血来源的 hUCMSCs 高表达 MSCs 相关抗原如 CD73、CD90、CD105 和黏附分子 CD44,不表达造血细胞标志 CD11b、CD14、CD19、HLA-DR^[10-11];脐带血管周围的 hUCPV-MSCs 高表达 CD105、CD73、CD90 及 CD44,不表达 CD34、CD235a、VCAM1、IL-3、及 OCT4,由于 hUCPV-MSCs)存在细胞含量少及增殖传代能力较弱的特性^[12-13],无法在临床和科学研究中广泛应用,因此相关研究较少;羊膜来源的 hAMSCs 高表达 CD73、CD90、CD105,可诱导分化为成脂和成骨细胞,同时, hAMSCs 具有促血管生成、组织修复及免疫调节功能^[14-15]。目前临床研究及应用得最多的是

hWJMSCs 和 hUCMSCs,统称为 hUCMSCs。

2 hUCMSCs 治疗不同疾病的研究进展

2.1 hUCMSCs 治疗肝损伤

hUCMSCs 可减少 CD8⁺T 细胞数量,进而减少干扰素- γ 和肿瘤坏死因子的产生;同时可以抑制肝内已经活化的巨噬细胞向抗炎症 M2 细胞转化,并阻止肝内的炎症级联反应^[16-17]。2016 年 Bi 等^[17]证实,移植进小鼠内的 hUCMSCs 可以通过降低 miR-199 的表达来降低角质细胞生长因子的生成,进而阻止肝星状细胞的活化和聚集,从而起到降低门静脉压力、减少肝纤维化和修复肝损伤的作用。近期在 Shao 等^[18]的研究中确定了 hUCMSCs 受到 IL-6 刺激后,会分泌可能靶向作用于 PI3K 信号通路的富含 miR-455-3p 的外泌体。这种外泌体在体内和体外均可抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞活化和细胞因子的产生,并且在化学性肝损伤小鼠模型中,miR-455-3p 的表达增强可以减弱巨噬细胞浸润和局部肝损伤,并降低血清中的炎症因子水平,从而改善肝功能。另外,在 Li 等^[19]的研究中, hUCMSCs 已显示出对糖尿病和肝病(如肝硬化和暴发性肝衰竭)的治疗潜力,在临床研究中进行 hUCMSCs 输注可显著改善高糖血症,并降低血液中甘油三酸酯,总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇含量,从而为 2 型糖尿病(T2DM)患者中的非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)患者带来治疗的希望。

2.2 hUCMSCs 治疗肾损伤

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是临床中常见的肾相关疾病,急性肾损伤后若无法得到及时有效的治疗,肾功能将快速恶化,甚至导致功能性肾衰竭^[20]。Andrade 等^[21]报道称,体外培养的 hUCMSCs 移植可有效改善急性肾损伤。其作用机制可能是 hUCMSCs 体内定向分化成肾小管上皮细胞,替代已经受损或坏死的肾组织细胞,并改善肾受损程度和减轻受损部位的炎症反应。此外有几项研究都表明 hUCMSCs 可作用于雄性大鼠 AKI 模型并改善其肾受损情况。其作用机制可能是:(1) hUCMSCs 降低趋化因子 CX3CL1 的表达从而减少受损部位炎症细胞的大量激活及浸润,减轻炎症反应,最终抑制肾组织细胞的变异、增生及纤维化;(2) hUCMSCs 分泌的外泌体可通过下调低氧诱导因子-1 的表达而抑制细胞凋亡,同时上调表达血管内皮生长因子,促进血管生成并修复肾损伤组

织^[22-23]。除此之外, hUCMSCs 可与胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factors 1, IGF-1) 嵌合成 hUCMSCs-IGF-1 复合体, 该复合体移植入大鼠 AKI 模型后, 可移动至肾受损处同时黏附于血管壁上, 促进血管内皮细胞大量增殖; 同时 hUCMSCs-IGF-1 复合体可通过激活 PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路从而减少 AKI 模型鼠肾组织中的细胞损伤, 增强其抗炎能力, 继而缓解肾损伤^[24]。因此可以认为, hUCMSCs 的移植将是 AKI 有效的前瞻性治疗方法。

2.3 hUCMSCs 治疗皮肤损伤

hUCMSCs 近年来由于其具有多能性、低免疫原性和可重建皮肤组织结构等特点而被认为是皮肤损伤的潜在治疗来源。hUCMSCs 移植到皮肤损伤部位后, 一方面可通过定向分化成表皮样细胞, 促进皮肤角质上皮再生及血管生成, 使受损皮肤逐渐愈合; 另一方面 hUCMSCs 可通过调节 Wnt4 信号通路, 促进 β -连环蛋白核转运, 增强表皮细胞的增殖能力, 并通过激活 Akt 信号通路来抑制表皮细胞凋亡使损伤皮肤修复^[24]。在 Montanucci 等^[25]研究中, 将 hUCMSCs 置于纤维蛋白双层膜上进行移植, 可以加快受损皮肤的上皮再生。此外, Mejía-Barradas 等^[26]发现皮脂切除术后产生继发性慢性溃疡的患者在接受了 hUCMSCs 的皮肤治疗后发现 hUCMSCs 可诱导瘢痕形成和新血管形成, 同时可减少产生白细胞和促炎因子, 继而发挥其促进皮肤愈合的作用。因此 hUCMSCs 也被提出可作为治疗术后皮肤病变的一种新的方法。

2.4 hUCMSCs 治疗脊髓损伤

急性脊髓损伤 (acute spinal cord injury, ASCI) 是一类由于高爆发暴力引起的椎体移位或骨折残片侵入人体内椎管, 导致脊髓受到严重机械性损伤的疾病, ASCI 的预后通常较差^[27]。而 hUCMSCs 易于获得和免疫原性低的特点使它成为治疗脊髓损伤这类疾病的热门选项。2018 年, 张陆等^[28]通过对比 hUCMSCs 移植前后 ASCI 患者的功能指标后发现, hUCMSCs 可以明显改善 ASCI 患者的神经功能损伤, 并且促进其恢复的同时不影响机体本身的免疫功能。另外, 人神经干细胞 (human neural stem cells, hNSCs) 也是在脊髓损伤模型中可用于细胞治疗的移植材料^[29]。先前的研究表明, MSCs 可以调节 NSCs 的细胞微环境并提高移植后 NSCs 的存活率, 并且与其他干细胞相比, MSCs 移植后相关的肿

瘤发生率明显更低^[30]。2019 年 Sun 等^[31]研究表明, 与单独移植 hUCMSCs 和单独移植 hNSCs 相比, 髓内联合移植 hUCMSCs 与 hNSCs 后治疗效果明显更好。因此虽尚未清楚其作用机制, 但可以认为 hUCMSCs 是未来用于临床治疗急性脊髓损伤的一个很有潜力的治疗工具。

2.5 hUCMSCs 治疗 cGVHD

慢性移植物抗宿主病 (chronic graft-versus-host disease, cGVHD) 是移植手术后最常见的并发症之一, 一般发生在移植 100 d 左右, 是手术后患者非疾病复发致死的主要原因^[32-33]。而 hUCMSCs 独特的免疫调节能力使其在 cGVHD 相关研究中备受关注。近期张玲等^[34]研究报道称, 接受 hUCMSCs 治疗后 cGVHD 患者外周血中原本高表达 CD19⁺ 的细胞数量有逐渐降低的趋势, 并且未观察到和 hUCMSCs 移植相关的不良反应, 患者也没有复发原发病以及产生间充质干细胞相关的肿瘤。这意味着 hUCMSCs 用于治疗难治性慢性移植物抗宿主病是有效并且安全的。另外还有实验表明, 尽管与对照组小鼠相比, 所有类型的间充质干细胞移植后小鼠均具有统计学上显著的存活延长, 但仅在接受 hBMSCs 和 hUCMSCs 的小鼠中观察到了显著的组织病理学改善。即其他类型的 MSCs 在体内的抗炎作用不如 hUCMSCs 和 hBMSCs^[35]。因而可以预见, 在未来关于治疗移植物抗宿主病的研究中, hUCMSCs 将成为一个热门选项。

2.6 hUCMSCs 治疗卵巢早衰

作为异质性疾病, 40 岁以下的女性中, 有 1% ~ 3% 的女性患有卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF), 其病理特征包括卵巢功能紊乱、雌激素水平降低和性腺激素水平升高, 但目前临床还没有非常有效的治疗手段^[36-37]。越来越多的证据表明, hUCMSCs 的移植是治疗 POF 的潜在疗法。研究表明, hUCMSCs 可以上调血红素加氧酶-1 (HO-1) 的表达, 而 HO-1 在卵巢的生理功能和垂体腺分泌促性腺激素功能中具有关键作用^[38-39]。但是在 hUCMSCs 治疗 POF 小鼠的相关研究中关于 HO-1 的作用和机制的了解还很少。最近, Yin 等^[39]发现在 hUCMSCs 中表达的 HO-1 基因可通过激活 JNK/Bcl-2 信号通路和上调 CD8⁺ CD28-T 细胞的表达来实现 hUCMSCs 移植后恢复 POF 小鼠的卵巢功能。这些发现为随后的临床上基于 hUCMSCs 的人类治疗提供了新的目标。

2.7 hUCMSCs 治疗帕金森和阿尔茨海默症

MSCs 可用于治疗神经退行性疾病引起了临床研究领域极大的关注,因为大部分神经退行性疾病都极其影响患者的生活质量,并且暂时没有其他有效的药物治疗手段^[40-41]。Lo 等^[42]研究表明,通过颈动脉移植 hUCMSCs 能够明显使帕金森(Parkinson's disease, PD)患者的 UPDRS 评分和 Webster 评分升高。hUCMSCs 治疗神经退行性疾病的作用机制尚不明确,目前提出的可能有:hUCMSCs 能够分化成促使神经再生及修复的神经元;hUCMSCs 旁分泌作用产生的细胞因子可以缓解黑质纹状体的损伤,并抑制 PD 患者多巴胺神经元的凋亡^[43-44]。此外也有报道提出,hUCMSCs 可以使外周神经损伤后的轴突再生,并且可以到达神经起到修复再生的作用^[45-46]。

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的病理特征目前主要认为是由 β -淀粉样蛋白聚集体引起的,但尚不清楚这些蛋白质聚集体与临床症状之间的致病机制^[47-48]。hUCMSCs 分泌的神经营养因子也许可以改善这种复杂的细胞环境并抑制神经细胞凋亡^[49],同时 hUCMSCs 可能通过逆转大脑中的小胶质细胞神经炎症而产生持续的神经保护作用^[50]。此外 Oh 等^[51]研究证实,hUCMSCs 可以减少 β -淀粉样前体蛋白转基因小鼠大脑中的淀粉样沉积。因此虽然 PD 和 AD 这两种神经退行性疾病的致病机制尚不完全清楚,但 hUCMSCs 已经给我们带来了治愈神经退行性疾病新的希望。

2.8 hUCMSCs 治疗阻塞性肺疾病

在美国,死于慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的人数仅次于癌症和心血管疾病^[52]。根据世界卫生组织(WHO)的估计,全世界目前有 6500 万人患有中度至重度 COPD^[53]。目前用于治疗 COPD 的药物包括支气管扩张药、吸入类固醇、口服类固醇、磷酸二酯酶 4 抑制剂、茶碱和抗生素。临床上还使用肺疗法治疗 COPD,例如氧气疗法;此外还有进行减少肺体积的手术,以及肺移植来治疗 COPD。然而,这些疗法疗效有限且存在严重不良反应^[54-55]。Le 等^[56]研究发现 hUCMSCs 的移植显著改善了 COPD 患者的生活质量和临床状况,并且结果表明 hUCMSCs 的全身给药相对安全,这可能是由于 hUCMSCs 具有较强的免疫调节能力。尽管这是一项初步研究,但这些结果为进一步对 COPD 患者进行 hUCMSCs 的临床研究

提供了重要的参考。

3 小结与展望

从人脐带分离的 hUCMSCs 是目前再生医学领域备受瞩目的研究热点,与其他来源的 MSCs 相比,它们具有较高的增殖能力、较快的自我更新能力、较低的免疫原性以及更可靠的获得方式。虽然目前对 MSCs 的功能机制的研究还不够深入,但其治疗的有效性和安全性已在科学研究、临床前和临床试验中得到了初步的验证。然而,细胞的移植剂量、递送途径、移植时间窗的选择、注射速率和移植频率等技术问题依然是临床试验中函待解决的问题,尤其由于 hUCMSCs 移植存在血管栓塞、hUCMSCs 传代过程中遗传物质改变及潜在致瘤致畸等风险极大等问题限制了其目前的发展。此外 hUCMSCs 供体的隐性健康问题亦存在很大隐患。因此研究人员不仅需要在移植前进行供体细胞的基因检测和规范细胞处理流程,而且还需要长期随访监控受体患者的健康状况。这使 hUCMSCs 的大规模临床应用面临更多的挑战,并且未来还需要做大量的工作才能充分揭开 hUCMSCs 的面纱。但随着细胞规模化培养、高通量测序等技术的发展以及临床试验研究体量的增加,相信不久的将来,hUCMSCs 将在转化医学领域带给我们更多惊喜。

参考文献:

- [1] Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs [J]. *Cell stem cell*, 2008, 3: 301-313.
- [2] Zimmerlin L, Donnenberg VS, Rubin JP, et al. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells [J]. *Cytometry A*, 2013, 83(1): 134-140.
- [3] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 [J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1327-1333.
- [4] Raffaghelli L, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche [J]. *Stem cells*, 2008, 26(1): 151-162.
- [5] Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, et al. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues [J]. *J R Soc Interface*, 2010, 7(6): S689-S706.
- [6] Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population [J]. *Stem cells*, 2008, 26(3): 591-599.

- [7] Mazini L, Rochette L, Amine M, et al. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10): 2523.
- [8] Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2011, 7(1): 1-16.
- [9] Donders R, Vanheusden M, Bogie JF, et al. Human Wharton's Jelly-derived stem cells display immunomodulatory properties and transiently improve rat experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24 (10): 2077-2098.
- [10] Miao Z, Jin J, Chen L, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cell Biol Int*, 2006, 30(9): 681-687.
- [11] La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131 (2): 267-282.
- [12] Mennan C, Wright K, Bhattacharjee A, et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 916136.
- [13] Luan C, Chen R, Chen B, et al. Umbilical cord blood transplantation supplemented with the infusion of mesenchymal stem cell for an adolescent patient with severe aplastic anemia: a case report and review of literature [J]. *Patient Prefer Adherence*, 2015, 9: 759-765.
- [14] Lou G, Chen Z, Zheng M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(6): e346.
- [15] Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(9): 1045-1059.
- [16] Borrelli DA, Yankson K, Shukla N, et al. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease [J]. *J Control Release*, 2018, 273: 86-98.
- [17] Bi ZM, Zhou QF, Geng Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate experimental cirrhosis through activation of keratinocyte growth factor by suppressing microRNA-199 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(23): 4905-4912.
- [18] Shao M, Xu Q, Wu Z, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate IL-6-induced acute liver injury through miR-455-3p [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 37.
- [19] Li B, Cheng Y, Yu S, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in obese type 2 diabetic mice [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 8628027.
- [20] Bellomo R, Ronco C, Mehta RL, et al. Acute kidney injury in the ICU: from injury to recovery: reports from the 5th Paris international conference [J]. *Ann Intensive Care*, 2017, 7 (1): 49.
- [21] Andrade L, Rodrigues CE, Gomes SA, et al. Acute kidney injury as a condition of renal senescence [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(5): 739-753.
- [22] Rodrigues CE, Capcha JM, de Bragança AC, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 19.
- [23] Zhang R, Yin L, Zhang B, et al. Resveratrol improves human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells repair for cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 965.
- [24] Pool M, Leuvenink H, Moers C. Reparative and regenerative effects of mesenchymal stromal cells-promising potential for kidney transplantation? [J] *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (18): 4614.
- [25] Montanucci P, di Pasquali C, Ferri I, et al. Human umbilical cord Wharton Jelly-derived adult mesenchymal stem cells, in biohybrid scaffolds, for experimental skin regeneration [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 1472642.
- [26] Mejía-Barradas CM, Cázarez-Montañez JE, Guerra-Márquez Á, et al. Regenerative treatment with umbilical cord mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in chronic ulcer caused by dermolipectomy [J]. *Cir Cir*, 2019, 87(S1): 8-16.
- [27] Akkurt H, Karapolat HU, Kirazli Y, et al. The effects of upper extremity aerobic exercise in patients with spinal cord injury: a randomized controlled study [J]. *Eur J Phys Rehabil Med*, 2017, 53(2): 219-227.
- [28] 张陆,刘志昂,姜岩,等. 脐带间充质干细胞移植治疗急性脊髓损伤的临床价值 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(3): 254-260.
- [29] Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, et al. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord [J]. *Nat Med*, 2018, 24(4): 484-490.
- [30] Sart S, Liu Y, Ma T, et al. Microenvironment regulation of pluripotent stem cell-derived neural progenitor aggregates by human mesenchymal stem cell secretome [J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(19-20): 2666-2679.
- [31] Sun L, Wang F, Chen H, et al. Co-transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and human neural stem cells improves the outcome in rats with spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(7): 893-906.
- [32] Zhang L, Chu J, Yu J, et al. Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(2): 279-287.
- [33] Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12

- (6): 443–458.
- [34] 张玲, 孙燕玲, 王晓珍, 等. 脐带间充质干细胞治疗难治性慢性移植抗宿主病 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24 (13): 2034–2038.
- [35] Kagia A, Tzetzis M, Kanavakis E, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, and pluripotent stem cells in a mouse model of chemically induced inflammatory bowel disease [J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1730–1740.
- [36] Lin J, Li XL, Song H, et al. A general description for Chinese medicine in treating premature ovarian failure [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(2): 91–97.
- [37] Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2016, 28(3): 217–222.
- [38] Li B, Nasser MI, Masood M, et al. Efficiency of traditional Chinese medicine targeting the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110074.
- [39] Yin N, Wu C, Qiu J, et al. Protective properties of heme oxygenase-1 expressed in umbilical cord mesenchymal stem cells help restore the ovarian function of premature ovarian failure mice through activating the JNK/Bcl-2 signal pathway-regulated autophagy and upregulating the circulating of CD8(+)CD28(–) T cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 49.
- [40] Lockrow JP, Fortress AM, Granholm AC. Age-related neurodegeneration and memory loss in down syndrome [J]. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 2012, 2012: 463909.
- [41] Blin P, Dureau-Pournin C, Foubert-Samier A, et al. Parkinson's disease incidence and prevalence assessment in France using the national healthcare insurance database [J]. *Eur J Neurol*, 2015, 22(3): 464–471.
- [42] Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R. Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3982–3999.
- [43] Pires AO, Mendes-Pinheiro B, Teixeira FG, et al. Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis [J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(14): 1073–1083.
- [44] Aliaghaei A, Gardaneh M, Maghsoudi N, et al. Dopaminergic induction of umbilical cord mesenchymal stem cells by conditioned medium of choroid plexus epithelial cells reduces apomorphine-induced rotation in parkinsonian rats [J]. *Arch Iran Med*, 2016, 19(8): 561–570.
- [45] Carriel V, Alaminos M, Garzón I, et al. Tissue engineering of the peripheral nervous system [J]. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14(3): 301–318.
- [46] Guo ZY, Sun X, Xu XL, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(4): 651–658.
- [47] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(6): 595–608.
- [48] Li Q, Liu Y, Sun M. Autophagy and Alzheimer's disease [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(3): 377–388.
- [49] Yang H, Xie Z, Wei L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AβPP/PS1 transgenic mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4 (4): 76.
- [50] Lee HJ, Lee JK, Lee H, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(3): 588–602.
- [51] Oh SH, Kim HN, Park HJ, et al. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and neuronal differentiation by enhancing the wnt signaling pathway in an Alzheimer's disease model [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(6): 1097–1109.
- [52] Martinez FD. Early-life origins of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 871–878.
- [53] Yazici O, Tas Gulen S, Eryilmaz U, et al. The evaluation of cardiac functions according to chronic obstructive pulmonary disease groups [J]. *Aging Male*, 2020, 23(2): 106–111.
- [54] Rothe K, Katchanov J, Schneider J, et al. Strongyloides stercoralis hyperinfection syndrome presenting as mechanical ileus after short-course oral steroids for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exacerbation [J]. *Parasitol Int*, 2020, 76: 102087.
- [55] Chen X, Wang T, Qiu X, et al. Susceptibility of individuals with chronic obstructive pulmonary disease to air pollution exposure in Beijing, China: A case-control panel study (COPDB) [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 717: 137285.
- [56] Le Thi Bich P, Nguyen Thi H, Dang Ngo Chau H, et al. Allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation for treating chronic obstructive pulmonary disease: a pilot clinical study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11 (1): 60.

[收稿日期]2020-06-15