

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993 年 6 月创刊

第 28 卷 第 4 期 2020 年 8 月 30 日出版

目次

研究报告

- 大鼠孤束核微量注射的定位初探 舒晴,邵雨薇,田峻,杨亚南(429)
- 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析
..... 熊翱,熊仁平,彭艳,李宇,江旭,许建中(436)
- 子宫内位异位症纤维化小鼠模型构建方法及其应用 毕艳丽,倪喆鑫,李溪,俞超芹(447)
- 小鼠及猕猴 Graves 病动物模型的比较研究 王悦,张萌,赵凤仪,伍丽萍,施秉银(455)
- 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用 崔玮,丁玲强,曾巧英(463)
- 清肺透邪汤介导 NLRP3 炎性小体抑制 NF- κ B 信号通路改善肺炎支原体小鼠炎症反应
..... 王子,王雪峰,吴振起(470)
- 高脂血症易感(WSHc)大鼠自发性后肢瘫痪的病症特点研究
..... 马全鑫,张利棕,郁晨,戎亦骊,徐松涛,蔡月琴,沈利叶,陈民利(478)
- 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究
..... 汤喜兰,徐国良,董伟,李洪铭,邱俊辉,孙楠,刘芳,刘思宇,李冰涛(486)
- 电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预
..... 周游,汪雯,蔡杨乾,杜俊英,邵晓梅,蒋永亮,刘伯一,高宏,梁宜,方剑乔(494)
- 肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究
..... 张薇,赵映,郑倩华,黎明,张健强,李瑛,蔡定均(503)
- 高尿酸血症及其并发症大鼠模型的建立
..... 陈林军,杨焱,吴迪,陈万超,董国超,乔徐馨,吴春燕,李婷婷(510)
- 马齿苋/甘草/蒲公英及其复方改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究
..... 李敏,杨晨,傅超慧,熊一功,凌云(517)
- 大鼠阴道炎模型的建立与评价 彭冬冬,董珂,厉巧,周志敏,肖洒,姜德建(525)

人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达
..... 李杰, 谢燕燕, 王馨, 王霖虹, 和红霞, 孙庆云, 晏亚辉, 闫振宇 (532)

深度水解蛋白的无乳糖奶粉在无菌大鼠培育中的应用研究 ... 张佳, 李永军, 屈玲玲, 毛孙炳, 李兰娟 (539)

研究进展

肩袖肌腱损伤诱导性动物模型构建评价及研究进展 许博洋, 庞小娟, 曾禹铭, 周严冬, 郭义 (545)

急性机械性脊髓损伤动物模型研究进展 刘海峰, 王斌, 赵斌 (551)

小鼠移植性肺癌转移模型研究进展 张娜, 田燕歌, 刘学芳, 王琦 (557)

不同 COPD 动物模型特点及应用的研究进展 陈美凤, 加慧, 夏书月 (563)

食物过敏小鼠模型研究进展 王峥, 李秀敏, 苗晋鑫 (570)

肿瘤坏死因子在斑马鱼-海分枝杆菌模型中的研究进展 杨建伟, 何树梅, 樊红艳, 刘红旭 (578)

广告 (封二, 封三, 内插)

主 管

中国科学技术协会

主 办

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编

秦川

编辑部主任

李继平

编 辑

《中国实验动物学报》编辑部

出 版

《中国实验动物学报》编辑部

发 行

《中国实验动物学报》编辑部

100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号

电话: 010-67779337

传真: 010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

<http://zgswdw.cnjournals.com/sydwbybjyx/ch/index.aspx>

本期执行主编 黄 韧

本期责任编辑 郭梦征 董令赢

照 排

同方知网(北京)技术有限公司

印 刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

2-748

广告发布登记

京朝工商广登字 20170142 号

定 价

每期 50.00 元, 全年 300.00 元

中国标准连续出版物号

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

2019 年版权归中国实验动物学会所有

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库, 如不同意自己论文入网, 请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。

本刊电子版出版发行合作伙伴: 中邮阅读网: www.183read.com

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 28, Number 4, August 30, 2020

CONTENTS

- Preliminary investigation of localization of solitary nucleus microinjection in rats
..... *SHU Qing, SHAO Yuwei, TIAN Jun, YANG Yanan*(429)
- Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats
..... *XIONG Ao, XIONG Renping, PENG Yan, LI Yu, JIANG Xu, XU Jianzhong*(436)
- Establishment and application of a mouse model of endometriosis with fibrosis
..... *BI Yanli, NI Zhexin, LI Xi, YU Chaoqin*(447)
- Comparison of mouse and rhesus monkey models of Graves' disease
..... *WANG Yue, ZHANG Meng, ZHAO Fengyi, WU Liping, SHI Bingyin*(455)
- Inhibitory effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors in mice *CUI Wei, DING Lingqiang, ZENG Qiaoying*(463)
- Qingfei Touxie decoction mediates NLRP3 inflammasome inhibition of the NF- κ B signaling pathway and improves inflammatory responses in mice with *Mycoplasma pneumoniae*
..... *WANG Zi, WANG Xuefeng, WU Zhenqi*(470)
- Study of the disease characteristics of spontaneous hindlimb paralysis in hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats
MA Quanxin, ZHANG Lizong, YU Chen, RONG Yili, XU Songtao, CAI Yueqin, SHEN Liye, CHEN Minli(478)
- Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model
TANG Xilan, XU Guoliang, DONG Wei, LI Hongming, QIU Junhui, SUN Nan, LIU Fang, LIU Siyu, LI Bingtao(486)
- Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain *ZHOU You, WANG Wen, CAI Yangqian, DU Junying, SHAO Xiaomei, JIANG Yongliang, LIU Boyi, GAO Hong, LIANG Yi, FANG Jianqiao* (494)
- Methods for establishing rat models of irritable bowel syndrome visceral hypersensitivity
..... *ZHANG Wei, ZHAO Ying, ZHENG Qianhua, LI Ming, ZHANG Jianqiang, LI Ying, CAI Dingjun*(503)
- Establishment of a rat model of hyperuricemia and its complications *CHEN Linjun, YANG Yan, WU Di, CHEN Wanchao, DONG Guochao, QIAO Xuxin, WU Chunyan, LI Tingting*(510)

Study of purslane/licorice/dandelion compound on insulin resistance in type 2 diabetic rats	
.....	<i>LI Min, YANG Chenyu, FU Chaohui, XIONG Yigong, LING Yun</i> (517)
Establishment and evaluation of a rat model of vaginitis	
.....	<i>PENG Dongdong, DONG Ke, LI Qiao, ZHOU Zhimin, XIAO Sa, JIANG Dejian</i> (525)
Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells	
	<i>LI Jie, XIE Yanyan, WANG Xin, WANG Linhong, HE Hongxia, SUN Qingyun, YAN Yahui, YAN Zhenyu</i> (532)
Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation	
.....	<i>ZHANG Jia, LI Yongjun, QU Lingling, MAO Sunbing, LI Lanjuan</i> (539)
Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model	
.....	<i>XU Boyang, PANG Xiaojuan, ZENG Yuming, ZHOU Yandong, GUO Yi</i> (545)
Research progress in the establishment of animal models of acute spinal cord injury	
.....	<i>LIU Haifeng, WANG Bin, ZHAO Bin</i> (551)
Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse	
.....	<i>ZHANG Na, TIAN Yange, LIU Xuefang, WANG Qi</i> (557)
Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and related clinical applications	
	<i>CHEN Meifeng, JIA Hui, XIA Shuyue</i> (563)
Advances in murine models for food allergies	<i>WANG Zheng, LI Xiumin, MIAO Jinxin</i> (570)
Research progress regarding the role of tumor necrosis factor in a zebrafish-mycobacterium marinum model	
.....	<i>YANG Jianwei, HE Shumei, FAN Hongyan, LIU Hongxu</i> (578)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

Institute of Laboratory Animal Sciences,

Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

LI Jiping(李继平)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021

Tel: 010-67779337

Fax: 010-67770690

E-mail: bjb@cnilas.org

<http://zgzydw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

Copyright 2019 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

舒晴,邵雨薇,田峻,等.大鼠孤束核微量注射的定位初探[J].中国实验动物学报,2020,28(4):429-435.

Shu Q, Shao YW, Tian J, et al. Preliminary investigation of localization of solitary nucleus microinjection in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 429-435.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.001

大鼠孤束核微量注射的定位初探

舒晴¹,邵雨薇^{1,2},田峻¹,杨亚南^{3,4*}

(1. 武汉大学中南医院康复医学科,武汉 430071; 2. 武汉大学第二临床学院,武汉 430071;
3. 华润武钢总医院中医科,武汉 430080; 4. 武汉科技大学职业危害识别与控制湖北省重点实验室,武汉 430000)

【摘要】 目的 通过应用不同参数定位注射,探讨大鼠孤束核微量注射的定位方法以提高注射成功率及准确性。**方法** 将15只大鼠根据实验进度的不同分为垂直注射组、Bregma定位组和Lambda定位组。垂直注射组进针点选择为大鼠颅底前缘0.5 mm,进针深度7.5 mm;Bregma定位组以Bregma-11.0 mm、双侧中线旁开0.5~0.7 mm为进针点,进针斜刺角度向后24°,斜刺深度8.6 mm为注射点;Lambda定位组以Lambda-3.2 mm、双侧中线旁开0.5~0.7 mm为进针点,进针斜刺角度向后24°,斜刺深度9.6 mm为注射点。观察各组大鼠注射后全脑冠状切面的荧光标记位置。**结果** 垂直注射组荧光标记位置位于脉络丛所在冠状切面。Bregma定位组荧光标记不稳定,分别位于小脑、脑干较浅位置或脉络丛所在冠状切面。Lambda定位组中体重300 g左右的大鼠荧光标记位置位于小脑和脑干的间隙,而体重400 g左右的大鼠能够准确标记于孤束核。**结论** 在400 g左右的大鼠中,以Lambda为基准点以一定角度斜刺可以准确注射至大鼠孤束核。

【关键词】 孤束核;脑立体定位术;脑微量注射

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0429-07

Preliminary investigation of localization of solitary nucleus microinjection in rats

SHU Qing¹, SHAO Yuwei^{1,2}, TIAN Jun¹, YANG Yanan^{3,4*}

(1. Department of Rehabilitation, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China.
2. the Second Clinical College of Wuhan University, Wuhan 430071. 3. Department of Traditional Chinese Medicine, China Resources & WuGang General Hospital, Wuhan 430080. 4. Hubei Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000)
Corresponding author: YANG Yanan. E-mail: yangyn_wg@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the localization method of microinjection of the solitary nucleus in rats using different parameters and to improve its success rate and accuracy. **Methods** Twenty rats were divided into a vertical injection group, a Bregma-based localization group, and a Lambda-based localization group according to the experimental progress. The injection point of the vertical injection group was 0.5 mm at the anterior edge of the skull base of the rat, with a needle insertion depth of 7.5 mm. The Bregma positioning group used Bregma-11.0 mm and 0.5 - 0.7 mm beside the bilateral midline as the puncture point. The oblique insertion angle was 24° backwards and the depth was 8.6 mm at the injection point. The Lambda positioning group used Lambda-3.2 mm and 0.5 - 0.7 mm beside the bilateral midline as the puncture point. The oblique insertion angle was 24° backwards and depth was 9.6 mm at the injection point. The positions

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81804180),湖北省卫生健康委联合基金青年人才项目(WJ2019H163,湖北省卫生健康科研基金资助),武汉大学自主科研项目(2042018kf0097,中央高校基本科研业务费专项资金资助)。

Funded by Natural Science Foundation of China (81804180), Joint Fund of Hubei Provincial Health Commission (WJ2019H163), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2042018kf0097).

【作者简介】 舒晴(1984—),男,博士,主治医师,研究方向:针灸防治内分泌系统疾病的神经环路研究。Email: shuqingj@whu.edu.cn

【通信作者】 杨亚南(1984—),女,硕士,主治医师,研究方向:针灸防治内分泌系统疾病的研究。Email: yangyn_wg@126.com

of the fluorescent markers in the coronal section of the whole brain after injection of each group of rats were observed.

Results The fluorescent label in the vertical injection group was located in the choroid plexus. The fluorescent labeling was unstable in the Bregma-based localization group, and was located in the coronal sections of the cerebellum, superficial brainstem, and choroid plexus. In the Lambda-based localization group, the fluorescent label position in the rats weighing approximately 300 g was located in the space between the cerebellum and the brainstem, while the rats weighing around 400 g could be accurately labeled in the solitary nucleus. **Conclusions** In rats of approximately 400 g, oblique puncture at a certain angle based on Lambda as the reference point can enable accurate injection into the nucleus of the solitary tract in rats.

【Keywords】 nucleus of the solitary tract; stereotaxy of brain; microinjection

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

作为神经科学的重要研究手段,应用光遗传学和化学遗传学进行神经环路的研究在近年来方兴未艾,越来越多的神经核团及相关神经元的功能被发现。作为神经环路研究中最基础的一环,核团的定位注射的准确性直接关系到实验的成败。但是,作为实验操作步骤的关键,一些复杂核团的注射参数往往在文献中只有简单的描述,其它学者进行相关后续研究时容易走弯路。孤束核(nucleus of the solitary tract, NTS)位于延髓背侧、迷走神经背核的背外侧,为孤束的止点,在吻尾方向上形成 Y 字形细胞柱,贯穿延髓全长^[1]。其在颅骨表面的投影已经超过了颅底,到达了第 1、2 颈椎。在现有文献报告中,孤束核的定位及注射参数出现了一定的差异性^[2-5]。笔者通过深入解读相关文献,并应用不同注射参数进行重复性注射,初步探索出大鼠孤束核定位注射的参数。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 12 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 15 只,体重 200 ~ 400 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2019-0010】。实验操作在武汉大学中南医院实验动物中心【SYXK(鄂)2015-0025】进行,自由进食饮水,12 h 明暗周期,动物房温度(22 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 10)%,每天更换垫料、饮水、清洗大鼠饮水器。动物处理及饲养条件按照实验动物使用 3R 原则给予人道主义关怀,并遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》和《实验动物质量管理办法》实施。本实验经武汉大学实验动物中心伦理审查后施行(AUP Number: 2019025 号)。

1.1.2 试剂及仪器

小动物麻醉用异氟烷(分析纯,深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:20160218),霍乱菌素亚单位 B-488(Cholera Toxin Subunit B Alexa Fluor 488 Conjugate, CTB-488, No. C34775),霍乱菌素亚单位 B-594(Cholera Toxin Subunit B Alexa Fluor 594 Conjugate, CTB-594, No. C34777),4% 多聚甲醛(国药集团)。

数显脑立体定位仪(深圳瑞沃德),异氟烷小动物麻醉系统(深圳瑞沃德),微量注射泵(兰格 Longer, TJ-4A/SL0107-1A),玻璃电极拉制仪(日本 Narishige, PC-10),玻璃电极(美国 SUTTER, No. BF120-60-10),微量进样器(上海高鸽, 1 μ L),脑定位仪专用大鼠麻醉面罩、定位针夹持器、麻醉诱导盒、颅钻(钻头直径 0.5 mm);玻璃离子水门汀(上海新世纪齿科),荧光显微镜(奥林巴斯, BX-53)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

根据实验流程的进度,最终所有大鼠被分为垂直注射组($n=2$)、Bregma 定位组($n=5$)和 Lambda 定位组($n=8$),但各组大鼠不在同一时间进行实验。

1.2.2 大鼠孤束核微量注射的方法

(1) 微量注射器的制作

应用玻璃电极拉制仪,应用“一步法”拉制尖端直径约 100 μ m 的玻璃电极注射针,在电极内灌注石蜡油后与微量进样器连接并用热胶固定保持密封性。

(2) 进针点及进针角度

将麻醉好的大鼠固定在大鼠脑立体定位仪上。备皮,用剪刀剪开皮肤、皮下组织,钝性分离骨膜,暴露颅骨显示人字缝和十字缝,用无菌干棉球擦干净局部。前后左右调平颅骨,保持前、后囟和后囟

左右 2.5 mm 均在同一平面。根据《The Rat Brain: in Stereotaxic Coordinates (6th edition)》^[6] 确定参照点,根据各组进针方法的不同确定进针点及进针角度,在进针点用颅钻钻取 0.5 mm 圆孔。

(3) 微量注射

微量注射泵吸取 CTB-594 或 CTB-488 0.3 mL 后,根据各组定位参数的不同注射 0.26 mL 于定位点,注射时间 5 min,注射完成后保留 5 min,拔针后用玻璃离子水门汀封闭进针点再缝合伤口。术后所有大鼠连续 3 d 肌肉注射庆大霉素,根据大鼠与人的剂量换算方法^[7],大鼠注射剂量为成人临床给药剂量(mg/kg)的 6.3 倍。注射完成后大鼠正常进食进水。

1.2.3 大鼠取材、切片及成像

术后 3 d 大鼠 4% 多聚甲醛心脏灌注后取全脑,全脑于 4% 多聚甲醛溶液中后固定 72 h,固定完成后放入 25% 蔗糖溶液中脱水。全脑组织脱水完成后,取大鼠孤束核所在冠状面行 10 μ m 冰冻切片。冰冻切片自然解冻后封片,在荧光显微镜下观察拍照。

1.2.4 孤束核注射位点的标准位置

根据脑定位图谱及相关文献确定大鼠孤束核的中后部,由第四脑室脉络丛(choroid plexus, chp)移行为中央水管(central canal, cc)后的切面为注射标准位置^[8],对应图谱大鼠冠状切面图 1A 中 Figure 147 (Bregma - 13.68 mm) 至图 1B 中 Figure 157 (Bregma - 15.00 mm),见红色标记位置。

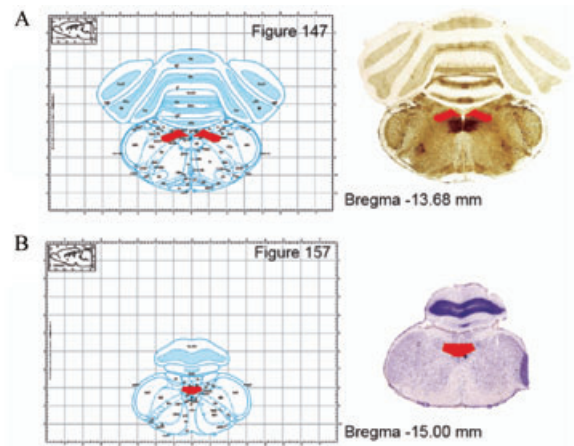


图 1 孤束核注射的标准位置

Figure 1 Standard localization of microinjection in solitary nucleus

2 结果

2.1 以 Bregma 和颅底为基准点垂直于颅骨平面进针无法注射至孤束核标准点

根据《大鼠脑定位图谱》^[6] 以大鼠颅骨平面 Bregma - 13.5 mm 为进针点进针,分离大鼠颅骨平面外皮肤及皮下组织,发现 Bregma - 13.5 mm 所在位置已超过颅底,无法在大鼠颅骨上进行打孔注射等实验操作。改用沿着颅底前缘 0.5 mm 进针,进针深度 7.5 mm,注射 CTB-594 0.26 mL。冰冻切片显示 CTB 注射位点在脉络丛所在冠状切面约 Bregma - 13 mm 处(见图 2),说明以 Bregma 为基准垂直注射,即使以颅底前缘为进针点仍无法准确注射至孤束核的标准位置。

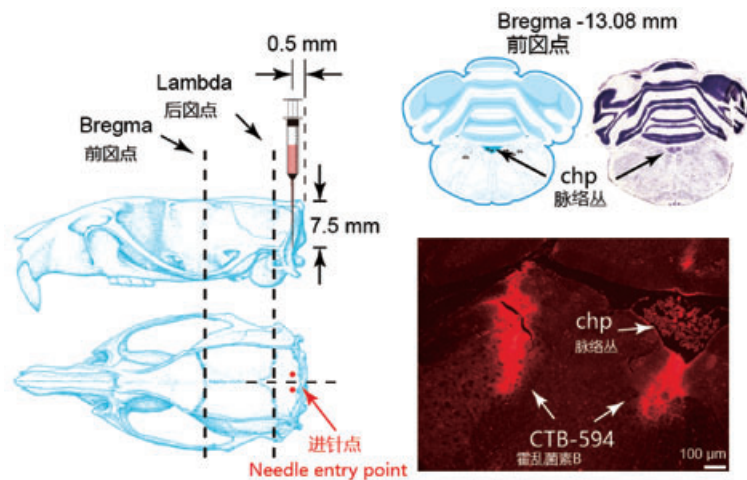


图 2 以 Bregma 和颅底为基准点垂直于颅骨平面进针示意图及注射位置荧光

Figure 2 Schematic diagram of needle insertion perpendicular to the skull plane based on Bregma and skull as reference points and the injection position of fluorescence

2.2 以 Bregma 为基准点以一定角度斜刺无法准确注射至孤束核标准点

在选取颅骨底部进针点直刺的情况下仍无法达到 NTS 中后部,故改为斜刺。通过三角函数的计算,以 Bregma-14.5 mm 为垂直进针点(在颅底后方),垂直注射深度为 7.86 mm,实际斜刺进针点为 Bregma-11 mm,进针角度为 24°,通过三角函数计算出进针深度为 8.6 mm(图 3A)。注射后切片观察发现,同样的注射参数,荧光标记的位置仍有差异(图 3),甚至在同一体重下,冠状切面的荧光标记位置也有差异(表 1)。

2.3 以 Lambda 为基准点以一定角度斜刺可以准确注射至 400 g 左右的大鼠孤束核

结果提示,以 Bregma 为基准点进行定位无法准确注射到大鼠孤束核。故本实验以 Lambda 为基准

点进行定位。以大鼠脑定位图谱中 Interaural 点与 Lambda 点的位置关系及 Lambda 点后方能够进行打孔的颅骨平面最佳位置为依据,通过三角函数计算出进针点位于 Lambda-3.2 mm、中线双侧旁开 0.5 ~ 0.7 mm。进针斜刺角度向后 24°、斜刺深度 9.6 mm 为注射点(图 4C)。将不同体重大鼠均以上述注射参数进行注射。结果发现,体重为 266、357 g 的大鼠荧光信号的位置位于延髓背侧且未见到针痕,仅有少量强度很弱的荧光标记。体重为 395、450、382 g 的大鼠脑均看到明显的针痕及明亮的荧光,且至少一侧的荧光标记位于孤束核或孤束核稍上方位置。说明以 Lambda 为基准点以一定角度斜刺可以准确注射至 400 g 左右的大鼠孤束核。(见表 2 及图 4)

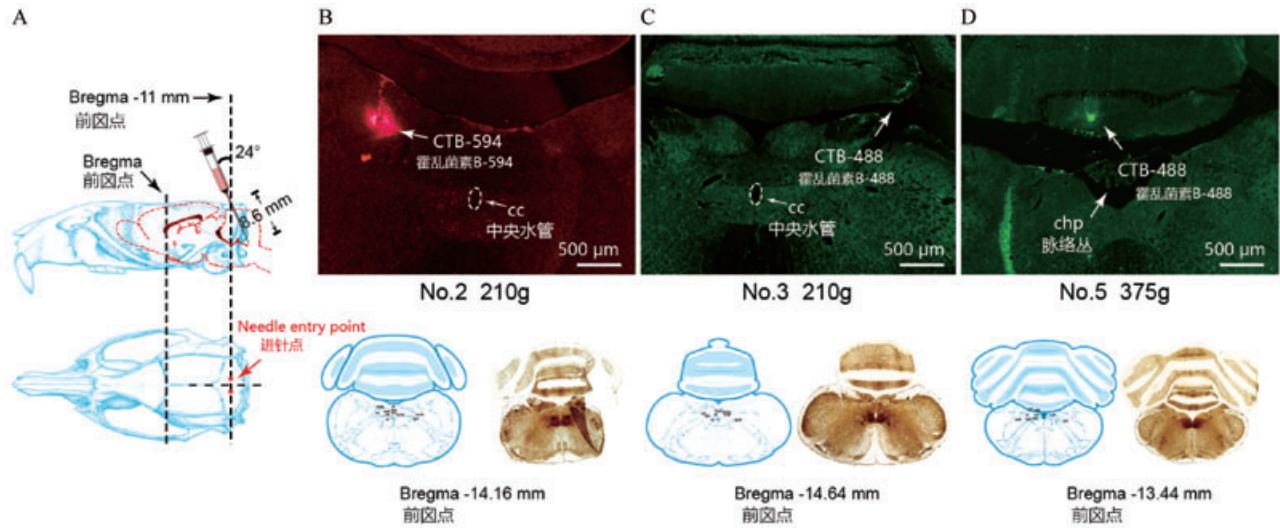


图 3 以 Bregma 为基准点以一定角度斜刺示意图(A)及荧光定位图(B, C, D)

Figure 3 Schematic diagram of the oblique puncture at a certain angle with the Bregma as the reference point (A) and the injection position of fluorescence (B, C, D)

表 1 大鼠以 Bregma 为基准点以一定角度斜刺注射后荧光标记的位置

Table 1 Position of the fluorescent marker after oblique injection at a certain angle with Bregma as the reference point					
编号 No.	体重(g) Weight(g)	前后脑距离(mm) Distance of Bregma-Lambda(mm)	深度(mm) Depth(mm)	图谱矢状面位置 Sagittal plane position	代表性图片 Representative figure
2	210	8.38	7.2	Bregma-14.16 mm	图 3B (Figure 3B)
3	210	6.7	7	Bregma-14.64 mm	图 3C (Figure 3C)
5	375	8.1	7	Bregma-13.44 mm	图 3D (Figure 3D)

表 2 以 Lambda 为基准点斜刺大鼠注射后荧光标记的位置

Table 2 Position of the fluorescent marker after oblique injection at a certain angle with Lambda as the reference point					
编号 No.	体重(g) Weight(g)	前后脑距离(mm) Distance of Bregma-Lambda(mm)	深度(mm) Depth(mm)	图谱矢状面位置 Sagittal plane position	代表性图片 Representative figure
9	357	6.62	7.5	Bregma-15.48 mm	图 4A (Figure 4A)
12	266	7.16	7.2	Bregma-15.96 mm	图 4B (Figure 4B)
8	395	7.59	8.0	Bregma-14.52 mm	图 4D (Figure 4D)
10	450	7.50	8.4	Bregma-14.52 mm	图 4D (Figure 4D)
14	382	7.70	8.4	Bregma-14.52 mm	图 4D (Figure 4D)

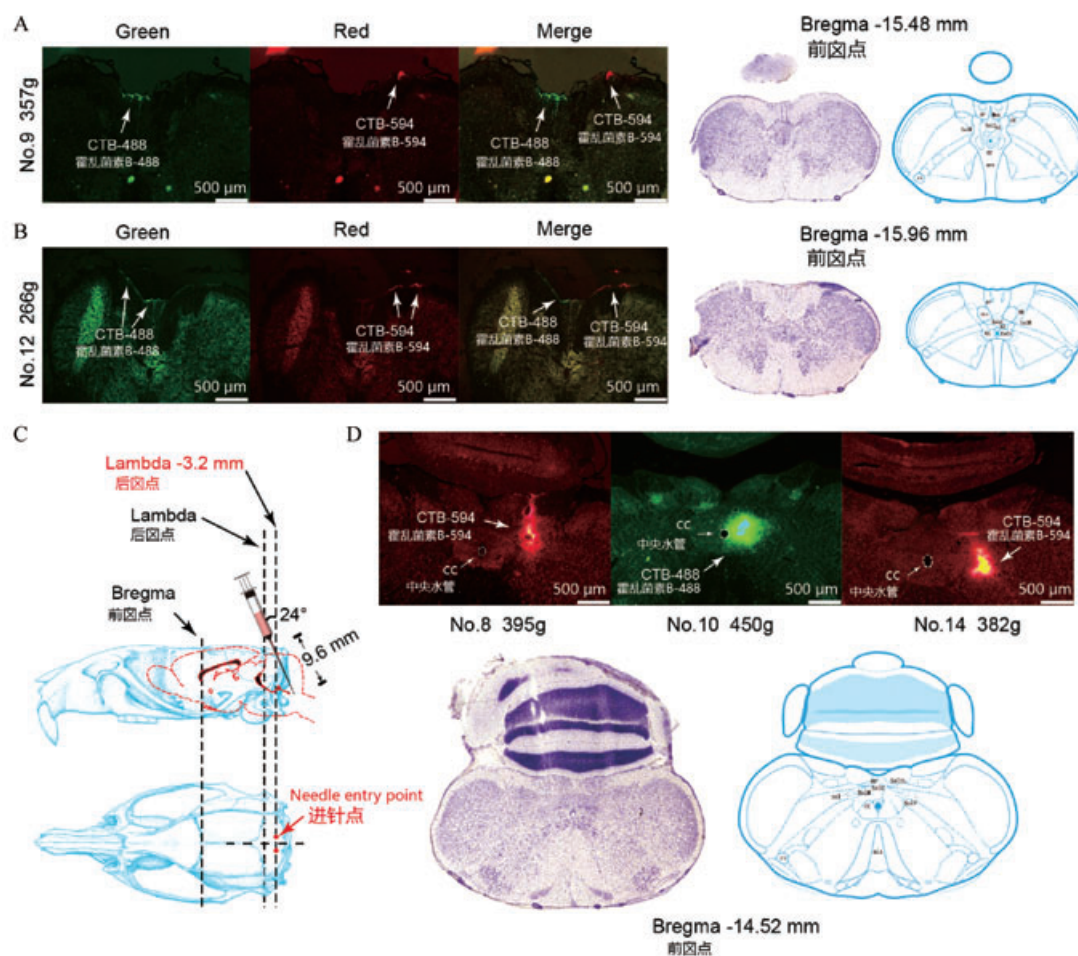


图 4 以 Lambda 为基准点以一定角度斜刺的示意图(C)及荧光定位图(A,B,D)

Figure 4 Schematic diagram of the oblique puncture at a certain angle with the Lambda as the reference point (C) and the the injection position of fluorescence (A, B, D)

3 讨论

孤束核因包绕孤束而得名,孤束由迷走神经、舌咽神经及面神经的内脏初级传入纤维组成,最终止于孤束核^[9]。孤束核接受来自舌咽神经、舌下神经的味觉传入纤维^[10],并将该信息传至臂旁核和延髓网状结构从而产生味觉^[11]。另外,孤束核还接收来自颈动脉体和主动脉弓中压力化学感受器的信息,通过传出副交感神经和交感神经复合体调节血压和心率^[12]。作为心肺传入输入的一级神经核团,孤束核接收包括血液 pH、血氧水平、周围的化学感受器,压力感受器和肺拉伸受体等输入,进而调节呼吸^[13]。另外,孤束核还能够接收来自外周的饱腹信号并传递至下丘脑的食欲调控神经元,参与饱腹感的调节,最终发挥调控食欲的作用^[14]。以上这些研究均说明孤束核是中枢神经系统参与内脏调节的重要核团,具有深入研究价值。

早期孤束核的定位注射实验中脑立体定位仪的应用并不普遍,常常以写翮(calamus scriptorius, 延髓背面作为第四脑室底的菱形窝的下端最狭窄部分)作为标志点^[2, 15],随后固定注射针后直接对着延髓进行注射。注射前需要分离颈后部软组织并暴露延髓背面,这种注射方式的创伤性明显高于脑立体定位仪通过颅骨打孔后注射。但近年来仍有研究在应用这种方法^[3, 16]。另外,大部分文献对 NTS 注射过程进行描述时,均只描述出脑立体定位仪的参数,参数均为 Bregma 为基准点前后轴(anterior-posterior, AP) - 12.5 ~ AP - 14.5 mm 不等^[4-5, 17]。但实际情况下,AP - 13.00 mm 向后的打孔位置已经非常接近颅底区域,由于大鼠颅骨平面延伸到颅底后向颈椎方向有一定角度的反折,所以 AP - 13.00 mm 以后的颅骨平面完全没有空间再进行垂直打孔注射的操作。因此,要想利用脑定位仪在颅骨表面打孔进行注射,只能通过一定角度向

后斜刺才能到达 NTS。实验结果也表明,沿着颅骨底部的前缘直刺,也只能将 CTB 注射至第四脑室脉络丛所在的冠状切面,无法达到标准的 NTS 注射点。

早在上世纪 70 年代,就有学者对大鼠前后囟的间距进行了统计,结果发现体重越大的大鼠前后囟间距越长^[18]。但由于当时研究的样本量不大,所以无法对相同体重区间的大鼠前后囟距离进行有效统计。另外,Bregma 的不稳定性早有报道,特别是在 Wistar 大鼠上表现明显^[19]。基于这种不稳定性,有学者提出用新的方法来确定其位置,可以提高定位注射或埋置电极的稳定性^[20]。如 2.2 结果所示,由于孤束核处于后脑,且未成年大鼠的前后囟距离并不稳定,这也是导致注射位点偏浅的一个重要原因。另外,Bregma 选择的误差可能也是注射位点过于远离中心点的原因之一。

在大鼠脑定位图谱第 6 版^[6]中,颅骨表面的定位点包括两个基准点:前囟点(Bregma)和内耳点(Interaural)。Bregma 为大鼠颅顶冠状缝和矢状缝的相交点,呈现十字型,因为体表定位清楚,为最常用的基准点。Interaural 为两耳道连线的中点,但无法在颅骨表面进行直接定位,故选择 Lambda 点作为后脑区定位的基准点。Lambda 点位于人字缝(lambdoid suture)和矢状缝的结合处后方,是人字缝最佳拟合曲线的中点。另外,标准图谱的大鼠体重为 290 g,而成年大鼠(平均 436 g)的 Interaural 点位于 Lambda 点后方约 0.3 ~ 0.9 mm。有学者通过统计 235 项应用了脑立体定位技术的研究,发现 96% 的实验中以 Bregma 为基准点进行注射,而且这些研究中,有 35% 的注射点与 Lambda 或 Interaural 的距离比 Bregma 更近^[21]。该统计结果说明,虽然在实际实验操作中以更近 Lambda 为基准点可能会让注射部位更加精准,但是可能由于习惯性思维,绝大部分研究还是选择 Bregma 作为基准点。在实验三中,改用 Lambda 作为后脑注射的基准点以一定角度斜刺。结果发现,体重不到 400 g 的大鼠注射后荧光位置均标记在延髓与小脑的间隙,可能由于 CTB 注射至脑干和延髓之间的缝隙,仅感染了脑干背部表面的神经细胞,而 400 g 左右的大鼠均可以准确注射至 NTS。说明即使应用 Lambda 作为后脑区核团的注射点,也可能因为大鼠的体重差异出现注射点的偏差,这一偏差可能与大鼠及其大脑的脑发育有关。但是目前大鼠脑形态的发育和年龄的

关系尚未发现有系统研究。由于大鼠在 10 ~ 11 周龄进入性成熟期,体重在 400 g 左右^[22],我们推测以 400 g 左右或以上的大鼠进入成熟期后,颅骨及大脑的发育趋向于稳定,更有利于注射的准确性。

本实验也存在一定的局限性。首先,大鼠脑立体定位仪没有调节左右平衡的耳杆,操作过程中左右平面未调平会导致注射位点向一侧偏移。所以在进行头部固定的时候需要更加精准的插入耳杆,以保持颅骨的左右水平。其次,本次实验中所用大鼠总数量并不太多,但通过调整参数最终多次注射成功可以一定程度上说明本实验具有可重复性。第三,图 4 中注射成功的代表性图片在实际操作中为双侧注射,400 g 以上大鼠至少能够保证一侧大鼠神经元能够被感染,并不会影响实验结果。至于未成年大鼠的注射方法,则需要进一步探索。

有学者通过统计发现 39% 的研究并没有对注射位点进行准确性确认,也仅仅只有 15% 的研究指出在实验过程中有注射偏离正确位置的情况发生^[21]。我们通过挖掘文献及进行不同注射参数的反复试验,在 400 g 左右的大鼠中,以 Lambda 为基准点以一定角度斜刺可以准确注射至大鼠孤束核。本实验的成功既能够作为后续实验的准确性确认依据,也能够为其它需要进行 NTS 注射的实验提供一些基础和线索。

参 考 文 献(References)

- [1] Conn PM. Neuroscience in Medicine(3rd ed) [M]. Beaverton, OR, USA: Springer, 2008: 264-265.
- [2] Dhruva A, Bhatnagar T, Sapru HN. Cardiovascular responses to microinjections of glutamate into the nucleus tractus solitarius of unanesthetized supracollicular decerebrate rats[J]. Brain Res, 1998, 801(1-2):88-100.
- [3] You H, Hu S, Ye QP, et al. Role of 5-HT1A in the nucleus of the solitary tract in the regulation of swallowing activities evoked by electroacupuncture in anesthetized rats[J]. Neurosci Lett, 2018, 687:308-312.
- [4] Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats[J]. Brain Res, 2005, 1032(1-2):85-93.
- [5] Sergeant L, Rodriguez-Dimitrescu C, Barney CC, et al. Injections of galanin-like peptide directly into the nucleus of the tractus solitarius (NTS) reduces food intake and body weight but increases metabolic rate and plasma leptin[J]. Neuropeptides, 2017, 62:37-43.
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain: in stereotaxic coordinates [M]. London UK: Elsevier Inc., 2007.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].北京:人民卫

- 生出版社, 2002: 202–204.
- Xu SY, Bian RY, Chen X. Experimental Methodology of Pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 202–204.
- [8] 乔虎, 王楠, 闫剑群. 杏仁中央核对醛固酮在大鼠孤束核水平钠盐摄入非基因组作用的调控 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(10):1159–1164.
- Qiao H, Wang N, Yan JQ. Role of the central nucleus of the amygdala in regulating the nongenomic effect of aldosterone on sodium intake in rat nucleus tractus solitarius [J]. J South Med Univ, 2018, 38(10): 1159–1164.
- [9] AbuAlrob MA, Tadi P. Neuroanatomy, Nucleus Solitarius. In: StatPearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing, November 8, 2019.
- [10] Bradley RM, Grabauskas G. Neural circuits for taste. Excitation, inhibition, and synaptic plasticity in the rostral gustatory zone of the nucleus of the solitary tract [J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 855:467–474.
- [11] Travers SP, Hu H. Extracellular projections of rNST neurons expressing gustatory-elicited Fos [J]. J Comp Neurol, 2000, 427(1):124–138.
- [12] Zanutto BS, Valentinuzzi ME, Segura ET. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius [J]. Biomed Eng Online, 2010, 9:4.
- [13] Zoccal DB, Furuya WI, Bassi M, et al. The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities [J]. Front Physiol, 2014, 5:238.
- [14] Renner E, Puskas N, Dobolyi A, et al. Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats [J]. Peptides, 2012, 35(1):14–22.
- [15] Ferreira M Jr, Sahibzada N, Shi M, et al. Hindbrain chemical mediators of reflex-induced inhibition of gastric tone produced by esophageal distension and intravenous nicotine [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 289(5):R1482–R1495.
- [16] Mohammed M, Madden CJ, Andresen MC, et al. Activation of TRPV1 in nucleus tractus solitarius reduces brown adipose tissue thermogenesis, arterial pressure, and heart rate [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018, 315(1):R134–R143.
- [17] Katsurada K, Nakata M, Saito T, et al. Central glucagon-like peptide-1 receptor signaling via brainstem catecholamine neurons counteracts hypertension in spontaneously hypertensive rats [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):12986.
- [18] Whishaw IQ, Cioe JD, Previsich N, et al. The variability of the interaural line vs the stability of bregma in rat stereotaxic surgery [J]. Physiol Behav, 1977, 19(6):719–722.
- [19] Skarsfeldt T. Differences in localization of substantia nigra vs interaural line in Wistar and Sprague Dawley rats [J]. Physiol Behav, 1982, 28(2):279–280.
- [20] Blasiak T, Czubak W, Ignaciak A, et al. A new approach to detection of the bregma point on the rat skull [J]. J Neurosci Methods, 2010, 185(2):199–203.
- [21] De Vloo P, Nuttin B. Stereotaxy in rat models: Current state of the art, proposals to improve targeting accuracy and reporting guideline [J]. Behav Brain Res, 2019, 364:457–463.
- [22] 秦川. 实验动物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 422.
- Qin C. Laboratory Animal Science [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 422.

[收稿日期] 2020–03–31

熊翱,熊仁平,彭艳,等. 脂多糖诱导SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.

Xiong A, Xiong RP, Peng Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.002

脂多糖诱导SD大鼠膝关节成纤维样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析

熊翱^{1,2}, 熊仁平^{2*}, 彭艳², 李宇¹, 江旭¹, 许建中^{1*}

(1. 郑州大学第一附属医院骨科, 郑州 450052;

2. 中国人民解放军陆军特色医学中心野战外科研究部, 重庆 400042)

【摘要】 目的 建立 Sprague Dawley (SD) 大鼠的正常膝关节滑膜细胞原代培养方法及脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 诱导成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 炎症模型。方法 选取 80 ~ 120 g SPF 级幼年 SD 大鼠, 分离其滑膜组织, 原代培养至第 3 代, 用组织化学染色法和 EdU 法检测 FLS 蛋白标志物 vimentin 和增殖功能。同时, 用滑膜组织作对照, 检测第 3 代至第 8 代原代培养 FLS 的特征蛋白表达, 筛选具有生理功能的高纯度且可用于后续实验的 FLS 细胞。LPS 诱导 FLS 炎症后, 检测 LPS 刺激 FLS 不同时间点的 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 和蛋白表达, 根据实验结果确定 LPS 成功诱导 FLS 炎症模型的时间点。最后, 检测 FLS 被 LPS 诱导前后的细胞因子、增殖功能和特征蛋白的表达, 为分析 FLS 炎症模型提供实验数据。结果 采用 0.2% I 型胶原酶消化法, 成功培养了 FLS 原代细胞。经检测蛋白标志物 vimentin, 第 3 代 FLS 纯度达 98% 以上。通过 FLS 特征蛋白检测, 筛选出具有生理功能且可用作后续实验的 FLS 为第 3 代至第 7 代原代细胞。通过对 LPS 诱导后的 FLS 的细胞因子和特征蛋白分析, 确定 1 μ g/mL LPS 诱导 FLS 细胞 3 h, 能复制出 FLS 炎症模型。结论 LPS 诱导的 FLS 炎症模型可作为体外研究炎性关节病的细胞模型。

【关键词】 成纤维样滑膜细胞; 原代培养; 波形蛋白; 炎性关节病; 模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0436-11

Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats

XIONG Ao^{1,2}, XIONG Renping^{2*}, PENG Yan², LI Yu¹, JIANG Xu¹, XU Jianzhong^{1*}

(1. the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China.

2. Army Characteristic Medical Center of the Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400042)

Corresponding author: XU Jianzhong. E-mail: 13937133786@163.com; XIONG Renping. E-mail: xiong_ren_ping@163.com

【Abstract】 Objective To establish synovial cell primary cultures and a lipopolysaccharide (LPS)-induced fibroblast-like synoviocyte (FLS) inflammatory model of a normal knee joint in Sprague-Dawley (SD) rats. **Methods** Normal knee joint synovium (80-120 g) was separated from specific-pathogen-free SD rats in an ice bath with phosphate-buffered saline. The primary synovium was cultured to the 3rd generation. Vimentin expression and FLS proliferation were detected via immunohistochemical staining and the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine method. Synovial tissue was used as a control

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81701915)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81701915).

【作者简介】 熊翱 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 骨科运动医学、创伤基础与临床。Email: 2528359578@qq.com

【通信作者】 许建中 (1964—), 男, 教授, 博士, 骨科主任, 主要研究方向: 骨关节疾病。Email: 13937133786@163.com;

熊仁平 (1963—), 男, 教授, 主要研究方向: 创伤分子生物学基础与临床。Email: xiong_ren_ping@163.com。

* 共同通信作者

to detect characteristic protein expressions in the FLS in the 3rd–8th generations of primary culturing and to screen the FLS for high purity and physiological functions for use in subsequent experiments. After LPS-induced FLS inflammation, the mRNA and protein expressions of IL-1 β and TNF- α were detected at different time points to determine the time point at which LPS could successfully induce an FLS inflammatory model. Finally, the cytokine expression, proliferative functions and characteristic proteins of the FLS before and after LPS induction were detected to provide experimental data to evaluate the FLS inflammatory model. **Results** FLS primary cells were successfully cultured with 0.2% collagenase I digestion. The FLS purity in the 3rd generation exceeded 98% for detecting vimentin. By detecting characteristic FLS proteins, FLS with physiological functions that could be used for subsequent experiments were selected as the primary cells from the 3rd–7th generations. Analyzing the cytokines and characteristic proteins in FLS before and after LPS induction revealed that 1 μ g/mL LPS is required to stimulate FLS cells for 3 h to replicate the FLS inflammatory model. **Conclusion** The LPS-induced FLS inflammatory model can be used to study inflammatory arthritis *in vitro*.

【Keywords】 fibroblast-like synoviocytes; primary culture; vimentin; inflammatory joint disease; model

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

纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 是关节滑膜的主要细胞之一^[1]。生理状态下的 FLS 参与润滑和免疫调节功能,维持关节腔稳态,参与关节的正常功能^[2];滑膜炎状态下的 FLS,由关节保护作用转变为关节破坏作用,分泌炎症介质,使滑膜免疫细胞浸润。免疫细胞诱导滑膜纤维化和滑膜新生血管形成^[3],加重 FLS 的促炎状态,导致蛋白酶和促炎细胞因子增加^[4],逐步导致关节功能丧失。所以,滑膜 FLS 在炎性关节炎 (inflammatory joint disease, IJD) 中的作用研究越来越受到重视。但要对 FLS 进行深入研究,首先要解决的问题,是建立滑膜 FLS 的原代培养及其病理模型。

有研究者通过手术时获取伤病患者的关节滑膜分离原代培养滑膜细胞进行 FLS 研究^[5–6],但获取病人滑膜的影响因素多,为 IJD 的 FLS 研究增加了难度。据此,有学者采用手术和化学法 (木瓜蛋白酶、单碘乙酸钠和胶原酶等) 诱导 OA 模型^[7],分离其滑膜 FLS,偏重于骨关节退行性变的研究;有学者采用胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA)^[8],分离其滑膜 FLS,偏重于类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的发病机制和治疗研究;有学者建立佐剂性关节炎大鼠滑膜成纤维细胞 (AA-FLS)^[9],偏重于类风湿药物研究,等等。国内外学者从诱导的各类动物疾病模型中分离出的 FLS,对 FLS 的鉴定,绝大多数采用的是形态观察以及组织化学染色法和流式细胞术检测 FLS 的蛋白标志物波形蛋白 (Vimentin),只有极少数进行了 FLS 的细胞增殖功能鉴定^[6]。但他们都没有进行原代培养的正常 FLS 和诱导模型的 FLS 特征蛋白检测和分析。

不论是 OA,还是 RA 和强制性脊椎炎等 IJD,都

要释放促炎因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等^[10–11],并且这些炎症因子与信号通路之间存在级联反应,通过各种途径促使 IJD 的发生发展。促炎因子不仅参与炎症生成阶段的调节,且在随后的炎症消退中也发挥重要作用。促炎因子已被确定为炎症的关键介质^[11]。鉴于此,若能诱导出 FLS 的炎症模型,势必对 IJD 的抑炎研究提供了工具。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌壁外壁的组成成分,是由脂质和多糖构成的物质。当其作用于人类或动物等其他生物细胞时,就会表现出多种生物活性。LPS 是动物免疫系统对入侵的革兰氏阴性菌的首要识别及攻击目标,它能够诱导动物分泌多种炎症细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等,广泛用于动物疾病建模。国内外学者,通过小鼠乳头导管灌注 0.2 mg/mL 的 LPS 50 μ g 成功诱导小鼠乳腺炎模型^[12],D-氨基半乳糖联合 LPS 腹腔注射 8 周,隔日 1 次,成功诱导了小鼠慢性肝损伤模型^[13]。OA 和 RA 的研究中,LPS 刺激上调了 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平^[11,14]。由此可见,LPS 刺激 FLS 可以模仿类似于 OA 和 RA 的炎症环境。在 IJD 体外研究中,用 LPS 诱导 FLS 炎症状态,建立 FLS 炎症模型在理论上是可行的。

本研究通过分离 SD 雄性大鼠的膝关节滑膜组织,原代培养至第 3 代,进行 FLS 蛋白标志物 Vimentin 和增殖功能鉴定,同时,用滑膜组织作为对照,检测原代培养 FLS 的特征蛋白的表达,筛选具有生理功能且纯度达 95% 的 FLS,用 LPS 进行 FLS 炎症模型诱导,检测其促炎细胞因子和特征蛋白的表达,建立 FLS 炎症模型,为 IJD 发病机制及其治疗研究提供实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 周龄 SPF (specific pathogen free animals) 级雄性 SD 大鼠 45 只, 体重约为 100 g, 购于陆军军医大学陆军特色医学中心实验动物中心【SCXK (军) 2017-0026】, 饲养于陆军军医大学陆军特色医学中心实验动物中心【SYXK (军) 2017-0058】。所有操作均符合陆军军医大学实验动物伦理学要求 (审批号: AMUWEC20201267), 严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 仪器与试剂

显微外科手术器械 (上海医疗器械有限公司), 25 cm² 培养瓶 (Hyclone), 0.22 μm 滤器 (millipore), CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国), Millicell[®] EZISLIDE (Millipore)。戊巴比妥钠 (德国进口分装), DMEM (high glucose) (BI), 双抗 (GiBco), 0.25% 胰酶 (GiBco), 4% 多聚甲醛 (博士德), Anti-vimentin (Abcam, ab8978), Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Abcam, ab15017), DAPI (Abcam, ab228549), 小鼠 SP 试剂盒 (中杉金桥), DAB 染色试剂盒 (中杉金桥)。Western Blot 实验系统和试剂 (Bio Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 滑膜细胞的获取与原代培养

采用腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠, 剂量为 2 mL/(kg · bw)。75% 乙醇浸泡大鼠 10 ~ 20 min, 取双侧后膝关节 (图 1A、1B)。先后用自来水和含双抗 (100 μg/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) 的 PBS 冲洗膝关节后, 转移膝关节至超净工作台盛有含双抗的 PBS 平皿中, 进行滑膜组织分离。分离条件: 冰浴, 无菌, PBS 浸泡, 锐性。剪碎滑膜组织至 1 mm × 1 mm × 1 mm, 将其移至 10 mL 无菌离心管短暂低速离心, 弃上清, 加入 1 mL 0.2% I 型胶原酶重悬滑膜组织, 转移其至 25 cm² 培养瓶, 用 0.2% I 型胶原酶定容至 3 mL, 轻晃培养瓶, 使其底部滑膜组织均匀分布。在 37℃ 和 5% CO₂ 下, 消化滑膜组织 4 ~ 6 h, 使其变成棉絮状, 向培养瓶加入 10% FBS 终止消化。收集滑膜组织转移至无菌离心管, 短暂低速离心, 弃上清, 加入完全培养基重悬洗涤一次后, 移至 25 cm² 培养瓶, 用高糖完全培养基 (含双抗) 定容至 3 mL, 轻晃培养瓶, 使滑膜组织在底部均匀分布。在 37℃, 5% CO₂ 的培

养箱培养滑膜组织, 每天观察细胞游出情况, 第 2 天可见梭形细胞游出 (图 1C), 2 ~ 3 d 换液一次。

1.2.2 滑膜细胞传代

待原代培养细胞融合度达 70% ~ 80%, 吸弃培养基。向培养瓶加入含 EDTA-2Na 的 0.25% 胰酶消化, 轻晃培养瓶, 使消化液覆盖瓶底, 轻拍瓶底, 帮助消化。倒置显微镜观察到细胞间隙增大, 细胞回缩变圆且悬浮时, 向培养瓶加入 10% FBS 终止消化。收集细胞至离心管, 短暂低速离心。完全培养基洗涤 1 次, 再用完全培养基重悬细胞, 混匀, 按 1:2 ~ 1:3 传代至新的无菌培养瓶中。

1.2.3 滑膜细胞鉴定

(1) 细胞形态观察

在倒置显微镜下, 每天观察滑膜细胞的形态, 生长状态。梭形为 FLS, 圆形、椭圆形为巨噬样滑膜细胞。观察每代梭形细胞占视野细胞中的比例, 目测 FLS 的纯度。

(2) 细胞免疫荧光化学染色

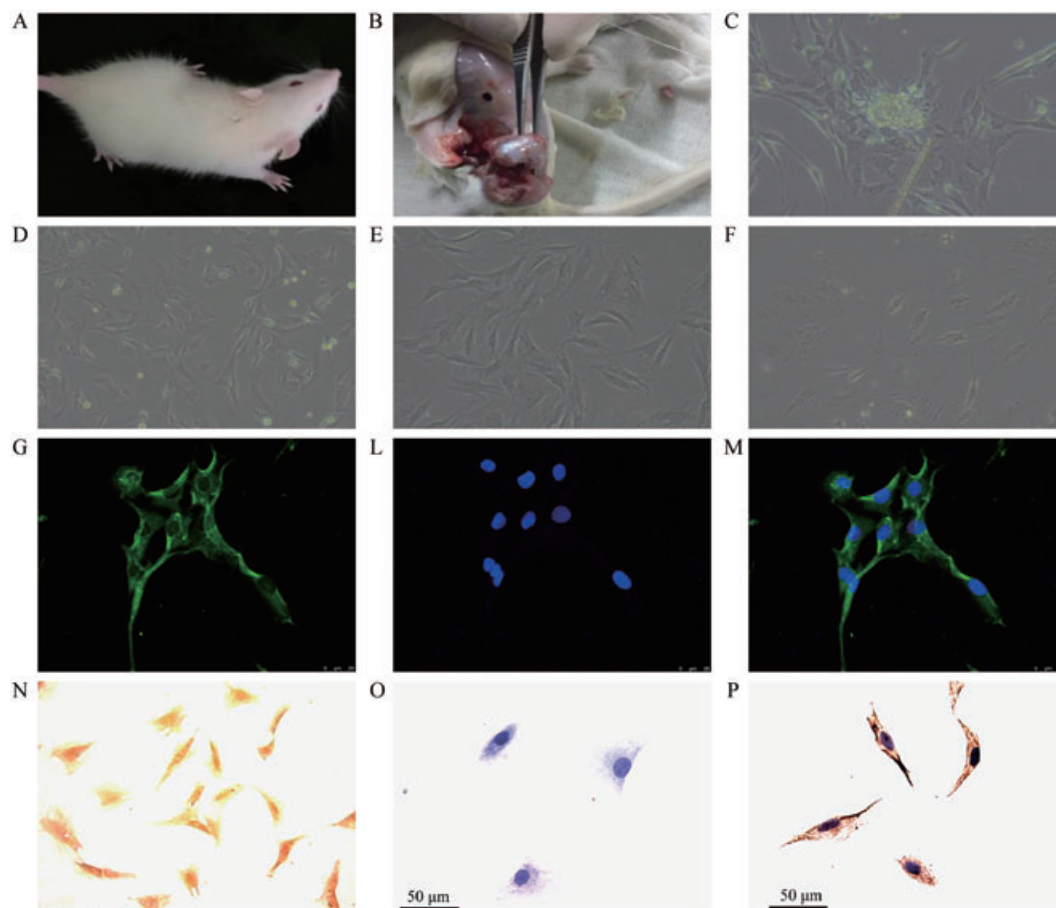
第 3 代滑膜细胞, 调整细胞比例为 4×10^4 /mL, 按每孔 0.2 mL 的容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。向腹腔小室加入 4% 多聚甲醛 300 μL, 固定 20 min 后, PBS 洗 2 ~ 3 次。用 0.2% Triton X-100, 在 37℃ 下透化 20 min 后, 向腹腔小室加入鼠抗 Vimentin 抗体 (1:200), 4℃ 湿盒孵育过夜, 加入荧光 488 抗鼠 IgG (1:500), 在 37℃ 下避光孵育 1 h 后, 用 DAPI 对细胞核染色 (37℃) 15 min 后, 用防荧光淬灭剂封片。荧光显微镜观察并拍照。根据所测滑膜细胞中 Vimentin 染色情况, 判断 FLS 的纯度。如滑膜细胞中染色 Vimentin 的细胞在 98% 以上, 即 98% 以上的细胞为 FLS。

(3) 细胞免疫组织化学染色

第 3 代滑膜细胞参照细胞免疫荧光化学染色加入鼠抗 Vimentin 单抗, 下面步骤按小鼠 SP 试剂盒说明书进行。DAB 显色后显微镜下观察拍照分析。判断滑膜细胞 FLS 纯度的方法同 (2)。

(4) FLS 的 EdU 细胞增殖检测

参照 EdU 细胞增殖检测 (广州锐博生物科技有限公司, 产品编号: C10310-1) 说明书完成。简述如下: 第七代滑膜细胞, 调整细胞比例为 4×10^4 /mL, 按每孔 0.2 mL 的容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。用细胞完全培养基按 1000:1 稀释 EdU 溶液, 制备成 50 μmol/L EdU 培养基; 每孔加入 100 μL 50 μmol/L 培养基孵育 12 h。向腹腔小室加入含 4% 多



注: A: SD 正常大鼠。B: 膝关节滑膜分离。C: 滑膜细胞培养第 1 天($\times 10$)。D: 滑膜细胞培养第 6 天第 1 代传代前($\times 10$)。E: 滑膜细胞培养至第 3 代($\times 10$)。F: 滑膜细胞培养至第 8 代($\times 10$)。G-M: 滑膜细胞培养至第 3 代 Vimentin 荧光化学鉴定($\times 40$, 标尺 = $25\ \mu\text{m}$) (G: Vimentin, 绿色; L: DAPI, 蓝色; M: Merge)。N-P: 滑膜细胞培养至第 3 代 Vimentin 组织化学鉴定($\times 40$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) (N: Vimentin 为棕黄色, DAPI 缺失; O: DAPI 为蓝色, Vimentin 缺失; P: Vimentin 为棕黄色, DAPI 为蓝色即细胞核)。

图 1 SD 大鼠正常滑膜细胞原代培养及其鉴定

Note. A, SD normal rats. B, Synovium of knee joint was separated. C, Synovial cells cultured on day 1 ($\times 10$). D, Synovial cells were cultured on the 6th day before the first passage ($\times 10$). E, Synovial cell culture to the third generation. F, Synovial cell culture to the eighth generation ($\times 10$). G-M, Fluorescence identification of vimentin from synovial cell culture to the third generation ($\times 40$, bar = $25\ \mu\text{m}$) (G, Vimentin, green. L, DAPI, blue. M, Merge). N-P, Histochemical identification of vimentin from synovial cell culture to the third generation ($\times 40$, bar = $50\ \mu\text{m}$) (N, Vimentin is brownish yellow, DAPI is absent. O, DAPI is blue, vimentin is absent. P, vimentin is brownish yellow, DAPI is blue, i.e. nucleus).

Figure 1 Primary culture and identification of normal synovial cells of SD rats

聚甲醛的 PBS $300\ \mu\text{L}$ 固定 30 min。用 0.5% Triton X-100 渗透剂孵育 10 min 后, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ Apollo[®] 染色反应液, 脱色摇床孵育 30 min。用 $100\ \mu\text{L}$ 0.5% Triton X-100 渗透剂脱色摇床清洗 2 ~ 3 次, 每次 10 min。在 37°C 下, 用 $100\ \mu\text{L}$ $1 \times$ Hoechst 33342 对 DNA 避光染色 25 min, PBS 洗 2 ~ 3 次, 用防荧光淬灭剂封片。荧光显微镜观察并拍照。

1.2.4 LPS 刺激 FLS

采用鉴定纯度超过 98% 的 FLS, 细胞比例为 $4 \times 10^4/\text{mL}$, 按每孔 0.2 mL 容量接种至腹腔小室, 培养箱培养 24 h。向腹腔小室加入 LPS, 使其终浓度为 $1000\ \text{ng}/\text{mL}$ (经过预实验获得), 刺激 FLS 细胞 24 h。在 0、1、3、6、12、24 h 的时间点, 分别用

0.25% 的胰酶消化 FLS 2 ~ 5 min, 用 10% FBS 终止消化, 各收集细胞 5 例, 贮于 -80°C 备用。

1.2.5 Western Blot 测定 FLS 中的细胞因子和特征蛋白表达

收集滑膜组织和培养对数生长期且纯度达到 98% 的第 3 ~ 8 代 FLS 及其经 $1000\ \text{ng}/\text{mL}$ LPS 刺激不同时间观测点的细胞, 各 5 例, 提取总蛋白。考马斯亮蓝法定量总蛋白, 调整样品总蛋白浓度为 $1.5\ \text{mg}/\text{mL}$ 。每孔上样 $20\ \mu\text{L}$, SDS-PAGE 电泳分离。0.3A 恒流湿转 50 min 或 1.5 h, 将凝胶电泳分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上。转膜结束后, PVDF 膜置入 6% 脱脂奶粉封闭。PVDF 膜经封闭洗膜后, 加入兔抗 IL-1 β 、TNF- α 、PCNA、

Collagen IV、Fibronectin、VEGF、Lubricin 和 Hyaluronan Synthase 2 多抗,按 1:1000 稀释。使 PVDF 膜与上面相应的一抗,在室温孵育 50 min 或 1.5 h。再次洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的 IgG(1:10 000),使 PVDF 膜与之在室温孵育 50 min, ECL 法检测。检测完毕,用 0.01 mol/L pH 7.2 的 PBS 洗涤 PVDF 膜 2 次 $\times$ 15 min,用抗体洗脱液(pierce 公司)洗脱 PVDF 膜上抗体,1 次 $\times$ 15 min,同上法洗膜和封闭后,用辣根过氧化物酶标记的甘油三磷酸脱氢酶(glycerol 3 phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(1:10 000),与 PVDF 在室温孵育 50 min, ECL 法检测。扫描分析软件系统扫描 X 射线光片蛋白条带进行密度分析。结果采用目的蛋白的光密度值与 GAPDH 内参蛋白的光密度值比值校正上样量误差。

1.2.6 QRT-PCR 检测 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 基因变化

将用终浓度为 1000 ng/mL 的 LPS 刺激 FLS 后收集的细胞,采用 TRIzol 法提取总 RNA, promega 公司的反转录试剂合成 cDNA, 用 IL-1 β (Forward: 5'-CCTTGTCGAAGTGTCTGAAG-3'; Reverse: 5'-GGGCTTGGAAGCAATCCTTA-3')、TNF- α (Forward: 5'-CAAGGAGGAGAAGTTCCCA-3'; Reverse: 5'-TTGGTGGTTTGCTACGACG-3') 和 GAPDH (Forward: 5'-TCTTCCAGGAGCGAGATCCC-3'; Reverse: 5'-TTCAGGTGAGCCCCAGCCTT-3') 引物^[15]去扩增,分析 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达。复管,重复 5 次。qRT-PCR 反应体系:2 $\times$ master mix(promega 公司)10 μ L, 消毒水 7 μ L, primer 0.5 μ L, cDNA 2 μ L。PCR 条件:95 $^{\circ}$ C, 10 s 变性,PCR 优化的退火温度,59 $^{\circ}$ C, 15 s 退火,40 个循环。55 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C 观察 melt curve。

1.3 统计学分析

实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 滑膜细胞形态和生长情况

分离的滑膜组织经培养 6 ~ 8 h 后,开始贴壁,1 d 后细胞游出,绝大部分为梭形(图 1C),圆形、椭圆形较少。培养第 6 天,细胞融合度达 70% ~ 80%,贴壁生长,但仍有极少的圆形、椭圆形细胞(图

1D)。培养第 12 ~ 14 天,已传至第 3 代的滑膜细胞形态基本上全为梭形,圆形、椭圆形等其他形状基本消失(图 1E)。第 8 代滑膜细胞增长缓慢,形态从梭形变为近似椭圆形,细胞间隙增大(图 1F)。滑膜细胞第 3 ~ 7 代,增殖活跃,生长情况良好(图 1G-M)。

2.2 滑膜细胞的免疫荧光化学和免疫组织化学染色

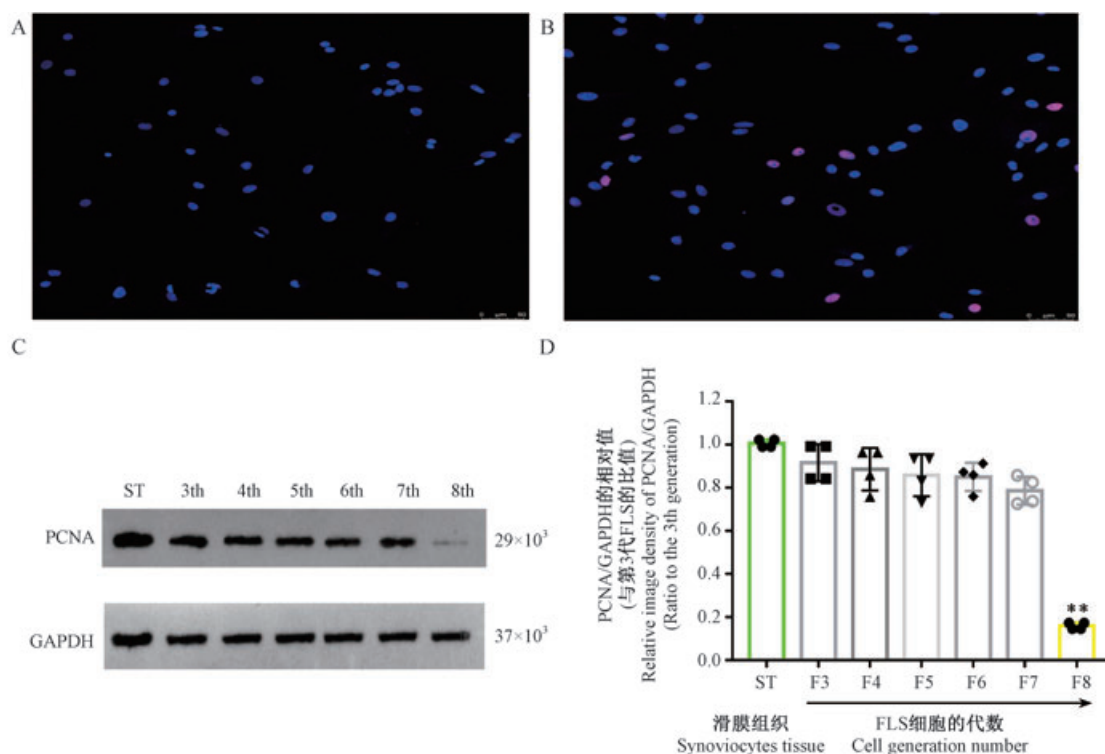
I 型胶原酶消化法获得的滑膜细胞第 3 代,用免疫染色观察:形态规则,呈梭形,其细胞核为卵圆形且位于细胞中央;滑膜细胞 Vimentin 染色阳性率大于 98%(图 1G-P)。Vimentin 为 FLS 特征性标注蛋白,提示培养的滑膜细胞为 FLS,且纯度达 98% 以上。

2.3 原代滑膜细胞的增值功能检测

对第 7 代滑膜细胞的 EdU 增殖实验,显示细胞具有增殖能力(图 2A, B)。通过对滑膜组织和第 3 ~ 8 代各代滑膜细胞的增殖核抗原 PCNA 蛋白的 Western Blot 检测分析,各代培养细胞同滑膜组织一样,都有增殖功能。与第 3 代比较,除第 8 代 PCNA 蛋白表达下调($t = -51.056$, ** $P < 0.01$),差异具有显著性外,余各代差异不具有显著性(图 2C, D)。

2.4 滑膜组织和滑膜 FLS 的细胞因子和特征蛋白检测

通过原代培养滑膜组织而获得的 FLS,与滑膜组织一样,都能表达具有天然免疫应答的细胞因子和特征蛋白。与第 3 代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达量比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达差异不显著,第 8 代 FLS 的 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达下调,差异具有显著性(图 3A-C)。原代培养获得的 FLS 具有分泌对关节囊有修复作用的结缔组织成分,与第 3 代 FLS 比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 分泌 Collagen IV 和 Fibronectin 蛋白水平差异不显著,第 8 代 FLS 分泌 Collagen IV 和 Fibronectin 蛋白的能力下降,差异显著(图 4A-C)。同时,原代培养获得的 FLS 还有产生与滑膜组织一样的 Lubricin 和 Hyaluronan Synthase 2 蛋白的能力,与第 3 代 FLS 比较,第 4 ~ 7 代的每代 FLS 分泌功能没有显著差异,第 8 代分泌功能减弱,差异显著(图 4A、D 和 E)。综合对原代培养滑膜细胞获得的 FLS 的细胞因子和特征蛋白检测结果,确定滑膜细胞原代培养的第 3 ~ 7 代 FLS 可作为后续实验研究。



注:A,B:第7代滑膜细胞EdU增殖实验($\times 10$, 标尺 = 50 μm) (A:阴性对照, 只将DNA染成了蓝色。B:将增殖细胞染成了红色,DNA染成了蓝色)。C:滑膜组织和原代培养的第3代至8代FLS的增殖细胞核抗原蛋白(PCNA)的Western Blot结果。D:各组PCNA蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 43.936$, $P < 0.001$ 。与第3代比较,只有第8代PCNA蛋白表达显著下调,** $P < 0.01$ 。

图2 原代滑膜细胞传代后的增殖功能检测

Note. A and B, Proliferation of synovial cells to the seventh generation of EdU ($\times 10$, bar = 50 μm) (A, Negative control, only DNA stained blue. B, Proliferating cells were dyed red and the DNA was dyed blue.). C, Western Blot results of PCNA protein in the synovial cells tissue (ST), the 3th to the 8th generation of fibroblast-like synovial cells (FLSs). D, One-way ANOVA between PCNA protein groups, $F = 43.936$, $P < 0.001$. Compared with the third generation, only the eighth generation of PCNA protein expression was significantly down regulated, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Proliferative function of primary synovial cells

2.5 LPS 刺激 FLS 后不同时间点炎症因子的 mRNA 和蛋白的表达

1000 ng/mL 的 LPS 刺激 FLS 后,与 0 h 相比较,IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达迅即上升,在 3 h 达到高峰,其均值是 0 h 的 17.865 倍和 19.177 倍,随后下降,但仍高于 0 h (图 5A,B)。同时,IL-1 β 和 TNF- α 在蛋白质上的表达,与 0 h 相比较也迅即上调,在 6 h 达到高峰,但与 3 h 比较无显著差异,6 h 的 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 蛋白表达与 GAPDH 内参蛋白表达的比值是 1.003 和 1.380,随后下降。6 h 后但仍高于 0 h (图 5C,D)。综合 LPS 刺激 FLS 后的细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在基因和蛋白质上的表达情况,确定 LPS 刺激 FLS 的时间为 3 h,刺激 FLS 的 LPS 终浓度为 1000 ng/mL,完成 LPS 诱导 FLS 的炎症模型。

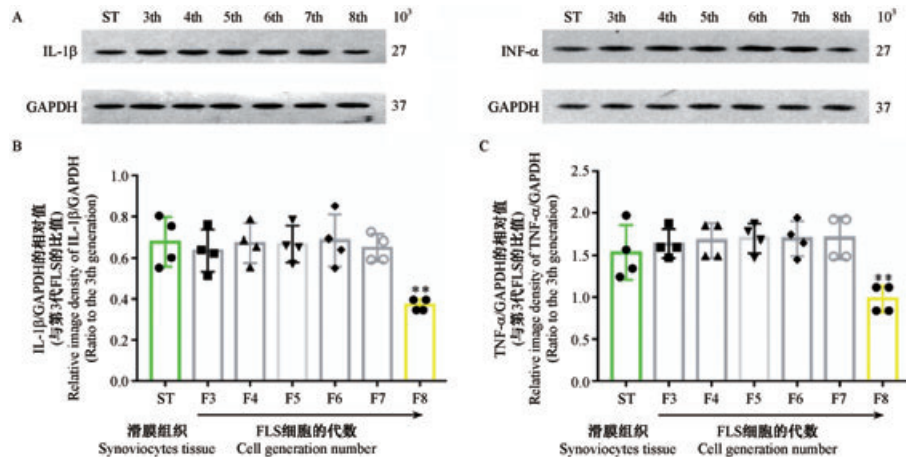
2.6 LPS 刺激 FLS 后 3 h 细胞因子和特征蛋白的表达

1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h,与刺激前比较,

细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在蛋白质上上调显著,增殖核抗原 PCNA 蛋白增加明显 (图 6A); Collagen IV 和 Lubricin 蛋白表达增加且差异显著,具有修复关节囊作用的结缔组织成分 Fibronectin 蛋白明显下调 (图 6B); Hyaluronan Synthase 2、VEGF 和 Cadherin 蛋白表达增加且差异显著 (图 6C)。

3 讨论

建立实验动物的体内和体外模型,目的都是为了更好地研究疾病的发病机制、治疗方法及其效果评价,但动物的选择要根据实验需要和研究目的来确定,同时还要兼顾实验时间的长短、动物饲养成本的高低、操作难易程度等。为了研究 RA 的滑膜增生,陈芳等^[16]改良了组织块法,分离培养了兔膝关节 FLS。滑膜炎症是 OA 和 RA 等 IJD 的共同病理过程,其动物模型,应选择动物成熟期短,能满足较短的实验周期,且生存及抗感染能力较强的动物。据统计,目前 1/4 OA 动物模型选择大鼠作为



注:A:滑膜组织(ST)及其原代培养第3代~第8代 FLS 的 IL-1 β 、TNF- α 及其 GAPDH 的 Western Blot 结果。B:各组 IL-1 β 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 5.115$, $P = 0.002$ 。IL-1 β 蛋白表达相对光密度值,与第3代 FLS 比较,第8代 FLS 降低非常显著($t = -5.639$, $**P < 0.01$)。ST、第4代~第7代 FLS 变化差异不具有显著性。C:各组 TNF- α 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 8.672$, $P < 0.001$ 。TNF- α 蛋白表达相对光密度值,与第3代 FLS 比较,第8代 FLS 降低非常显著, $**P < 0.01$ 。ST、第4代~第7代 FLS 变化差异不具有显著性。

图3 滑膜组织和滑膜 FLS 的细胞因子 Western Blot 检测分析

Note. A, Western Blot results of IL-1 β , TNF- α and GAPDH in synovium tissue (ST) and primary synovium cells after passage. B, One-way ANOVA between IL-1 β protein groups, $F = 5.115$, $P = 0.002$. Compared with the expression of IL-1 β protein in the third generation FLS, the expression of IL-1 β protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.639$, $**P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. One way ANOVA between TNF- α protein groups, $F = 8.672$, $P < 0.001$. Compared with the expression of TNF- α protein in the third generation FLS, the expression of TNF- α protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($**P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS.

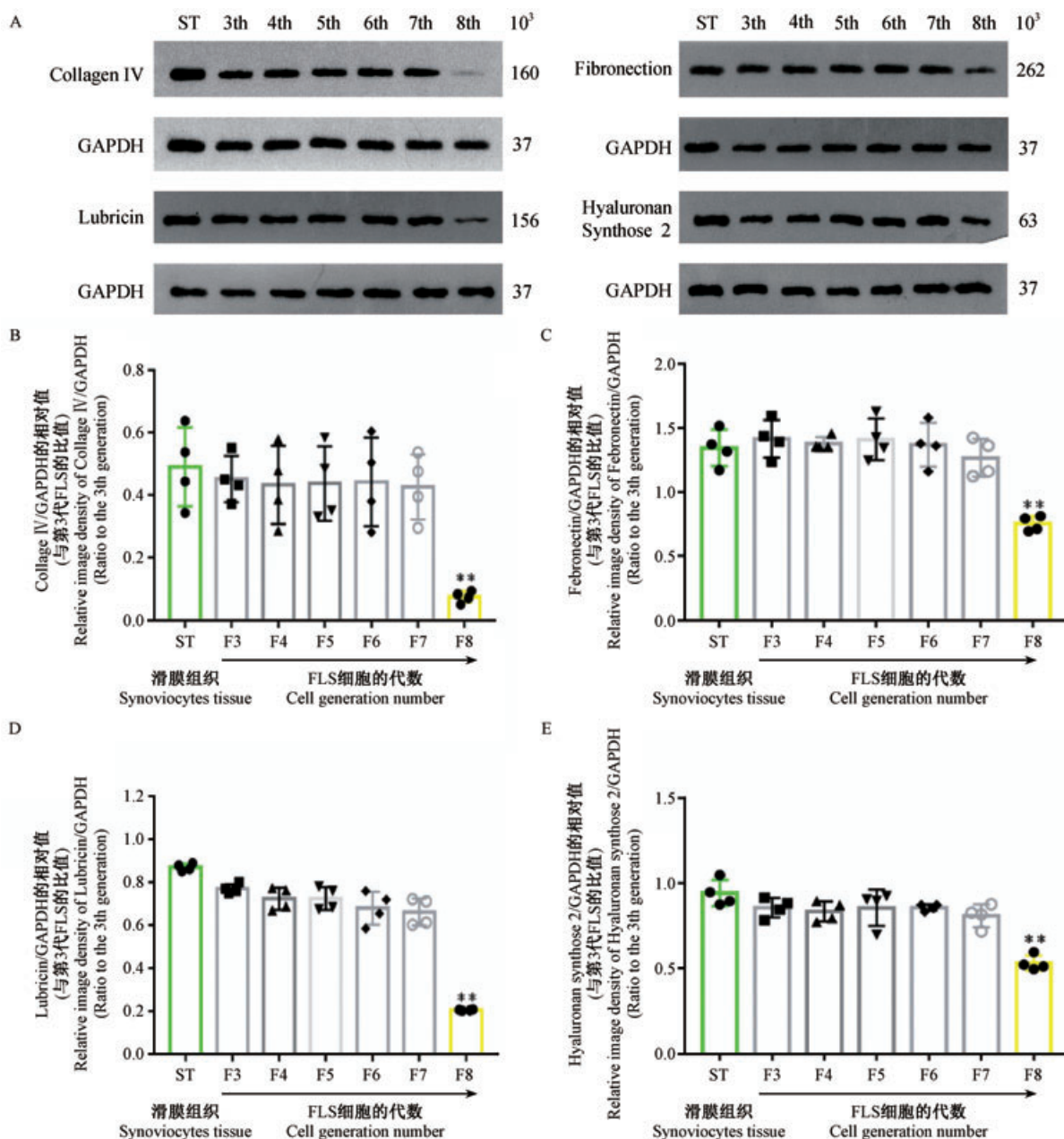
Figure 3 Western Blot analysis of cytokines in synovial tissue and FLS

实验动物^[17]。大鼠模型能模拟人类 IJD 发病机制和病理过程,且具有操作方便易行、稳定性高、干扰因素少等特性。本实验不仅是建立滑膜 FLS 原代培养方法,更重要的是建立 FLS 炎症模型,所以我们选择了 SPF 级 SD 大鼠。建模获得成功,为研究 IJD 提供了良好的实验条件。

在 OA 和 RA 等 IJD 中,由于可溶活性因子和细胞表面的相互作用激活 FLS,合成并释放促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等,激活免疫系统,从免疫防御转变为免疫破坏,破坏关节,改变关节正常功能^[18]。越来越多的研究^[19]显示:IJD 滑液促炎因子分泌增加,滑膜明显增厚,其 FLS 异常增殖和侵袭。IJD 中润滑素水平降低,透明质酸分子的数量下降,滑液的润滑能力也下降,增高了磷脂水平,脂肪链变短,不能有效减轻关节活动的摩擦力^[20]。促炎因子在炎症模型的高表达,是模拟炎症病理状态的关键。尤欣等^[21]以 hIL-1 β 为炎症抗原诱导兔膝关节炎,检测到关节滑膜组织 hIL-1 β mRNA 的表达,滑膜组织呈结节样增生,关节炎的严重程度与注入关节腔的 MFG hIL-1 β 转染兔滑膜细胞数目成正相关。熊乐等^[22]向大鼠坐骨神经断端显微注射 LPS (2 g/L) 1 μ L,术后 1.5 h 和 24 h 的 IL-1 β mRNA 和单核细

胞趋化蛋白-1 (MCP-1) mRNA 的表达明显升高。运用 LPS 诱导乳腺炎模型^[12],导致 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子释放异常增加,加重炎症。LPS 作为炎症抗原,LPS 激活了固有的免疫系统,可通过细胞信号转导系统激活单核巨噬细胞、内皮细胞、FLS、上皮细胞等合成和释放多种细胞因子和炎性介质,具有良好的一致性和重复性^[12]。利用 LPS 刺激 FLS 促进促炎因子的分泌,可以诱导出 FLS 的炎症病理过程,LPS 诱导的 FLS 炎症模型,符合 IJD 的基本特征^[20]。

IJD 的主要特征是促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 高表达,通过一系列炎症级联反应和激活各类信号通路,调节下游因子,促使 IJD 的发生和加剧,直至关节破坏。IJD 的临床症状是关节疼痛、僵硬和关节残废^[14]。软骨降解在 IJD 的发病中起着重要作用,丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是软骨降解的主要途径。促炎因子是激活 p38-MAPK 信号通路的主要因素之一,MAPK 信号通路的异常激活又可促进炎症反应,导致软骨基质降解酶的释放,从而加速软骨退化^[23]。体外 FLS 炎症模型的建立,对 MAPK 信号通路研究提供了工具。IL-1 β 是 IJD 首要致病因子

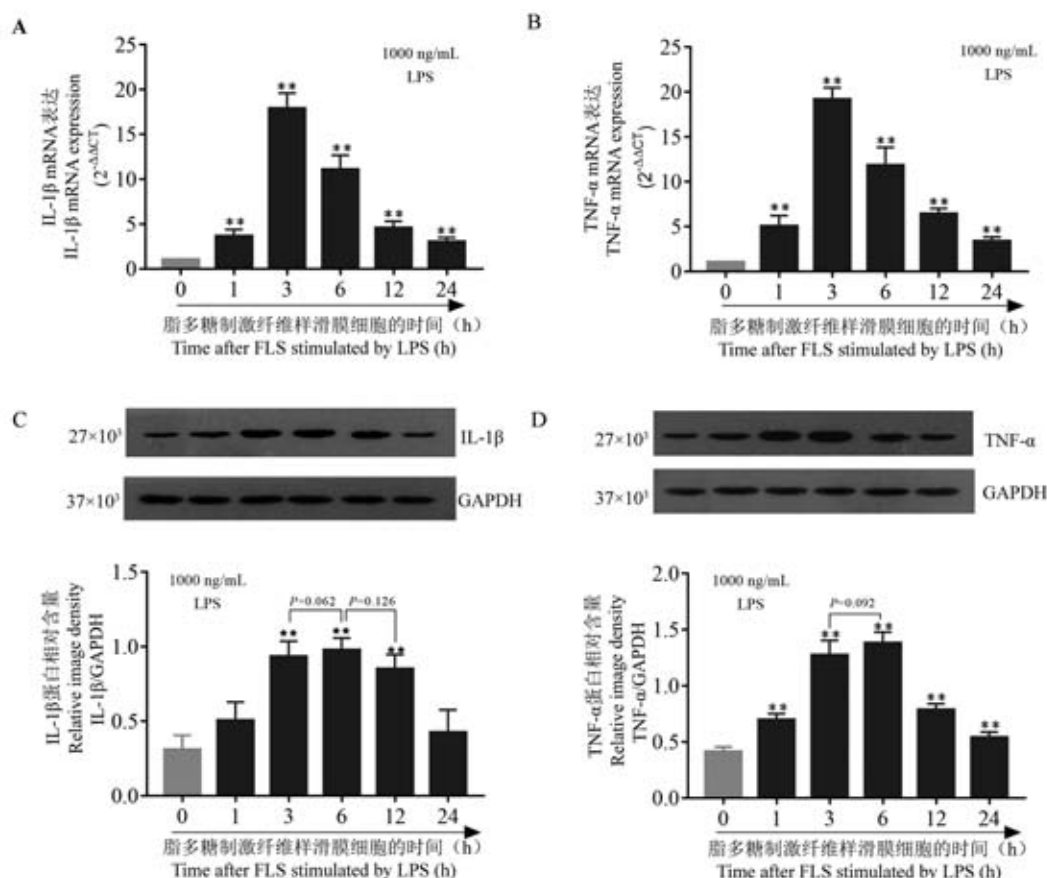


注: A: 滑膜组织 (ST) 及其原代培养第 3 代 ~ 第 8 代 FLS 的特征蛋白的 Western Blot 结果。B: 各组 Collagen IV 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 5.315$, $P = 0.003$ 。Collagen IV 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -5.339$, $**P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。C: 各组 Fibronectin 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 8.372$, $P < 0.0001$ 。Fibronectin 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -5.616$, $**P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。D: 各组 Lubricin 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 58.239$, $P < 0.0001$ 。Lubricin 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -53.712$, $**P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。E: 各组 Hyaluronan synthase 2 蛋白相对含量。组间单因素方差分析, $F = 7.312$, $P < 0.0001$ 。Hyaluronan synthase 2 蛋白表达相对光密度值, 与第 3 代 FLS 比较, 第 8 代 FLS 降低非常显著 ($t = -4.335$, $**P < 0.01$)。ST, 第 4 代 ~ 第 7 代各代 FLS 变化差异不具有显著性。

图 4 滑膜组织和滑膜 FLS 的特征蛋白 Western Blot 检测分析

Note. A, Western Blot results of Collagen IV, Fibronectin, Lubricin, Hyaluronan synthase 2 and GAPDH in ST and its subcultured primary synovium cells from the third to the eighth generation. B, One way ANOVA between Collagen IV protein groups, $F = 5.315$, $P = 0.003$. Compared with the expression of Collagen IV protein in the third generation FLS, the expression of Collagen IV protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.339$, $**P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. C, One way ANOVA between Fibronectin protein groups, $F = 8.372$, $P < 0.0001$. Compared with the expression of Fibronectin protein in the third generation FLS, the expression of Fibronectin protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -5.616$, $**P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. D, One way ANOVA between Lubricin protein groups, $F = 58.239$, $P < 0.0001$. Compared with the expression of Lubricin protein in the third generation FLS, the expression of Lubricin protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -53.712$, $**P < 0.01$). There was no significant difference between the ST, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS. E, One way ANOVA between Hyaluronan synthase 2 protein groups, $F = 7.312$, $P < 0.0001$. Compared with the expression of Hyaluronan synthase 2 protein in the third generation FLS, the expression of Hyaluronan synthase 2 protein in the eighth generation FLS decreased significantly ($t = -4.335$, $**P < 0.01$). There was no significant difference between the st, the fourth generation to the seventh generation FLS and the third generation FLS.

Figure 4 Western Blot detection of characteristic protein in synovial tissue and FLS



注: A 和 B: 显示用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的相对表达含量。单因素方差分析结果: IL-1 β 的 $F = 172.477, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 3 h 为其表达峰值 (17.865 ± 1.754); TNF- α 的 $F = 162.478, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 3 h 为其表达峰值 (19.177 ± 1.317)。C 和 D: IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的相对表达含量。单因素方差分析结果: IL-1 β 的 $F = 28.694, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 1 h 和 24 h 观察时间点的 P 值分别为 0.057 和 0.078, 其余各观察时间点均 $**P < 0.01$, 6 h 为其表达峰值 (1.003 ± 0.096); TNF- α 的 $F = 175.03, P < 0.0001$ 。与 0 h 比较, 1 ~ 24 h 观察时间点均 $**P < 0.01$, 6 h 为其表达峰值 (1.380 ± 0.099)。

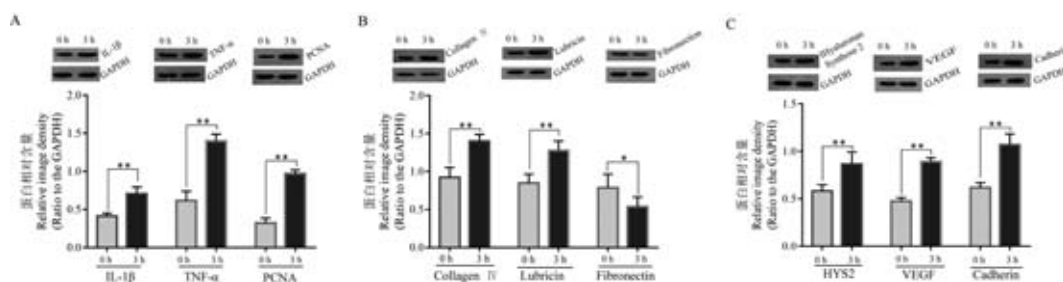
图 5 荧光 qRT-PCR 法和 Western Blot 法检测 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 后不同时间点 IL-1 β 和 TNF- α 的表达 ($n = 5$)

Note. A and B show the relative expression data of IL-1 β and TNF- α mRNA with $2^{-\Delta\Delta CT}$. In statistical analysis, One-way ANOVA of IL-1 β , $F = 172.477, P < 0.0001$, compared with 0 h, $**P < 0.01$ at other observation time points, 3 h was its expression peak (17.865 ± 1.754); $F = 162.478, P < 0.0001$ of TNF- α . Compared with 0 h observation time point, P value of other observation time points were less than 0.01, 3 h was its expression peak (19.177 ± 1.317). C and D showed the Western Blot analysis of IL-1 β and TNF- α protein. One-way ANOVA of IL-1 β , $F = 28.694, P < 0.0001$. Compared with 0 h, P value of 1 h and 24 h observation time points were 0.057 and 0.078, respectively. P value of other observation time points were less than 0.01, 6 h was its expression peak (1.003 ± 0.096) (C). One-way ANOVA of TNF- α protein, $F = 175.03, P < 0.0001$. Compared with 0 h, $**P < 0.01$ at 1–24 h, and the peak value was (1.380 ± 0.099) at 6 h (D).

Figure 5 Detection of IL-1 β and TNF- α expression at different time points after FLS stimulation with 1000 ng/mL LPS by fluorescence QRT-PCR and Western Blot ($n = 5$)

之一,其可通过刺激产生磷酸化的 p38-MAPK 来合成大量 NO, 反馈激活 MAPK 通路, 促进 IL-1 β 的产生, 增加前列腺素 E2 及环氧化酶-2 (COX-2) 的水平, 引起软骨损伤。TNF- α 可介导多种炎症因子, 可以与 p38-MAPK 形成正反馈环路, 活化的 p38-MAPK 通路可促进 TNF- α 的表达, 过度表达 TNF- α 可诱导软骨细胞凋亡。这些促炎因子通过各种途

径激活信号通路, 促使 IJD 的发生发展。NF- κ B 信号通路影响着 OA、RA 等 IJD 炎症反应的各个阶段。NF- κ B 信号通路参与血管内皮细胞黏附分子的表达并且与 KOA 患者淤血状态密切相关。淤血和患处新生毛细血管是关节疼痛的重要因素。NF- κ B 信号通路也是软骨降解进程中的关键分子途径, 其通过促进 MMP-1、MMP-2、MMP-3 等多种降解酶的分



注: A: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, IL-1 β 蛋白相对表达量升高, $t = -6.817$, $**P < 0.01$; TNF- α 蛋白相对表达量升高, $t = -11.443$, $**P < 0.01$; PCNA 蛋白相对表达量上调, $t = -17.801$, $**P < 0.01$ 。B: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, Collagen IV 蛋白相对表达量上调, $t = -6.702$, $**P < 0.01$; Lubricin 蛋白相对表达量升高, $t = -5.686$, $**P < 0.01$; Fibronectin 蛋白相对表达量下调, $t = 2.518$, $*P < 0.05$ 。C: 1000 ng/mL LPS 刺激 FLS 3 h, 与刺激前比较, Hyaluronan Synthase 2 (HYS2) 蛋白相对表达量升高, $t = -4.364$, $**P < 0.01$; VEGF 蛋白相对表达量上调, $t = -16.668$, $**P < 0.01$; Cadherin 蛋白相对表达量上调, $t = -7.637$, $**P < 0.01$ 。

图 6 Western Blot 法检测 1000 ng/mL LPS 诱导 FLS 后 3 h 细胞因子和特征蛋白的表达

Note. A, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of IL-1 β protein was increased, $t = -6.817$, $**P < 0.01$; the relative expression of TNF- α protein was increased, $t = -11.443$, $**P < 0.01$; the relative expression of PCNA protein was increased, $t = -17.801$, $**P < 0.01$. B, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of collagen IV protein was increased, $t = -6.702$, $**P < 0.01$; the relative expression of lubricin protein increased, $t = -5.686$, $**P < 0.01$; the relative expression of fibronectin protein decreased, $t = 2.518$, $*P < 0.05$. C, 1000 ng/mL LPS stimulated FLS for 3 h, compared with that before stimulation, the relative expression of hyaluronan synthase 2 (HYS2) protein increased, $t = -4.364$, $**P < 0.01$; the relative expression of VEGF protein increased, $t = -16.668$, $**P < 0.01$; the relative expression of cadherin protein was up-regulated, $t = -7.637$, $**P < 0.01$.

Figure 6 Detection of the expression of cytokines and characteristic proteins in 3 hours after FLS stimulation with 1000 ng/mL LPS by Western Blot

泌及 COX-2、NO 等分解代谢因子的合成,加剧关节炎软骨的凋亡和软骨的炎症反应^[24]。TNF- α 对 FLS 的增殖有促进作用,可使滑膜组织纤维样变并增加滑液中的炎症因子,加重病情。FLS 还具有类似肿瘤细胞增殖的特性,可突破生理屏障侵入软骨和骨,导致关节破坏。FLS 入侵体参与 FLS 与软骨的附着,其内富含基质金属蛋白酶,可特异性地使细胞外基质变性^[25]。LPS 既是炎症抗原,又是 NF- κ B 的激动剂,运用 LPS 诱导体外 FLS 炎症模型的建立,有利于进行信号通路的干预,探讨如何降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、VEGF 和 MMP 等蛋白的表达,从而减弱或抑制住 IJD 诱导的疼痛和炎症,延缓或阻止关节退变,达到治疗的目的。

综上所述,本研究建立的 SD 大鼠正常膝关节滑膜 FLS 原代培养方法,FLS 纯度高,成本低,来源容易,重现性好,操作简单,实验时间可控。关键是第 3 ~ 7 代 FLS 具有宿主骨关节滑膜组织中的 FLS 的生理功能,且能分泌具有关节囊修复作用的结缔组织成分,还能合成透明质酸和润滑素等保证关节内环境的稳定的物质。LPS 能诱导原代培养的滑膜组织 FLS 分泌促炎细胞因子和诱导 IJD 特征蛋白的表达改变,复制出 IJD 的基本特征。总之,LPS 诱导的 FLS 炎症模型可作为体外研究 IJD 的细胞模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] Moasheri A, Raymann MP, Gualillo O, et al. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2017, 13(5): 302-311.
- [2] 宋朋飞, 阚卫兵, 袁琴, 等. 滑膜病变在骨关节炎中的表现 [J]. 中国骨伤, 2012, 25(5): 442-444.
Song PF, Han WB, Yuan L, et al. Synovial lesions in osteoarthritis [J]. Chin J Orthopa Trauma, 2012, 25(5): 442-444.
- [3] Canzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis [J]. Bone, 2012, 51(2): 249-257.
- [4] Orlowsky EW, Kraus VB. The role of innate immunity in osteoarthritis; when our first line of defense goes on the offensive [J]. J Rheumatol, 2015, 42(3): 363-371.
- [5] 朱立帆, 周建新, 曾金才, 等. S100 钙结合蛋白 B 在骨性关节炎软骨损伤修复中的作用及机制研究 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(11): 1429-1434.
Zhu LF, Zhou JX, Zeng JC, et al. The role and mechanism of S100calcium binding protein B in osteoarthritis cartilage damage repair [J]. Chin J Reparat Reconstruct Surg, 2018, 32(11): 1429-1434.
- [6] 丁娟, 王志军, 董晓薇, 等. RA 滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(36): 7008-7011.
Ding J, Wang ZJ, Dong XW, et al. Primary culture and identification about fibroblast-like synoviocytes of RA [J]. Progr Modern Biomed, 2012, 12(36): 7008-7011.
- [7] Pauly HM, Larson BE, Coatney GA, et al. Assessment of cortical and trabecular bone changes in two model of post-

- traumatic osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2015, 33 (12): 1835–1845.
- [8] González C, Abello P, Cepeda R, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2007, 18 (3): 127–135.
- [9] 高皖皎, 邓秋狄, 佟丽, 等. 佐剂型关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 关节炎大鼠滑膜成纤维细胞模型建立及特征分析 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31 (12): 1693–1698.
- Gao WJ, Deng QD, Dong L, et al. Establishment and characteristic analysis of fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant arthritis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31 (12): 1693–1698.
- [10] Min S, Wang C, Lu W, et al. Serum levels of the bone turnover marker dickkopf-1, osteoprotegerin, and TNF- α in knee osteoarthritis patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2017, 36 (10): 2351–2358.
- [11] Zhang B, Wang LS, Zhou YH. Elevated microRNA-125b promotes inflammation in rheumatoid arthritis by activation of NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1151–1157.
- [12] 黄永周, 李漪, 丛竹军. 栀子苷对乳腺炎动物模型 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28 (11): 95–99.
- Huang YZ, Li Y, Cong ZJ. Effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in an animal model of mastitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28 (11): 95–99.
- [13] 翟亚南, 王晶晶, 袁李瑶, 等. D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠慢性肝损伤模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24 (5): 62–65.
- Zhai YN, Wang JJ, Li M, et al. Chronic hepatic injury modeling in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide combination [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24 (5): 62–65.
- [14] Zhang L, Zhang L, Huang Z, et al. Increased HIF-1 α in knee osteoarthritis aggravate synovial fibrosis via fibroblast-like synovial cell pyroptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019; 2019: 6326517.
- [15] Shruthi PJ, Sujatha K, Srilatha CH, et al. Nucleolar organizer region count PCNA and Ki-67 indices are diagnostic makers of malignancy and cell proliferation rate in bovine lymphosarcoma [J]. *J Veterinar Sci Technol*, 2016, 7 (2): 1–7.
- [16] 陈芳, 刘琴, 王丽平, 等. 改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26 (4): 75–78.
- Chen F, Liu Q, Wang LP, et al. Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26 (4): 75–78.
- [17] McCoy AM. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations [J]. *Vet Pathol*, 2015, 52 (5): 803–818.
- [18] Filer A. The fibroblast as a therapeutic target in rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13 (3): 413–419.
- [19] Li S, Chen JW, Xie X, et al. Autophagy inhibitor regulates apoptosis and proliferation of synovial fibroblasts through the inhibition of PI3K/AKT pathway in collagen-induced arthritis rat model [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9 (5): 2065.
- [20] Kosinska MK, Ludwig TE, Liebisch G, et al. Articular joint lubricants during osteoarthritis and rheumatoid arthritis display altered levels and molecular species [J]. *PLoS One*, 2015; 10 (5): e0125192.
- [21] 尤欣, 唐福林, 吴士宏, 等. 人白介素-1 β 诱导兔膝关节炎模型的临床及病理特点 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12 (2): 65–70.
- You X, Tang HL, Wu SH, et al. Characteristics and Major Pathologies of Lapin Knee Arthritis Induced by Intra-articular Expression of Human Interleukin-1 β [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12 (2): 65–70.
- [22] 熊乐, 张蓓, 沈若武, 等. 脂多糖干预对大鼠周围神经损伤后瓦勒变性的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25 (2): 211–217.
- Xiong Y, Zhang P, Shen RW, et al. Effect of lipopolysaccharide on Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25 (2): 211–217.
- [23] Xu L, Zhai LL, Ge Q, et al. Vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) regulates apoptosis of chondrocytes via p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK) in osteoarthritis [J]. *Inflammation*, 2017, 40 (6): 1924–1932.
- [24] Ji B, Cuo W, Ma H, et al. Isoliquiritigenin suppresses IL-1 β induced apoptosis and inflammation in chondrocyte-like ATDC5 cells by inhibiting NF- κ B and exerts chondroprotective effects on a mouse model of anterior cruciate ligament transection [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40 (6): 1709–1718.
- [25] Asano T, Iwasaki N, Kon S, et al. A9 β 1 integrin acts as a critical intrinsic regulator of human rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53 (3): 415–424.

[收稿日期] 2020-04-23

毕艳丽,倪喆鑫,李溪,等. 子宫内位症纤维化小鼠模型构建方法及其应用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 447-454.

Bi YL, Ni ZX, Li X, et al. Establishment and application of a mouse model of endometriosis with fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 447-454.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.003

子宫内位症纤维化小鼠模型构建方法及其应用

毕艳丽^{1,2}, 倪喆鑫², 李溪², 俞超芹^{2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 海军军医大学附属长海医院, 上海 200433)

【摘要】 目的 探索一种高效的子宫内位症纤维化小鼠模型建立方法及其评价方法。**方法** 改良的腹腔注射法构建 BALB/c 小鼠子宫内位症纤维化模型;收集小鼠腹腔灌洗液,ELISA 试剂盒检测灌洗液 TGF- β 1 水平;对小鼠腹腔粘连程度进行评分;HE 染色验证子宫内位症模型是否成功;Masson 染色检测异位灶胶原纤维沉积情况,评估其胶原沉积程度;免疫组化法检测纤维化相关蛋白 E-cadherin、Collagen I、 α -SMA、smooth muscle myosin heavy chain II (SMMHC-II) 的表达情况,评估异位灶纤维化程度。**结果** 改良腹腔注射法构建小鼠子宫内位症纤维化小鼠模型成功率可达到 100%。小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 水平随造模时间延长有明显升高。Masson 染色和纤维化相关蛋白免疫组化染色观察到子宫内位症小鼠腹腔存在纤维化表型。**结论** 改良的腹腔注射法构建小鼠子宫内位症纤维化模型成功率高,腹腔灌洗液 TGF- β 1 水平、Masson 染色和纤维化相关蛋白 E-cadherin、Collagen I、 α -SMA、SMMHC-II 免疫组化染色能够评价小鼠子宫内位症盆腔纤维化程度。

【关键词】 子宫内位症;模型;纤维化;BALB/c 小鼠;TGF- β 1

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0447-08

Establishment and application of a mouse model of endometriosis with fibrosis

BI Yanli^{1,2}, NI Zhixin², LI Xi², YU Chaoqin^{2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

2. Changhai Hospital, Naval Military Medical University, Shanghai 200433)

Corresponding author: YU Chaoqin. E-mail: chqyu81@163.com

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of endometriosis with fibrosis and to study its application. **Methods** A mouse model of endometriosis with fibrosis was established by modified intraperitoneal injection using BALB/c mice; the peritoneal lavage fluid of mice was collected and the level of TGF- β 1 in lavage fluid was detected by ELISA. The degree of abdominal adhesion was scored and the success of the endometriosis model was verified by hematoxylin-eosin (HE) staining, while the collagen deposition in the ectopic focus was detected by Masson staining and the degree of collagen deposition was evaluated. The expression of fibrosis-related proteins E-cadherin, collagen I, α -SMA, and smooth muscle myosin heavy chain II (SMMHC-II) were detected by immunohistochemistry, and the degree of ectopic fibrosis was evaluated. **Results** The success rate of a mouse model of endometriosis with fibrosis constructed by a modified intraperitoneal injection method could reach 100%. The level of TGF- β 1 in the peritoneal lavage fluid of mice increased significantly with the extension of modeling time. Masson staining and immunohistochemical staining of fibrosis-related proteins revealed a fibrotic phenotype in the abdominal cavity of endometriosis mice. **Conclusions** The improved

【基金项目】 国家自然科学基金(81774352,81703874,81573755),上海市中医药三年行动计划[ZY(2018-2020)-FWTX-1107]。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81774352, 81703874, 81573755), Shanghai 3-Year Action Plan for Traditional Chinese Medicine [ZY(2018-2020)-FWTX-1107].

【作者简介】 毕艳丽(1987—),女,博士研究生,研究方向:子宫内位症的临床和基础研究。Email: biyanli.mary@163.com

【通信作者】 俞超芹(1965—),女,教授,医学博士,研究方向:子宫内位症的临床和基础研究。Email: chqyu81@163.com

intraperitoneal injection method has a high success rate in the establishment of a mouse model of endometriosis with fibrosis. TGF- β 1 levels in peritoneal lavage fluid, Masson staining, and immunohistochemical staining of fibrosis-related proteins can evaluate the degree of pelvic fibrosis in mice with endometriosis.

【**Keywords**】 endometriosis; model; fibrosis; BALB/c mouse; TGF- β 1

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

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是子宫内膜腺体和间质种植于子宫以外的一种慢性、雌激素依赖性疾病,在育龄期女性中发病率为 10% ~ 15%^[1-2]。EM 虽是一种良性疾病,却具有发病范围广、症状多样、易转移、易复发的恶性行为,至今其病因及发病机制仍不清楚。目前 EM 的治疗手段主要包括手术和激素类药物,但疗效均不理想。因此,子宫内膜异位症是妇科学研究的热点和难点之一。

子宫内膜异位症的病理学基础为异位内膜在体内激素的作用下周期性剥脱出血,这种周期性出血长期反复出现引起盆腔粘连、甚至纤维化。研究显示,80% 以上的 EM 患者在初次手术时发现粘连形成,而术后 3 个月再粘连的发生率又可达 50%^[3-4]。随着疾病的进展,盆腔粘连逐渐加重,由轻度 EM 的亚临床腹膜炎或轻度盆腔粘连,发展至重度 EM 的严重而广泛的粘连,形成盆腔纤维化,甚至冰冻盆腔,导致患者不孕、慢性盆腔痛,严重影响女性的身心健康。然而,目前 EM 盆腔纤维化的形成机制尚不清楚^[5-6]。

构建一种高效的子宫内膜异位症动物模型将有助于对本病发病机制的认识和新药的开发,同时可以为探索子宫内膜异位症纤维化发病机制提供理想模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

90 只 SPF 级 6 周龄性成熟 BALB/c 雌小鼠,体重 18 ~ 20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】,饲养于上海长海医院临床实验中心动物实验室【SCXK(沪)2017-0005】,温度 22 ~ 25℃,湿度 55% ~ 60%,12 h 光照和 12 h 黑暗交替,实验前适应性饲养 1 周。所有实验操作均严格遵照动物伦理相关规定执行并通过长海医院伦理委员会审查,批准号:CHEC2019-127。

1.1.2 试剂与仪器

苯甲酸 β -雌二醇(Sigma, E2758),实验用芝麻

油(Acros organics, 241002500),伊红-苏木精染色剂、小鼠转化生长因子 β 1(TGF- β 1) ELISA 检测试剂盒(武汉博士德),兔抗鼠 E-cadherin 抗体(CST, 3195S),兔抗鼠 Collagen I 抗体(Abcam, AB34710),兔抗鼠 α -SMA 抗体(Abcam, AB5694),兔抗鼠 SMMHC-II 抗体(Abcam, AB53219)。

两套眼科常规手术器械(剪刀、镊子、止血钳)、注射用生理盐水、1 mL 注射器、20 mL 注射器、细胞培养皿(Corning, USA),RPMI-1640 培养基(Gibco, USA),低温离心机、组织包埋机、石蜡切片机、光学显微镜(Olympus, Japan)等。

1.2 方法

1.2.1 药物配制

称取 1.5 mg 苯甲酸 β -雌二醇粉末以 50 mL 实验用芝麻油溶解,配成浓度为 30 μ g/mL 的苯甲酸 β -雌二醇溶液置 4℃ 冰箱避光保存备用。

1.2.2 实验分组

造模前,每日定时对所有小鼠进行阴道脱落细胞涂片(美蓝染色法),连续观察两个动情周期,选取动情周期规律的小鼠用于实验。90 只实验小鼠中 48 只用于子宫内膜异位症模型建立,32 只作为假手术组,另外 10 只作为空白对照,用于模型对比鉴定。用于模型建立的 48 只小鼠按照 1:2 的比例随机分为供体鼠 16 只和受体鼠 32 只。32 只受体小鼠随机分为 4 组,每组 8 只,分别为种植后 1 周组、种植后 2 周组、种植后 4 周组和种植后 6 周组。

1.2.3 建模方法

所述模型的建立方法,按如下步骤操作:

(1)注射雌激素:所有实验小鼠(包括供体鼠和受体鼠)颈背部皮下注射苯甲酸雌二醇溶液 150 μ g/kg,每 4 天注射 1 次,共注射两次。

(2)从注射雌激素开始至腹腔种植当日,每日定时对供体鼠和受体鼠进行阴道脱落细胞涂片检查,观察小鼠动情周期。动情周期判断依据如下:动情前期:圆形或椭圆形的有核上皮细胞为主,夹有少量角化细胞和白细胞;动情期:几乎全是无核的角化细胞;动情后期:角化细胞减少,出现有核上皮细胞和白细胞;动情间期:细胞少而皱缩,白细胞

为主。

(3) 种植前标本准备: 供体小鼠的子宫取出用预冷的生理盐水清洗血液和粘液, 将子宫一分为二分别放入盛有 0.5 mL 预冷的 RPMI1640 培养基的培养皿中, 用眼科剪将子宫纵向剖开, 剥离子宫内膜层并迅速将其剪成体积 $\leq 1 \text{ mm}^3$ 的内膜碎片制成悬浮液备用。

(4) 腹腔注射内膜: 受体小鼠腹部皮肤消毒后, 以 1 mL 注射器针筒接 20 mL 注射器针头, 以小鼠下腹部正中尿道口上方 0.5 cm 处为进针点, 将子宫内膜碎片注射入受体小鼠腹腔, 针孔处涂抹适量青霉素软膏预防感染, 供体鼠与受体鼠数量比为 1:2。从取出供体小鼠子宫到注射子宫内膜碎片入受体小鼠所有操作应在 5 min 内连续完成, 全程保持无菌。假手术组注射雌激素的方法与模型组相同, 不同的是, 假手术组腹腔注射的是等体积的供体小鼠的腹腔脂肪组织。

(5) 种植后处理: 腹腔种植内膜当日开始对受体小鼠颈背部皮下注射苯甲酸 β -雌二醇溶液 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每 4 天注射 1 次, 共注射两次, 之后待内膜自然生长。

1.2.4 观察指标和检测方法

分别于造模后第 1 周末、第 2 周末、第 4 周末、第 6 周末脱颈法随机处死模型组小鼠和假手术组小鼠各 8 只, 经 75% 乙醇消毒后以 2 mL 预冷的生理盐水注入小鼠腹腔, 腹部充分按摩后收集腹腔灌洗液, 取出腹腔种植物, 从以下方面观察和检测相应指标。

(1) 观察种植物形态: 开腹后观察小鼠腹腔种植物的生长部位、形态、颜色、体积等。之后放入 4% 多聚甲醛溶液, 室温固定 24 h 后常规石蜡包埋切片做 HE 染色, 观察种植物病理组织形态学特征。

(2) 测量种植物体积: 种植物取出后用游标卡尺测量其长度、宽度与高度, 按公式 $V = \Pi/6 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}^{[7]}$, 计算种植物体积。

(3) 腹腔粘连评分: 采用 Blauer 粘连评分系统对小鼠腹腔粘连程度进行评分^[8-9]。评分标准: 0 分, 无粘连; 1 分, 盆腔轻微的膜状粘连; 2 分, 粘连致密, 通常宫角与肠管和膀胱均有粘连; 3 分, 粘连更致密, 范围更广, 双侧宫角均与肠管和膀胱粘连, 子宫尚有一定活动度; 4 分, 严重的粘连, 双侧宫角均与肠管和膀胱粘连, 子宫固定不动。粘连评分由两位实验人员独立进行, 取两位实验人员所评分数的

平均值作为最终粘连评分。

(4) TGF- β 1 表达水平: 2 mL 离心管收集模型组小鼠腹腔灌洗液, 4℃, 2000 rpm, 离心 15 min, 留取上清, -80℃ 冰箱保存。ELISA 试剂盒检测小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 表达水平。

(5) Masson 染色: 常规石蜡包埋、切片、脱蜡, Masson 三色染色液浸泡 15 ~ 20 min; 常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。显微镜下观察种植物胶原纤维沉积情况, 评估种植物胶原沉积程度。

(6) 免疫组化: 常规石蜡包埋、切片、脱蜡, 抗体孵育、封片。纤维化相关蛋白抗体 E-cadherin (1:400)、Collagen I (1:200)、 α -SMA (1:200)、SMMHC-II (1:300) 的表达情况, 评估种植物纤维化情况。显微镜下观察免疫组化染色切片, 染色区域内显示为黄棕色或黄褐色为阳性表达, 每张切片高倍镜下拍摄三个不同视野, 将采集的所有图像应用 Image pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析, 计算每张图像上阳性表达区域的累积光密度 (sum IOD), 再测量对应阳性表达区域的面积 (area of interest, AOI), 以平均光密度 (mean IOD) 值作为该图像阳性表达的定量标准, 反映图像上免疫反应物的表达强度。平均光密度 (mean IOD) = 累积光密度 (sum IOD) / 阳性区域面积 (AOI)。每个样品拍摄的三张图像分析的平均光密度 (mean IOD) 再作一次平均, 作为这个样品的平均光密度 (mean IOD)。针对每个样本的平均光密度 (mean IOD) 值, 用 t 检验或单因素方差分析比较各组蛋白表达量的统计学差异。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料比较, 满足方差分析条件者, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较用 SNK 法; 若不满足方差分析条件者, 采用多个独立样本的非参数检验 (Kruskal-Wallis H Test)。实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, 使用 GraphPad Prism 5.0 对数据处理作图。

2 结果

2.1 小鼠阴道脱落细胞学观察

小鼠动情周期为 4 ~ 5 d, 具有规律的性周期, 动情前期: 圆形或椭圆形的有核上皮细胞为主, 夹有少量角化细胞和白细胞; 动情期: 几乎全是无核的角化细胞; 动情后期: 角化细胞减少, 出现有核上

皮细胞和白细胞;动情间期:细胞少而皱缩,白细胞为主。如图 1 所示,不同动情周期小鼠阴道脱落细胞涂片(美蓝染色)。在内膜种植当日小鼠动情周期较一致,处于动情前期。

2.2 种植物形态学观察

小鼠腹腔子宫内膜异位灶大多数生长在肠系膜上,其次为脾下、腹壁、子宫附近,与周围组织轻中度粘连。异位灶为囊性不规则形态,有的

呈半透明色,有的呈暗红色,囊内含淡黄色或半透明液体,囊壁表面有细小血管形成,囊壁边缘有少量结缔组织,病灶直径范围 1 ~ 10 mm 不等(图 2),造模后 1 周即见典型的子宫内膜异位灶,造模成功率为 100%。组织病理学观察种植物可见生长良好的腺体和间质,腺体数目较正常在位子宫内膜明显减少,囊腔内可见炎性细胞。(图 2)

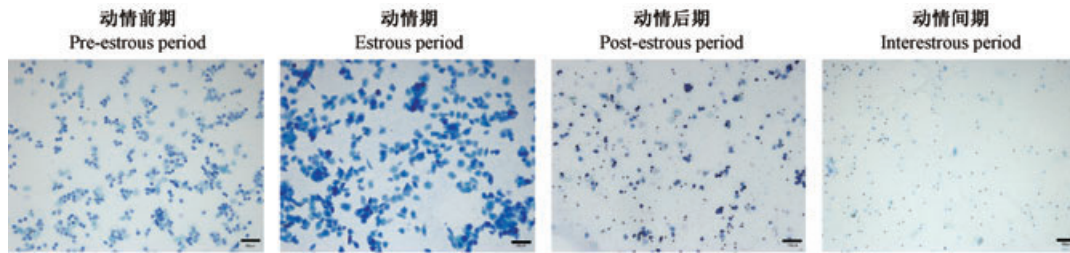


图 1 小鼠阴道脱落细胞染色(美蓝染色, $\times 100$)

Figure 1 Methylene blue staining of mouse vaginal exfoliated cells($\times 100$)

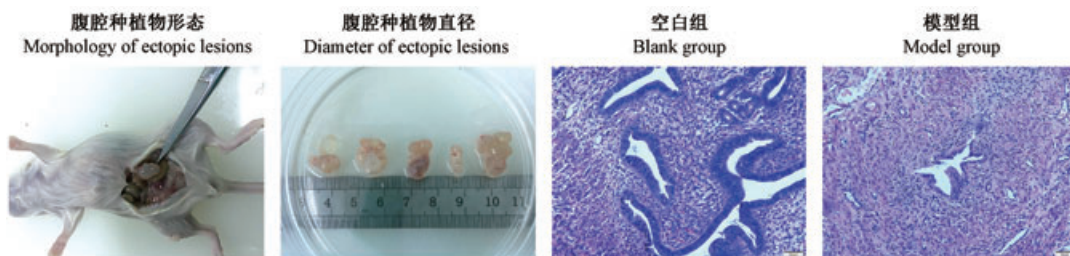


图 2 种植物形态和小鼠子宫内膜 HE 染色

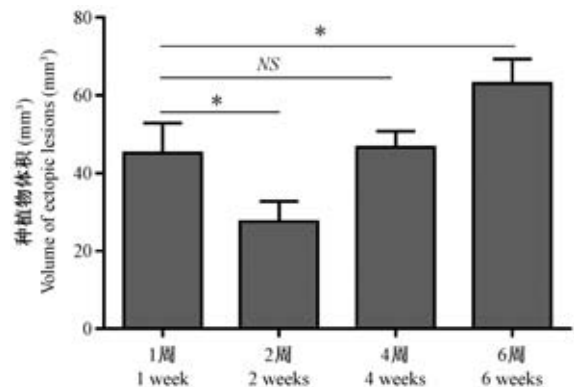
Figure 2 Morphology and diameter of ectopic lesions and HE staining of endometrium

2.3 种植物体积比较

如图 3 所示,随着造模时间的延长,EM 模型小鼠腹腔种植物数量无明显变化,但体积呈先增大后缩小再增大的趋势,其中造模后 2 周较造模后 1 周体积显著缩小,差异具有显著性($P < 0.05$);造模后 4 周、造模后 6 周种植物体积与造模后 2 周比较再次增大,造模后 4 周与造模后 1 周种植物体积比较,差异不具有显著性($P > 0.05$);造模后 6 周与造模后 1 周种植物体积比较,差异具有显著性($P < 0.05$)。假手术组小鼠腹腔脂肪组织稍有增多,均未见明显腹腔种植物。

2.4 腹腔粘连评分

随着造模时间的延长,假手术组(对照组)不同时间点的小鼠腹腔粘连评分比较,差异不具有显著性。模型组小鼠腹腔粘连程度有逐渐加重趋势,与造模 1 周的小鼠腹腔粘连评分相比,造模后 2 周、



注:与造模后 1 周比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 小鼠腹腔种植物体积

Note. Compared with 1 week after modeling, * $P < 0.05$.

Figure 3 Volume of ectopic lesions in mice

4 周、6 周的小鼠腹腔粘连评分均有显著性增加($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$),造模后 6 周的小鼠腹

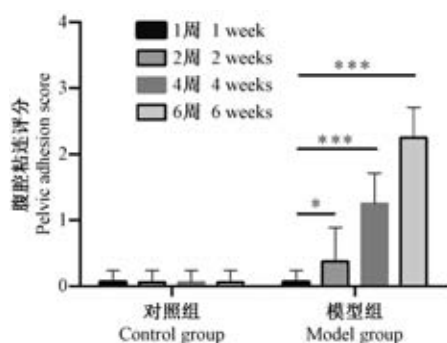
腔粘连评分最高。(图 4)

2.5 腹腔灌洗液 TGF- β 1 表达

ELISA 检测结果显示(图 5),假手术组(对照组)小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 表达水平在腹腔注射后不同时间变化不显著($P > 0.05$)。模型组小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 表达水平在造模后呈先升高后降低再升高的趋势,其中造模后 1 周较造模当日 TGF- β 1 表达水平显著升高($P < 0.05$),造模后 2 周较造模后 1 周 TGF- β 1 表达水平有轻度降低,造模后 4 周到 6 周 TGF- β 1 表达水平再次显著性升高($P < 0.05$)。

2.6 种植物 Masson 染色

Masson 染色后肌纤维呈红色,胶原纤维呈蓝色,细胞核呈黑褐色,显微镜下观察种植物胶原纤维沉积明显,随着造模时间的延长,胶原纤维沉积有增多趋势。(图 6)



注:与造模后 1 周比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

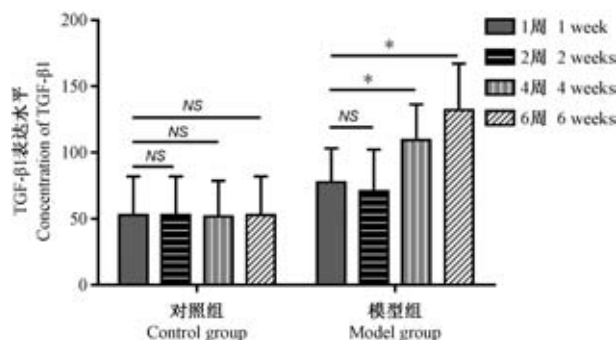
图 4 小鼠腹腔粘连评分

Note. Compared with 1 week after modeling, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 4 Score of pelvic adhesion in mice

2.7 免疫组化

免疫组化染色结果显示,纤维化相关蛋白 E-cadherin、Collagen I、 α -SMA、smooth muscle myosin heavy chain 11(SMMHC-II)于在位内膜和异位内膜均有阳性表达(图 7)。在位内膜,E-cadherin 主要表达于子宫腺体上皮细胞的细胞膜,呈强阳性表达且分布均匀,Collagen I 主要表达于子宫上皮细胞和间质细胞的细胞外基质, α -SMA 和 SMMHC-II 主要表达于子宫内膜肌层的平滑肌细胞和成纤维细胞,子宫间质部分几乎不表达。异位内膜,E-cadherin 在上皮细胞膜表达弱阳性,Collagen I 表达在上皮细胞和间质细胞的细胞外基质但分布无明显规律, α -SMA 和 SMMHC-II 在整个异位组织中可见广泛阳性表达,分布无明显规律(图 7)。应用 Image pro Plus 6.0 图像分析软件分析染色切片的平均光密度,结果见表 1。



注:与造模后 1 周比较, * $P < 0.05$ 。

图 5 小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 表达水平

Note. Compared with 1 week after modeling, * $P < 0.05$.

Figure 5 Concentration of TGF- β 1 in peritoneal lavage fluid

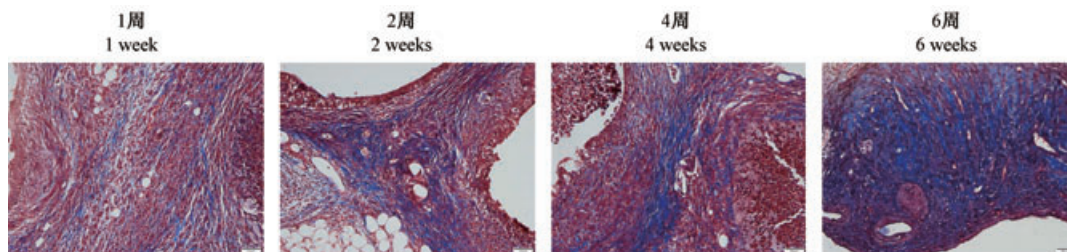


图 6 造模后腹腔种植物 Masson 染色结果($\times 200$)

Figure 6 Masson staining results of peritoneal plants after modeling($\times 200$)

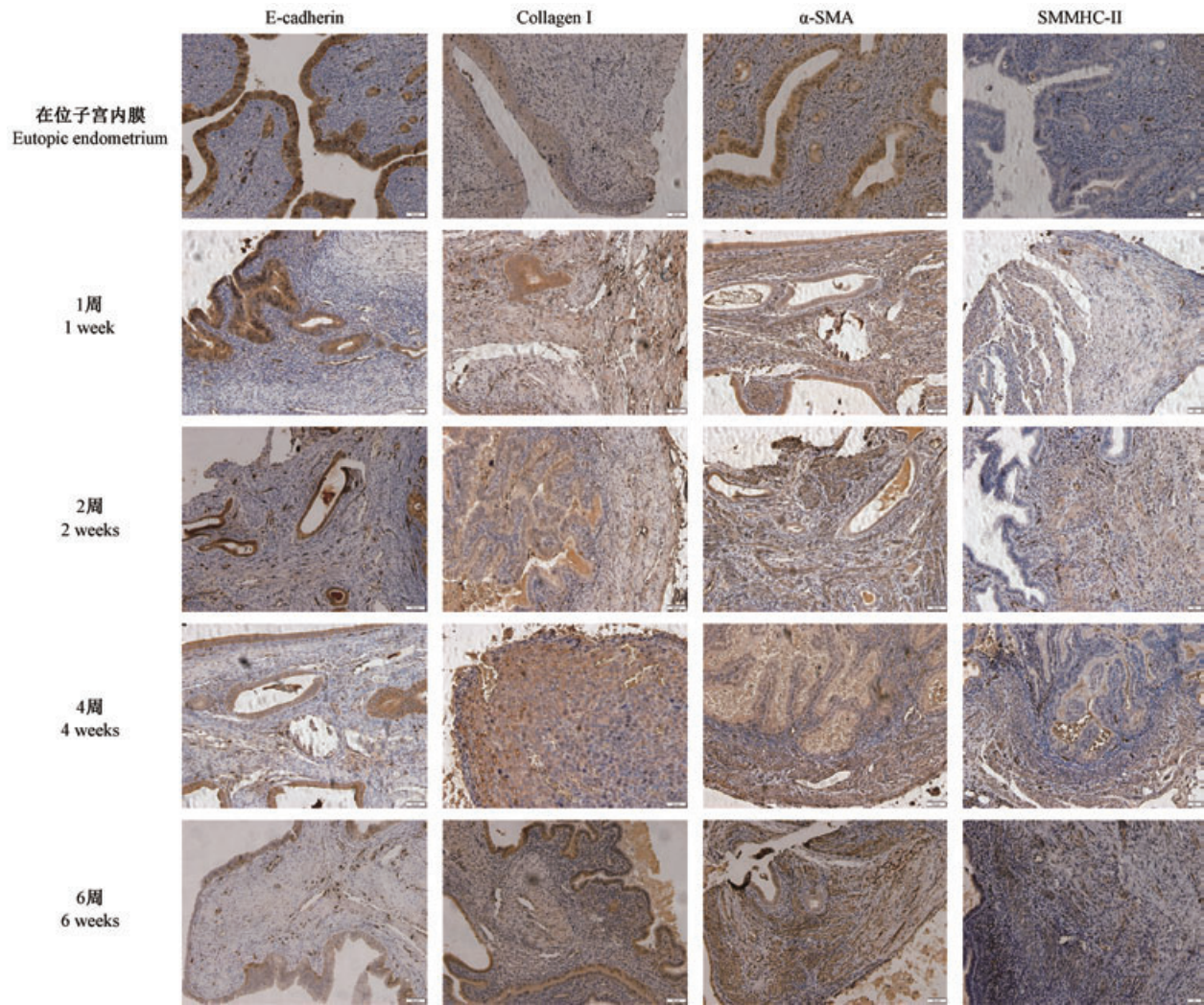


图 7 在位子宫内膜和造模后异位种植物免疫组化染色结果(× 200)

Figure 7 Immunohistochemical staining results of eutopic endometrium and ectopic plants after modeling(× 200)

表 1 正常子宫和异位种植物免疫组化染色图像的平均光密度($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Mean IOD of immunohistochemical staining images of normal uterus and ectopic plants ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Groups	E-cadherin	Collagen I	α-SMA	SMMHC-II
正常 Control	0.3366 ± 0.0188	0.0579 ± 0.0144	0.1389 ± 0.0254	0.0361 ± 0.0119
1 周 1 week	0.3159 ± 0.0181 [△]	0.0509 ± 0.0088 [△]	0.1623 ± 0.0200 [△]	0.0382 ± 0.0062 ^{△△}
2 周 2 weeks	0.2604 ± 0.0172 ^{**}	0.1283 ± 0.0167 [*]	0.2536 ± 0.0253 ^{**}	0.0651 ± 0.0116 [*]
4 周 4 weeks	0.1228 ± 0.0245 ^{**}	0.2600 ± 0.0160 ^{**}	0.3674 ± 0.0019 ^{**}	0.1662 ± 0.0199 ^{**}
6 周 6 weeks	0.0628 ± 0.0121 ^{**}	0.3592 ± 0.0161 ^{**}	0.4882 ± 0.0259 ^{**}	0.2025 ± 0.0148 ^{**}

注:与正常在位子宫内膜相比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。与造模后 1 周种植物相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with normal uterus endometrium,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$. Compared with ectopic plants,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$.

3 讨论

目前除人类外,只有灵长类动物可以自发形成子宫内膜异位症,但由于代价昂贵、造模成功率低等原因,应用受限。啮齿类动物由于经济实用、动情周期短、成模率高等优点被广泛使用。常用的啮齿类动物子宫内膜异位症造模方法主要有同源内

膜腹膜缝合法、同源内膜腹腔注射法、同源内膜皮下注射法等,但以上方法均有不足之处。腹膜缝合法需要开腹手术,操作繁琐,动物感染几率大、死亡风险高。另外,更重要的是,腹膜缝合法不能避免手术因素对疾病模型的影响,不适于子宫内膜异位症这种自发性疾病的研究。单纯的子宫内膜皮下注射法虽操作简单,但造模部位不符合临床子宫内

膜异位症的好发部位。单纯的腹腔注射法虽比较符合临床子宫内膜异位症的好发部位,但是不能很好地模拟子宫内膜异位症雌激素依赖的临床特征,且造模成功率较低。另外,还有用人子宫内膜种植的方法,虽能够观察人子宫内膜异位症的发病特征,但是为避免异体排斥反应,模型需使用裸鼠,而裸鼠免疫功能缺陷,不能模拟正常免疫状态下的疾病情况。本模型所采用的 BALB/c 小鼠基因与人高度相似,遗传背景明确,重复性好,价格经济,饲养方便,多用于肿瘤学、免疫学等的研究。本模型具有以下优势:采用皮下注射雌激素的方法人为地将小鼠的动情周期同步化,之后在动情前期注射子宫内膜,使异位内膜在小鼠体内生长同步化;腹腔注射法种植子宫内膜,以小鼠下腹部正中尿道口上方 0.5 cm 处为进针点,该处对应的腹腔内容物主要为脂肪组织,进针容易,出血概率低,降低了小鼠死亡风险;本发明内膜种植后按照小鼠动情周期规律皮下注射雌激素,促进异位内膜的生长,模拟了子宫内膜异位症雌激素依赖的发病特征;本发明腹腔注射法避免了开腹手术对模型的影响,最大程度地降低了手术创伤造成小鼠盆腔纤维化的可能性,为探索正常免疫状态下子宫内膜异位症盆腔纤维化的发病机制提供了基础。

Blauer 粘连评分系统是一种公认的腹腔粘连评分方法,广泛用于 EM 模型腹腔内粘连的分级和评价,该方法使用简便,应用性强。本研究使用 Blauer 粘连评分系统发现 EM 模型小鼠腹腔粘连程度随造模时间的推移有加重趋势,造模 4 ~ 6 周粘连明显,可作为 EM 动物模型腹腔粘连和纤维化研究的时间参考。

TGF- β 1 是目前发现的强促纤维化因子^[10-12],能够活化多种细胞,促使细胞分泌大量细胞外基质并促进组织中胶原纤维沉积,最终导致组织纤维化。本研究显示 EM 模型小鼠腹腔灌洗液 TGF- β 1 水平随造模时间逐渐升高,提示 TGF- β 1 升高可作为 EM 模型盆腔纤维化的重要评价指标之一。本研究结果显示造模第 2 周的种植物体积有轻度缩小且腹腔灌洗液 TGF- β 1 水平较造模 1 周相比有下降趋势,其原因可能是异位内膜种植在小鼠腹腔后激发的局部炎性反应,促炎因子和抑炎因子均反应性升高,激活体内免疫调节机制,短时间内抑制了异位内膜的生长,后期 TGF- β 1 再次升高可能是异位内膜在多种细胞因子和免疫细胞交互调节后继续侵

袭和生长的结果。研究显示 TGF- β 1 在子宫内膜异位症的发生发展中起重要作用,TGF- β 1 可能影响 T 辅助细胞(Th)的分化,产生更多 IL-17 和 IL-10,可能会间接影响腹腔炎症反应,与更高的 IL-1 β 和 IL-6 水平相关,子宫内膜异位症患者腹腔液中 TGF- β 1 可能促进异位病灶的形成^[13-14]。

Masson 染色是组织纤维染色中最经典的一种方法,可以显示组织中胶原纤维的沉积情况,是纤维化相关研究常用的一种染色方法^[15-16]。本研究发现,EM 模型小鼠腹腔种植物胶原纤维沉积明显,且随时间推移胶原沉积有逐渐增多趋势,提示 Masson 染色可作为 EM 模型腹腔异位灶纤维化的一种评价方法。

E-cadherin 即 e-钙粘蛋白,是上皮细胞的标记蛋白,正常上皮细胞表达强阳性,主要定位在细胞膜和细胞间质,分布均匀,可维持细胞间紧密连接,具有抑制细胞活动,阻止细胞侵袭和转移的功能,在发生纤维化的组织中 E-cadherin 在上皮细胞的表达明显减弱^[17-18]。本研究发现与在位内膜相比,异位内膜上皮细胞的 E-cadherin 表达明显减弱。Collagen I 即 I 型胶原蛋白,广泛分布在细胞外基质,是组织纤维化过程细胞分泌的一种重要的蛋白,其过度沉积造成不可逆的组织纤维化^[19-21]。 α -SMA 即 α -平滑肌肌动蛋白,目前被认为是肌成纤维细胞的标志,SMMHC-II 即平滑肌肌动蛋白重链 II,广泛表达于平滑肌细胞,若过度表达则提示组织处于纤维化的病理状态,二者常应用于纤维化疾病的研究^[22-23]。本研究中由于异位内膜的上皮、间质、肌层结构紊乱,平滑肌细胞和成纤维细胞错杂分布,界限模糊, α -SMA 和 SMMHC-II 呈广泛强阳性表达。本研究结果显示,子宫内膜异位症小鼠模型的腹腔种植物免疫组化染色 E-cadherin、Collagen I、 α -SMA、SMMHC-II 均呈阳性表达,其中 E-cadherin 随着时间的延长,表达逐渐减弱,Collagen I、 α -SMA、SMMHC-II 随着时间的延长,表达有逐渐增强趋势,以造模后 4 ~ 6 周的表达最显著。故 E-cadherin、Collagen I、 α -SMA、SMMHC-II 均可应用于子宫内膜异位症纤维化的实验研究,且造模 4 ~ 6 周纤维化表现较明显。

综上所述,本模型的建立方法具有操作简便、造模周期短、成功率高的特点。造模后移植的内膜仍保持子宫间质和腺体的组织形态,增殖活性好,模型稳定,能够广泛应用于子宫内膜异位症的动物

实验研究,对子宫内膜异位症纤维化机制研究、新药开发等方面具有重要的应用价值。

参 考 文 献(References)

- [1] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组.子宫内膜异位症的诊治指南[J].中华妇产科杂志,2015,50(3):161-169.
Gynecology association of Chinese medical association endometriosis collaboration group. Guidelines for the diagnosis and treatment of endometriosis [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2015, 50(3): 161.
- [2] Yen CF, Kim MR, Lee CL. Epidemiologic factors associated with endometriosis in east Asia [J]. Gynecol Minim Invasive Ther, 2019, 8(1): 4-11.
- [3] Goldberg JM, Falcone T, Diamond MP. Current controversies in tubal disease, endometriosis, and pelvic adhesion [J]. Fertil Steril, 2019, 112(3): 417-425.
- [4] Somigliana E, Garcia-Velasco JA. Treatment of infertility associated with deep endometriosis: definition of therapeutic balances [J]. Fertil Steril, 2015, 104(4): 764-770.
- [5] 余蕊薇,赵瑞华.子宫内膜异位症相关盆腔粘连的发生机制浅析[J].现代妇产科进展,2014,23(9):758-759.
Yu YW, Zhao RH. A brief analysis on the mechanism of endometriosis related pelvic adhesion [J]. Progr Obstet Gynecol, 2014, 23(9): 758-759.
- [6] 李晓燕,冷金花,郎景和,等.卵巢子宫内膜异位囊肿粘连程度及相关因素分析[J].中华妇产科杂志,2009,44(5):328-332.
Li XY, Leng JH, Lang JH, et al. Study on incidence and associated factors of different degree endometrioma adhesions [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2009, 44(5): 328-332.
- [7] Zhou A, Hong Y, Lv Y. Sulforaphane attenuates endometriosis in rat models through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway [J]. Dose Response, 2019, 17(2): 1559325819855538.
- [8] Cao Y, Ye Q, Zhuang M, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits angiogenesis in a rat model of endometriosis through the VEGFR-2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0186520.
- [9] Saltan G, Sutar I, Ozbilgin S, et al. Viburnum opulus L.: A remedy for the treatment of endometriosis demonstrated by rat model of surgically-induced endometriosis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193: 450-455.
- [10] Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(4): a022293.
- [11] Vallée A, Lecarpentier Y, Guillemin R, et al. Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis [J]. Oncotarget, 2017, 8(52): 90579-90604.
- [12] Loboda A, Sobczak M, Jozkowicz A, et al. TGF- β 1/Smads and mir-21 in renal fibrosis and inflammation [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 8319283.
- [13] Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, et al. The involvement of multifunctional TGF- β and related cytokines in pathogenesis of endometriosis [J]. Immunol Lett, 2018, 201: 31-37.
- [14] Zhou WJ, Yang HL, Shao J, et al. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(11): 2111-2132.
- [15] Park SJ, Cho SW, Kim SM, et al. Assessment of myocardial fibrosis using multimodality imaging in severe aortic stenosis: Comparison with histologic fibrosis [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2019, 12(1): 109-119.
- [16] Flevaris P, Khan SS, Eren M, et al. Plasminogen activator inhibitor type I controls cardiomyocyte transforming growth factor- β and cardiac fibrosis [J]. Circulation, 2017, 136(7): 664-679.
- [17] Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin beyond structure: A signaling hub in colon homeostasis and disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2756.
- [18] Che M, Shi T, Feng S, et al. The microRNA-199a/214 cluster targets e-cadherin and claudin-2 and promotes high glucose-induced peritoneal fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(8): 2459-2471.
- [19] Montesi SB, Izquierdo-Garcia D, Désogère P, et al. Type I collagen-targeted positron emission tomography imaging in idiopathic pulmonary fibrosis: First-in-human studies [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(2): 258-261.
- [20] Organ LA, Duggan AR, Oballa E, et al. Biomarkers of collagen synthesis predict progression in the PROFILE idiopathic pulmonary fibrosis cohort [J]. Respir Res, 2019, 20(1): 148.
- [21] 刘新磊,王珊珊,颜月香,等.下调 mir-192 对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的干预作用及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 48-53.
Liu XL, Wang SS, Yan YX, et al. Intervention of downregulating mir-192 in renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction and the mechanism involved [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 48-53.
- [22] Holm Nielsen S, Willumsen N, Leeming DJ, et al. Serological assessment of activated fibroblasts by alpha-smooth muscle actin (α -SMA): A noninvasive biomarker of activated fibroblasts in lung disorders [J]. Transl Oncol, 2019, 12(2): 368-374.
- [23] Ma W, Xu J, Zhang Y, et al. Matrine pre-treatment suppresses AGEs-induced HSCMs fibrotic responses by regulating Poldip2/mTOR pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 865: 172746.

[收稿日期] 2020-02-01

王悦,张萌,赵凤仪,等. 小鼠及猕猴 Graves 病动物模型的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 455-462.

Wang Y, Zhang M, Zhao FY, et al. Comparison of mouse and rhesus monkey models of Graves' disease[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 455-462.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.004

小鼠及猕猴 Graves 病动物模型的比较研究

王悦[#], 张萌[#], 赵凤仪, 伍丽萍, 施秉银^{*}

(西安交通大学第一附属医院内分泌代谢科, 西安 710061)

【摘要】 目的 本研究旨在从 Graves 病(Graves' disease, GD)免疫相关机制出发,通过比较我们既往研究中小鼠及猕猴 GD 动物模型,探讨不同动物 GD 模型特点差异,并基于不同动物模型的特点,为日后免疫治疗新方法提供研究工具。**方法** 利用表达促甲状腺素受体(TSHR)A 亚单位的重组腺病毒肌肉注射 BALB/c 小鼠,每三周 1 次,共 3 次。利用同样的重组腺病毒肌肉注射猕猴,基于小鼠病毒剂量通过体重和体表面积换算出猕猴的病毒剂量,每三周 1 次,共 5 次。于末次免疫后四周安乐死小鼠和猕猴,收集外周血、甲状腺、脾等组织测定总甲状腺素 TT4、促甲状腺素受体抗体 TRAb 及免疫学相关指标。**结果** 小鼠造模组($n=8$)TRAb 水平较对照组显著增高 $[(8.1 \pm 0.6) \text{ IU/I vs } 423.1 \pm 61.4 \text{ IU/I}]$,其中有 6 只小鼠的 TT4 水平明显增高,整体 T4 水平显著高于对照组 $[(57.1 \pm 2.9) \mu\text{g/dL vs } (96.7 \pm 13.8) \mu\text{g/dL}, P < 0.05]$,GD 甲亢发生率为 75%。猕猴造模组($n=6$)中有 3 只猕猴的 TT4 和 FT4 水平均明显增高,甲亢发生率为 50%。甲状腺病理中,小鼠(6/8)及猕猴(3/6)造模组中均出现了滤泡上皮明显增生,呈立方状或高柱状。流式细胞学分析显示,猕猴造模组的外周血和脾中的 Treg 细胞比例均显著低于对照组($P < 0.05$),这一结果与小鼠造模组的脾中 Treg 细胞比例结果一致($P < 0.05$)。此外,造模组的猕猴还出现了体重的下降($P < 0.05$)和静息心率的上升($P < 0.05$)。**结论** 与猕猴 GD 模型相比,小鼠模型 GD 甲亢的诱导时间更短,发生率更高,但 GD 猕猴基础生理生化指标和免疫相关指标中显示出更多的与人类 GD 患者类似的表现及机制。在日后探索 GD 发病机制及评估新治疗方案的研究中,我们可以根据两种动物 GD 模型的不同特点选择更合适的研究工具。

【关键词】 Graves 病;BALB/c 小鼠;猕猴;TSHR A 亚单位;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0455-08

Comparison of mouse and rhesus monkey models of Graves' disease

WANG Yue[#], ZHANG Meng[#], ZHAO Fengyi, WU Liping, SHI Bingyin^{*}

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: SHI Bingyin. E-mail: shibingy@126.com

【Abstract】 Objective This study compared mouse and rhesus monkey models of Graves' disease (GD), particularly regarding the immunological mechanisms, and provided research tools for further novel treatment. **Methods** Six-week-old female BALB/c mice were injected intramuscularly with adenovirus expressing the A-subunit of thyrotropin receptor (TSHR) (A-sub-Ad) three times at 3-week intervals. The animals were euthanized 4 weeks after the final injection to obtain their blood, spleen cells, thyroid glands and other organs. Three-year-old female rhesus monkeys were injected intramuscularly with A-sub-Ad five times at 3-week intervals, and sera were prepared from blood samples collected at several time points during the immunization regimen. The animals were euthanized 4 weeks after the final injection to

【基金项目】国家重点研发计划(2018YFC1311500),国家自然科学基金(81500690)。

Funded by National Key R&D Program of China (2018YFC1311500), and National Natural Science Foundation of China (NSFC) (81500690).

【作者简介】王悦(1987—),女,助理研究员,住院医师,博士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病,内分泌代谢性疾病。Email:shelly1021@126.com;

张萌(1992—),女,在读博士研究生,研究方向:甲状腺自身免疫疾病。Email:869083468@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】施秉银(1959—),男,博士生导师,硕士,研究方向:甲状腺自身免疫疾病,内分泌代谢性疾病。Email:shibingy@126.com

obtain their blood, spleen cells, thyroid glands and other organs. Serum total thyroxine (TT4) and thyrotropin receptor antibodies (TRAb) levels and thyroid morphology were detected in both the mice and rhesus monkeys to identify the thyroid function. The body weights of the mice and rhesus monkeys were recorded during the experiment as well as the resting heart rate of the rhesus monkeys. Flow cytometry was performed to detect the changes in splenic CD4+CD25+Foxp3+ cell proportions. **Results** After the final immunization, compared with the controls, the A-sub-Ad-injected mice developed significantly higher TRAb and TT4 levels [(8.1 ± 0.6) IU/I vs (423.1 ± 61.4) IU/I and (57.1 ± 2.9) $\mu\text{g/dL}$ vs (96.7 ± 13.8) $\mu\text{g/dL}$, respectively, $P < 0.05$]. Using the mean ± 2 standard deviations as the normal range, all A-sub-Ad-injected mice and rhesus monkeys showed positive TRAb levels, and 75% of the mice and half of the rhesus monkeys had increased TT4 levels. The thyroid pathology confirmed the GD-induced changes in the mice and rhesus monkeys. Different from the thyroid follicular epithelial cells in the controls, which were lowly cubic or flat, 6/8 mice and 3/6 rhesus monkeys in the model group showed obvious follicular epithelial hyperplasia with cubic or tall columnar-shaped cells, and papillary structures caused by hyperplasia protruded into the follicular cavity in part of the visual field. However, no lymphocyte infiltration occurred in the thyroids of either the mice or rhesus monkeys. In addition, the rhesus monkeys with GD lost body weight and had significantly increased resting heart rates ($P < 0.05$). Flow cytometry showed decreased CD4+CD25+Foxp3+ cell proportions in both the mouse and rhesus monkey GD groups compared with those of the control groups. **Conclusions** Compared with the GD rhesus monkey model, the GD mouse model showed a shorter induction time and a higher GD incidence. However, in terms of physiology and immune response, especially with GD complications, GD rhesus monkeys showed more similarities to GD patients. In future research to explore the pathogenesis and evaluate new treatments for GD, scholars can choose the appropriate research tools according to the different characteristics of the two GD animal models.

【Keywords】 Graves' disease; BALB/c mice; rhesus monkey; TSHR A subunit; animal model

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

Graves 病 (Graves' disease, GD) 是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病, 人群患病率 0.5% ~ 2%^[1]。临床表现主要有甲状腺毒症、弥漫性甲状腺肿大, 部分伴有突眼或胫前粘液性水肿。严重时可导致病人发生重度心律失常、重度肝损害、重度肌萎缩及重度贫血等^[2]。在动物活体水平建立真实反应人类疾病的疾病模型, 对疾病发病机制探讨、在体功能研究、药物新靶点发现和临床前药效学评价至关重要^[3]。

近年来, 国内外研究者对于 GD 的疾病模型展开了诸多探索。稳定表达促甲状腺素受体 (TSHR) 的细胞在免疫佐剂的帮助下, 能诱导小鼠产生促甲状腺素受体抗体 (TRAb) 升高、甲状腺毒症及甲状腺病理等 GD 相关表现, 但其操作的可能性较差且诱导成功率不稳定^[4]。此后, 研究者们更换了抗原的表达载体, 发现表达 TSHR 全长的重组腺病毒可以获得甲亢发生率为 30% ~ 50% 的 BALB/c 小鼠^[5]。随着“TSHR A 亚单位可能是 GD 发生的主要抗原”这一发病机制的重大发现, 研究者们利用表达 TSHR A 亚单位的重组腺病毒将甲亢的发生率提高至 60% ~ 80%^[6-8]。虽然近期有自发产生促甲状腺素受体刺激性抗体 (TSAb) 的 TSHR/NOD.H2h4 转

基因小鼠动物模型的相关报道, 但该小鼠甲状腺激素水平正常, 没有甲状腺功能亢进症状, 分析原因认为该抗体是针对人 TSHR 的, 因此与小鼠体内 TSHR 结合比较微弱^[9]。因此, 利用表达 TSHR A 亚单位的腺病毒免疫诱导模型是目前最为广泛接受的 GD 小鼠模型^[4]。

但由于啮齿类动物与人类遗传背景、免疫学、病理学特征上存在较大差异, Graves 病的一些典型临床表现难以在小鼠模型中成功再现, 且医药转化研究中, 啮齿类动物模型也存在着不可忽视的局限性^[10]。为了突破啮齿类动物模型在免疫学研究中的局限性, 非人灵长类动物在免疫学研究中发挥越来越重要的作用。其中, 猕猴模型作为最常见的非人灵长类动物模型, 已经广泛应用于包括感染免疫, 免疫应答, 免疫衰老及自身免疫性疾病的研究领域中。系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎的相关模型已经被陆续报道, 给构建猕猴的 GD 动物模型提供了可能性和宝贵的经验^[10]。

本研究旨在从 GD 发病机制出发, 通过比较我们既往研究中小鼠及猕猴 GD 动物模型^[11-12], 一方面探讨不同动物 GD 模型特点差异, 另一方面基于

不同动物模型的特点,为日后免疫治疗新方法提供研究工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

16 只 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,体重约 18 ~ 20 g,购自西安交通大学医学实验动物实验中心【SCXK(陕)2018-001】,饲养于西安交通大学医学实验动物中心【SYXK(陕)2015-002】,所有操作均符合西安交通大学医学部生物科研伦理要求(审批号:IACUC 2015036)。

12 只 3 周岁普通级雌性猕猴,体重约 3.8 ~ 4.0 kg,购于中国科学院昆明动物研究所【SCXK(滇)2017-0003】,饲养于空军医科大学实验动物中心【SYXK(陕)2019-001】。单笼饲养,饲养室温度控制在 24 ~ 26℃,相对湿度控制于 40% ~ 60%,自由活动。所有操作均符合陕西省林业厅生物科研伦理要求(审批号:IACUC 2011065)。整体实验过程符合 3R 原则。

1.1.2 试剂与仪器

表达 TSHR A 亚单位的重组腺病毒(A-sub-Ad)(深圳市百恩维生物科技有限公司,S2AD1005-1),对照病毒(con-Ad)(深圳市百恩维生物科技有限公司,P8V0034-2),碘[125I]-甲状腺素放射免疫分析药盒(天津市协和医药科技集团有限公司,RA10102),TRAb 滴度 ELISA 法检测(德国 Medipan GmbH,3505),Treg 细胞检测试剂盒(eBiosciences,A42925)。

正置光学显微镜(Olympus, BX53, 日本),流式细胞仪(BD, FACSCalibur, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及诱导 GD 动物模型

小鼠随机分为造模组和对照组,采取国际公认的腺病毒造模方案^[5-6],造模组用表达 TSHR A 亚单位的重组腺病毒进行免疫(A-sub-Ad),对照组用对照病毒进行免疫(con-Ad)。小鼠造模组用 PBS 稀释病毒原液,取 50 μ L 病毒稀释液经股四头肌肌肉注射。每只小鼠每次注射剂量为 1×10^8 vp,每三周免疫 1 次,共 3 次,于末次免疫后四周安乐死小鼠。猕猴随机分为造模组和对照组,造模组用 PBS 稀释病毒原液,取 1 mL 病毒稀释液经两侧股四头肌肌肉注射,每侧 500 μ L。猕猴组的病毒用量是基于

小鼠剂量通过体重和体表面积换算出的,每三周注射 1 次,共 5 次,于末次免疫后四周安乐死猕猴。取小鼠和猕猴的外周血、甲状腺、脾等组织测定 T4、TRAb 及免疫学相关指标。

1.2.2 甲状腺激素、TRAb 测定

血清总甲状腺素 TT4 水平由放射免疫法检测:含 T4 的血清和 125I 标记的 T4 与相应的抗体反应后形成抗原抗体复合物。加入二抗和聚乙二醇,使免疫复合物沉淀并离心,使用 γ 计数器测定沉淀物放射性强度。最后通过标准曲线得到血清中 T4 最终浓度。

TRAb 滴度 ELISA 法检测:含 TRAb 的血清加入包被着 TSHR 蛋白的 ELISA 板进行孵育,随后加入 M22 单克隆抗体与 TRAb 竞争性结合 TSHR。加入二抗和辣根过氧化物酶,用四甲基联苯胺进行显色,使用酶标仪测定其 OD 值。最后通过标准曲线得到血清中 TRAb 最终浓度。

1.2.3 甲状腺病理

甲状腺组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察其组织病理学改变。

1.2.4 流式细胞测定

使用流式染色缓冲液将脾或外周血单个核细胞重悬至每毫升 5×10^6 个。Treg 细胞染色按照商品说明书进行,首先使用 FITC 标记的 CD4 和 APC 标记的 CD25 进行表面染色,固定破膜后使用 PE 标记的 Foxp3 进行核内染色。最后使用多通道流式细胞仪进行检测,Cell Quest 软件进行数据分析。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行统计学检验。计量资料数据形式为平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验标准以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 GD 小鼠及 GD 猕猴体重变化

对照组和造模组小鼠体重平均值分别从 (20.9 ± 0.7) g 和 (19.7 ± 0.6) g,增长为 (26.5 ± 0.9) g 和 (26.6 ± 0.4) g,至整个实验结束,两组体重差异无显著性(图 1A)。而在整个实验过程中,对照组猕猴体重由 (3.9 ± 0.2) kg 增长至 (4.0 ± 0.3) kg。而造模组中甲亢猕猴(3/6)体重从 (3.9 ± 0.05) kg 下降至 (3.6 ± 0.2) kg($P < 0.05$)。与 GD 小鼠体重前后无统计学差异不同,GD 猕猴体重显著下降,

这说明 GD 猕猴出现了消瘦的临床表现(图 1B)。从图 1C 可以看出, GD 小鼠至造模结束时,单位摄食量下的体重增加显著低于对照组[(1.1 ± 0.01) vs (1.5 ± 0.05), $P < 0.05$], 该结果说明与对照小鼠相比,造模组小鼠摄入相同重量饲料,但其体重增长显著低于对照小鼠。这可能是由于小鼠自身体重过轻,摄食量可以显著影响体重的变化。图 1D 所示,对照组猕猴静息心率维持在 190 次/分左右,未出现明显的波动。而造模组中甲亢猕猴(3/6)静息心率由(192 ± 11)次/分上升至(255 ± 14)次/分($P < 0.05$),说明 GD 猕猴出现类似 GD 患者心动过速的表现。

2.2 GD 小鼠及 GD 猕猴 TT4

造模结束时,对照组和造模组小鼠 TT4 平均值分别为(57.1 ± 2.9) $\mu\text{g/dL}$ 和 (96.7 ± 13.8) $\mu\text{g/dL}$, 差异具有显著性($P < 0.05$)。以对照小鼠 TT4 平均值 + 2 倍标准差为正常 TT4 上限($63.1 \mu\text{g/dL}$), 超过该上限判定甲亢。造模组小鼠甲亢发生率为 75%(图 2A)。以对照猕猴血清 TT4 平均值 + 2 倍标准差为正常上限($5.72 \mu\text{g/dL}$), 超过该值视为甲亢。在第 3 次免疫结束联周后,造模组 6 只猕猴中有 1 只猕猴出现了 TT4 升高。而在 5 次免疫结束后两周,造模组共 3 只猕猴出现了 TT4 升高,即甲

亢发生率为 50%(图 2B)。

2.3 GD 小鼠及 GD 猕猴 TRAb

造模结束时,对照组和造模组小鼠血清 TRAb 平均值分别为(8.1 ± 0.6) IU/I 和 (423.1 ± 61.4) IU/I, 差异具有显著性($P < 0.05$)。以对照小鼠 TRAb 平均值 + 2 倍标准差为正常 TRAb 上限(9.3 IU/I), 造模组小鼠 TRAb 阳性率达 100%(图 3A)。以对照猕猴血清 TRAb 的平均值 + 2 倍标准差为正常上限, ELISA 法大于 0.06 IU/L 为阳性, 5 次免疫结束后,造模组 6 只猕猴 TRAb 100% 阳性(图 3B)。

2.4 GD 小鼠及 GD 猕猴甲状腺病理

光镜下,对照小鼠或猕猴甲状腺滤泡上皮细胞呈低立方或者扁平状,滤泡中胶质丰富。造模组中 6/8 只小鼠, 3/6 只猕猴出现明显的滤泡上皮增生呈立方状或高柱状,部分视野下还可观察到由于增生导致的乳头状结构凸入滤泡腔。但小鼠及猕猴均未观察到淋巴细胞浸润。(图 4)

2.5 GD 小鼠及 GD 猕猴 Treg 细胞比例

与对照组小鼠相比(12.2 ± 0.5)%, 造模组小鼠脾中 CD4+CD25+Foxp3+Treg 细胞在 CD4+T 淋巴细胞中的比例显著降低(10.3 ± 0.6)%(图 5A, $P < 0.05$)。在外周血和脾,造模组猕猴 CD4+CD25+FOXP3+Treg 细胞在 CD4+ 细胞中的比例分别是

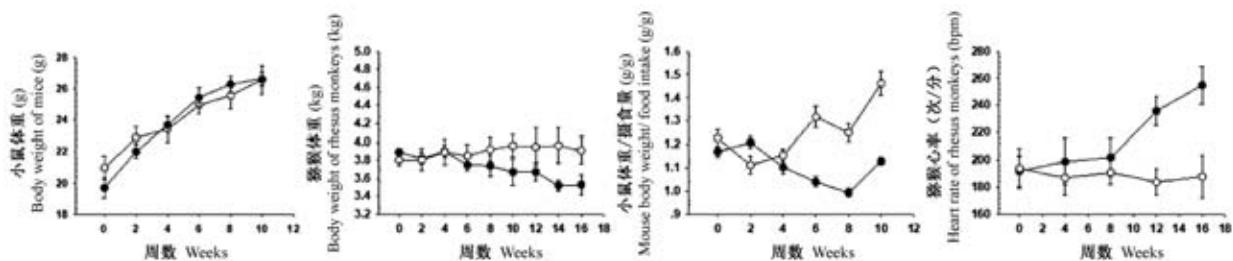


图 1 GD 小鼠及 GD 猕猴的体重变化

Figure 1 Body weight changes in GD mice and GD rhesus monkeys

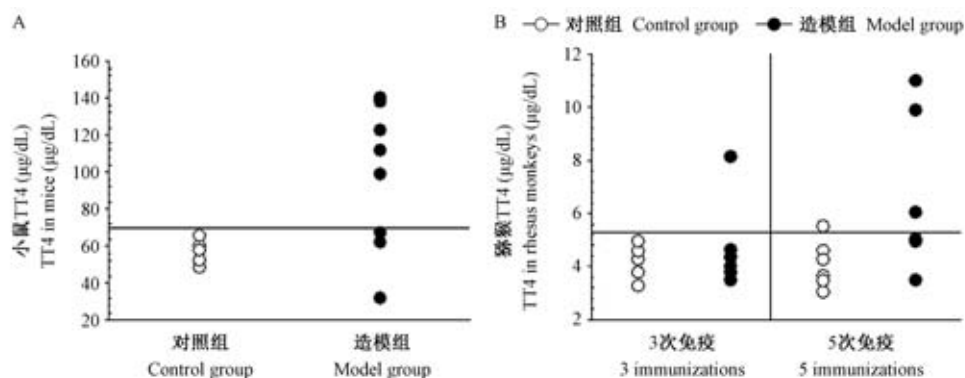


图 2 GD 小鼠及 GD 猕猴 TT4

Figure 2 TT4 levels of GD mice and GD rhesus monkeys

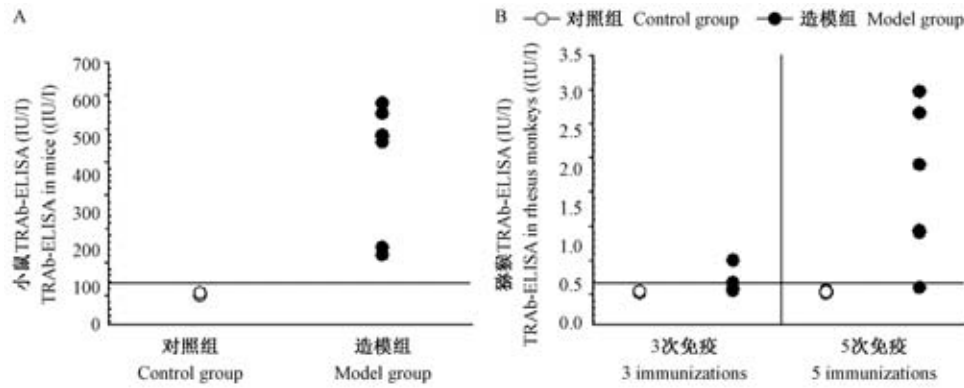


图 3 GD 小鼠及 GD 猕猴 TRAb

Figure 3 TRAb levels of GD mice and GD rhesus monkeys

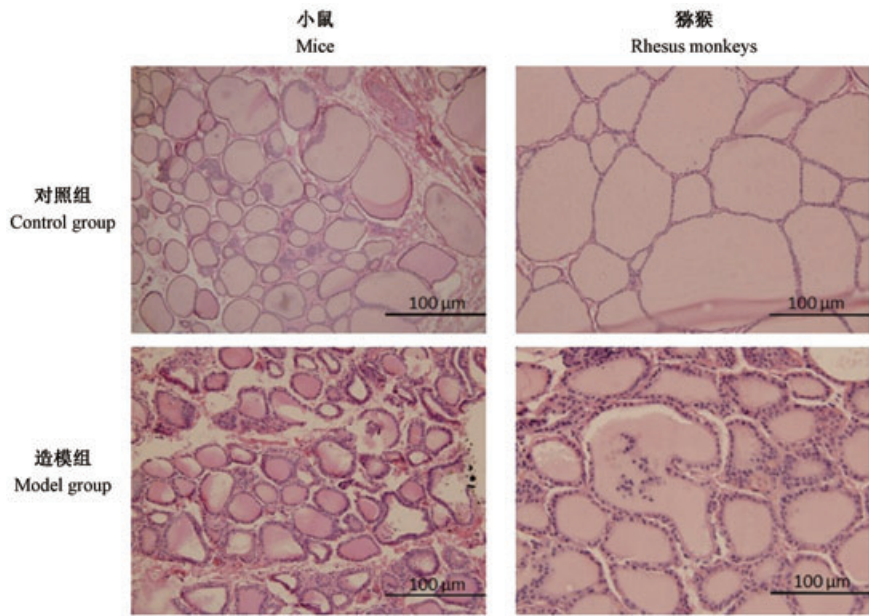


图 4 GD 小鼠及 GD 猕猴甲状腺病理切片

Figure 4 Pathological sections of thyroid gland of GD mice and GD rhesus monkeys

(0.9 ± 0.3)% 和 (0.6 ± 0.2)%, 显著低于对照组的 (1.3 ± 0.1)% 和 (2.3 ± 0.5)% (图 5B, $P < 0.05$)。但 CD4+IL-17+ Th17 细胞在造模猕猴和对照猕猴中差异无显著性 (图 5B, $P > 0.05$)。

2.6 GD 小鼠及 GD 猕猴肝病理

GD 小鼠和猕猴身体机能处于稳定状态。造模组与对照组小鼠、猕猴的肝在光镜下未发现炎症或其他病理学改变, 包括细胞水肿或坏死等。(图 6)

3 讨论

理想的 GD 动物模型有以下特点: (1) 自发模型优于诱导的模型。但目前唯一的自发模型 TSHR/NOD.H2h4 转基因小鼠产生 TSAb 周期较长, 花费较高, 因此不方便广泛推广使用。(2) 可复制性。表

达 TSHR 的质粒诱导的 GD 模型目前在世界多个实验室可重复性较低^[5]。(3) GD 发病率高, 便于观察病因及协助新治疗。(4) 在多品系小鼠中可诱导 GD 发生。Shimojo 和 M12 模型都只能在易感品系诱导 GD。综合以上四点, 表达 TSHR A 亚单位的腺病毒诱导 GD 模型是目前被广泛认可, 且重复性最好的模型^[13]。

3.1 小鼠及猕猴 GD 模型的成功构建

本研究中, 通过注射表达 TSHR A 亚单位的重组腺病毒, 猕猴造模组 (注射 5 次) 和小鼠造模组 (注射 3 次) 均出现了 TRAb 阳性, 甲状腺激素水平升高和甲状腺组织显著增生等表现。此外, 猕猴造模组还出现了体重下降和静息心率增高等典型 GD 的临床症状, 小鼠造模组也出现了单位摄食量下的

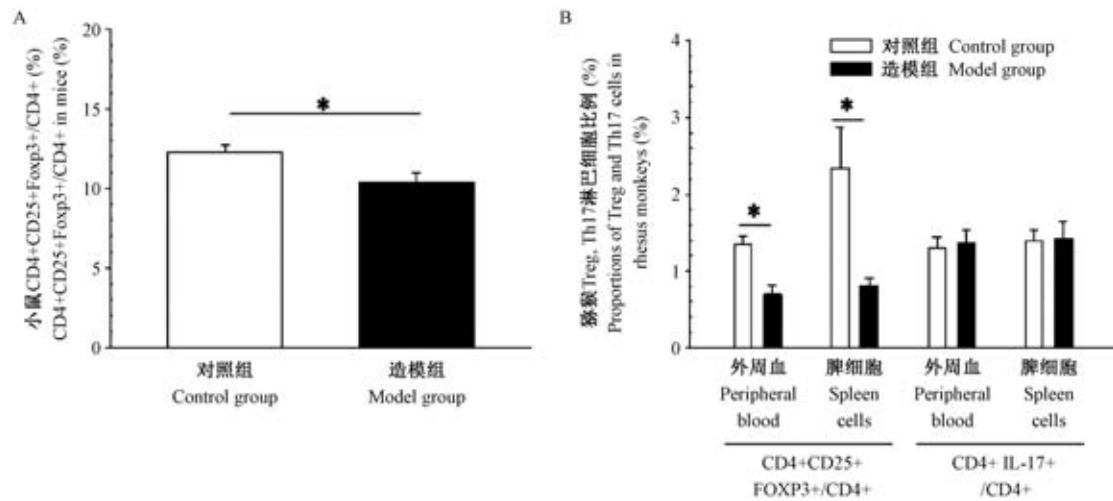


图5 GD小鼠及GD猕猴Treg细胞比例

Figure 5 Proportion of Treg cells in GD mice and GD rhesus monkeys

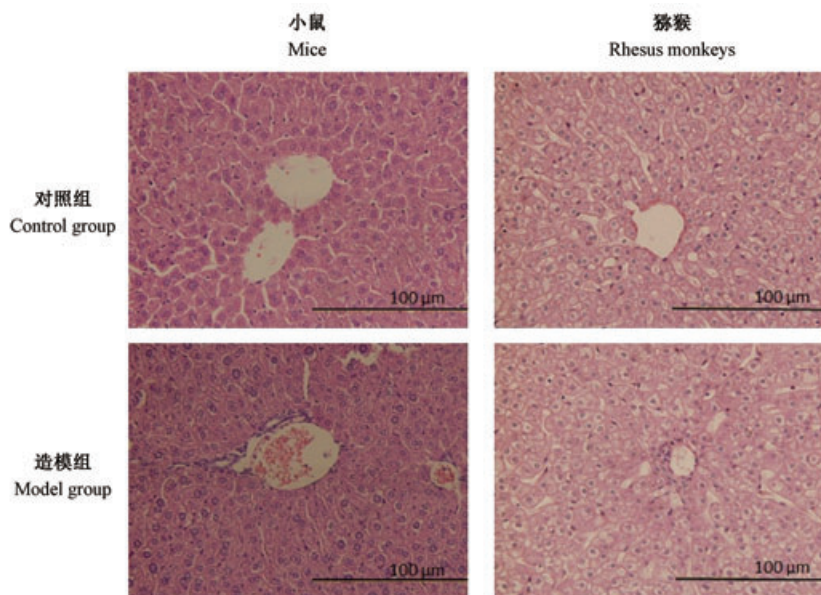


图6 GD小鼠及GD猕猴肝病病理切片

Figure 6 Liver pathological sections of GD mice and GD rhesus monkeys

体重增加显著下降。

值得注意的是,猕猴造模组的GD发生率是随着注射次数等增加逐渐增高的,在第3次免疫结束时,猕猴造模组的TT4升高率仅为16.7%,但是在第5次免疫结束时,猕猴造模组的TT4升高率达到了50%。我们未公布的数据显示,继续免疫下去,TT4升高率会继续增高。这一结果间接证明了TSHR是诱发GD最有力的抗原也说明在建立猕猴GD模型时,为了获得更高的GD发病率,可能需要延长免疫时间和增加免疫次数。

3.2 GD模型与Treg细胞的关系

Treg细胞是一类以免疫抑制功能为特点的T

淋巴细胞亚群^[14]。作为重要的免疫调节细胞,其在自身免疫性疾病的发病过程中起着核心的作用^[15]。叉头盒蛋白3(fork head box P3, Foxp3)是Treg细胞发育和功能的重要调节因子^[16]。本研究中,小鼠GD模型与猕猴GD模型均展现了CD4+CD25+Foxp3+的Treg细胞比例的显著降低,这一结果与之前报道的GD临床实验结果一致^[17-19]。这一现象再次佐证了Treg细胞可能与GD发病有关,而这两个动物模型都是未来研究Treg细胞与GD的发病关系和针对Treg细胞免疫疗法的良好工具。

3.3 小鼠及猕猴GD模型的比较

造模结束时,猕猴造模组的6只小鼠中有3只

出现了以上的现象(50%),而小鼠造模组的 8 只小鼠中有 6 只小鼠出现了以上的现象(75%),与报道的数据相符合^[6-7]。因此,小鼠造模组的 GD 发病率略高于猕猴组,但没有显著的统计学差异。但在相同注射次数(三次注射)下,猕猴造模组的 GD 发病率(16.7%)是显著低于小鼠造模组的($P < 0.05$)。这说明在相同的免疫时间和次数的情况下,小鼠 GD 模型的发病率更高。

与小鼠 GD 模型相比,猕猴 GD 模型会出现显著的与人类 GD 患者类似的临床表现,包括体重显著降低和静息心率的增加^[20-21]。另外,对比小鼠及猕猴的 TT4、TRAb 水平的数据可以看出,小鼠 TT4、TRAb 水平均显著高于猕猴,这也可能是因为种属不同而造成的生化差异,其中猕猴与人类的数据更为接近^[22-24]。

本研究中,在小鼠和猕猴模型造模时使用均为表达人 TSHRA 的腺病毒。事实上,在氨基酸水平上,人类和小鼠 TSHRs 的同源性约为 87%,而人类与猕猴 TSHRs 的同源性高达 97%。有研究证实,在流式细胞术检测小鼠 TSHR 时,人 α 亚基免疫诱导的抗体的交叉反应性较差^[25]。从造模机制的层面, GD 及并发症尤其是甲状腺功能亢进性心脏病(甲亢心),其发病机制是靶器官分布的 TSHR 受体与自身抗体的结合启动下游的反应导致,我们有理由推测,猕猴 GD 模型在复制人类 GD 及其并发症中更具说服力。

从模型的应用来看,小鼠 GD 模型具备造模时间短、场地要求不高及实验成本较低的优势,但对于更加深入的研究 GD 的发病机制、尤其是并发症的发病机制等还是有着不小的限制性。而猕猴 GD 模型从发病机制、临床表现、并发症层面及与人类 GD 患者更加相似,尤其为 GD 的并发症的研究提供了切实可行的有效途径及方案,随着大动物价格昂贵、饲养成本高、难以进行规模化等问题的逐渐被解决,其研究前景和应用前景将极为广阔^[10]。

综上所述,小鼠模型的 GD 发生率略高于猕猴模型,但是经过对基础生理生化指标和免疫相关指标的检测, GD 猕猴显示出更多的与人类 GD 患者类似的表现及机制。因此,我们应当根据实验需求及经费安排,选择适当的动物模型,从而更合理的完成预期目标。

参 考 文 献(References)

[1] Smith TJ, Hegedus L. Graves' Disease [J]. N Engl J Med,

2016, 375(16): 1552-1565.

[2] Franklyn JA, Boelaert K. Thyrotoxicosis [J]. Lancet, 2012, 379(9821): 1155-1166.

[3] Dagdelen S, Kong YC, Banga JP. Toward better models of hyperthyroid Graves' disease [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2009, 38(2): 343-354.

[4] 王悦, 伍丽萍, 施秉银. Graves 病动物模型研究进展 [J]. 医学综述, 2012, (10): 1455-8.

Wang Y, Wu LP, Shi BY. The research progress of Graves disease animal model [J]. Med Recapitulate, 2012, (10): 1455-1458.

[5] Nagayama Y. Animal models of Graves' hyperthyroidism [J]. Endocr J, 2005, 52(4): 385-394.

[6] Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, et al. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim [J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1897-1904.

[7] Chen CR, Hubbard PA, Salazar LM, et al. Crystal structure of a TSH receptor monoclonal antibody: Insight into Graves' disease pathogenesis [J]. Mol Endocrinol, 2015, 29(1): 99-107.

[8] Chazenbalk GD, Pichurin P, Chen CR, et al. Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor [J]. J Clin Invest, 2002, 110(2): 209-217.

[9] Rapoport B, Aliesky HA, Banuelos B, et al. A unique mouse strain that develops spontaneous, iodine-accelerated, pathogenic antibodies to the human thyrotrophin receptor [J]. J Immunol, 2015, 194(9): 4154-4161.

[10] 郑弘毅, 郑永唐. 非人灵长类动物: 免疫学基础研究到临床应用的桥 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(8): 1121-1130.

Zheng HY, Zheng YT. Nonhuman primates: connections from bench to bed in immunological researches [J]. Chin J Immunol, 2018, 34(8): 1121-1130.

[11] Wang Y, Zhao F, Rijntjes E, et al. Role of selenium intake for risk and development of hyperthyroidism [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(2): 568-580.

[12] Wang Y, Wu LP, Fu J, et al. Hyperthyroid monkeys: a nonhuman primate model of experimental Graves' disease [J]. J Endocrinol, 2013, 219(3): 183-193.

[13] Wiesweg B, Johnson KT, Eckstein AK, et al. Current insights into animal models of Graves' disease and orbitopathy [J]. Horm Metab Res, 2013, 45(8): 549-555.

[14] Shao S, Yu X, Shen L. Autoimmune thyroid diseases and Th17/Treg lymphocytes [J]. Life Sci, 2017, 192: 160-165.

[15] El Menshaw N, Eissa M, Abdeen HM, et al. CD58; leucocyte function adhesion-3 (LFA-3) could be used as a differentiating marker between immune and non-immune thyroid disorders [J]. Comp Clin Path, 2018, 27(3): 721-727.

[16] Bossowski A, Borysewicz-Sańczyk H, Wawrusiewicz-Kurylonek N, et al. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases [J]. Autoimmunity, 2014, 47(6): 395-400.

[17] McLachlan SM, Nagayama Y, Pichurin PN, et al. The link

- between Graves' disease and Hashimoto's Thyroiditis: A role for regulatory T cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148 (12): 5724-5733.
- [18] Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, et al. HLA-DR expressing peripheral T regulatory cells in newly diagnosed patients with different forms of autoimmune thyroid disease[J]. *Thyroid*, 2008, 18(11):1195-1200.
- [19] Mao CM, Wang S, Xiao YC, et al. Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease[J]. *J Immunol*, 2011, 186:4734-4743.
- [20] Kyriacou A, Kyriacou A, Makris KC, et al. Weight gain following treatment of hyperthyroidism-A forgotten tale[J]. *Clin Obes*, 2019, 9(5):e12328.
- [21] Witczak JK, Ubaysekara N, Ravindran R, et al. Significant cardiac disease complicating Graves' disease in previously healthy young adults[J]. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*, 2020, 2020:19-0132.
- [22] Hussain YS, Hookham JC, Allahabadia A, et al. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease-real life data[J]. *Endocrine*, 2017, 56(3): 568-578.
- [23] Bucci I, Giuliani C, Napolitano G. Thyroid-stimulating hormone receptor antibodies in pregnancy: clinical relevance [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8:137.
- [24] Hung CS, Chang LY, Sui HH, et al. Clinical and laboratory findings at initial diagnosis in pediatric Graves' disease in Taiwan[J]. *Acta Paediatr Taiwan*, 2006, 47(2):77-82.
- [25] Nakahara M, Mitsutake N, Sakamoto H, et al. Enhanced response to mouse thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor immunization in TSH receptor-knockout mice [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(8):4047-4054.

[收稿日期] 2020-02-24

崔玮,丁玲强,曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.

Cui W, Ding LQ, Zeng QY. Inhibitory effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 463-469.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.005

甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用

崔玮^{1,2}, 丁玲强^{1,2}, 曾巧英^{3*}

(1. 河西学院生命科学与工程学院, 甘肃 张掖 734000; 2. 河西学院实验动物中心, 甘肃 张掖 734000;
3. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探讨甘青虎耳草乙酸乙酯提取物(EtOAc extract from *Saxifraga taugutica*, EST)对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用。**方法** 体外实验用不同浓度 EST 处理 H22 细胞 48 h 后, AO/EB 双荧光染色, 激光共聚焦显微镜观察细胞形态变化; 用核酸电泳和流式细胞术检测 H22 细胞的凋亡情况。建立小鼠肝癌原位移植瘤模型进行体内实验, 对比 EST 低、中、高剂量组对荷瘤小鼠抑瘤率、T 淋巴细胞增殖能力以及肝病理变化的影响。**结果** EST 处理后 H22 细胞出现凋亡形态学变化, 且与浓度正相关; 核酸电泳呈凋亡特征性梯状带; 流式细胞分析, 500 $\mu\text{g/mL}$ 处理组凋亡率达 31%; 体内试验显示, EST 低、中、高剂量的抑瘤率分别为 33.0%、46.7%、64.3%; 显著提高小鼠的胸腺指数、T 淋巴细胞增殖能力 ($P < 0.05$); 组织学观察证明 EST 各剂量组癌细胞有不同程度的生长抑制, 形态固缩、向周围组织浸润减少。**结论** EST 可增强小鼠免疫功能和诱导肿瘤细胞凋亡, 具明显的抗肿瘤作用, 与剂量正相关。

【关键词】 甘青虎耳草; 乙酸乙酯提取物; 肝癌细胞; 原位移植瘤; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0463-07

Inhibitory effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors in mice

CUI Wei^{1,2}, DING Lingqiang^{1,2}, ZENG Qiaoying^{3*}

(1. College of Life Sciences and Engineering Hexi University, Zhangye 734000, China. 2. Laboratory Animal Center, Hexi University, Zhangye 734000. 3. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Corresponding author: ZENG Qiaoying. E-mail: zengqy@gsau.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of EtOAc extract from *Saxifraga taugutica* (EST) on carcinoma cells and orthotopic-transplanted tumors. **Methods** Murine cancer cells (H22 cells) were incubated with different concentrations of EST for 48 h *in vitro*. Morphological changes were examined by laser confocal microscopy after AO/EB double staining. Apoptosis of carcinoma cells was determined by DNA electrophoresis and flow cytometry. Orthotopic-transplanted tumors in mice were established *in vivo*. The tumor inhibition rate, thymus index, spleen index, and liver pathology were compared between low-dose, medium-dose, and high-dose groups. Results Apoptotic morphological changes of H22 cells were observed, with the level of apoptosis gradually increasing with increased EST concentration. DNA

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31860709), 甘肃省自然科学基金项目(18JR3RG207)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31860709), and National Natural Science Foundation of Gansu (18JR3RG207)。

【作者简介】 崔玮(1969—), 男, 博士研究生, 研究方向: 动物生理。Email: zhangyecw@163.com

【通信作者】 曾巧英, 女, 博士, 教授, 博士生导师。Email: zengqy@gsau.edu.cn

electrophoresis demonstrated a typical ladder pattern. Flow cytometry revealed that the apoptosis rate of H22 cells was 31% in the EST group with 500 $\mu\text{g/mL}$. *In vivo* experiments showed that the tumor inhibition rate was dose-dependent to some extent; the best tumor inhibition rate was 64.3% in the high dose group, followed by tumor inhibition rates of 46.7% in the medium dose group and 33% in the low dose group. Spleen and thymus indexes in the EST group was significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). Histological observation showed that the proliferation and invasion of cancer cells was inhibited to different degrees, and karyopyknosis of cancer cells was identified in the EST group. Conclusion EST could enhance the immune function of mice, induce apoptosis of tumor cells, and significantly inhibit the proliferation of carcinoma cells in a dose-dependent manner.

[Keywords] *Saxifraga taugutica*; EtOAc extract; hepatoma cells; orthotopic transplantation tumor; mice

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

甘青虎耳草 (*Saxifraga taugutica*) 是虎耳草科虎耳草属植物。为常用藏药, 藏药名松滴, 其味苦、性凉, 清热。常用于治疗急性中耳炎、风热咳嗽、大泡性鼓膜炎、风疹瘙痒等^[1]。研究证实, 甘青虎耳草中含有黄酮、多糖等生物活性物质, 其中, 乙酸乙酯提取物中槲皮素比较丰富^[2], 诸多研究表明, 槲皮素通过调节抑癌基因表达、阻断细胞周期、诱导细胞凋亡、干扰细胞信号传导、抑制血管生成、阻滞肿瘤细胞侵袭及转移等多种机制来发挥抗肿瘤作用, 对人前列腺癌、乳腺癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌等多种恶性肿瘤细胞均有抑制作用^[3-6]。肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高^[7], 目前有关甘青虎耳草对肝癌是否有影响的研究报道较少, 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物 (EtOAc extract from *Saxifraga taugutica*, EST) 对肝癌 H22 细胞和其肝原位移植瘤的抑制鲜有研究。为此, 本试验研究了 EST 对肝癌 H22 细胞和其肝原位移植瘤生长的影响, 旨在探讨甘青虎耳草在肝细胞癌治疗中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

小鼠 H22 肝癌细胞, 购自中国典型培养物保藏中心。

1.1.2 实验动物

6 周龄 SPF 级 KM 小鼠, 体重 18 ~ 22 g, 来源于甘肃中医药大学科研实验动物中心【SCXK(甘)2015-0002】, 在甘肃中医药大学科研实验动物中心进行实验【SYXK(甘)2015-0005】, 所有操作均符合甘肃中医药大学动物实验伦理学要求(审批号: 2018-310)。

1.1.3 试剂

细胞 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)

股份有限公司, 批号: B511375); 环磷酰胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: H58849); 丫啶橙(AO)(上海生工生物工程有限公司, 批号: 140810); 噻唑蓝(MTT)(上海源叶生物科技有限公司, 批号: YY11351); 多聚甲醛(Sigma 公司, 批号: 19J171120); 苏木精(天津光复化学试剂有限公司, 批号: 090408); 伊红(天津光复化学试剂有限公司, 批号: 75130319); RPMI-1640 培养基(Gibco 公司, 批号: AE2446298); 小牛血清(赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司, 批号: NYB0814)。

1.2 方法

1.2.1 EST 的制备

虎耳草→60℃ 烘干→粉碎→过筛(80 目)→石油醚浸泡(脱脂)→挥干→超声辅助乙醇回流提取(100 W)→合并粗提液→室温减压抽滤→滤液减压旋蒸→蒸馏水溶解→乙酸乙酯萃取→萃取液减压浓缩→冻干→蒸馏水溶解→AB-8 大孔树脂吸附→去离子水洗脱除杂→90% 乙醇洗脱→减压浓缩→异丙醇洗涤(2 次)→过滤→浓缩→甲醇除杂→冻干(棕黄色粉末)→甘青虎耳草提取物。

以芦丁作对照, 硝酸铝法测得甘青虎耳草提取物中黄酮的纯度为 82.07%。

1.2.2 EST 对 H22 瘤细胞的体外抑制试验

(1) H22 细胞的形态学观察

将生长旺盛的 H22 细胞以 5×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板, 置 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱培养 24 h, PBS 清洗一次, 加入含 EST 的培养液, 使其终浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$, 培养 48 h 后 1000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, PBS 洗两次, 收集细胞, 加入 100 μL PBS 重新悬浮细胞, 与 4 μL AO/EB 荧光染液混合(AO、EB 各含 100 $\mu\text{g/mL}$), 进行吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB) 双染色。30 s 后在激光共聚焦显

显微镜下观察药物作用于细胞后细胞的形态变化及细胞的凋亡情况^[8]。

(2) H22 细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

收集经 EST 0、20、40、100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 处理的 H22 细胞,用细胞 DNA 提取试剂盒提取 H22 细胞基因组 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪拍照。设 PBS 对照。

(3) 细胞凋亡率的检测

收集经 EST 0 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 处理的两组 H22 细胞,根据凋亡试剂盒的说明书用流式细胞仪检测分析。每个处理 3 个重复,设 PBS 阴性对照。

1.2.3 EST 对 H22 瘤细胞的体内抑制试验

(1) 小鼠 H22 肝癌细胞原位移植瘤模型的建立
依据参考文献^[9]的方法略作改进,取对数生长期的 H22 细胞,用生理盐水调整细胞密度(每毫升 2×10^6 个),腹腔注射到雄性 KM 小鼠体内,作为瘤源小鼠,取培养 1 周的瘤源小鼠腹水,离心(1000 r/min、10 min)收集 H22 细胞,生理盐水调整细胞密度($2 \times 10^7/\text{mL}$)制成细胞悬液;选取健康昆明种小鼠(雌雄各半)、麻醉、腹部手术、暴露肝,向肝内注入 10 μL H22 细胞悬液,棉签压迫止血、乙醇棉球擦拭,肝回纳腹腔,缝合伤口,小鼠肝癌细胞原位移植瘤模型建立完毕。另外,肝接种生理盐水代替 H22 细胞实施假移植。

(2) 动物的分组与处理

将肝癌原位移植瘤模型建立成功的小鼠随机分为:低剂量组、中剂量组、高剂量组、模型组和环磷酰胺组,每组 10 只,雌雄各半,假移植小鼠作为对照组(10 只,雌雄各半)。手术 24 h 后开始给药,低、中、高剂量组分别灌胃 50、100、200 mg/kg 的 EST 溶液,对照组、模型组灌胃生理盐水,环磷酰胺组按 20 mg/kg 腹腔注射环磷酰胺,各组均连续处理 14 d。

(3) 抑瘤率及脏器指数的测定

末次给药 12 h 后,脱颈处死小鼠,剖取肝、脾、胸腺,剥离肝肿瘤,计算抑瘤率和器官指数^[10]。

抑瘤率(%) = $[\text{模型组平均瘤重}(\text{g}) - \text{给药组平均瘤重}(\text{g})] / \text{模型组平均瘤重}(\text{g}) \times 100\%$

器官指数 = $\text{器官重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$

(4) T 淋巴细胞增殖功能的测定

试验动物的分组与处理同上,末次给药 12 h

后,脱颈处死小鼠,无菌取脾,制备脾细胞悬液,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液调整细胞密度为每毫升 2×10^6 。每份脾细胞悬液在 24 孔培养板中加 2 孔,每孔 1 mL,其中一孔加 50 μL ConA 液,另一孔不加 ConA 液作对照,细胞培养箱(37℃、5% CO_2)培养 44 h 时每孔弃去培养液 0.7 mL,重新加入不含小牛血清的 RPMI1640 培养液 0.7 mL,同时加入 MTT(5 mg/mL),每孔 50 μL ,细胞培养箱中继续培养 4 h 后每孔加入 1 mL 酸性异丙醇,吹打多次,5 min 后用全波长酶标仪测定 570 nm 下的 OD 值,以加 ConA 的吸光度值减去不加 ConA 的吸光度值表示 T 淋巴细胞增殖情况^[11]。

(5) 肝组织学检测

用 10% 福尔马林固定肝组织 24 h,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜 400 倍视野下观察肝组织形态学变化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 Excel 2016 进行统计学处理,用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均值比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具有显著性。

2 结果

2.1 EST 处理后 H22 细胞的形态学观察

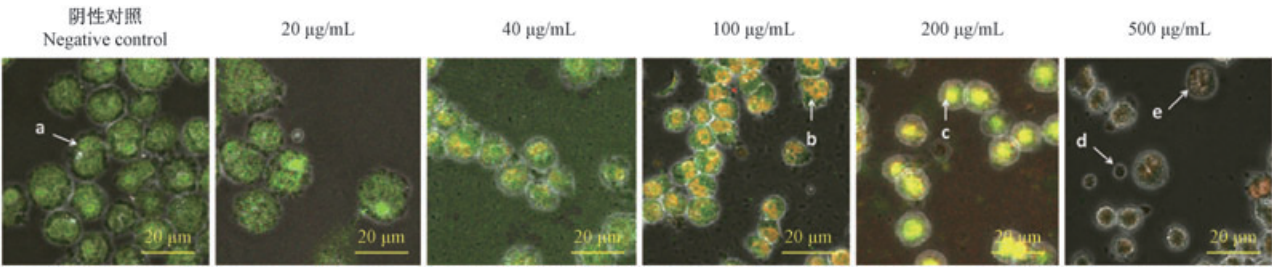
如图 1 所示,经 AO/EB 细胞染色,阴性对照细胞形态规则均一,着色均匀,外形较圆,仅被 AO 染色呈绿色;EST 处理细胞被 EB 染色,随浓度增加呈黄绿色直至橙红色,细胞膜皱缩、出芽、染色体固缩、边聚、碎裂等细胞凋亡特征,数量和程度与浓度正相关。

2.2 H22 细胞的基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

如图 2 所示,H22 细胞在不同浓度的 EST 处理 48 h 后,其 DNA 图谱在阴性对照(0 $\mu\text{g/mL}$)仅一条高分子质量条带;而其它浓度处理后均呈现典型的凋亡细胞特征性梯状条带,并随着 EST 浓度增加细胞凋亡特征性梯状条带越明显,200 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 处理组梯状条带最明显。

2.3 细胞凋亡率的检测

流式细胞仪分析表明,500 $\mu\text{g/mL}$ EST 对 H22 细胞作用 48 h,出现特征性的凋亡峰,即 AP 峰,凋亡率为 31%,而阴性对照(0 $\mu\text{g/mL}$)为 0.3%(图 3),两组间差异极显著($P < 0.01$)。



注:a:正常细胞;b:细胞核碎裂;c:细胞核固缩;d:凋亡小体;e:坏死细胞。

图 1 EST 作用 48 h 对 H22 肝癌细胞形态的影响

Note. a, Normal cell. b, Nuclear fragmentation. c, Nuclear shrinkage. d, Apoptotic body. e, Necrotic cells.

Figure 1 Effect of EST on the morphology of H22 hepatoma cells after 48 h treatment

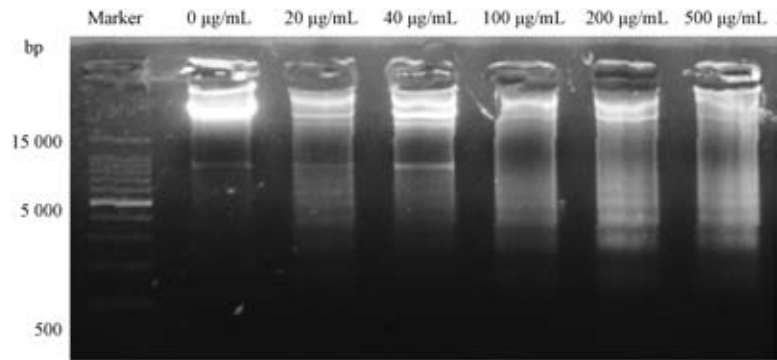


图 2 EST 对 H22 细胞作用的基因组 DNA 片段电泳分析

Figure 2 Electrophoretic analysis of genomic DNA fragments in H22 Cells by EST

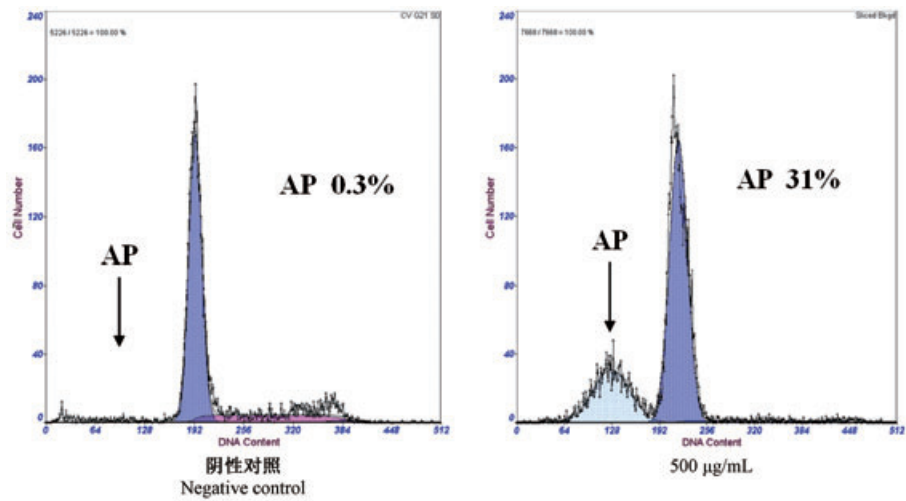


图 3 EST 对 H22 细胞作用的流式细胞分析图

Figure 3 Flow cytometric analysis of the effect of EST on H22 cells

2.4 EST 对小鼠 H22 肝癌的抑瘤效果

由图 4 可以看到,除对照组外,EST 各剂量组、模型组和环磷酸胺组小鼠的肝均有大小不同肿瘤,说明原位移植瘤模型的建立是成功的。

由表 1 可知,给药组平均瘤重显著低于模型组 ($P < 0.05$),且呈现出了一定的量效关系。高剂量组的抑瘤率为 64.3%,接近环磷酸胺组的 78.7%。

而根据国家药监局新药特药评审规定,抑瘤率达 30% 以上,就算作有效,即可作为新药开发。表明甘青虎耳草乙酸乙酯提取物在一定程度上能够明显抑制肝癌的生长。

2.5 EST 对小鼠免疫器官指数和 T 淋巴细胞增殖能力影响

由表 2 所示,与模型组比较,环磷酸胺组小鼠脾

指数和胸腺指数显著下降 ($P < 0.05$), 其与环磷酰胺强大的免疫抑制作用有关; 与环磷酰胺组比较, EST 高剂量组小鼠的脾指数和胸腺指数均显著升高 ($P < 0.05$), 提示该剂量甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠免疫系统毒副作用较低。

由表 2 也可看到, 与空白对照组比较, 模型组和环磷酰胺组小鼠 T 细胞增殖能力显著下降 ($P <$

0.05); 与模型组比较, EST 各剂量组小鼠 T 细胞增殖能力显著升高 ($P < 0.05$), 且具有剂量依赖趋势, 提示甘青虎耳草乙酸乙酯提取物能提升肝癌小鼠细胞免疫能力。

2.6 EST 对 H22 肝癌小鼠肝组织形态的影响

如图 5 所示, 对照组小鼠肝小叶结构清晰, 细胞排列整齐; 模型组小鼠表现为组织结构紊乱、肝小

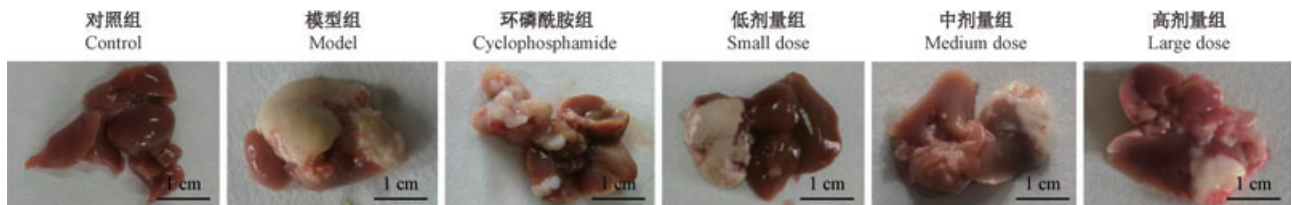


图 4 小鼠肝癌细胞原位移植瘤生长情况

Figure 4 Growth of orthotopic xenograft of mouse hepatoma cells

表 1 EST 对小鼠 H22 肝移植瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Inhibition of EST on H22 liver xenograft in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	平均瘤重 (g) Average weight (g)	抑瘤率 (%) Anti-tumor rate (%)
模型组 Model	1.280 ± 0.283 ^a	0
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	0.273 ± 0.057 ^b	78.7
低剂量组 Small dose	0.857 ± 0.108 ^c	33.0
中剂量组 Medium dose	0.683 ± 0.110 ^c	46.7
高剂量组 Large dose	0.456 ± 0.099 ^{bc}	64.3

注: 同列不同上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note. Significant difference ($P < 0.05$) were shown by the different superscript letters in the same line.

表 2 EST 对小鼠器官指数和 T 淋巴细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of EST on organ index and T lymphocyte proliferation in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	脾指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index	ΔOD
对照组 Control	4.112 ± 0.790 ^{ab}	2.816 ± 0.537 ^a	0.266 ± 0.032 ^a
模型组 Model	7.315 ± 0.387 ^d	1.039 ± 0.190 ^c	0.090 ± 0.004 ^b
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	2.705 ± 0.640 ^c	0.682 ± 0.188 ^b	0.070 ± 0.004 ^b
低剂量组 Small dose	3.388 ± 0.992 ^{ac}	0.945 ± 0.206 ^c	0.114 ± 0.017 ^c
中剂量组 Medium dose	3.492 ± 0.711 ^{ac}	1.261 ± 0.281 ^{cd}	0.147 ± 0.023 ^d
高剂量组 Large dose	5.221 ± 1.461 ^b	1.564 ± 0.459 ^d	0.216 ± 0.010 ^e

注: 同列不同上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note. Significant difference ($P < 0.05$) were shown by the different superscript letters in the same line.

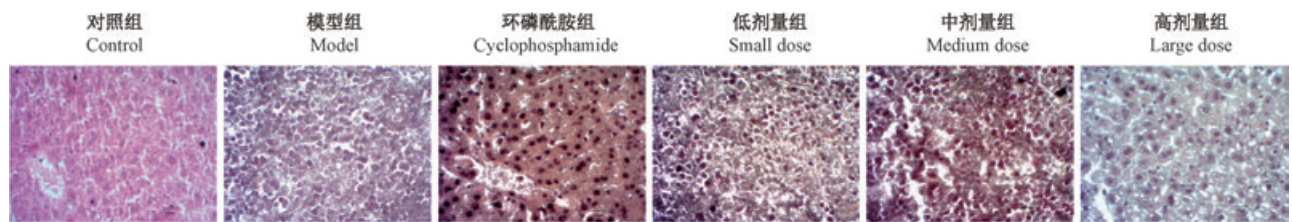


图 5 肝癌小鼠肝组织 HE 染色结果 ($\times 400$, 标尺 = 20 μm)

Figure 5 HE staining results of liver tissues of mice with liver cancer ($\times 400$, Bar = 20 μm)

叶消失、汇管区消失、细胞密度增加、细胞增生、细胞异型性明显,表现出炎症反应、癌变等特性;EST 各治疗组癌细胞有不同程度的生长抑制,主要表现为癌细胞固缩,癌细胞向周围肝组织浸润减少。

3 讨论

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,具有治愈率低、致死率高等特点,对人类的生命健康构成严重威胁。当前在对肿瘤患者实施临床治疗时,主要应用顺铂、环磷酰胺等化疗药物,虽然有很明显的抑制肿瘤作用,但是其毒副作用很大,表现为破坏机体免疫力、抗氧化能力和肝损伤等^[12]。近年来,研究发现很多传统中药在治疗恶性肿瘤方面具有毒副作用小,可以提高肿瘤患者的生存质量,在恶性肿瘤治疗方面有广阔的应用前景^[13]。甘青虎耳草是有抗炎、抗氧化作用的常用藏药。近年研究发现,同属植物虎耳草具有抑制前列腺增生、提升 Lewis 肺癌移植瘤小鼠抗氧化能力以及促进肿瘤细胞的凋亡,且显示出有效、低毒的优点^[14]。但甘青虎耳草及其活性成分在肿瘤治疗方面的研究未见报道,因此,我们课题组设计试验,用乙酸乙酯提取甘青虎耳草黄酮,研究其体外对小鼠 H22 肝癌细胞的抑制作用以及体内对小鼠肝癌原位移植瘤的抑制作用。

结果显示,EST 在体外能够诱导 H22 细胞的凋亡,且凋亡程度与 EST 浓度相关,浓度越大,H22 细胞凋亡程度越大。

体内实验表明,EST 各剂量组在小鼠体内都能达到抑瘤的效果,其中高剂量(200 mg/kg)对小鼠 H22 肝癌移植瘤的抑瘤率达到 64.3%,具有显著的生长抑制作用;肿瘤组织病理学观察结果也显示,EST 使肝癌细胞生长受到抑制,癌细胞向肝组织浸润程度减轻,进一步表明 EST 可以抑制肝癌生长。

肿瘤的发生、发展与机体的免疫功能有关,研究发现,肿瘤患者免疫功能明显低下,表现为胸腺严重萎缩,T、B 细胞增殖力下降,T 淋巴细胞总数、T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺和 CD4⁺/CD8⁺比值均明显低低下,提示癌症患者机体免疫抑制是导致肿瘤无限制增长和免疫逃避的一个重要因素^[15-16]。本试验体内实验结果显示,EST 能提升肝癌小鼠 T 细胞增殖能力和胸腺指数,对荷瘤小鼠免疫力低下有一定的改善作用,表明甘青虎耳草乙酸乙酯提取物可以有效增强肝癌小鼠的免疫功能,提高机体免疫

力,从而发挥抗肿瘤的作用。

综上所述,甘青虎耳草乙酸乙酯提取物中主要的活性物质—黄酮类物质,具有明显的体内外抗肝肿瘤活性,其作用机制可能与其增强机体免疫力促进肝癌细胞凋亡有关。但甘青虎耳草乙酸乙酯提取物是如何激活机体免疫调节还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 西北高原生物所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1991: 107.
The Northwest Plateau Institute of Biology edita. Tibetan Medicine Records[M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991: 107.
- [2] 杨爱梅, 李玉兰. 藏药甘青虎耳草化学成分研究[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报) [J]. 2011, 26(9): 1975-1977.
Yang AM, Li YL. Study on chemical composition from Tibetan herbal medicine *Saxifraga tangutica*[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26(9): 1975-1977.
- [3] Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(5): 647-659.
- [4] 徐浩, 高艺璇, 王向涛. 槲皮素磺酸化衍生物合成及其体内外抗肿瘤研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1945-1950.
Xu H, Gao YX, Wang XT. Antitumor efficacy of quercetin sulfonic acid[J]. Drug Eval Res, 2018, 41(11): 1945-1950.
- [5] 孙涓, 余世春. 槲皮素的研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 85-88.
Sun J, Yu SC. Research progress of Quercetin[J]. Res Pract Chin Med, 2011, 25(3): 85-88.
- [6] 杨扬, 郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1468-1475.
Yang Y, Guo J. Research progress on active quercetin derivatives with antitumor effect[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(6): 1468-1475.
- [7] Mise Y, Sakamoto Y, Ishizawa T, et al. A worldwide survey of the current daily practice in liver surgery[J]. Liver Cancer, 2013, 2(1): 55-66.
- [8] Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS, et al. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death--study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL60[J]. Anal Cell Pathol, 1999, 19(3-4): 139-151.
- [9] 赵方, 胡明道, 陈鹏. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及其研究意义[J]. 现代肿瘤医, 2017, 25(18): 2883-2885.
Zhao F, Hu MD, Chen P. Establishment of orthotopic transplantation model of mice liver cancer and its significance[J]. Mod Oncol, 2017, 25(18): 2883-2885.
- [10] 李晓娟, 白云峰, 王睿林, 等. 扶正化积方剂对 H22 肝癌小鼠抑瘤的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(11): 42-45.

- Li XJ, Bai YF, Wang RL, et al. Experimental study of Fuzheng Huaji decoction inhibition effect on H22 tumor bearing mice[J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(11): 42-45.
- [11] 李秀娟, 刘福英, 毛宇湘, 等. 复肝春 6 号对荷 H22 小鼠抑瘤作用的实验研究[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(2): 107-110.
- Li XJ, Liu FY, Mao YX, et al. Anti-tumor effect of Fuganchun 6 on H22 tumor-bearing mice[J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(2): 107-110.
- [12] 苏海刚. 肿瘤化疗药物应用中的不良反应及影响因素[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(9): 108-109.
- Su HG. Adverse reactions and influencing factors in application of tumor chemotherapy drugs[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2017, 11(9): 108-109.
- [13] 杨绍梅, 张娜. 肝癌治疗药物的研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(2): 93-98.
- Yang SM, Zhang N. Research progress of hepatocellular carcinoma chemotherapy[J]. Chin J New Drugs Clin Remed, 2015, 34(2): 93-98.
- [14] 刘东. 虎耳草及其主要活性成分以及对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抗肿瘤作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
- Liu D. *Saxifraga stolonifera* and its main bioactives and their anti-tumor effects on Lewis lung carcinoma-bearing mice [D]. Suzhou: Soochow University, 2017.
- [15] 余琪, 毛培江, 姜建民, 等. 4 种药用石斛对增强小鼠免疫功能效果的比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(2): 191-195.
- Yu Q, Mao PJ, Jiang JM, et al. Comparison of the effects of four medicinal species of dendrobium on improving immunological functions on mice[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(2): 191-195.
- [16] 张景豪, 郑超, 周振华, 等. 免疫细胞与肝细胞癌关系的研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(36): 24-27.
- Zhagn JH, Zheng C, Zhou ZH, et al. Research progress of relationship the between immune cells and hepato-cellular carcinoma[J]. Chin Med Herald, 2018, 15(36): 24-27.

[收稿日期] 2020-02-20

王子,王雪峰,吴振起. 清肺透邪汤介导 NLRP3 炎性小体抑制 NF- κ B 信号通路改善肺炎支原体小鼠炎性反应[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 470-477.

Wang Z, Wang XF, Wu ZQ. Qingfei Touxie decoction mediates NLRP3 inflammasome inhibition of the NF- κ B signaling pathway and improves inflammatory responses in mice with *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 470-477.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.006

清肺透邪汤介导 NLRP3 炎性小体抑制 NF- κ B 信号通路改善肺炎支原体小鼠炎性反应

王子¹, 王雪峰^{2*}, 吴振起²

(1. 辽宁中医药大学研究生学院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

【摘要】 目的 探讨清肺透邪汤对肺炎支原体肺炎(MPP)小鼠的治疗作用及其作用机制。**方法** 40只雄性SPF级BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组、清肺透邪汤低、中及高剂量组,每组8只。利用鼻腔滴注肺炎支原体菌液(MP)的方法建立肺炎支原体肺炎小鼠模型,模型组小鼠灌服生理盐水,清肺透邪汤低、中、高剂量组小鼠分别按200、400、800 mg/kg体重每天剂量灌服清肺透邪汤混悬液。治疗两周后,计算小鼠肺组织指数;HE染色检测肺组织病理改变;TUNEL检测小鼠肺内细胞凋亡情况;ELISA检测各小鼠肺泡灌洗液中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18含量;qPCR检测肺组织中NLRP3、MyD88及NF- κ B mRNA的表达;Western Blot检测肺组织中NLRP3、MyD88及p-NF- κ B蛋白的表达。**结果** 清肺透邪汤显著降低MPP小鼠肺指数,减轻肺病理损伤和细胞凋亡率($P < 0.05$);清肺透邪汤还可显著降低肺泡灌洗液中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18水平($P < 0.05$);并降低NLRP3、MyD88和NF- κ B mRNA和蛋白表达($P < 0.05$)。**结论** 清肺透邪汤改善肺炎支原体肺炎小鼠肺损伤,其作用机制可能与抑制NLRP3炎性小体及NF- κ B信号通路有关。

【关键词】 清肺透邪汤;肺炎支原体肺炎;炎性小体;NLRP3

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0470-08

Qingfei Touxie decoction mediates NLRP3 inflammasome inhibition of the NF- κ B signaling pathway and improves inflammatory responses in mice with *Mycoplasma pneumoniae*

WANG Zi¹, WANG Xuefeng^{2*}, WU Zhenqi²

(1. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China.

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032)

Corresponding author: WANG Xuefeng. E-mail: lnzywxf@163.com

【Abstract】 Objective To explore the therapeutic effect and mechanism of Qingfei Touxie decoction on mice with *Mycoplasma pneumoniae* (MP). **Methods** Forty male specific-pathogen-free BALB/c mice were randomly divided into the control, model, low-dose, medium-dose, and high-dose Qingfei Touxie decoction groups, with $n = 8$ mice per group. A mouse model of MPP was established via nasal instillation of solution containing MP. Mice in the model and control groups received 0.9% saline solution by oral gavage, and mice in the Qingfei Touxie decoction (QFTXT)-treated groups received QFTXT at low (200 mg/kg body weight), medium (400 mg/kg body weight) and high (800 mg/kg body weight) doses

[基金项目] 国家自然科学基金(81774363, 81973907)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81774363, 81973907).

[作者简介] 王子(1985—),女,在读博士研究生,研究方向:中医儿科学。Email:wangzi52617@163.com

[通信作者] 王雪峰(1957—),女,教授,主任医师,博士,主要研究方向:中医药干预感染性疾病。Email:lnzywxf@163.com

daily. After 2 weeks of treatment, the lung tissue indices of the mice were calculated, and the pathological changes in the lung tissue were observed via hematoxylin and eosin staining. Apoptosis in the mouse lung cells was detected via TUNEL staining, and the interleukin (IL)-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-18 levels were detected using enzyme-linked immunosorbent assays. NLRP3, MyD88 and NF- κ B mRNA expressions in the lung tissue were detected using qPCR, and the NLRP3, MyD88 and p-NF- κ B protein expressions in the lung tissue were detected via western blot. **Results** Qingfei Touxie decoction significantly reduced the lung indices of the MPP mice and reduced the lung pathological damage and apoptotic rates ($P < 0.05$). Qingfei Touxie decoction also significantly reduced the IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-18 levels ($P < 0.05$) and NLRP3, MyD88 and NF- κ B mRNA and protein expressions ($P < 0.05$). **Conclusions** Qingfei Touxie decoction attenuated lung injuries in mice with MP pneumonia, possibly by inhibiting NLRP3 inflammatory bodies and the NF- κ B signaling pathway.

【Keywords】 Qingfei Touxie decoction; mycoplasma pneumoniae pneumonia; inflammasome; NLRP3

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

肺炎支原体 (*mycoplasma pneumoniae*, MP) 是一种常见的可以引发儿童及青少年肺炎支原体肺炎 (*mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP) 的病原体, 该病多在秋冬季节流行, 患儿除具有肺部病征外, 重者还可出现多器官损害, 严重影响了儿童的健康。目前 MPP 发病机制尚不完全清楚, 但普遍认为与机体免疫功能异常有关^[1]。核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (NLRP3) 炎性小体和核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路是诱发炎症反应的重要通路。有研究表明, 肺炎支原体可被 NLRP3 识别, 触发机体固有免疫应答, 诱发炎症反应, 从而参与 MPP 的发生与发展^[2]。

近年来, MPP 发病率不断升高, 同时肺炎支原体对大环内酯类抗生素耐药性的不断扩大导致了难治性 MPP 的比例也逐渐升高。随着中医药的不断发展, 传统中医药治疗儿童肺炎支原体肺炎的优势逐步显现, 有研究表明, 应用中药方剂可以明显减轻临床症状并增强机体免疫力, 以防复发, 其即使长期服用中药制剂也无明显不良反应^[3]。清肺透邪汤是临床治疗肺炎支原体肺炎及病毒性肺炎的常用中药制剂, 由炙桑白皮、黄芩、石膏、麻黄、麦冬、虎杖、苏子、杏仁、桔梗组成, 具有清热化痰止咳之功效^[4]。本实验室前期研究表明清肺透邪汤可以明显抑制 MPP 小鼠的炎症反应, 但是其作用机制尚未报道^[5]。因此, 本研究旨在通过建立 MPP 小鼠模型, 观察清肺透邪汤对其治疗作用, 并且从 NLRP3 炎性小体和 NF- κ B 信号通路方面探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只, 体重 (20 ± 2) g, 购于辽宁长生生物有限公司【SCXK (辽) 2015-0001】, 实验在辽宁中医药大学实验动物中心屏障系统内进行【SYXK (辽) 2019-0004】。所有本研究中使用的实验方案由辽宁中医药大学动物管理委员会及动物福利伦理委员会批准, 严格按照 3R 原则进行动物饲养及实验, 项目批准号: 201711。

1.1.2 菌株

MP 标准株 FH 来自辽宁中医药大学附属医院病毒实验室, 由辽宁中医药大学附属医院儿科吴振起教授惠赠。将冻存的 MP 接种至液体培养基中, 在 37℃ 含 5% CO₂ 饱和氮的厌氧培养箱中孵育。当培养液由红变黄时进行连续传代, 取第 3 代 MP 菌液备用。以培养基由红色转变为黄色时的最高稀释浓度作为颜色改变单位 (color change unite, CCU), 采用 CCU/mL 方法测定 MP 浓度, 取 MP 菌液浓度 1×10^7 CCU/mL 备用。

1.1.3 清肺透邪汤

清肺透邪汤由炙桑白皮 9 g、黄芩 9 g、石膏 12 g、麻黄 6 g、麦冬 9 g、虎杖 9 g、苏子 9 g、杏仁 6 g、桔梗 9 g 组成, 中药由辽宁中医药大学附属医院门诊中草药局提供, 经辽宁中医药大学中药分析教研室李峰教授鉴定为正品, 辽宁中医药大学附属医院制剂室加工制成含生药 2 g/mL 的浓缩液, 用于后续实验。

1.1.4 试剂与仪器

IL-1 β (批号: 19010847 M)、TNF- α (批号: 19010880 M)、IL-6 (批号: 19010890 M)、IL-18 (批号: 19010896 M) ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司; HiScriptQ RT SuperMix for qPCR (批号: 7E272CB) 和 HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master

Mix(批号:7E380A9)购自诺唯赞生物科技有限公司;NLRP3、MyD88、NF- κ B 和 β -actin 引物由上海生工生物有限公司合成;NLRP3(19771-1-AP)、MyD88(23230-1-AP)、p-NF- κ B(14220-1-AP)和 β -actin(66009-1-AP)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

倒置荧光生物显微镜(NIB-100F,宁波永新光学股份有限公司),qPCR 仪(QuantStudio™ 3, Thermo scientific 公司),酶标仪(Mr-96 A,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),Western Blot 电泳槽与转膜仪(美国 Bio-rad 公司),凝胶成像系统(Gene Genius, UVP,上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肺炎支原体感染小鼠模型的建立及分组

按文献报道的方法建立肺炎支原体感染小鼠模型^[6],用乙醚将 40 只小鼠进行轻度麻醉,用 1 mL 注射器缓慢向每只小鼠的鼻腔中滴入 0.1 mL 的 MP 菌液(滴度为 1×10^7 CCU/mL),接种后将小鼠呈 45° 静置 30 s,以利于 MP 菌液的充分吸入并防止小鼠窒息,连续滴鼻 3 d,另取 8 只小鼠在同等条件下滴入等量生理盐水作为对照组。接种后观察记录各组小鼠的体重、进食、大便、活动度等情况的变化。随后将模型制备成功的小鼠随机分为模型组(MPP)、清肺透邪汤低剂量(200 mg/kg)组(QFTXTL)、中剂量组(400 mg/kg)组(QFTXTM)、高剂量(800 mg/kg)组(QFTXTH),每组 8 只。治疗组的小鼠按照剂量连续灌胃给药 2 周,每天 1 次,对照组(sham)及模型组给予等体积的蒸馏水。

1.2.2 样本的采集

处死各组小鼠,打开胸腔,用预冷的 PBS 对右肺进行支气管肺泡灌洗,回收肺泡灌洗液(BALF)3000 r/min 离心 15 min,吸取上清。随后取出肺组织一部分立即放入 4% 的多聚甲醛溶液中固定用于制备肺组织切片,另一部分置于液氮中冻存,用于 qPCR 及 Western Blot 检测。

1.2.3 MPP 小鼠肺指数计算

处死各组小鼠前称取每只小鼠的体重,处死后冰上快速取出各组小鼠的肺组织,滤纸吸去表面水分后称取肺组织重量。按下面公式计算肺指数:肺指数 = 肺重/体重 $\times$ 100%,得到各组小鼠的肺指数。

1.2.4 HE 染色检测各组小鼠肺组织病理变化

首先将各组小鼠肺切片放入苏木精液中染色 5 ~ 10 min;蒸馏水洗去染色液,1%盐酸乙醇 1 ~ 3 s,蒸馏水快速洗涤,伊红染色液染色 1 ~ 2 min,依次浸入 70%、80%、90%、100%乙醇中 10 s,浸入二甲苯中透明 5 min 后中性树胶进行封片,显微镜下观察并拍照^[7-8]。

1.2.5 TUNEL 法检测各组小鼠肺组织中细胞凋亡情况

各组小鼠肺组织中细胞凋亡的检测严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作。将切片置于倒置荧光显微镜下观察,并利用 Image J 软件进行计数分析。

1.2.6 ELISA 检测各组小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18 的含量

取肺泡灌洗液样品用酶联免疫吸附剂测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测样品中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。于酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度值,根据不同浓度标准品的 OD 值绘制标准曲线,得到回归方程,根据回归方程计算样品中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 水平。

1.2.7 qPCR 法检测各组小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88、NF- κ B 的 mRNA 水平

按 TRIzol 法提取各组小鼠肺组织 RNA,用分光光度计检测各组总 RNA 的纯度及纯度;按 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)所示比例将 mRNA 反转录成 cDNA,按 HiScript II One Step qRT-PCR SYBR Green Kit 所示比例构建 qPCR 反应,相关引物序列如表 1。反应条件:预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 10 s,退火 55℃ 30 s,扩增 40 个循环。以 U6 为内参,得到的结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

表 1 qPCR 引物列表

Table 1 qPCR primers

基因 Gene	项目 Item	引物 Primers(5' → 3')
NLRP3	F	ATTACCCGCCGAGAAAGG
	R	TGCGAGCAAAGA TCCACACAG
MyD88	F	AAAGGCTTCTCAGCCTCCTC
	R	ACTGCTCGAGCTGCTTACCA
NF- κ B	F	GGAGAAGCGCAAGAGAACTGA
	R	CGTAGGGAATGGCCGTCTTT
β -actin	F	TGATGGGTGTGAACACGAG
	R	GCCCTTCCACAATGCCAAAG

1.2.8 Western Blot 检测

提取各组小鼠肺组织蛋白,12 000 r/min 离心 15 min,使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量

分析,100℃加热 10 min 对蛋白进行变性,随后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,使用 PVDF 膜转膜,5% 脱脂奶粉封闭液封闭,TBST 洗膜,分别加入 β -actin、兔抗 NLRP3、MyD88、p-NF- κ B 及 β -actin 一抗(1:1000),4℃孵育过夜,TBST 洗膜,加入相应 HRP 标记二抗稀释浓度为 1:1000,室温避光孵育 1 h。TBST 洗膜,ECL 发光试剂盒发光,凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值,统计分析目的条带与内参蛋白条带光密度的比值。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 软件进行分析处理,作图采用 Graphpad 5.0 处理。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),多组间均数的比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用 LSD- t 法,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 清肺透邪汤对 MPP 小鼠外观表现及肺指数的影响

对照组小鼠观察期内精神状态良好,皮毛光泽,活动、呼吸及进食情况正常,体质量逐渐增加;而模型组小鼠精神状态变差,皮毛无光泽,活动减少,进食量减少,体质量增长速度减缓;清肺透邪汤治疗后,小鼠精神状态改善,活动量增多,进食量增加,体质量增长速度增加。

对照组小鼠取出的肺组织表面呈淡红色,无病理性瘀斑;模型组小鼠肺组织呈暗红色,表面可见大量的肺实变病灶,看见大量瘀点;而各个剂量清肺透邪汤治疗后的 MPP 小鼠肺组织的肺实变病灶明显

减少。各组的小鼠肺指数的结果如图 1 所示,与对照组相比,模型组小鼠肺指数显著升高($P < 0.05$);经过不同剂量清肺透邪汤治疗后,MPP 小鼠肺指数显著降低($P < 0.05$)。

2.2 清肺透邪汤改善 MPP 小鼠肺组织病理改变

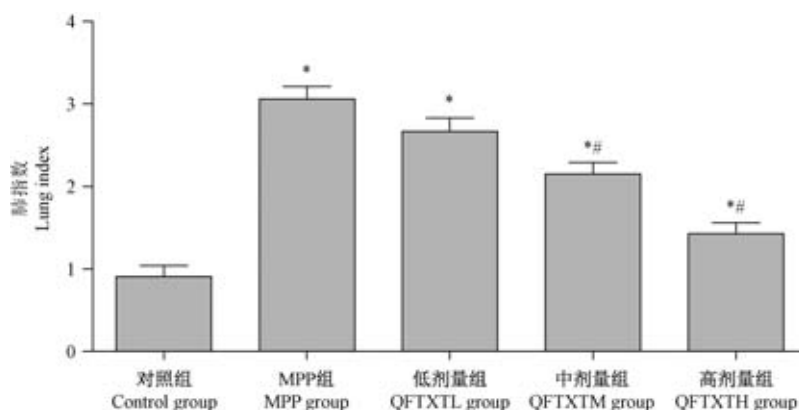
HE 染色结果如图 2 所示,对照组小鼠肺泡结构较为均匀与清晰,肺泡内无渗出,支气管和血管周围及肺泡间隔中偶见淋巴细胞和巨噬细胞浸润。模型小鼠肺组织中可见间质性炎症改变,肺泡内有渗出肺泡间隔增宽,在支气管和血管周围及肺泡间隔有大量的淋巴细胞和巨噬细胞浸润。而给予不同剂量清肺透邪汤治疗后的 MPP 小鼠肺组织炎症反应开始减轻,间质性炎症呈现轻度改变,肺泡间隔稍有增宽,淋巴细胞和巨噬细胞浸润在支气管和血管周围及肺泡间隔的浸润减少。

2.3 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织细胞凋亡

如图 3 所示,与对照组相比,模型组小鼠肺处细胞凋亡数显著增多($P < 0.05$);与模型组相比,不同剂量清肺透邪汤治疗组小鼠肺处细胞的凋亡数显著减少($P < 0.05$),说明清肺透邪汤可以抑制 MPP 小鼠肺组织中细胞凋亡。

2.4 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-18 的含量

如图 4 所示,与对照组相比,模型组肺泡灌洗液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 含量显著升高($P < 0.05$);给予清肺透邪汤治疗后的 MPP 小鼠肺泡灌洗液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 含量显著降低($P < 0.05$),说明清肺透邪汤能改善 MPP 小鼠肺组织中的炎症反应。



注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 清肺透邪汤对 MPP 小鼠肺指数影响

Note. Compared with control group,* $P < 0.05$. Compared with MPP group,# $P < 0.05$. (The same in the following Figures)

Figure 1 Effects of Qingfei Touxie decoction on lung index in MPP mice

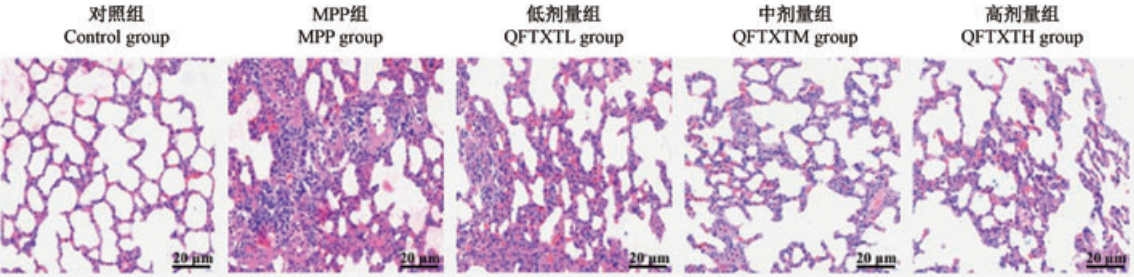


图 2 清肺透邪汤对 MPP 小鼠肺组织病理改变(HE 染色)

Figure 2 Effects of Qingfei Touxie decoction on pathological changes of lung tissue in MPP mice (HE staining)

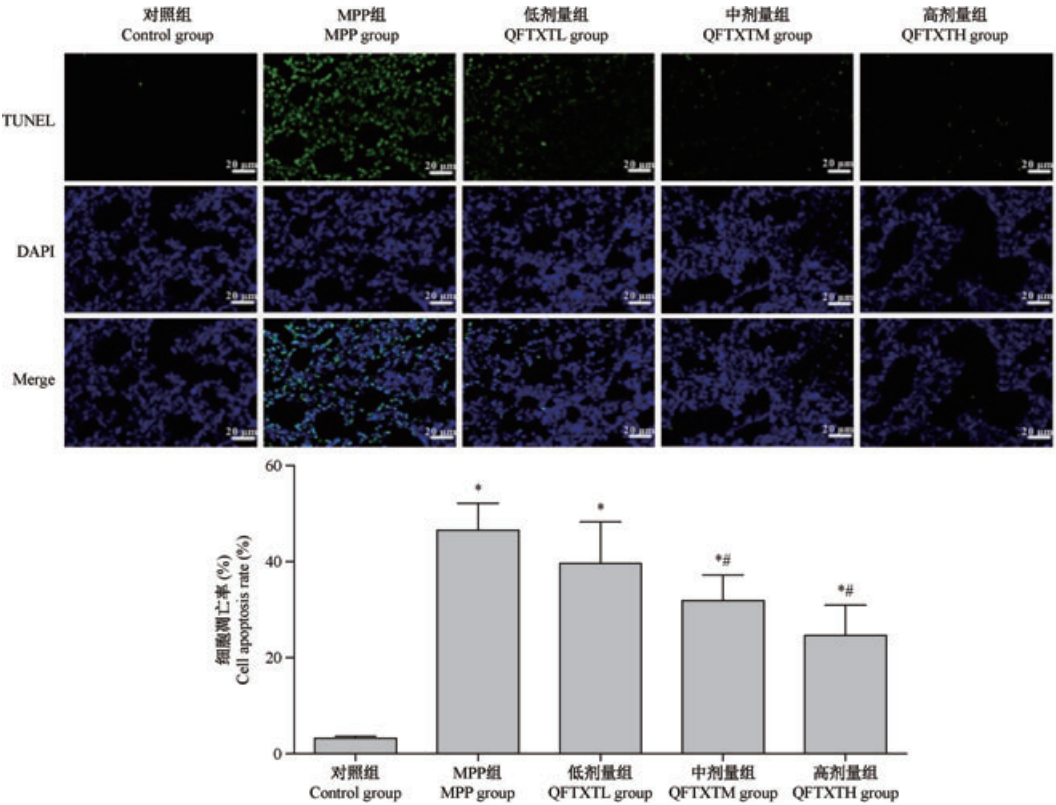


图 3 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织细胞凋亡影响(TUNEL 染色)

Figure 3 Effects of Qingfei Touxie decoction on apoptosis of lung tissue in MPP mice (TUNEL staining)

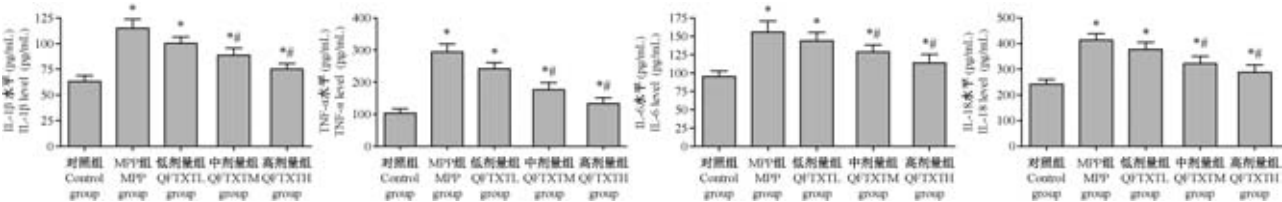


图 4 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺泡灌洗液中炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-18 的含量

Figure 4 Qingfei Touxie decoction reduced the content of inflammatory cytokines IL-1β, TNF-α, IL-6, and IL-18 in bronchoalveolar lavage fluid of MPP mice

2.5 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B 的 mRNA 的表达

为了探讨清肺透邪汤对 MPP 小鼠抗炎作用的机制,我们采用了 qPCR 法检测了 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B mRNA 的表达。结果如图 5 所示,与对照组相比,MPP 小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B mRNA 水平均显著升高($P < 0.05$);而经清肺透邪汤治疗后,MPP 小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B mRNA 水平明显降低($P < 0.05$)。

2.6 清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B 蛋白的表达

如图 6 显示,与对照组相比,模型组肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B 蛋白的表达显著升高($P <$

0.05);清肺透邪汤治疗后,肺组织中 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B 蛋白的表达显著降低($P < 0.05$),以上结果提示清肺透邪汤对 MPP 小鼠的治疗作用可能与抑制 NLRP3 炎症小体从而抑制炎症反应有关。

3 讨论

MPP 属于中医学“肺炎喘嗽”、“咳嗽”等范畴,归属于温病范畴。中医药由于其独特的优势在治疗 MPP 方面发挥了重要的作用。本实验室前期已经证实清燥救肺汤可明显抑制肺炎支原体感染小鼠肺部炎症因子的表达及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 的表达^[7-8]。传统中医学认为该病由

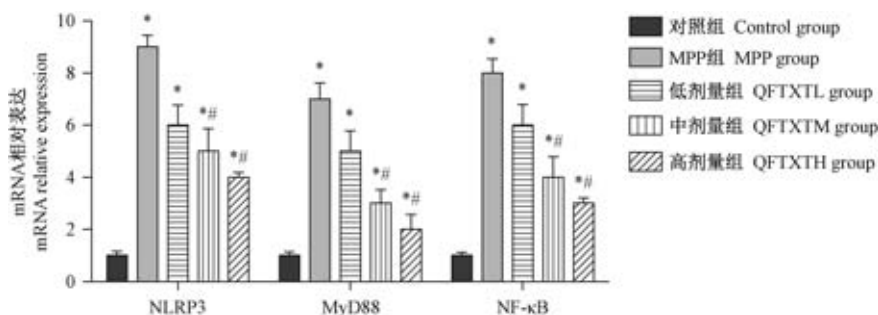


图 5 qRT-PCR 检测清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B mRNA 含量

Figure 5 Qingfei Touxie decoction reduced NLRP3, MyD88 and NF- κ B mRNA content in lung tissue of MPP mice as measured by qRT-PCR

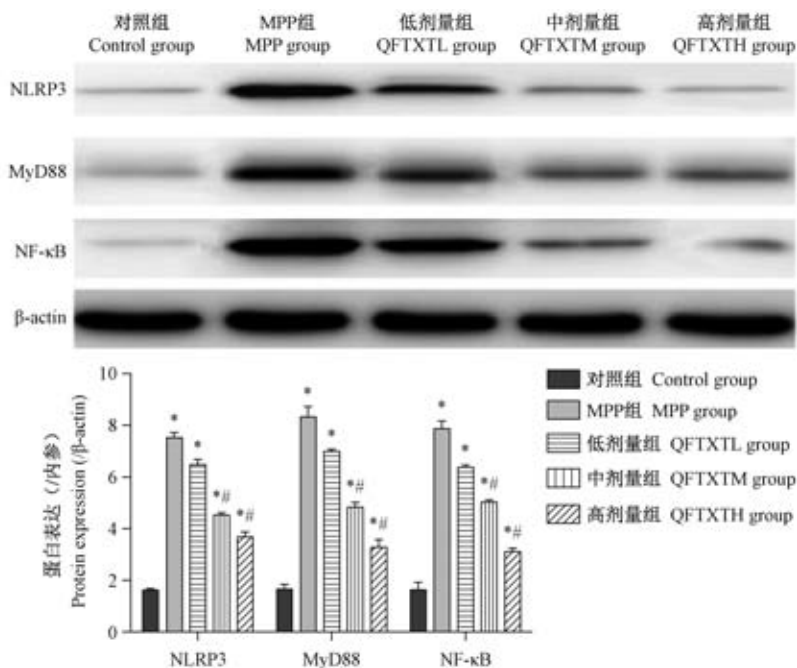


图 6 Western Blot 检测清肺透邪汤减少 MPP 小鼠肺组织 NLRP3、MyD88 及 NF- κ B 蛋白含量

Figure 6 Qingfei Touxie decoction reduced NLRP3, MyD88 and NF- κ B mRNA content in lung tissue of MPP mice as measured by Western Blot

于风温之邪侵袭肺卫,邪气蕴结于内而见邪热蕴肺证;其病机为风温之邪闭阻于肺,则肺失宣肃,肺络受损。因此提出“风温伏肺”理论,确立清肺透邪之法治疗小儿 MPP^[9]。清肺透邪汤具有清肺透邪、宣肺止咳之功效,组方以桑白皮、黄芩、石膏、麻黄为君药,桑白皮泻肺平喘,黄芩清热泻火解毒,石膏配麻黄清热宣肺;麦冬、虎杖为臣药,麦冬润肺止咳,虎杖解毒化痰止咳;杏仁、苏子止咳平喘,为佐药;桔梗宣肺去痰,引诸药上行于肺,为使药。本研究显示,我们利用鼻腔滴注 MP 菌液的方法建立 MPP 小鼠模型,发现模型组小鼠精神状态不佳,反应迟钝,呼吸频率加快,皮毛无光泽,自主活动减少,进食量减少,体质量增长速度减缓且肺部结构存在明显的病理学改变,表明 MP 感染可导致小鼠肺组织结构和功能损伤,说明 MPP 小鼠模型制备成功,可用于后续实验。而且给予不同剂量清肺透邪汤治疗后小鼠肺组织病理损伤明显减轻,肺指数降低,炎症细胞浸润及坏死程度减轻,且细胞凋亡数量明显减少,提示清肺透邪汤能够减轻 MP 诱导的肺组织损伤。

致病源过度激活免疫系统,诱导机体释放多种炎症因子,从而造成炎症反应,是 MPP 的发病机制之一。有研究表明,MPP 可诱导炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 等的释放^[10]。先前研究证明了 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 等炎症因子的表达水平与 MPP 的严重程度呈正比,则 MPP 越重,炎症因子的水平越高^[11]。本研究结果显示,模型组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 含量显著高于对照组,提示 MP 菌液可激活机体免疫炎症系统,诱导肺内炎症因子的大量表达并释放,而不同剂量清肺透邪汤治疗后小鼠 BALF 中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 及 IL-18 含量显著下降,说明清肺透邪汤能够抑制 MP 菌液诱导的炎症因子大量释放,抑制炎症反应。

NLRP3 炎性小体与 MPP 等多种病原体引起的呼吸系统感染有关,其激活的方式可能主要与溶酶体破裂方式、半通道方式及活性氧方式激活^[12]。活化的 NLRP3 通过其 N 端的热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 与 ASC 的 PYD 域相连,进而诱导 ASC 的胱天蛋白酶募集结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 招募 Caspase-1 形成 NLRP3 炎症复合体,可以使无活性的 pro-IL-1 β 加工成为有活性的 IL-1 β ,并分泌到细胞外参与 MPP 的炎症反应^[13]。此外,有研究表明,在 MPP 模型中,MP 可以与组织

细胞表面的 Toll 样受体 (TLRs) 结合,激活 NF- κ B 信号通路引发炎症反应。TLR4 在免疫炎症反应中发挥关键作用,是机体固有免疫反应中的上游关键因子,MyD88 是 TLRs 的接头蛋白,是 TLR4 的下游因子,在信号转导过程中发挥重要作用^[14]。TLR4 被激活后与 MyD88 相互作用,使其活化,并将信号传递给下游,后经激酶磷酸化激活 NF- κ B 通路,诱导炎症因子 TNF- α 、IL-6 等释放,从而参与 MPP 炎症反应^[15-16]。Segovia 等^[2]首次证实了 NLRP3 是 MP 感染过程中炎症和先天免疫细胞反应的重要调节因子。Chen 等^[17]证明了桑色素可通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻支原体肺炎。Liu 等^[18]也证实了金丝桃苷可通过抑制显著 NF- κ B 信号通路降低 MP 诱导的 IL-8 和 TNF- α 的表达,从而改善 MPP,以上研究说明 NLRP3 炎性小体与 NF- κ B 信号通路是调控 MPP 病理进程的潜在的有效靶点。因此本研究利用 Western Blot 检测肺组织中 NLRP3 炎性小体与 NF- κ B 信号通路相关蛋白的表达,结果显示,鼻腔滴注 MP 菌液后小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88、NF- κ B 基因和 NLRP3、MyD88、NF- κ B 蛋白表达含量显著增加,说明 NLRP3 炎性小体和 NF- κ B 信号通路参与了 MPP 的炎症反应,与文献报道一致^[2-3,17-18]。而给予清肺透邪汤可显著降低小鼠肺组织中 NLRP3、MyD88、NF- κ B 基因和 NLRP3、MyD88、NF- κ B 蛋白表达含量,说明清肺透邪汤抑制炎症因子释放,减轻炎症反应与抑制 NLRP3 炎性小体和 NF- κ B 信号通路有关。

综上所述,清肺透邪汤改善 MPP 小鼠的肺损伤,减轻炎症反应的机制可能与抑制 NLRP3 炎症小体和 NF- κ B 信号通路有关,为清肺透邪汤抗 MPP 作用机制的研究提供了理论和实验依据。本研究只是初步探讨了清肺透邪汤治疗 MPP 的可能机制,具体有效成分及具体分子作用机制仍需要进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Stein B, DeCredico N, Hillman L. Evaluation of the direct antiglobulin test (DAT) in the setting of mycoplasma pneumoniae infection[J]. JAMA, 2018, 319(13):1377-1378.
- [2] Segovia JA, Chang TH, Winter VT, et al. NLRP3 is a critical regulator of inflammation and innate immune cell response during mycoplasma pneumoniae infection[J]. Infect Immun, 2017, 86(1):548-552.
- [3] 张涵, 索绪斌, 张云凌, 等. 清热止咳方对肺炎支原体感染 BALB/c 小鼠 NLRP3 炎性小体 mRNA 表达的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(4):82-85.

- Zhang H, Suo XB, Zhang YL, et al. Effect of heat-clearing and anti-tussive prescription on expression of NLRP3 inflammasome mrna of BALB/c mice infected with mycoplasma pneumoniae[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med, 2018, 30(4): 82-85.
- [4] 丁晓娟, 张勇, 何东初, 等. 清肺透邪扶正方治疗新型冠状病毒肺炎的临床疗效及机制研究[J]. 医药导报, 2020, 39(5): 640-644.
- Ding XJ, Zhang Y, He DC, et al. Clinical effect and mechanism of Qingfei Touxie Fuzheng Recipe in the treatment of COVID-19[J]. Herald Med, 2020, 39(5): 640-644.
- [5] 张童, 王雪峰, 李庆焕. 清肺透邪方对 MPP 小鼠炎症因子 IL-10, IL-17 疗效机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(7): 37-41.
- Zhang T, Wang XF, Li QH. Research of therapeutic mechanism of Qingfei Touxie decoction on inflammatory factor IL-10 and IL-17 in MPP mice[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(7): 37-41.
- [6] Xiao Z, Jiang Y, Gao X, et al. Comparison of the ameliorative effects of Qingfei Tongluo formula and azithromycin on Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. J Nat Med, 2017, 71(4): 685-692.
- [7] 吴振起, 敏娜, 岳志军, 等. 清燥救肺汤及其分解剂对肺炎支原体感染小鼠肺部炎症相关因子的影响[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 120-127.
- Wu ZQ, Min N, Yue ZJ, et al. Effect of Qingzao Jiufei decoction and its decomposing agent on lung inflammation-related factors in mice infected with Mycoplasma pneumoniae[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(1): 120-127.
- [8] 吴振起, 杨璐, 敏娜, 等. 清燥救肺汤及其拆方对肺炎支原体感染小鼠 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白的影响[J]. 中草药, 2018, 49(2): 389-395.
- Wu ZQ, Yang L, Min N, et al. Effect of Qingzao Jiufei Decoction and its decomposing agent on MP infection Bax, Bcl-2, and Caspase-3[J]. Chin Tradit Herb Drug, 2018, 49(2): 389-395.
- [9] Wang J, Cheng W, Wang Z, et al. ATF3 inhibits the inflammation induced by Mycoplasma pneumonia *in vitro* and *in vivo*[J]. Pediatr Pulmonol, 2017, 52(9): 1163-1170.
- [10] Lin Y, Tan D, Kan Q, et al. The protective effect of naringenin on airway remodeling after mycoplasma pneumoniae infection by inhibiting autophagy-mediated lung inflammation and fibrosis[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 8753894.
- [11] Zoghail S, Kechichian E, Souaid K, et al. Triggers, clinical manifestations, and management of pediatric erythema multiforme: A systematic review[J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 81(3): 813-822.
- [12] Zhao Y, Ma G, Yang X. HDAC5 promotes Mycoplasma pneumoniae-induced inflammation in macrophages through NF- κ B activation[J]. Life Sci, 2019, 221(5): 13-19.
- [13] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- Yang GM, Hong SJ, Wang YH, et al. Progress of research in the regulation of Keap1/Nrf2/p62, NLRP3 inflammasome and autophagy[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 103-107.
- [14] 董丹, 王雪峰, 南春红, 等. 不同鼠龄小鼠甲型流感病毒 H1N1/FM1 株感染 TLR4-NF- κ B 信号通路改变比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12): 15-20.
- Dong D, Wang XF, Nan CH, et al. Comparison of the changes in TLR4-NF- κ B signaling pathway in infant and adult mice infected with influenza virus[J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(12): 15-20.
- [15] Liu AH, Wu YT, Wang YP. MicroRNA-129-5p inhibits the development of autoimmune encephalomyelitis-related epilepsy by targeting HMGB1 through the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Brain Res Bull, 2017, 132(8): 139-149.
- [16] Rashidian A, Muhammadnejad A, Dehpour AR, et al. Atorvastatin attenuates TNBS-induced rat colitis: the involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Inflammopharmacology, 2016, 24(3): 109-118.
- [17] Chen C, Wang J, Chen J, et al. Morusin alleviates mycoplasma pneumonia via the inhibition of Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling[J]. Biosci Rep, 2019, 39(6). pii: BSR20190190.
- [18] Liu F, Zhao Y, Lu J, et al. Hyperoside inhibits proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with Mycoplasma pneumoniae[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 453(1-2): 179-186.

[收稿日期] 2020-03-23

马全鑫,张利棕,郁晨,等. 高脂血症易感(WSHc)大鼠自发性后肢瘫痪的病症特点研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 478-485.

Ma QX, Zhang LZ, Yu C, et al. Study of the disease characteristics of spontaneous hindlimb paralysis in hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 478-485.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.007

高脂血症易感(WSHc)大鼠自发性后肢瘫痪的病症特点研究

马全鑫,张利棕,郁晨,戎亦骊,徐松涛,蔡月琴,沈利叶,陈民利*

(浙江中医药大学,动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察高脂血症易感(WSHc)大鼠种群中自发性后肢瘫痪大鼠的发病过程、病理特点,并初步研究其发病机制,探讨其应用与科研价值。**方法** 在本中心培育的WSHc大鼠种群中,取8只自发性后肢瘫痪大鼠与8只来自同一家族的同周龄无瘫痪症状的大鼠,分别饲喂普通饲料和高脂饲料,观察对高脂血症的易感性;利用磁共振成像和病理组织学观察后肢瘫痪大鼠不同部位的中枢神经病变,TUNEL免疫组化法观察细胞凋亡水平;利用RT-PCR检测不同部位的中枢神经系统Caspase-1和IL-1 β 基因的表达,并利用Western Blot法检测蛋白水平的表达。**结果** 后肢瘫痪的WSHc大鼠雌雄均可发病,对高脂饲料的敏感性与非后肢瘫痪的WSHc大鼠无显著差异,磁共振成像未见大脑及小脑存在显著性病变,病理组织学可见后肢瘫痪WSHc大鼠脊髓中后段大量炎症细胞浸润和TUNEL阳性表达,与非后肢瘫痪的WSHc大鼠比较,脊髓中后段Caspase-1与IL-1 β 基因的表达显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且蛋白表达亦显著升高($P < 0.05$)。**结论** 高脂血症易感WSHc大鼠自发性后肢瘫痪为进行性病变,其发病部位位于脊髓中后段,病理特征为炎症细胞浸润和神经元细胞变性凋亡,其发病机制可能与Caspase-1过度激活有关。

【关键词】 高脂血症易感大鼠,WSHc大鼠,自发性后肢瘫痪,动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0478-08

Study of the disease characteristics of spontaneous hindlimb paralysis in hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats

MA Quanxin, ZHANG Lizong, YU Chen, RONG Yili, XU Songtao, CAI Yueqin, SHEN Liye, CHEN Minli*

(Animal Experimental Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cml991@zcmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To elucidate the onset process and pathological characteristics of spontaneous hindlimb paralysis in a hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rat population, and to preliminarily study the pathogenesis mechanism. **Methods** In a WSHc rat population, eight spontaneous hindlimb paralysis rats and eight age-matched rats without paralysis symptoms from the same family were fed with normal chow or high-fat chow to examine their susceptibility to hyperlipidemia. Magnetic resonance imaging and histopathology were used to examine central neuropathy in different parts of hindlimb paralysis rats. TUNEL immunohistochemistry was used to detect apoptosis. The mRNA expression of Caspase-1 and IL-1 β in the central nervous system was determined by RT-PCR, and the corresponding protein expression was determined

【基金项目】 国家卫生计生委科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划项目(2016149056)。

Funded by National Health Planning Commission Scientific Research Fund-Zhejiang Medical and Health Major Science and Technology Plan Project (2016149056).

【作者简介】 马全鑫(1988—),男,实验师,研究方向:实验动物与中药药理。Email:mqx1025@hotmail.com

【通信作者】 陈民利(1963—),女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。Email:cml991@zcmu.edu.cn

by Western Blot. **Results** Both male and female WSHc rats with hindlimb paralysis developed the paralysis. The sensitivity to high-fat diet was not significantly different between WSHc rats with and without hindlimb paralysis. No significant lesions were observed in the brain and cerebellum by magnetic resonance imaging. Histopathology showed a large amount of inflammatory cell infiltration and TUNEL-positive staining in the middle and posterior spinal cord of hindlimb paralysis WSHc rats. Compared with the non-hindlimb paralysis WSHc rats, the mRNA and protein expression of Caspase-1 and IL-1 β in the middle and posterior spinal cord was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the hindlimb paralysis WSHc rats. **Conclusions** Spontaneous hindlimb paralysis of hyperlipidemia-susceptible WSHc rats is a progressive lesion, which occurs in the middle and posterior spinal cord and is pathologically featured by inflammatory cell infiltration, neuronal degeneration and apoptosis. This pathogenesis may be related to excessive activation of caspase-1.

【Keywords】 hyperlipidemia-susceptible rats; WSHc rats; spontaneous hindlimb paralysis; animal model

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

Wistar-SD 高脂血症易感 (Wistar-SD hyperlipidemia, WSHc) 大鼠是本动物实验研究中心发现并培育研究的一种特色实验动物品系。该品系雌性大鼠经高脂诱导后, 平均血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 水平可达 6.0 mmol/L 以上^[1]。经过筛选和繁育, 目前本中心已形成了具有一定规模, 遗传性状较稳定的封闭群。日前, 本课题组发现在封闭群中的一个繁殖家族的 WSHc 大鼠中, 有个别动物成年后会出现可遗传的自发性的后肢瘫痪, 雌雄均可发病。起初表现为步态不稳, 进行性地发展为后肢完全丧失活动能力, 但头部和前肢活动力不受影响, 可长时间存活, 类似于人类运动神经元疾病 (motor neuron diseases, MND) 的症状, 但其病理特点和发病机制尚不清楚。

现有的研究发现, MND 的病理特点往往伴随自由基损伤、炎症反应、细胞凋亡等基因表达和细胞代谢的改变^[2-3]。而半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase-1) 是炎症性反应中的关键因子, 触发其后一系列细胞、分子水平的反应, 导致细胞程序性死亡, 从而加重中枢神经损伤^[4-5]。基于此, 本研究选取具有自发性后肢瘫痪症状的 WSHc 大鼠, 观察该病症与高脂血症易感的相关性, 并通过影像学和病理组织学观察病变部位和病理特点, 从炎症和细胞程序性死亡的角度初步探讨该病症可能的发病机制, 为明确该模型发病的一般规律和病理特点提供实验依据, 并分析其应用与科学价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本课题组自繁殖 WSHc 大鼠 16 只, 雌雄各半, 其中 8 只为自发性后肢瘫痪, 8 只无瘫痪症状。饲

养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障实验室【SYXK(浙)2018-0012】, 环境温度 20 ~ 24℃, 相对湿度 50% ~ 70%, 早 7:00 至晚 19:00 明暗交替光照, 噪声 < 50 dB; 在 IVC 笼内饲养, 自由饮食。浙江中医药大学实验动物保护和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 审议通过, 决议编号: IACUC-20191216-08。

1.1.2 试剂与仪器

TC、三酰甘油 (triylglycerides, TG) 均购自上海申能德赛诊断技术有限公司; HE 染色试剂盒 (G1120-100), 购自索莱宝生物技术有限公司; TUNEL 免疫组化染色试剂盒 (12156792910), 购自上海罗氏诊断产品有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (9767)、反转录试剂盒 (RR037A)、TB Green RT-PCR 染料 (RR430A) 均购自大连宝生物有限公司; 总蛋白提取试剂盒 (KGM451), 购自南京凯基生物科技发展有限公司; 全自动微量蛋白定量分析测试板 (12-230 kDa), 购自上海普诺森生物科技公司; 使用以下抗体: anti-Caspase-1 (Santa Cruz, SC-56036)、anti-IL-1 β (Santa Cruz, SC-52012)、anti-GAPDH (Santa Cruz, SC-166545)。普通基础饲料购自南京爱立默科技有限公司, 辐照全营养颗粒饲料。高脂饲料配方: 胆固醇 1%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、3 号胆盐 0.5%、基础饲料 78.5%。

GE 3.0T 磁共振仪 (美国, 通用电气公司); 7020 全自动生化分析仪 (日本, 日立公司); RM2255 半自动石蜡切片机 (德国, Leica 公司); Autostainer XL 全自动染色机 (德国, Leica 公司); WES 全自动蛋白定量分析仪 (美国, Protein Simple 公司); Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (美国, Thermo Fisher 公司); 全自动数字切片扫描设备 (日本, 滨松公司)。

1.2 方法

1.2.1 自发性后肢瘫痪大鼠的发生率、一般体征和

血脂水平的观察

首次发现的一只后肢瘫痪雌性 WSHc 大鼠种鼠作为 F0 代, 将其与同一胎出生的雄性非后肢瘫痪 WSHc 大鼠进行近亲交配, 繁殖 2 胎, 记录出生仔鼠和断奶鼠的数量, 在 12 周龄时观察大鼠运动形态, 步态不稳的大鼠定义为发病大鼠。随后, 取两对步态不稳的雌雄大鼠 (F1 代) 进行近亲交配, 繁殖 1 胎, 记录出生仔鼠的数量、断奶鼠数量和发病的大鼠数量。取 8 只 12 ~ 14 周自发性后肢瘫痪大鼠 (F2 代) 与 8 只来自同一家族的同周龄无瘫痪症状的大鼠, 均为雌雄各半。随机分为 4 组, 即非后肢瘫痪 WSHc 大鼠 + 普通饲料 (NLP + SC)、非后肢瘫痪 WSHc 大鼠 + 高脂饲料 (NLP + HFD)、后肢瘫痪 WSHc 大鼠 + 普通饲料 (LP + SC)、瘫痪 WSHc 大鼠 + 高脂饲料 (LP + HFD)。分别饲喂不同饲料 4 周后, 检测空腹血脂。自断奶开始, 记录每周记录大鼠步态和体征。

1.2.2 大鼠脑磁共振成像

大鼠 45 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后行俯卧位, 采用磁共振扫描仪与大鼠颅脑部专用线圈, 对正常饲料饲喂的大鼠大脑和小脑进行常规 T2 冠状面扫描, MRI 序列如下: 重复时间为 2000 ms, 视野范围为 50 mm × 50 mm, 层厚为 5 mm, 回波时间为 36 ms, 翻转角为 90°, 矩阵 = 396 × 264, Bangwith 为 432.1 Hz, 序列扫描时间为 13 min。

1.2.3 脑与脊髓组织病理学观察

大鼠 45 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后, 使用冷的生理盐水灌注 5 min, 冲净血液, 再用 4% 多聚甲醛进行灌注 20 min, 小心地摘取大鼠小脑组织和脊髓 (上、中、下三段), 置于 10% 中性甲醛中固定。一周后取材, 经脱水包埋后制成蜡块, 4 μm 切片, 脱蜡、透明后, 行常规 HE 染色并封片, 使用数字病理切片扫描分析仪扫片, 观察各组大鼠小脑及各段脊髓的病理学变化。

1.2.4 脑与脊髓组织免疫组化观察

将小脑与脊髓组织的切片置于 60℃ 烘箱内烤片 2 h; 脱蜡, 使用高压锅热修复; 3% H₂O₂ 浸泡 15 min 使过氧化物酶猝灭; 蒸馏水冲洗, PBS 溶液洗三遍; 制备后的切片按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤进行操作, 染色完成后, 封片, 使用数字病理切片扫描分析仪扫片, 利用 NDP 软件进行阳性细胞比例分析。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测小脑和脊髓中 *IL-1β* 和 *Caspase-1* 基因的 mRNA 表达

使用总 RNA 提取试剂盒分别提取正常饲料饲喂的大鼠小脑、脊髓组织 RNA, 反转录成 cDNA 后待用,

查找大鼠 *IL-1β*、*Caspase-1* 和 *GAPDH* mRNA 序列, 设计各引物序列如下 (5' - 3'): *IL-1β*: F-GCCAACAA GTGGTATTCTCCA, R-CCGTCTTTTCATCACACAGGA; *Caspase-1*: F-ACCGAGTGCTCCCTCAAGT, R-GGCA AGACGTGTACGAGTGG; *GAPDH*: F-ATGCTGGTGCC GAGTATGTTGTG, R-GCAGAAGGTGCGGAGATGATG AC。使用 Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪进行 RT-PCR 反应。反应体系为 20 μL, 包括 1 μg cDNA 溶液 8 μL, 10 μL TB green 染料以及上下游引物各 1 μL。循环次数为 40 次, 反应条件按试剂盒说明书推荐条件进行。*GADPH* 内参基因内标对照, 并以非后肢瘫痪大鼠对应部位的表达量作为参照, 目的基因转录水平通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

1.2.6 Western Blot 检测 *IL-1β* 和 *Caspase-1* 的蛋白表达水平

取各组大鼠 50 mg 脊髓下段组织, 使用试剂盒提取总蛋白。蛋白样本经变性并调整浓度后, 在 WES 仪器上检测 *IL-1β* 和 *Caspase-1* 的表达水平, 以 *GAPDH* 作为内参蛋白。通过 ProteinSimple 软件 (版本 2.7.1) 进行可视化分析, 并计算蛋白质的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析与 *t* 检测, 所有数据使用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 自发性后肢瘫痪 WSHc 大鼠的发生率和一般体征

首次发现的一只后肢瘫痪雌性 WSHc 大鼠种鼠 (F0 代) 所生 25 个后代中 (F1 代, 14 ♀, 11 ♂), 有 7 只出现步态不稳的 (4 ♀, 3 ♂), 发病率为 28%。将两对步态不稳的雌雄大鼠进行近亲交配, 所生的 26 个后代 (F2 代, 15 ♀, 11 ♂) 中, 有 18 只出现步态不稳 (10 ♀, 8 ♂), 发病率为 69.2%。这 18 只大鼠中雌雄各取 4 只进行病理学研究, 剩余动物用于继续繁殖。

步态不稳的大鼠均表现为进行性后肢瘫痪。7 ~ 10 周龄时, 大鼠出现后肢支撑力不足, 行动速度下降, 16 ~ 20 周时发展为后肢无力, 仅可借助前肢爬行, 前肢和头部活动良好, 采食与饮水不受影响, 可长时间存活, 大体情况见图 1。

如表 1 所示, 无论是否瘫痪, 雌性 WSHc 大鼠经高脂饲料诱导后, 血清 TC 含量均显著提高 ($P < 0.01$), 而雄性 WSHc 大鼠经高脂诱导后血清 TC 含量有上升趋势, 但差异不具有显著性 ($P > 0.05$)。

与非后肢瘫痪 WSHc 大鼠相比,后肢瘫痪 WSHc 大鼠血脂差异不具有显著性($P>0.05$)。

2.2 自发性后肢瘫痪 WSHc 大鼠脑磁共振成像

非后肢瘫痪的大鼠与后肢瘫痪的大鼠颅脑的图像能均清楚区分大脑、中脑、桥脑、小脑和上段颈

髓等解剖结构。在 T2WI 上,大鼠脑组织的灰质与白质之间具有一定的对比度,高度髓鞘化的白质表现为低信号(黑色),脑室和脑池表现为高信号(白色),大脑新皮质、丘脑、海马、基底节等灰质结构呈灰色,均未见显著形态学差异。(见图 2)



图 1 非后肢瘫痪的大鼠与后肢瘫痪的大鼠大体观察

Figure 1 Gross observation of rats without hindlimb paralysis (NLP) and rats with hindlimb paralysis (LP)

表 1 各组大鼠不同饲料饲喂 4 周后血清 TC 的变化 (mmol/L)

Table 1 Changes of serum TC in rats fed with different diets for 4 weeks (mmol/L)

组别 Groups	普通饲料 Standard chows		高脂饲料 High fat diet	
	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male
非后肢瘫痪 WSHc 大鼠 NLP WSHc rats	2.16 ± 0.23	2.21 ± 0.34	7.34 ± 1.53 ^{##}	3.03 ± 0.42
后肢瘫痪 WSHc 大鼠 LP WSHc rats	1.95 ± 0.19	2.02 ± 0.29	8.63 ± 1.89 ^{##}	3.24 ± 0.64

注:与对应的普通饲料大鼠比较,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with standard chows group,^{##} $P<0.01$.

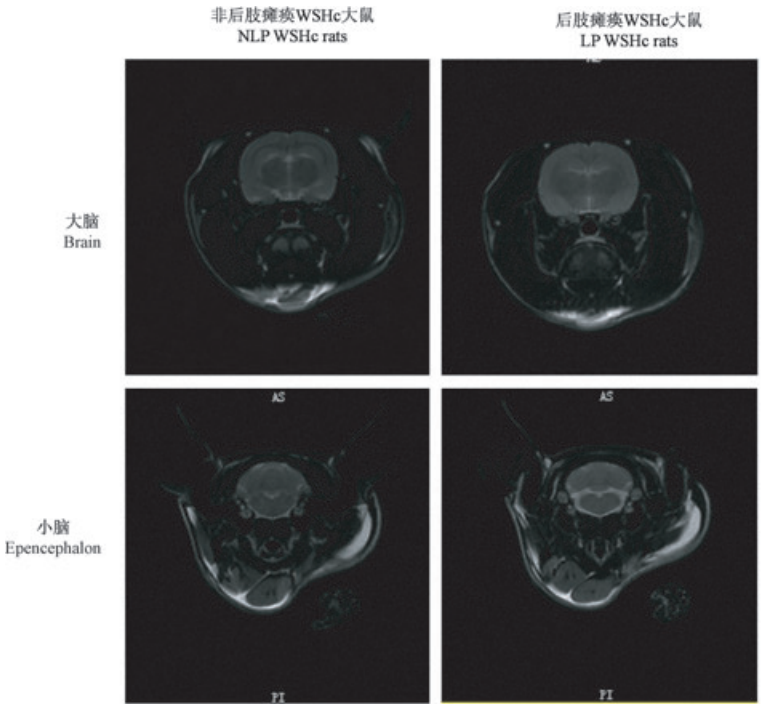


图 2 非后肢瘫痪的大鼠与后肢瘫痪的大鼠脑磁共振成像

Figure 2 Brain magnetic resonance imaging (MRI) of rats without hindlimb paralysis and rats with hindlimb paralysis

2.3 自发性后肢瘫痪 WSHc 大鼠小脑与脊髓一般病理学变化

非后肢瘫痪大鼠小脑、脊髓上、中、下段以及后肢瘫痪大鼠的小脑、脊髓上段均未见炎症细胞细胞浸润,未见组织水肿、出血、坏死等异常状态。后肢瘫痪大鼠脊髓中段和下段可见大量空泡形成;神经元细胞排列松散,形态改变,出现核固缩与核左移;可见大量炎症细胞浸润,尤其与脊髓下段更为严重。(见图 3)

2.4 自发性后肢瘫痪 WSHc 大鼠小脑与脊髓细胞凋亡情况

非后肢瘫痪大鼠小脑、脊髓上、中、下段以及后肢瘫痪大鼠的小脑、脊髓上段褐色阳性着色较少,而瘫痪大鼠脊髓中段和下段可见大量阳性染色,神经元细胞大量凋亡,经定量分析后可见,瘫痪大鼠脊髓中段和下段细胞凋亡比例显著上升($P < 0.05$)。(见图 4)

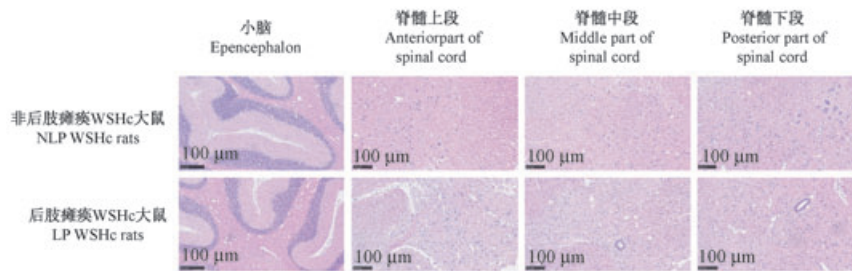
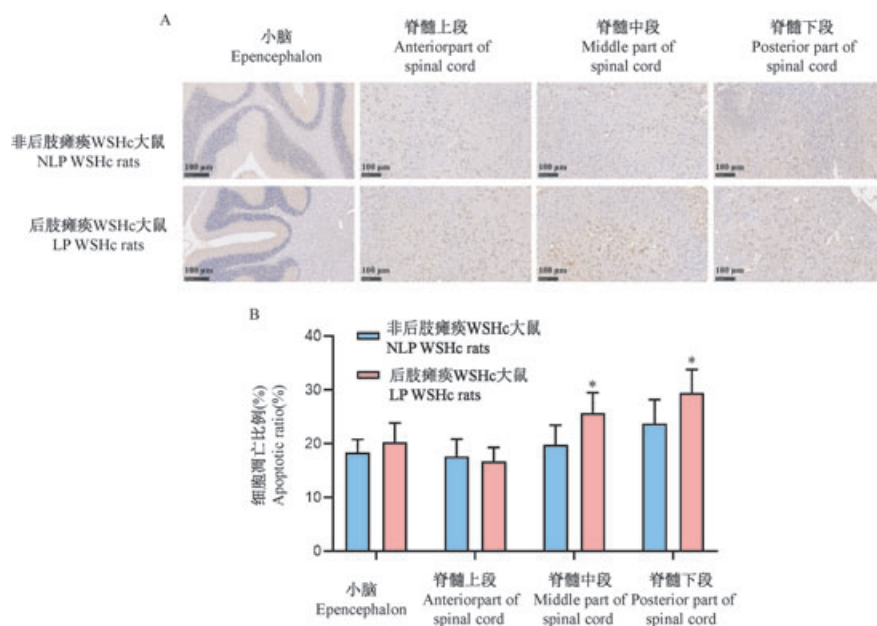


图 3 非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠小脑与脊髓 HE 染色结果

Figure 3 HE staining results of cerebellum and spinal cord of rats without hindlimb paralysis and rats with hindlimb paralysis



注:A:非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠小脑与脊髓 TUNEL 染色结果;B:大鼠不同部位细胞凋亡比例。与非后肢瘫痪大鼠比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠小脑与脊髓细胞凋亡情况

Note. A, TUNEL staining results of cerebellum and spinal cord of rats without hindlimb paralysis and rats with hindlimb paralysis. B, Proportion of apoptosis in different parts of rats. Compared with NLP WSHc rats, * $P < 0.05$.

Figure 4 Apoptosis of cerebellum and spinal cord of rats without hindlimb paralysis and rats with hindlimb paralysis

2.5 自发性后肢瘫痪 WSHc 大鼠小脑与脊髓 Caspase-1 相关基因与蛋白的表达

对不同部位的中枢神经系统进行炎症相关基因表达差异进行研究。RT-PCR 检测发现,与非后肢瘫痪的 WSHc 大鼠比较,后肢瘫痪大鼠脊

髓中、下段 Caspase-1 和 IL-1 β 的 mRNA 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),而小脑和脊髓上段 Caspase-1 和 IL-1 β 的 mRNA 水平差异不具有显著性($P > 0.05$)。进一步取脊髓后段组织进行蛋白水平的验证,发现 Pro-Caspase-1 表达差异不

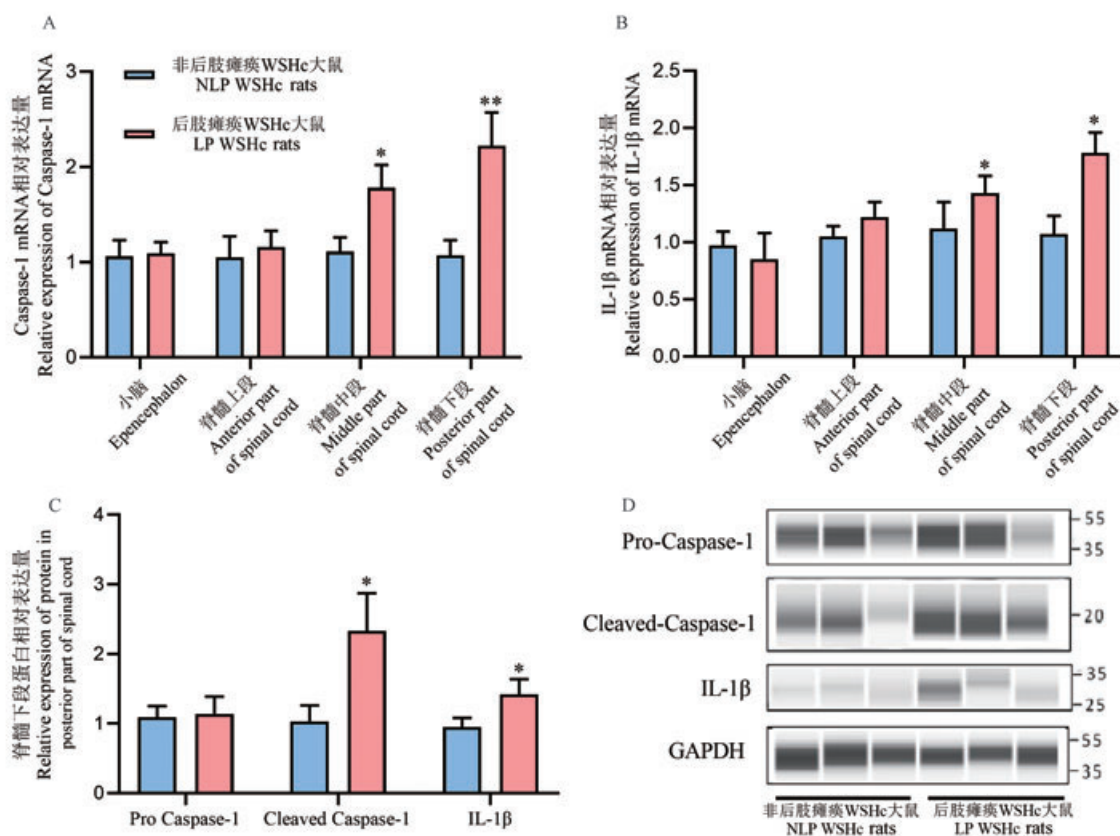
具有显著性 ($P > 0.05$), 而后肢瘫痪大鼠脊髓后段的 Cleaved-Caspase-1 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$), 且下游产物 IL-1 β 表达亦显著上升 ($P < 0.05$)。 (见图 5)

3 讨论

MND 是由额叶中央前回的上运动神经元和脊髓前角的下运动神经元功能障碍引起的自发性疾病。通常情况下, 自发性 MND 会引起肌无力, 一般无感觉障碍和括约肌障碍。最常见的 MND 是肌萎缩性脊髓侧索硬化症, 占 MND 的 85%, 其他运动神经元疾病包括遗传性痉挛性麻痹、脊髓灰质炎等^[6]。目前该疾病的病因不明, 尚无有效的治疗手段, 而疾病动物模型是研究疾病发病机制和药物治

疗的关键环节, 因此, 寻找与人类疾病类似的动物模型至关重要。

目前用于研究 MND 的疾病模型种类较多, 包括神经元细胞、离体脊髓组织、线虫、果蝇和斑马鱼和啮齿目动物等, 以小鼠为最常用的动物模型。大小鼠 MND 模型中又包括轴突断离术、毒性药物造模、转基因动物模型和自发性动物模型^[7-8]。轴突断离术和药物毒性的模型呈急性发病, 病程短, 且损伤不限于运动系统, 与 MND 的神经系统慢性进展性不符, 因此在科学应用中有很大的限制^[8]。国外有多个自发性 MND 小鼠模型报道, 如 MND 小鼠、Wobble 小鼠及 Wasted 小鼠等, 这些小鼠的病理特点与人类 MND 接近, 但这些报道年代久远, 且未见更多的深入机制研究和应用报道, 国内也未见



注: A: 大鼠不同部位 Caspase-1 mRNA 相对表达量; B: 大鼠不同部位 IL-1 β mRNA 相对表达量。C: 非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠脊髓下段蛋白相对表达量; D: 非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠脊髓下段蛋白条带。与后肢瘫痪大鼠比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 非后肢瘫痪大鼠与后肢瘫痪大鼠小脑与脊髓 Caspase-1 相关基因的表达

Note. A, Relative expression of Caspase-1 mRNA in different parts of rats. B, Relative expression of IL-1 β mRNA in different parts of rats. C, Relative expression levels of proteins in the posterior spinal cord of non-paraplegic rats and paraplegic rats. D, Protein bands in posterior spinal cord of non-paraplegic rats and paraplegic rats. Compared with NLP WSHc rats, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Expression of Caspase-1 related genes in cerebellum and spinal cord of rats without hindlimb paralysis and rats with hindlimb paralysis

有学者利用,可能目前已无法获得^[9-10]。目前应用最多的则是转基因小鼠模型,如 SOD1 基因突变小鼠、ALSIN 基因敲除小鼠等,但 MND 病因复杂,单个基因的变异不能全面的反映病因。因此,现有的动物模型均存在一定的局限性,需进一步研发新的疾病模型,从而更全面的解释病因和寻找治疗手段。

WSHc 大鼠是本动物实验研究中心目前自主培育并研究的一个大鼠新品系,来源于本课题组偶然发现的一只 Wistar 大鼠。该大鼠经高脂饲料诱导后,血清 TC 水平达 20 mmol/L 以上,将该血脂异常的 Wistar 大鼠与 SD 大鼠杂交后进行保种传代,经过多年来不断筛选高脂血症易感的大鼠,目前已形成一定规模的封闭群,雌性大鼠经高脂诱导后,TC 高于 5.0 mmol/L 的占 90% 以上,并能长期保持高血脂状态^[1]。近来本实验中心发现有一个支系的 WSHc 大鼠成年后会出现可遗传的自发性后肢瘫痪,雌雄均可发病。起初表现为步态不稳,进行性地发展为后肢完全丧失活动能力,但头部和前肢活动力不受影响,可长时间存活。这种自发性的后肢瘫痪症状与人类的 MND 相似,但具体的病变部位尚不清楚,因此需要对不同节段的中枢神经进行观察,才能进一步确定该大鼠模型的病因和研究价值。值得一提的是,本实验中,后肢瘫痪的 WSHc 大鼠与非后肢瘫痪的 WSHc 大鼠高脂血症的易感性一致,且无论是否给与高脂饲料诱导,均有一定的概率发生后肢瘫痪,提示该性状与高脂血症易感性状相对独立;WSHc 大鼠高脂血症性状为伴性遗传,目前仅在雌性大鼠中可见,而后肢瘫痪的性状雌雄均可发病,提示该性状可能为常染色体遗传,更确切的遗传模式需要更多的遗传学实验来揭示。

通过影像学与病理学研究发现,后肢瘫痪的 WSHc 大鼠大脑、小脑和脊髓上段未见明显病变,而自脊髓中段开始至脊髓后段均出现较为严重的病变,如神经纤维空泡、神经元细胞核左移和核固缩,且伴随炎性细胞浸润,提示神经细胞的程序性死亡和脊髓的炎症反应参与了后肢瘫痪的 WSHc 大鼠主要致病因素。通过 TUNEL 免疫组化试验我们发现,后肢瘫痪大鼠脊髓中段和和脊髓下段神经细胞凋亡程度显著升高,而小脑和脊髓上段未见明显改变,进一步证实了病变部位主要存在于脊髓中后段,并提示可能是脊髓中的炎症反应导致神经细胞凋亡。

目前 MND 可能的发病机制有多种学说,主要

有(1)RNA 结合蛋白核质转运已经 RNA 代谢的改变;(2)细胞自噬减少导致蛋白酶系统稳态失衡;(3)线粒体功能障碍和氧化应激;(4)星形胶质细胞激活,产生有毒性的炎症因子等^[11-14]。该大鼠疾病模型目前观察到的病变特征主要为炎症细胞浸润和神经细胞空泡,因此作者推测,该大鼠可能是中后段的脊髓组织中免疫炎症细胞激活,产生的炎症因子进一步损伤神经原细胞和脊髓前角细胞。文献报道可见,MND 疾病中常见炎症细胞的异常活化和 IL-1 β 的释放,而 IL-1 β 的释放与 Caspase-1 密切相关^[15-16]。Caspase-1 是炎症小体复合物中有一个重要的蛋白组件,平时以无活性的酶原形式(Pro-Caspase-1)存在,当受到刺激时 Pro-Caspase-1 发生水解,经过一系列的反应,最终形成有活性的裂解 Caspase-1(Cleaved Caspase-1)^[17]。活化的 Caspase-1 能够对 IL-1 β 前体进行切割,形成具有活性的 IL-1 β 并释放,从而引起机体的炎症反应^[18]。与此同时,Caspase-1 能直接作用于细胞生存相关的重要蛋白,具有促凋亡的作用^[19-20]。本实验研究发现,与非后肢瘫痪的大鼠比较,在后肢瘫痪大鼠小脑和脊髓前段 Caspase-1 与 IL-1 β 基因表达水平未见显著变化,而瘫痪大鼠脊髓中后段,Caspase-1 与 IL-1 β 基因表达水平均显著升高,蛋白定量分析结果进一步显示,瘫痪大鼠脊髓后段中激活的 Caspase-1 和成熟的 IL-1 β 蛋白水平也显著增高,这与病理组织学结果相一致,提示 WSHc 大鼠后肢瘫痪的病理机制可能是由于脊髓中后段的神经元细胞 Caspase-1 过度激活,引起机体炎症和细胞凋亡,从而形成自发性进行性后肢瘫痪。该自发性后肢瘫痪大鼠模型的发病机制可能不仅限于此,而更确切的病因需要更进一步的实验加以验证。

综上所述,高脂血症易感 WSHc 大鼠自发性后肢瘫痪为进行性病变,由早期的步态不稳发展到后期的后肢瘫痪,其发病部位位于脊髓中后段,病理特征为炎症细胞浸润和神经元细胞变性凋亡,其发病机制可能与 Caspase-1 过度激活有关。

参 考 文 献(References)

- [1] 马全鑫,陈姣姣,郁晨,等.一种新型高脂血症易感大鼠的血脂水平与心血管并发症[J].中国实验动物学报,2019,27(1):25-31.
Ma QX, Chen JJ, Yu C, et al. Study on blood lipid level and cardiovascular complication in a new type of hyperlipidemia susceptible rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 25-31.

- [2] Rothhammer V, Maccanfroni ID, Bunse L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 586.
- [3] Rust R, Kaiser J. Insights into the dual role of inflammation after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(18): 4658–4660.
- [4] McKenzie BA, Mamik MK, Saito LB, et al. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): E6065–E6074.
- [5] de Rivero Vaccari JP. Carbon monoxide releasing molecule-3 inhibits inflammasome activation: A potential therapy for spinal cord injury[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 17–18.
- [6] Foster LA, Salajegheh MK. Motor neuron disease: pathophysiology, diagnosis, and management[J]. *Am J Med*, 2019, 132(1): 32–37.
- [7] Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(5): 537–549.
- [8] 时婧, 许蕾. 运动神经元病实验模型[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2009, 17(5): 399–400.
- Shi J, Xu L. Experimental model of motor neuron disease [J]. *J Brain Nervous Dis*, 2009, 17(5): 399–400.
- [9] Messer A, Strominger NL, Mazurkiewicz JE. Histopathology of the late-onset motor neuron degeneration (Mnd) mutant in the mouse[J]. *J Neurogenet*, 1987, 4(3): 201–213.
- [10] Mitsumoto H, Bradley WG. Murine motor neuron disease (the wobbler mouse) degeneration and regeneration of the lower motor neuron[J]. *Brain*, 1982, 105(4): 811–834.
- [11] West AP, Shadel GS. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(6): 363.
- [12] Guerrero EN, Wang H, Mitra J, et al. TDP-43/FUS in motor neuron disease: complexity and challenges[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 145: 78–97.
- [13] Komine O, Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2015, 77(4): 537.
- [14] Mis MSC, Brajkovic S, Frattini E, et al. Autophagy in motor neuron disease: key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 72: 84–90.
- [15] Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, et al. Caspase-1 and D-3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu, Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13901–13906.
- [16] Lindberg C, Chromek M, Ahrengart L, et al. Soluble interleukin-1 receptor type II, IL-18 and caspase-1 in mild cognitive impairment and severe Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2005, 46(7): 551–557.
- [17] Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241–247.
- [18] Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, et al. Caspase-1-processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by $\gamma\delta$ and CD4 T cells that mediate autoimmunity [J]. *J Immunol*, 2011, 186(10): 5738–5748.
- [19] Van Opdenbosch N, Van Gorp H, Verdonck M, et al. Caspase-1 engagement and TLR-induced c-FLIP expression suppress ASC/caspase-8-dependent apoptosis by inflammasome sensors NLRP1b and NLRC4 [J]. *Cell Rep*, 2017, 21(12): 3427–3444.
- [20] Xi H, Zhang Y, Xu Y, et al. Caspase-1 inflammasome activation mediates homocysteine-induced pyroptosis in endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1525–1539.

[收稿日期] 2020-02-07

汤喜兰,徐国良,董伟,等. 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报,2020,28(4): 486-493.

Tang XL, Xu GL, Dong W, et al. Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 486-493.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.008

异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠的血清代谢组学研究

汤喜兰¹,徐国良²,董伟³,李洪铭¹,邱俊辉¹,孙楠¹,刘芳¹,刘思宇¹,李冰涛^{2*}

(1. 江西科技师范大学药学院,南昌 330013; 2. 江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心,南昌 330004; 3. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室,南昌 330004)

【摘要】 目的 通过血清代谢组寻找重要性生物标志物,探讨大鼠心脏肥大的发病机制。**方法** 采用连续14 d腹腔注射异丙肾上腺素 30 mg/(kg·d)建立大鼠心脏肥大模型。采用心脏重量指数评价大鼠心脏肥大模型。应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱检测大鼠血清内源性代谢物,MPP 软件分析代谢物差异,Human Metabolome Database (HMDB)数据库来确定生物标志物,MetaboAnalyst 4.0 分析代谢通路。**结果** 腹腔注射异丙肾上腺素可诱导大鼠心脏肥大。心脏肥大模型组与正常组具有明显的血清代谢产物差异,共鉴定 10 个潜在生物标志物。与正常组相比,心脏肥大模型组的鞘氨醇-1-磷酸和二高-γ-亚麻酸显著下调,D-果糖-1,6-二磷酸、脱氧腺嘌呤核苷、N-乙酰蛋氨酸、植物鞘氨醇、尿囊素、3-酮基-β-D-半乳糖、辛酸和甘油显著上调。**结论** 异丙肾上腺素诱导的心脏肥大涉及鞘脂代谢、甘油脂代谢、半乳糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成及嘌呤代谢等代谢通路。本研究为揭示异丙肾上腺素诱导的心脏肥大循环血液的代谢变化提供参考。

【关键词】 心脏肥大;异丙肾上腺素;代谢组学;生物标志物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0486-08

Serum metabolomics study of cardiac hypertrophy in an isoproterenol-induced rat model

TANG Xilan¹, XU Guoliang², DONG Wei³, LI Hongming¹, QIU Junhui¹, SUN Nan¹, LIU Fang¹, LIU Siyu¹, LI Bingtao^{2*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, China.

2. Research Center for Differentiation and Development of Traditional Chinese Medicine(TCM) Basic Theory, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004. 3. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Corresponding author: LI Bingtao. E-mail: ljw10@126.com

【Abstract】 Objective To screen potential biomarkers to explore the pathogenesis in a rat model of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. **Methods** Isoproterenol 30 mg/(kg·d) was used to establish the rat model of cardiac hypertrophy via intraperitoneal injection for 14 consecutive days. The rat cardiac hypertrophy model was evaluated via the

【基金项目】国家自然科学基金项目(81960732),江西省自然基金项目(20181BAB215041),江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ180606),江西科技师范大学博士启动基金项目(2017BSQD017),江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室开放项目(TCM-201911),江西科技师范大学大学生创新创业训练计划项目(20191304127,20190604041)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81960732), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20181BAB215041), Research Foundation of Education Bureau of Jiangxi Province (GJJ180606), PhD Research Startup Foundation of Jiangxi Science & Technology Normal University (2017BSQD017), Open Project of Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM-201911), Jiangxi Science & Technology Normal University Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (20191304127,20190604041).

【作者简介】汤喜兰(1983—),女,副教授,博士,研究方向:中药心血管药理。Email:tangxilan1983@163.com

【通信作者】李冰涛(1981—),男,讲师,博士,研究方向:网络药理学。Email:ljw10@126.com

cardiac index. Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS) was conducted to detect serum metabolites in normal and model rats. MPP software was used to analyze metabolic differences. The Human Metabolome Database (HMDB) was used to identify biomarkers. MetaboAnalyst 4.0 was used to analyze metabolic pathways. **Results** Serum metabolites in the rats with isoproterenol-induced cardiac hypertrophy differed significantly from those of the normal rats, and 10 potential biomarkers were identified. Compared with the normal group, sphingosine 1-phosphate and dihomog- γ -linolenic acid in the model group were significantly downregulated, and D-fructose-1,6-bisphosphate, deoxyadenosine, N-acetylmethionine, phytosphingosine, allantoin, 3-keto- β -D-galactose, octane, and glycerol were significantly upregulated. **Conclusions** The metabolic pathways involved in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy include sphingolipid metabolism, glycerolipid metabolism, galactose metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, and purine metabolism. This study provides a basis for understanding the metabolic changes in the circulating blood in a model of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy.

【Keywords】 cardiac hypertrophy; isoproterenol; metabolomics; biomarker

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

心脏肥大是心脏血流动力学压力和容量超负荷及神经体液因素等引起的主要病理生理反应,表现为蛋白质合成增加,肌节致密重组,心肌细胞体积增大,是各种心血管疾病心肌重构过程中的关键阶段。持续的心脏肥大最终可导致心力衰竭,增加心血管疾病的发病率和死亡率,威胁人类健康^[1]。因此,心脏肥大的发生机制是心血管疾病研究的重点。

异丙肾上腺素是一种 β -肾上腺素能受体激动剂,可作用于心肌组织,引起心肌损伤、心肌梗死、心肌肥厚甚至心力衰竭等^[2]。异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏肥大模型是心脏肥大药物评价的常用模型,尤其适用于研究心脏肥大过程中心肌结构和功能的适应性^[3],受到国内外学者的持续关注。代谢组学是一门新的组学研究技术,可以帮助我们了解各种心血管疾病状态下发生的整体代谢和心脏特异性代谢的变化,明确心血管疾病的分子标志物和代谢组学特征,已广泛应用于心血管疾病研究^[4-5]。

本研究拟采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱技术检测异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清代谢物的变化,通过主成分分析寻找潜在的生物标志物并进行代谢通路分析,探索心脏肥大大鼠体内的代谢变化,为心脏肥大的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

16 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,5 ~ 6 周龄,体重 200 ~ 220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司

提供【SCXK(湘)2016-0002】,饲养于江西中医药大学实验动物科技中心屏障系统【SYXK(赣)2017-0004】。饲养条件:温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 $50\% \pm 5\%$,12 h 光照/黑暗循环,自由摄食饮水。所有操作均符合江西中医药大学动物实验伦理要求,满足 3R 原则(审批号:JZLLSC2017_0109)。

1.1.2 试剂与仪器

异丙肾上腺素(上海源叶生物科技有限公司,TP0395)。

XS203S 万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多),TGL20 M 台式高速冷冻离心机(盐城市凯特实验仪器有限公司),安捷伦 6538 A 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS, Agilent, 美国),色谱柱为 ZORBAXExtend-C18 柱(2.1×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$, Agilent)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

16 只大鼠按体重随机分为正常组和模型组,每组各 8 只。参考文献^[6],加以调整,给予模型组大鼠腹腔注射异丙肾上腺素 $30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,连续 14 d 建立大鼠心脏肥大模型。正常组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。以心脏重量指数包括心脏重量与体重比值(HW/BW)、左心室重量与体重比值(LVW/BW)以及右心室重量与体重比值(RVW/BW)判断大鼠心脏肥大模型是否成功。实验过程中,所有大鼠给予普通饲料进行正常饲养,每两天称重及更换垫料。

1.2.2 样本采集与制备

观察记录大鼠一般行为学变化,包括精神状

态,被毛,饮食等。末次注射异丙肾上腺素后,大鼠禁食不禁水 12 h,次日早晨麻醉,腹主动脉取血,取心脏组织并称重。

血清样本的制备:血液 4℃ 静置 2 h,4℃ 离心 10 min (3000 r/min),分离血清。各取 100 μ L 血清样本进行混合制备 QC 样本。从各血清样本(含 QC)取 100 μ L 血清,加入甲醇 300 μ L,涡旋混匀 30 s,4℃ 恒温静置 3 h,离心 15 min (15 000 r/min,4℃),取上清于 1.5 mL EP 管,真空浓缩离心,加水-甲醇浓度(水:甲醇=85:15)200 μ L 复溶,涡旋混匀 30 s,离心 15 min (15 000 r/min,4℃),取上清于样品瓶,进样。

1.2.3 色谱和质谱条件

安捷伦 UHPLC-Q-TOF-MS; 色谱柱为 ZORBAX Extend-C18 柱(2.1 $\times$ 100 mm, 3.5 μ m, Agilent), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈, 进样量 4 μ L, 柱温 35℃, 样品室温度 4℃, 流速 0.4 mL/min, 梯度洗脱条件: 0 ~ 4 min, 98% ~ 88% A, 4 ~ 14 min, 88% ~ 19% A, 14 ~ 17 min, 19% ~ 9% A, 17 ~ 18 min, 9% ~ 0% A, 18 ~ 20 min, 0% ~ 98% A, 20 ~ 23 min, 98% ~ 98% A。

质谱条件: 正离子模式下采集谱图对前处理的样品进行分析, 为保持仪器稳定性, 精密度和重现性, 使用仪器配套的参比液进行实时校正, 采用 Dual ESI 源, 正离子模式下(4000 V), 干燥气温度 350℃, 干燥气流速: 10 L/min; 扫描(Full Scan)方式, 扫描范围: m/z 50 ~ 1200, 喷雾室压力: 35 psig; 碎片电压: 120 V; 锥孔电压: 60 V。仪器使用参比自动校正, 参比液以 5 μ L/min 的速度通过自动传输入口, 参比离子 m/z 121.05973 和 m/z 922.09798。

1.3 统计学分析

心脏重量指数采用 Graphpad prism 6.0 进行统计分析, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异具有显著性。采用 Profinder B.06.0 软件对原始质谱数据进行格式转换(转化为 .cef 格式数据), 数据导入 MPP 软件进行峰提取、匹配、对齐和标准化处理, 然后将处理后数据导入 SIMCA-P 12.0 进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法分析(PLS-DA), 以相关性系数 [$P(\text{coor}) > 0.8$] 和变量重要性 ($VIP > 1$) 为条件, 进一步通过组间 t 检验筛选差异代谢物 ($P < 0.05$), 采用 Human Metabolome Database (HMDB) 数据库对差异代谢物进行定性, 利用 MetaboAnalyst 4.0 软件进行相关代谢通路分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及心脏重量指数变化分析

正常组大鼠精神状态良好, 毛发有光泽, 体重稳定上升。心脏肥大模型组大鼠精神萎靡, 动作迟缓, 毛发失去光泽, 体重增长缓慢, 明显低于正常组大鼠体重增长(见图 1)。与正常大鼠相比, 模型组大鼠 HW/BW、LVW/BW 及 RVW/BW 显著增加 ($P < 0.05$), 见图 2。

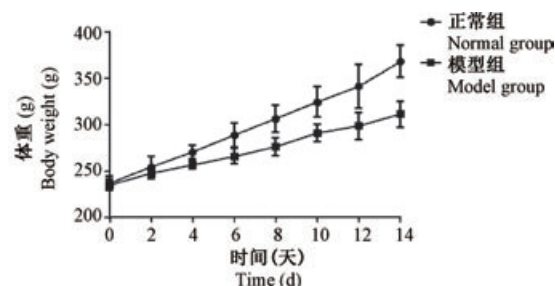


图 1 大鼠体重变化

Figure 1 Body weight changes in rats

2.2 大鼠血清代谢轮廓分析

图 3 显示了正常组大鼠与模型组大鼠血清样本的总离子色谱图。从两组总离子流图的血清样品分析中, 可以看出样品出峰均匀, 强度适中, 说明此时液相质谱条件适合正常组及模型组的血清样品分析。

2.3 样品及设备稳定性分析

本研究采用 QC 控制样品检测过程中样品及设备的稳定性。采样前, 运行 1 次 QC, 采样过程中, 每检测 8 个样品运行 1 次 QC, 共运行 3 次 QC 样品。图 4 显示了 3 次 QC 样品总离子流图的叠加, 可以看出主要样品峰的强度、保留时间都能重合, 没有差异, 说明样品检测过程中样品及仪器均稳定。

2.4 大鼠血清代谢物主成分分析

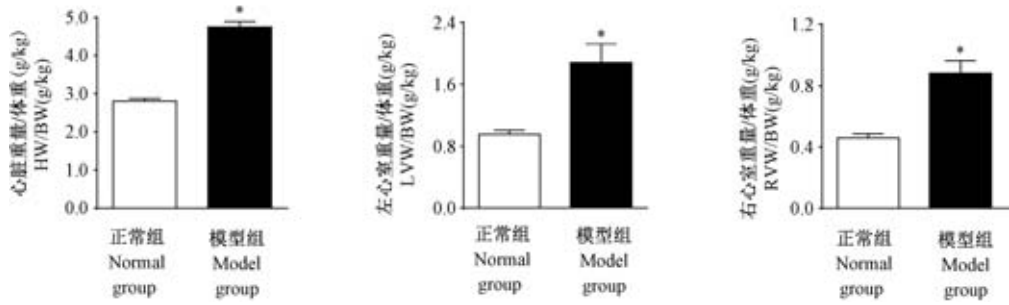
用主成分分析方法考察异丙肾上腺素对大鼠血清内源性代谢物质的影响, 正离子模式下 PCA 得分图显示正常组与模型组分离明显, 组内聚集程度较好, 提示与正常组相比, 异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠内源性代谢物发生了显著变化(见图 5)。

2.5 潜在生物标志物筛选

为进一步研究异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清中的内源性代谢物质, 我们采用基于正交信号校正偏最小二乘法的 U-plot 来初步筛选符合异丙肾上腺素诱导心脏肥大模型大鼠血清中内源性物质状态特征的生物标志物群, 选择相关性系数大

于 0.8 且 VIP 大于 1 的变量作为候选生物标志物变量,并对两组中的候选生物标志物变量进行峰面积 t

检验,将 $P < 0.05$ 的化合物作为差异显著的潜在生物标志物,结果见图 6。



注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。(图 7 同)

图 2 大鼠心脏重量指数比较

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$.(The same in the Figure 7)

Figure 2 Comparison of rat heart weight index

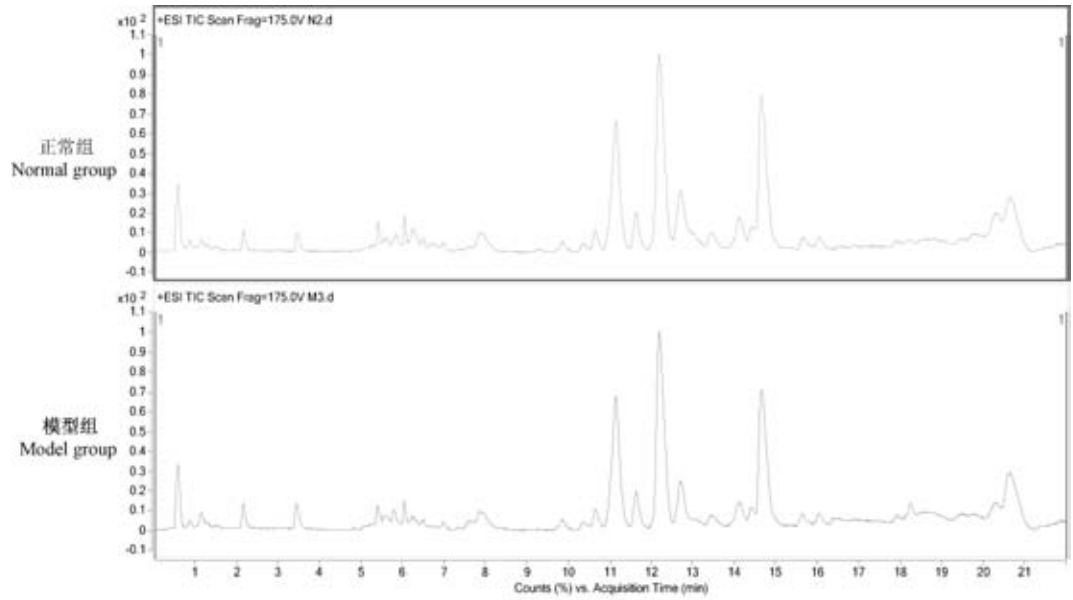


图 3 正离子模式下大鼠血清的总离子色谱图

Figure 3 UHPLC-Q-TOF-MS spectra of rat serum samples in ESI+ mode

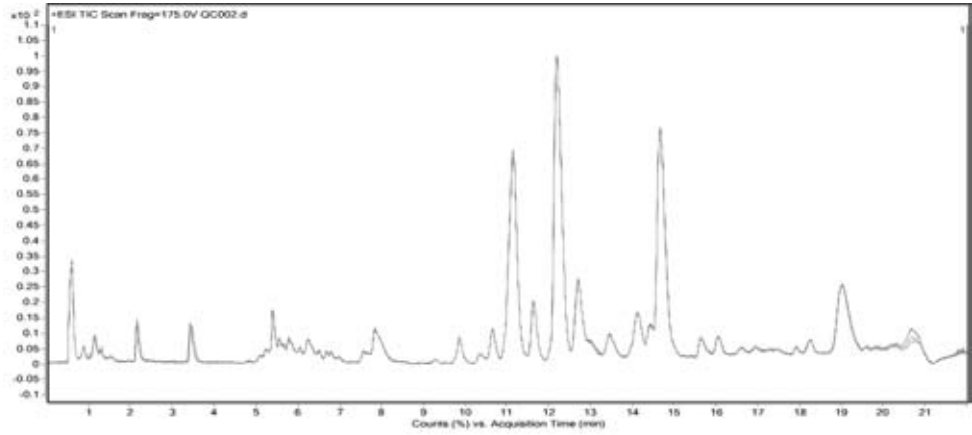


图 4 QC 样本叠加总离子流图

Figure 4 Superposition of total ion chromatogram of QC samples

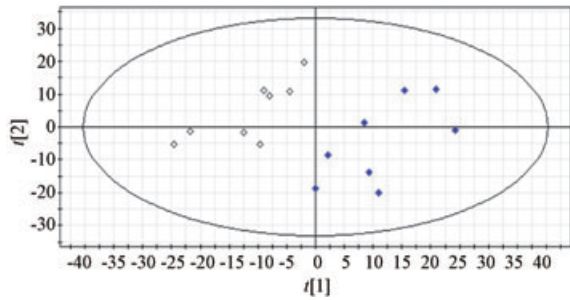
2.6 潜在生物标志物鉴定

共得到 13 个生物标志物,按照前期文献^[7-8],采用 HMDB 数据库来确定生物标志物,共鉴定出 10 个潜在生物标志物,3 个未通过鉴定。10 个潜在生物标志物分别为鞘氨醇-1-磷酸、二高- γ -亚麻酸、D-果糖-1,6-二磷酸、脱氧腺嘌呤核苷、N-乙酰蛋氨酸、植物鞘氨醇、尿囊素、3-酮基- β -D-半乳糖、辛烷和甘油(见表 1)。与正常组相比,心脏肥大模型组大鼠

血清鞘氨醇-1-磷酸和二高- γ -亚麻酸下调,其余 8 个潜在生物标志物上调(见图 7)。

2.7 生物标志物代谢通路分析

将鉴定的 10 个潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 4.0 进行 Pathway Analysis 分析,结果显示生物标志物主要参与鞘脂代谢、甘油酯代谢、半乳糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成和嘌呤代谢(见图 8)。



注:○:正常组;●:模型组。

图 5 正离子模式下大鼠血清 PCA 得分图

Note: ○, Normal group. ●, Model group.

Figure 5 PCA of metabolites in rats serum in ESI+ mode

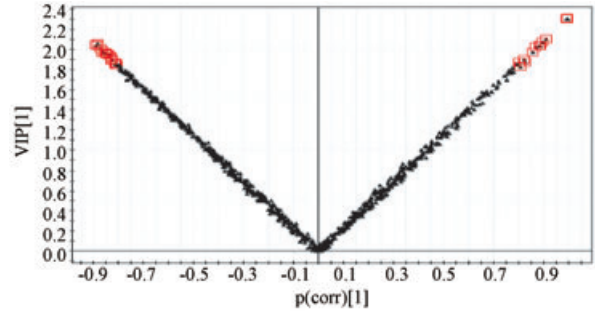


图 6 潜在生物标志物筛选图

Figure 6 Screening for the potential biomarkers in ESI+ mode

表 1 异丙肾上腺素诱导心脏肥大大鼠血清潜在生物标志物

Table 1 Potential serum biomarkers of cardiac hypertrophy rats model induced by isoproterenol

保留时间 RT (min)	质子数/ 电荷数 m/z	变量影响 重要性因子 VIP	相关性系数 P (corr)	编号 KEGG.ID	名称 Description	化学式 Chemical formula	变化趋势 (模型 vs 对照) Trend (Model vs Normal)
10.3554	379.2486	1.8671	0.8040	C06124	鞘氨醇-1-磷酸 Sphingosine 1-phosphate	$C_{18}H_{38}NO_5P$	↓
2.1650	385.1737	2.3057	0.9952	C03242	二高- γ -亚麻酸 Dihomo- γ -linolenic acid	$C_{20}H_{34}O_2$	↓
5.4160	340.9838	2.0102	-0.8711	C00354	D-果糖-1,6-二磷酸 D-Fructose-1,6-bisphosphate	$C_6H_{14}O_{12}P_2$	↑
5.4449	250.0969	1.8581	-0.8124	C00559	脱氧腺嘌呤核苷 Deoxyadenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	↑
1.9380	191.0580	1.8420	-0.8064	C02712	N-乙酰蛋氨酸 N-Acetylmethionine	$C_7H_{13}NO_3S$	↑
15.6470	396.2126	1.8999	-0.8230	C12144	植物鞘氨醇 Phytosphingosine	$C_{18}H_{39}NO_3$	↑
5.4500	157.0370	2.0343	-0.8824	C01551	尿囊素 Allantoin	$C_4H_6N_4O_3$	↑
5.4160	198.0141	2.0341	-0.8810	C05394	3-酮基- β -D-半乳糖 3-Keto- β -D-galactose	$C_6H_{10}O_6$	↑
5.4090	193.0600	2.0590	-0.8831	C01387	辛烷 Octane	C_8H_{18}	↑
5.4190	112.0158	2.0356	-0.8822	C00116	甘油 Glycerol	$C_3H_8O_3$	↑

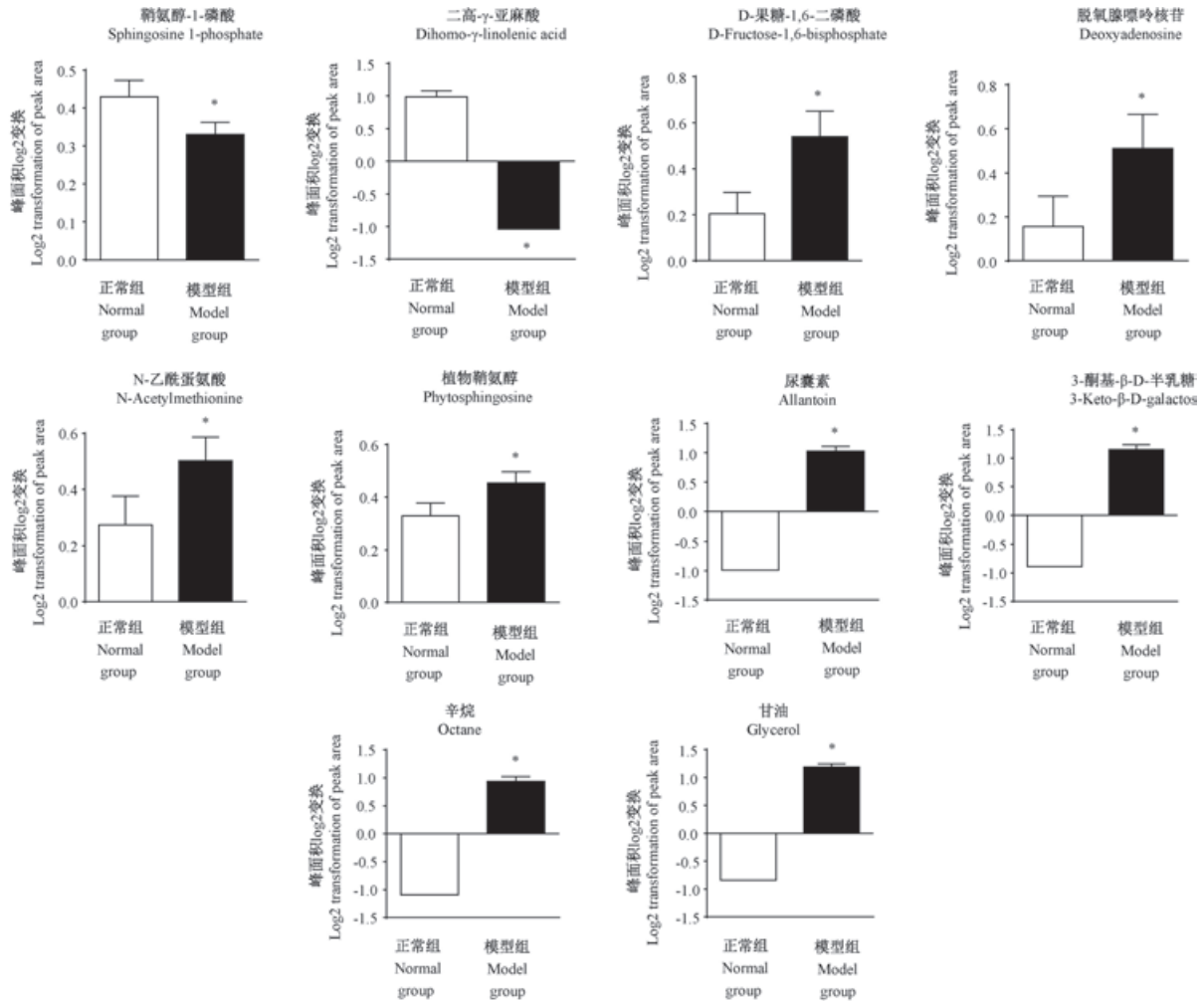


图 7 潜在代谢标志物的相对含量变化

Figure 7 Changes in the relative content of potential metabolic markers

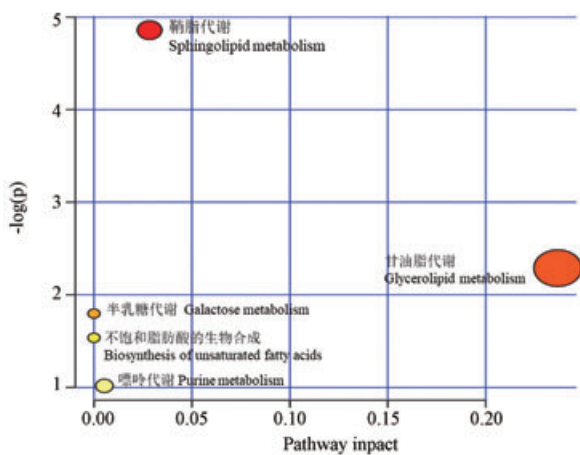


图 8 相关代谢通路

Figure 8 Relevant metabolic pathways

3 讨论

本研究采用连续 14 d 腹腔注射异丙肾上腺素

30 mg/(kg·d) 建立大鼠心脏肥大模型, 研究结果显示, 异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠的心脏重量、左心室重量和右心室重量显著增加, 结果表明模型建立成功。我们进一步基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术和数据分析, 筛选出异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏肥大 10 个潜在生物标志物, 涉及鞘脂代谢、甘油脂代谢、半乳糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成和嘌呤代谢等代谢通路。

鞘氨醇-1-磷酸和植物鞘氨醇的含量变化反映了鞘脂代谢改变。鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate, S1P) 是神经鞘磷脂经过多步酶促反应生成。神经鞘磷脂在鞘磷脂酶的催化下生成神经酰胺, 在神经酰胺酶的催化作用下生成鞘氨醇, 在鞘氨醇激酶的催化作用下生成鞘氨醇-1-磷酸^[9]。S1P 参与调节心肌细胞稳态, 研究表明血浆 S1P 尤其是高密度脂蛋白结合的 S1P 含量与心血管疾病呈负相关, 可能成为心血管疾病的潜在标志物^[10-11]。

Liu 等^[12-13]研究表明异丙肾上腺素 85 mg/kg 皮下注射诱导的大鼠心肌梗死模型和高胆固醇诱导的动脉粥样硬化家兔模型中血浆植物鞘氨醇含量显著升高,另外,植物鞘氨醇蓄积可能是心肌细胞缺氧复氧损伤最重要的特征,它促使心肌细胞线粒体通透性转换孔开放,导致细胞发生凋亡^[14]。本研究中心异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清中 S1P 下调,植物鞘氨醇上调,与上述文献报道相一致。

心脏衰竭时,心肌糖脂代谢失衡,能量供应不足。代谢组学研究表明心衰时与能量代谢相关的代谢途径如甘油酯代谢、半乳糖代谢、脂肪酸的生物合成及嘌呤代谢等会发生显著改变^[15-16]。本研究检测到异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清中糖脂代谢中间代谢产物甘油的含量显著上调,代谢通路分析结果表明甘油所参与的甘油酯代谢途径和半乳糖代谢途径都发生改变。二高- γ -亚麻酸,属 N-6 系列多不饱和脂肪酸,是生物合成前列腺素 E1 的前体物质。研究表明急性失代偿性心力衰竭患者血清中二高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, DGLA)含量、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)含量和 DGLA/AA 比值越低,存活率越低。N-6 系列多不饱和脂肪酸水平^[17-18],尤其是 DGLA 含量和 DGLA/AA 比值与急性心血管疾病和急性失代偿性心衰患者的临床预后显著相关^[19]。本研究发现异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清中 DGLA 含量显著下调,进一步代谢通路分析结果表明不饱和脂肪酸合成代谢与异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏肥大有关系。另外,心衰时嘌呤代谢也发生明显改变。王真真等^[20]研究表明在冠状动脉结扎诱导的大鼠心衰模型中,心肌黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)表达显著上调,本研究发现在异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏肥大模型中,血清脱氧腺苷含量显著增加,二者都体现了嘌呤分解代谢活跃的特点。脱氧腺苷是腺嘌呤的一种代谢产物,其在心脏肥大发病中的作用尚有待进一步研究。

本文采用代谢组学的分析手段检测了异丙肾上腺素诱导的心脏肥大大鼠血清代谢物的变化,通过多元统计分析,确定了鞘氨醇-1-磷酸、二高- γ -亚麻酸、D-果糖-1,6-二磷酸、脱氧腺嘌呤核苷、N-乙酰蛋氨酸、植物鞘氨醇、尿囊素、3-酮基- β -D-半乳糖、辛酸和甘油 10 个生物标志物,这些代谢物主要与鞘脂代谢、甘油酯代谢、半乳糖代谢、不饱和脂肪酸的生物合成和嘌呤代谢等途径有关。本研究为探索

心脏肥大的发病机制和诊断防治提供了实验依据。

参 考 文 献(References)

- [1] 罗漫,吴晓云,郑敏,等. 心肌细胞肥大过程中心脏发育相关转录因子及下游心脏肥大标志基因的时序性表达规律研究[J]. 解放军医学杂志, 2017, 42(5): 394-401.
Luo M, Wu XY, Zheng M, et al. The temporal expression patterns of the transcription factors and target genes in cardiomyocyte hypertrophy [J]. Med J Chin PLA, 2017, 42(5): 394-401.
- [2] 梁娟,刘越,尹新华. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 110-114.
Liang J, Liu Y, Yin XH. Research progress of animal models of myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 110-114.
- [3] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141-151.
- [4] McGarrah RW, Crown SB, Zhang GF, et al. Cardiovascular metabolomics [J]. Circ Res, 2018, 122(9): 1238-1258.
- [5] Cheng S, Shah SH, Corwin EJ, et al. Potential impact and study considerations of metabolomics in cardiovascular health and disease: a scientific statement from the American Heart Association [J]. Circ Cardiovasc Genet, 2017, 10(2): e000032.
- [6] Tang X, Gan XT, Rajapurohitam V, et al. North American ginseng (*Panax quinquefolius*) suppresses β -adrenergic-dependent signalling, hypertrophy, and cardiac dysfunction [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(12): 1325-1335.
- [7] 盛译萱,李冰涛,张启云,等. 高脂饲料诱导胰岛素抵抗大鼠的代谢机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(3): 185-191.
Sheng YX, Li BT, Zhang QY, et al. Metabolic mechanism of rats with insulin resistance induced by high-fat diet [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(3): 185-191.
- [8] 张启云,汤喜兰,李冰涛,等. 黄连总生物碱对糖尿病大鼠的血浆代谢组学研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(6): 42-45.
Zhang QY, Tang XL, Ling BT, et al. Metabonomics study on the plasma of diabetes rats administrated with total alkaloids from *Rhizoma Coptidis* [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2013, 29(6): 42-45.
- [9] 段海峰,王立生,吴祖泽. 鞘氨醇-1 磷酸盐的生理功能研究进展[J]. 生理科学进展, 2003, 34(1): 16-20.
Duan HF, Wang LS, Wu ZZ. Progress in the study of physiological function of sphingosine 1-phosphate [J]. Prog Physiol Sci, 2003, 34(1): 16-20.
- [10] Diarte-Añazco EMG, Méndez-Lara KA, Pérez A, et al. Novel insights into the role of HDL-associated sphingosine-1-phosphate in cardiometabolic diseases [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): E6273.

- [11] Polzin A, Piayda K, Keul P, et al. Plasma sphingosine-1-phosphate concentrations are associated with systolic heart failure in patients with ischemic heart disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 110: 35–37.
- [12] Liu YT, Peng JB, Jia HM, et al. UPLC-Q/TOF MS standardized Chinese formula Xin-Ke-Shu for the treatment of atherosclerosis in a rabbit model [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1364–1372.
- [13] Liu YT, Jia HM, Chang X, et al. Metabolic pathways involved in Xin-Ke-Shu protecting against myocardial infarction in rats using ultra high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90: 35–44.
- [14] Sun LL, Jia HM, Ma LY, et al. Metabolic profiling of hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cells reveals the accumulation of phytosphingosine and the vital role of Dan-Shen in Xin-Ke-Shu [J]. *Phytomedicine*, 2018, 49: 83–94.
- [15] 许文轩, 李彤, 张磊, 等. 急性心肌梗死血浆标志代谢物及相关代谢通路的筛选 [J]. *山东医药*, 2018, 58(7): 23–27.
- Xu WX, Li T, Zhang L, et al. Screening plasma marker metabolites and the related metabolic pathways in acute myocardial infarction [J]. *Shandong Med J*, 2018, 58(7): 23–27.
- [16] Yang DW, Wang XX, Wu YP, et al. Urinary metabolomic profiling reveals the effect of shenfu decoction on chronic heart failure in rats [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 11915–11929.
- [17] Ouchi S, Miyazaki T, Shimada K, et al. Decreased circulating dihomo-gamma-linolenic acid levels are associated with total mortality in patients with acute cardiovascular disease and acute decompensated heart failure [J]. *Lipids Health Dis*, 2017, 16(1): 150.
- [18] Ouchi S, Miyazaki T, Shimada K, et al. Low docosahexaenoic acid, dihomo-gamma-linolenic acid, and arachidonic acid levels associated with long-term mortality in patients with acute decompensated heart failure in different nutritional statuses [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9): E956.
- [19] Nagai T, Honda Y, Sugano Y, et al. Circulating omega-6, but not omega-3 polyunsaturated fatty acids, are associated with clinical outcomes in patients with acute decompensated heart failure [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165841.
- [20] 王真真, 刘地川, 杨刚. 别嘌呤醇在心衰大鼠能量代谢中的保护作用 [J]. *临床心血管病杂志*, 2015, 31(1): 89–93.
- Wang ZZ, Liu DC, Yang G. Allopurinol preserves myocardial energy metabolism in chronic heart failure rats [J]. *J Clin Cardiol*, 2015, 31(1): 89–93.

[收稿日期] 2020-03-04

周游,汪雯,蔡杨乾,等. 电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 494-502.

Zhou Y, Wang W, Cai YQ, et al. Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 494-502.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.009

电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达的干预

周游¹,汪雯¹,蔡杨乾¹,杜俊英¹,邵晓梅¹,蒋永亮¹,刘伯一¹,高宏^{2*},梁宜^{1,2*},
方剑乔^{1,2}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室 浙江省针灸神经病学重点实验室, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学附属第三医院针灸科, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察电针对慢性炎性痛大鼠患侧足趾机械痛阈(paw withdrawal thresholds, PWTs)以及背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)内卫星胶质细胞及其 P2X7 受体活化的影响,探讨电针抗大鼠炎性痛的外周机制。**方法** 第一部分:将大鼠完全随机分为空白组(Con group, $n=12$)、炎性痛组(CFA group, $n=12$)、炎性痛+电针组(CFA + EA group, $n=12$)、炎性痛+假电针组(CFA + sEA group, $n=12$)。炎性痛大鼠于右后足掌侧正中皮下注射完全弗氏佐剂(complete freud's adjuvant, CFA)每只 0.1 mL 构建模型;电针处理取穴“足三里”、“昆仑”,电针参数为疏密波,频率 2/100 Hz,强度 0.5-1-1.5 mA(每个强度治疗 10 min),每日 1 次,连续 7 d。检测造模前和造模后 1、3、7、8、10、12、14 d 各组大鼠机械痛阈,采用免疫印迹法检测造模后 14 d 各组大鼠患侧 DRG 中神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)及 P2X7 受体活化情况。第二部分:将大鼠随机分为炎性痛+DMSO 组(CFA + DMSO group, $n=8$)、炎性痛+P2X7R 抑制剂 A740003 组(CFA + A740003 group, $n=10$)、炎性痛+电针+生理盐水组(CFA + EA + NS group, $n=8$)、炎性痛+电针+P2X7R 激动剂 BzATP 组(CFA + EA + BzATP group, $n=12$),分别鞘内注射相应药物。分别于手术前、造模前、造模后和给药后各时点检测大鼠 PWTs 变化。**结果** (1)CFA 致炎性模型大鼠痛阈显著下降($P < 0.01$),电针治疗后其机械痛阈显著升高($P < 0.01$)。CFA 足底注射 14 d 后,大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP、P2X7 蛋白表达显著增多($P < 0.05$);电针显著抑制大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP、P2X7 蛋白表达($P < 0.05$),而 CFA + sEA 组却无明显变化($P > 0.05$)。(2)与 CFA + DMSO 组比较,鞘内注射 P2X7 抑制剂 A740003 显著提高 CFA 大鼠机械痛阈($P < 0.01$);CFA + EA + BzATP 组大鼠 PWTs 明显低于 CFA + EA + NS 组($P < 0.01$)。**结论** 抑制大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化和 P2X7 受体表达参与电针抗慢性炎性痛,可能是电针镇痛外周机制之一。

【关键词】 慢性炎性痛;电针镇痛;背根神经节;卫星胶质细胞;P2X7 受体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0494-09

Effect of electroacupuncture on activation of satellite glial cells and P2X7 receptor in the DRG of rats with chronic inflammatory pain

ZHOU You¹, WANG Wen¹, CAI Yangqian¹, DU Junying¹, SHAO Xiaomei¹, JIANG Yongliang¹, LIU Boyi¹,
GAO Hong^{2*}, LIANG Yi^{1,2*}, FANG Jianqiao^{1,2}

【基金项目】 国家自然科学基金(81674061),浙江省自然科学基金(LY19H270010)。

Funded by National Natural Science Foundation(81674061), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY19H270010)。

【作者简介】 周游(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:针刺镇痛研究。Email:zhouyou0955@163.com

【通信作者】 高宏(1970—),男,主任中医师,研究方向:针刺镇痛和功能调节研究。Email:qtgh@hotmail.com;

梁宜(1980—),女,博士,研究员、主任中医师,研究方向:针灸镇痛和免疫调节的基础和临床研究。Email:liangyiwww@zcmu.edu.cn。

* 共同通信作者

(1. Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China.

2. Department of Acupuncture and Moxibustion, the Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005)

Corresponding author: CAO Hong. E-mail: qtgh@hotmail.com; LIANG Yi. E-mail: liangyiwww@zcmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects of electroacupuncture (EA) on ipsilateral paw withdrawal thresholds (PWTs), activation of satellite glial cells, and the P2X7 receptor in the dorsal root ganglia (DRG) of rats with chronic inflammatory pain, and further explore the peripheral mechanism of EA against chronic inflammatory pain. **Methods** Part 1: Rats were randomly divided into the control group (Con group; $n=12$), CFA-induced inflammatory pain group (CFA group; $n=12$), CFA model plus EA treatment group (CFA + EA group; $n=12$), and CFA model plus sham EA treatment group (CFA + sEA group; $n=12$). The CFA inflammatory pain model was established by injecting 0.1 mL CFA into the plantar of the rat right hind foot. EA at a 2/100 Hz alternative frequency and gradual intensity (0.5, 1, and 1.5 mA, 10 min each) was administered at acupoints “Zusanli” and “Kunlun” for 30 min per day for 7 days. PWTs were detected at 1, 3, 7, 8, 10, 12, and 14 days after CFA injection. Protein expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and P2X7 receptor in DRG at day 14 post-CFA was measured by western blotting. Part 2: CFA rats were randomly divided into the CFA plus DMSO group (CFA + DMSO group; $n=8$), CFA plus P2X7R agonist A740003 group (CFA + A740003 group; $n=10$), EA plus normal saline group (CFA + EA + NS group; $n=8$), and EA plus P2X7R agonist BzATP group (CFA + EA + BzATP group; $n=12$), which were intrathecally administrated with DMSO, A740003, normal saline, and BzATP respectively. PWTs were measured at pre-surgery, pre-CFA, post-CFA, and post-intrathecal injection. **Results** Part 1: PWTs of CFA rats were decreased significantly ($P < 0.01$) and EA significantly increased PWTs ($P < 0.01$). CFA injection significantly increased the expression of GFAP and P2X7 receptor in the ipsilateral L4–6 DRG of rats ($P < 0.05$). EA significantly reduced the expression of GFAP and P2X7 receptor in the L4–6 DRG of rats ($P < 0.05$), but sham EA had no obvious effect ($P > 0.05$). Part 2: Compared with the CFA + DMSO group, intrathecal injection of P2X7 receptor antagonist A740003 significantly increased PWTs of CFA rats ($P < 0.01$). PWTs in the CFA + EA + BzATP group were significantly lower than those in the CFA + EA + NS group ($P < 0.01$). **Conclusions** Electroacupuncture alleviates chronic inflammatory pain in rats, which might be related to the reduction of satellite glial cell activation and decrease of P2X7 receptor activation in the rat DRG. Inhibition of satellite glial cell activation and a decrease of P2X7 receptor expression contribute to EA treating chronic inflammatory pain, which may be one of the peripheral mechanisms of EA analgesia.

【Keywords】 chronic inflammatory pain; Electroacupuncture's analgesia; dorsal root ganglia; satellite glial cells; P2X7 receptor

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

随着生活水平的不断提升,人们对生活质量的要求日益提高,而慢性疼痛是损害患者生活质量的重要因素之一。有报道显示:去年,发达国家中的慢性疼痛患者人数达到人口总数的 37.3%,而发展中国家则高达 41.1%^[1]。最新报道显示美国慢性疼痛的发病率高达 4.8%^[2],中国流行病学研究结果显示女性慢性疼痛发生率高于男性(女性:39.92%,男性:32.17%)^[3]。慢性疼痛严重影响患者的生活质量,给个人和社会造成巨大负担。炎性疼痛是慢性疼痛的主要类型之一,目前主要采用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)进行治疗^[4]。虽然 NSAIDs 抗炎镇痛疗效显著,但因胃肠道损伤、心血管损害等副作用而限

制其临床应用。电针疗法作为新型针刺疗法,因其镇痛疗效确切被广泛应用于临床镇痛^[5]。

嘌呤 P2X7 受体(purinergic P2X7 receptor, P2X7R)是三磷酸腺苷敏感的配体门控阳离子通道的受体,在外周选择性表达于卫星胶质细胞^[6-7],新近研究表明 P2X7R 在疼痛信号传导中起重要作用^[8-11]。课题组前期研究已证实电针有较好抗炎镇痛效应^[12-14],电针抗炎性痛效应是否与抑制外周卫星胶质细胞活化及其 P2X7R 表达相关,暂未见相关报道。故本研究通过观察电针对炎性痛大鼠背根神经节卫星胶质细胞活化与 P2X7R 表达的干预,以期揭示电针抗炎性痛的部分外周调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 86 只, 6 周龄, 体重 (180 ± 20) g, 购自中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2018-0006】, 由浙江中医药大学实验动物中心饲养【SYXK(浙)2018-0012】, 本实验饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由浙江中医药大学实验动物中心提供)及自由饮水, 12 h 循环灯光, 恒定湿度, 室温(23 ± 2)℃。本实验所有操作均符合浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会实验伦理学要求, 伦理审批号: IACUC-20190715-03。

1.1.2 试剂与仪器

完全弗氏佐剂(F5881, 美国 Sigma), 兔抗 P2X7R (APR-004, 美国 Alomone), GAPDH (3683, 美国 CST), 兔抗 GFAP (ab7260, 美国 Abcam), 山羊抗兔 IgG H&L (ab6721, 美国 Abcam), P2X7R 选择性抑制剂 A740003 (3701, 美国 Tocris), P2X7R 选择性激动剂 BzATP (B6396, 美国 Sigma), BCA 试剂盒 (P0010, 中国碧云天), ECL 试剂盒 (P0018, 中国碧云天)。

纤毛机械刺激针 (NC12775, 美国 Stoelting Co.); 韩氏穴位神经刺激仪 (HANS-200 A, 中国联创科技公司); 一次性无菌针灸针 (0.25×13 mm, 中国苏州医疗用品厂有限公司); 恒温手术台 (美国 Harvard); 动物麻醉机 (WMR, 美国 MATRX); 超声波粉碎机 (中国宁波新芝生物科技有限公司); 电泳-转印系统 (美国 BioRad); 台式高速冷冻离心机 (Sorvall Biofuge Stratos, 美国 Thermo Scientific); 酶标仪 (SpectraMax M4, 美国 Molecular Devices); 凝胶成像系统 (Image Quant LAS4000, 德国 GE)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

每只大鼠右后足掌面正中皮下注射完全弗氏佐剂 (complete freud's adjuvant, CFA) 0.1 mL, 建立大鼠炎性痛模型; 对照大鼠仅在相同位置注射相同剂量的 0.9% 生理盐水溶液。

1.2.2 鞘内置管术

使实验第二部分大鼠适应环境 3 d 后, 于模前 8 d 进行鞘内置管术。具体方法如下: 采用异氟烷 (输出浓度为 2%) 以 500 mL/min 氧气流量进行低流量吸入麻醉。将大鼠背部 L6-S1 区域常规去毛备皮。于大鼠 L6-S1 棘突中间纵向做切口, 分离肌肉与棘间韧带, 用咬骨钳去除 L6 部分棘突, 形成“V”

形切口, 暴露椎间隙。用导引针头刺穿硬脊膜, 随后将 PE-10 导管从穿刺部位斜向上缓慢插入, 使其到达 L4-L5 间隙。经皮下隧道将导管另一端于颈部引出, 前端保留 4 ~ 6 cm, 热熔封闭管的外端口。置管术后肌肉注射青霉素并单笼饲养。术后待大鼠活动自如后, 注入 10 μ L 的 2% 利多卡因及 25 μ L 生理盐水。鞘内注射后 30 s 内大鼠出现双下肢麻痹, 拖地、不能负重, 钳夹或针刺不产生缩足反应, 待药效消退后可完全恢复正常肢体活动能力, 以此验证鞘内置管成功, 否则为失败。

1.2.3 分组与处理

第一部分: 48 只大鼠完全随机分为 4 组: 空白组 (Con 组, $n=12$)、炎性痛组 (CFA 组, $n=12$)、炎性痛 + 电针组 (CFA + EA 组, $n=12$)、炎性痛 + 假电针组 (CFA + sEA 组, $n=12$)。除了 Con 组, 余三组大鼠均接受造模和与 CFA + EA 组相同固定处理。CFA + EA 组于造模后第 8 天介入电针治疗, 采用 $0.25 \text{ mm} \times 13 \text{ mm}$ 针灸针刺入大鼠双侧“足三里”、“昆仑”, 连接 HANS-200 A 韩氏电针仪, 刺激参数选用疏密波、频率 2/100 Hz、强度为 0.5-1.5 mA (每 10 min 步进 0.5 mA), 每次治疗 30 min, 每日 1 次, 连续 7 d; CFA + sEA 组仅将针灸针刺入相同穴位皮下不予通电。

第二部分: 鞘内置管术成功的 38 只大鼠随机分为炎性痛 + DMSO 组 (CFA + DMSO 组, $n=8$)、炎性痛 + A740003 组 (CFA + A740003 组, $n=10$)、炎性痛 + 电针 + 生理盐水组 (CFA + EA + NS 组, $n=8$) 和炎性痛 + 电针 + BzATP 组 (CFA + EA + BzATP 组, $n=12$), 于造模后第 12 ~ 14 天分别鞘内注射 10 μ L 不同药物 (0.1% DMSO 溶液、250 nmol/L A740003 溶液、灭菌生理盐水和 280 nmol/L BzATP 溶液), 每日 1 次, 连续 3 d。考虑到留置 PE 管体积, 每次鞘内给药后给予 25 μ L 灭菌生理盐水冲管后再行封管。CFA + EA + NS 组和 CFA + EA + BzATP 组鞘内给药前给予电针治疗, 具体参数同第一部分, 共治疗 7 次。

1.2.4 痛行为检测

采用缩腿阈 (paw withdrawal threshold, PWT) 作为大鼠痛行为观测指标, 分别于 CFA 造模前后、电针治疗和鞘内给药前后不同时间点检测 PWT。正式测定前将大鼠置于铁丝网上的透明有机玻璃箱内 ($20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$), 使其适应环境 30 min。待大鼠停止梳理毛发和探索性活动, 选用不同 Von Frey 丝 (0.4、0.6、1、2、4、6、8、15、26 g) 垂直刺激大鼠右后足底中部, 向大鼠足垫施加压力至 Von Frey

丝轻微弯曲并持续 5 s。若大鼠出现缩腿或舔足反应则为阳性反应,记为“X”并给予相邻小一级力度的刺激。当该力度的 von Frey 纤维刺激不能引起阳性反应时,则记为“O”并给予相邻大一级力度的纤维刺激,每次刺激间隔 30 s。由此可得到一串以“O”或“X”组合的序列,并使用 Chaplan 等^[15]描述的方法进行计算。若计算得出 50% PWTs > 26.0 g 或 < 0.4 g,仍以 26.0 g 或 0.4 g 作为最大或最小值。

1.2.5 取材及样本处理

本实验于 CFA 模后 14 d 检测完 PWT 后,进行取材。用 3%戊巴比妥钠(0.15 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,暴露心脏,左心室、升主动脉用 4℃预冷的生理盐水快速灌注,快速取出患侧 L4-6 DRG,置入-80℃冰箱中保存。

1.2.6 免疫印迹法检测大鼠 DRG 中 GFAP、P2X7R 蛋白表达

将大鼠患侧 L4-6 背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)使用 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,进行蛋白变性。上样时采用 8%分离胶、5%浓缩胶制胶,电泳后转印至 PVDF 膜。使用 5%脱脂奶粉封闭,分别用 TBST 稀释好的一抗:兔抗 P2X7R(1:1000, Alomone),兔抗 GFAP(1:2000, Abcam), GAPDH(1:1000, CST),4℃孵育过夜。随后加入 TBST 稀释的二抗:山羊抗兔 IgG H&L(1:10000, Abcam),室温搅动孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂盒显色拍片。采用德国 GE 公司凝胶成像系统 ImageQuant LAS 4000 进

行成像,拍片后使用 Image J 软件计算条带的平均灰度值。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。两组组间采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间不同时间点采用双因素重复测量方差分析。两两比较方差齐性时采用 LSD 检验、方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验;均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

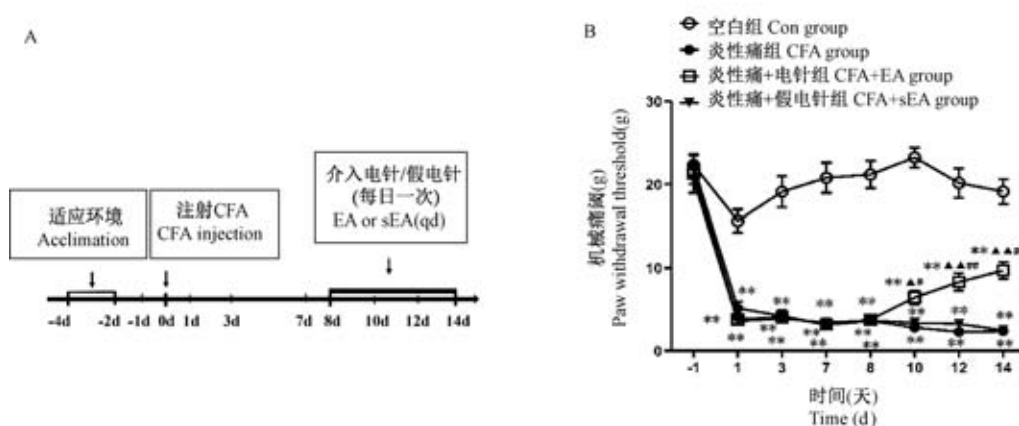
2 结果

2.1 各组大鼠 PWTs 变化

如图 1 所示,造模前各组大鼠患侧基础 PWTs 无差异($P > 0.05$)。与 Con 组比较,余三组大鼠造模后 1、3、7 d 时 PWTs 显著降低($P < 0.01$);模后第 8 天介入电针治疗,每次电针治疗后 30 min 内完成 PWTs 测量。单次电针治疗后,CFA + EA 组大鼠患侧 PWTs 并未出现显著变化($P > 0.05$)。电针治疗 3、5、7 次后,CFA + EA 组大鼠患侧 PWTs 逐渐递增,显著高于同期 CFA 和 CFA + sEA 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但仍低于同期 Con 组($P < 0.01$)。结果提示重复电针治疗可有效缓解 CFA 诱发的慢性炎性痛。

2.2 各组大鼠 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达变化

如图 2 所示,造模后 14 d 时,CFA 大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达显著高于同期 Con 组(P



注:A:实验流程图;B:与同期 Con 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同期 CFA 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与同期 CFA + sEA 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 各组大鼠不同时间点 PWTs 变化

Note. A, Illustration of experimental design. B, Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with CFA group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$. Compared with CFA + sEA Group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following Figures)

Figure 1 Comparisons of PWTs among groups of rats at different timepoints

< 0.05); CFA + EA 组大鼠患侧 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达显著低于同期 CFA 组和 CFA + sEA ($P < 0.05$), 与同期 Con 组无明显差异 ($P > 0.05$); 而 CFA + sEA 组与同期 CFA 组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明电针可显著降低 CFA 大鼠患侧 DRG 中 GFAP 蛋白表达, 提示电针可抑制外周卫星胶质细胞活化。

2.3 各组大鼠 L4-6 DRG 中 P2X7R 蛋白表达变化

如图 3 所示, 于造模后 14 d, CFA 组大鼠患侧 L4-6 DRG 中 P2X7 蛋白表达显著高于同期 Con 组 ($P < 0.05$); 与同期 CFA 组比较, CFA + sEA 组大鼠患侧 DRG 中 P2X7 蛋白表达无明显差异 ($P > 0.05$); CFA + EA 组大鼠患侧 DRG 中 P2X7 蛋白表达显著低于同期 CFA 和 CFA + sEA 组 (均 $P < 0.05$)。结果表明电针可显著抑制 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 表达。

2.4 鞘内注射 P2X7R 选择性抑制剂 A740003 提高炎性痛大鼠机械痛阈

如图 4 所示, 实验大鼠接受鞘内置管术后予以

修复 1 周, 分别于模前 8 d、模前 1 d 检测两组大鼠基础 PWTs 情况, 两组间无明显差异 ($P > 0.05$)。两组大鼠经由相同造模处理, 模后两组痛阈均无差异 ($P > 0.05$)。实验大鼠于造模后 12 ~ 14 d 分别鞘内注射 A740003 或等量 0.1% DMSO 溶液, CFA + A740003 组大鼠患侧 PWTs 显著高于同期 CFA + DMSO 组 (均 $P < 0.01$)。结果提示鞘内给药 P2X7R 选择性抑制剂可拮抗 CFA 大鼠痛觉异常。

2.5 鞘内注射 P2X7R 激动剂 BzATP 翻转电针抗炎性痛效应

如图 5 所示, 实验大鼠接受鞘内置管术后予以修复 1 周, 分别于模前 8 d、模前 1 d 检测两组大鼠基础 PWTs 情况, 两组间无明显差异 ($P > 0.05$)。两组大鼠经由相同造模处理, 模后两组痛阈均无差异 ($P > 0.05$)。两组大鼠于造模后 8 ~ 11 d 均接收电针治疗, 组间无差异 ($P > 0.05$); 于造模后 12 ~ 14 d 各时点, CFA + EA + BzATP 组大鼠患侧足跖 PWTs 显著低于同期 CFA + EA + NS 组 (均 $P < 0.01$)。结果提示鞘内注射 P2X7R 激动剂 BzATP 可翻转 EA 对 CFA 大鼠的镇痛效应。

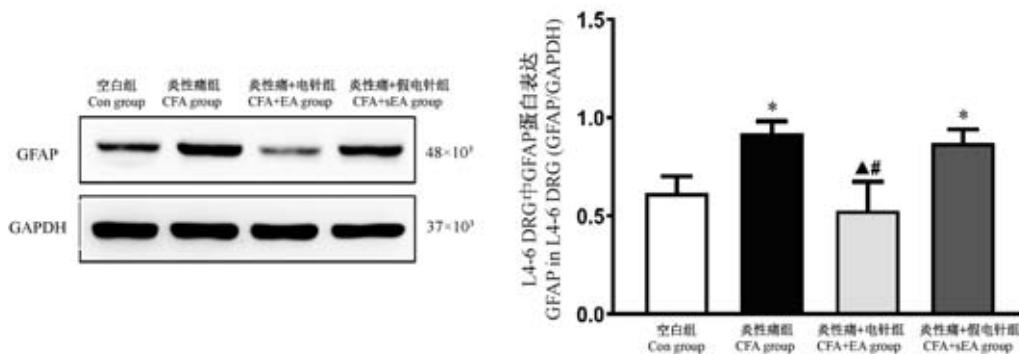


图 2 各组大鼠 L4-6 DRG 中 GFAP 蛋白表达变化

Figure 2 Changes of GFAP protein expression in L4-6 DRG among groups of rats

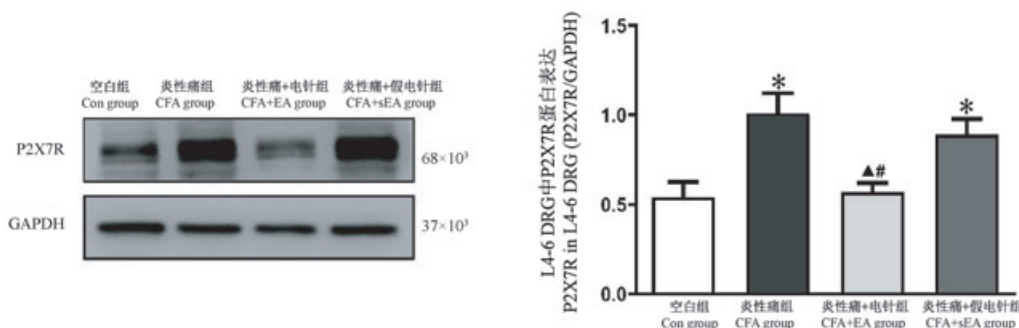
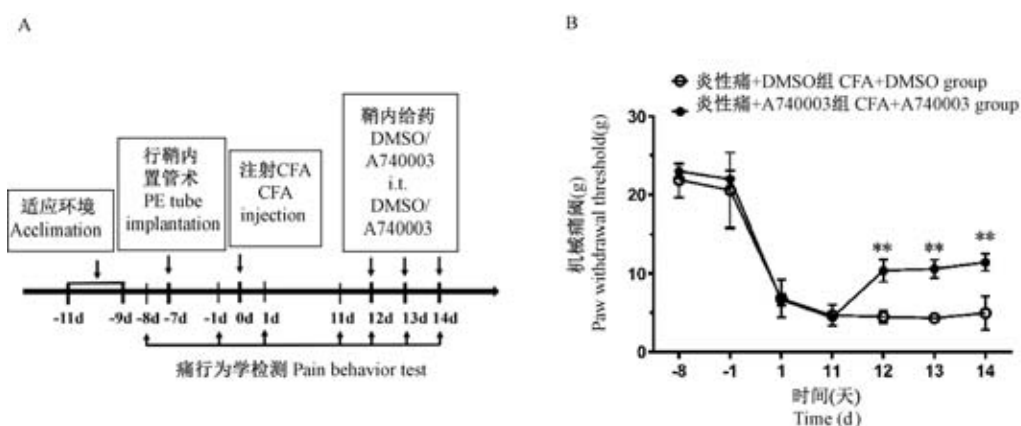


图 3 各组大鼠 L4-6 DRG 中 P2X7R 蛋白表达变化

Figure 3 Changes of P2X7R protein expression in L4-6 DRG among groups of rats

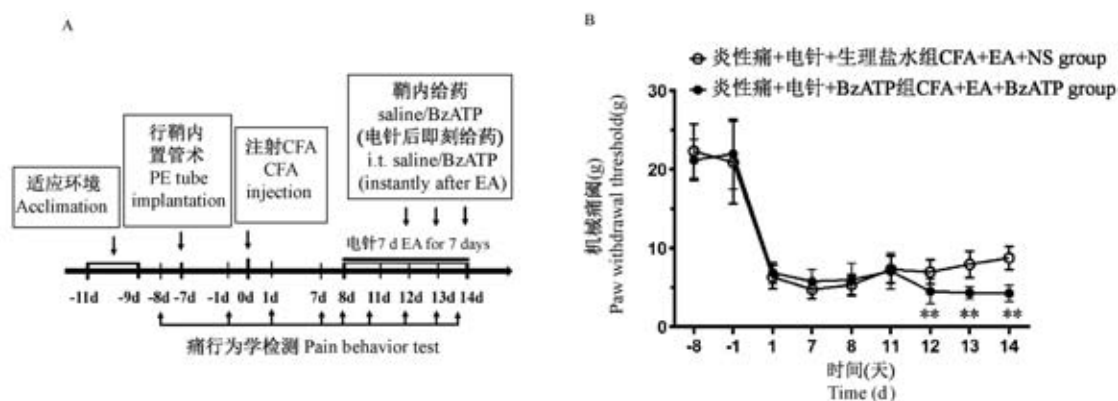


注:A: 实验流程图;B: 与 CFA+DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 鞘内给药 P2X7R 抑制剂 A740003 提高 CFA 大鼠患侧 PWTs

Note. A, Illustration of experimental design. B, Compared with CFA + DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Intrathecal injection of selective P2X7R inhibitor A740003 increased ipsilateral PWTs of CFA rats



注:A: 本实验流程及 PWTs 测量时点示意图。B: 与 CFA + EA + NS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 鞘内给药 P2X7R 激动剂 BzATP 翻转电针对 CFA 大鼠的镇痛效应

Note. A, Experiment process and timing of PWTs measurement. B, Compared with CFA + EA + NS group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Intrathecal injection of selective P2X7R agonist BzATP reversed EA's analgesia on CFA rats

3 讨论

电针疗法是传统针刺疗法与微量电流刺激相结合的一种新型疗法。最早于二十世纪五十年代由朱玉龙医生首次提出,用于替代临床针灸医师繁琐的运针过程。现代研究表明,电针是临床镇痛的常用针灸方法,具有绿色、副作用小,临床上易于推广等优点,广泛用于治疗炎性痛、神经病理性疼痛等各类疼痛。有临床观察研究结果表明电针镇痛取穴双侧肢体较单侧(患侧)疗效显著^[16]。课题组既往实验研究结果也表明,双侧电针穴位“昆仑”、“足三里”能有效缓解大鼠炎性痛^[17]。既往研究表明,CFA 致炎性痛大鼠模型于造模后 4 ~ 24 h 处于

急性期,1 ~ 3 d 处于亚急性期,3 d 后转向慢性痛^[18]。本研究前期实验表明,CFA 致炎性痛模型于模后 1 d 出现患侧 PWTs 显著下降,并持续维持较低痛阈至模后 42 d。模后 28 d,对侧 PWTs 显著降低,出现“镜像痛”并维持至模后 42 d。同时,热痛(thermal withdrawal latency, TWL)在模后 1 d 显著下降并持续至 14 d。现有研究表明,通过在足底内注射 CFA100 μL 可引起大鼠双侧机械性异常性疼痛,及患侧热痛觉过敏。CFA 致炎性痛患侧 PWTs 在模后(< 1 h)迅速下降,在模后 7 d 到达最低峰值,并持续维持较低痛阈至造模后 28 d。约在模后 28 d,对侧足跖也出现 PWTs 降低的情况。同时,CFA 致炎性痛也可引起 TWL 迅速下降(< 1 h)。TWL 在

模后 6 h 达到峰值,于模后 14 ~ 28 d 可缓慢恢复致正常水平^[18-19]。本研究中机械痛、热痛变化趋势与现有文献一致^[18-19],说明造模成功。Gao 等^[19]通过鞘内注射选择性 JNK 抑制剂,发现可降低 CFA 致慢性炎性痛维持阶段的机械痛,但对其引起的热痛没有影响。Lao 等^[20]也指出,腹腔注射纳洛酮(20 mg/kg)可逆转单次电针对 CFA 致炎性痛产生的机械痛阈下降。以上结果提示两者(热痛与机械痛)机制有所差别,在慢性炎性痛的维持阶段,机械痛变化较之热痛更具变化特点。由于本研究处于慢性炎性痛维持期,因此侧重机械痛的变化情况作为行为学测定标准。据研究表明,电针对 CFA 致炎性痛大鼠患侧 PWTs、TWL 均具有升高作用^[21-22],并且电针治疗在辣椒素、角叉菜胶及 CFA 等不同药物诱导的炎性痛模型均有效果^[23]。这与实验室前期结果^[24-25]相一致,提示电针治疗炎性痛效果确切。本研究中观察到连续 7 d 电针治疗可升高 CFA 致炎性痛大鼠患侧 PWTs 至模后 14 d,提示电针可以有效对抗炎性疼痛,与课题组以往研究结果相符^[17,23-24]。但本研究并未观察到单次电针的镇痛效应,可能与炎性痛大鼠在足底注射 CFA 后 24 h 时足部肿胀严重,导致大鼠缩足反应性降低所致,提示重复电针可有效缓解慢性炎性痛,而在炎性痛急性期治疗并不占优势。

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是初级感觉神经元的聚集地,负责将外周感觉信号传输至中枢神经系统;外周损伤引起的 DRG 神经元胞体诱发出持续性的自发异位放电,常被认为传入脊髓后可增强外周信号和激发放大效应^[25]。卫星胶质细胞(satellite glial cells, SGCs)分布在 DRG 神经元胞体周围,SGCs 活化可调控 DRG 神经元兴奋性参与外周痛觉敏化的调控。胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)被认为是中枢星型胶质细胞和外周卫星胶质细胞活化的特异性标志物。炎症、神经损伤等病理状态下 SGCs 可被激活,主要表现为 GFAP 表达增加^[26-27]。本研究观察到 CFA 大鼠造模后 14 d 患侧 L4-6 DRG 中 GFAP 表达显著增高。以往研究中在不同疼痛模型的不同时点也观察到与本研究类似结果。Liu 等^[28]在脊神经结扎(SNL)致神经病理性疼痛模型中,观察到 SNL 大鼠于术后 4 h 便观察到 DRG 中 GFAP 表达增加,并持

续高水平表达至术后 7 d。Nascimento 等^[29]研究表明,在 CFA 致炎性痛模型中背根神经节 GFAP 表达显著升高,造模后 7 d 到达表达高峰并维持高水平至实验结束。课题组以往研究结果显示,电针可抑制 SNL 大鼠脊髓背角 GFAP 表达,提示电针镇痛与其抑制星形胶质细胞密切相关^[13]。本研究中,我们观察到电针可显著抑制大鼠足底注射 CFA 引起的 DRG 中 GFAP 表达升高,提示背根神经节 SGCs 活化参与 CFA 诱发炎性痛,抑制 SGCs 活化介导电针抗大鼠炎性痛效应。

近来研究表明,P2X7 受体在疼痛的发展和维持中担当重要角色,在炎性痛、神经病理性疼痛等多种疼痛状态呈表达上调^[8-11]。已有研究证实 SGCs 活化与 P2X7R 表达增加成正相关,GFAP 与 P2X7R 蛋白表达在 CCI 模型导致的神经病理性疼痛状态下均有升高趋势^[30];Wu 等^[31]发现在 gp120 诱导的神经病理性疼痛中大鼠 DRG 内 P2X7R 和 GFAP 的荧光共表达增加。在外周神经组织中,嘌呤 P2X7 受体特异性表达于 SGCs 中,背根神经元和 SGCs 可以通过 ATP 释放和 P2X7R 激活进行细胞间通信。以往有研究发现 CFA 大鼠 DRG 中 P2X7R 蛋白表达显著升高;敲除 P2X7R 基因可消除炎症诱发的痛觉过敏;于大鼠足跖局部注射 P2X7R 非特异性拮抗剂 oxidized ATP (ox ATP) 或鞘内注射 A740003 可有效缓解不同造模方式导致的炎性疼痛^[32-33]。本研究结果也观察到 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 蛋白表达显著升高,且鞘内注射 P2X7R 拮抗剂 A740003 可有效提高 CFA 大鼠缩腿阈进而缓解炎性疼痛,与以往研究结果较一致^[32-33]。关于 EA 是否通过调控 P2X7R 表达发挥镇痛作用相关研究并不多见,主要集中于 EA 对中枢脊髓 P2X7R 表达的干预研究。以往研究表明,EA 可通过抑制脊髓 P2X7R 阳性小胶质细胞活化进而缓解神经损伤诱发的痛觉过敏^[34];在颈部术后切口痛模型中,电针可通过抑制颈髓 P2X7R 介导 fractalkine/CX3CR1 信号通路活化发挥镇痛效应^[35]。然而,抑制外周 P2X7R 表达是否参与电针镇痛的相关性研究,尚未见相关报道。本研究观察到电针可以显著抑制 CFA 大鼠患侧 DRG 中 P2X7R 蛋白表达,且鞘内注射 P2X7R 特异性激动剂 BzATP 可有效翻转电针镇痛效应,结果提示外周 P2X7R 参与电针抗炎性痛

效应。

综上所述,电针可有效缓解大鼠慢性炎性痛,抑制外周 SGCs 及其 P2X7R 活化可能是电针抗炎性痛的外周作用机制之一。

参 考 文 献(References)

- [1] Van Hecke O, Torrance N, Smith BH. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance[J]. Br J Anaesth, 2013, 111(1): 13-18.
- [2] Pitcher MH, Von Korff M, Bushnell MC, et al. Prevalence and profile of high-impact chronic pain in the united states[J]. J Pain, 2019, 20(2): 146-160.
- [3] Chen B, Li L, Donovan C, et al. Prevalence and characteristics of chronic body pain in china: A national study [J]. Springerplus, 2016, 5(1): 938.
- [4] Zghoul N, Ross EL, Edwards RR, et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics: A randomized telephone survey among medical center patients in kuwait[J]. J Pain Res, 2017, 10: 679-687.
- [5] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明[J]. 针刺研究, 2001: 224-227.
Han JS. Further proof of frequency specificity of acupuncture analgesia [J]. Acupuncture Research, 2001, 26(3): 224-227.
- [6] Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, et al. Disruption of the p2x7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain[J]. Pain, 2005, 114(3): 386-396.
- [7] Chen Y, Wang CY, Li GW, et al. Activation of p2x7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of p2x3 receptors in nociceptive neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(43): 16773-16778.
- [8] McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, et al. P2x7-related modulation of pathological nociception in rats[J]. Neuroscience, 2007, 146(4): 1817-1828.
- [9] Liu S, Shi Q, Zhu Q, et al. P2x(7) receptor of rat dorsal root ganglia is involved in the effect of moxibustion on visceral hyperalgesia[J]. Purinergic Signal, 2015, 11(2): 161-169.
- [10] Tang Y, Yin HY, Liu J, et al. P2x receptors and acupuncture analgesia[J]. Brain Res Bull, 2019, 151: 144-152.
- [11] Fernandes NC, Sriram UG, et al. Methamphetamine alters microglial immune function through P2X7R signaling [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 91.
- [12] Du JY, Fang JQ, Liang Y, et al. Electroacupuncture attenuates mechanical allodynia by suppressing the spinal jnk1/2 pathway in a rat model of inflammatory pain[J]. Brain Res Bull, 2014, 108: 27-36.
- [13] Liang, Y, Du JY, Qiu YJ, et al. Electroacupuncture attenuates spinal nerve ligation-induced microglial activation mediated by p38 mitogen-activated protein kinase [J]. Chin J Integr Med, 2015, 22(9), 704-713.
- [14] Liang Y, Fang JQ, Du JY, et al. Effect of electroacupuncture on activation of p38mapk in spinal dorsal horn in rats with complete freund's adjuvant-induced inflammatory pain [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 568273.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55-63.
- [16] 方剑乔, 刘元亮. 电针巨刺与患侧针刺镇痛的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(10): 579-582.
Fang JQ, Liu YL. Clinical and experimental study on giant needle electroacupuncture and acupuncture analgesia on the affected side[J]. Chin J Integr Trad West Med, 1994, 14(10): 579-582.
- [17] 项璇儿, 杜俊英, 方剑乔, 等. 电针对 CFA 致炎性痛大鼠热痛和机械痛优效频率观察及机制初探 [J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(12): 891-897, 922.
Xiang X, Du JY, Fang JQ, et al. Observation of the frequency and effect of electroacupuncture on heat and mechanical pain in rats with CFA-induced inflammatory pain [J]. J Zhejiang Univ Trad Chin Med, 2016, 40(12): 891-897, 922.
- [18] Nagakura Y, Okada M, Kohara A, et al. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant-induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics [J]. J PH-Armacol Exp Ther, 2003, 306(2): 490-497.
- [19] Gao YJ, Xu ZZ, Ji RR, et al. The c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in spinal astrocytes is required for the maintenance of bilateral mechanical allodynia under a persistent inflammatory pain condition[J]. Pain, 2010, 148(2): 309-319.
- [20] Lao L, Zhang RX, Zhang G, et al. A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats[J]. Brain Res, 2004, 1020(1-2): 18-29.
- [21] Zhang Y, Li A, Xin J, et al. Involvement of spinal serotonin receptors in electroacupuncture anti-hyperalgesia in an inflammatory pain rat model [J]. Neurochem Res, 2011, 36(10): 1785-1792.
- [22] Zhang R, Lao L, Ren K, et al. Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain[J]. Anesthesiology, 2014; 120(2): 482-503.
- [23] Fang JQ, Du JY, Fang JF, et al. Parameter-specific analgesic effects of electroacupuncture mediated by degree of regulation TRPV1 and P2X3 in inflammatory pain in rats [J]. Life Sci, 2018, 200: 69-80.
- [24] Xiang X, Wang SS, Shao FB, et al. Electroacupuncture stimulation alleviates CFA-induced inflammatory pain via suppressing P2X3 expression [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 3248.
- [25] Warwick RA, Hanani M. The contribution of satellite glial cells

- to chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. *Eur J Pain*, 2013, 17(4): 571–580.
- [26] Kasuya G, Yamaura T, Ma XB, et al. Structural insights into the competitive inhibition of the atp-gated p2x receptor channel [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 876.
- [27] Lemes JBP, de Campos Lima T, Santos DO, et al. Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 676: 8–12.
- [28] Liu FY, Sun YN, Wang FT, et al. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation [J]. *Brain Res*, 2012, 1427: 65–77.
- [29] Nascimento DS, Castro-Lopes JM, Moreira Neto FL. Satellite glial cells surrounding primary afferent neurons are activated and proliferate during monoarthritis in rats: is there a role for ATF3? [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108152.
- [30] Xie JY, Liu SM, Wu B, et al. The protective effect of resveratrol in the transmission of neuropathic pain mediated by the P2X7 receptor in the dorsal root ganglia [J]. *Neurochem Int*, 2017, 103:24–35.
- [31] Wu B, Ma YC, Yi ZH, et al. Resveratrol-decreased hyperalgesia mediated by the P2X7 receptor in gp120-treated rats [J]. *Molecular Pain*, 2017, 13:1–9.
- [32] Chen Y, Zhang X, Wang C, et al. Activation of P2x7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2x3 receptors in nociceptive neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(43):16773–16778.
- [33] Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, et al. Mammalian p2x7 receptor pharmacology: Comparison of recombinant mouse, rat and human p2x7 receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(7): 1203–1214.
- [34] Xu J, Chen XM, Zheng BJ, et al. Electroacupuncture relieves nerve injury-induced pain hypersensitivity via the inhibition of spinal P2X7 receptor-positive microglia [J]. *Anesth Analg*, 2015, 122(3):882–892.
- [35] Gao YH, Li CW, Wang JY, et al. Effect of electroacupuncture on the cervicospinal P2X7 receptor/fractalkine/CX3CR1 signaling pathway in a rat neck-incision pain model [J]. *Purinergic Signal*, 2017, 13(2):215–225.

[收稿日期] 2020-04-27

张薇,赵映,郑倩华,等. 肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 503-509.

Zhang W, Zhao Y, Zheng QH, et al. Methods for establishing rat models of irritable bowel syndrome visceral hypersensitivity[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 503-509.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.010

肠易激综合征内脏高敏模型不同制作方法的比较研究

张薇,赵映,郑倩华*,黎明,张健强,李瑛,蔡定均

(成都中医药大学针灸推拿学院,成都 610072)

【摘要】 目的 研究不同方法制作 IBS 内脏高敏幼鼠模型,并对其内脏敏感性 & 稳定性进行评价。**方法** 将出生后第 2 天的 SD 大鼠幼鼠随机分成母婴分离组(A组)、不可预测性母婴分离组(B组)和空白对照组(C组)。造模成功后,观察大鼠一般情况 & 大便情况,并通过腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分 & 内脏痛阈值测定大鼠内脏高敏性及持续性,检测结束后,取大鼠结肠组织进行病理检测。**结果** 各组间体重、结肠病理组织检测无显著差异($P > 0.05$);与 A 组 & C 组比较, B 组大鼠大便颗数增多、粪便含水量增加;与 C 组相比, A 组 & B 组大鼠的 AWR 评分更高,且在 9 周龄时达到峰值,而在 11 周龄, A 组 & B 组大鼠 AWR 评分较之前降低;在 5 ~ 9 周龄期间,与 C 组比较, A 组 & B 组引起的内脏痛阈值更低。**结论** 母婴分离 & 不可预测性母婴分离均可模拟出 IBS 内脏高敏性模型,其中不可预测性母婴分离模型更适合制作腹泻型 IBS 模型。同时, IBS 内脏高敏存在时间依赖性,模型稳定期多为造模结束后到大鼠 9 周龄以内。

【关键词】 肠易激综合征;内脏高敏;母婴分离;模型评价

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0503-07

Methods for establishing rat models of irritable bowel syndrome visceral hypersensitivity

ZHANG Wei, ZHAO Ying, ZHENG Qianhua*, LI Ming, ZHANG Jianqiang, LI Ying, CAI Dingjun

(Acupuncture and Tuina College, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

Corresponding author: ZHENG Qianhua. E-mail: zhengqianhua@cdutcm.edu.cn

【Abstract】 Objective To assess visceral hypersensitivity and constancy of visceral hypersensitivity models of irritable bowel syndrome (IBS) in rats. **Methods** Two-day-old Sprague-Dawley rat pups were randomly divided into the neonatal maternal separation group (group A), the unpredictable neonatal maternal separation group (group B), and the control group (group C). After successful modeling, the rats' general conditions and stools were observed, and their visceral hypersensitivity and constancy were determined via the abdominal wall withdrawal reflex and visceral pain threshold. After testing, the rats' colonic tissue was taken for pathological examination. **Results** Body weight and colonic pathological examinations did not differ between the groups ($P > 0.05$). Compared with groups A and C, rats in group B had increased stools and stool water content. Compared with groups B and C, the abdominal withdrawal reflex (AWR) threshold was highest in the group A rats and peaked at 9 weeks of age. The visceral pain threshold did not differ between groups A and B but was lower in both groups compared with that of group C ($P > 0.05$). **Conclusions** Both the neonatal

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81804207),四川省教育厅一般项目(18ZB0198),成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(BSH2018015),成都中医药大学校基金项目(ZRYY1740)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81804207), Scientific Research Foundation of the Education Department of Sichuan Province (18ZB0198), Chengdu University of Traditional Chinese Medicine “Xinglin Scholar” Academic Research Talent Upgrade Plan (BSH2018015), Project of University Fund of Chengdu University of Chinese Medicine (ZRYY1740).

【作者简介】 张薇(1994—),女,硕士研究生,主要从事针刺治疗肠易激综合征机制研究。Email: zhangwei@stu.cdutcm.edu.cn

【通信作者】 郑倩华(1984—),女,博士,博士后,讲师,主要从事针灸治疗胃肠病的临床及机制研究。Email: zhengqianhua@cdutcm.edu.cn

maternal separation and the unpredictable neonatal maternal separation models simulated the IBS visceral hypersensitivity model. The unpredictable neonatal maternal separation model better simulated a diarrheal IBS model. The visceral hypersensitivity model was time-limited, and the optimal experimental time was within 9 weeks of age.

【**Keywords**】 irritable bowel syndrome (IBS); visceral hypersensitivity; neonatal maternal separation; model evaluation

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

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床常见的功能性肠病,以腹痛、排便习惯改变及粪便性状异常为主要临床表现^[1]。流行病学研究发现,IBS 影响约 11% 的全球人口,在中国 IBS 患病率为 0.82% ~ 11.5%^[2]。现代研究表明 IBS 的发病与内脏感觉过敏、胃肠动力学失常、精神因素、感染因素等相关^[3]。其中内脏高敏作为 IBS 最主要的病变特征之一,其主要表现为内脏组织对生理性刺激及伤害性刺激的敏感性及反应性增强^[4]。在课题组前期研究中发现,IBS 内脏高敏的造模方法较多,虽各有优势,但都缺乏对模型内脏高敏状态的稳定性和持续性进行深入研究。另外,目前研究 IBS 内脏高敏所使用的幼鼠模型最常用的造模方法为新生期母婴分离(neonatal maternal separation, NMS)法^[5-6],然而这种造模方式尚不完善^[7],且刺激因素相对单一。因此,我们将 NMS 造模方法与慢性不可预测性应激^[8]当中的时间应激相结合,并把此模型称之为不可预测性母婴分离模型,将其与传统母婴分离模型相比较,评估内脏高敏性及稳定性和持续性上有何异同,为 IBS 内脏高敏幼鼠模型的研究和该病的相关治疗研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

2 日龄清洁级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体重(8 ± 2.5)g,由成都中医药大学实验动物研究中心提供【SCXK(川)2019-11】,动物在成都中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养【SYXK(川)2019-049】,室内温度 18 ~ 24℃,湿度 50% ~ 70%,昼夜节律 12 h: 12 h。所有操作均符合成都中医药大学实验伦理学要求(成都中医药大学动物伦理备案号:2019-06),并且实验操作过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 试剂与仪器

二甲苯(AR 级),批号:20181020,福晨(天津)化学试剂有限公司;苏木素染液,批号:G1005-1,武

汉赛维尔生物技术有限公司;伊红染液,批号:G1001,武汉赛维尔生物技术有限公司;盐酸(AR 级),批号:20180118,成都市科龙化工试剂厂生产;中性树胶,批号:BL704 A, Biosharp 生物公司;转轮式切片机(徕卡-2016,德国);TSJ-II 型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司,中国);BMJ-III 型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂,中国);PHY-III 型病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司,中国);数码三目摄像显微镜(BA400Digital,麦克奥迪实业集团有限公司,中国);图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

每只幼鼠与哺乳母鼠共同饲养于塑料笼内,幼鼠在出生后第 22 天断奶,第 30 天分笼,并进行雌雄分离。哺乳母鼠自由进食与饮水。采用随机数字表将幼鼠随机分成母婴分离组(A 组)、不可预测性母婴分离组(B 组)和空白对照组(C 组),每组 10 只,雌雄各半。

1.2.2 肠易激综合征内脏高敏性模型的建立

A 组:乳鼠在出生后 2 ~ 21 d 每天与母鼠分离 3 h(9:00-12:00)。B 组:乳鼠在出生后 2 ~ 21 d 每天与母鼠分离 3 h,每天随机安排分离时间刺激,分离时间段为:①9:00-12:00;②14:00-17:00;③19:00-22:00,且每个分离时间段不连续出现 3 d,使动物不能预料分离刺激的发生。C 组:乳鼠在出生后 2 ~ 21 d 与母鼠一直共同饲养,不做任何分离处理。

1.2.3 观察指标

(1) 一般情况

造模结束后,在大鼠 5 周龄、7 周龄、9 周龄和 11 周龄时对所有组别的大鼠进行体重测量,并且观测所有组别大鼠的精神状态、皮毛色泽、活动度及进食量,并将以上指标作详细记录。进食量检测方法为:将各组大鼠进行单笼饲养,称取 24 h 前后饲料重量,进食量(g)=原有饲料量(g)-剩余量(g)。

(2) 大便情况

造模结束后,在大鼠 11 周龄时观测各组大鼠的大便颗数及粪便性状,采用 Bristol 大便分型量表^[9]判断粪便性状,评分标准为:1 分,分离的硬团;2 分,团块状;3 分,干裂的香肠状;4 分,柔软的香肠状;5 分,软的团块;6 分,泥浆状;7 分,水样便。并测定粪便含水量,方法如下:对所有组别大鼠分笼单只饲养,在自由进食与饮水的情况下,每隔 2 h 收集各组大鼠粪便一次,共收集 12 h 粪便,使用电子天平称得湿重后,放入 50℃ 烤箱内烘烤 6 h 后,取出称干重,计算粪便含水量。含水量=(湿重-干重)×100%。

(3) 内脏高敏测定

造模结束后,在大鼠 5 周龄、7 周龄、9 周龄和 11 周龄时进行不同压力下结直肠扩张(colorectal distention, CRD)刺激,并使用腹壁撤退反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)评分及内脏痛阈值进行评价,以评估其内脏敏感性。

腹壁撤退反射评分:实验前 24 h 禁食但不禁水,单手抓握大鼠后轻揉其肛口,排尽粪便后,用少量乙醚麻醉。将麻醉后的大鼠放入自制的大鼠固定器中(清醒后大鼠在该固定器中只能上下运动,无法前后活动及转身),将涂抹石蜡油的球囊导管轻柔插入大鼠肛门,使球囊末端距肛门约 1 cm,并用胶带将导管与鼠尾根部固定。待大鼠清醒并能适应环境后,向球囊内迅速充气,使球囊扩张压在短时间内分别达到 20、40、60 和 80 mmHg。每个压力梯度保持 30 s,并观察记录 AWR 评分。使用腹壁撤退反射评分,评分标准:0 分:给予扩张刺激时大鼠的情绪基本稳定;1 分:给予扩张刺激时大鼠变的相对不稳定,偶尔扭动头部;2 分:腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面;3 分:腹背部肌肉强烈收缩并把腹部抬离地面;4 分:腹部肌肉强烈收缩,腹部呈弓形并把腹部、会阴部抬离地面^[10]。每次检测重

复 3 次,评分过程采用盲法评价,避免人为的主观影响。

内脏痛阈值:将大鼠放入固定器中并插入球囊导管(方法与腹壁撤退反射一致),向球囊内迅速充气,压力从 0 mmHg 每次匀速递增 5 mmHg,每次扩张持续 30 s 以观察大鼠的反应,待大鼠安静 1 min 后,反复多次加压直至大鼠腹部抬起和背部拱起(即 AWR 评分为 3 分)时的最低压力值作为内脏痛阈值^[11]。每个压力值重复 3 次检测,取平均值整个检测过程中为防止球囊对大鼠肠粘膜有所损害,球囊压力控制在 0 ~ 80 mmHg 之间。

(4) 大鼠结肠组织病理观察

在上述检测结束后,使用颈椎脱臼法处死大鼠后,迅速取距肛门 4 ~ 5 cm 处约 1 cm 的远端结肠,用 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片,用苏木精-伊红染色,在光学显微镜下观察切片:炎性细胞(主要是中性粒细胞)在全层中浸润化及浸润的程度,各细胞间质之间的水肿情况,并根据结肠病理组织评价炎症分级^[12]标准进行评分,如表 1 所示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计学分析。首先对数据进行正态性分析,符合正态分布的数据采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,采用单因素方差分析进行比较。由于多个时间点比较,故组间和组内差异同时采用重复测量进行比较。不满足正态分布的数据采用中位数(P25, P75)描述,采用秩和检验进行比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

由表 2 中所示,各组大鼠间体重无显著性差异($P > 0.05$)。由于不同性别大鼠在发育过程中体重

表 1 结肠病理组织评价炎症分级

Table 1 Evaluation of colonic pathological tissue inflammation grade

分级 Systematics	表现 Performance
-(0 分) 0 mark	无炎症,固有层中无中性粒细胞浸润,间质无水肿 No inflammation, no neutrophil infiltration in the propria, no edema in the interstitial
+(1 分) 1 mark	轻度,固有层少量中性粒细胞浸润,轻度或无间质水肿 Mild, with a small amount of neutrophil infiltration in the lamina propria, mild or no interstitial edema
++(2 分) 2 marks	中度,固有层中等量粒细胞浸润,间质中度水肿 Moderate, moderate granulocyte infiltration in the lamina propria, moderate interstitial edema
+++ (3 分) 3 marks	重度,固有层中有量到大量中性粒细胞弥漫性浸润,严重间质水肿 Severe, moderate to large neutrophil diffuse infiltration in the lamina propria, severe interstitial edema

增长会存在差异,因此我们对各组同性别大鼠的体重做了比较,结果显示在 7 周龄及 11 周龄时,各组同性别大鼠间体重无显著性差异($P>0.05$) (见图 1)。此外,与 C 组比较,A 组和 B 组大鼠精神较差,毛发枯黄无光泽,活动减少,且进食量也有所减少(表 3)。

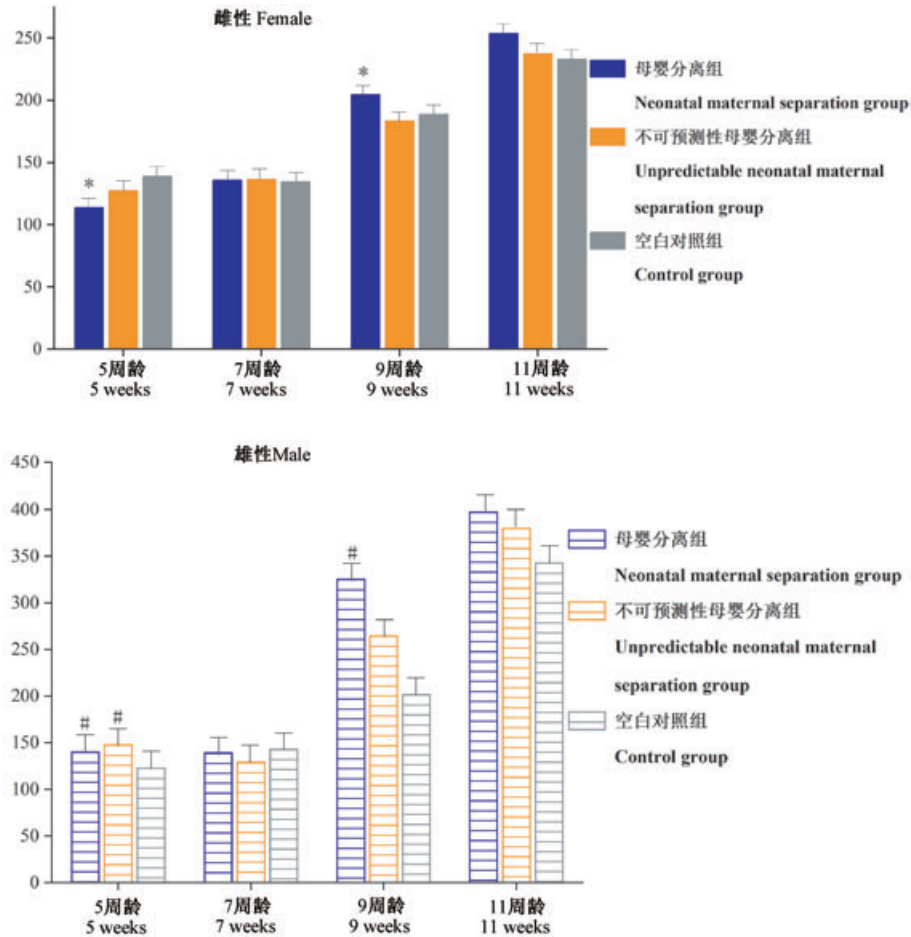
2.2 大便情况

如表 4 所示,与 C 组比较,B 组在大便颗数及粪便含水量上均有增加,且差异有显著性($P<0.05$);另外,A 组与 B 组两两比较显示,B 组大鼠大便颗数、粪便含水量增加更多,且有显著性差异($P<0.05$)。

表 2 不同时间点各组大鼠体重比较($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

Table 2 Comparison of the weight of rats in different groups at different time points($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

组别 Groups	5 周龄 5 weeks	7 周龄 7 weeks	9 周龄 9 weeks	11 周龄 11 weeks
母婴分离组 Neonatal maternal separation group	121.52 ± 13.63	136.58 ± 4.69	240.67 ± 60.01	296.76 ± 74.02
不可预测性母婴分离组 Unpredictable neonatal maternal separation group	135.47 ± 13.37	133.47 ± 8.31	215.73 ± 49.83	294.34 ± 74.77
空白对照组 Control group	130.72 ± 12.11	138.63 ± 11.25	195.00 ± 39.92	287.78 ± 64.12
P	0.069	0.406	0.149	0.958



注:与空白对照组大鼠比较, * $P<0.05$, # $P<0.05$ 。

图 1 各组间同性别大鼠在不同年龄段的体重(g)比较

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

Figure 1 Comparison of body weight (g) of rats of the same sex between different groups at different ages

表 3 各组大鼠进食量比较($\bar{x} \pm s, n = 10, g$)Table 3 Comparison of food intake of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, g$)

组别 Groups	5 周龄 5 weeks	7 周龄 7 weeks	9 周龄 9 weeks	11 周龄 11 weeks
母婴分离组 Neonatal maternal separation group	4.00 $\pm$ 0.000	4.20 $\pm$ 1.033	2.80 $\pm$ 1.135 *	3.60 $\pm$ 0.966
不可预测性母婴分离组 Unpredictable neonatal maternal separation group	4.60 $\pm$ 0.843	3.80 $\pm$ 1.033	2.40 $\pm$ 1.647 *	4.20 $\pm$ 1.033
空白对照组 Control group	4.60 $\pm$ 0.843	4.40 $\pm$ 0.966	4.40 $\pm$ 0.966	5.00 $\pm$ 0.000

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$.表 4 各组大鼠大便颗粒数、性状及含水量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Comparison of the number of stool particles, characters and water content of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	大便颗粒(颗) Stool particles(Pieces)	大便性状(分) Stool characteristics(marks)	粪便含水量(%) Fecal water content(%)
母婴分离组 Neonatal maternal separation group	6.400 $\pm$ 5.720 [▲]	4.323 $\pm$ 0.74	1.124 $\pm$ 1.160 [▲]
不可预测性母婴分离组 Unpredictable neonatal maternal separation group	15.700 $\pm$ 8.520 *	3.887 $\pm$ 0.35	2.581 $\pm$ 1.190 *
空白对照组 Control group	6.900 $\pm$ 5.950 [▲]	3.847 $\pm$ 0.27	0.789 $\pm$ 0.700 [▲]

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与不可预测性母婴分离组比较, [▲] $P < 0.05$ 。(下表同)Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with unpredictable neonatal maternal separation group, [▲] $P < 0.05$. (The same in the following Tables)

2.3 内脏高敏测定

2.3.1 腹壁撤退反射评分

由图 2 所示,与 C 组相比, A 组及 B 组大鼠 AWR 评分更高,且在 9 周龄时达到峰值,而在 11 周龄, A 组及 B 组大鼠 AWR 评分较之前降低。此外,各组同周龄大鼠 AWR 评分比较,在 5 ~ 9 周龄期间,以 A 组大鼠的 AWR 评分最高。

2.3.2 内脏痛阈值

由表 5 所示,与 C 组比较,在 5 ~ 9 周龄期间, A 组和 B 组引起腹部抬起与背部拱起的压力值更低,但是在 11 周龄时痛阈值较 C 组更高。

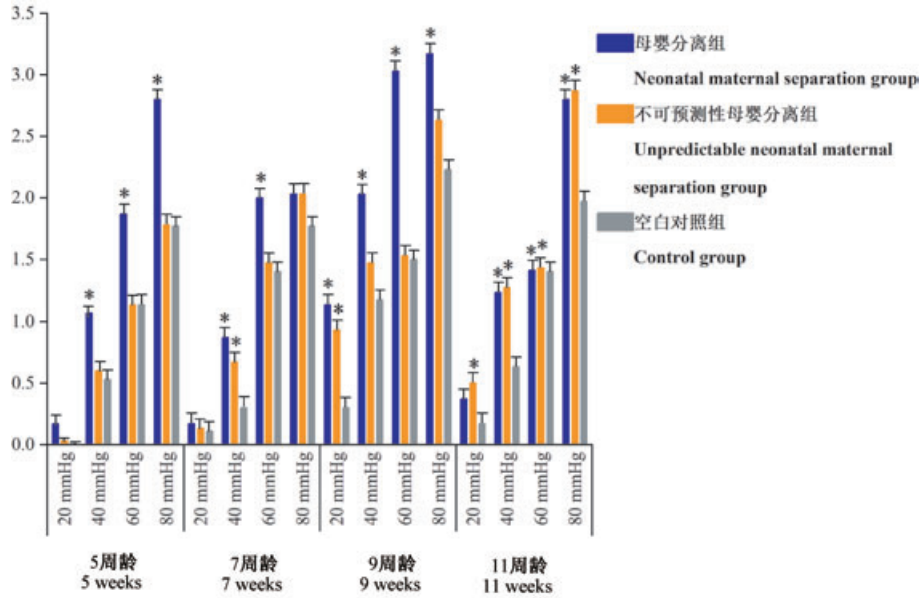
2.4 大鼠结肠组织病理观察

如图 3 所示, A 组和 B 组动物结肠组织形态较为完整,分层较为明显,结构清晰;黏膜层结构完整,单层柱状上皮细胞排列紧密,形态正常,胞质染色均匀,胞核轮廓清晰,未见变性或坏死脱落,部分动物固有层内少量肠腺出现变性坏死,长单管状结构消失,少量炎细胞呈小灶状聚集,包括中性粒细胞及淋巴细胞;间质内未见明显水肿;黏膜下层可见少量炎细胞散在分布;黏膜下层、肌层和外膜连接紧密,结构完整清晰,其他未见明显病理变化。C 组未见异常。最后统计结果显示,与 C 组相比, A 组和 B 组病理评分稍有升高,但均不具有统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究将新生期母婴分离的造模方法与慢性不可预测性应激当中的时间应激相结合,制作了不可预测性母婴分离模型。旨在将母婴分离这一种单一因素的造模方法与其他刺激因素相结合,更能体现出 IBS 发病复杂性的特点。同时,大量实验中母婴分离模型的分离时间相对固定(一般为上午)^[13-14],此分离时间存在局限性,易对幼鼠产生耐受,故我们在母婴分离模型中加入了时间随机这一不可预测性应激刺激,使幼鼠不能提前感知母婴分离刺激的到来,不易产生耐受。

从本研究的结果可以看出,母婴分离法与不可预测性母婴分离法均可复制 IBS 模型,但各自的侧重点不同,从大便情况来看,与母婴分离组及空白对照组比较,不可预测性母婴分离组大鼠大便颗粒数更多,多为软稀便,且粪便含水量增加更多,这说明与其余两组相比,不可预测性母婴分离模型更符合制作腹泻型 IBS 模型。而从 IBS 内脏高敏测定上,与空白对照组和不可预测性母婴分离组大鼠比较, 5 ~ 9 周龄期间,母婴分离组大鼠的 AWR 评分最高,这说明母婴分离组的内脏高敏程度高于其余两组,更适合制作 IBS 内脏高敏模型。从 IBS 内脏高敏持续性测定可以看出,内脏高敏状态具有时间依赖



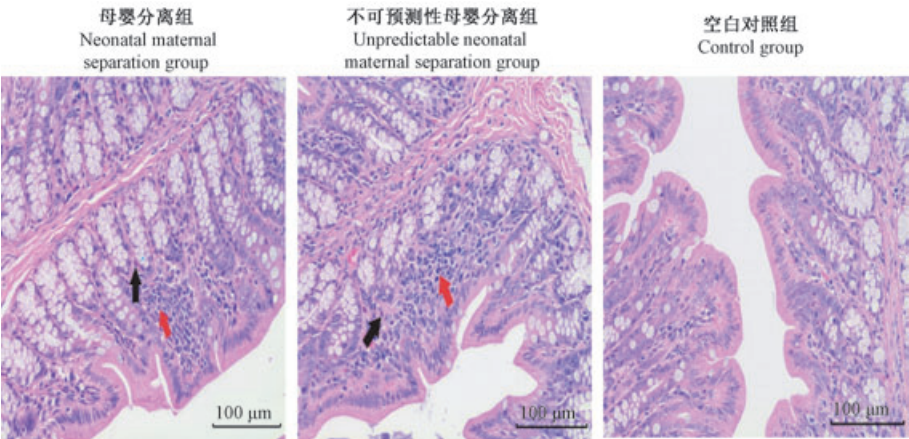
注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。
图 2 不同时间点不同直肠扩张压力下各组大鼠 AWR 的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of AWR of rats in different groups under different rectal dilatation pressure at different time points($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 5 不同时间点各组大鼠内脏痛阈值的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmHg)

Table 5 Comparison of visceral pain thresholds of rats in different groups at different time points($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmHg)

组别 Groups	5 周龄 5 weeks	7 周龄 7 weeks	9 周龄 9 weeks	11 周龄 11 weeks
母婴分离组 Neonatal maternal separation group	69.67 ± 10.83	68.67 ± 7.40	55.67 ± 12.77*▲	74.67 ± 4.77
不可预测性母婴分离组 Unpredictable neonatal maternal separation group	72.00 ± 4.21	66.00 ± 15.78	76.80 ± 5.18	75.97 ± 4.66
空白对照组 Control group	74.00 ± 5.16	75.00 ± 8.18	76.90 ± 8.18	73.00 ± 6.75



注:中性粒细胞(↑);淋巴细胞浸润(↑)。
图 3 各组结肠组织病理光镜观察图(× 400, 标尺 = 100 μm)
Note. Neutrophils (↑). Lymphocyte infiltration (↑).

Figure 3 Pathological observation of colonic tissue in each group (× 400, Scale bar=100 μm)

性。在造模后,大鼠呈现出内脏高敏状态,且在 9 周龄时达到峰值,而在大鼠 11 周龄时有所下降。这一现象提示在研究 IBS 幼鼠模型内脏高敏状态时,应严格注意时间。造模后,模型在 9 周龄之前呈现出稳定的内脏高敏状态,在这之后便出现内脏高敏自愈倾向。同时,这一现象也提示在研究相关干预措施对内脏高敏状态的治疗作用中,应该充分考虑模型自愈可能带来的效力评价准确性、客观性问题。从实验结果可以看出,幼鼠在造模结束后,内脏高敏敏感性仅能维持到成年后 3 周内,而幼鼠模型需在其成年后(即 8 周龄)才能施加干预措施,因此我们在造模后施加干预措施时,应在幼鼠模型成年后 3 周以内施加,才能准确观测到干预措施对模型内脏高敏状态的影响。

综上所述,母婴分离法及不可预测性母婴分离法均可模拟 IBS 内脏高敏模型,但各具优劣及其适合的研究症状。此外,本研究发现幼鼠模型内脏高敏状态存在时间依赖性,最佳研究时间为大鼠 9 周龄以内。本研究创新性的制作不可预测性母婴分离模型,弥补了传统母婴分离模型分离时间存在耐受性不足,并且观察了该模型的内脏高敏持续性,这在前期文献研究中鲜有研究及说明,对今后该疾病的模型评价及干预措施研究提供证据。

然而本研究尚存在一些不足,在研究中仅对模型的一般情况、大便性状、内脏敏感性及肠道病理情况进行测定,未针对模型的心理状态进行深入研究,在后期研究中可以增加高架十字迷宫、旷场试验等动物模型精神行为学的检测,以检测母婴分离模型及不可预测性母婴分离模型对幼鼠的精神活动有无影响。另外,使用腹壁撤退反射评分及内脏痛阈值进行内脏高敏评价具有一定的主观性,因此在后期可加入腹壁肌电活动或脊髓诱发电位等检测对内脏敏感性测定有更为客观的评价。本文对通过不同方法制作 IBS 内脏高敏幼鼠模型,并对其内脏高敏情况及模型持续性进行了评价,为今后 IBS 内脏高敏模型的建立、运用及治疗评价等基础研究提供思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Ma J, Li J, Qian M, et al. The comprehensive pathophysiological changes in a novel rat model of postinflammatory visceral hypersensitivity[J]. *FASEB J*, 2019, 33(12):13560-13571.
- [2] Ju T, Naliboff BD, Shih W, et al. Risk and protective factors related to early adverse life events in Irritable Bowel Syndrome[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2020, 54(1):63-69.
- [3] Ceuleers H, Van Spaendonck H, Hanning N, et al. Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome: The role of proteases[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(47):10275-10286.
- [4] Grundy D. What activates visceral afferents? [J]. *Gut*, 2004, 53(2): ii5-ii8.
- [5] Riba A, Olier M, Lacroix-Lamande S, et al. Early life stress in mice is a suitable model for Irritable Bowel Syndrome but does not predispose to colitis nor increase susceptibility to enteric infections[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73(10):403-415.
- [6] 林泽斯,王洪琦.肠易激综合征母婴分离模型应用进展[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(4): 434-439.
Lin ZS, Wang HQ. Review of the application of neonatal maternal separation model in irritable bowel syndrome studies[J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 23(4):434-439.
- [7] 林滨榕,吴斌,卓玲,等.幼鼠慢性内脏高敏感模型的建立及评价[J]. *福建医科大学学报*, 2010, 44(2): 116-119.
Lin BR, Wu B, Zhuo L, et al. Establishment and evaluation of a model of visceral hyperalgesia in young rats[J]. *J Fujian Med Univ*, 2010, 44(2): 116-119.
- [8] Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. Electroacupuncture regulates disorders of gut-brain interaction by decreasing corticotropin-releasing factor in a rat model of IBS[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2019, 2019:1759842.
- [9] Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1997, 32(9): 920-924.
- [10] 陈颖,赵妍,罗丹妮,等.腹壁撤退反射实验测量方法概述[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 89-93.
Chen Y, Zhao Y, Luo DN, et al. A summary of measurement methods for abdominal withdrawal reflex test[J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(8):89-93.
- [11] Anand KJ, Coskun V, Thirivikraman KV, et al. Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups[J]. *Physiol Behav*, 1999, 66(4):627-637.
- [12] 滕卫军,杜小雪,丁明星,等.母婴分离致肠易激综合征大鼠模型的建立与评价[J]. *浙江医学*, 2016, 38(6): 412-415.
Teng WJ, Du XX, Ding MX, et al. Establishment of irritable bowel syndrome rat models with neonatal maternal separation method[J]. *Zhejiang Med J*, 2016, 38(6): 412-415.
- [13] 李延青,郭玉婷,左秀丽,等.肠易激综合征内脏感觉过敏动物模型的建立[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2003, 12(4): 332-335.
Li YQ, Guo YT, Zuo XL, et al. A animal model of chronic visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome[J]. *Chin J Gastroenter Hepatol*, 2003, 12(4):332-335.
- [14] 赵云.母婴分离应激致肠易激综合征的生物学特征及同型半胱氨酸损伤机制[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2014.
Zhao Y. The biological basis of irritable bowel syndrome caused by maternal separation and injury role of homocysteine on intestinal epithelial barrier function[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2014.

[收稿日期] 2020-02-01

陈林军,杨焱,吴迪,等. 高尿酸血症及其并发症大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 510-516.

Chen LJ, Yang Y, Wu D, et al. Establishment of a rat model of hyperuricemia and its complications[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 510-516.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.011

高尿酸血症及其并发症大鼠模型的建立

陈林军¹, 杨焱², 吴迪², 陈万超², 董国超¹, 乔徐馨¹, 吴春燕¹, 李婷婷^{1,3*}

(1. 上海健康医学院医学技术学院, 上海 200237; 2. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403;
3. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

【摘要】 目的 建立一种稳定高效的高尿酸血症合并肝肾损伤及痛风性关节炎等并发症的大鼠模型。**方法** 雄性 Sprague-Dawley大鼠(下称 SD 大鼠)48 只,随机分为 6 组(每组 8 只),分别为空白对照组(Control 组)、氧嗪酸钾组(OA 组)、氧嗪酸钾+次黄嘌呤组(OA + H 组)、氧嗪酸钾+酵母膏组(OA + YE 组)、10%果糖 + 0.2%乙胺丁醇组(10% Fru + 0.2% EMB 组)、2%氧嗪酸钾联合 12%酵母特殊饲料组(OA PO 组)五种不同药物与不同浓度的实验,5 周后通过大鼠血清尿酸、肌酐、尿素等生化指标的测定以及肾和关节滑膜肌病理切片观察。**结果** 与空白对照组比较,OA PO 组血清尿酸值升高,伴有严重的肝肾损伤和关节炎症。OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB 组未达到高尿酸水平,但出现一定程度的肝肾损伤及关节炎症。**结论** 2%氧嗪酸钾和 12%酵母膏混合饲料建立高尿酸血症及其并发症模型的效果最佳,此模型也适用于高尿酸血症引起肾损及关节炎症的相关研究。

【关键词】 高尿酸血症;尿酸;氧嗪酸钾;肝肾损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0510-07

Establishment of a rat model of hyperuricemia and its complications

CHEN Linjun¹, YANG Yan², WU Di², CHEN Wanchao², DONG Guochao¹, QIAO Xuxin¹, WU Chunyan¹, LI Tingting^{1,3*}

(1. Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 200237, China.
2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 201403.
3. College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201316)

Corresponding author: LI Tingting. E-mail: litt@sumhs.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish an efficient rat model of hyperuricemia with liver and kidney injury, gouty arthritis and other complications. **Methods** Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the blank control group (control group), oteracil potassium group (OA group), oteracil potassium with 6-hydroxypurine group (OA + H group), oteracil potassium with yeast extract group (OA + YE group), 10% fructose with 0.2% ethambutol group (10% Fru + 0.2% EMB group), and the 2% oteracil potassium mixed with 12% yeast extract peculiar feed group (OA PO group) ($n=8$ rats per group). Blood was collected from the tail vein once weekly, the serum uric acid and urea values were detected, and the model was studied for 5 consecutive weeks. **Results** Compared with the control group, the OA PO group reached high serum uric acid levels with severe liver and kidney damage and joint inflammation in week 5. The uric acid values of the OA + H, OA + YE and 10% Fru + 0.2% EMB groups failed to reach high levels. However, biochemical indicators showed that liver and kidney damage occurred in these four groups. Hematoxylin and eosin staining showed that the knee joints of the model group had synovial thickening and scattered and disordered arrangement to varying degrees.

【基金项目】上海市晨光计划(14CGB21),上海健康医学院重点“种子基金”(HMSFP-18-22-05-003),上海市教委产学研项目。

Funded by Shanghai “Chenguang Program” (14CGB21), “Seed Fund” Foundation of Shanghai University of Medicine & Health Sciences (HMSFP-18-22-05-003), “Produce-Learn-Research” Project of Shanghai Municipal Education Committee.

【作者简介】陈林军(1965—),男,副教授,研究生,研究方向:食品卫生与营养。Email:chenlj@sumhs.edu.cn

【通信作者】李婷婷(1989—),女,博士研究生,研究方向:食品卫生与营养学。Email:litt@sumhs.edu.cn

Conclusions The 2% oteracil potassium mixed with 12% yeast extract diet is the best diet for establishing a rat model of hyperuricemia and its complications and is suitable for studying hyperuricemia-induced renal injury and arthritis.

【Keywords】 hyperuricemia; uric acid; oteracil potassium; liver and kidney injury

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

近年来,随着生活水平的提高,我国居民的生活习惯和膳食结构发生很大改变,高嘌呤和高糖食物摄入的不断增加。我国高尿酸血症患病率已达 13.7%,发病年龄呈低龄化,高尿酸血症及其并发症发病率呈逐年上升趋势。尿酸是人类嘌呤代谢的最终产物,当血中尿酸水平大于 $420 \mu\text{mol/L}$ (7 mg/dL) 时即定义为高尿酸血症^[1-3]。尿酸盐在关节腔和组织中沉积,进而引发痛风性关节炎、痛风性肾病,高尿酸血症已是当前影响人类健康的一种严重的代谢性疾病^[4]。因此建立稳定的高尿酸血症及肝肾损伤动物模型,对人类预防高尿酸血症、筛选相关治疗药物尤为重要。

人类由于缺乏尿酸酶,因而尿酸是嘌呤代谢的最终产物。但是其他大多数哺乳动物体内固有尿酸酶,可将尿酸降解为尿囊素而随尿液排出体外,故大多数动物体内血尿酸值较低,建立高尿酸血症的动物模型是非常困难的^[5]。迄今为止,高尿酸造模方法存在观察周期较短,不稳定的问题,国内外尚无公认的高尿酸血症动物模型。本研究采用给予尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾,同时增加体内尿酸前体(次黄嘌呤、酵母)的量,以及高果糖摄入同时抑制肾小管尿酸的分泌联合造模的方法,通过五个动物模型组筛选大鼠血清尿酸升高并维持较长时间的建模方法。通过大鼠血清中尿酸(uric acid, UA)、尿素(urea, Urea)、肌酐(creatinine, Cr)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)等水平的检测来考察与评价其建立持续、稳定的高尿酸动物模型的可行性,并同时大鼠踝关节组织、肾组织形态学观察来比较不同高尿酸血症造模法对肾、踝关节继发性损伤的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠(下称 SD 大鼠)48 只, (6 ± 1) 周龄, 体重 $(190 \pm 10) \text{ g}$, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2019-0812】, 饲养在上海健康医学院实验动物中心

【SYXK(沪)2018-0029】, 室温维持 25°C 恒温, 动物自由饮水及摄食。所有操作均根据美国国家卫生研究院(NIH)发布的实验室动物护理和使用指南(8th Edition, 2011, ISBN 10: 0-309-15400-6)进行且均符合上海健康医学院动物实验伦理学要求(审批号:2019-HXXM-05-3048)。

1.1.2 试剂与仪器

氧嗪酸钾(Potassium Oxonate, PO, 阿拉丁, P137112); 次黄嘌呤(Hypoxanthine, H, H108384); 酵母膏(Yeast extract, YE, Y110984); 盐酸乙胺丁醇片(EMB, 特一药业集团股份有限公司, 国药准字 H44023635); 普通大鼠饲料(辽宁省沈阳前民动物实验饲料厂, GB14924.3-2010); 氧嗪酸钾联合酵母混合饲料(2%氧嗪酸钾, 12%酵母膏, 定制于北京博泰宏达生物); 尿酸试剂盒(尿酸酶法, CH0101054, 迈克生物股份有限公司); 尿素试剂盒(尿素酶-谷氨酸脱氢酶法, CH0101051, 迈克生物股份有限公司)等。

离心机(eppendorf, centrifuge 5424, 美国), 全自动生化分析仪(HITACHI, 7080 Automatic Analyzer, 日本), PRECICE 全自动数字切片扫描系统(PRECICE 500, 北京优纳科技有限公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

将 48 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠(下称 SD 大鼠)随机分为 6 组(每组 8 只), 分别为空白对照组(Control 组)、氧嗪酸钾组(OA 组)、氧嗪酸钾+次黄嘌呤组(OA+H 组)、氧嗪酸钾+酵母膏组(OA + YE 组)、10%果糖+乙胺丁醇组(10% Fru + 0.2% EMB 组)、2%氧嗪酸钾联合 12%酵母特殊饲料组(OA PO 组)。所有动物适应生活环境, 自由进食和饮水, 1 周后开始实验。

1.2.2 造模方法

Control 组给予正常饲养, OA 组给予 $250 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 氧嗪酸钾腹腔注射, OA + H 组给予氧嗪酸钾 $250 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 联合次黄嘌呤 $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 腹腔注射, OA + YE 组给予氧嗪酸钾 $250 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 腹腔注射联合酵母膏 $3.5 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 除 OA PO 组喂食氧嗪酸钾联合酵母特殊饲料, 10% Fru +

0.2% EMB 组饮用果糖加乙胺丁醇的水外,其余组别 SD 大鼠均摄取正常饲料和饮用正常水,造模方法详见表 1。每周尾部采血 1 次,连续造模 5 周。

1.2.3 检测指标及处理

采血前 12 h 禁食、不禁水,每周对 SD 大鼠尾部静脉抽血每只 0.5 mL,37℃ 水浴 30 min,以 3000 r/min 离心 15 min,取血清 200 μ L,按照尿酸、尿素、丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶试剂盒(maccura,上海)的操作说明,并采用自动生化仪测定血清中各生化指标的水平。

1.2.4 大鼠肾及关节病理组织学检查

大鼠处死后,取全肾及膝关节,全肾用生理盐水清洗后,浸泡在福尔马林溶液中固定。SD 大鼠膝关节浸润 EDTA 脱钙液中 12 d,达到用针可以轻松刺穿的程度后,进行固定。取肝、肾、膝关节组织进行脱水、石蜡包埋、制片(4 μ m)、HE 染色、利用 PRECICE 全自动数字切片扫描系统观察。

1.3 统计学分析

应用 SPSS Statics 统计学软件进行统计分析,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性; $P < 0.01$ 表示差异极具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察

空白组大鼠饮食正常,毛色光滑,反应灵敏,体重正常;5 个造模组随着时间的推移,体重相对空白对照组有明显减轻,毛色发黄,食量减少,排尿量明显增多,且 1 月后造模组开始出现大鼠踝关节红肿

等炎症,脚踝行动不灵活现象,且 OA PO 组大鼠体重减轻最明显,精神萎靡,易怒,且脚踝肿胀程度明显高于其他造模组。

2.2 大鼠血清中尿酸值、尿素值变化

2.2.1 不同造模组大鼠血清中尿酸值变化

与空白组相比较,除 OA PO 组外,其余模型组尿酸值总体没有升高反而略微有所降低,无统计学意义;建模 1 周,模型组 OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB 与空白组接近,OA PO 组尿酸反而降低,可能是氧嗪酸钾作为一种尿酸酶的竞争性抑制剂,大鼠体内尿酸浓度快速升高时,可能反馈性促进尿酸酶的表达或者活性增加^[6];建模 5 周,OA PO 组尿酸值与空白组比较有显著的升高,且差值具有统计学意义;OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB 模型组与空白组相比较尿酸值持续降低,出现模型组尿酸值不升高反而降低的异常现象,可能与大鼠体内的尿酸酶活力反馈性升高有关。(见表 1)

2.2.2 不同造模组大鼠血清生化指标的比较

血尿素(Urea)与肌酐(Cre)都是反应肾功能的重要指标,丙氨酸氨基转移酶(AST)和天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)是反映肝功能的生化指标^[7]。造模 5 周后,各组实验终点时血清生化指标见图 1。造模组的血清肌酐和尿素氮水平明显低于健康对照组,氧嗪酸钾联合酵母特殊饲料组(OA PO 组)血清中肌酐、尿素水平大幅提升,伴有严重的肾损伤,血肌酐水平显示已经出现肾衰现象。同时,丙氨酸氨基转移酶和天门冬氨酸氨基转移酶水平显著降低,说明肝也伴有明显损伤。其他各模型组尿素氮

表 1 每周各组大鼠血清中尿酸水平变化(μ mol/L, $n=8$)

Table 1 Changes of serum uric acid level in rats of each group every week(μ mol/L, $n=8$)

组别 Groups	1 周 1 week	2 周 2 weeks	3 周 3 weeks	4 周 4 weeks	5 周 5 weeks
Control 组 Control group	90.60 $\pm$ 8.67	83.80 $\pm$ 11.03	83.00 $\pm$ 16.53	92.80 $\pm$ 21.81	96.20 $\pm$ 19.11
OA 组 OA group	100.80 $\pm$ 32.16	101.80 $\pm$ 16.48	77.80 $\pm$ 11.86	86.20 $\pm$ 17.78	92.60 $\pm$ 32.46
OA + H 组 OA + H group	104.80 $\pm$ 32.15	79.60 $\pm$ 19.55	71.40 $\pm$ 12.93	78.20 $\pm$ 5.80	71.60 $\pm$ 22.23 *
OA + YE 组 OA + YE group	118.40 $\pm$ 24.20	99.00 $\pm$ 25.38	84.60 $\pm$ 16.00	79.60 $\pm$ 18.60	71.20 $\pm$ 15.31 *
10% Fru + 0.2% EMB 组 10% Fru + 0.2% EMB group	111.40 $\pm$ 34.50	84.80 $\pm$ 28.70	63.00 $\pm$ 24.28 *	68.80 $\pm$ 6.41 *	74.20 $\pm$ 21.04 *
OA PO 组 OA PO group	56.60 $\pm$ 6.22 **	83.40 $\pm$ 5.12	95.20 $\pm$ 40.40	94.60 $\pm$ 21.84	154.80 $\pm$ 59.83 **

注:与 Control 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

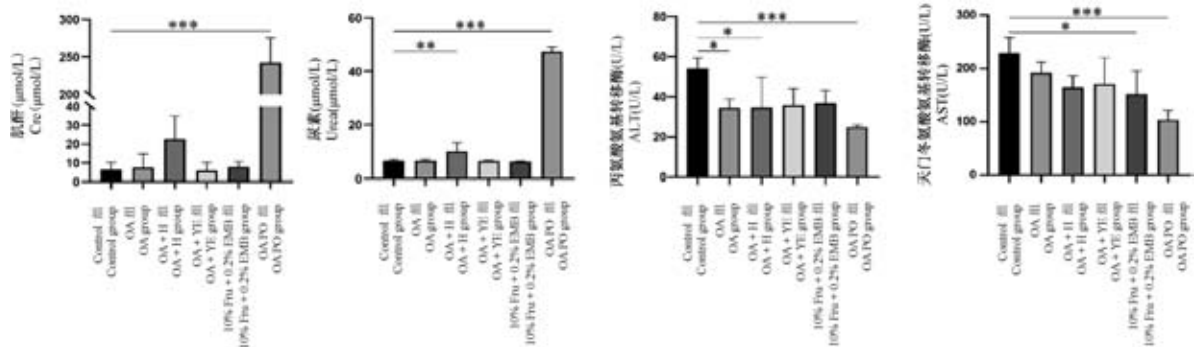
Note. Compared with Control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

和肌酐与对照组相比,氧嗪酸钾 + 次黄嘌呤组(OA + H 组) 尿素水平有显著升高,肾出现严重损伤。氧嗪酸钾组(OA 组)、氧嗪酸钾+次黄嘌呤组(OA + H 组) 丙氨酸氨基转移酶有降低,肝出现损伤。10%果糖+乙胺丁醇组(10%Fru + 0.2%EMB 组) 天门冬氨酸氨基转移酶水平降低,肝也出现损伤。

2.3 大鼠肝及关节病理形态学观察

2.3.1 大鼠肝形态观察及 HE 染色

大鼠肝组织大体标本见图 2,肉眼观察可见,空白对照组肝为棕红色,包膜光滑,质地柔软;模型组肝颜色略微发黄,肝体积有增大,质地变硬,OA PO 组较为严重。大鼠肝组织 HE 染色显示,空白对照组未见肝细胞脂肪变性,未见明显炎症性细胞浸润;模型组 OA 组、OA + H 组、OA + YE 组、OA PO 组局部肝汇管区可见少量炎症细胞浸润,说明 OA 组、OA + H 组、OA + YE 组、OA PO 组对 SD 大鼠肾



注:大鼠在实验终点时血清生化指标与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 大鼠在实验终点时血清生化指标的比较

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

Figure 1 Comparison of serum biochemical indicators in rats at the end of experiment

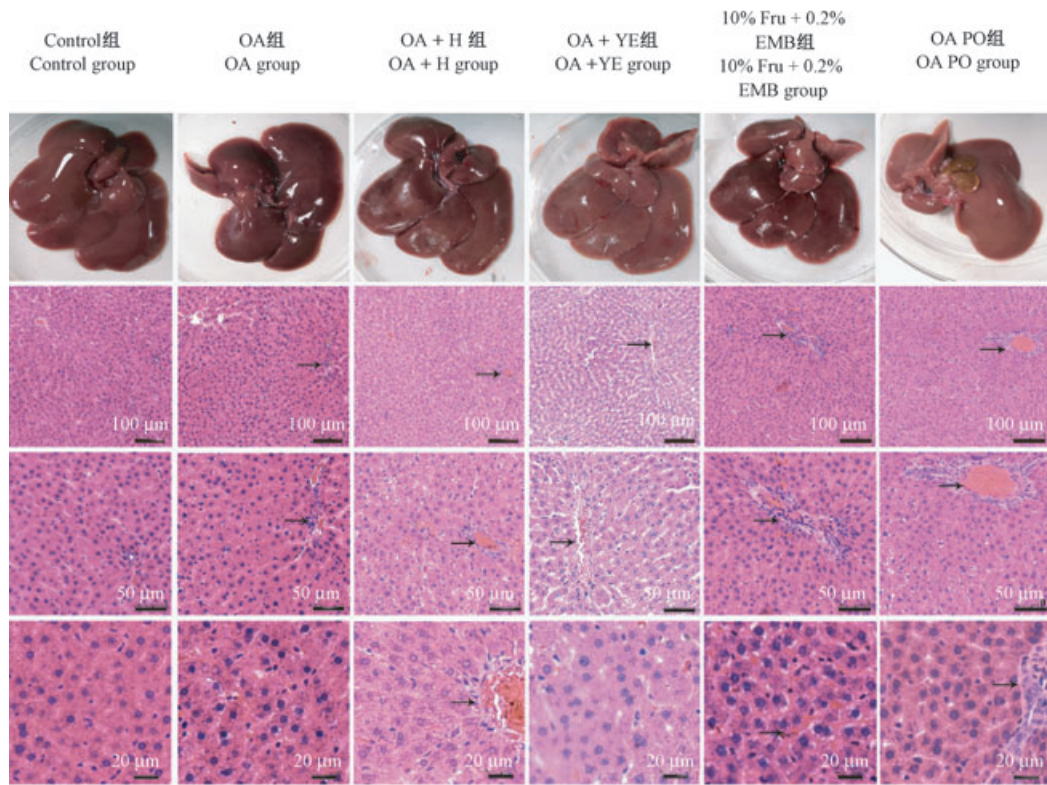


图 2 各组大鼠的肝及 HE 染色病理切片(箭头:炎症细胞浸润)

Figure 2 Livers and HE stained pathological sections of rats in each group (Arrows indicate inflammatory cell infiltration)

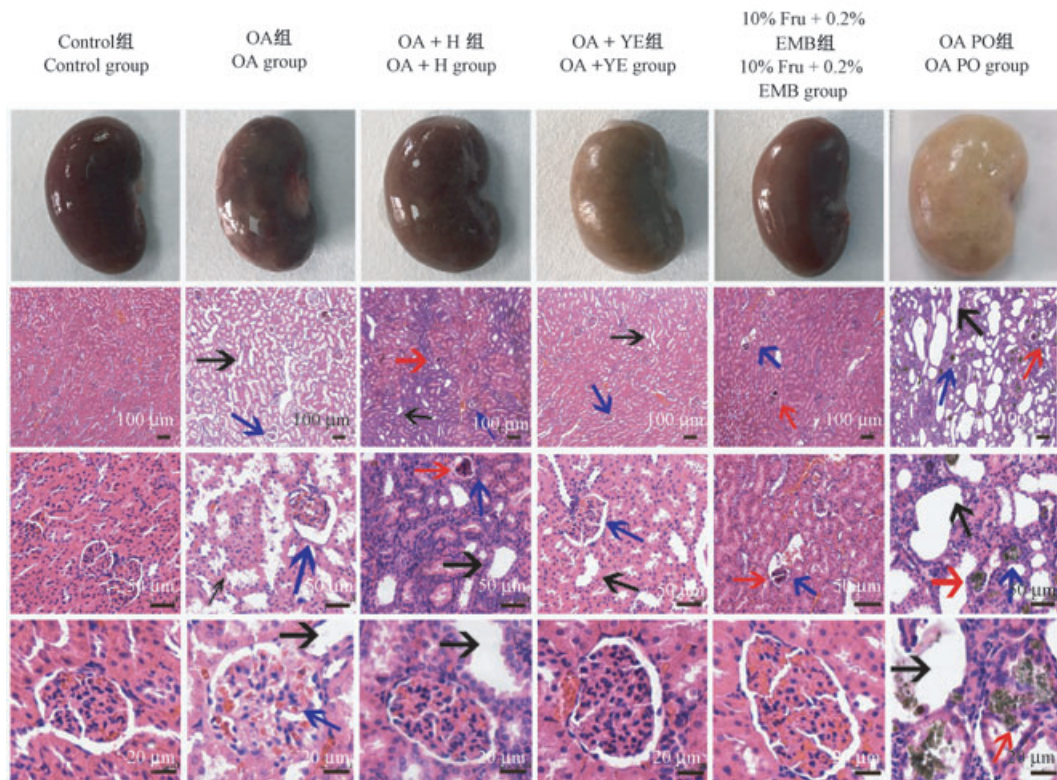
均有不同程度损伤,其中氧嗪酸钾混合饲料组损伤最严重。

2.3.2 大鼠肾形态观察及 HE 染色

大鼠肾组织大体标本见图 3,肉眼观察可见,空白对照组肾色暗红,表面光滑,外观无肿胀造;模组肾均有肥大,呈鼓型,肾色发黄,OA PO 组尤为严重,且外观表面细颗粒状。对大鼠肾组织进行病理组织学检查,根据 HE 染色显示,空白对照组大鼠肾结构正常,肾小球大小正常,肾小管结构清晰完整,无异变,无结晶积累,间质内未见异常;OA、OA + H、OA + YE 各模型组均出现肾小球内不同程度的尿酸钠盐结晶沉积,肾小管排列不规则不明显,OA + H 组肾小管周围炎性细胞浸润;模型 10% Fru + 0.2% EMB 组有少量的尿酸钠盐沉积,肾小管局部扩张;模型 OA PO 组肾小球硬化,内有大量的尿酸钠盐结晶积累,间质严重扩张,所有肾小球发生病变,肾小管上皮细胞胞质空泡非常明显,说明 OA 组、OA + H 组、OA + YE 组、OA PO 组对 SD 大鼠肾都有不同程度损伤,且氧嗪酸钾混合饲料损伤最严重。

2.3.3 大鼠踝关节滑膜肌组织病理学观察

滑膜是关节囊内的一层很薄的组织,当关节内部受到刺激时,滑膜就会首先发生炎症反应,引起积液、发热肿大等症状运动表现欠佳,导致关节屈伸困难。痛风性滑膜炎,正是因为尿酸结晶这一刺激物,沉积至滑膜所引起的^[8]。选取空白对照组及 OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB、OA PO 各模型组的踝关节滑膜肌进行病理组织学检查(图 4),根据 HE 染色显示,空白对照组大鼠关节滑膜 2 ~ 5 层排列规整、紧致、有序;OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB、OA PO 各模型组关节滑膜增厚,排列散乱、无序、松散,其中 OA + YE 组有大量的中性粒细胞浸润,其他模型组有轻微炎症细胞,这与造模组大鼠脚踝出现红肿炎症表象一致。虽然 OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB 模型组尿酸值波动幅度小,且有几个时间段尿酸值有略微降低。但是大鼠取材前已出现步态异常,踝关节肿胀,病理观察也出现炎细胞浸润等关节炎症状^[9]。吴燕升等^[10]研究报道,氧嗪酸钾造模



注:红色箭头:尿酸钠沉积结晶;黑色箭头:病变肾小管;蓝色箭头:病变肾小球。

图 3 各组大鼠的肾及 HE 染色病理切片

Note. Red arrow, deposition and crystallization of sodium uric acid. Black arrow, diseased renal tubules. Blue arrow, diseased glomeruli.

Figure 3 Kidney and HE stained pathological sections of rats in each group

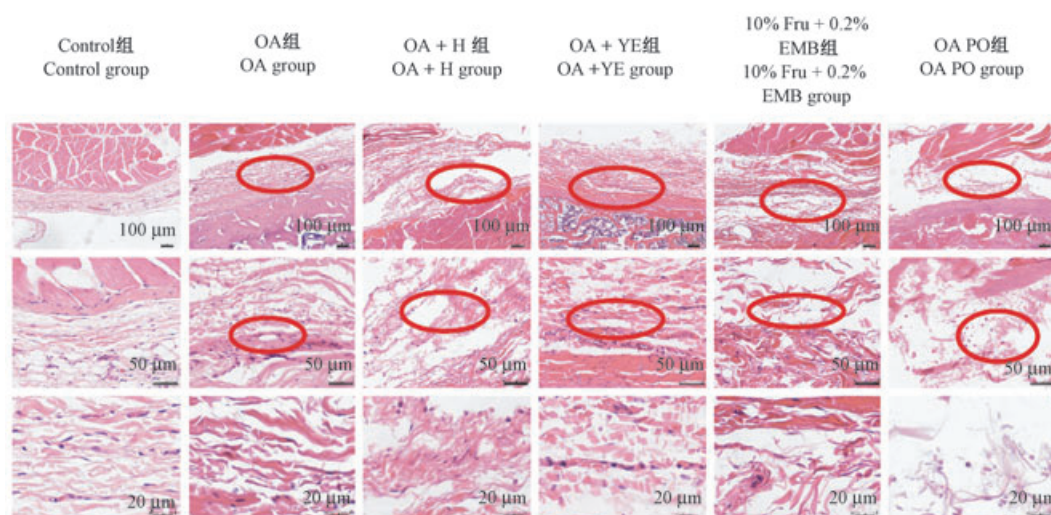


图 4 各组大鼠踝关节滑膜肌组织 HE 染色病理切片(圈出部分为大鼠踝关节滑膜组织)

Figure 4 HE stained pathological sections of of ankle joints in rats of each group

(Circled portion is synovial tissue from rat ankle)

后,大鼠会出现一个短暂性的尿酸升高随后降低的现象,一般会在 12 h 内恢复到正常水平。所以我们推断由于大鼠体内尿酸酶的作用,OA、OA + H、OA + YE、10% Fru + 0.2% EMB 这 4 个模型组 12 h 后大鼠血清尿酸值降低,检测不到高尿酸,但是踝关节已经出现痛风性关节炎症状。

采用氧嗪酸钾联合酵母特殊饲料组(2%氧嗪酸钾,12%酵母膏),第 5 周已经达到维持较长时间的高尿酸水平。通过肾组织、踝关节 HE 染色,肾组织肾小球内有大量尿酸钠晶体沉积,肾小管上皮细胞可见明显的胞质空泡,排列紊乱,管腔扩张,说明肾损伤非常严重,关节滑膜略微增厚,排列散乱,少量中性粒细胞浸润。与其他模型组相比,氧嗪酸钾混合饲料组血尿酸、血尿素、肌酐、肾损伤效果都较为明显。且建模方法更接近人类痛风疾病的发病机制,可以最大程度上的模拟临床上形成的痛风症状有利于研究人类高尿酸相关疾病的发病机制以及治疗药物靶点的设计。

3 讨论

建立高尿酸血症动物模型,主要通过增加尿酸来源、抑制尿酸排出、抑制尿酸酶的活性来进行^[11-12]。本实验建立了 5 种造模方法,氧嗪酸钾组(OA)、氧嗪酸钾 + 次黄嘌呤组(OA + H)、氧嗪酸钾+酵母膏组(OA + YE)、10%果糖 + 0.2%乙醇组(10% Fru + 0.2% EMB)这四种造模方法均未能形成持续稳定的高尿酸模型,造模可行性较小。

其原因可能是氧嗪酸钾所诱导的动物体内尿酸水平在一日内并不稳定,且 SD 大鼠尾部静脉采血时间延时很长,不能保证在同一时间点给全部模型组采血,个体也存在差别,导致尿酸值有较大的差异。给予 SD 大鼠氧嗪酸钾+酵母混合饲料,成功的诱导了大鼠高尿酸血症合并肝肾损伤模型。大鼠体内存在尿酸酶,所以大鼠高尿酸模型往往存在不稳定的问题,氧嗪酸钾是目前国内外最常用的高尿酸血症造模药物。Yukio 等^[13]每隔两小时连续腹腔注射给予大鼠 250 mg/kg 的氧嗪酸钾,可明显提高血中尿酸水平,但是尿酸值随后很快降低。有报道称果糖可致血尿酸迅速升高,且果糖是目前唯一已知的可增加血尿酸的糖类,乙醇也可作为抑制尿酸排泄的药物^[14]。本实验使用了果糖联合乙醇造模,但是 5 周依然没有成稳定的高尿酸模型。本实验建立的氧嗪酸钾联合酵母特殊饲料的高尿酸模型,与人类痛风临床现象高度相似,大大提高了模型的稳定性以及可重复性,减少了灌胃、注射等实验难度,并且能更好的模仿人类高尿酸的发病过程,且该方法操作简便,稳定,易于操作。

本研究使用氧嗪酸钾、酵母膏等建立高尿酸血症动物模型,从生化以及病理学检查发现 OA PO 混合饲料组尿酸值升高且维持较长时间,肾、心脏等器官发生病变,是一种高效、便利的高尿酸血症联合肾损伤的动物模型,极具研究价值和医疗用途前景。据统计,我国高尿酸患者目前已经达 1.2 亿,痛风患者 8000 万人,且患病人数逐年增加^[15-16]。目

前,国内外还没有有效的治疗痛风的药物,动物疾病模型在研究人类致病机理中起到了关键作用,该模型的建立对高尿酸药物的预防及药物的筛选及开发有着非常重要的意义。

参 考 文 献(References)

- [1] Xu X, Hu J, Song N, et al. Hyperuricemia increases the risk of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Nephrol, 2017, 18:27.
- [2] Han T, Lan L, Qu R, et al. Temporal relationship between hyperuricemia and insulin resistance and its impact on future risk of hypertension [J]. Hypertension, 2017, 70(4):703-711.
- [3] 李媛媛,周海燕,吴绿英,等.大鼠高尿酸血症模型的建立与研究[J].中国实验动物学报,2019,27(06):747-752.
Li YY, Zhou HY, Wu LY, et al. Establishment and study of a hyperuricemia rat model[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6):747-752.
- [4] 裴忆雪,刘永杰,张笛,等.建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究[J].中国比较医学杂志,2018,28(9):46-54.
Pei YX, Liu YJ, Zhang D, et al. Establishment of a hyperuricemia mouse model with renal damage [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9):46-54.
- [5] 孙海滨,于梅.高尿酸血症动物模型研究进展[J].黑龙江中医药,2018,48(4):130-131.
Sun HB, Yu M. Advances in animal models of hyperuricemia [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2018, 47(4):130-131.
- [6] Long H, Wu S, Zhu W, et al. Antihyperuricemic effect of liquiritigenin in potassium oxonate-induced hyperuricemic rats [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:1930-1936.
- [7] 周启蒙,赵晓悦,王海港,等.茶黄素降低高尿酸血症小鼠血清尿酸的作用与机制探究[J].中国新药杂志,2018,27(14):1631-1638.
Zhou QM, Zhao XY, Wang HG, et al. Effect and mechanism of theaflavine on serum uric acid in hyperuricemia mice [J]. Chin J New Drug, 2018, 27(14):1631-1638.
- [8] 张超男,黄学宽,骆言,等.电针对急性痛风性关节炎大鼠踝关节滑膜组织 TLR/MYD88 信号通路的影响[J].四川大学学报(医学版),2014,45(6):924-927.
Zhang CN, Huang XK, Luo Y, et al. Effects of electroacupuncture on TLR/MYD88 signaling pathway in synovial tissue of ankle joint in rats with acute gouty arthritis [J]. J Sichuan University (Med Sci Edition), 2014, 45(6):924-927.
- [9] 石旭柳,乔森,伍明江,等.痛风和高尿酸血症动物模型研究进展及代谢通路分析[J].天津中医药,2019,36(5):511-515.
Shi XL, Qiao M, Wu MJ, et al. Research progress and metabolic pathway analysis of animal models of gout and hyperuricemia [J]. Tianjin Tradit Chin Med, 2019, 36(5):511-515.
- [10] 吴燕升,万强,史丽强,等.多种方法探索高尿酸血症大鼠模型的建立[J].中国中西医结合肾病杂志,2018,19(1):7-10.
Wu YS, Wan Q, Shi LQ, et al. To explore the establishment of hyperuricemia rat models induced by a variety of methods [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med Nephrol, 2018, 19(1):7-10.
- [11] 王陈芸,李哲丽,叶尤松,等.氧嗪酸钾致 Wistar 大鼠高尿酸血症急性模型的剂量探讨[J].中药药理与临床,2018,34(5):141-143.
Wang CY, Li ZL, Ye YS, et al. Dose analysis of hyperuricemia induced by potassium oxonate in Wistar rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2018, 34(5):141-143.
- [12] 陶慧,闫婕,林发全.啮齿类动物高尿酸血症模型的研究进展[J].实验动物科学,2014,31(4):59-62.
Tao H, Yan J, Lin FQ. Advances in rodent models of hyperuricemia [J]. Exp Anim Sci, 2014, 31(4):59-62.
- [13] Yonetani Y, Ishii M, Iwaki K. Hyperuricemia induced by some antihypertensives and uricosuric drugs in oxonate-treated rats [J]. Jpn J Pharmacol, 1980, 30(6):829-840.
- [14] Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, et al. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome [J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2005, 1(2):80-86.
- [15] 吴燕升,万强,史丽强,等.高尿酸血症肾纤维化动物模型研究进展[J].成都医学院学报,2016,11(6):747-750.
Wu YS, Wan Q, Shi LQ, et al. Advances in animal models of renal fibrosis in hyperuricemia [J]. J Chengdu Med Coll, 2016, 11(6):747-750.
- [16] Mallat SG, Kattar SA, Tanios BY, et al. Hyperuricemia, hypertension, and chronic kidney disease: an emerging association [J]. Curr Hypertens Rep, 2016, 18(10):74.

[收稿日期] 2020-02-06

李敏,杨晨钰,傅超慧,等. 马齿苋/甘草/蒲公英及其复方改善2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 517-524.

Li M, Yang CY, Fu CH, et al. Study of purslane/licorice/dandelion compound on insulin resistance in type 2 diabetic rats[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 517-524.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.012

马齿苋/甘草/蒲公英及其复方改善2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究

李敏^{#*}, 杨晨钰[#], 傅超慧, 熊一功, 凌云

(长沙医学院医学检验学院, 长沙 410219)

【摘要】 目的 探讨马齿苋、甘草、蒲公英及其复方对2型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的情况。**方法** 小剂量链脲佐菌素联合高糖高脂饮食建立2型糖尿病大鼠模型,造模成功后随机分为模型组、马齿苋组、甘草组、蒲公英组、复方组及二甲双胍组并设正常组。干预4周后,测定各组大鼠FBG、TC、TG、HDL、LDL、FINS数值的变化并计算AI值、ISI值和IRI值。取胰腺组织制成切片,染色后观察胰岛细胞的形态学变化。**结果** (1)各单方和复方干预组体重与模型组比较均具有显著性差异($P < 0.01$),但效果不及二甲双胍。(2)2周时,各干预组大鼠FBG值与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);4周时,各干预组大鼠FBG值均显著降低($P < 0.01$);干预2周以及干预4周复方组与二甲双胍组比较差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。(3)复方组和二甲双胍组糖负荷后0.5、1、2 h血糖值均显著降低,但2 h血糖比较有统计学差异($P < 0.05$)。(4)各干预组与模型组比较ISI值显著升高、IRI值显著降低($P < 0.01$),复方组IRI值与二甲双胍组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。(5)复方组血清TC、TG、LDL-C值显著降低($P < 0.01$),HDL-C值显著升高($P < 0.01$),同时发现二甲双胍组TC、TG、HDL-C和LDL-C水平与复方组相似($P > 0.05$)。(6)显微镜下观察发现复方组有修复增生表现,细胞排列均匀,大小一致,与二甲双胍组相似。**结论** 马齿苋、甘草、蒲公英复方可调节糖脂代谢紊乱、修复胰岛 β 细胞从而改善胰岛素抵抗。整体效果优于单方。

【关键词】 马齿苋;甘草;蒲公英;复方;降血糖;胰岛素抵抗;胰岛 β 细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0517-08

Study of purslane/licorice/dandelion compound on insulin resistance in type 2 diabetic rats

LI Min^{#*}, YANG Chenyu[#], FU Chaohui, XIONG Yigong, LING Yun

(College of Medical Laboratory, Changsha Medical College, Changsha 410219, China)

Corresponding author: LI Min. E-mail: 1273088185@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of purslane, licorice, and dandelion compound on insulin resistance in type 2 diabetic rats. **Methods** Low-dose streptozotocin was combined with a high-sugar and high-fat diet to establish

【基金项目】 湖南省大学生创新创业训练计划项目(湘教通[2019]219号-2410),湖南省教育厅科研项目(17C0176),湖南省卫生计生委基金科研课题(C20180131)。

Funded by Hunan Province University Students Innovation and Entrepreneurship Training Program Project(Xiang jiao tong[2019] No.219-2410); Scientific Research Project of Hunan Provincial Department of Education(17C0176)and Scientific Research Project of Hunan Provincial Health and Family Planning Commission(C20180131)

【作者简介】 李敏(1987—),女,硕士,讲师,主要检验医学研究。Email: 1273088185@qq.com;

杨晨钰(1999—),女,本科。

[#]共同第一作者

【通信作者】 李敏(1987—),女,硕士,讲师,主要检验医学研究。Email: 1273088185@qq.com

type 2 diabetic rats. After successful modeling, they were randomly divided into control (normal), model, purslane, licorice, dandelion, compound, and metformin groups. After 4 weeks of intervention, Fasting blood glucose (FBG), Serum total cholesterol (TC), Triglyceride (TG), High-density lipoprotein (HDL), Low-density lipoprotein (LDL), and Fasting insulin (FINS) were measured in each group of rats. The changes in the values were calculated and Atherosclerosis index (AI), Insulin sensitivity index (ISI), and Insulin resistance index (IRI) values were calculated. The pancreatic tissue was cut into sections and the morphological changes were observed after staining. **Results** (1) The weight of each intervention group was significantly different from that of the model group ($P < 0.01$), but the effect was not as good as metformin. (2) At 2 weeks, the FBG value of each intervention group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$); at 4 weeks, the FBG value of each intervention group was significantly lower ($P < 0.01$), and there was no statistical significance between the compound group and the metformin group before and after 2 weeks and 4 weeks of intervention ($P > 0.05$). (3) The 0.5, 1, and 2 h blood sugar values of the compound and metformin groups were significantly lower after the glucose load, but there was a significant difference in 2-h blood glucose ($P < 0.05$). (4) The ISI and IRI values of each intervention group were significantly higher and lower than those of the model group, respectively ($P < 0.01$). (5) The levels of TC, TG, HDL-C, and LDL-C in the metformin group were similar to those in the compound group ($P > 0.05$). (6) Microscopic observation revealed that the compound group underwent repair and proliferation, and the cells were arranged evenly and uniformly in size, similar to those in the metformin group. **Conclusions** Purslane, licorice, and dandelion compound can regulate glucose and lipid metabolism disorders, repair islet β cells, and thereby improve insulin resistance. The overall effect of combination treatment is better than that achieved with single treatment.

【Keywords】 purslane; glycyrrhiza; dandelion; compound; hypoglycemic; insulin resistance; islet β cell

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

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 本质是胰岛素敏感性降低导致的葡萄糖代谢异常, 一般存在于肝、脂肪和骨骼组织中, 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发病的主要机制之一。IR 以肥胖、糖脂代谢紊乱、糖耐量异常和高胰岛素血症为特征。改善 IR 对防治 T2DM 具有重要作用。天然植物可多靶点、多途径、多环节地改善 IR 且副作用小^[1-2]。研究发现马齿苋包含多糖、黄酮、生物碱等多种化学成分, 多糖能通过保护胰岛 β 细胞降低血糖^[3-5]。甘草的主要成分是黄酮类、甘草酸和多糖, 其中黄酮发挥的抗氧化作用有效改善了糖脂代谢紊乱^[4-6]。蒲公英中黄酮类具有抗氧化效果, 三萜类可降低胆固醇, 多糖抗氧化和糖苷酶抑制活性显著^[7-9]。目前没有关于三种植物制成复方作用于糖尿病动物的实验研究报导。因此, 本研究通过链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立 2 型糖尿病大鼠模型, 采用马齿苋、蒲公英、甘草复方进行干预, 同时与临床抗高血糖药物盐酸二甲双胍比较, 评价单方及复方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠的作用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 42 只, 体重 210 ~ 230 g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK

(湘)2019-0014】, 饲养于长沙医学院动物实验中心【SYXK(湘)2017-0003】, 温度 22 ~ 25℃, 昼夜 12 h 自动切换。所有实验均符合实验动物伦理学要求。

1.1.2 药材

马齿苋、蒲公英、甘草干品各 1 kg, 购于安徽亳州康美中药有限公司, 经长沙医学院药学院中药学教研室鉴定为 *Protulaca oleracea* L. (全草)、*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. (全草)、*Glycyrrhiza uralensis* Fisch (根及根状茎)。

1.1.3 试剂与仪器

链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) (批号 S0130, 美国 Sigma 公司); 盐酸二甲双胍 (中美上海施贵宝制药有限公司, 批号 190509); 胰岛素、TC、TG、HDL-C、LDL-C 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 血糖测试仪及配套血糖试纸 (三诺, 中国); 全自动生化分析仪 (日立 7180, 日本); 酶标仪 (迈瑞 CL-1000i, 中国); 紫外可见分光光度计 (津岛 UV-1240, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 马齿苋、甘草、蒲公英提取液的制备

马齿苋、蒲公英、甘草干品粉碎得粗粉。马齿苋提取液: 马齿苋粗粉 100 g 按 1:10 料液比加入蒸馏水, 浸泡 30 min, 煮沸后小火煎 20 min, 重复三次后过滤离心, 合并上清液于旋转蒸发器蒸发浓缩至生药浓度 1 g/mL (生药浓度 = 生药重量/汤剂体

积)。蒲公英提取液、甘草提取液:分别取粗粉 100 g 按 1:10 料液比加入蒸馏水,浸泡 30 min,煮沸后小火煎 30 min,重复三次后过滤离心,合并上清液于旋转蒸发仪蒸发浓缩至生药浓度 1 g/mL。马齿苋、蒲公英、甘草复方:马齿苋、蒲公英、甘草粗粉各 100 g 按 1:10 料液比加入蒸馏水,浸泡 30 min,煮沸后小火煎 30 min,重复三次后过滤离心,合并上清液于旋转蒸发仪蒸发浓缩至生药浓度 1 g/mL。提取液保存在 4℃ 冰箱备用,临用时水浴加热。

1.2.2 马齿苋、蒲公英、甘草提取液总黄酮、多糖含量测定

精密称取 120℃ 下干燥至恒重的芦丁标准品 10 mg,用 60% 乙醇溶解、定容至 100 mL 容量瓶中,即得到 0.1 mg/mL 的芦丁标准品溶液。精密吸取芦丁标准品溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,加入 5% 硝酸钠溶液 0.4 mL,摇匀后静置 6 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.4 mL,摇匀后静置 6 min,加入 4% 氢氧化钠溶液 4 mL,用 60% 乙醇定容至刻度处,静置 15 min 后在 510 nm 处测定吸光度,以标准品浓度 C (mg/mL) 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $A = 3.44C + 0.002$ ($R^2 = 0.9995$)。按 1.2.1 方法配置各提取液三份,分别精密吸取各提取液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,按上述方法进行吸光度测定,带入回归方程,计算得出各提取液总黄酮质量浓度。按公式计算各提取液多糖含量:含量 (%) = 质量浓度 (mg/mL) × 稀释倍数 × 体积 (mL) / 粗粉质量 (g) × 100%,取平均值。马齿苋提取液、蒲公英提取液、甘草提取液、复方提取液总黄酮含量分别为:1.34%、1.83%、0.61%、1.44%。

精密称取 100 mg 葡萄糖标准品,用蒸馏水配成浓度 1 mg/mL 溶液。取上述样液 10 mL 配制成 0.1 mg/mL 葡萄糖标准品溶液,备用。精密吸取葡萄糖标准品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,全部用蒸馏水补足至 2 mL,以 2 mL 水作空白对照。再添加 6% 苯酚溶液 1.0 mL 混匀,迅速加入 5.0 mL 浓硫酸摇匀,静置 10 min 后在 70℃ 水浴中加热 20 min,取出冷却至室温,在 490 nm 处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度 C (mg/mL) 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,得回归方程: $A = 1.415C + 0.010$ ($R^2 = 0.993$)。按 1.2.1 方法配置各提取液三份,分别精密量取各提取液 500 mL,Sevag 法去蛋白,离心分离后再取 95% 乙醇沉淀,离心取沉淀物,无水乙醇洗涤数次,干燥得粗多糖。精密称取 10 mg 粗多糖,置于 100 mL 容量瓶中,蒸馏水定容。用苯酚-硫酸

法测吸光度,带入回归方程,计算得出各提取液总多糖质量浓度。根据 1.2.2 中公式计算各提取液多糖含量。马齿苋提取液、蒲公英提取液、甘草提取液、复方提取液总多糖含量分别为:2.97%、2.38%、1.75%、2.55%。

1.2.3 糖尿病模型的建立

大鼠适应性喂养 3 d 后随机分为正常组 (5 只) 和造模组 (37 只),正常组喂以普通饲料,造模组喂以高糖高脂饲料 (59% 普通饲料、20% 蔗糖、18% 猪油、3% 蛋黄粉)。喂养两周后,正常组不予处理,挑选造模组体重达到 260 ~ 290 g 的大鼠,禁食不禁水 18 h,一次性腹腔注射 STZ 35 mg/kg (0.1 mol/L, pH = 4.22, 避光冰浴)。注射 1 周后尾静脉针刺采血,血糖仪测定血糖。以空腹血糖值大于 7.0 mmol/L,随机血糖值大于 11.1 mmol/L 作为造模成功标准。本实验共 30 只大鼠符合上述标准,被纳入观察。

1.2.4 分组

普通饲料喂养的正常组 (N 组);成模大鼠随机分为 6 组:模型组 (M 组)、马齿苋组 (P 组)、蒲公英组 (D 组)、甘草组 (L 组)、复方组 (C 组) 和二甲双胍组 (MH 组),每组 5 只。P 组、D 组、L 组、C 组和 MH 组统称为治疗组。

1.2.5 干预措施

造模后,P 组、D 组、L 组、C 组分别给予 10 g/kg 马齿苋提取液、蒲公英提取液、甘草提取液以及复方液灌胃 (提取液浓度为 1 g/mL, 此处 10 g/kg 相当于 1 kg 大鼠灌胃 10 mL 提取液);N 组、M 组给予 10 mL/kg 蒸馏水灌胃;MH 组给予 0.1 g/kg 盐酸二甲双胍 (按大鼠与人体每公斤体重剂量折算系数计算^[6]) 灌胃,同时干预期间 N 组给予普通饲料喂养,M 组、P 组、D 组、L 组、C 组和 MH 组给予高糖高脂饲料喂养。

1.2.6 体重

所有大鼠均于造模前、造模成功后 1 周、干预 2 周和干预 4 周测定体重。

1.2.7 空腹血糖 (FBG) 测定

各组大鼠均于造模成功后 1 周、干预 2 周和干预 4 周,禁食 12 h,乙醇棉球涂擦鼠尾远端 1/3 段,使尾静脉充盈,待乙醇干燥后使用采血针刺破尾静脉,待血液流出,血糖仪测定血糖值,观察单方及复方对大鼠 FBG 的影响。

1.2.8 葡萄糖耐量 (OGTT) 实验

干预 4 周后进行 OGTT 试验,禁食 20 h 后,以 2 g/kg 的葡萄糖溶液灌胃,测定灌胃后 0、0.5、1 及 2 h 的血糖水平以及血糖曲线下面积变化,血糖曲线

下面积 = (0 h 血糖 + 0.5 h 血糖) × 0.5/2 + (0.5 h 血糖 + 2 h 血糖) × 1.5/2。

1.2.9 血清胰岛素、超氧化物歧化酶和血脂指标测定

干预 4 周后,各组大鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,静置 60 min,3000 r/min 离心 15 min 分离血清,送至长沙医学院附属医院检验科,7180 型全自动生化分析仪(日立)测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量,酶标仪测定空腹胰岛素(FINS),所有操作步骤均按照检测试剂盒说明书进行。

根据空腹血糖和空腹胰岛素计算胰岛素敏感指数和抵抗指数,计算公式为:胰岛素敏感指数(ISI) = $\ln[1/(\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})]$;胰岛素抵抗指数(IRI) = $(\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素})/22.5$ 。

1.2.10 病理切片观察

大鼠腹主动脉采血后摘取胰,4%多聚甲醛溶液固定 12 h,石蜡包埋切片后进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察胰岛组织病理变化。

1.3 统计学分析

SPSS 24.0 软件处理所有数据,结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较使用单因素方差分析,两组间差异比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 T_2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠体重的影响

由表 1 所示,干预前各组大鼠体重差异不具有

显著性($P > 0.05$)。从干预 2 周开始,M 组较 N 组体重下降($P < 0.05$),二甲双胍组体重与模型组比较显著增加($P < 0.01$)。干预 2 周时,P 组、D 组、C 组和 M 组体重虽有所降低,但与 M 组比较差异具有显著性($P < 0.05$),复方组与二甲双胍组比较,差异不具有显著性($P > 0.05$);干预 4 周时,各干预组与 M 组比较差异均具有显著性($P < 0.01$)。表明单方和复方均能有效抑制 2 型糖尿病大鼠体重下降的趋势,其中马齿苋、蒲公英、和复方在起效速度上具有优势,但效果不及二甲双胍。

2.2 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠 FBG 的影响

如表 2 所示,干预前成模大鼠 FBG 均 > 16.7 mmol/L,明显高于正常组($P < 0.01$)。干预 2 周开始,各干预组大鼠 FBG 值与 M 组比较均有所降低($P < 0.05$)。干预 2 周时,P 组、D 组和 L 组大鼠 FBG 值与 M 组、MH 组比较差异具有显著性($P < 0.05$),C 组大鼠 FBG 值显著降低($P < 0.01$)。干预 4 周时,各治疗组大鼠 FBG 值均显著降低($P < 0.01$)。干预前、干预 2 周及干预 4 周复方组与二甲双胍组比较差异不具有显著性($P > 0.05$)。

2.3 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠 OGTT 的影响

如表 3 所示,干预 4 周后 M 组大鼠血糖与 N 组比较 0.5,1,2 h 均显著升高($P < 0.01$)。与 M 组比较,P 组糖负荷后 2 h 血糖显著降低($P < 0.01$);D 组与 L 组糖负荷后 1,2 h 血糖显著降低($P < 0.01$),C 组和 MH 组糖负荷后 0.5,1,2 h 血糖均显著降低($P < 0.01$),在 0.5,1 h C 组与 MH 组血糖无差别($P > 0.05$),C 组糖负荷后 0.5,1,2 h 血糖显

表 1 马齿苋、蒲公英、甘草及其联合制剂对 2 型糖尿病大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of purslane, dandelion, licorice and their combined preparations on the body weight in type 2 diabetic rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	体重(g) Body weight(g)		
	干预前 Before intervention	干预 2 周 Intervene 2 weeks	干预 4 周 Intervene 4 weeks
正常组 Normal group	251.68 ± 11.18	272.02 ± 10.14	292.96 ± 12.08
模型组 Model group	258.36 ± 14.10	240.58 ± 15.28 ^a	225.10 ± 14.56 ^a
马齿苋组 Purslane group	265.78 ± 6.93	259.66 ± 6.59 ^{cd}	254.56 ± 6.04 ^{ce}
蒲公英组 Dandelion group	260.38 ± 9.80	255.46 ± 11.07 ^{bc}	253.34 ± 8.69 ^{ce}
甘草组 Licorice group	259.06 ± 11.28	249.80 ± 11.84 ^c	243.20 ± 11.38 ^{ce}
复方组 Compound group	267.56 ± 7.08	263.20 ± 7.99 ^c	257.42 ± 8.23 ^{ce}
二甲双胍组 Metformin group	263.90 ± 11.95	275.04 ± 7.92 ^c	282.44 ± 8.68 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;^c $P < 0.01$;与二甲双胍组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$. Compared with metformin group, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$.

著降低 ($P < 0.01$), 在 0.5, 1 h 复方组与二甲双胍组血糖无差别 ($P > 0.05$)。但 0, 0.5, 1 h 时, 马齿苋、蒲公英、甘草与二甲双胍比较差异具有显著性 ($P < 0.05$), 2 h 时单方和复方与二甲双胍组比较差异均具有显著性 ($P < 0.01$), 各干预组血糖曲线下面积与 M 组比较均降低, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), C 组与 MH 组之间差异不具有显著性 ($P > 0.05$)。

2.4 马齿苋、蒲公英、甘草复方对 2 型糖尿病大鼠 FINS、SOD、ISI 和 IRI 的影响

干预 4 周后, M 组大鼠 FINS 值和 IRI 值明显高于 N 组, 而 ISI 值水平则明显低于 N 组 ($P < 0.01$); P 组、C 组大鼠 FINS 与 M 组相比显著降低 ($P <$

0.01), 接近二甲双胍组 FINS 水平 ($P > 0.05$), 各干预组与 M 组比较 ISI 值显著升高, IRI 值显著降低 ($P < 0.01$), C 组 IRI 值与 MH 组比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示复方在改善高胰岛素血症以及 IR 方面效果与二甲双胍类似。(见表 4)

2.5 马齿苋、蒲公英、甘草复方对 2 型糖尿病大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的影响

如图 1 所示, 与 N 组相比, M 组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 均显著升高 ($P < 0.01$); 与 M 组相比, P 组和 L 组血清 TC、TG 和 LDL-C 显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$); D 组血清 TG 显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.05$); C 组血清 TC 显著降低 ($P < 0.01$), 接近

表 2 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠 FBG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of purslane, dandelion, licorice and their combined preparations on FBG in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Groups	空腹血糖 (mmol/L) FBG (mmol/L)		
	干预前 Before intervention	干预 2 周 Intervene 2 weeks	干预 4 周 Intervene 4 weeks
正常组 Normal group	5.42 ± 0.95	5.40 ± 0.87	5.20 ± 0.48
模型组 Model group	17.54 ± 2.23 ^a	21.20 ± 2.70 ^a	23.06 ± 2.96 ^a
马齿苋组 Purslane group	19.32 ± 2.23	17.36 ± 2.78 ^b	16.48 ± 1.86 ^{cd}
蒲公英组 Dandelion group	18.64 ± 2.12	16.94 ± 2.16 ^b	15.66 ± 2.15 ^{cd}
甘草组 Licorice group	18.52 ± 2.89	17.66 ± 3.04 ^b	16.50 ± 2.86 ^{cd}
复方组 Compound group	17.17 ± 3.19	14.52 ± 2.30 ^c	11.08 ± 0.76 ^c
二甲双胍组 Metformin group	19.10 ± 2.38	15.46 ± 1.96 ^c	10.26 ± 1.67 ^c

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$. Compared with metformin group, ^d $P < 0.05$.

表 3 马齿苋、蒲公英、甘草及其联合制剂对 2 型糖尿病大鼠 OGTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effects of purslane, dandelion, licorice and their combined preparations on OGTT in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Groups	血糖 (mmol/L) BG (mmol/L)				曲线下面积 AUC
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	
正常组 Normal group	5.50 ± 0.85	12.58 ± 2.39	8.54 ± 2.34	5.68 ± 0.82	16.91 ± 3.50
模型组 Model group	21.48 ± 2.23 ^a	30.60 ± 1.54 ^a	28.54 ± 2.37 ^a	24.46 ± 2.45 ^a	54.31 ± 3.90 ^a
马齿苋组 Purslane group	15.66 ± 1.25 ^c	30.08 ± 2.00	26.54 ± 1.78	20.26 ± 3.07 ^c	48.99 ± 4.02 ^{bd}
蒲公英组 Dandelion group	17.18 ± 1.40 ^{cd}	28.58 ± 1.65	24.68 ± 1.30 ^c	19.38 ± 3.14 ^{cd}	46.69 ± 3.40 ^{cd}
甘草组 Licorice group	16.22 ± 2.56 ^{cd}	28.80 ± 2.32	24.10 ± 1.99 ^c	20.18 ± 2.00 ^{cd}	46.62 ± 3.86 ^{cd}
复方组 Compound group	12.36 ± 1.77 ^c	26.56 ± 1.74 ^c	22.20 ± 1.71 ^c	16.10 ± 1.37 ^c	41.07 ± 3.07 ^c
二甲双胍组 Metformin group	11.76 ± 1.26 ^c	24.24 ± 1.14 ^c	19.88 ± 1.63 ^c	11.48 ± 1.16 ^c	35.71 ± 2.54 ^c

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, ^d $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$. Compared with metformin group, ^d $P < 0.05$.

正常水平 ($P > 0.05$), TG、LDL-C 显著降低 ($P < 0.01$), HDL-C 显著升高 ($P < 0.01$), 接近正常水平 ($P > 0.05$); 同时发现 MH 组 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平与 C 组效果相似 ($P > 0.05$), 表明马齿苋、蒲公英、甘草及其复方可降低 2 型糖尿病大鼠血清 TC、TG、LDL-C, 升高 HDL-C, 改善脂代谢, 但复方作用效果与二甲双胍相当。

2.6 马齿苋、蒲公英、甘草复方对 HE 染色下 2 型糖尿病大鼠胰岛形态的影响

N 组胰岛 β 细胞排列紧密, 大小一致, 核染色

质清晰, 胞浆界线清楚 (图 2A); M 组胰岛 β 细胞排列疏松, 细胞大小不一, 胞浆空泡化严重 (图 2B); 与 M 组相比较, P 组 (图 2C)、D 组 (图 2D) 以及 L 组 (图 2E) 胰岛 β 细胞排列松散程度较轻, 胞浆空泡化程度较轻。C 组 (图 2F) 与 MH 组 (图 2G) 胰岛 β 细胞形态结构大致与 N 组相似, 细胞大小较一致, 排列较均匀, 胞浆较均匀。表明马齿苋、蒲公英、甘草及复方对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞具有不同程度的保护作用, 但复方组与二甲双胍组作用效果更优。

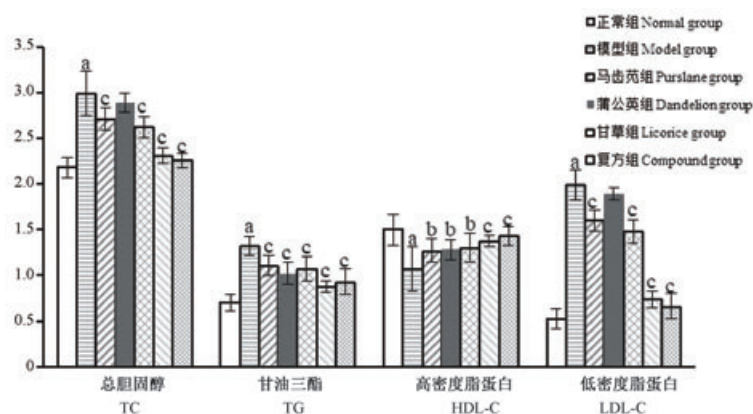
表 4 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠 FINS、ISI 和 IRI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effects of purslane, dandelion, licorice and their combined preparations on FINS, ISI and IRI in type 2 diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Groups	FINS ($\mu\text{u/L}$)	HOMA-ISI	HOMA-IRI
正常组 Normal group	23.66 $\pm$ 1.93	-4.81 $\pm$ 0.11	5.50 $\pm$ 0.61
模型组 Model group	29.76 $\pm$ 1.99 ^a	-6.52 $\pm$ 0.19 ^a	30.70 $\pm$ 5.90 ^a
马齿苋组 Purslane group	26.58 $\pm$ 1.51 ^c	-6.12 $\pm$ 0.22 ^{ce}	19.56 $\pm$ 3.28 ^{ce}
蒲公英组 Dandelion group	27.84 $\pm$ 1.28 ^d	-6.07 $\pm$ 0.18 ^{ce}	19.47 $\pm$ 3.53 ^{ce}
甘草组 Licorice group	28.10 $\pm$ 1.44 ^c	-6.13 $\pm$ 0.24 ^{ce}	20.75 $\pm$ 4.49 ^{ce}
复方组 Compound group	26.36 $\pm$ 1.05 ^c	-5.67 $\pm$ 0.19 ^{ce}	13.04 $\pm$ 2.55 ^c
二甲双胍组 Metformin group	25.16 $\pm$ 1.44 ^c	-5.54 $\pm$ 0.21 ^c	11.55 $\pm$ 2.56 ^c

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$. Compared with metformin group, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$.



注: 与正常组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

图 1 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 的影响

Note. Compared with normal group, ^a $P < 0.01$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of purslane, dandelion, licorice and its compound on serum TC, TG, HDL-C, LDL-C in type 2 diabetic rats

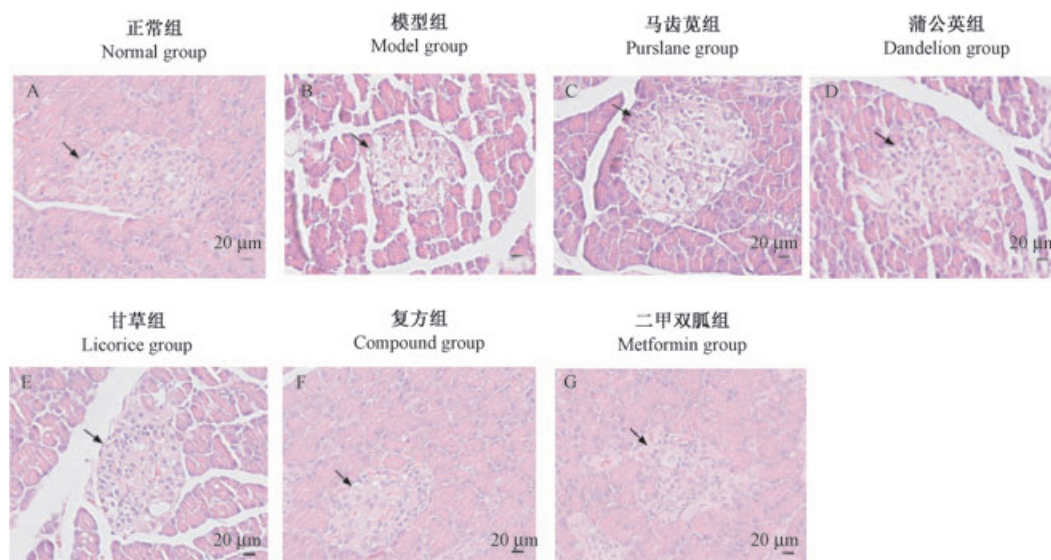


图 2 马齿苋、蒲公英、甘草及其复方对 2 型糖尿病大鼠胰岛病理形态的影响(HE 染色, $\times 400$)

Figure 2 Effect of purslane, dandelion, licorice and its compound on the pathological morphology of islets in type 2 diabetic rats (HE staining, $\times 400$)

3 讨论

糖尿病是与遗传、环境因素相关的慢性全身代谢性疾病。全球 11 个成年人中约有 1 个患有糖尿病,其中 T2DM 占总发病率的 90% 以上^[10-11]。对 T2DM 的治疗通常采用胰岛素或西药,目前用于治疗 T2DM 的临床一线药物二甲双胍可能产生胃肠道反应,降低患者生活质量。近年研究发现更安全低成本的天然植物具有良好降糖效果。

王天宁等^[12]报道马齿苋对 STZ 糖尿病大鼠有降糖作用、可改善糖代谢,还能调节血脂和降低肝细胞受损。本实验通过 STZ 诱导建立 2 型糖尿病大鼠模型验证了马齿苋的降血糖作用和改善糖脂代谢能力,但与二甲双胍比较存在显著差异,与复方比较起效慢作用弱。此外 C 组大鼠胰岛细胞也有损伤修复,这与马齿苋多糖保护 β 细胞的机制相关。

甘草有效成分甘草黄酮类化合物能降低血糖血脂、发挥抗生物氧化作用^[13]。从实验结果可知,甘草组较模型组具有降血糖、降血脂作用 ($P < 0.01$),但次于复方和二甲双胍。与模型组比较,甘草组表现出显著抗胰岛素抵抗效果 ($P < 0.01$),虽不如二甲双胍显著但与复方效果相似。

蒲公英具有抗氧化、调节血脂等药理作用^[14]。在本实验中蒲公英组大鼠除 TG 显著降低外 FINS 及 IRI 值也显著降低,这提示蒲公英具有降低 T2DM

大鼠血脂、增加胰岛素分泌和改善胰岛素抵抗的作用,但不如马齿苋、甘草及复方作用显著。

改善 IR 一直是治疗 T2DM 的关键,而增强胰岛素敏感性和促进胰岛素分泌能有效控制 IR^[15],糖脂代谢紊乱则会加重 IR^[16-18]。实验结果显示,复方比各单方降血糖作用都好,起效快作用强。在血脂方面,复方降低了 T2DM 大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 含量,对 HDL-C 的升高作用最为显著。在调节糖代谢上复方优势明显且与二甲双胍效果类似。复方能显著降低 T2DM 大鼠的 FINS 和 IRI,升高 ISI。OGTT 试验中复方组糖耐量显著增加,0.5 h 时与 M 组相比糖耐量已有较大改善,与 MH 组相比无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示复方除直接降糖作用外还能通过改善胰岛素的分泌、胰岛素增敏以及改善胰岛素抵抗缓解高胰岛素血症,同时复方还具有纠正脂质代谢紊乱的作用,在 T2DM 并发症的预防上小有成效。

此外实验观察到复方对 T2DM 大鼠的体重具有调节作用,表明复方可以增加外周组织对葡萄糖的利用,这可能与促进胰岛素与受体的结合作用有关,其中涉及到的通路机制有待进一步的研究。实验结果表明,复方在体重调节上效果不及二甲双胍。在病理学方面,复方的胰岛 β 细胞形态趋于正常,这与其保护 β 细胞和抗氧化减少细胞损伤有关。

综上所述,复方虽然整体的作用强度不及二甲双胍,但在改善糖脂代谢、提高糖耐量、促进胰岛素

分泌和增加胰岛素敏感性上都有较好效果,其中各组分的作用机制、多途径的协同作用以及复方的有效成分和安全性还有待进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] 赵晓晴. 中医治疗糖尿病用药规律及效果分析[J]. 中外女性健康研究, 2018(4): 65-66.
Zhang XJ. Analysis of the drugs used in traditional Chinese medicine for diabetes[J]. Women's Health Res, 2018(4): 65-66.
- [2] 扈本荃, 廉江平, 徐玥, 等. 甘草酸脂质体的制备及小鼠体内肝靶向效率的评价[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 402-405.
Hu BQ, Lian JP, Xu Y, et al. Preparation of glycyrrhizic acid liposomes and evaluation its liver targeting property in mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(4): 402-405.
- [3] 孟祥云, 郭树明, 杨丽霞. 中药植物多糖对 2 型糖尿病胰岛素抵抗的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 220-225.
Meng XY, Guo SM, Yang LX. Effect of traditional Chinese medicine polysaccharides in resisting type 2 diabetes insulin[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2017, 23(8): 220-225.
- [4] 王璐, 张锐虎, 王晨阳, 等. 中国仓鼠自发性 2 型糖尿病基础代谢特征及相关基因的表达差异[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 508-515.
Wang L, Zhang RH, Wang CY, et al. Characteristics of basal metabolism and expression of related genes in spontaneous type 2 diabetic Chinese hamster [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 508-515.
- [5] 雷少青, 王雅枫, 周璐, 等. N-乙酰半胱氨酸对 2 型糖尿病大鼠肝氧化应激及 FoxO1 活性的影响[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 734-738.
Lie SQ, Wang YF, Zhou L, et al. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress and FoxO1 activity of the liver in type 2 diabetic rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 734-738.
- [6] 朱子博, 樊金玲, 程源斌, 等. 光果甘草提酸废渣萃取物降血糖活性的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(6): 233-241.
Zhu ZB, Fan JL, Cheng YB, et al. The hypoglycemic activities of waste extracts from glycyrrhiza glabra L[J]. Food Sci Technol, 2019, 44(6): 233-241.
- [7] 王一婷. 蒲公英根化学成分及其抗氧化活性研究[D]. 延边: 延边大学, 2018.
Wang YT. Study on chemical constituents and antioxidant activity of taraxacum mongolicum root[D]. Yanbian: Yanbian University, 2018.
- [8] 郭慧静. 蒲公英多糖的提取、分离纯化、鉴定及其生物活性的初步研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
Guo HJ. Extraction, isolation, purification, characterization and its biological activity of polysaccharide from taraxacum mongolicum[D]. Shihezi: Shihezi University, 2019.
- [9] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(05): 52-53.
Zhao W, Sun GZ. Conversion of dosage between different kinds of experimental animals [J]. Chin J Anim Husbandry Vet Med, 2010(5): 52-53.
- [10] 蒲瑞阳, 史典, 刘莎, 等. 2 型糖尿病小鼠模型血糖干预评价点的实验观察[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 224-229.
Pu RY, Shi D, Liu S, et al. Observation of evaluation points for blood glucose intervention in a mouse model of type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 224-229.
- [11] Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018; 14(2): 88-98.
- [12] 王天宁, 刘玉婷, 肖凤琴, 等. 马齿苋化学成分及药理活性的现代研究整理[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 224-234.
Wang TN, Liu YT, Xiao FQ, et al. Chemical composition and pharmacological activity of portulaca olerace [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(6): 224-234.
- [13] 冯亚娟, 胡滨青, 周建华. 甘草黄酮对糖尿病大鼠血糖、血脂水平及抗氧化能力的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(3): 23-25.
Feng YJ, Hu BQ, Zhou JH. Effects of licorice flavonoids on blood glucose, blood lipid levels and antioxidant capacity in diabetic rats[J]. Shandong Med J, 2016, 56(3): 23-25.
- [14] 侯荣荣, 杜峰涛, 邹星月, 等. 蒲公英的活性物质及其应用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(22): 27-28, 53.
Hou RR, Du FT, Zou XY, et al. Advances in the application of taraxacum active substances[J]. Anhui Agr Sci Bull, 2019, 25(22): 27-28, 53.
- [15] 方玲, 张琪. 中药复方改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗研究进展[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2974-2976.
Fang L, Zhang Q. Progress in research on the improvement of insulin resistance in type 2 diabetes by Chinese herbal compound [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2017, 28(12): 2974-2976.
- [16] 张继媛. 三种植物提取物联合改善 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢效果及对肠道菌群的影响研究[D]. 天津: 天津农学院, 2017.
Zhang JY. Three plant extracts combined to improve the effect of glucose and lipid metabolism in type 2 diabetic mice and its impact on intestinal flora [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural College, 2017.
- [17] 刘红媛, 马南希, 马瑞, 等. Roux-en-Y 胃旁路术对 2 型糖尿病大鼠肝及外周胰岛素敏感性的影响[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 271-274.
Liu HY, Ma NX, Ma R, et al. Roux-en-Y gastric bypass increases hepatic and peripheral insulin sensitivity in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(3): 271-274.
- [18] 寿升芸, 魏骏骏, 何晓芬, 等. 低频电针对 2 型糖尿病神经痛大鼠 DRG P2X3 受体的抑制作用[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 54-59.
Shou SY, Wei JJ, He XF, et al. Inhibitory effect of low frequency electroacupuncture on the P2X3 receptor in dorsal root ganglion of rats suffering from type II diabetic neuropathic pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 54-59.

[收稿日期] 2020-03-15

彭冬冬,董珂,厉巧,等. 大鼠阴道炎模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 525-531.

Peng DD, Dong K, Li Q, et al. Establishment and evaluation of a rat model of vaginitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 525-531.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.013

大鼠阴道炎模型的建立与评价

彭冬冬,董珂,厉巧,周志敏,肖洒,姜德建*

(湖南省药物安全评价研究中心,新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331)

【摘要】 目的 建立大鼠阴道炎模型,为阴道炎治疗药物的开发与评价提供新模型。**方法** 临床阴道加德纳菌、白色链球菌及B族链球菌患者阴道样品中分离和纯化阴道加德纳菌、白色链球菌及B族链球菌株。26只雌性大鼠上午分别给予苯甲酸雌二醇(20 mg/kg)和链霉素(每只10 μg)预处理,下午大鼠阴道内接种混合菌株,另选10只雌性大鼠皮下注射苯甲酸雌二醇(20 mg/kg)作为正常组,每天1次,连续3 d。分组前采集阴道分泌物和阴道冲洗液观察大鼠阴道混合菌感染情况,选取感染成功20只大鼠按体重和菌株负荷量随机分为模型组和药物验证组(复方甲硝唑阴道栓每只54 mg,每天1次,连续5 d),每组10只动物。正常组和模型组经阴道给予等量的0.9%氯化钠注射液。末次给药后采集阴道灌洗液检测菌株负荷情况,并采集阴道分泌物进行阴道涂片、清洁度以及pH检查。取阴道组织经HE染色观察其病理组织学改变。**结果** 模型组大鼠阴道壁变厚,复层扁平上皮细胞变性坏死脱落,固有层充血水肿明显,以中性粒细胞为主细胞,淋巴细胞和单核细胞炎细胞浸润,散在点状出血,乳头区成纤维细胞增生明显,网状纤维轻度增生。模型组阴道灌洗液混合菌数目、pH值及清洁度评分均显著大于正常组($P < 0.01$),且转阴率显著减少($P < 0.01$);复方甲硝唑阴道栓组能显著降低阴道灌洗液混合菌数目、pH值及清洁度评分,且增加阴道转阴率,同时能显著改善阴道组织病变程度。**结论** 对大鼠进行雌激素和注射用硫酸链霉素预处理后,接种混合菌可成功建立大鼠混合性阴道炎模型,为女性生殖系统的药物筛选与评价提供有效的动物模型。

【关键词】 阴道炎;SD大鼠;混合菌(阴道加德纳菌、白色链球菌及B族链球菌)

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)04-0525-07

Establishment and evaluation of a rat model of vaginitis

PENG Dongdong, DONG Ke, LI Qiao, ZHOU Zhimin, XIAO Sa, JIANG Dejian*

(Hunan Provincial Research Center for Safety Evaluation of Drugs, Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331, China)

Corresponding author: JIANG Dejian. E-mail: jiangdejian@hnse.org

【Abstract】 Objective A rat model of vaginitis was established to provide a model for developing and evaluating therapeutic drugs for vaginitis. **Methods** *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus albus* and Group B *Streptococcus* were isolated and purified from clinical vaginal samples. Twenty-six female rats were treated with 20 mg/kg estradiol benzoate and 10 μg/kg streptomycin in the morning, and mixed strains were inoculated into the vagina in the afternoon. Ten female rats serving as the control group were subcutaneously administered 20 mg/kg estradiol benzoate once daily for 3 days. Mixed bacterial infections in the vaginas of the rats were observed by collecting vaginal discharge and lavage fluid, then the rats were grouped according to body weight and strain load. Twenty rats were randomly divided into either the model group (54 mg/day compound metronidazole vaginal suppository once daily for 5 days) or the drug validation group, with 10 animals

[基金项目] 湖南省重点研究计划(2018SK2115)。

Funded by Key Research Program of Hunan Province of China(2018SK2115)。

[作者简介] 彭冬冬,男,助理研究员,本科,主要从事新药药效与评价研究。Email: pengdongdong@hnse.org

[通信作者] 姜德建,男,研究员,博士后,研究方向:新药临床前药效与安全性评价研究。Email: jiangdejian@hnse.org

per group. The control and model groups were injected vaginally with 0.9% sodium chloride. After the last drug administration, the bacterial strain loads were detected via vaginal lavage, and the vaginal smears, cleanliness and pH were examined from the vaginal discharge. The vaginal tissue was performed to observe the histomorphological changes by HE staining. **Results** In the model group, the vaginal walls became thickened, the stratified squamous epithelial cells became denatured and necrotic, and the lamina propria became engorged and edematous. Neutrophils were the primary cells, and lymphocyte and monocyte infiltration occurred, with scattered punctiform hemorrhaging, obvious fibroblast proliferation in the mastoid region, and slight reticular fiber proliferation. The mixed bacterial numbers, pH values and cleanliness scores were significantly higher in the model group than in the normal group ($P < 0.01$), and the negative conversion rate was significantly reduced ($P < 0.01$). A compound metronidazole vaginal suppository significantly reduced the numbers of mixed bacteria, pH values and cleanliness scores; increased the negative rate for vaginal bacteria and significantly attenuated the degree of the vaginal lesions. **Conclusions** After pretreatment with estrogen and streptomycin sulfate injections, a rat model of mixed vaginitis was successfully established by inoculating mixed bacteria, thus providing an effective animal model for drug screening and evaluation of female reproductive system.

【Keywords】 vaginitis; SD rats; mixed bacteria (*Gardella vaginalis*, *Streptococcus albicans* and group B *Streptococcus*)

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

阴道炎是目前妇科门诊中常见疾病,是引导粘膜及粘膜下结缔组织发生的炎症,其主要包括细菌性阴道炎、霉菌性阴道炎、滴虫性阴道炎以及细菌和真菌混合性阴道炎。临床上阴道炎病例大多是由多种菌(包括细菌和真菌)混合感染所致,以阴道黏膜易充血、肿胀,有颗粒状脓疱和小出血点等为主要临床表现。根据病原学流行病学调查结果显示,亚洲妇女阴道炎发病率如下:阴道毛滴虫 2% ~ 5%,念珠菌属 3% ~ 14%,细菌性阴道病 0% ~ 16%,细菌和真菌混合感染 50% 以上,混合性阴道炎占比逐年上升^[1]。混合性阴道炎不仅会影响女性患者的生活质量,而且会导致女性不孕症,故此类动物模型建立对该病的治疗和发病机制研究具有重要意义。因此,本研究采用 SD 大鼠通过混合菌(加德纳菌 GV10-1 菌,白色念珠菌,B 族链球菌悬液)诱导建立混合性阴道炎模型,并对其临床表现和病理生理改变进行观察,为混合性阴道炎的药物开发和评价提供新模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级约 7 周龄雌性 SD 大鼠 30 只,体重 210 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】;饲养于湖南省药物安全评价研究中心 ABSL-II 生物安全实验室 IVC 系统【SYXK(湘)2015-0016】。饲养期间各组大鼠自由饮水,饲喂 SPF 鼠料(Co^{60} 消毒)由北京科澳协力饲料有限

公司【SCXK(京)2019-0003】提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,温度 20.9 ~ 25.9℃,湿度 42.5% ~ 64%。动物实验均按照湖南省药物安全评价研究中心动物伦理与福利委员会的指导方针和批准进行(审批号:IACUC-2019(3)051)。

1.1.2 受试物

复方甲硝唑阴道栓,组份为:甲硝唑 0.45 g、四环素 50 mg、制霉菌素 30 mg。规格:每粒 3 g,批号:09191001,失效日期:2021.09。主要适应症:用于治疗滴虫性阴道炎、霉菌性阴道炎、细菌性阴道炎和老年性阴道炎、非特异性阴道炎及支原体感染、淋病双球菌感染等病症。生产单位:河北金牛原大药业科技有限公司。

1.1.3 试剂与仪器

苯甲酸雌二醇注射液,批号:20180101,规格:2 mL:4 mg,10 支/盒,失效日期:2020.01.05,生产厂家:四川金科药业有限责任公司;注射用硫酸链霉素,批号:17053101,规格:1 g(100 万单位)/瓶,失效日期:2020.04,生产厂家:瑞阳制药有限公司。革兰氏染色液试剂盒,货号:HB8278,批号:20190511,生产单位:青岛海博生物技术有限公司。

DFC 420C 型病理成像系统(德国 Leica);DM2500 型荧光显微镜(德国 Leica);3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo);SPL-250 型生化培养箱(天津市莱伯特瑞);TP1020 型全自动脱水机(德国 Leica);EG1150H+C 型组织包埋机(德国 Leica);RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica);CX31 型生物显微镜(日本奥林巴斯公司);CV5030+HV 型全自

动封染一体机(德国 Leica);BX43+MD50 型生物显微镜+数码成像系统(日本奥林巴斯公司)。

1.1.4 试验菌株

阴道加德纳氏菌(BNCC 337545)和白色念珠菌(17015177)由杭州先端生物科技有限公司提供,B 族链球菌(ATCC 12386)由北纳创联生物科技有限公司提供,均来源于阴道炎患者的白带样本。所有菌株均在本中心进行培养及传代,并扩增至 10^8 CFU/mL 以上。

1.2 方法^[2-8]

1.2.1 菌株的复苏、传代/纯化

阴道加德纳氏菌:取阴道加德纳氏菌甘油冻存液,于 37℃ 水浴中轻轻摇晃,加速解冻,用一次性无菌接种环划线接种于哥伦比亚血平板(成品,购于广东环凯微生物科技有限公司)上复苏,(36 ± 1)℃ 厌氧培养 48 h,形成灰白色、半透明、光滑、针尖样大小的菌落。用一次性无菌接种环于一生长良好的阴道加德纳氏菌的哥伦比亚血平板上挑取单个菌落,采用划线法转接于另一无菌哥伦比亚血平板上,(36 ± 1)℃ 培养 48 h,2 ~ 8℃ 暂存,备用。

B 族链球菌:取 B 族链球菌甘油冻存液,于 37℃ 水浴中轻轻摇晃,加速解冻,用一次性无菌接种环划线接种于血平板(成品,购于广东环凯微生物科技有限公司)上复苏,(36 ± 1)℃ 培养 24 h 后,形成灰白色、表面光滑、圆形、 β 溶血的菌落,部分菌株无明显 β 溶血环。用一次性无菌接种环于一生长良好的 B 族链球菌的血平板上挑取单个菌落,采用划线法转接于另一无菌血平板上,(36 ± 1)℃ 培养 24 h,2 ~ 8℃ 暂存,备用。

白色念珠菌:取白色念珠菌甘油冻存液,于 37℃ 水浴中轻轻摇晃,加速解冻,用一次性无菌接种环划线接种于沙氏葡萄糖琼脂(成品,购于广东环凯微生物科技有限公司。121℃,30 min 高温高压灭菌,待冷却至 50℃ 左右,注入 20 ~ 25 mL 于 90 mm 无菌培养皿中,待凝固后方可使用)平板上复苏,25 ~ 28℃ 培养 48 h 后,生成灰白乳酪样菌落。用一次性无菌接种环于一生长良好的白色念珠菌的沙氏葡萄糖琼脂平板上挑取单个菌落,采用划线法转接于另一无菌沙氏葡萄糖琼脂平板上,25 ~ 28℃ 培养 48 h,2 ~ 8℃ 暂存,备用。

1.2.2 形态观察及革兰氏染色观察

光学显微镜下观察阴道灌洗液菌株形态和数量等。用接种环挑取 1 环蒸馏水至洁净载玻片上,

挑取 1 个单菌落,与蒸馏水混合均匀;涂布经火焰固定,加结晶紫溶液和碘液,各染 1 min 水洗,脱色液,不时摇动载玻片约 10 ~ 30 s,至无紫色脱落为止水洗,再加复染色染 1 min 水洗。干后油镜观察菌株形态。

1.2.3 大鼠混合性阴道炎模型建立

30 只大鼠分别于给药前第 1 ~ 3 天每只皮下注射 0.5 mg 的苯甲酸雌二醇注射液(每日上午进行),其中 20 只模型大鼠阴道内注入链霉素每只每次 50 μ g(上午进行),然后向阴道内注入混合菌(加德纳菌 GV10-1 菌,白色念珠菌,B 族链球菌悬液)(1×10^8 CFU/mL)每只每次 50 μ L(下午进行),每天 1 次,连续 3 d,复制混合性阴道炎模型,空白组大鼠阴道接种 50 μ L 不含菌株的半固体培养基。模型组和空白组大鼠分别于分组前向大鼠阴道内注入 50 μ L 无菌 PBS,移液枪轻轻吹打 5 次后吸出冲洗液(约 250 μ L),取 50 μ L 用于显微镜下观察是否存在阴道混合菌感染。选取感染成功 20 只大鼠按体重和菌株负荷量随机分为模型组和药物验证组(复方甲硝唑阴道栓每只 54 mg,每天 1 次,连续 5 d),每组 10 只动物。正常组和模型组大鼠经阴道给予等量的 0.9% 氯化钠注射液。

1.2.4 观察指标

(1)分别于分组前及给药第 5 天后用棉签蘸取 SD 大鼠外阴或阴道分泌物,涂于病理载玻片上,酒精固定,常规瑞氏染色和革兰氏染色镜检,并在显微镜($\times 200$ 倍)下观察菌体和线索细胞情况。治愈(转阴):显微镜下观察不到菌丝和(或)芽孢(或)线索细胞;未愈:显微镜下观察可见菌丝和(或)芽孢(或)线索细胞。计算转阴率(转阴率=治愈例数/动物总例数)(2)分别于分组前及给药第 5 天后取大鼠阴道分泌物进行清洁度检查。阴道清洁度评分标准:I 度:镜下以阴道杆菌为主,并可见大量上皮细胞,计为 1 分;II 度:有部分阴道杆菌,上皮细胞亦可见,也有部分脓细胞和杂菌,计为 2 分;III 度:只见少量阴道杆菌和上皮细胞,但有大量的脓细胞和其他杂菌,计为 3 分;IV 度:镜下无阴道杆菌,几乎全是脓细胞和大量杂菌,计为 4 分。(3)于末次给药后处死大鼠,取出、吸干表面液体后称量阴道重量,计算阴道指数(阴道指数=阴道重量/动物体重),同时测量阴道 pH。(4)收集分组前、治疗 5 d 的阴道灌洗液,按照梯度稀释后进行培养,计数 100 μ L 灌洗液中的菌落数。(5)取阴

道组织置于 10% 中性福尔马林溶液中固定,石蜡包埋、切片、HE 染色进行组织病理学观察。根据充血、水肿、出血、浸润 4 项指标进行评分,具体评分标准:黏膜上皮光滑,无坏死脱落,黏膜下无充血、水肿、出血、炎细胞浸润,阴道内无炎性渗出物,计为 0 分;黏膜上皮无坏死脱落,黏膜下充血,阴道内无炎性渗出物,计为 1 分;黏膜上皮有灶性坏死脱落,黏膜下充血、水肿,无炎细胞浸润,计为 2 分;黏膜上皮有灶性坏死脱落,黏膜下充血、水肿、点状出血、少量炎细胞浸润,计为 3 分;黏膜上皮坏死脱落,黏膜下充血、水肿、点状出血、炎细胞浸润,阴道内有大量炎性渗出物,计为 4 分。记录炎症分值并统计。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 进行数据统计,计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Leven's test 方法检验方差齐性,单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行统计分析, LSD test (参数法) 进行两两比较分析。计数资料以百分率表示,采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 阴道分泌物涂片转阴率

如图 1 和图 2 所示,正常组 10/10 例动物阴道涂片未染色和染色镜检可见少量卵圆形白色念珠菌,但均未见菌丝和线索细胞,感染率为 0;模型组 9/10 例动物阴道涂片未染色和染色镜检可见大量菌丝和球状的线索细胞,感染率 90%;复方甲硝唑阴道栓组 9/10 例动物阴道涂片未染色和染色镜检未见菌丝和线索细胞,1/10 例动物阴道涂片未染色和染色镜检可见菌丝,但不未见线索细胞,治愈率 90%。

2.2 阴道灌洗液混合菌计数

如图 3 及图 4 所示,革兰氏染色镜检,阴道加德纳氏菌染色镜检,呈革兰阴性细小杆菌,常呈球杆状;B 族链球菌呈革兰阳性球菌,单个、成双或链状排列、长短不一;白色念珠菌表层卵圆形芽生细胞,革兰染色呈阳性。如表 1 所示,与正常组比较,给药第 5 天后模型组阴道灌洗液混合菌计数显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,给药第 5 天后复方甲硝唑阴道栓组阴道灌洗液混合菌计数显著降低 ($P < 0.01$)。

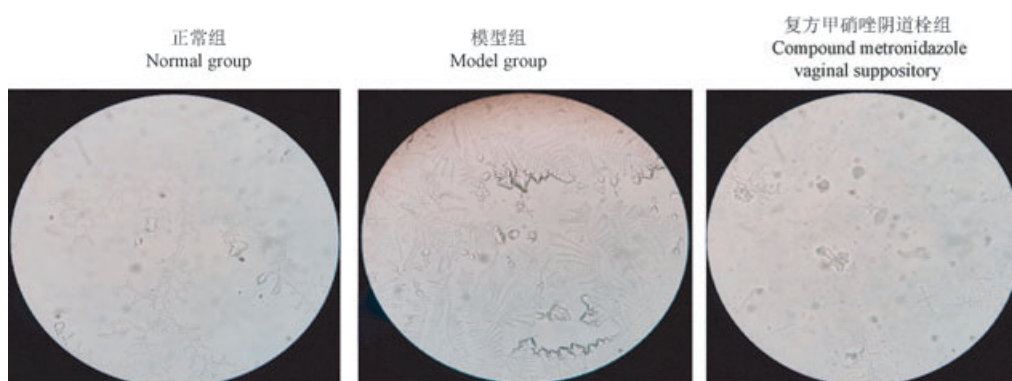


图 1 阴道涂片($\times 40$, 标尺 = 50 μm)

Figure 1 Vaginal smear($\times 40$, Bar = 50 μm)

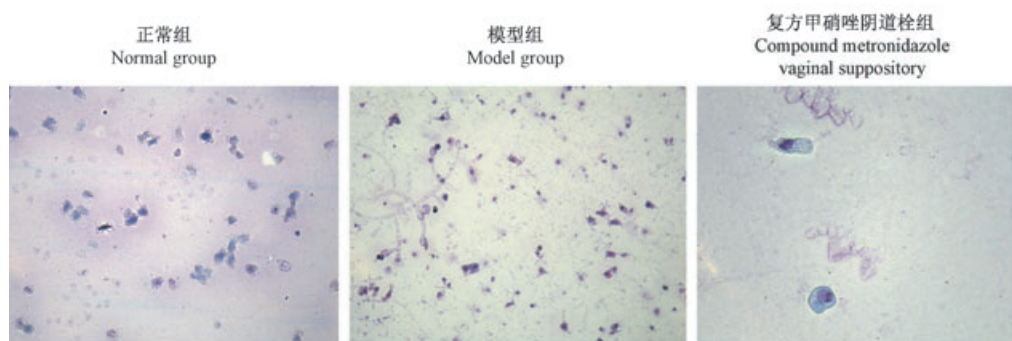


图 2 阴道涂片(Wright's staining, $\times 10$, 标尺 = 100 μm)

Figure 2 Vaginal smear (Wright's staining, $\times 10$, Bar = 100 μm)

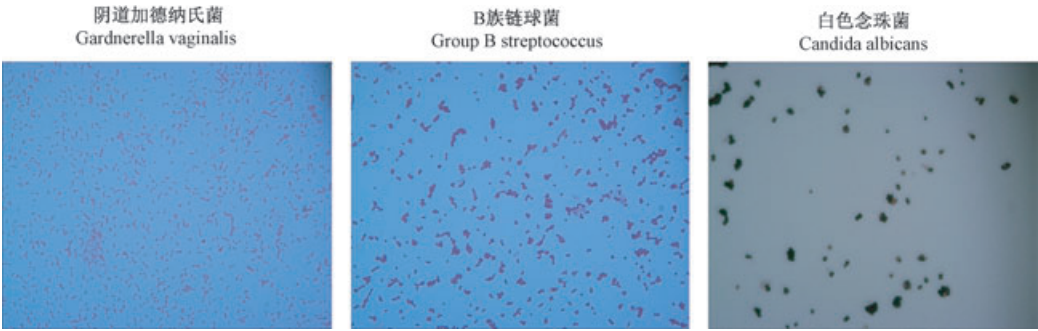
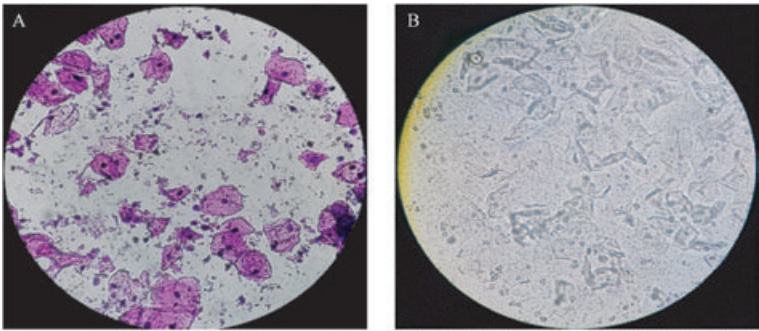


图 3 接种前菌株培养镜检(革兰氏染色, $\times 100$, 标尺 = $100\ \mu\text{m}$)

Figure 3 Microscopic examination of strain culture before inoculation (Gram's staining, $\times 100$, Bar = $100\ \mu\text{m}$)



注:A: 革兰氏染色(阴道加德纳氏菌;B 族链球菌);B: 阴道涂片(白色念珠菌)。

图 4 阴道灌洗液镜检($\times 40$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$)

Note. A, Gram staining (gardnerella vaginalis; group B streptococcus). B, Vaginal smear (candida albicans).

Figure 4 Transvaginal lavage($\times 40$, Bar = $50\ \mu\text{m}$)

表 1 混合性阴道炎对大鼠阴道灌洗液菌落数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of mixed vaginitis on colony count of vaginal lavage in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	剂量 Exposure	给药前 Before building	给药第 5 天 Day 5 intervention
正常组 Normal group	—	$1.24 \pm 0.12 (\times 10^2 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})$	$1.31 \pm 0.44 (\times 10^2 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})$
模型组 Model group	—	$1.44 \pm 0.23 (\times 10^3 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})$	$3.75 \pm 0.87 (\times 10^3 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})^{\Delta\Delta}$
复方甲硝唑阴道栓组 Compound metronidazole vaginal suppository	54 mg/只	$1.18 \pm 0.09 (\times 10^3 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})$	$0.90 \pm 0.34 (\times 10^3 \text{ CFU}/100\ \mu\text{L})^{**}$

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $** P < 0.01$ 。

Note. Compared with normal group, $\Delta\Delta P < 0.01$. Compared with model group, $** P < 0.01$.

2.3 阴道清洁度检查

正常组动物阴道涂片有部分阴道杆菌,同时可见大量的上皮细胞,清洁度为 II 度,评分为 2.0 ± 0.0 ;模型组动物阴道涂片仅少见上皮细胞,无阴道杆菌,可见大量的杂菌,清洁度为 III ~ IV 度,评分为 3.7 ± 1.2 ;复方甲硝唑阴道栓组动物阴道涂片仅少量的阴道杆菌,可见部分的上皮细胞,清洁度为 II ~ III 度,评分为 2.3 ± 0.2 。提示模型组动物连续接种混合菌 3 d,致病菌经 5 d 在大鼠阴道体内不断繁殖,优势菌逐渐减少,清洁度明显增加 ($P <$

0.05);经阴道给予复方甲硝唑阴道栓治疗 5 d 后,清洁度较模型组明显降低 ($P < 0.05$)。

2.4 阴道 pH

给药前各组动物阴道分泌物经 0.1 级 pH 试纸检测,正常组、模型组及复方甲硝唑阴道栓组阴道分泌物 pH 值分别为 4.1 ± 0.9 、 4.0 ± 1.2 、 3.9 ± 1.4 ;给药第 5 天,正常组、模型组及复方甲硝唑阴道栓组阴道分泌物 pH 值分别为 4.2 ± 1.1 、 7.7 ± 2.1 、 4.5 ± 0.6 。提示模型组动物连续接种混合菌 3 d,致病菌经 5 d 在大鼠阴道体内不断繁殖,优势

菌逐渐减少, pH 值明显增加 ($P < 0.01$); 经阴道给予复方甲硝唑阴道栓治疗 5 d 后, 动物阴道 pH 值与给药前变化不大, 与同期模型组比较, pH 值明显降低 ($P < 0.01$)。

2.5 阴道组织指数

正常组、模型组及复方甲硝唑阴道栓组阴道体质量分别为 1.02 ± 0.23 、 0.98 ± 0.45 及 1.13 ± 0.17 , 模型组大鼠阴道指数与正常组比较, 差异不具有显著性; 混合性阴道炎大鼠经复方甲硝唑阴道栓治疗 5 d 后, 复方甲硝唑阴道栓组阴道指数与模型组比较, 差异不具有显著性。

2.6 阴道组织病理检查

2.6.1 一般镜下观察

如图 5 所示, 正常组: 阴道黏膜上皮细胞未见坏死, 固有层为致密结缔组织, 未见充血水肿及炎症细胞浸润。模型组: 阴道壁变厚, 上皮细胞坏死, 固有层出现充血和水肿, 以中性粒细胞为主, 淋巴细胞和单核细胞炎症细胞浸润, 纤维细胞增生明显。复方甲硝唑阴道栓组阴道分泌物减少, 镜下观察上皮连续性好, 少见浅表糜烂, 炎症细胞浸润减少。

2.6.2 阴道组织病变评分

正常组阴道组织未见炎症细胞浸润或水肿及充血, 病变评分为 0.0 ± 0.0 ; 模型组阴道组织可见大量的炎症细胞浸润, 同时伴有炎性渗出物, 病变评分为 3.5 ± 0.4 ; 复方甲硝唑阴道栓组阴道组织可见充血, 但未见水肿和炎症细胞浸润, 病变评分为 1.0 ± 0.1 。结果显示模型组动物连续接种混合菌 3 d, 大鼠阴道组织病变程度加重 ($P < 0.01$); 经阴道给予复方甲硝唑阴道栓治疗 5 d 后, 动物阴道组织病变程度有所减轻 ($P < 0.01$)。提示复方甲硝唑阴道栓能显著改善混合性阴道炎大鼠阴道组织病变程度。

3 讨论

混合性阴道炎是指阴道受多种病菌 (如霉菌、细菌、滴虫等)、原虫感染而引起的炎症性病变, 也就是阴道菌群失调的局部表现。临床实践上多数是混合感染, 如真菌感染多继发于细菌感染或治疗之后。临床上妇科诊断主要通过阴道分泌物培养、清洁度、pH 以及胺臭味试验检查, 筛选出可能性疾病。阴道炎治疗原则主要是消除诱因, 根据患者情况选择局部或全身应用抗真菌药物, 应将抗真菌药与抗菌药联合应用。但这些药物在杀死致病菌的同时, 也杀死了起自洁作用的乳杆菌, 所以只能取得暂时缓解, 由于失去优势乳杆菌的保护, 新一轮感染很快出现, 导致迁延反复。由此可见, 阴道炎方面疾病对人类健康的危害依然严重, 其治疗任务依然艰巨, 因此建立符合临床阴道炎表现的模型对阴道炎的治疗都有着重要的意义。目前文献报道的模型有细菌性、真菌性、滴虫性和衣原体性阴道炎模型, 其中真菌性阴道炎模型研究较多, 而真菌和细菌混合感染模型报道甚少, 因此本研究主要通过大鼠经皮下注射给予苯甲酸雌二醇, 建立假动情期, 同时经阴道给予注射用硫酸链霉素处理, 能够破坏正常大鼠的阴道菌群, 再注入致病性混合菌 (加德纳菌 GV10-1 菌, 白色念珠菌, B 族链球菌悬液) 更容易定植到大鼠阴道内, 有利于混合菌的生长和繁殖, 从而复制混合性阴道炎模型。

研究显示, 混合性阴道炎模型组大鼠给药第 5 天混合感染率为 90%, 致病性菌落数显著增加, 阴道分泌物涂片转阴率显著减少, 清洁度评分显著增加, 同时阴道 pH 显著增加, 其异常症状与临床上阴道炎的临床表现相似。显微镜下观察到阴道壁变厚, 上皮细胞坏死, 固有层出现充血和水肿, 以中性粒细胞为主, 淋巴细胞和单核细胞炎症细胞浸润, 纤

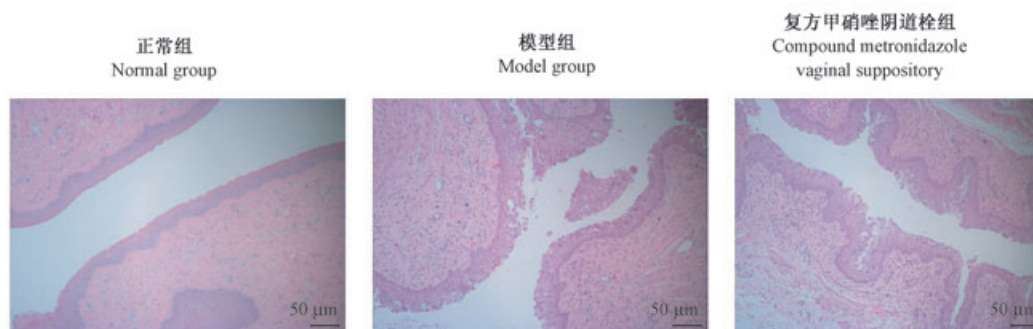


图 5 SD 大鼠阴道组织病理切片 ($\times 100$, HE 染色)

Figure 5 Vaginal histopathological sections of SD rats ($\times 100$, HE staining)

维细胞增生明显,其病理改变与临床基本一致。复方甲硝唑阴道栓含有甲硝唑、制霉菌素、四环素等多种成分,可以同时杀死细菌、霉菌和滴虫,用于治疗滴虫性阴道炎、细菌性阴道炎和霉菌性阴道炎等多种类型的阴道炎。甲硝唑的抗菌谱包括消化链球菌、韦荣球菌、梭形杆菌、真杆菌等,其中甲硝唑的硝基在特定条件下还原成一种细胞毒性物质,并参与细菌的基因代谢过程致细菌的死亡^[9-11]。制霉菌素栓剂是一种多烯型抗真菌药物,对念珠菌属的抗菌活性高,可与真菌细胞膜上甾醇结合,改变细胞膜通透性进而发挥抗菌功能^[12]。故本次研究选用复方甲硝唑阴道栓作为混合性阴道炎模型的阳性药进行验证,结果显示复方甲硝唑阴道栓能显著减轻阴道黏膜的炎症浸润,显著减少阴道分泌物和阴道灌洗液的致病菌群数目,同时降低阴道 pH 值和清洁度评分。

综上所述,对大鼠进行雌激素和注射用硫酸链霉素预处理后,接种混合菌可成功建立大鼠混合性阴道炎模型,为女性生殖系统的药物筛选与评价提供有效的动物模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] 付东红. 生殖道感染患病率高达 57.1% [N]. 中国医药报, 2004/06/24.
Fu DH. The prevalence of genital tract infection was as high as 57.1% [N]. China Pharmaceutical News, 2004/06/24.
- [2] Schwebke JR, Gaydos CA, Nyirjesy P, et al. Diagnostic performance of a molecular test versus clinician assessment of vaginitis [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(6): e00252-18.
- [3] 李会影, 李瑞丽, 刘建璇, 等. 参绒洁阴泡沫剂对霉菌性阴道炎模型兔阴道分泌物及阴道黏膜组织病理改变的影响 [J]. 河北中医, 2019, 41(10): 1536-1539.
Li HY, Li RL, Liu JX, et al. Effect of Shenrong Jieyin foam on vaginal secretion and pathological changes of vaginal mucosa in model rabbits with colpitis mycetica [J]. Hebei J Tradit Chin Med, 2019, 41(10): 1536-1539.
- [4] 黄瑜, 蒙春莲, 黄国爱, 等. 缩醛磷脂对混合细菌感染大鼠阴道炎的改善效果分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(18): 2731-2735.
Huang Y, Meng CL, Huang GA, et al. Effect of plasmalogen on improvement vaginitis in rats with mixed infection [J]. Chin J Nosocomiol, 2019, 29(18): 2731-2735.
- [5] 张冬梅, 李红娟, 周芹. 黄柏碱对细菌性阴道病小鼠模型的保护作用 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5849-5853.
Zhang DM, Li HJ, Zhou Q. Protective effect of phellodendrine on bacterial vaginosis mice [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2018, 49(24): 5849-5853.
- [6] Cai X, Kong F, Wang R, et al. Candida albicans vaginitis in a murine model is reduced by polypeptide-enriched Gastrodia elata extracts [J]. Future Microbiol, 2019, 14: 839-846.
- [7] Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina [J]. Arch Gynecol Obst, 2006, 273(4): 195-202.
- [8] Esposito E, Campolo M, Casili G, et al. Effect of pea protein plus grape seed dry extract on a murine model of Candida albicans induced vaginitis [J]. Future Microbiol, 2018, 13: 1375-1382.
- [9] 孟凡景. 阴道菌群移植及阴道益生菌组合对细菌性阴道炎的治疗及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
Meng FG. Therapy and mechanism of vaginal microbiota transplantation and combination of vaginal probiotics in the vaginal bacterial infections [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.
- [10] 李军霞. 复方甲硝唑阴道栓治疗阴道炎的应用价值分析及评估 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(20): 162-163.
Li JX. Analysis and evaluation of the application value of compound metronidazole vaginal suppository in the treatment of vaginitis [J]. Chin Cont Med Edu, 2017, 9(20): 162-163.
- [11] 王丽萍. 复方甲硝唑阴道栓治疗滴虫性阴道炎疗效观察 [J]. 临床研究, 2016, 22(2): 86-87.
Wang LP. Clinical observation of compound metronidazole vaginal suppository in the treatment of trichomonas vaginitis [J]. Psychological Doctor, 2016, 22(2): 86-87.
- [12] 雷洁, 陈小宁. 制霉菌素栓剂与凯妮汀阴道给药治疗复发性外阴阴道念珠菌病临床疗效和安全性评估 [J]. 药品评价, 2019, 16(9): 24-26, 32.
Lei J, Chen XN. Clinical efficacy and safety of nystatin suppository and canine vaginal administration in the treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis [J]. Drugs Clin, 2019, 16(9): 24-26, 32.

[收稿日期] 2020-01-31

李杰, 谢燕燕, 王馨, 等. 人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 532-538.

Li J, Xie YY, Wang X, et al. Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 532-538.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.014

人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达

李杰[#], 谢燕燕[#], 王馨, 王霖虹, 和红霞, 孙庆云, 晏亚辉, 闫振宇^{*}

(华北理工大学附属医院血液科, 河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 将携带人凝血因子 IX(hFIX) 基因(F9)的重组腺病毒转染 C57BL/6 小鼠脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC), 经过传代培养后, 观察 F9 是否在 ADSC 中稳定表达, 探索 ADSC 是否可作为血友病基因治疗的载体细胞。**方法** 取 C57BL/6 小鼠腹股沟区脂肪, 依据组织块悬浮法分离培养小鼠 ADSC 并进行传代培养, 应用携带 hFIX 基因并含 GFP 荧光标记的重组腺病毒转染第 3 代 ADSC, 转染后再次进行传代培养至第 4、5 代细胞。荧光显微镜下观察细胞携带荧光数量, RT-PCR 检测 F9 基因表达, ELISA 法检测细胞上清液及 Western Blot 检测细胞内携带目的基因表达蛋白情况。**结果** (1) 重组腺病毒转染后荧光显微镜下可见荧光表达, 细胞传代后仍具有荧光。(2) RT-PCR 结果显示: 四组 ADSC 均可表达内参 GAPDH 基因片段, A、B、C 组可检测到目的基因 F9 的表达, D 组未检测到 F9 的表达。(3) ELISA 法检测凝血因子 IX 抗原(hFIX: Ag)结果显示: A 组(81.62 ± 8.82) ng/mL、B 组(52.50 ± 3.25) ng/mL、C 组(47.41 ± 4.00) ng/mL 明显高于 D 组检测值(0.76 ± 0.44) ng/mL, 差异具有显著性($P < 0.05$)。(4) Western Blot 法检测四组细胞内 hFIX 蛋白表达情况, 结果显示 A 组蛋白表达灰度值(0.68 ± 0.10)、B 组(0.49 ± 0.15)、C 组(0.18 ± 0.05)明显高于 D 组蛋白表达灰度值(0.02 ± 0.01), 差异具有显著性($P < 0.05$)。**结论** 重组腺病毒转染 ADSC 后, 经过传代后培养, 仍可表达较高的 hFIX 活性, 可以作为血友病基因治疗的载体细胞。

【关键词】 目的基因; 重组腺病毒; 脂肪间充质干细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0532-07

Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells

LI Jie[#], XIE Yanyan[#], WANG Xin, WANG Linhong, HE Hongxia, SUN Qingyun, YAN Yahui, YAN Zhenyu^{*}

(Department of Hematology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com

【Abstract】 Objective To observe whether hFIX is stably expressed in adipose-derived stem cells (ADSCs) and to explore whether ADSCs can be used as a vector cell line for hemophilia gene therapy following transformation by recombinant adenoviruses carrying human coagulation factor IX (hFIX) gene, F9. **Methods** ADSCs were isolated from C57BL/6 mice and cultured by tissue mass suspension. The third generation of ADSCs was transfected by recombinant adenovirus carrying F9 and GFP fluorescence marker. After transfection, the cells were subcultured again to the 4th and 5th passages. The level of fluorescence expressed by the cells was observed by fluorescence microscopy, the expression of F9 was detected by RT-PCR, and the protein expression of hFIX was detected by ELISA and western blotting. **Results**

[基金项目] 2016 年河北省政府临床医学优秀人才基础与培养项目(361036)。

Funded by Clinical Medicine Talent Foundation and Training Project of Hebei Provincial Government in 2016(361036)。

[作者简介] 李杰(1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 血液病学。Email: hbljj2017@163.com;

谢燕燕(1989—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 血液病学。Email: 15081920603@163.com。

[#]共同第一作者

[通信作者] 闫振宇(1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 血液病学。Email: hbyzy2011@163.com

Fluorescence was observed after recombinant adenoviral transfer, and was still identified after cell passaging. RT-PCR revealed that all four groups of ADSCs could express internal reference *GAPDH*, but there was no expression of the target gene *F9* in group A, and the expression of *F9* could be detected in group D. Detection of hFIX:Ag by ELISA showed that the detection values of groups A (81.62 ± 8.82) ng/mL, B (52.50 ± 3.25) ng/mL, and C (47.41 ± 4.00) ng/mL were significantly higher than that of group D (0.76 ± 0.44) ng/mL, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$). hFIX expression in the four groups of ADSCs was detected by western blotting. The result showed that the gray value of histone expression in groups A (0.68 ± 0.10), B (0.49 ± 0.15) and C was significantly higher than that in group D (0.02 ± 0.01), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), while the gray value of histone expression in group A was significantly higher than that in group D ($P < 0.05$). **Conclusions** The recombinant adenoviruses were transformed into ADSCs and cultured after passaging, and could still express high hFIX activity, thus demonstrating their potential as vector cells for hemophilia gene therapy.

【Keywords】 target gene; recombinant adenovirus; adipose-derived stem cell (ADSC)

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

血友病 B (hemophilia B) 是一种 X 染色体相关的隐性遗传性疾病,其发病机制为编码凝血因子 IX 的基因突变导致凝血功能障碍,目前尚无治愈方法^[1]。其作为一种单基因型疾病,基因治疗为该疾病的治愈提供了可能。间接体内法 (*ex vivo*) 为基因治疗的间接途径,其实质是指通过将携带目的基因的病毒或非病毒载体转染实验动物或患者体内的组织或细胞,该组织或细胞作为靶细胞再次回输入体内,产生所需蛋白的表达。本实验组前期已经探讨了携带 *hFIX* 的重组腺病毒可以转染小鼠脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cell, ADSC), 并得到目的蛋白的表达,但未探讨腺病毒转染后,ADSC 的干性有无变化,也未进行转染后细胞是否可以稳定表达的实验研究。本实验就此问题进行初步研究,探讨 ADSC 转染携带目的基因的腺病毒后,干性有无改变及蛋白是否稳定表达,为 ADSC 作为血友病基因治疗的靶细胞动物实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级近交系雄性 C57BL/6 小鼠 4 只,3 ~ 4 周龄,体重 20 ~ 30 g,购自北京华阜康动物有限公司【SCXK(京)2019-0008】,饲养于华北理工大学医学中心实验室【SYXK(冀)2015-0038】。自由进食水,室温温度控制在 (18 ~ 26) °C,相对湿度 40% ~ 70%,12 h 昼夜交替,每次 8 ~ 12 h 通风换气。本实验通过华北理工大学实验动物伦理委员会审查,符合动物伦理要求,按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 实验细胞

实验细胞为近交系 C57BL/6 小鼠脂肪间充质干细胞 (ADSC),为本实验组进行分离培养。

1.1.3 试剂与仪器

胎牛血清 (PAN, P30-2600); DMEN/F12 培养基 (Corning, 10-092-CVR); Pen/Strep 青链霉素双抗 100X (Corning, 30-002-CI); PBS 缓冲液 (Hyclone, 02-024-1ACS); 含 0.05% EDTA 胰蛋白酶 (Hyclone, 03-050-1B)。重组腺病毒 Ad-F9-GFP 及 Ad-GFP (上海汉恒生物科技有限公司)。碱性磷酸酶染色剂 (BASO, BA4117); 茜素红染色剂 (Lengene, 美国); 逆转录试剂盒 (TaKaRa, RR037 A); 2 × Utaq PCR MasterMix (含染料) (ZOMANBIO, ZT201 A-2); DNA Marker I (ZOMANBIO, zm101-2); Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-Free, 100X in DMSO) (APEX BIO, K1007); F9 Polyclonal Antibody (ABclonal, A1578); ACTB (ABclonal, AC026); 超敏 ExPlus ECL 化学发光检测试剂盒 (ZOMANBIO, ZD310 A-1); 人凝血因子 IX (FIX) ELISA Kit (Andy gene, Human1954)。

生物安全柜 (海尔集团有限公司, HR60-IIA2, 中国); 超净工作台 (Forma Scientific, 美国); CO₂ 细胞培养箱 (Forma 公司, SL-JC-2323, 美国); 倒置相差显微镜 (Olympus, CX-24, 日本); 荧光电子显微镜 (Nikon 公司, TI-U, 日本); 普通 PCR 仪 (伯乐生物技术有限公司, 美国); 电泳仪 (伯乐生物技术有限公司, 美国); 酶标仪 (Biotek 公司, ELX800, 美国); 凝胶成像系统 AI600 (GE, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

本实验分为 4 组, A 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染首次转染细胞; B 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP

转染后细胞传代后 1 代; C 组: 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染后细胞传代后 2 代; D 组: 正常 ADSC。

1.2.2 ADSC 复苏

将冻存 ADSC 从液氮中取出, 迅速置于 37℃ 水浴锅中复溶, “8” 字形滑动, 注意期间冻存瓶盖及封口膜位置不可接触水浴锅中温水, 避免污染。待细胞溶解, 约 1 min 后将细胞快速置入含有 0.5 mL 预热培养基的培养瓶中, 后逐渐加入培养基至 3 ~ 4 mL。滴管混匀后, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后换液处理。

1.2.3 ADSC 的消化及传代

将细胞培养瓶中原有细胞培养液弃去, 加入 3 ~ 5 mL 生理盐水清洗 2 次后弃去液体, 注意将瓶中剩余生理盐水应用移液器去除, 后加入 600 μL 含 0.05% EDTA 的胰蛋白酶, 放入 37℃ 细胞培养箱, 2 min 后显微镜下观察, 细胞完全消化后加入 2 mL 完全培养基终止, 转移至 15 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 5 min 后弃去上清液, 加入 4 mL 10% FBS 将细胞吹匀后移至 2 个细胞瓶中, 每瓶放置 2 mL 培养基, 最后在每瓶细胞瓶中补充 2 mL 10% FBS 培养基, 放置于含有 5% CO₂ 的 37℃ 孵育箱中培养, 3 d 后再次换液。

1.2.4 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 体外转染 ADSC

取第 3 代 ADSC, 计数 2.5×10^5 个细胞接种于 12.5 cm² 细胞瓶中, 观察细胞生长状态, 当细胞生长汇合率至 70% ~ 80%, 更换新的完全培养基, 取重组腺病毒 Ad-F9-GFP 按照 MOI = 300 转染细胞 (MOI = 病毒载量 × 体积 / 细胞数量, 本研究 MOI = 300 为前期实验结果显示最佳转染 MOI)。24 h 后进行换液处理。荧光显微镜观察荧光表达情况。

1.2.5 转染后 ADSC 传代培养

首次转染后 ADSC 留取足够数量细胞, 其余细胞进行传代培养, 至转染后第 1、2 代细胞, 荧光显微镜下观察荧光表达情况, 传代方法同 1.2.3。

1.2.6 转染后 ADSC 的成骨诱导检测

取重组腺病毒转染后 ADSC, 观察细胞生长状态, 待汇合率为 60% ~ 70% 时, 依据相关文献^[2-3]进行成骨诱导, 并于诱导培养第 7 天后进行 ALP 染色, 第 30 天后茜素红染色。观察转染后 ADSC 的分化能力, 初步探讨重组腺病毒转染后 ADSC 的干性有无改变。

1.2.7 RT-PCR 检测转染后 ADSC 传代后目的基因表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 应用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。RNA 提取后, 测定 RNA 纯度及浓度测定。样品合格后, 取 1 μg 提取 RNA 根据试剂盒说明书进行逆转录合成。依据 TaKaRa 逆转录试剂说明书, 逆转录条件为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ forever。以逆转录产物行 PCR, 根据小鼠 GAPDH (179 bp) 为内参, F9 (118 bp) 的基因序列设计引物 (表 1), 引物送至英潍捷基 (上海) 贸易有限公司 Invitrogen 合成。再行 PCR 扩增特异序列, PCR 反应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 72℃ 5 min, 30 个循环。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	前引物 (5' 端到 3' 端) Forward primer (5' to 3')	后引物 (5' 端到 3' 端) Reverse primer (5' to 3')
GAPDH	ACTCTTCCACCTTCGGCC	TCTTGCTCAGTGTCTTGCT
hFIX	GCGGCAGTTCGAAGGATGAC	AACTGCTCGCATCTGCCATT

1.2.8 ELISA 检测转染后细胞及传代后 hFIX: Ag 表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 提取细胞上清液, 依据 ELISA 试剂说明书, 检测上清液中 hFIX: Ag 表达情况。

1.2.9 Western Blot 检测转染后细胞及传代后目的蛋白表达

依据实验分组, A 组细胞转染后 72 h, B、C、D 组待细胞长满细胞瓶, 提取细胞蛋白。BCA 蛋白浓度测定后, 行 Western Blot 检测蛋白表达。

1.3 统计学分析

实验所得数据采用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理统计分析软件进行分析, 计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 C57BL/6 小鼠 ADSC 复苏后状态观察

如图 1 所示, 冻存 ADSC 在细胞复苏后, 大致外观与冻存前 ADSC 未见明显改变, 细胞呈均匀长梭型生长。

2.2 重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染小鼠 ADSC 及转染后传代荧光图

重组腺病毒 Ad-F9-GFP 转染 ADSC 24 h 后, 荧光显微镜下可见荧光表达。随时间延长荧光逐渐

增强,72 h 后可见荧光亮度强于 24 h。待细胞长满细胞瓶,传代后仍可见荧光表达(图 2)。

2.3 转染后 ADSC 的成骨诱导检测

如图 3 所示,A、B 两图为重组腺病毒转染细胞后成骨诱导,图 C、图 D 分别为第 7 天、第 30 天进行 ALP 染色,图 C 为应用偶氮偶联法,图中显示大量红色颗粒为细胞核,散在可见部分蓝色颗粒。图 D 为第 30 天行茜素红染色,细胞间可见大小不一的棕褐色块状沉淀,即矿化结节。

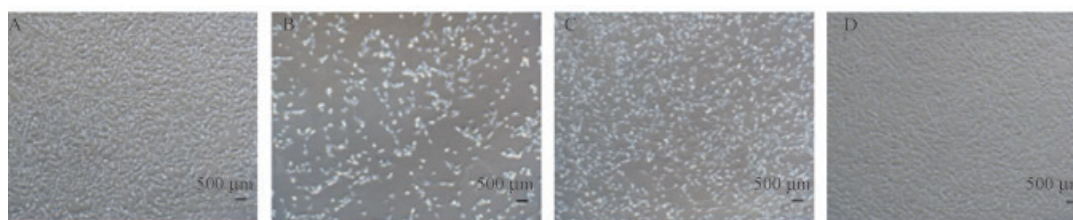
2.4 RT-PCR 检测转染后 ADSC 传代后目的基因表达

如图 4 所示,四组细胞均可见到内参基因 *GAPDH* 的表达,在 *F9* 基因表达上,A、B、C 组可见

到符合 118 bp 基因表达片段,而 D 组未见到表达情况。根据图像,进行灰度值分析,A、B、C 三组明显高于 D 组表达,差异具有显著性。

2.5 ELISA 检测转染后细胞及传代后 hFIX:Ag 表达

结果分析显示四组细胞中,A 组、B 组及 C 组 ELISA 法检测抗原水平,均可见 hFIX:Ag 的表达,分析四组间数据,差异具有显著性。A 组中 hFIX:Ag (81.62 ± 8.82) ng/mL 水平明显高于其它三组,B 组 (52.50 ± 3.25) ng/mL、C 组 (47.41 ± 4.00) ng/mL hFIX:Ag 水平高于 D 组正常 ADSC (0.76 ± 0.44) ng/mL,提示 ADSC 在转染重组腺病毒 Ad-F9-GFP 后传代 2 次仍可稳定表达目的蛋白(图 5)。

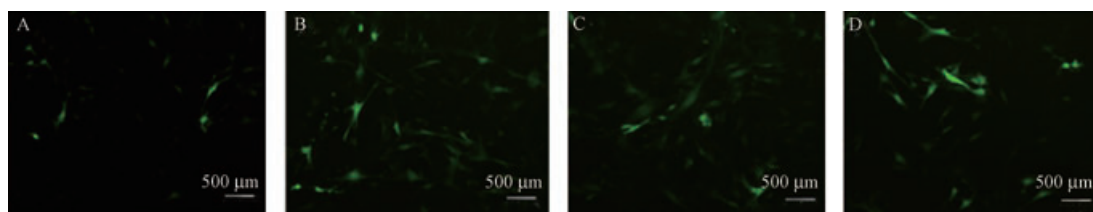


注:A:冻存前 24 h;B:复苏后 24 h;C:复苏后 48 h;D:复苏后 72 h。

图 1 复苏后 ADSC 细胞生长情况

Note. A, 24 hours before cryopreservation. B, 24 hours after recovery. C, 48 hours after recovery. D, 72 hours after recovery.

Figure 1 Growth of ADSC cells after recovery

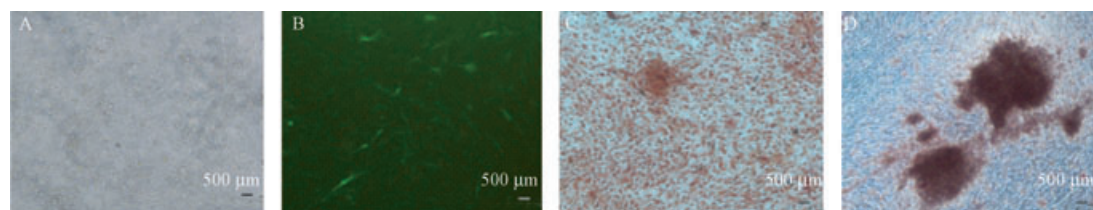


注:A:转染 24 h 后;B:转染 72 h 后;C:转染后传代 1 次;D:转染后传代 2 次。

图 2 Ad-F9-GFP 转染细胞及传代后荧光表达

Note. A, 24 hours after transfection. B, 72 hours after transfer. C, The first passage after transfer. D, The second passage after transfer.

Figure 2 Fluorescent expression of Ad-F9-GFP transfected cells and subcultured cells

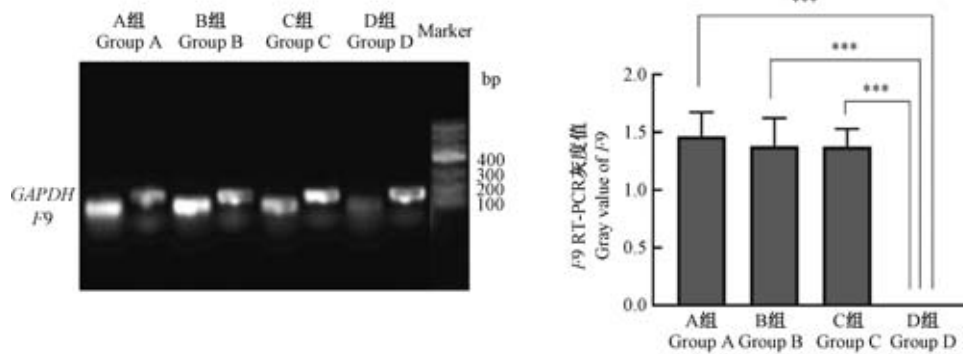


注:A:重组腺病毒转染后成骨诱导;B:重组腺病毒转染后成骨诱导荧光图;C:成骨诱导后碱性磷酸酶染色;D:成骨诱导后茜素红染色。

图 3 重组腺病毒转染 ADSC 成骨诱导图

Note. A, Osteogenic induction after recombinant adenoviral transfer. B, Osteogenic induction fluorescence map after recombinant adenoviral transfer. C, Alkaline phosphatase staining after osteogenic induction. D, Alizarin red staining after osteogenic induction.

Figure 3 Results of osteogenic induction of ADSC by recombinant adenovirus



注:与 D 组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 4 四组细胞 F9 基因 RT-PCR 结果及灰度值比较图

Note. Compared with group D, *** $P < 0.001$. (The same in the following Figures)

Figure 4 Comparison of RT-PCR results and gray value of F9 gene in the four groups

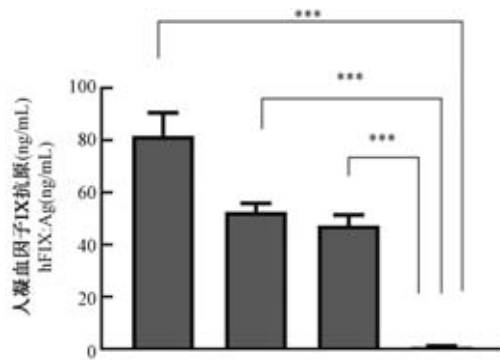


图 5 ELISA 检测细胞上清液 hFIX:Ag 表达水平

Figure 5 Expression of hFIX:Ag in cell culture medium by ELISA

2.6 Western Blot 检测转染后细胞及传代后 hFIX 表达

如图 6 所示, A 组蛋白表达灰度值 (0.68 ± 0.10)、B 组 (0.49 ± 0.15)、C 组 (0.18 ± 0.05) 明显高于 D 组蛋白表达灰度值 (0.02 ± 0.01), 差异具

有显著性。

3 讨论

血友病 B 为一种单基因隐性遗传性疾病, 男性多发病, 研究表明血友病发病率约为 $1/25\,000$ ^[4], 目前的治疗方法主要以替代治疗为主^[5]。然而, 替代治疗具有一个非常常见的问题, 即 FIX 因子半衰期约为 24 h, 随着时间的延长, 药物浓度逐渐降低, 无法持久维持在有效血药浓度。并且随着给药频率的增加, 也将增加患者体内 FIX 抗体即抑制物的发生率。这种抑制物的产生则会使之后的凝血因子输注达不到预期效果^[6]。作为一种单基因遗传性疾病, 基因治疗成为可能治愈手段成为可能。基因治疗则可以分为体内途径 (*in vivo*) 和体外途径 (*ex vivo*), *in vivo* 主要是指将携带有目的基因的各种载体直接注入体内, 从而产生一系列的蛋白表达, 达到研究者的预期结果。而 *ex vivo* 则主要表现在将

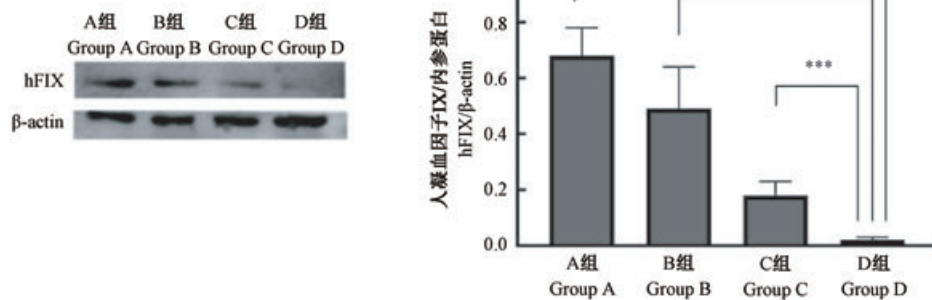


图 6 Western Blot 检测细胞 hFIX 蛋白水平

Figure 6 Western Blot was used to detect cellular hFIX protein expression

目的基因整合到从机体内分离提取的各种干细胞上,再通过将该细胞移植到宿主体内,达到预期效果^[7]。

在各种间充质干细胞中,脂肪间充质干细胞(ADSC)具有其自身的优势,易于提取^[8-10]。研究表明,ADSC 仍具有其他间充质干细胞的主要特征:具有向其它细胞分化的潜能^[11-19]。多项研究表明,ADSC 的应用范围非常广泛,得到了众多方面的应用^[20-29]。

在本研究前期工作中,对于 C57BL/6 小鼠 ADSC 的分离培养有所涉及,并对于该细胞进行了流式细胞术及成脂成骨诱导分化培养进行鉴定,证明 ADSC 的成功抽提。同时通过将腺病毒和 ADSC 相结合,对于血友病基因治疗的体外方法成功奠定基础。初步证明了携带 *hFIX* 基因的腺病毒能有效转染 ADSC,使其表达具有凝血活性的 hFIX 蛋白。基于上述实验研究结果,本实验通过对于携带 *hFIX* 基因的腺病毒转染后的 ADSC 传代培养,初步探讨携 *hFIX* 基因重组腺病毒转染后的 ADSC 是否稳定表达。

实验过程中,我们发现重组腺病毒转染 ADSC 后,经过传代后培养,仍可表达较高的 hFIX 活性。ELISA 检测细胞上清液中,携带 *F9* 基因转染的 ADSC 经过细胞传代培养仍可以分泌 hFIX 并分泌如细胞上清液。数据表明,三组实验组数据均明显高于空白对照组。Weston Blot 检测四组 ADSC 的细胞内蛋白表达,A、B、C 三组均可见到表达在 50kDa 左右的 hFIX 蛋白表达,而 D 组未见到该蛋白表达。在本实验中,应用 RT-PCR 检测四组 ADSC 中 *F9* 基因表达情况,结果显示:A、B、C 三组均可见到位于 118 bp 的基因表达条带而未见到 D 组表达。实验中,ELISA、Weston Blot 及 RT-PCR 结果中,A 组数值均为最高,考虑与腺病毒本身的特点,该病毒为非包膜双联 DNA,携带的遗传物质并不整合到宿主细胞基因组有关。但是该病毒包装量大,也避免了插入突变的风险^[30]。

综合上述实验结果,我们初步认为在携带 *hFIX* 基因的腺病毒转染后的 ADSC,其携带的 *hFIX* 基因并不受细胞传代的影响。ADSC 可以作为基因治疗的有效靶细胞。这也为后续血友病 *ex vivo* 基因治疗动物实验奠定了基础。

参 考 文 献(References)

[1] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-bunschoten EP, et al.

Guidelines for the management of hemophilia[J]. Haemophilia, 2013, 19(1): e1-e47.

[2] 郭艳萍,陶常波,张爱君,等.成人脂肪间充质干细胞的定向成骨诱导[J].中国组织工程研究,2014,18(19):2987-2992.

Guo YP, Tao CB, Zhang AJ, et al. Osteogenic induction of human adipose-derived stem cells[J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2014, (19): 2987-2992.

[3] 李珂雅,石桂英,高舒平,等.小鼠、大鼠、食蟹猴与人的脂肪干细胞分离培养方法和生物学特性的比较分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(6):14-21.

Li KY, Shi GY, Gao SP, et al. Comparative analysis of adipose-derived stem cells from commonly used laboratory animals and human[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 14-21.

[4] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组,中国血友病协作组.血友病诊断与治疗中国专家共识(2017年版)[J].中华血液学杂志,2017,38(5):364-370.

Thrombosis and hemostasis group, hematology society of chinese medical association. hemophilia treatment center collaborative network of china. Consensus of Chinese expert on the diagnosis and treatment of hemophilia (version 2017) [J]. Chin J Hematol, 2016, 37(5): 364-370.

[5] Santagostino E, Mancuso MS. Glycopegylated recombinant factor IX for hemophilia B in context[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 2933-2943.

[6] Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, et al. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia[J]. J Thromb Haemost, 2015, 13 Suppl 1: S133-S142.

[7] Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy[J]. N Engl J Med, 2001, 344(23): 1773-1779.

[8] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295.

[9] 李银华,黄星原,徐之良.转染鼠脂肪干细胞用于血友病 A 基因治疗的可能性实验[J].中国临床康复,2005,9(19):76-79.

Li YH, Huang XY, Xu ZL. Possibility of the transfected adipose tissue-derived stromal cells in the gene therapy of hemophilia A [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2005, 9(19): 76-79.

[10] Mizuno H, Tobita H, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine[J]. Stem Cells, 2012, 30(5): 804-810.

[11] Rangappa S, Fen C, Lee EH, et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(3): 775-779.

[12] Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue[J]. Plast Reconstr Surg, 2004, 113(2): 585-594.

[13] Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization in vivo[J]. Biochem Biophys Res

- Commun, 2005, 332(2): 370-379.
- [14] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(5): 560-567.
- [15] Ning H, Lin G, Lue TF, et al. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells[J]. Differentiation, 2006, 74(9-10): 510-518.
- [16] Corre J, Barreau C, Cousin B, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors[J]. J Cell Physiol, 2006, 208(2): 282-288.
- [17] Hörl S, Ejaz A, Ernst S, et al. CD146 (MCAM) in human cs-DLK1⁻/cs-CD34⁺ adipose stromal/progenitor cells[J]. Stem Cell Res, 2017, 22: 1-12.
- [18] Ejaz A, Mitterberger MC, Lu Z, et al. Weight loss upregulates the small GTPase DIRAS3 in human white adipose progenitor cells, which negatively regulates adipogenesis and activates autophagy via Akt-mTOR inhibition[J]. EBioMedicine, 2016, 6: 149-161.
- [19] Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2013, 129: 59-71.
- [20] Minteer DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential[J]. Clin Plast Surg, 2015, 42(2): 169-179.
- [21] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and periodontal tissue engineering[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2013, 28(6): e487-e493.
- [22] Minteer DM, Young MT, Lin YC, et al. Analysis of type II diabetes mellitus adipose-derived stem cells for tissue engineering applications[J]. J Tissue Eng, 2015, 6: 2041731415579215.
- [23] Tobita M, Mizuno H. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma; the keys to functional periodontal tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2013, 8(5): 400-406.
- [24] Tobita M, Uysal CA, Guo X, et al. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model[J]. Cytotherapy, 2013, 15(12): 1517-1526.
- [25] Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications[J]. Stem Cells Int, 2012, 2012: 461718.
- [26] Galeshi A, Ghasemi-kasman M, Feizi F, et al. Co-administration of aspirin and adipose-derived stem cell conditioned medium improves the functional recovery of the optic pathway in a lysolecithin-induced demyelination model[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15: 2681-2694.
- [27] Mou S, Zhou M, Li Y, et al. Extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells for the improvement of angiogenesis and fat-grafting application[J]. Plast Reconstr Surg, 2019, 144(4): 869-880.
- [28] Ryu S, Lee JM, Bae CA, et al. Therapeutic efficacy of neuregulin 1-expressing human adipose-derived mesenchymal stem cells for ischemic stroke[J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0222587.
- [29] Freitag J. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis-reply[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(16): 400.
- [30] Benskey MJ, Sandoval IM, Miller K, et al. Basic concepts in viral vector-mediated gene therapy[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1937: 3-26.

[收稿日期] 2020-02-08

张佳,李永军,屈玲玲,等. 深度水解蛋白的无乳糖奶粉在无菌大鼠培育中的应用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 539-544.

Zhang J, Li YJ, Qu LL, et al. Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 539-544.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.015

深度水解蛋白的无乳糖奶粉在无菌大鼠培育中的应用研究

张佳,李永军,屈玲玲,毛孙炳,李兰娟*

(浙江大学附属第一医院,传染病诊治国家重点实验室,无菌实验动物平台,杭州 310003)

【摘要】 目的 无菌大鼠的培育中,出生后饲喂的人工配制乳对于无菌大鼠的培养至关重要。深度水解蛋白的无乳糖奶粉,便于婴幼儿吸收,减少了各种消化不良和过敏反应,那么在无菌大鼠使用的奶中加入这种奶粉是否会对无菌大鼠的培育有积极的作用,并且检测饲养成功的无菌大鼠的生化指标。**方法** 使用清洁级的SD大鼠,确定临产期,摘除子宫后,在隔离器内剥离大鼠幼崽,使用人工方法哺乳至22 d离乳,记录体重和生存率。使用的配方奶中,加入深度水解蛋白无乳糖奶粉的为实验组,对照组中加入全价配方奶粉。对培育成功的无菌大鼠在第8周时检测血生化指标。**结果** 在人工喂养的前14天,实验组与对照组在体重和生存率上都无差别,从第14天开始实验组的体重和生存率开始高于对照组,直至第22天实验组的生存率与对照组相比极显著提高(37.18% vs 17.78%),第22天的体重也显著高于对照组(9.96 ± 0.49) vs (13.36 ± 0.59)。无菌大鼠的血生化指标显示AST(天门冬氨酸氨基转移酶)降低,GLU(葡萄糖)升高。**结论** 在培育无菌大鼠幼鼠阶段的过程中,深度水解蛋白的无乳糖奶粉可以作为配方奶成分的重要的成分进行添加,可以有效的增加幼鼠体重,减少死亡率。雌性无菌大鼠的血生化指标变动较大。

【关键词】 无菌大鼠;深度水解蛋白;无乳糖奶粉;生化分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0539-06

Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation

ZHANG Jia, LI Yongjun, QU Lingling, MAO Sunbing, LI Lanjuan*

(State Key Laboratory for the Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

Corresponding author: LI Lanjuan. E-mail: ljli@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective Artificially formulated milk fed after birth is essential for cultivating germ-free rats. Lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein is easily absorbed by infants and reduces indigestion and allergic reactions. We detected the biochemical indexes of germ-free rats to investigate whether adding lactose-free milk powder to their milk would have a positive effect on the rats. **Methods** Pregnant Sprague-Dawley rats were determined to be in labor. After surgically removing the uterus, the young rats were housed in isolators and artificially lactated for 22 days. Body weight and survival rates were recorded. The experimental group received lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein in their milk, and the control group received regular formula milk. The blood biochemical indexes were measured at 8 weeks. **Results** During the first 14 days of artificial feeding, body weight and survival rates did not differ between the

[作者简介] 张佳,实验员,研究方向:无菌动物培养。Email: zhjia2008@zju.edu.cn

[通信作者] 李兰娟,教授,研究方向:胃肠微生态。Email: ljli@zju.edu.cn

experimental and control groups. The weights and survival rates of the experimental group began to increase compared with those of the control group on day 14. The survival rate and body weights of the experimental group were significantly higher than those of the control group on day 22 [37.18% vs 17.78% and (9.96 ± 0.49) g vs (13.36 ± 0.59) g, respectively]. Blood biochemical indexes of the germ-free rats showed that their aspartate aminotransferase levels decreased, and their glucose levels increased. **Conclusions** In cultivating germ-free rat pups, lactose-free milk powder with deep hydrolyzed protein can be added to formula milk to effectively increase the weight of the young rats and reduce their mortality rate. Adding lactose-free milk powder to formula milk substantially changed the blood biochemical indexes of female germ-free rats.

【Keywords】 germ-free rats; deep hydrolyzed protein; lactose-free milk powder; biochemical analysis

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

无菌大鼠,是指体内不存在任何包括细菌、病毒、真菌、原虫、支原体、衣原体、螺旋体、立克次体在内的活的生命体的动物,这种动物模型为研究和验证肠道微生态和宿主正常生理的相互关系提供了行之有效的办法。

在国内无菌大鼠以个别机构少量生产后自用为主,国内尚无无菌大鼠规模化培育成功及应用的报道。这导致了无菌大鼠大多是从国外引进。目前,国际上主要有两家专业机构提供无菌大鼠模型,但其费用昂贵、运输不便、维持困难^[1]。

无菌大鼠在培育过程中,由于肠道菌群的缺失,乳鼠在喂奶后往往出现消化不良,吸收障碍,腹泻、腹部胀气进而腹部发黑,相继死亡,这一过程是造成无菌大鼠培育失败的主要原因之一。配方奶中蛋白质为大分子颗粒,对于幼鼠的吸收很困难,在胃肠微生物缺失的环境下,更易出现各种消化问题。另外在肠道中,由于乳糖酶的缺少会产生乳糖不耐,进而产气。深度水解蛋白无乳糖奶粉不仅不含乳糖,而且蛋白分子被深度水解为小分子蛋白,在人类婴幼儿的哺乳中被使用,增加婴幼儿营养的吸收,减少乳糖不耐症的发生,促进生长发育^[2]。无菌大鼠的培养中,使用深度水解蛋白的无乳糖奶粉是否会提高培育无菌大鼠的成活率,目前尚无文献报道,本实验将通过使用深度水解蛋白的无乳糖奶粉和普通全价奶粉的使用,观察是否在培育无菌大鼠中对乳鼠生存率有影响,进一步促进无菌大鼠的培育工作。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

10 只清洁级的 SD 大鼠,390~420 g,孕期 20 d,购于浙江省实验动物中心【SCXK(浙)2019-0002】。

40 只即将临产的普通级新西兰白兔,4.2~4.9 kg,由浙江省农业科学院提供【SCXK(浙)2017-0001】。动物实验在浙江大学附属第一医院无菌动物实验室进行【SYXK(浙)2019-0012】,经医院实验动物中心伦理委员会审批(2018 实动快审 749 号)。无菌大鼠隔离器内的温度为 33~34℃,12 h/12 h 昼夜交替,相对湿度 60%~70%,所有操作均符合实验动物福利和伦理委员会的要求。

1.1.2 试剂与仪器

小牛血清购于 Gibco 公司,婴幼儿奶粉对照组为普通婴儿奶粉,品牌为惠氏爱儿乐(S-26),实验组为深度水解蛋白的无乳糖奶粉,品牌为雀巢蔼儿舒。脑心浸液培养基、硫乙醇酸钠盐培养基购于美国 BD 公司,胰酪大豆胨液体培养基购于海博生物公司。兔乳为本实验室自制:临产母兔至产仔后第 20 天,每日人工挤奶收集,混合后测量乳糖含量,调整乳糖浓度为 25 g/L 后用来配制。软塑隔离器、空气过滤器、传递罐和灭菌筒购于冯氏实验动物设备有限公司。无菌大鼠血生化指标的分析仪器为深圳蓝韵医疗器材公司的全自动生化分析仪 LW C400。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠子宫摘除

使用清洁级的 SD 大鼠,选择怀孕时间已经为 20 d 的未生产母鼠,分别用推算法、触诊法、观察法和综合法进行判断,预测并确定孕鼠最终生产的时间点。将预测生产时间点和实际生产时间点进行比较,两者相差 1 h 以内的结果认定为判断准确。

CO₂ 麻醉后,用剪刀沿腹中线剪开皮肤,剪开腹肌,露出子宫。用手将子宫托起,用止血钳将子宫颈和两侧输卵管夹住,沿止血钳子宫远端宫颈和输卵管剪断。离体子宫放入传送袋中,经灭菌漂槽(内装 37℃ 的 2% 过氧乙酸),转入手术隔离器。在

手术隔离器内,用 0.1 mol/L 氢氧化钠中和子宫表面的过氧乙酸后,用两把组织镊将子宫及羊膜撕开。挤出胎鼠,擦去口鼻处羊水,用镊子轻轻夹捏胎鼠的尾巴,刺激其呼吸。然后剪断脐带,2 h 后开始人工哺乳。

1.2.2 人工乳的配制

在配制无菌大鼠人工乳的方面,为了减少其他

营养因子的干扰,参考了文献报导中的配方^[3],进行简化后配制,对照组的配方见表 1,实验组配方为将对照组中的普通婴幼儿奶粉替换为无乳糖深度水解奶粉,配制好以后⁶⁰Co 辐照消毒。根据计算三个阶段的乳糖含量:实验组为 13.5 g/L、14.75 g/L 和 16.25 g/L,对照组为 17.95 g/L、19.74 g/L 和 21.24 g/L。

表 1 无菌大鼠配方乳配料表

Table 1 Ingredients of germ-free rat formula milk

饲养时间 (天) Time (d)	兔乳 (mL) Rabbit milk (mL)	婴幼儿奶粉 (g) Infant formula (g)	小牛血清 (mL) Calf serum (mL)	灭菌水 (mL) Sterile water (mL)
0 ~ 6	54	3.4	12	34
7 ~ 15	59	3.8	16	25
16 ~ 21	65	3.8	16	19

1.2.3 乳鼠人工哺乳

根据乳鼠日龄的不同选用适宜的人工乳和吮吸乳头,连接好人工哺乳装置,将人工乳充满整个注射器、连接硅胶管和吮吸的人工乳头中,左手拇指和食指固定乳鼠头部,另外三个手指轻轻捏住动物,右手拇指和食指夹持人工乳头近乳头端一厘米处,挤出一滴乳诱导其张开嘴巴,然后将乳头插入乳鼠口中,放在舌头之上。这时用右手的拇指和食指轻轻堵在乳鼠口部。观察注射器内的液面变化情况。如果出现液面下降,说明乳鼠开始吮吸。哺乳到第 22 天离乳自由舔食,每日称量体重,计数死亡数和腹黑数。

1.2.4 无菌检测

在隔离器内收集无菌大鼠粪便、饲料、垫料、饮用水、棉拭子(皮毛、水瓶嘴、隔离器通风口、隔离器内壁)于无菌试管中,无菌操作下从隔离器内取出。粪便标本中加入适量无菌双蒸水制成粪便悬液,棉拭子标本中加入少量无菌双蒸水(以没过样品为宜),用吸管充分混匀。

在无菌操作台分别取 0.5 mL 样品溶液接种于已配置好的脑心浸液培养基、硫乙醇酸钠培养基、胰酪大豆胨培养基内,并各自设置阴、阳性对照,阳性对照样品为 SPF 大鼠粪便。接种后将硫乙醇酸钠培养基、脑心浸液培养基置于 37℃ 培养,胰酪大豆胨培养基置于 26℃ 培养。培养 14 d,逐日观察有无细菌或真菌生长。在培养第 7 天和第 14 天,从 37℃ 培养的液体培养基中转种相应的血培养基平板,再于 37℃ 培养 4 d,观察平板上有无细菌或真菌生长。

1.2.5 无菌大鼠血生化指标

8 W 的无菌大鼠雌雄各 3 只,麻醉后采血,室温

放置 30 min,3000 r/min 离心 30 min 分离血清。测试指标有:ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶)、ALB(白蛋白)、BUN(血尿素氮)、CR(血肌酐)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯)和 GLU(葡萄糖)。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行分析,以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 差异极具有显著性。运用卡方检验对两种人工配置乳的饲养结果进行计算。

2 结果

2.1 无菌大鼠模型的建立

共培养 10 个批次的无菌大鼠,其中对照组 4 个批次,起始培养数为 45 只,22 d 离乳存活数为 8 只。实验组为 6 个批次,起始培养数为 78 只,22 d 离乳存活数为 29 只。无菌检测结果均为阴性。

2.2 无菌大鼠的生长曲线

使用添加两种不同奶粉的配方奶饲养的无菌大鼠,其体重变化见图 1,在出生后的 1 ~ 7 d 体重呈现下降的趋势,从第 7 天开始,无菌大鼠的体重开始增加,直至第 14 天,体重增幅达到相同;从第 14 天开始体重增幅变化趋势发生变化,使用深度水解蛋白低乳糖奶粉的实验组,体重的增幅明显高于了使用全价奶粉的对照组。

2.3 死亡无菌大鼠的腹黑率

对 2 组哺乳无菌大鼠的腹黑率进行统计,对照组共死亡 37 只,其中 35 只发生腹黑,比例为 94.59%;实验组共死亡 49 只,40 只发生了腹黑的现

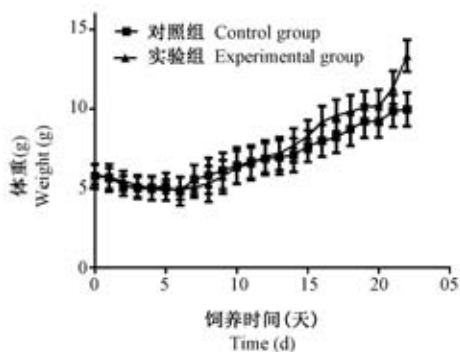


图1 无菌大鼠的生长曲线

Figure 1 Growth curve of germ-free rats

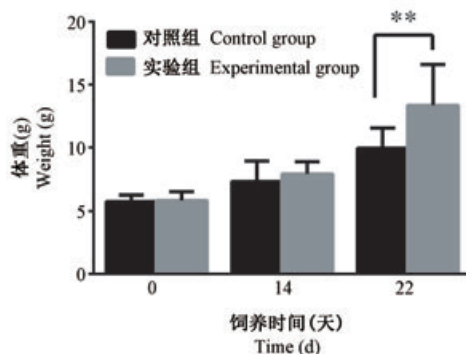
象,腹黑率为 81.63%,对比可见实验组的腹黑率低于对照组(81.63% vs 94.59%)。

2.4 无菌大鼠的体重对比

如图 2 所示,选取了 0,14 和 22 d 的体重进行比较。第 0 天(5.76 ± 0.08) vs (5.83 ± 0.08) 和第 14 天的体重(7.3 ± 0.36) vs (7.89 ± 0.16) 均无显著的差异,第 22 天实验组的体重显著高于对照组(9.96 ± 0.49) vs (13.36 ± 0.59),差异极具有显著性($P < 0.01$)。

2.5 无菌大鼠的生存曲线

根据生长曲线和体重的分析对比发现,在 14 d 左右饲养的无菌大鼠的生理数据出现了差别,所以生存曲线被分为 0 ~ 14 d 和 14 ~ 22 d 分别计算。由图 3A 所示,在培养的前 14 d,实验组和对照组的生存率无差别($P = 0.82$)。图 3B 显示实验组在第 14 ~ 22 天的生存率差异极具有显著性($P = 0.0002$),实验组的生存率极显著高于对照组。



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图2 无菌大鼠的体重对比

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

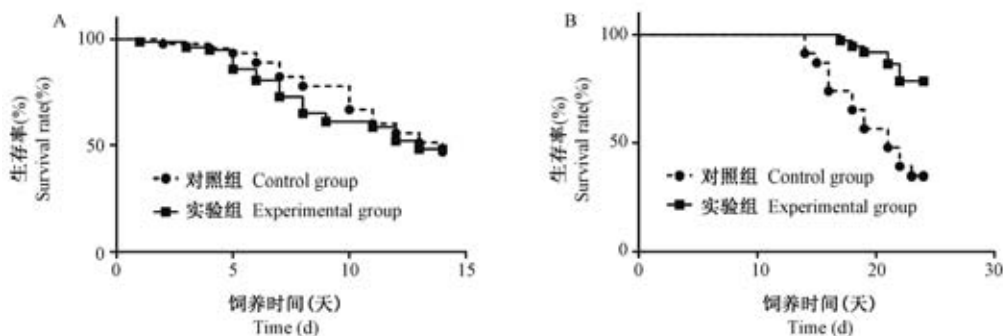
Figure 2 Weight comparison of germ-free rats

2.6 对两组无菌大鼠的卡方检验

将两组无菌大鼠实验数据做成表 2 的分类统计表格,假设 H_0 : 无菌大鼠的存活率与配方奶中添加何种奶粉无关,即二因子相互独立。 H_A : 无菌大鼠的存活率与配方奶中添加何种奶粉有关,即二因子彼此相关。统计推断结果为 $\chi^2 = 4.24 > \chi^2_{0.05} = 3.84$, $P < 0.05$, 否定 H_0 接受 H_A 。说明无菌大鼠的存活率和添加奶粉的类型显著相关。

2.7 无菌大鼠血生化指标检测结果

由表 3 所示,雌雄无菌大鼠的 BUN(血尿素氮)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯)表现为差异显著。其余 5 项 ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶)、ALB(白蛋白)、CR(血肌酐)、GLU(葡萄糖)雌雄间差异无显著性。



注:A:0 ~ 14 d 的生存曲线;B:14 ~ 22 d 的生存曲线。

图3 无菌大鼠的生存曲线

Note. A, the survival curve of 0 - 14 days. B, the survival curve of 14 - 22 days.

Figure 3 Survival curve of germ-free rats

表 2 实验组和对照组 22 d 存活率的分类统计表(内为理论数值)

Table 2 Classified statistics of 22-day survival rates in the two groups(The numbers in parentheses are theoretical values)

组别 Groups	死亡数 Number of deaths	存活数 Number of survivors	列总和 Column sum	存活率 Survival rates
对照组 Control group	37(31.46)	8(13.54)	45	17.78%
实验组 Experimental group	49(54.54)	29(23.46)	78	37.18%
行总和 Row sum	86	37	123	—

表 3 无菌大鼠血生化指标结果

Table 3 Results of blood biochemical indexes of germ-free rats

组别 Groups	丙氨酸氨基转移酶 ALT(U/L)	天门冬氨酸氨基转移酶 AST(U/L)	白蛋白 ALB(g/L)	血尿素氮 BUN(mmol/L)	血肌酐 CR(μmol/L)	总胆固醇 TC(mmol/L)	甘油三酯 TG(mmol/L)	葡萄糖 GLU(mmol/L)
雄性 Male	53.00 ± 5.80	126.90 ± 48.63	32.43 ± 0.50	6.19 ± 0.21	50.40 ± 2.95	2.22 ± 0.15	0.55 ± 0.11	9.45 ± 1.37
雌性 Female	56.60 ± 1.60	104.40 ± 41.47	33.73 ± 2.49	6.99 ± 0.42	57.00 ± 6.74	2.84 ± 0.23	1.44 ± 0.48	11.31 ± 3.00
平均值 Average	54.80 ± 4.29	115.67 ± 42.26	33.08 ± 1.76	6.59 ± 0.53	53.70 ± 5.89	2.53 ± 0.38	1.00 ± 0.58	10.38 ± 2.32
P 值 P value	0.359	0.574	0.426	0.041 *	0.195	0.018 *	0.035 *	0.381

注: * 表示雌雄间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Note. * represents significant difference between male and female ($P < 0.05$).

3 讨论

无菌动物是非常好的研究模型,现已发现肠道菌群的失衡与糖尿病、感染性疾病、炎症性肠病、肝病,甚至脑部疾病等多种疾病的发生密切相关^[4-8]。而无菌大鼠的成功培育非常困难,其技术要求高(人工哺乳技术)、需要特殊环境、专门仪器(隔离器)、成本高、污染率高、成功率低。1945 年,Reyniers 报道无菌大鼠繁殖成功后,其他研究者对无菌大鼠的培育也曾反复进行研究,但研究方法比较繁琐,甚至还有保守的成分存在,报道内容不尽详细,都使得无菌大鼠的培育受到制约^[1, 3, 9-13]。

在无菌大鼠的培养过程中,从出生人工喂养到断奶,这一过程无疑是最重要的环节,只要度过这个时期,就会为后面的成年无菌大鼠饲喂和种群扩繁提供可靠的保障。而人工喂养的乳鼠,由于在无菌的环境下,没有肠道菌群的参与和人工配制乳配方的缺陷,往往到断奶时有很高的死亡率。

无菌大鼠配方奶中的动物乳中含有一种或多种蛋白,可以引发胃肠道和呼吸道的不良过敏反应,深度水解牛乳蛋白奶粉通过超高温加热和酶切等技术的加工,将牛乳中蛋白质分子变小,或成为多肽、氨基酸,使其不含食物蛋白以减少动物乳蛋白的致敏性,降低发生牛乳蛋白过敏的概率^[2]。另

外,非水解奶粉平均粒径大,消化过程复杂,在胃中消化时会产生脂滴聚集的现象,消化不彻底,而深度水解的乳蛋白奶粉可以避免或减少这些情况,消化的更为快速,因此深度水解的配方奶粉对于动物的生长有显著的促进作用。这两项重要因素与无菌大鼠饲养培育实验的结果相符合,实验组在后期显著提高了无菌大鼠的体重和存活率。

由于无菌大鼠饲养的环境中不存在微生物,造就了自身特殊的生理条件,比如成年无菌大鼠的消化系统中,麦芽糖酶、蔗糖酶、海藻糖酶、纤维二糖酶和乳糖酶的活性大大高于普通饲养条件中的大鼠。另外,无菌大鼠出生前,乳糖酶的活性便开始增加,出生时的活性就为无菌成年大鼠的 2.6 倍左右,在出生后的第 7 天左右达到最高点,约为无菌成年大鼠的 4 倍,随即下降,20 d 左右降低到平台期保持不变,纤维二糖酶也有着相似的变化曲线^[14-15]。

这些无菌大鼠的生理特点与实验中的生理数据变化相呼应,培养的无菌大鼠在离乳人工饲喂的前 7 d,两组实验的无菌大鼠都呈现出体重不增反降,可能是人工饲喂的应激期,待习惯了这种饲喂方式,体重开始增加。持续到第 14 天,体重的增加和生存率都没有差别。从第 14 天开始,饲喂深度水解的无乳糖奶粉实验组的体重增幅明显高于对照全价奶粉组,而死亡率低于实验组。由于实验组中

添加了不含乳糖的奶粉,使得实验组中的乳糖含量低于对照组,而乳糖酶的活性在第 14 天下降到的水平成为了拐点,使得对照组不能充分利用吸收的乳糖开始增加,渗透压增高,造成一系列的乳糖不耐和消化不良反应,从而降低了体重的增速,增加了死亡率。

在无菌大鼠饲喂的配方奶方面,根据查到的文献都比较复杂繁琐,本研究中简化了相关配方,虽然免乳在配方中超过了总量的 50%,婴儿奶粉只是作为补充的添加,但是即便如此,使用深度水解无乳糖奶粉的实验组还是在生存率和体重增速上优于实验组,说明深度水解无乳糖的奶粉在无菌大鼠的培育中确实起到了促进作用,下一步的工作中,继续增加这种奶粉的比重,是否会进一步提高无菌大鼠繁育的成活率还有待进一步的研究。

无菌大鼠的血生化分析中,可以看到,由于在无菌环境下生长,大鼠的生化指标有所变化,相比较于清洁级的大鼠^[16],AST(天门冬氨酸氨基转移酶)降低,GLU(葡萄糖)升高。在性别分组的比较上,有三项表现为差异具有显著性,分别是 BUN(血尿素氮)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯),根据结果分析, $BUN(6.19 \pm 0.21) \text{ mmol/L}$ vs $(6.99 \pm 0.42) \text{ mmol/L}$ 和 $TC(2.22 \pm 0.15) \text{ mmol/L}$ vs $(2.84 \pm 0.23) \text{ mmol/L}$ 的差异扩大样本量后可以消除,但是 $TG(0.55 \pm 0.11) \text{ mmol/L}$ vs $(1.44 \pm 0.48) \text{ mmol/L}$ 结果的表现雄性显著低于雌性,结合雌性无菌大鼠血糖也显著升高,在无菌环境下,雌性无菌大鼠的生理生化指标受到的影响较大,这种差别是否是由于雌性对无菌环境更为敏感造成的,具体机制还需实验证实。

参 考 文 献(References)

- [1] 易萍. 无菌大鼠模型的建立及相关生物学特性研究 [D]. 杭州:浙江大学; 2013.
Yi P. Establishment of the germfree rat models and its Characteristic study [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2013.
- [2] 张阔. 不同水解度婴儿配方奶粉体外消化特性及对小鼠生长发育影响 [D]. 杭州:浙江工商大学; 2019.
Zhang K. *In vitro* digestibility of infant formula with different degree of hydrolysis and its effect on growth and development of mouse [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University; 2019.
- [3] 王建国. 无菌大鼠的人工培育及相关实验研究 [D]. 杭州:浙江大学; 2006.
Wang JG. Establishment of germfree rats and their techniques [D]. Hangzhou: Zhejiang University; 2006.
- [4] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 313-323.
- [5] Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? [J]. World J Gastroentero, 2011, 17(5): 557-566.
- [6] Gratz SW, Mykkanen H, El-Nezami HS. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases [J]. World J Gastroentero, 2010, 16(4): 403-410.
- [7] Thion MS, Low D, Silvén A, et al. Microbiome influences prenatal and adult microglia in a sex-specific manner [J]. Cell, 2017, 172(3): 500-516.
- [8] Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes [J]. Nature, 2008, 455(7216): 1109-1113.
- [9] 王建国, 李兰娟, 卢领群, 等. 动态调节人工乳粘稠度和营养成分饲喂无菌大鼠效果研究 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2007, 33(3): 259-264.
Wang JG, Li LJ, Lu LQ, et al. Effect of dynamic regulation of viscosity and nutritional ingredients of milk-substitutes on artificial rearing of germfree rats [J]. J Zhejiang Univ (Agric & Life Sci), 2007, 33(3): 259-264.
- [10] 戴方伟, 萨晓婴, 周莎桑, 等. 无菌大鼠培育中无菌检测影响因素分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 65-69.
Dai FW, Sa XY, Zhou SS, et al. Investigation of the influencing factors for sterile examination in germfree-reared rats [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(9): 65-69.
- [11] 王荫槐, 王安京, 孙淑华, 等. 人工培育繁殖无菌大鼠的研究(简报) [J]. 中国医学科学院学报, 1991, 3: 207.
Wang YH, Wang AJ, Sun SH, et al. Study on artificial breeding of germfree rats (briefing) [J]. Acta Acad Med Sin, 1991, 3: 207.
- [12] 仇慧敏, 孙淑华, 胡晓燕, 等. 无菌大鼠血液学及血液生化指标正常参考值的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5): 26-31.
Zhang HM, Sun SH, Hu XY, et al. Detection of blood parameters and blood biochemical parameters in germ-free rats [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(5): 26-31.
- [13] 朱祥宇, 刘君芳, 周淑佩, 等. 无菌大鼠培育的技术创新及其繁育探讨 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(1): 61-65.
Zhu XY, Liu JF, Zhou SP, et al. Technical innovation and breeding research in germ-free rats [J]. Lab Anim Sci, 2017, 34(1): 61-65.
- [14] Reddy BS, Pleasants JR, Wostmann B. Effect of dietary carbohydrates on intestinal disaccharidases in germfree and conventional rats [J]. J Nutr, 1968, 95(3): 413-419.
- [15] Reddy BS, Wostmann BS. Intestinal disaccharidase activities in the growing germfree and conventional rats [J]. Arch Biochem Biophys, 1966, 113(3): 609-616.
- [16] 王冬平, 隋丽华, 尚世臣, 等. 清洁级 SD 大鼠血液生理生化指标的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 44-46.
Wang DP, Sui LH, Shang SC, et al. Values of blood physiological and biochemical in clean animal SD rat [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(9): 44-46.

[收稿日期] 2020-02-19

许博洋, 庞小娟, 曾禹铭, 等. 肩袖肌腱损伤诱导性动物模型构建评价及研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 545-550.

Xu BY, Pang XJ, Zeng YM, et al. Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 545-550.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.016

肩袖肌腱损伤诱导性动物模型构建评价及研究进展

许博洋¹, 庞小娟¹, 曾禹铭¹, 周严冬², 郭义^{3,4,5*}

(1. 天津中医药大学 针灸推拿学院, 天津 301617; 2. 天津中医药大学 中西医结合学院, 天津 301617;
3. 天津中医药大学 中医学院, 天津 301617; 4. 天津中医药大学 实验针灸学研究中心, 天津 301617;
5. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381)

【摘要】 肩袖(rotator cuff, RC)肌腱损伤是肩关节急慢性疼痛、活动度受限的主要原因,急性损伤全层撕裂时通常需要进行外科手术的及时干预。临床上RC损伤的修复难点在于骨-肌腱界面的重建,虽然目前已经建立了多种手术创伤诱导性肩袖损伤动物模型,但仍缺乏合适的动物模型以及确切的治疗方法。本文将对国内外RC肌腱损伤诱导性动物模型的建立方法及适用范围进行总结归纳,探讨动物模型的选择及功能评估方法,以期为RC损伤的基础科研提供相应的理论依据。

【关键词】 肩关节;肩袖肌腱损伤;动物模型;组织构建;软组织生物力学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0545-06

Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model

XU Boyang¹, PANG Xiaojuan¹, ZENG Yuming¹, ZHOU Yandong², GUO Yi^{3,4,5*}

(1. College of Acupuncture and Massage, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China.
2. School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617.
3. School of Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617.
4. Research Center of Experimental Acupuncture Science, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617. 5. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381)
Corresponding author: GUO Yi. E-mail: guoyi_168@163.com

【Abstract】 Rotator cuff tendon injury is the main cause of acute and chronic shoulder pain and a limited range of motion. Surgical intervention is usually needed in cases of acute injury with full-thickness tears. The difficulty in repairing rotator cuff injuries lies in reconstructing the bone-tendon interface. Although various animal models of rotator cuff injuries induced by surgical trauma have been developed, suitable animal models and exact treatment method are lacking. This paper summarizes the establishment method and applicable scope of rotator cuff tendon injury-induced animal models and explores the selection of animal models and functional evaluation method to provide a corresponding theoretical basis for basic scientific research on rotator cuff injuries.

【Keywords】 shoulder joint; rotator cuff injury; animal model; tissue construction; soft tissue biomechanics

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

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(81330088), 国家级大学生创新创业训练项目(201910063002)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81330088), National College Students' Innovative and Entrepreneurial Training Program (201910063002).

【作者简介】 许博洋(1999—), 男, 本科, 主要从事骨关节疾病及运动医学的临床和生物力学基础研究。Email: lyndonhsu@outlook.com

【通信作者】 郭义(1965—), 男, 医学学士、硕士, 工学博士, 教授(二级), 研究员, 博士/博士后合作导师, 主要从事中医针灸教学及针灸作用原理、中医标准化研究和临床工作。Email: guoyi_168@163.com

肩关节是人体中最易移动且受约束最少的关节,其功能稳定性和固有关节活动度之间的平衡依赖于整个肩部静态和动态稳定系统的共同复合作用^[1]。RC 是由肩胛下肌(Subscapularis, SSc)、冈上肌(Supraspinatus, SS)、冈下肌(Infraspinatus, IS)和小圆肌(Teres minor, TM)所组成的肌群,在肩关节的动态稳定机制中扮演着重要角色。RC 通过肌肉的收缩活动平衡机械载荷所引起的去稳定化和稳定化作用,其中 SS 和 SSc 通过施加于冠状面和水平面上的应力应变作用来帮助肩部运动,同时将肱骨头居中压在肩胛盂上,从而保证在整个运动弧线上的关节稳定^[2-3]。因此,当发生肩袖肌腱损伤后,肩关节失去肩袖的主被动约束作用,稳定性急剧下降。传统意义上认为,退行性 RC 撕裂好发于 SS 肌腱的前部,与肱二头肌肌腱相邻。现认为其主要发生于肱二头肌后方约 15 mm 处的 SS 和 IS 的交界处^[4]。急性创伤引起的 RC 损伤,通常以 SS 肌腱的受累较为常见,损伤部位多位于距肱骨大结节止点约 1 cm 处。目前在临床上,RC 修复技术通常是使用缝合锚钉将断裂的肌腱锚定在其解剖足迹上,修复的肌腱-骨连接逐渐被纤维瘢痕界面取代,而不是通过纤维软骨区域天然附着部位而重建^[5]。因此,由于 RC 肌腱与骨骼之间的愈合能力不好,术后再撕裂率和并发症发生率仍处于较高水平,积极开发有利于肌腱解剖学上的软-硬组织过渡的生物材料或外科技术,对 RC 损伤的修复效果有一定的积极意义。成熟的动物模型能为我们理解 RC 肌腱损伤的发病机制有着很大的推进作用。本文将以肌腱-骨骼的生物力学特性为出发点,介绍国内外各种慢性 RC 损伤动物模型的制备方法及其功能评估,为后期 RC 损伤的基础科研提供一定参考。

1 肩袖肌腱的生物力学环境

RC 又称腱袖、旋转袖,组成 RC 的四块肌肉分别从肩胛骨向前延伸包绕肱骨头,维持肩关节稳定。SS 起源于肩胛骨的冈上窝,其肌腱穿过肩胛下间隙,附着于大结节的上、中面;IS 和 TM 起源于冈下窝和肩胛骨外侧缘背面,其肌腱分别附着于大结节的中部和下侧;SSc 起源于肩胛下窝,其肌腱附着于肱骨小结节。四块肌肉的肌腱在其附着点附近融合成一个连续的结构。肌腱与骨的结合部位便是腱-骨止点,主要包括肌腱致密纤维结缔组织层、纤维软骨层、钙化软骨层和骨组织层,这四个依次

连续渐变的组织结构^[6]。肌腱组织层主要由 I 型、XII 型胶原纤维以及蛋白聚糖组成,含有纺锤状成纤维细胞^[7]。随着肌腱软组织向骨组织的过渡,细胞类型由成纤维细胞向骨细胞或成骨细胞转变,纤维蛋白的种类和走向也由整齐排列的 XII 胶原纤维向随机分布高度矿化的 I 型纤维变化^[8-9]。其纳米微观角度的关键机制在于:轴向载荷介导下,盘曲的三螺旋小分子结构逐渐发生轴向拉伸,最终导致纤维结构的解螺旋过程,从而引起胶原纤维分层排列的疏密转变^[10]。胶原纤维的变化是维持 RC 肌腱良好粘弹性和异质性的主要原因,循环加载诱导胶原纤维偏向力的方向,并在应变时产生非线性刚度,增加肌腱强度^[11-12]。当异常载荷变化作用于 RC,肌腱细胞通过分泌基质金属蛋白酶加速胶原纤维代响应刺激,促进炎性细胞因子的分泌和细胞凋亡基因表达,将造成腱细胞大量凋亡、肾上腺素能受体增加(但并不会发生明显的炎症反应)。在长期损伤的持续累积下组织机械性能会大幅度降低,显著的局部肌腱应变集中,将易于发生肌腱的表面部分性断裂,最终演变为 RC 的全层撕裂^[13-14]。

2 肩袖损伤动物模型的建立

动物模型是了解 RC 肌腱损伤的组织生物学及病理学基础、开发新技术以改善现有治疗方法的实用手段。从目前的研究报道来看,针对不同阶段的病理进程,现已建立出较多的 RC 肌腱损伤模型。

2.1 急性肩袖肌腱撕裂模型

目前,国内外主要是通过手术创伤的方式诱导急性 RC 肌腱损伤动物模型建立,通常以 SS 为施术部位,建立 SS 肌腱损伤模型(Carpenter 模型)。主要操作是通过肩胛冈远端前内侧或肩肱关节头侧作 1.0 cm 小切口,沿肩胛冈下缘钝性分离皮下组织和三角肌,向肩峰方向寻找并暴露 SS 肌腱,于肱骨大结节止点处钝性离断,然后以 6-0 可吸收缝线将其原位缝合。术前术后可通过注射青霉素、庆大霉素以及头孢曲松钠预防感染并于术后苏醒允许自由行走,1 ~ 2 周成模。进一步的研究证实,为了防止实验动物自发肌腱愈合或瘢痕形成,通常需要修整肱骨大结节附着点与冈上肌腱,剔除多余软组织,刮净离断处肱骨端残留纤维软骨层直至骨质。如若对 SS 肌腱 2 ~ 3 mm(< 50%止点处肌腱宽度)或 0.5 cm × 0.5 cm 的组织施以切除^[15-16],则将建立全层 RC 损伤模型。此外,也有通过离断 SSc 肌

腱建立 RC 损伤动物模型,但研究数量不多。然而,为了使肩关节获得较高的机械稳定性,对于在 RC 损伤修复缝合过程中应用单排还是双排固定技术目前仍存在争议。从长期效益来看,双排修复技术确实可以提高肌腱的愈合速度并降低复发率。而由于成本效益的考虑和目前质量不高的临床证据,不建议使用双排技术修复所有的 RC 损伤过程^[17]。

2.2 慢性肩袖肌腱损伤模型

慢性退行性劳损是目前临床上最为常见的 RC 损伤诱因,RC 肌腱与肩峰或盂肱关节下表面的频繁接触被认为是 RC 损伤的发病机制之一,因此实验研究中主要使用肩峰下撞击模型进行模拟^[18],通过剪取同侧肩胛骨的 1 ~ 2 块小骨块移植固定到肩峰的下表面,模拟 SSc 的肩峰撞击过程。然而有研究提出,肌腱的撞击过程与 RC 损伤之间并没有直接联系,可能并不是衰老相关退行性 RC 病变的本质^[19]。目前有研究通过微创的方式进行慢性 RC 损伤模型的制备,主要通过紧贴肩峰内侧刺入植入物,并于刺入后紧贴肩峰下表面行进,至三角肌后缘从肩峰外侧刺出^[20]。除此之外,也有研究采用 A 型肉毒素注射的方式进行模型制备^[21]。

3 肩袖损伤动物模型的选择

从目前的研究来看,肌腱韧带等软组织的损伤在外科临床中一直缺乏有效的治疗,乃至通过药物等其他替代疗法的干预中也显得异常困难和复杂。其中最大的障碍便是缺乏成熟且标准量化的活体 RC 损伤动物模型。虽然曾有研究对多种实验动物在肩袖损伤造模中的应用进行评估^[22-23]。但实际上除人类以外,大多数动物都是依靠四肢支撑,即使存在偶尔的双后肢支撑短暂站立行为,双前肢仍需要发挥较多的承重功能。因此,人类的肩部解剖结构是极具特异性的,与大多数动物的软组织结构并不相似。肩峰、喙肩弓以及通过其下方的韧带结构是 RC 损伤模型的必要构造。另外,RC 损伤模型建立的过程中,应满足以下条件^[24]:①RC 肌腱损伤后没有自发性肌腱愈合或瘢痕形成的现象;②滑膜内损伤炎症环境存在;③有可用于人类缝合修复技术的肌腱大小;④存在可控的术后康复能力;⑤慢性肌腱损伤后能出现相关肌肉不可逆转的萎缩、僵硬和脂肪浸润。我们通过阅读相关文献,针对 RC 损伤造模应用过程中不同动物种类的优缺点,归纳

总结如表 1,以便后期的研究人员基于具体的情况建立出更为合适的模型。

从表中我们不难看出,根据目前的实际情况,使用大鼠和兔来制备 RC 肌腱损伤模型可基本满足 RC 损伤模型的选择原则,是比较符合实际的建模动物。对于兔 RC 肌腱损伤模型来说,兔孟上结节下方行走的 SSc 肌腱是以类似于人类 SS 的附着方式附着于肱骨小结节,并在 RC 损伤过程中会出现明显的脂肪浸润。尽管目前大部分的实验都集中于以兔 SS 为造模对象,但已逐渐有使用 SSc 造模的趋势,因此我们更推荐将 SSc 作为造模的首选干预肌腱。大鼠模型手术操作成熟,成本低廉易获取,但关节较小,组织处理时应更加精细。同时需要注意的是,由于大鼠与人类 RC 组织高度相似的解剖学特征,大鼠模型对于 SS 肌腱损伤机制介导的 RC 肌腱损伤过程能够很好的进行描述。但在大鼠 SS 肌腱损伤模型中并未有明显的脂肪浸润,有研究^[37]提出大鼠 IS 在损伤后经历着与人类相似的脂肪堆积和肌肉萎缩等病理过程,该模型可能是贴合人类 SS 肌腱损伤的更好的动物模型。对于早期退行性 RC 损伤的动物模型选择,犬类动物似乎要比绵羊和山羊更具有优势。关节镜下的肩部损伤犬模型更有利于观察肩内神经肌肉组织病理和肌腱载荷能量的变化。

4 肩袖损伤动物模型的功能评估

在 RC 肌腱损伤模型建立的过程中,组织学和行为学分析是衡量造模成功与否必不可少的条件。疼痛是 RC 损伤后的典型症状,包括机械和触觉异常性疼痛。对于小型动物来说,可表现为步态异常、自发笼内运动和攀爬行为增多、梳理行为以及食物和水的消耗量变化。而对于那些大型动物,大多数的功能性测量比在大鼠等小型动物中更容易观察到。通常在我们的疼痛评估实验室中,纤毛测痛仪机械痛和热辐射痛实验中所反应出的数值主观性较低。另外某些测试中由刺激引起的行为变化也被广泛用作疼痛的量化指标。比如可通过楼梯实验用以评估前肢的精细运动控制^[38]。同时在使用这些测试时,有些实验主观性较强,通常凭借斜眼、四肢缩回或发声来识别那些处于疼痛状态的动物^[39]。因此需要尽可能引入某些客观参数,来补偿主观性较高情况下所缺乏的可靠性和可重复性,如食物和水的摄入量、体重和体温的变化、肌肉的

表 1 不同种类动物模型优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of different animal models

动物种类 Animal species	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
小鼠 Mouse	存在喙肩弓和纤维软骨过渡区的附着点^[25]; 具备测试特定信号通路及分子对肌腱变性和修复作用的潜在属性; 主要用于局部解剖-外科模型中,研究与 RC 肌腱撕裂相关的退行性变,也是研究肌腱-骨愈合的合适模型^[26] There are attachment points for the transition zone of the beak and shoulder arch and fibrocartilage^[25]. It can test the potential properties of specific signal pathways and molecules on tendon degeneration and repair. It is mainly used in the local anatomical-surgical model to study the degeneration related to RC tendon tear, and it is also a suitable model to study tendon-bone healing^[26].	体型较小,操作难度较大 The size is smaller and the operation is more difficult.
大鼠 Rat	存在喙肩弓,在肱骨近端较大结节处有明显的 SS 肌腱附着点,与人类解剖学相似性最高^[27]; RC 损伤后与人类一样显现出关节外展活动度变小的现象^[28]; 广泛应用于各种影响急性 RC 损伤及修复生物学效应的研究,尤其是促进肌腱-骨愈合的修复重建过程的机制研究 There are coracoacromial arch and obvious SS tendon attachment point in the larger tubercle of the proximal humerus, which has the highest similarity with human anatomy^[27]. After RC injury, the abduction activity of the joint decreased like that of human beings^[28]. It is widely used in various studies that affect the biological effects of acute RC injury and repair, especially the mechanism of the repair and reconstruction process of promoting tendon-bone healing.	自愈能力很强; 不适合评估修复技术的优劣^[29]; RC 损伤可伴有肱骨头和关节盂软骨退化^[30]; 肩部形态不算大,有一定操作难度,术后观察困难 The self-healing ability is very strong; It is not suitable to evaluate the advantages and disadvantages of repair technology^[29]. RC injury may be accompanied by degeneration of humeral head and articular glenoid cartilage^[30]. There is a certain degree of difficulty in surgical operation and postoperative observation because the shape of the shoulder is not large.
兔 New Zealand White Rabbit, Japanese Short-eared Rabbit	细胞组织学水平接近人类,体型中等; SS 肌腱的形态与人类较为相似^[31]; 但 SSc 肌腱的走行与人类 SS 肌腱更为类似,肌腱离断后存在与人类相似的脂肪浸润过程,术后愈合方式也大体一致^[32]; 多用于与 RC 撕裂相关的肌肉变化、肌腱-骨愈合的研究 The level of cytohistology is close to that of humans, and the somatotype is medium. The shape of the SS tendon is similar to that of human beings^[31]. But the distribution of SSc tendon is more similar to that of human SS tendon, the process of fat infiltration after tendon amputation is similar to that of humans, and the mode of postoperative healing is generally the same^[32]. It is mainly used in the study of muscle changes and tendon-bone healing related to RC tear.	自愈能力较强; 双前肢站立机会较多; 肩部解剖结构相对简单; 易遭受惊吓或腹泻,造成二次受伤和死亡^[33] Strong self-healing ability There are more opportunities to stand on both forelegs. The anatomical structure of the shoulder is relatively simple. It is vulnerable to shock or diarrhea, resulting in secondary injuries and death^[33].
犬 Beagle	RC 承受机械载荷与人类相当,具有相似的生物力学环境; 多用于探讨某些内在因素介导 RC 损伤修复效果以及术后康复方案 RC bears the same mechanical load as human beings and has a similar biomechanical environment. It is mainly used to explore the repair effect of RC injury mediated by some internal factors and postoperative rehabilitation plan.	解剖学结构与人类有较大差异,稳定性较差; 有自发的 RC 退行性病变的情况,不利于控制变量^[34]; 购买和饲养成本较高,难以展开大样本实验研究; The anatomical structure is quite different from that of human beings, and its stability is poor. There are spontaneous RC degenerative diseases, which is not conducive to the control of variables^[34]. The cost of purchase and feeding is high, so it is difficult to carry out large sample experimental research.
绵羊 Sheep	IS 肌腱包括形态大小和微脉管系统在内是与人类 SS 极为相似的; 多用于慢性 RC 损伤和各种降低术后不良状况缝合技术的研发^[35] IS tendons, including shape, size, and microvascular system, are very similar to human SS. It is mainly used for the research and development of various suture techniques for chronic RC injury and reducing postoperative adverse condition^[35].	饲养和管理成本不低; 偶蹄类动物术后会立即使用双前肢,有 RC 损伤手术修复失败的潜在风险 The cost of feeding and management is not low. Cloven-hoofed animals will use both forelimbs immediately after the operation, and there is a potential risk of failure in surgical repair of RC injury.
灵长类动物 Primate	肩部结构在解剖学、生物力学及免疫学方面与人类极为相似; 狒狒可能是研究 RC 损伤最佳的动物^[36] The structure of the shoulder is very similar to that of humans in anatomy, biomechanics, and immunology. Baboons may be the best animals to study RC damage^[36].	购买和围手术期饲养设施管理成本极高 The cost of purchasing and managing perioperative feeding facilities is extremely high.

围度和体积等。除此之外步态分析依旧是评定动物运动行为的有效方式,虽然啮齿类动物的四足步态和人类双足步态之间存在明显差异,但患病后二者均表现出相似的补偿性步态模式。有研究曾描述了一种新开发的步态分析方法,该方法可以轻松量化大量运动参数。通过使用墨水标记测量单个爪印的特征和爪印之间的距离,以提供时间和空间步态数据。健康的啮齿类动物以平衡对称的步态行走,步长的缩短表明外展能力可能受损。步幅宽度的减少表明,啮齿类动物通过重新分配,将体重转移到其他三条腿来保护受伤的肢体,从而对受伤的肢体进行补偿。这类似于在两足动物中观察到的跛行。爪印之间角度的改变是由过度的旋前或旋后引起的,这可能表明关节的活动障碍^[40-41]。

5 总结

目前没有任何一种动物模型能够完全模拟临床上的 RC 病变,大鼠和兔仍是最常用的两种造模动物。人类与大型动物(尤其是灵长类动物)由于在解剖学上的相似性,可以对手术技术和相关问题进行有力的评估,而小型动物更适合研究影响 RC 损伤和修复的多种生物学因素。单一的从撞击或缺血退变病因的角度探讨 RC 损伤机制可能较为局限。RC 撕裂的发生发展也可能导致肱骨头上半脱位,最终导致整个肩部的功能障碍。慢性 RC 撕裂与肌肉本身结构变化关系更为密切,例如肌肉体积的丧失和脂肪的堆积,同时也受 RC 肌腱微血管供应的影响。因此对于 RC 损伤动物模型的研究应注重整体与局部的联系,临床生物力学模型的开发为 RC 损伤提供了一定思路,具有较好的应用前景。进一步了解肩袖肌腱损伤的细胞和分子途径、肌腱生理病理学以及关节生物力学,有利于以后开发出更为成熟的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Kelkar R, Wang VM, Flatow EL, et al. Glenohumeral mechanics: a study of articular geometry, contact, and kinematics[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2001, 10(1):73-84.
- [2] Porcellini G, Caranzano F, Campi F, et al. Glenohumeral instability and rotator cuff tear[J]. Sports Med Arthrosc Rev, 2011, 19(4):395-400.
- [3] Parsons IM, Apreleva M, Fu FH, et al. The effect of rotator cuff tears on reaction forces at the glenohumeral joint[J]. J Orthop Res, 2002, 20(3):439-446.
- [4] Kim HM, Dahiya N, Teefey SA, et al. Location and initiation of degenerative rotator cuff tears: an analysis of three hundred and sixty shoulders[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(5):1088-1096.
- [5] Cummins CA, Murrell GA. Mode of failure for rotator cuff repair with suture anchors identified at revision surgery[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2003, 12(2):128-133.
- [6] Thomopoulos S, Williams GR, Gimbel JA, et al. Variation of biomechanical, structural, and compositional properties along the tendon to bone insertion site[J]. J Orthop Res, 2003, 21(3):413-419.
- [7] Shaw HM, Benjamin M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise[J]. Scand J Med Sci Sports, 2007, 17(4):303-315.
- [8] Yang PJ, Temenoff JS. Engineering orthopedic tissue interfaces[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2009, 15(2):127-141.
- [9] Smith L, Xia Y, Galatz LM, et al. Tissue-engineering strategies for the tendon/ligament-to-bone insertion[J]. Connect Tissue Res, 2012, 53(2):95-105.
- [10] Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A, et al. Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up[J]. Nano Lett, 2011, 11(2):757-766.
- [11] Lake SP, Miller KS, Elliott DM, et al. Effect of fiber distribution and realignment on the nonlinear and inhomogeneous mechanical properties of human supraspinatus tendon under longitudinal tensile loading[J]. J Orthop Res, 2009, 27(12):1596-1602.
- [12] Miller KS, Edelstein L, Connizzo BK, et al. Effect of preconditioning and stress relaxation on local collagen fiber re-alignment: inhomogeneous properties of rat supraspinatus tendon[J]. J Biomech Eng, 2012, 134(3):031007.
- [13] Maeda E, Fleischmann C, Mein CA, et al. Functional analysis of tenocytes gene expression in tendon fascicles subjected to cyclic tensile strain[J]. Connect Tissue Res, 2010, 51(6):434-444.
- [14] Arnoczky SP, Lavagnino M, Egerbacher M. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? [J]. Int J Exp Pathol, 2007, 88(4):217-226.
- [15] 李奉龙, 姜春岩, 鲁谊, 等. 免肩袖损伤模型的建立及初步组织学研究[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20):3685-3689.
- Li FL, Jiang CY, Lu Y, et al. Establishment of a rotator cuff tear model in rabbits and its preliminary histological study[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2012, 16(20):3685-3689.
- [16] 闫明童, 翟申浩, 褚国庆, 等. 肩袖肌腱损伤动物模型的建立及初步研究[J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(5):406-411.
- Yan MT, Zhai SH, Chu GQ, et al. Establishment and preliminary study of animal model of the rotator cuff tendon injury[J]. Chin J Sports Med, 2019, 38(5):406-411.
- [17] Schneeberger AG, Nyffeler RW, Gerber C. Structural changes of the rotator cuff caused by experimental subacromial impingement in the rat[J]. J Shoulder Elbow Surg, 1998, 7(4):375-380.
- [18] Baums MH, Kostuj T, Klinger HM, et al. Rekonstruktion der Rotatorenmanschette: Single-row oder Double-row. Klinische und biomechanische Ergebnisse [Rotator cuff repair: single- vs

- double-row. Clinical and biomechanical results [J]. Orthopade, 2016, 45(2):118-124.
- [19] McFarland EG, Maffulli N, Del Buono A, et al. Impingement is not impingement; the case for calling it "Rotator Cuff Disease" [J]. Muscles Ligaments Tendons J, 2013, 3(3):196-200.
- [20] 丁舒晨,田臻,马超然,等.微创建立大鼠慢性肩袖损伤模型[J].中国修复重建外科杂志,2014,28(10):1225-1230.
Ding SC, Tian Z, Ma C, et al. Establishment of minimally invasive model of chronic rotator cuff injury in rats[J]. Chin J Reparat Reconstr Surg, 2014,28(10):1225-1230.
- [21] 丁舒晨,方学伟,虞荣斌,等.大鼠肩袖功能评分量表的设计及初步验证[J].中国修复重建外科杂志,2016,30(1):54-59.
Ding SC, Fang XW, Yu RB, et al. Establishment and testing of rating scale of rat rotator cuff function [J]. Chin J Reparat Reconstr Surg, 2016,30(1):54-59.
- [22] Soslowsky LJ, Carpenter JE, DeBano CM, et al. Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease[J]. J Shoulder Elbow Surg, 1996,5(5):383-392.
- [23] Edelstein L, Thomas SJ, Soslowsky LJ. Rotator cuff tears: what have we learned from animal models? [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2011,11(2):150-162.
- [24] Derwin KA, Baker AR, Codsi MJ, et al. Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2007,16(5 Suppl):S140-S148.
- [25] Bell R, Taub P, Cagle P, et al. Development of a mouse model of supraspinatus tendon insertion site healing[J]. J Orthop Res, 2015,33(1):25-32.
- [26] Zhang J, Wang JH. The effects of mechanical loading on tendons—an in vivo and in vitro model study[J]. PLoS One, 2013,8(8):e71740.
- [27] Derwin KA, Baker AR, Codsi MJ, et al. Assessment of the canine model of rotator cuff injury and repair[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2007, 16(5 Suppl):S140-S148.
- [28] Perry SM, Getz CL, Soslowsky LJ. Alterations in function after rotator cuff tears in an animal model[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2009, 18(2):296-304.
- [29] Derwin KA, Baker AR, Iannotti JP, et al. Preclinical models for translating regenerative medicine therapies for rotator cuff repair [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2010,16(1):21-30.
- [30] Kramer EJ, Bodendorfer BM, Laron D, et al. Evaluation of cartilage degeneration in a rat model of rotator cuff tear arthropathy[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2013,22(12):1702-1709.
- [31] 赵杨,戴海峰,刘莎莎,等.自体骨膜促进兔肩袖腱骨愈合的疗效[J].中国比较医学杂志,2018,28(2):74-79.
Zhao Y, Dai HF, Liu SS, et al. Therapeutic effect of autologous periosteum on the healing of tendon-bone interface in rabbit rotator cuff tear[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2):74-79.
- [32] Gupta R, Lee TQ. Contributions of the different rabbit models to our understanding of rotator cuff pathology[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2007,16(5 Suppl):S149-S157.
- [33] Lui PP, Maffulli N, Rolf C, et al. What are the validated animal models for tendinopathy? [J]. Scand J Med Sci Sports, 2011,21(1):3-17.
- [34] Fransson BA, Gavin PR, Lahmers KK. Supraspinatus tendinosis associated with biceps brachii tendon displacement in a dog[J]. J Am Vet Med Assoc, 2005,227(9):1429-1416.
- [35] Gerber C, Meyer DC, Schneeberger AG, et al. Effect of tendon release and delayed repair on the structure of the muscles of the rotator cuff: an experimental study in sheep [J]. J Bone Joint Surg Am, 2004,86(9):1973-1982.
- [36] Sonnabend DH, Howlett CR, Young AA. Histological evaluation of repair of the rotator cuff in a primate model[J]. J Bone Joint Surg Br, 2010,92(4):586-594.
- [37] Liu X, Manzano G, Kim HT, et al. A rat model of massive rotator cuff tears[J]. J Orthop Res, 2011,29(4):588-595.
- [38] Sevivas N, Serra SC, Portugal R, et al. Animal model for chronic massive rotator cuff tear; behavioural and histologic analysis[J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2015,23(2):608-618.
- [39] Barrett JE. The pain of pain: challenges of animal behavior models[J]. Eur J Pharmacol, 2015,753:183-190.
- [40] Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, et al. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries [J]. J Neurotrauma, 2001,18(2):187-201.
- [41] Fu SC, Chan KM, Chan LS, et al. The use of motion analysis to measure pain-related behaviour in a rat model of degenerative tendon injuries [J]. J Neurosci Methods, 2009, 179(2):309-318.

[收稿日期] 2020-03-05

刘海峰,王斌,赵斌. 急性机械性脊髓损伤动物模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 551-556.

Liu HF, Wang B, Zhao B. Research progress in the establishment of animal models of acute spinal cord injury[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 551-556.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.017

急性机械性脊髓损伤动物模型研究进展

刘海峰^{1,2}, 王斌^{1,2*}, 赵斌^{1,2*}

(1. 山西医科大学第二医院骨科, 太原 030001; 2. 骨与软组织损伤修复山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI) 是一种致残率高、后果严重的中枢神经系统性损伤, 给个人、家庭以及社会带来了沉重的负担。目前仍没有治疗脊髓损伤的有效方法, 但包括: 干细胞、药物、组织工程的不同治疗手段已经在多种动物模型中进行了应用, 并取得一定的效果。动物模型的受伤机制、有效性以及完整性是否可以模拟临床所见, 类似的问题依然存在。本文通过阐述几种常见的急性机械性脊髓损伤动物模型的应用及其优缺点, 同时也包括常用动物种类和损伤节段的选择, 旨在为今后选择更为有效的动物模型提供参考。

【关键词】 急性脊髓损伤; 动物模型; 机械性损伤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0551-06

Research progress in the establishment of animal models of acute spinal cord injury

LIU Haifeng^{1,2}, WANG Bin^{1,2*}, ZHAO Bin^{1,2*}

(1. Department of Orthopaedic, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Shanxi Key Laboratory of Bone and Soft Tissue Injury Repair, Taiyuan 030001)

Corresponding author: WANG Bin. E-mail: wangbin_pku@163.com; ZHAO Bin. E-mail: zzb2005@163.com

【Abstract】 Acute spinal cord injury is a central nervous system injury with a high disability rate and serious consequences, which brings a heavy burden to individuals, families and society. No effective treatments exist for spinal cord injuries, but different therapies, including stem cells, drugs and tissue engineering have been used in various animal models with some success. Similar questions remain as to whether the mechanism of injury, effectiveness, and integrity of animal models can mimic what is seen clinically. This paper describes the application, advantages, and disadvantages of several common animal models of acute mechanical spinal cord injury, as well as the selection of common animal types and injury segments, to provide references for selecting more effective animal models.

【Keywords】 Acute spinal cord injury; animal model; mechanical injury

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

急性脊髓损伤是由于外伤、肿瘤、血肿及感染等原因所致的脊髓受压^[1], 可导致完全或不完全的感觉运动能力的丧失, 合并有较高的死亡率^[2]。目前我国脊髓损伤年患病率为 13 ~ 60 人次/100 万,

并且有逐年增高的趋势, 其原因多为高处坠落、交通事故等^[3]。利用动物模型可以更好地模拟临床中的急性机械性脊髓损伤, 如急性钝挫伤模型的建立主要是为了研究神经保护治疗后的创伤后损伤过

【基金项目】 国家自然科学基金(81802204), 山西省自然科学基金(201801D22117)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81802204), and Natural Science Foundation of Shanxi (201801D22117)。

【作者简介】 刘海峰(1996—), 硕士在读, 研究方向: 脊柱外科治疗及脊髓损伤修复基础研究。Email: lhf7037@163.com

【通信作者】 赵斌, 男(1970—), 主任医师, 医学博士, 硕士生导师。研究方向: 脊柱外科手术治疗。Email: zzb2005@163.com;

王斌, 男(1984—), 主治医师, 医学博士, 硕士生导师。研究方向: 骨关节炎相关研究。Email: wangbin_pku@163.com。

* 共同通信作者

程和修复过程^[4];脊髓横断/半横断动物模型可用来观察脊髓损伤后神经纤维及轴突的再生情况;钳夹及压迫伤模型可以反映损伤和压迫程度的关系以寻求手术减压时间窗。现笔者就急性机械性脊髓损伤模型的研究进展综述如下。

1 实验动物的选择

1.1 大鼠

大鼠具有易获取、种系内纯合度高、再生能力与抗感染能力强、管理饲养方便、行为学评估方法成熟、损伤后在电生理及病理学改变上与人类相似等优势^[5],成为建立急性脊髓损伤模型最常用的动物。但大鼠在解剖结构上与人类有所差异,其皮质脊髓束几乎都位于背侧,而人类的皮质脊髓束则位于后外侧白质部分。同时,皮质脊髓束的损伤会对人类的运动功能造成比较严重的影响^[6],而在大鼠模型中却不明显,反而其他的脊髓传导通路,如红核脊髓束以及 5-羟色胺通路的损伤会对大鼠的运动功能造成较大影响^[7]。在基因研究领域,虽然转基因大鼠在近年来取得了一定的发展,仍无法替代小鼠在该领域的应用^[8]。

1.2 小鼠

小鼠多在基因工程中使用^[9],其遗传背景较为明确,体内微生物可比较稳定地控制、性状遗传稳定,通常用来观察相关基因及其表达的蛋白质对于脊髓损伤的作用。但小鼠体形小,不易于手术操作,术后由于细胞增生形成纤维化瘢痕连接脊髓损伤的两侧断端^[10],与人或是大鼠中形成充满液体的囊腔样改变或者空洞样改变不同,有研究表明在脊髓完全横断的情况下小鼠的脊髓会有一定程度的再生^[11],而在人或者大鼠中则没有这样的表现。

综上所述,鼠类动物往往仅应用于脊髓损伤初步研究,尽管已有部分研究在鼠类模型中取得一定结果,但仍需进一步将其转化于大型动物模型中来确保安全性及有效性。

1.3 大、中型哺乳动物

包括兔、犬、猪、猫、山羊等动物,它们体型较大,容易操作。这类动物在解剖特征上与人类较为相似,可应用于测试新疗法的潜在疗效,以确保可用于临床。其中兔常用作脊髓缺血损伤模型的建立,其血管结构比较简单,从腹主动脉尾侧到肾动脉起源之间很少有分支血管,仅阻断腹主动脉便可以有效地造成脊髓的缺血损伤^[12],该模型不足之处

在于大多数抗体来源为兔来源,限制了对于该模型的检测^[13]。犬类除了在解剖结构与人类相似之外,一定程度也会同人类一样会受到自发性疾病的影响,例如肌营养不良、肿瘤、脊髓损伤等^[14]。值得注意的是,犬类动物胸段椎间盘的突出可能是导致其脊髓自发性损伤的主要原因^[15],因此犬类常作为研究椎间盘压迫导致脊髓损伤的动物模型^[16]。猫的中枢神经系统较为发达,常被用来研究脊髓运动神经元细胞之间的相互联系^[17],且猫的脊髓平均长度(34 cm)与人的脊髓长度(平均 40 ~ 45 cm)较为接近,使其在评估脊髓再生潜能方面具有一定优势^[18]。猪也可用于脊髓损伤模型的制作,其 miRNA 表达谱与小鼠相比更接近于人类,其中已知的有 45% 的序列与人类同源,而在小鼠中只有 16%,使得猪成为研究脊髓损伤后转录水平变化的理想模型^[19]。山羊的脊椎、脊髓结构与人类相似,其中枢神经系统的研究在电生理学领域已经取得进展,且山羊容易进行行为学功能的训练以及损伤功能恢复的观察^[20]。但出于较高的饲养费用、严格的监管要求以及伦理方面的考虑,并没有广泛地应用于急性脊髓损伤的造模中。

1.4 非人灵长类动物

非人灵长类动物的脊髓组织与人类最接近^[21]。Friedli 等^[22]人发现灵长类动物的下行皮质脊髓束包括来自双侧的轴突,在脊髓半切损伤模型中未损伤侧的轴突可以代偿性地长入对侧损伤平面以下的部分从而促进双侧脊髓功能的恢复,而大鼠脊髓损伤模型中却没有这样的表现,这个发现强调了灵长类动物在物种间研究及治疗脊髓损伤的研究起到了重要的作用。同样由于饲养费用较高、伦理要求严格等,也没有广泛地应用于急性脊髓损伤的造模中。

1.5 其他种类动物(爪蟾等)

爪蟾用于脊髓损伤模型的建立有以下优势:(1)爪蟾的受精卵体积大约是大鼠的 2300 倍,只需将体外构建的基因改造工具微注射到卵子或受精卵胚胎中便能够方便地在脊髓发育成熟前进行基因工程的改造;(2)由于受精卵是透明的,在胚胎发育阶段可以直接看到脊髓发生的变化;(3)其脊髓结构比较简单,容易进行组织及细胞间的分析;(4)其脊髓再生潜能十分巨大,容易寻找促进再生的因素^[23]。且爪蟾拥有独特的再生能力常被用来研究新型的治疗策略,但由于其属于非哺乳类动物,研

究所取得的结果有待进一步的证实。

2 损伤节段的选择

临床中脊髓损伤中最为常见的节段是颈段,然而动物模型常选择胸腰段进行造模。原因可能包括以下几点:(1)脊髓的灰质损伤会导致较难辨认的功能丧失,而白质不同于灰质,选择胸段进行造模可以较好地选择损伤白质,对于功能的恢复比较容易观察;(2)造模时损伤节段越高,伤后越易出现呼吸、心血管等系统并发症,死亡率越高。颈段的脊髓损伤容易导致呼吸功能的受损,这可能是在颈段进行造模时容易切断膈运动神经元导致膈肌受损进而造成呼吸功能受限有关^[24];(3)胸腰段脊髓处椎板咬除较方便,能够降低操作难度和避开骶髓排便中枢^[24];(4)在颈段只能进行单侧半切损伤模型或者脊髓挫伤的建立,因为颈髓完全横断损伤会造成严重的四肢瘫痪以及较高的死亡率,这样的做法在伦理方面是不允许的。

3 急性机械性脊髓损伤模型的用途

3.1 急性挫伤模型

在临床中大多数的脊髓损伤是由外伤导致脊髓受压或挫伤造成的,因此为了研究脊髓损伤后的病理生理变化,首选挫伤和/或压迫模型。Allen 首次采用垂直打击显露硬脊膜致急性脊髓挫伤的方法,此法简单易行,制作成本低,易于复制,但是打击的精准度难以保持一致,后人不断对其进行改进^[25]。目前常用的包括以下几种打击器:纽约大学打击器(New York University (NYU) impactor)^[26]、水平打击器(infinite horizon (IH) impactor)^[27]、俄亥俄州立大学打击器(Ohio State University (OSU) impactor)^[28]、空气打击器(air gun impactor)^[29]。除此之外,还有许多研究者不断研发新型打击器和改进部分配件,如:打击头、椎体固定装置等,其目的都是为了尽可能模拟临床中常见脊髓损伤以及减少不必要的副损伤。

Squair 等^[30]建立胸 3 节段严重脊髓挫伤模型来研究米诺环素对于交感兴奋性神经的保护作用、减轻自主神经功能障碍以及其对于脊髓损伤后血流动力学的调控。Hara 等^[31]发现星形胶质细胞的表型转变在小鼠脊髓挫伤模型中对于胶质瘢痕的形成具有重要的调控作用,并通过蛋白组学等方法寻找在这个过程的主要调控分子对其进行干扰以

观察小鼠的运动功能恢复指标以及胶质瘢痕的形成情况。大多数研究对于脊髓损伤过程血管组织的观察都是采用组织切片或者免疫荧光染色等,都是基于一种二维的观察模式,Hu 等^[32]在大鼠挫伤模型中使用 Micro-CT 追踪在川芎嗪治疗脊髓损伤后微血管的 3D 形态变化,并探讨其对于血管再生的影响。Brakel 等^[33]注意到在部分大鼠完成脊髓损伤的造模后会出现类似于抑郁症的一些行为学表现,主要为饮食习惯的改变、运动功能的进一步降低以及穴居行为的减少等,也发现在出现上述行为改变的同时动物模型的心功能也发生了改变,因此他们通过建立脊髓挫伤模型来观察抑郁症行为与心功能之间的联系从而探寻有关脊髓损伤后抑郁症出现的发病机制。

3.2 急性压迫模型

急性压迫模型主要是模拟临床中患者椎管狭窄闭塞或者外伤导致脊髓受压损伤的情况,用来研究压迫造成的影响以及寻求一种减压的时机。压迫模型最为常见的是微血管夹/动脉瘤夹直接钳夹硬脊膜表面对其造成损伤。Führmann 等^[34]使用一种改进的动脉瘤夹以 21 g 的力度钳夹脊髓表面 1 分钟造成脊髓损伤来研究硫酸软骨素酶 ABC 联合神经上皮细胞治疗对损伤后组织再生效果。Soubeyrand 等^[35]使用 35 g 的力度的动脉瘤钳夹脊髓表面 1 分钟以构建大鼠脊髓损伤模型,通过超高分辨超声(very high resolution ultrasound, VHRS)来探测脊髓血管出血的情况,并通过组织学的方法进行验证,证实了 VHRS 可以实时定量地判断脊髓损伤急性期和亚急性期的出血情况,既往认为脊髓遭受损伤后会伴随血管破裂导致髓内出血^[2],而血管的破裂往往在早期不易检查。使用钳夹方式造成损伤使其在重复性、一致性上得到保证,但该方法仍需咬除椎板,对于脊柱后方结构完整性有较大影响,该方式也同人体中常见脊髓损伤有一定的区别。

另外一种压迫造模方式是使用球囊导管对脊髓造成压迫,该造模方式只需在椎板上钻孔即可以将球囊导管送至损伤位点,对于脊柱后部结构有较好的保护。1953 年,Tarlov 等^[36]首次描述了球囊压迫模型,通过球囊的不同体积以及不同的停留时间可以较好地调控损伤程度。Gong 等^[37]使用导管对脊髓造成压迫损伤后,通过留置的导管可以直接注射药物。Zheng 等^[38]使用球囊导管的膨胀程度(根据球囊占椎管前后径的比值)来对山羊造成

压迫损伤,并使用 X 线和 CT 观察球囊的位置,计算球囊充气的大小和椎管内脊髓受压的程度。但由于球囊导管无法固定,损伤位点的一致性无法得到保证。

3.3 急性横断模型

急性横断模型是指使用显微器械进行完全/不完全脊髓横断。与脊髓挫伤、压迫模型不同,脊髓横断损伤模型能够尽可能排除损伤区域残留的神经纤维对实验结果造成的影响,可以有效地观察外源性因素对于脊髓损伤修复的调控作用。横断模型目前主要应用于组织工程材料治疗脊髓损伤中,适合于研究再生、退化、组织工程策略或神经可塑性。Yao 等^[39]采用脊髓节段背侧半切的造模方式来验证水凝胶支架对于大鼠脊髓损伤后轴突再生以及运动功能恢复的影响。Lukovic 等^[40]比较详尽地叙述了脊髓横断模型的建立的过程,认为该模型在观察细胞移植对于脊髓再生潜能的影响方面具有独特的优势。Kumar 等^[41]发现在脊髓完全损伤的情况下会增加褥疮出现的机率、降低皮肤愈合能力,且这种情况大多发生在损伤平面以下,这可能与伤口闭合和修复所需的各种细胞过程活性降低有关。戴建武团队首次建立了比格犬脊髓完全横断模型,并对这种模型进行评价,认为其评估神经再生的情况是十分可靠的,同时也提出了脊髓完全横断模型由于其本身损伤较为严重可导致一些并发症的出现,如压迫性溃疡、深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT)、骨质疏松、肌肉痉挛、尿路感染和呼吸系统并发症等,建立了一套详细的术后护理方案^[42]。但是这种损伤的情况在临床中十分罕见,并不能真正地反映脊髓损伤后的病理改变。因此该模型更多应用在验证生物材料、细胞治疗对脊髓再生修复的作用。

3.4 急性牵拉/脱位损伤模型

急性椎体脱位造成脊髓损伤是临床中常见的损伤机制之一,大约占脊髓损伤患者的 32% ~ 58%^[43]。脱位模型是基于椎体移位对脊髓造成损伤,而牵拉模型则是通过椎体的轴向运动对脊髓施加轴向作用力造成拉伸损伤。Wu 等^[44]设计了一种椎体牵拉造成脊髓损伤的家兔模型,按照家兔的脊髓长度比例来造成损伤可以有效地模拟临床损伤的机制,并且这种方法可以很好地避免损伤脊髓血供减少其带来的其他损伤。目前已经大量的动物模型证实尽早进行减压手术可以缓解由脊髓受压

引起的神经症状^[45],但是当这一结果应用于临床中却存在较大差异,早期手术有时并没有取得明显的疗效^[46],考虑其原因可能是因为在临床前动物模型中使用的生物力学变量与临床损伤中发生的生物力学条件之间存在差异,Speidel 等^[47]建立一种新型的大鼠椎体脱位模型来探讨压迫时间和损伤时的速度与脊髓损伤预后之间的关系,从而寻找一种最佳的手术减压时机。Bhatnagar 等^[48]则是通过比较脊髓挫伤模型和椎体脱位造成脊髓损伤的方法首次尝试量化不同损伤过程脊髓的形态变化,希望通过这样的方法来解释当机械因素发生改变时是如何改变下游生物信号。

4 动物模型的局限性

急性脊髓损伤模型研究发展迅速,但鉴于人类脊髓损伤的复杂性,实验动物模型与临床中人的脊髓损伤有很大差异。目前尚没有一种模型可以完全模拟人类急性脊髓损伤,每种脊髓损伤模型都有其局限性。临床中常见损伤为闭合性损伤,而在动物模型的制备中常有剥离椎旁肌肉、椎板及韧带咬除等情况,这样不仅会造成局部的损伤,也会导致脊柱稳定性的丢失,同时这些结构的移除也可能对脊髓损伤后的病理生理改变造成一定影响;另一方面,在临床中对病人进行感觉功能恢复的评估,但在动物模型中无法进行准确评估。

综上,大鼠是目前造模最常见的动物,然而为了更好地进行临床前研究向临床的转化,选择与人类更为相似的动物模型已成为必然趋势,同时也应当根据自己的研究目的来选择最合适的动物模型。为了能够更深层次地研究当前脊髓损伤领域的研究热点以及不断出现的新观点、新机制,对于动物模型的探索研究仍需继续发展和改进,使其更加标准化、量化、智能化,为推进脊髓损伤治疗研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

- [1] 杨俊松,郝定均,刘团江,等. 急性脊髓损伤的临床治疗进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2018, 28(4): 368-373.
Yang JS, Hao DJ, Liu TJ, et al. Clinical treatment of acute spinal cord injury [J]. Chin J of spinal cord, 2018, 28(4): 368-373.
- [2] 唐玺和,范益民,蓝胜勇. 细胞与生物材料联合治疗脊髓损伤的研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 127-130.
Tang XH, Fan YM, Lan SY. A review on the treatment of spinal cord injury based on combining cell transplantation and

- biomaterial therapy [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(6): 127–130.
- [3] 陈星月, 陈栋, 陈春慧, 等. 中国创伤性脊髓损伤流行病学和疾病经济负担的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2018, 18(2): 143–150.
- Chen XY, Chen D, Chen CH, et al. The epidemiology and disease burden of traumatic spinal cord injury in China: a systematic review[J]. *Chin J Evid-Based Med*, 2018, 18(2): 143–150.
- [4] 唐涛, 马小翠, 姚冰, 等. 大鼠脊髓挫伤模型对比及行为学评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 84–88.
- Tang T, Ma XC, Yao B, et al. Comparison and behavioral evaluation of rat models of spinal cord contusion [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(2): 84–88.
- [5] Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review [J]. *Spinal Cord*, 2017, 55(8): 714–721.
- [6] Nathan PW. Effects on movement of surgical incisions into the human spinal cord[J]. *Brain*, 1994, 117 (Pt 2): 337–346.
- [7] Filli L, Engmann AK, Zorner B, et al. Bridging the gap: a reticulo-proprio-spinal detour bypassing an incomplete spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(40): 13399–13410.
- [8] Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies[J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(10): 1125–1137.
- [9] 付明阳, 王春芳, 李宵, 等. Mir-31 转基因小鼠的构建及其在组织器官的表达[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(1): 1–7.
- Fu MY, Wang CF, Li X, et al. Establishment of a mir-31 transgenic mouse and its expression in tissues and organs [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(1): 1–7.
- [10] Goritz C, Dias DO, Tomilin N, et al. A pericyte origin of spinal cord scar tissue[J]. *Science*, 2011, 333(6039): 238–242.
- [11] Inman DM, Steward O. Ascending sensory, but not other long-tract axons, regenerate into the connective tissue matrix that forms at the site of a spinal cord injury in mice[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 462(4): 431–449.
- [12] Mazensky D, Flesarova S, Sulla I. Arterial blood supply to the spinal cord in animal models of spinal cord injury. A review[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2017, 300(12): 2091–2106.
- [13] Simon FH, Erhart P, Vcelar B, et al. Erythropoietin preconditioning improves clinical and histologic outcome in an acute spinal cord ischemia and reperfusion rabbit model[J]. *J Vasc Surg*, 2016, 64(6): 1797–1804.
- [14] Spitzbarth I, Bock P, Haist V, et al. Prominent microglial activation in the early proinflammatory immune response in naturally occurring canine spinal cord injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(8): 703–714.
- [15] Wang-Leandro A, Hobert MK, Kramer S, et al. The role of diffusion tensor imaging as an objective tool for the assessment of motor function recovery after paraplegia in a naturally-occurring large animal model of spinal cord injury [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 258.
- [16] 王雪乔, 饶宇腾, 吴伟澎, 等. 犬椎间盘脱出模型的建立及其脊髓微循环与组织学变化观察[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(6): 22–26.
- Wang XQ, Rao YT, Wu WP et al. Establishment of a dog model of intervertebral disc extrusion and observation of the histological and microcirculatory changes in the spinal cord [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(6): 22–26.
- [17] Johnson MD, Kajatz E, Cain CM, et al. Motoneuron intrinsic properties, but not their receptive fields, recover in chronic spinal injury[J]. *J Neurosci*, 2013, 33(48): 18806–18813.
- [18] Cote MP, Hanna A, Lemay MA, et al. Peripheral nerve grafts after cervical spinal cord injury in adult cats[J]. *Exp Neurol*, 2010, 225(1): 173–182.
- [19] Tigchelaar S, Streijger F, Sinha S, et al. Serum MicroRNAs reflect injury severity in a large animal model of thoracic spinal cord injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1376.
- [20] Wilson S, Abode-Iyamah KO, Miller JW, et al. An ovine model of spinal cord injury[J]. *J Spinal Cord Med*, 2017, 40(3): 346–360.
- [21] 田肇隆, 王小华, 许亚超, 等. 恒河猴脊髓半断模型行脑和脊髓 fMRI 检查麻醉方案的实验研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(3): 39–41.
- Tian ZL, Wang XH, Xu YC, et al. Experimental study of continuous intravenous anesthesia for fMRI of Rhesus monkey [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(3): 39–41.
- [22] Friedli L, Rosenzweig ES, Barraud Q, et al. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates[J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(302): 302ra134.
- [23] Borodinsky LN. *Xenopus laevis* as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration [J]. *Front Neural Circuits*, 2017, 11: 90.
- [24] Lane MA, Fuller DD, White TE, et al. Respiratory neuroplasticity and cervical spinal cord injury: translational perspectives[J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(10): 538–547.
- [25] Vijayaprakash KM, Sridharan N. An experimental spinal cord injury rat model using customized impact device: A cost-effective approach.[J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013, 4(3): 211–213.
- [26] Gruner JA. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat[J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(2): 123–126, 126–128.
- [27] Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device[J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(2): 179–193.
- [28] Stokes BT. Experimental spinal cord injury: a dynamic and verifiable injury device[J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(2): 129–131, 131–134.
- [29] Marcol W, Slusarczyk W, Gzik M, et al. Air gun impactor--a novel model of graded white matter spinal cord injury in rodents [J]. *J Reconstr Microsurg*, 2012, 28(8): 561–568.
- [30] Squair JW, Ruiz I, Phillips AA, et al. Minocycline reduces the

- severity of autonomic dysreflexia after experimental spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(24): 2861–2871.
- [31] Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury[J]. *Nat Med*, 2017, 23(7): 818–828.
- [32] Hu J, Cao Y, Wu T, et al. Micro-CT as a tool to investigate the efficacy of tetramethylpyrazine in a rat spinal cord injury model[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2016, 41(16): 1272–1278.
- [33] Brakel K, Aceves AR, Aceves M, et al. Depression-like behavior corresponds with cardiac changes in a rodent model of spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2019, 320: 112969.
- [34] Führmann T, Anandakumaran PN, Payne SL, et al. Combined delivery of chondroitinase ABC and human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial cells promote tissue repair in an animal model of spinal cord injury[J]. *Biomed Mater*, 2018, 13(2): 024103.
- [35] Soubeyrand M, Badner A, Vawda R, et al. Very high resolution ultrasound imaging for real-time quantitative visualization of vascular disruption after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(21): 1767–1775.
- [36] Tarlov IM, Keener EB. Subarachnoid hemorrhage and tumor implants from spinal sarcoma in an infant[J]. *Neurology*, 1953, 3(5): 384–390.
- [37] Gong Y, Wang S, Liang Z, et al. Label-free spectral imaging unveils biochemical mechanisms of low-level laser therapy on spinal cord injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(3): 1127–1142.
- [38] Zheng YH, Fang Z, Cao P, et al. [A model of acute compression spinal cord injury by a mini-invasive expandable balloon in goats][J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012, 92(23): 1591–1595.
- [39] Yao S, Yu S, Cao Z, et al. Hierarchically aligned fibrin nanofiber hydrogel accelerated axonal regrowth and locomotor function recovery in rat spinal cord injury [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 2883–2895.
- [40] Lukovic D, Moreno-Manzano V, Lopez-Mocholi E, et al. Complete rat spinal cord transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9640.
- [41] Kumar S, Yarmush ML, Dash BC, et al. Impact of complete spinal cord injury on healing of skin ulcers in mouse models[J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(6): 815–824.
- [42] Han S, Li X, Xiao Z, et al. Complete canine spinal cord transection model: a large animal model for the translational research of spinal cord regeneration[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(1): 115–117.
- [43] Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 26(24 Suppl): S2–S12.
- [44] Wu J, Xue J, Huang R, et al. A rabbit model of lumbar distraction spinal cord injury[J]. *Spine J*, 2016, 16(5): 643–658.
- [45] Batchelor PE, Wills TE, Skeers P, et al. Meta-analysis of pre-clinical studies of early decompression in acute spinal cord injury: a battle of time and pressure[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72659.
- [46] Wilson JR, Voth J, Singh A, et al. Defining the pathway to definitive care and surgical decompression after traumatic spinal cord injury: Results of a Canadian population-based cohort study[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33(10): 963–971.
- [47] Speidel J, Mattucci S, Liu J, et al. Effect of velocity and duration of residual compression in a rat dislocation spinal cord injury model[J]. *J Neurotrauma*, 2020; 37(9):1140–1148.
- [48] Bhatnagar T, Liu J, Yung A, et al. In vivo measurement of cervical spinal cord deformation during traumatic spinal cord injury in a rodent model[J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(4): 1285–1298.

[收稿日期] 2020-02-09

张娜,田燕歌,刘学芳,等. 小鼠移植性肺癌转移模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 557-562.

Zhang N, Tian YG, Liu XF, et al. Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 557-562.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.018

小鼠移植性肺癌转移模型研究进展

张娜¹, 田燕歌², 刘学芳^{2*}, 王琦¹

(1. 河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046)

【摘要】 小鼠移植性肺癌转移模型是进行肺癌研究的重要工具,对阐释肺癌的转移机制以及肺癌相关药物的研发都具有重要意义。本文综合考虑肺癌转移易发生的部位及肿瘤的种属差异,对该模型进行进一步分类,同时详细地论述了每种类型的建模方法、评价指标,为肺癌相关研究提供模型参考。

【关键词】 小鼠; 肺癌; 移植; 转移模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0557-06

Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse

ZHANG Na¹, TIAN Yange², LIU Xuefang^{2*}, WANG Qi¹

(1. College of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

Corresponding author: LIU Xuefang. E-mail: 616621312@qq.com

【Abstract】 The metastatic model of transplanted lung cancer in mouse is an important tool in lung cancer research, and has great significance in interpreting the metastasis mechanism of lung cancer and in studying drugs related to lung cancer. In this paper, the frequent sites of lung cancer metastasis and the species differences of tumors were comprehensively considered, and this model was further classified, while the modeling method and evaluation index of each type were expounded in detail to provide model references for lung cancer-related research.

【Keywords】 mouse; lung cancer; transplant; metastatic model

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

肺癌是目前世界上导致肿瘤相关死亡的首要原因,据2019年09月国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)发布的《2018年全球癌症统计报告》评估数据显示,2018年全球癌症发病人数上升至1810万例,死亡人数960万例,其中肺癌是最常见的癌症类型(占病例总数的11.6%)和癌症死亡的主要原因(占癌症死亡总数的18.4%)^[1]。肺癌的治疗迫切需要开发新的药物制定新的治疗方案,

在活体内动物模型上阐明药物的作用机制无疑是最佳途径,那么有没有适合的肺癌动物模型就成为制约肺癌相关药物临床疗效、转化研究的重要因素。此外,肺癌高病死率的原因之一是容易发生远处转移,临床常见发生肺转移、脑转移、骨转移、淋巴结转移等^[2-3]。本文就目前国内外报道的小鼠肺癌转移模型的构建方法及在科研领域中的应用进行综述,以期能为肺癌相关研究提供模型参考。

【基金项目】 河南省重点研发与推广专项(192102310427),河南省高等学校重点科研项目(20A360007)。

Funded by Henan Province Key Research and Generalized Special Project (192102310427), Key Scientific Research Project of College and University in Henan Province (20A360007).

【作者简介】 张娜(1982—),女,博士,副教授,研究方向:肿瘤动物模型。Email: zhangnahnzy@163.com

【通信作者】 刘学芳(1979—),男,硕士,实验师,研究方向:实验动物模型。Email:616621312@qq.com

1 小鼠肺癌模型的分类

根据制备方法的不同,肺癌动物模型分为许多类型,按照接种部位不同分为:皮下注射、原位注射、心内注射、颈内动脉注射和尾静脉注射等;按照肿瘤细胞来源不同分为:自发性、诱发性、移植性和动物基因修饰模型等;其中移植性模型是指将肿瘤组织或细胞移植到实验动物体内所形成的肿瘤动物模型,根据肿瘤细胞或癌组织块的来源不同分为:同种移植模型与异种移植模型。同种移植是指肿瘤细胞类型与宿主动物种属一致,而异种移植是指肿瘤细胞类型与宿主动物种属不一致^[4]。此外,按照肺癌转移部位不同分为:肺转移、骨转移、脑转移、淋巴转移模型等,参考国内外文献报道发现不同肺癌类型易发生转移的部位也不同,其中小细胞癌主要形成淋巴结转移,鳞状细胞癌主要转移至肝脏和肾脏,腺癌形成肺转移灶^[5]。本文综合肺癌易转移部位及肿瘤来源的差异,将小鼠移植性肺癌模型进一步分类,如下文阐述。

2 小鼠移植性肺癌转移模型的分类

2.1 肺转移型

理论而言肺癌的原发部位为肺,原位种植模型也被认为是最合适的肺癌治疗模型,但原位种植容易发生并发症,并且其在体内的成瘤率和转移形成率不稳定。皮下注射仍广泛应用于大多数模型的建立,尾静脉也常被用于肺转移动物模型的构建。

2.1.1 同种移植性肺转移模型

小鼠 Lewis 肺癌模型是目前应用最为广泛的同种来源的肺癌模型,Lewis 肺癌细胞株(LLC)最早是从小鼠 Lewis 肺癌中分离到的适应培养细胞克隆系,LLC 细胞在 C57BL/6 小鼠体内保持高度致瘤性和肺转移性^[6],LLC 细胞采用基因工程技术修饰后可表达荧光素酶或绿色荧光蛋白,达到肿瘤细胞在活体内可视化效果。Zhu 等^[7]将表达荧光素酶的 Lewis 肺癌(LL/2-Luc-M38)细胞(1×10^6 个/只)接种于 7 ~ 8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠皮下,注射 3 d 和 17 d 时腹腔注射 D-荧光素酶(0.6 mg/30 g 体重),对动物进行全身成像,结果显示在注射部位可检查到生物荧光信号,17 d 时收集小鼠肺,进行器官生物发光的体外测量,也可检测到明显的生物荧光信号,对肺组织匀浆进行生物荧光测量,绘制标准曲线,可获得小鼠肺中癌细胞负荷的定量信

息,该方案使用活体成像技术与体外成像相结合的方法观察 Lewis 癌细胞在小鼠体内的生长和转移。马雪曼等^[8]研究显示接种部位的不同,Lewis 肺癌肺转移率不同,将能够稳定表达荧光素酶的小鼠 LL/2-Luc-M38 细胞(1×10^6 个/只)分别采用右腋下、右腹股沟下、右脚垫接种三种方法接种到 6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠皮下,接种 21 d 时小动物活体成像检测显示,肺转移率右腋下接种组为 50%,右腹股沟接种组为 70%,右脚垫接种组为 0%。以上研究显示 Lewis 细胞皮下接种 C57BL/6 小鼠 17 ~ 21 d 后可确定产生肺转移灶,注射部位首选腹股沟与腋下。

2.1.2 异种移植性肺转移模型

将人类肺癌细胞系移植到免疫缺陷动物皮下是进行恶性肿瘤实验研究的首选方法。姚明等^[9]将人肺癌细胞 SPC-A-1(2×10^6 个/只)右背侧近腋部皮下接种于 6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 NOD/SCID 小鼠体内,随后切除首代小鼠移植瘤,收集肺转移灶肿瘤细胞,从第二代起采用肺转移灶-皮下移植-肺转移灶-皮下移植的体内循环筛选方法传代,第 4 代 NOD/SCID 小鼠在接种后 12 周肺转移率 100%,该方案成功建立人肺癌皮下移植瘤高转移模型,为肺癌防治研究及抗转移实验治疗提供了理想的动物模型。Cui 等^[10]收集一名 45 岁中国男性肺癌转移患者的腹水,分离获得肺癌细胞系(命名为 XL-2),取 6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c-nu/nu 裸鼠,将 XL-2 细胞(2×10^6 个/只)注射到小鼠右上侧背部皮下,4 周后切除原发肿瘤,当小鼠濒临死亡时,收集肺转移病灶并将其植入新的受体小鼠的右上侧背部皮下,如此反复传代,在第 5 轮的选择中,从肺转移灶中分离细胞并体外增殖(命名为 XL-2 sci),各代分离的肺癌细胞肺转移率检测显示,第一代为 30%,第三代为 60%,第五代为 90%,该转移模型保留了原发肿瘤的临床特征,为肺癌的深入研究提供了可靠的模型。

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)是指从原发灶或转移灶脱落,在血液和淋巴管中循环的细胞,阙祖俊等^[11]将人源肺癌循环肿瘤细胞 CTC-TJH-01(1×10^6 个/只)采用尾静脉注射的方法,注射到 C57BL/6 小鼠、Nude 小鼠和 NOD/SCID 小鼠体内,3 种小鼠均为雄性,SPF 级,4 ~ 6 周龄。注射后第 8 周 NOD/SCID 小鼠首次观察到肺部成瘤,第 10 周 NOD/SCID 小鼠肺部成瘤率为 100%,而

在 Nude 小鼠和 C57BL/6 小鼠体内均不成瘤。

2.2 脑转移型

肺癌最常见的远处转移部位之一是脑,脑转移的发生率为 23% ~ 65%。脑转移患者放、化疗效果不佳,预后差,生存期短,是患者死亡的重要原因^[12],因此构建合适的肺癌脑转移动物模型具有重要的研究价值。颈内动脉注射与心内注射两种方法常用于肺癌脑转移动物模型的构建。

2.2.1 同种移植性脑转移模型

徐磊等^[13]将稳定转染绿色荧光蛋白(GFP)的 Lewis 肺癌细胞,通过颈内动脉注射的方法建立 C57BL/6 小鼠肺癌脑转移动物模型,注射剂量 10^5 个 Lewis 细胞/只,3 周后脑组织标本在荧光显微镜下可观察到绿色荧光蛋白的富集区,证实已经形成 Lewis 肺癌细胞的脑转移灶,病理显示病灶周围有反应性星形胶质细胞增生,颈内动脉注射法直接模拟癌细胞在脑部终末毛细血管床内聚集、粘附、侵袭穿透血脑屏障形成转移灶的真实过程,手术成功的小鼠 100% 发生脑部转移癌。颈内动脉注射方法的优点在于模型的重复性较好,缺点是显微外科手术操作步骤复杂并且对操作者手术技巧要求较高。

2.2.2 异种移植性脑转移模型

Uzunalli 等^[14]使用慢病毒感染 A549 细胞使其稳定表达荧光素酶,采用超声引心内注射的方法,将 A549 细胞(1×10^6 个/只)接种至 6 周龄的裸鼠体内,组织学检查显示注射 2 周后,裸鼠脑部出现肺癌微转移灶,直径为 $64.6 \sim 95.3 \mu\text{m}$,3 ~ 4 周时转移灶直径增至 $50.9 \sim 216.9 \mu\text{m}$,5 ~ 6 周时转移灶直径可达 $20.6 \sim 1070.6 \mu\text{m}$,心内注射的方法可成功构建肺癌脑转移模型。陈愉生等^[15]将处于对数期生长的人肺腺癌 PC-9 细胞(1×10^6 个/只),经左心室注射接种于 BALB/c nude 裸鼠体内,第 4 周处死,除 2 只裸鼠胸壁见 2 ~ 3 个散在瘤结分布,其余胸腔视野正常,肺组织轮廓清楚,未见瘤结生成,组织学检测显示心内注射法肺癌脑转移率为 100%。心内注射这种方法优点在于操作简单,而且确实会产生中枢神经系统的转移。缺点是肿瘤常常转移到中枢神经系统以外的器官,并可能导致动物死亡,该方法的模型变异性较高^[16]。

2.3 骨转移型

骨是各种原发性肿瘤最常见的转移部位之一,随着治疗手段的提高,患者生存期延长,骨转移的概率也随之升高,近期报道显示小细胞肺癌患者中

骨转移发生率为 38.18%,多发骨转移灶是小细胞肺癌骨转移患者发生骨相关事件的风险因素^[17],骨转移可引起骨痛、骨折严重影响晚期肺癌患者生活质量,因而建立肺癌骨转移动物模型对其预防与治疗的研究具有重要意义。

2.3.1 同种移植性骨转移模型

Kuchimaru 等^[18]将表达荧光素酶小鼠肺癌细胞 LLC/luc 经尾动脉注射和心内注射两种方法注射进入 C57BL/6 雄性小鼠体内,生物发光活体成像技术显示,尾动脉注射组在注射后 30 min 即可在后肢骨髓即检测到中荧光,尾动脉注射肿瘤细胞的运输效率是心内注射的 3 倍,尾动脉注射后癌细胞向小鼠下体器官具有显性传递性,而心内注射则导致癌细胞则扩散到各种组织。组织学分析证实小鼠接受尾动脉注射后 7 d,骨转移病灶数目的增加。X 线与 CT 成像显示尾动脉注射比心内注射的小鼠骨量明显下降,生存期检测显示,尾动脉注射后小鼠生存超过 32 d,而心内注射的小鼠注射后 25 d 全部死亡。

2.3.2 异种移植性骨转移模型

Yang 等^[19]建立一株稳定高表达绿色荧光蛋白(GFP)的人肺癌细胞系 H460(H460-GFP),将 5×10^6 个 H460-GFP 细胞接种到 SPF 级雌性 BALB/c nu/nu 裸鼠皮下,3 周后肿瘤直径增至 $1.5 \sim 2.1 \text{ cm}$,取 1 mm^3 瘤块通过手术方法原位植入裸鼠的左肺中,3 ~ 4 周后观察可见 GFP 荧光遍及整个骨骼系统,包括头骨、椎骨、股骨、胫骨以及股骨和胫骨的骨髓,通过这种方法成功建立了肺癌骨转移模型同时揭示了肺癌的广泛转移潜力。王静等^[20]将 A549 细胞(6×10^6 个/只)注射到 NOD/SCID 裸鼠胫骨外贴骨处,6 周后显示肺癌细胞浸润到胫骨骨组织及周围软骨组织,发生肿瘤侵袭和骨质破坏。Miki 等^[21]将 8 种人肺癌细胞系尾静脉注入自然杀伤细胞缺乏性 SCID 小鼠体内,其中只有小细胞癌细胞系 SBC-5 细胞可重复发生骨转移,经 X 线评估,第 28 天 SBC-5 细胞产生的溶骨性骨转移就被检测到,所有受体小鼠在第 35 天出现骨转移,而肺腺癌细胞(PC-14, A549)主要在肺中产生转移灶。

2.4 淋巴结转移型

2.4.1 同种移植性淋巴结转移模型

Yamaura 等^[22]将 Lewis 肺癌细胞通过皮肤切口直接置入 C57/BL6 小鼠肺实质,93% 的动物在移植

部位出现单个肺结节,形成肺结节的小鼠均出现纵隔淋巴结转移。小鼠的平均存活时间为 (21 ± 2) d,植入后第 17 天和第 21 天纵隔淋巴结转移灶明显,远处器官或淋巴结未见转移。

2.4.2 异种移植性淋巴结转移模型

淋巴结转移是非小细胞肺癌最常见的转移途径,也是影响肺癌分期和预后重要的因素。Chishima 等^[23]建立了稳定表达 GFP 的人肺腺癌细胞 Anip 973,将该细胞皮下接种到裸鼠体内,5 周后当肿瘤的直径超过 1 cm 时,通过手术原位移植的方法将皮下瘤块植入裸鼠左肺的胸膜脏层,活体成像检测显示经淋巴传播的转移灶激发出的绿色荧光,在裸鼠肺门淋巴结、颈部淋巴结、纵隔和对侧胸膜腔清晰可见,该方法证实手术原位移植肺癌瘤块确定会产生淋巴结转移,同时结合 GFP 转染可实现肺癌转移可视化研究。

3 小鼠移植性肺癌转移模型的应用

3.1 肺癌转移模型在肿瘤转移机制中研究

小鼠肺癌转移模型在肿瘤转移机制的研究中具有重要意义,利用缺氧、转化生长因子 TGF、原癌基因 NF κ B、血管内皮生长因子 VEGF 等对肿瘤细胞进行预处理可以更好探讨肺癌的转移机制,转化生长因子(TGF- β)在肿瘤发生的早期起抑癌作用,但在疾病的后期变为肿瘤启动子。Khan 等^[24]采用转化生长因子 TGF- β 1 对肺癌 A549 细胞进行体外上皮间质化处理,并将其注射到 BALB/c 裸鼠的尾静脉中进行转移性传播研究,TGF- β 1 处理组 A549 细胞的分布与未处理组 A549 在肺的相对荧光簇数较少,在向肝、大脑、卵巢、骨骼和肾上腺转移方面,TGF- β 1 处理组转移率是未处理组的 2、3、1.5、2 和 1.7 倍。Salvo 等^[25]报道 TGF- β 是一种已知的肿瘤细胞整合素表达的诱导剂,它有助于癌细胞的转移扩散,TGF- β 暴露后增加了 β 3-整合素依赖性 NSCLC 对淋巴管内皮的粘附,体内实验表明,靶向 TGF- β 和 β 3 整合素可显著降低淋巴结转移的发生率。Qin 等^[26]报道肿瘤坏死因子超家族 15 (TNFSF15)是一种主要由血液内皮细胞产生的细胞因子,TNFSF15 通过上调 A549 细胞中 VEGF-c 的表达来促进肿瘤淋巴管生成,促进荷瘤小鼠的淋巴转移。

3.2 肺癌转移模型在新药研究中的意义

使用肺癌转移动物模型,可研究探讨药物是否

对肺癌的生长和转移产生影响,Ren 等^[27]利用转基因肺癌细胞株 L9981-Luc 裸鼠肺癌移植模型,检测到甲基亚硒酸能抑制 L9981-Luc 在裸鼠体内种植瘤的生长和远处转移。Skeberdytė 等^[28]利用沙利霉素和二氯乙酸盐协同作用可抑制 Lewis 肺癌细胞增殖、肿瘤生长和转移,沙利霉素是众所周知的癌症细胞杀手,而二氯乙酸盐是丙酮酸脱氢酶激酶抑制剂,其专门针对线粒体活性改变的肿瘤细胞,沙利霉素和二氯乙酸盐在 Lewis 肺癌细胞的 2D 和 3D 培养物中具有协同的细胞毒性,沙利霉素和二氯乙酸盐的联合治疗可提高同种异体移植性小鼠的存活率,抑制肿瘤转移。

3.3 肺癌转移模型在中药及单体药物研究中的意义

小鼠 Lewis 肺癌转移模型在中药治疗肿瘤性疾病的研究中具有广泛应用,Tang 等^[29]报道中药郁消散联合顺铂显著抑制 Lewis 肺癌移植瘤的生长,减少肺转移结节的数量,提高对肺转移的抑制率。Zhao 等^[30]报道黄芪多糖能有效抑制小鼠 Lewis 肺癌的生长和转移,改善免疫器官功能,抑制肿瘤组织中 VEGF 和 EGFR 蛋白的表达。Zhou 等^[31]报道,中药冬虫夏草提取物在 Lewis 异种移植动物模型中可降低肿瘤生长,减少肺转移。

4 小鼠移植性肺癌转移模型在应用中值得关注的问题

C57BL/6 小鼠、裸鼠、SCID 小鼠、NOD/SCID 小鼠都是构建移植性肺癌转移模型的常用品种,具体选择哪种类型的小鼠建模,需要充分考虑实验目的、实验周期、接种方法以及检测指标等因素。这几种品系小鼠各有优势,其中 C57BL/6 小鼠具有正常的免疫功能,价格低廉、耐受性强,模型成熟,常用于 Lewis 细胞的肺癌转移建模构建。裸鼠、SCID 小鼠、NOD/SCID 小鼠常用于人源肺癌细胞的移植性种植,Teraoka 等^[32]研究显示,将人类肺癌小块组织移植入 SCID 小鼠,种植成功率为 50%。吴健彬等^[33]研究显示 NOD/SCID 小鼠皮下移植瘤模型成瘤率为 55.6%,高于 BALB/c 裸鼠的成瘤率,并且肺癌在 NOD/SCID 小鼠并且易发生肺转移与骨转移,NOD/SCID 小鼠仍然是移植性肺转移模型的首选品系。在接种方法的选择上,Lewis 细胞常采用皮下注射、颈内动脉注射、尾动脉注射等方法来构建小鼠肺癌肺转移、脑转移和骨转移模型,成功率较高。人源性的肺癌细胞主要通过皮下注射、尾静

脉注射、心内注射、后肢胫骨平台注射以及原位移植的方法来构建肺转移、脑转移、骨转移和淋巴转移模型。

5 结语

综上所述,小鼠移植性肺癌转移模型是进行肺癌研究的重要支撑,对阐释肺癌的转移机制,肺癌相关药物的开发和研究都具有重要意义,本文详细介绍了同种和异种来源的小鼠移植性肺癌转移模型的建模方法,评价指标,以及该模型在科研中的广泛应用,对于从事肺癌转移相关研究的科技人员具有非常重要的参考价值。

参 考 文 献(References)

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] She C, Wang R, Lu C, et al. Prognostic factors and outcome of surgically treated patients with brain metastases of non-small cell lung cancer[J]. Thorac Cancer, 2019, 10(2):137-142.
- [3] 冯宇, 胡兴胜. 非小细胞肺癌脑转移治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(7):331-338.
Feng Y, Hu XS. Progress in the treatment of non-small cell lung cancer with brain metastases[J]. Chin J Clin Oncol, 2018, 45(7):331-338.
- [4] 韦武, 郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1):119-123.
Wei W, Guo HX. Research progress in establishing rat liver cancer models[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1):119-123.
- [5] Yano S, Nishioka Y, Izumi K, et al. Novel metastasis model of human lung cancer in SCID mice depleted of NK cells[J]. Int J Cancer, 1996, 67(2):211-217.
- [6] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture[J]. Cancer Lett, 1980, 11(1):63-73.
- [7] Zhu H, Kauffman ME, Trush MA, et al. A simple bioluminescence imaging method for studying cancer cell growth and metastasis after subcutaneous injection of Lewis lung carcinoma cells in syngeneic C57BL/6 mice[J]. React Oxyg Species (Apex), 2018, 5(14):118-125.
- [8] 马雪曼, 于明薇, 张甘霖, 等. 小鼠 Lewis 肺癌不同部位皮下移植瘤模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4):386-390.
Ma XM, Yu MW, Zhang GL, et al. Comparison of mouse models of Lewis lung carcinoma subcutaneously transplanted at different sites[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(4):386-390.
- [9] 姚明, 闫明霞, 刘蕾, 等. 人肺癌高转移动物模型的筛选及其细胞系的建立[J]. 肿瘤, 2007(11):866-869.
Yao M, Yan MX, Liu L, et al. Screening for an animal model of human lung cancer with highly metastatic potential as well as establishment its corresponding cell line[J]. Tumor, 2007(11):866-869.
- [10] Cui YQ, Geng Q, Yu T, et al. Establishment of a highly metastatic model with a newly isolated lung adenocarcinoma cell line[J]. Int J Oncol, 2015, 47(3):927-940.
- [11] 阙祖俊, 董昌盛, 罗斌, 等. 人源肺癌循环肿瘤细胞系在不同品系小鼠上肺转移能力研究[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(5):26-28.
Que ZJ, Dong CS, Luo B, et al. Study on lung metastasis of human lung cancer circulating tumor cell lines in different strains of mice[J]. E-J Transl Med, 2018, 5(5):26-28.
- [12] 唐明科, 魏殿芳, 刘洋, 等. 腺苷对肺癌脑转移的影响及其可能机制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(1):19-22.
Tang MK, Wei DF, Liu Y, et al. Effects of adenosine on brain metastasis of lung cancer and its possible mechanism[J]. J Clin Exp Pathol, 2019, 35(1):19-22.
- [13] 徐磊, 周伟, 刘科. GFP 标记 Lewis 肺癌细胞 3LL 颈内动脉注射建立脑转移瘤动物模型的可行性研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(23):2754-2757.
Xu L, Zhou W, Liu K. The feasibility of GFP positive Lewis lung cancer cell line 3LL intracarotid injected to establish brain metastasis animal model[J]. Chongqing Med J, 2013, 42(23):2754-2757.
- [14] Uzunalli G, Dieterly AM, Kemet CM, et al. Dynamic transition of the blood-brain barrier in the development of non-small cell lung cancer brain metastases[J]. Oncotarget, 2019, 10(59):6334-6348.
- [15] 陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 等. 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5):490-494.
Chen YS, Tu XW, Yu ME, et al. Comparison between the establishment methods of mouse models of lung cancer brain metastases by intrathoracic orthotopic implantation and by left ventricular injection[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(5):490-494.
- [16] Zhang C, Lowery FJ, Yu D. Intracarotid cancer cell injection to produce mouse models of brain metastasis[J]. J Vis Exp, 2017, 8(120):e55085.
- [17] 白娟, 蒲萍, 郑玲. 小细胞肺癌发生骨转移及骨相关事件的风险因素分析[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(16):2876-2879.
Bai J, Pu P, Zheng L. Risk factors for bone metastases and skeletal related events in small cell lung cancer patients[J]. J Mod Oncol, 2019, 27(16):2876-2879.
- [18] Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, et al. A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):2981.
- [19] Yang M, Hasegawa S, Jiang P, et al. Widespread skeletal metastatic potential of human lung cancer revealed by green fluorescent protein expression[J]. Cancer Res, 1998, 58(19):

- 4217-4221.
- [20] 王静, 刘芳, 杨晓琼. BMP9 对裸鼠非小细胞肺癌骨转移的影响[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(23):3566-3569.
- Wang J, Liu F, Yang XQ. Effect of BMP9 on bone metastasis of non-small cell lung cancer in nude mice[J]. Lab Med Clinic, 2018, 15(23):3566-3569.
- [21] Miki T, Yano S, Hanibuchi M, et al. Bone metastasis model with multiorgan dissemination of human small-cell lung cancer (SBC-5) cells in natural killer cell-depleted SCID mice[J]. Oncol Res, 2000, 12(5):209-217.
- [22] Yamaura T, Doki Y, Murakami K, et al. Model for mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic intrapulmonary implantation of lung cancer cells in mice[J]. Hum Cell, 1999, 12(4):197-204.
- [23] Chishima T, Miyagi Y, Wang X, et al. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression[J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15(5):547-552.
- [24] Khan GJ, Sun L, Abbas M, et al. In-vitro pre-treatment of cancer cells with TGF-beta1: a novel approach of tail vein lung cancer metastasis mouse model for anti-metastatic studies[J]. Curr Mol Pharmacol, 2019, 12(4):249-260.
- [25] Salvo E, Garasa S, Dotor J, et al. Combined targeting of TGF-beta1 and integrin beta3 impairs lymph node metastasis in a mouse model of non-small-cell lung cancer[J]. Mol Cancer, 2014, 13:112.
- [26] Qin T, Huang D, Liu Z, et al. Tumor necrosis factor superfamily 15 promotes lymphatic metastasis via upregulation of vascular endothelial growth factor-C in a mouse model of lung cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(8):2469-2478.
- [27] Ren Y, Wang Y, Liu H, et al. Influence of MSA on cell growth and spontaneous metastasis of L9981-Luc lung cancer transplanted model in nude mice by bioluminescence imaging[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2013, 16(2):67-72.
- [28] Skeberdyte A, Sarapiniene I, Krasko JA, et al. Salinomycin and dichloroacetate synergistically inhibit Lewis lung carcinoma cell proliferation, tumor growth and metastasis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(4):874-879.
- [29] Tang M, Wang S, Wei Y, et al. Inhibition effects of Yuxiao San combined with cisplatin on transplanted tumor growths via upregulation of nm-23 and downregulation of K-ras in Lewis lung cancer mice[J]. Oncol Lett, 2019, 17(1):1267-1273.
- [30] Zhao L, Zhong Y, Liang J, et al. Effect of astragalus polysaccharide on the expression of VEGF and EGFR in mice with Lewis transplantable lung cancer[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2019, 29(4):392-394.
- [31] Zhou Q, Zhang Z, Song L, et al. Cordyceps militaris fraction inhibits the invasion and metastasis of lung cancer cells through the protein kinase B/glycogen synthase kinase 3beta/beta-catenin signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 16(6):6930-6939.
- [32] Teraoka S, Kyoizumi S, Seyama T, et al. Scid mice model for the in-vivo study of human oncotherapy - studies on the growth and metastasis of human lung-cancer[J]. Int J Oncol, 1994, 5(3):501-508.
- [33] 吴健彬, 江妹, 王玥, 等. 非小细胞肺癌病人源性 NOD/SCID 小鼠和 BALB/c 裸鼠移植瘤模型的建立及比较[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(2):114-119.
- Wu JB, Jiang M, Wang Y, et al. Comparison of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts models in NOD/SCID and nude mice[J]. Carcinog·Teratog·Mutag, 2018, 30(2):114-119.

[收稿日期] 2020-02-20

陈美凤,加慧,夏书月. 不同 COPD 动物模型特点及应用的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 563-569.

Chen MF, Jia H, Xia SY. Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and related clinical applications[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 563-569.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.019

不同 COPD 动物模型特点及应用的研究进展

陈美凤,加慧,夏书月*

(沈阳医学院,沈阳医学院附属中心医院,呼吸与危重症医学,沈阳 110020)

【摘要】 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以不完全可逆的持续性进行性气流受限为特点,常伴随急性加重及严重并发症。建立标准化且切合临床 COPD 特征的动物模型对探究其发生发展、形态功能学改变及新的治疗途径具有重大意义。近年来国内外学者进行了许多相关研究,但目前尚无最佳模式的 COPD 动物模型构建方法。在本文中,对用于建立 COPD 模型的动物类型及各模型优缺点做了详细比较并阐述了其临床应用。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;COPD 动物模型;模型特点及应用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0563-07

Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and related clinical applications

CHEN Meifeng, JIA Hui, XIA Shuyue*

(Respiratory and Critical Care Medicine, Central Hospital Affiliated To Shenyang Medical College,
Shenyang Medical College, Shenyang 110020, China)

Corresponding author: XIA Shuyue. E-mail:syx262@126.com

【Abstract】 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by incomplete reversible persistent progressive airflow limitations, and always presents acute exacerbations and serious complications. Establishing standardized animal models that are consistent with the clinical COPD characteristics of COPD is important for exploring its development, and morphological changes, as well as new therapeutic approaches. Many studies have been conducted on COPD, but there is no best method exists for constructing animal models of COPD. Here, we describe and compare the types of animals used to establish the COPD models and the advantages, and disadvantages, and clinical applications of each model.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; COPD animal model; model characteristics and application

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

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以不完全可逆的持续性进行性气流受限为特点,是呼吸系统最常见慢性疾病,主要表现为气道慢性炎症,气道阻塞、结构重塑,肺泡结构改变和相关并发症^[1]。据国际慢阻肺疾病(the Burden of Obstructive Lung Diseases,

BOLD)等研究显示,预计到2020年,慢阻肺将成为全球第三大死因^[2]。据报道,我国40岁以上慢阻肺患病率为9.9%,患病人数高达1亿,整体疾病负担位列急性慢性疾病第3位^[3]。建立标准化且切合临床 COPD 特征的动物模型对探究其发生发展、病理生理、形态功能学改变及新的治疗途径具有重大意

【基金项目】 沈阳市科学技术计划项目(17-230-9-05)。

Funded by Science and Technology Planning Project of Shenyang (17-230-9-05).

【作者简介】 陈美凤(1994—),女,硕士研究生,主要从事呼吸科慢性阻塞性肺疾病研究。Email: cmf19950304@163.com

【通信作者】 夏书月,女,博士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事慢性阻塞性肺疾病、肺栓塞研究。Email: syx262@126.com

义。近年来国内外学者进行了许多相关研究,但目前尚缺乏最佳模型的 COPD 动物模式构建方法。在本文中,对用于建立 COPD 模型的动物类型及各模型优缺点做了详细比较并阐述了其应用。

1 动物品种的选择

目前建立 COPD 动物模型常用的动物包括小鼠、大鼠、豚鼠、小型猪、兔子、犬、非灵长类动物等,其中应用最为广泛的为鼠类。

1.1 小鼠和大鼠

鼠类品种丰富,体形较小,繁殖周期短,饲养及药物使用成本较低,可操作性较强。由于目前对鼠的基因组研究比较明确,多用于研究特定基因和蛋白质在 COPD 病理生理学中的作用^[4];同时,鼠存在多种酶与抗体,可用于鉴定抗原、细胞流式实验并直接定位和测量^[5]。但小鼠气管内纤毛分布较少,其气管黏膜下腺体不发达且无杯状细胞;单足气道分叉与人类的气道解剖结构不同,并且缺乏有呼吸功能的细支气管;气道较小,若进行肺泡灌洗难度较大;同时鼠属于专性鼻呼吸的动物,鼻纤毛对烟的滤过功能较低^[6],这与人类上呼吸道不同。研究显示鼠对外源性刺激敏感差异性^[7],对 COPD 症状的发展也具有一定的抵抗力,只能复制早期 COPD 症状,复制严重的 COPD 模型十分困难。

1.2 豚鼠

豚鼠的肺部解剖结构类似于人类二分支细支气管结构,可最大化减少吸入肺内的颗粒形成差异性分布^[8]。与小鼠相比,豚鼠的气管上皮排列更均匀,并且大气道中含粘液腺和杯状细胞,被广泛应用于呼吸系统疾病领域的研究。Ramírez-Ramírez 等^[9]发现豚鼠炎症反应与人类相似,可建立呈进行性发展的肺气肿模型^[10],符合临床 COPD 发展特点。该模型的主要缺点为豚鼠的大部分肺损伤反应为轴突反射,但轴突反射在人类肺损伤中作用并不明显^[11]。豚鼠价格较小鼠及大鼠相对昂贵,目前用于豚鼠的细胞因子和免疫标记物也较少;同时豚鼠缺乏尾巴,皮肤厚实,使血样的采集和给药具有一定的难度。

1.3 中型动物—小型猪,兔子,犬,羊

猪的肺组织比大鼠等动物更发达,肺部结构与人类相似度较高,为左侧两叶、右侧三叶^[12];具有呼吸性细支气管,可形成小气道阻力升高 COPD 动物模型;猪呼吸道黏膜下腺体较发达,诱导 COPD 发病

模型相对容易^[13]。兔子从解剖学、生理学、遗传学和生物学的相似性看,在系统发育上比其他啮齿类动物更接近人类^[14],但它们在非无菌过程中易感染细菌和病毒,建造模型过程中易发生死亡。实验性犬的呼吸道较大,可将致病试剂或治疗药物有针对性地传递到肺部,并可将另一肺部作为对照;嘴较宽,可进行肺输送系统研究;肺泡数量多且存在咳嗽反射,符合 COPD 的生理症状^[15]。羊十分温顺且气道结构为二分支,研究发现烟雾暴露后产生的粘液和上皮细胞分布类似于人的气道炎症反应^[16]。

中型动物体形较大,抗应激能力较强;但兔子、犬的气道均为单足分支,粘液成分与人类不同。同时饲养成本较高,物种具有特异性及一定危险性,市售可用试剂和测量手段也有限,这为造模增加了一定难度且实验成本较高。

1.4 非人类灵长类动物 (nonhuman primate, NHP)

非人类灵长类动物在解剖学、生理学、遗传学和生物学角度最接近人类,其中猴常被用作研究动物,尤其是恒河猴 (*Macaca mulatta*) 具有与人类极其相似的肺部结构,细支气管为二分支,肺泡分布广泛^[17],纤毛,杯状细胞和基底细胞排列方式与人类气道类似。其基因组与人类高度相似,可增加物种之间的关联性和可比性^[18],用作 COPD 患者发生气道疾病的模型并可以进行纵断面采样,这对于评估 COPD 的新型生物标志物或疗法可能有用。但灵长类动物模型需要专门的设备和技术来对动物进行麻醉和操作,对成本和伦理要求较高。

2 COPD 体外模型的建立

COPD 体外模型可在受控环境中研究特定的生理病理过程^[19]。COPD 涉及多个系统,要了解疾病的发生发展,需研究各系统的细胞,以更准确地模拟个体体内环境。目前常用的体外模型有保留肺结构和组织特性的离体肺切片^[20],允许细胞外基质和组织因子参与的灌注模型^[21],三维 (3D) 类器官模型及涉及未分化的支气管上皮细胞模型^[22-23]。但使用体外培养细胞需要注意细胞从炎性细胞外基质和环境中移出是可能会发生一些改变从而影响研究结果,导致临床应用价值欠佳。尽管体外/离体方法提供了许多优势,但由于人体组织/细胞的变化,有限的可用性及实验室间的差异,使可重复性受到限制。但随着 3D 打印技术的不断发展和对干细胞生物学的深入研究,建立标准化实验室人体组织的前景可观。

3 COPD 动物模型的建立

COPD 的病因、发病机制及病理改变复杂,用于研究 COPD 的动物模型应符合人类 COPD 诱导刺激的一系列相似的解剖和生理病理反应,从分子,细胞,器官和个体等多个层面展开,在建模中选择符合致病因素的诱导条件建立 COPD 模型。

3.1 单因素诱导

3.1.1 吸入有害气体/细颗粒物

目前常用的有害气体/细颗粒物为烟雾,PM_{2.5},二氧化硫,二氧化氮,臭氧等。由于吸烟和空气污染为 COPD 发生的重要危险因素^[1],所以烟雾暴露(CS)和 PM_{2.5} 在建模中较常使用。吸入有害气体及细颗粒物的效应随暴露时间的长短,频率,次数,暴露类型(局部烟熏,全身暴露,腹腔注射)和烟雾产生方式(吹气或吸气行为产生的主流烟雾,卷烟燃烧产生的侧流烟雾)的不同而差异较大^[24],Fröhlich 等^[25]发现全身或经鼻系统的烟雾暴露方法的差异为诱导 COPD 表型变异的潜在来源。Zhao 等^[26]将 C57BL/6 J 小鼠暴露于 PM_{2.5} 48 周后出现肺功能下降,气肿性病变和气道炎症,造模成功。同时种间差异影响 CS 暴露后肺气肿表型的发育时间,一般单纯烟雾暴露 2 个月即出现早期 COPD 肺部改变,6 个月出现典型的 COPD 肺部表现^[27]。需要注意的是某些物种(例如鼠)对 CS 诱导的嗜中性炎症和肺损害具一定的抵抗力,这种抵抗在中断 CS 暴露后就会停止甚至恢复^[28]。因此,单纯 CS 暴露的小鼠模型无法符合临床 COPD 的复杂性及严重性特点,适用于研究早期 COPD 疾病特征,需将结合多个不同的模型进行对比分析。

3.1.2 气道滴注弹性蛋白酶

目前常用的蛋白酶包括猪胰蛋白酶,木瓜弹性蛋白酶,人嗜中性粒细胞弹性蛋白酶,基质金属蛋白酶。弹性蛋白酶可诱导大鼠产生肺气肿,该模型的优点在于经气管内滴注可免受血液中弹性蛋白酶抑制因子的灭活,单剂量弹性蛋白酶即可导致肺泡壁结构短期丧失并可诱导并维持炎症反应的发生^[29]。但弹性蛋白酶的给药窗口狭窄,低于推荐剂量浓度不足以引起肺部结构发生变化,而高于阈值的浓度会导致动物严重肺出血和死亡,研究表明弹性蛋白酶诱导啮齿类动物出现 COPD 病理改变需 21 ~ 45 d^[30],Longhini 等^[31]制备了使用抗弹性蛋白酶自身免疫性鼠模型引起的肺气肿,可用于检查免疫耐受在 COPD 中的作用,增加基于弹性蛋白酶模型的临床相关性。弹性蛋白酶不但破坏肺泡间

隔的弹性纤维,同时也引起气管壁及血管壁等组织的破坏,这与人类 COPD 肺气肿的病理表现接近。

3.1.3 气管内注入脂多糖

脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌的细胞壁成分,存在于空气污染和有机粉尘中。LPS 暴露会引起嗜中性粒细胞和巨噬细胞大量聚集,导致肺部炎症的发生,长期暴露会引起肺部结构发生变化,这种变化在 LPS 接触停止后仍会持续。研究表明 LPS 鼻内滴注的最佳时间为 72 h,28 d 即可形成 COPD 模型^[32]。脂多糖动物模型存在肺功能下降、肺气肿、小气道重塑、肺部炎症等现象^[33]。De Oliveira 等^[34]利用 LPS 成功制备了急性肺气肿加重模型以进行 COPD 急性加重期相关研究。与其他模型相比,使用 LPS 诱导产生炎症和纤维化模型以实现 COPD 的病理学特征所需时间相对较短且与人类 COPD 的临床特点接近。

3.1.4 细菌/病毒感染

感染是发生 COPD 急性加重最重要的诱因,可导致病情进展及病死率增加。目前常用的细菌/病毒有铜绿假单胞菌,肺炎克雷伯杆菌,流感嗜血杆菌,肺炎链球菌,大肠杆菌,流感病毒,鼻病毒,人免疫缺陷病毒(HIV)等。此模型适用于研究细菌感染导致肺组织损伤的机理,但实践中要注意选取细菌的种类及控制细菌的数量。单纯应用细菌/病毒建立 COPD 模型的情况较少,多与其他因素联合使用建立 AECOPD 动物模型^[35-36]。

3.1.5 基因控制模型

COPD 具有遗传和环境易感性,遗传性 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺乏(AATD)尽管只占很小一部分,却很好的解释了遗传与环境的相互作用致使个体倾向于发生 COPD^[37],不过尚不明确这些基因究竟是 COPD 发病的基因或仅仅是致病基因的标记。目前基因调控模型主要包括自然变异的 COPD 模型,如紧皮、苍白、斑点型小鼠^[38]。转基因 COPD 模型如将删除肺上皮神经纤毛蛋白 1(Nrp1)的基因缺失小鼠暴露于烟雾中 12 周制备的 Nrp1 基因缺失型 COPD 动物模型,发现上皮 Nrp1 在维持正常肺泡结构中的作用,可用于研究 Nrp1 表达失调在慢阻肺发展中的机制^[39];与成年吸烟者 COPD 风险及肺功能下降相关的基因编码金属蛋白酶 12(MMP12)^[40]。Nakashima 等^[41]通过诱导气道上皮 Na⁺通道 b 亚基(bENaC-Tg 老鼠)建立了 COPD 大鼠模型,以探索 C57BL/6 J 基因型小鼠与 bENaC-Tg 小鼠表现出的弥漫型肺气肿模型稳定表达炎性和衰老样标记物的差别。

现已制备的 COPD 模型包括 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶、TGF- β 、人趋化因子受体 6、Klotho 基因、胚胎干细胞诱导突变和肺表面活性物质 D 等敲除鼠。COPD 基因改造模型获得的动物模型具有遗传稳定性和重复性,允许从细胞分子易感性水平上来分析特定性的调控作用及其功能,对于 COPD 的预防和治疗提供重要的工具,但其不能产生人类 COPD 的几种特定表现,因而限制了其转化应用价值。

3.1.6 植入他莫西芬

一直以来,国内外关于性别与 COPD 易感性及急性加重是否相关存在很大争议。相关研究表明:与吸烟男性相比,40~50 岁女性吸烟者的肺功能下降快于男性吸烟者,并且 COPD 风险增加了 50%^[42-43]。Tam 等^[44]将雄性、雌性和卵巢切除的 C57BL/6 小鼠先烟雾暴露 6 个月,然后给雌性小鼠植入他莫昔芬,暴露 2 周后进行第二次干预,每只小鼠再次植入 75 mg 他莫昔芬颗粒继续暴露 4 周后成功制备雌激素缺乏的 COPD 模型,证明了雌激素可能参与了烟雾暴露雌性小鼠中独特的氧化剂/TGF- β 信号转导轴失调。为寻找雌激素信号传导级联反应下游的治疗靶点提供实验基础,用于探索女性 COPD 的干预治疗提供了新的理论指导。

3.1.7 免疫相关型模型

吸烟一直被认为是发生 COPD 最重要的危险因素,但戒烟 2 年后气道炎症仍在持续,该现象与自身免疫性疾病的特征相似。相关研究表明 CS 暴露可显著降低患者 SP-D 的肺泡水平,尼古丁可导致人气道上皮细胞中 SP-D 水平降低^[45]。Sorensen 等^[46]通过诱导上皮 Na⁺ 通道 b 亚基的气道特异性过表达的小鼠(bENaC-Tg 小鼠)3 周建立了 SP-D 基因敲除的 COPD 小鼠,为研究肺部炎症和先天免疫以及进行肺表面活性物质稳态研究提供了建模基础。Hirota 等^[47]研究了由气道上皮 NLRP3 炎性小体介导的 PM10 暴露的先天性和适应性免疫反应模型,证明了肺 NLRP3 炎性体在介导 PM10 暴露相关的先天性而非适应性免疫反应中的重要性,用于研究 PM10 暴露加剧气道疾病的机制。

3.2 复合因素

单一造模方法难以模拟出符合临床的 COPD 模型,并且耗时较长。为了尽可能全面真实地模拟 COPD 的发病过程及病理特点,多数研究者倾向于采用复合因素构建 COPD 动物模型。近年来常用的复合因素造模方式包括:烟雾+LPS,烟雾+细菌/病毒感染,烟雾+PM2.5,烟雾+弹性蛋白酶,弹性蛋白酶+脂多糖,氯化钙+山梨豆类制

等联合方式。

舒家泽等^[48]通过烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖的方法成功建立慢性阻塞性肺疾病及相关肺动脉高压(COPD.PH)的小鼠模型,可用于研究减轻肺动脉高压的治疗策略,并提示 4 周即可形成 COPD 大鼠模型。Shu 等^[49]利用机动车尾气(MVE)和气管内滴注脂多糖(LPS)13 周成功建立了 COPD 动物模型,并出现了心室和血管病理变化。Mebratu 等^[50]将大鼠暴露于 CS2 个月后感感染甲型流感病毒(IAV)/呼吸道合胞病毒(RSV)/病毒衍生物肌苷-聚胞苷酸[poly(I:C)]以及联合铜绿假单胞菌+肺炎链球菌及流感嗜血杆菌建立了 COPD 细菌/病毒感染模型^[51],表明 CS 引起的炎症反应和气肿改变的程度取决于病毒感染的类型。这些动物模型可能有助于研究不同病毒加剧 CS 诱导的炎症和肺气肿的机制。Wang 等^[52]将 C57BL/6 基因型小鼠联合暴露于 PM2.5 和 CS/CSE40 周成功制备 COPD 模型,提出在 COPD 的背景下,PM2.5 可加剧 CS/CSE 诱导的炎症。Geraghty 等^[53]使用 EcoHIV 的野生型小鼠 2 个月诱导建立了 COPD 模型,再现了人类 HIV 相关 COPD 的几种病理生理特征,可用于确定 HIV 相关 COPD 的关键参数并测试该疾病的未来疗法。陈敏等^[54]通过烟熏+间歇低氧 8 周成功构建大鼠 COPD-OSAHS 重叠综合征模型,为开展 OS 基础研究提供了参考。

复合因素建立的 COPD 模型,可从多方面探究疾病的发生发展及病理生理过程,使建立 COPD 合并症模型成为可能。需要注意的是复合因素建模对动物的耐受性要求较高,在选择造模动物时需全面考虑。

4 COPD 模型的评估

目前用于判断 COPD 模型是否造模成功的评估内容主要包括:动物行为学改变^[55],如观察皮毛光泽度、活动情况、反应灵敏度、精神状况、进食进水量、呼吸状况、体重变化、死亡情况、呼吸道变化等,由于影响因素较多,缺乏统一的评分标准,评估时多与其他方法联合使用。测定肺功能(有创和无创测定法),其中无创体描测定可在生理状态下观察药物等治疗方法对肺功能的影响,脉冲振荡技术可通过测定呼吸道阻力、黏性阻力、弹性阻力、惯性阻力等参数分析出是否存在气道阻塞、部位及程度;同时还有肺动脉仪量化气道内压、肺阻力、肺顺应性等。肺功能测定对于确定疾病模型是否出现气流受限具有重要意义,且操作方便,可重复性良好,

在 COPD 模型的评价中应用前景广阔^[56]。肺部切片病理学改变可确定气道及肺

实质的病理变化是否符合 COPD 的典型改变^[57],包括:中央气道黏液腺增大,炎症细胞浸润;外周气道损伤,胶原蛋白沉积及修复;纤毛倒伏、变短、粘连,脱落;气道平滑肌增厚;肺泡扩张,肺泡壁变薄,肺大泡形成,肺泡数目显著减少等,此方法简便、直观、易操作,在哮喘、COPD、肺纤维化等多种肺部疾病的研究中具有重要参考意义,能够客观地反映病理特征及严重程度,应用较多。肺泡灌洗液分析白细胞和中性粒细胞,血清 IgE, BLAF 的总细胞浓度计数与分类计数是动物实验中常用的观察指标之一且准确性高;免疫组化检测呼吸道中的细胞因子(IL-8, TNF- α , IFN- γ 和 TGF- β)和趋化因子(CCL-2, CXCL1, CXCL9, CXCL10 和 CXCL11^[58])等,标本易获取,可操作性强,应用广泛。Marcos 等^[59]提出了平均线性截距和等效直径以量化组织学切片中的气肿性病变相关的区域,使用贝叶斯方法得出新型气肿严重程度指数(SI)及 X 射线显微断层扫描(micro-CT)评估肺气肿等,两种方法均可实现对肺气肿的范围及分布进行定量分析,并可在肺功能正常的早期阶段发现肺气肿,有助于 COPD 早期诊断与治疗。Micro-CT 分辨率达到微米级别,可无创、清晰的观测样本内部显微结构,对肺部改变非常灵敏,可用于无创动态监测肺部病理变化,展示疾病动态过程^[60]。

5 结语

COPD 发病率、致死率高,诊断率低并呈慢性迁延,其病因、发病机制及病理改变复杂,所以在设计模型时应充分考虑动物品种及各诱导因素的优缺点,最大化符合临床,优化从分子水平、药物化学评估、体外测试、预测性动物模型到最终人类临床试验的级联测试,选择最适用于研究目的的造模方法。

临床实际中 COPD 的发生发展及形态功能学改变复杂,常伴随急性加重及合并症,单一的造模方法难以模拟出符合临床实际的 COPD 模型且耗时较长,目前多倾向于采用复合因素构建 COPD 动物模型,针对不同的研究目的,采用 2 ~ 3 个诱导因素进行造模,缩短造模时间,深入研究 COPD 及其合并症的相关问题。一直以来,小鼠和大鼠因其造模价格相对便宜、饲养方便、品种丰富等各方面优点,是多数研究者造模的优先选择,但同时也须考虑物种之间的关联性及可比性,使实验结果的临床推广性更佳,越来越多的学者选择中型动物及非灵长类动物

作为造模对象。因造模动物、诱导因素、诱导剂量及方式等不同,造模所需时间也有所差别,评估造模是否成功需根据造模目的,结合功能学、结构学及肺组织中细胞数目计数等方法综合评估,在模型评估中尽量采用评估标准明确,主观性小的评估方法,保证评估结果的准确性及可重复性。

目前 COPD 动物模型的主要限制一方面体现在不能再现患者在临床环境中实际发生的情况及相关合并症,单一的 COPD 模型没有 COPD 疾病特征的广度,特别是疾病后期。随着对 COPD 动物模型研究的不断深入,越来越多贴近临床实际的 COPD 模型被建立及完善,并应用于研究其发病机制及新的治疗途径和靶点。

建模另一个关键是急性加重,尽管感染(尤其是病毒感染)是病情加重最常见的病因,但各患者之间具有 COPD 易感性,发作频率,肺功能下降速度不同等个体差异性,这种情况下使用动物模型研究 COPD 加重的特殊性进行分析面临诸多问题。在临床研究中,识别出易急性加重的 COPD 患者,阐明并鉴定 COPD 特定临床表型相关性和患者病情加重的潜在机制是 COPD 动物实验研究中的重要部分。然而,由于 COPD 病程呈慢性迁延,急性加重后疾病的预后也有差异,但在动物模型中我们通常使用横断面研究,终点事件出现后一般不再进行长时间跟踪观察,这对动物实验产生的结果应用于人类面临很多不确定性,动物模型的评估效用也面临挑战。

参 考 文 献(References)

- [1] Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2017, 195(5): 557-582.
- [2] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990 - 2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013 [J]. Lancet 2015; 385(9963): 117-171.
- [3] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [4] Reczyńska K, Tharkar P, Kim SY, et al. Animal models of smoke inhalation injury and related acute and chronic lung diseases [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2018, 123: 107-134.
- [5] Yue F, Cheng Y, Breschi A, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome [J]. Nature, 2014, 515(7527): 355-364.
- [6] Rydell-Törmänen K, Johnson JR. The applicability of mouse models to the study of human disease [J]. Methods Mol Biol,

- 2019, 1940; 3–22.
- [7] Fermont JM, Masconi KL, Jensen MT, et al. Bio-markers and clinical outcomes in COPD: a systematic review and meta-analysis[J]. Thorax, 2019, 74(5): 439–446.
- [8] Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in preclinical mouse models of COPD[J]. Clin Sci, 2014, 126(4): 253–265.
- [9] Ramírez-Ramírez E, Torres-Ramírez A. Characteristic Plethysmographic findings in a guinea pig model of COPD[J]. Exp Lung Res, 2017, 43(2): 57–65.
- [10] Yarto-Jaramillo E. Respiratory system anatomy, physiology, and disease: Guinea pigs and chinchillas[J]. Vet Clin North Am Exot Anim Pract, 2011, 14(2): 339–355.
- [11] Manning PJ, Wagner JE, Harkness JE. Biology and diseases of guinea pigs[J]. Labor Anim Med, 1984; 149–181.
- [12] Wemyss-Holden SA, Porter KJ, Baxter P, et al. The laryngeal mask airway in experimental pig anaesthesia[J]. Lab Anim, 1999, 33(1): 30–34.
- [13] Chen P, Hou J, Ding D, et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation of bronchi and emphysematous changes of pulmonary parenchyma in miniature pigs (*Sus scrofa domestica*) [J]. Lab Animal, 2013, 42(3): 86–91.
- [14] Kamaruzaman NA, Kardia E, Kamaldin N', et al. The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013; 691830.
- [15] Chapman RW. Canine models of asthma and COPD[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(5): 731–742.
- [16] Abraham WM. Modeling of asthma, COPD and cystic fibrosis in sheep[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(5): 743–754.
- [17] Cai Y, Sugimoto C, Arainga M, et al. In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans [J]. J Immunol, 2014, 192(6): 2821–2829.
- [18] Asgharian B, Price O, McClellan G, et al. Development of a rhesus monkey lung geometry model and application to particle deposition in comparison to humans[J]. Inhal Toxicol, 2012, 24(13): 869–899.
- [19] Mertens TC, Karmouty-Quintana H, Taube C, et al. Use of airway epithelial cell culture to unravel the pathogenesis and study treatment in obstructive airway diseases [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2017, 45; 101–113.
- [20] Bauer C, Golgi J, Lambert K, et al. Precision cut lung slices: A novel method for examining mechanisms underlying respiratory diseases[J]. Eur Respir J, 2013, 42 Suppl 57: 669.
- [21] Gnadt M, Trammer B, Freiwald M, et al. Methacholine delays pulmonary absorption of inhaled β_2 -agonists due to competition for organic cation/carnitine transporters [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2012, 25(1): 124–134.
- [22] Zscheppang K, Berg J, Hedtrich S, et al. Human pulmonary 3D models for translational research[J]. Biotechnol J, 2018, 13(1): 1700341.
- [23] Leeman KT, Pessina P, Lee J, et al. Mesenchymal stem cells increase alveolar differentiation in lung progenitor organoid cultures[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6479.
- [24] Fricker M, Deane A, Hansbro PM. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9(6): 629–645.
- [25] Fröhlich E, Salar-Behzadi S. Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* studies [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(3): 4795–4822.
- [26] Zhao J, Li M, Wang Z. Role of PM2.5 in the development and progression of COPD and its mechanisms[J]. Respir Res, 2019, 20(1): 120.
- [27] Holami Mahtaj L, Boskabady MH, Mohamadian Roshan N. The effect of *Zataria multiflora* and its effect of *Zataria multiflora* and its constituent *J. carvacrol*, on tracheal responsiveness and lung pathology in guinea pig model of COPD [J]. Phytother Res, 2015, 29(5): 730–736.
- [28] Williams K, Roman J. Studying human respiratory disease in animals—role of induced and naturally occurring models [J]. J Pathol, 2016, 238(2): 220–232.
- [29] Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, et al. α_1 -antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis[J]. Am J Pathol, 2006, 169(4): 1155–1166.
- [30] Gu BH, Sprouse ML, Madison MC, et al. A novel animal model of emphysema induced by anti-elastin autoimmunity [J]. J Immunol, 2019, 203(2): 349–359.
- [31] Longhini DSN, Barbosa OVA. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema[J]. Stem Cell Rev, 2013, 9(2): 210–218.
- [32] Lee SY, Cho JH, Cho SS, et al. Establishment of a chronic obstructive pulmonary disease mouse model based on the elapsed time after LPS intranasal instillation[J]. Lab Anim Res, 2018, 34(1): 1–10.
- [33] 汪珊珊, 汪电雷. 脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮 MRP1 功能分析[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 30–34.
- Wang SS, Wang DL, Tao XH, et al. MRP1 expression and bronchial epithelial function in lipopolysaccharide-induced rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 30–34.
- [34] De Oliveira MV, Rocha NN, Santos RS, et al. Endotoxin-induced emphysema exacerbation: A novel model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations causing cardiopulmonary impairment and diaphragm dysfunction [J]. Front Physiol, 2019, 10; 664.
- [35] Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, et al. Elastase/LPS-exposed mice exhibit impaired innate immune responses to bacterial challenge: role of scavenger receptor A [J]. Am J Pathol, 2012, 180(1): 61–72.
- [36] Kobayashi S, Fujinawa R, Ota F, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(6): 971–917.
- [37] Hardin M, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease genetics: a review of the past and a look into the future [J].

- Chronic Obstr Pulm Dis, 2014, 1(1): 33-46.
- [38] Shapiro SD. Animal models for COPD[J]. Chest, 2000, 117(5 Suppl 1): 223S-227S.
- [39] Le A, Zielinski R, He C. Pulmonary epithelial neuropilin-1 deletion enhances development of cigarette smoke-induced emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(5): 396-406.
- [40] Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, et al. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations[J]. N Engl J Med, 2009, 361(27): 2599-2608.
- [41] Nakashima R, Kamei S, Nohara H, et al. Auto-measure emphysematous parameters and pathophysiological gene expression profiles in experimental mouse models of acute and chronic obstructive pulmonary diseases[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 140(2): 113-119.
- [42] Downs SH, Brandli O, Zellweger JP, et al. Accelerated decline in lung function in smoking women with airway obstruction: SAPALDIA 2 cohort study[J]. Respir Res, 2005, 6(1): 45.
- [43] Martinez FJ, Curtis JL, Sciurba F, et al. Sex differences in severe pulmonary emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(3): 243-252.
- [44] Tam A, Churg A, Wright JL, et al. Sex differences in airway remodeling in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(8): 825-834.
- [45] Zou W, Liu S, Hu J, et al. Nicotine reduces the levels of surfactant proteins A and D via Wnt/ β -catenin and PKC signaling in human airway epithelial cells[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2016, 221: 1-10.
- [46] Sorensen GL. Surfactant protein D in respiratory and non-respiratory diseases[J]. Front Med, 2018, 5: 18.
- [47] Hirota JA, Gold MJ, Hiebert PR, et al. The nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat protein 3 inflammasome/IL-1 receptor I axis mediates innate, but not adaptive, immune responses after exposure to particulate matter under 10 μ m[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 52(1): 96-105.
- [48] 舒家泽, 卢文菊, 李德富, 等. 应用烟草烟雾口鼻暴露联合脂多糖方法建造慢性阻塞性肺疾病及相关肺动脉高压小鼠模型[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(12): 907-911.
- Shu JZ, Lu WJ, Li DF, et al. Nose-only cigarette smoke exposure plus airway lipopolysaccharide inhalation induced chronic obstructive pulmonary disease and associated pulmonary hypertension in mice[J]. Chin J Tuberc Respir, 2015, 38(12): 907-911.
- [49] Shu J, Lu W, Yang K, et al. Establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease model by chronic exposure to motor vehicle exhaust combined with lipopolysaccharide instillation[J]. Exp Physiol, 2018, 103(11): 1532-1542.
- [50] Mebratu YA, Smith KR, Agga GE, et al. Inflammation and emphysema in cigarette smoke-exposed mice when instilled with poly (I:C) or infected with influenza A or respiratory syncytial viruses[J]. Respir Res, 2016, 17(1): 75.
- [51] 张甜甜, 田王斌, 李媛媛, 等. 烟熏联合不同细菌建立大鼠慢性阻塞性肺疾病急性加重期动物模型[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(8): 743-746.
- Zhang TT, Tian WB, Li YY, et al. Establishment of rat models of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by fumigation combined with different bacteria[J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2018, 32(8): 743-746.
- [52] Wang Z, Zhao J, Wang T, et al. Fine-particulate matter aggravates cigarette smoke extract-induced airway inflammation via Wnt5a-ERK pathway in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019, 14: 979-994.
- [53] Geraghty P, Hadas E, Kim BH, et al. HIV infection model of chronic obstructive pulmonary disease in mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312(4): L500-L509.
- [54] 陈敏, 黄照明, 何剑, 等. 通过烟熏和间歇低氧构建大鼠 COPD-OSAHS 重叠综合征模型[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 59-64.
- Chen M, Huang ZM, He J, et al. Establishment of a rat model of COPD-OSAHS overlap syndrome induced by smoking and intermittent hypoxia[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 59-64.
- [55] Cheng Y, Tao W, Zhang X, et al. Experimental study on the building animal model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. World J Int Tradit Western Med, 2016, 1(4): 445-448.
- [56] Kastelik JA, Aziz I, Oioo JC, et al. Evaluation of impulse oscillation system: comparison with forced oscillation technique and body plethysmography[J]. Eur Respir J, 2002, 19(6): 1214-1215.
- [57] Postnov AA, Meurrens K, Weiler H, et al. *In vivo* assessment of emphysema in mice by high resolution X-ray microtomography[J]. J Microsc, 2005, 220(1): 70-75.
- [58] 龙颖姣, 陈燕, 陈平. 慢性阻塞性肺疾病动物模型构建及评价[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(17): 1327-1330.
- Long YJ, Chen Y, Chen P. Building and evaluation of COPD animal models[J]. Int J Respir, 2014, 34(17): 1327-1330.
- [59] Marcos JV, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-de-Solórzano C, et al. Quantitative assessment of emphysema severity in histological lung analysis[J]. Ann Biomed Eng, 2015, 43(10): 2515-2529.
- [60] Vande VG, Poelmans J, De LE, et al. Longitudinal Micro-CT provides biomarkers of lung disease that can be used to assess the effect of therapy in preclinical mouse models, and reveal compensatory changes in lung volume[J]. Dis Model Mech, 2016, 9(1): 91-98.

[收稿日期] 2019-12-23

王峥,李秀敏,苗晋鑫. 食物过敏小鼠模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 570-577.

Wang Z, Li XM, Miao JX. Advances in murine models for food allergies[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 570-577.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.020

食物过敏小鼠模型研究进展

王峥¹,李秀敏^{2*},苗晋鑫^{1*}

(1. 河南中医药大学,中医药科学院,郑州 450000; 2. 纽约医学院,微生物与免疫学系,耳鼻喉系,纽约 10595)

【摘要】 食物过敏正在迅速发展成为全球性健康问题。食物过敏反应是由无害食物特异性的 Th2 反应引起,导致 IgE 介导的肥大细胞脱颗粒和相关的发炎反应。食物过敏小鼠模型有助于对人类食物过敏病理学、生理学及新型治疗策略的研究。食物过敏小鼠模型分为依赖佐剂模型、无佐剂模型、基因工程模型和人源化模型。然而,尚无小鼠模型能重现人类食物过敏完整的病理学特征,使用特定的食物过敏小鼠模型来解决特定食物过敏研究问题至关重要。本文结合国内外研究文献,对近 20 年不同食物过敏小鼠模型的制备方法及其优缺点的研究进展做一综述,为食物过敏机制研究及开发新型治疗策略提供科学基础。

【关键词】 食物过敏;小鼠模型;基因工程模型;人源化小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0570-08

Advances in murine models for food allergies

WANG Zheng¹, LI Xiumin^{2*}, MIAO Jinxin^{1*}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. Department of Microbiology and Immunology, and Department of Otolaryngology, New York Medical College and School of Medicine, New York, 10595, USA)

Corresponding author: LI Xiumin. E-mail: xiu-min.li@outlook.com; Miao Jinxin. E-mail: jinxin.miao@yahoo.com

【Abstract】 Food allergies are rapidly becoming a global health problem. Food allergic reactions are caused by Th2 responses to harmless foods, leading to IgE-mediated mast cell degranulation and related inflammatory responses. Food allergy murine models are helpful for studying the pathology, physiology and new treatment strategies for human food allergies. These models can be divided into adjuvant-dependent, adjuvant-free, genetic-engineered and humanized mouse models. However, no animal models can reproduce the entire range of human pathological features; therefore, specific mouse models of food allergies must be used to address specific food allergy research issues. This article summarizes the literature, research progress on modeling method, and advantages and disadvantages of different murine models of food allergies over the last 20 years and provides a reference and scientific basis for researching food allergy mechanisms and developing new treatment method.

【Keywords】 food allergy; mouse model; genetic engineering model; humanized mouse

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

【基金项目】 河南中医药大学科研启动经费(RSBSJJ2018-36),河南中医药大学实验室建设与人才培养(38103009-2020-2)。

Funded by PhD Research Startup Foundation of Henan University of Chinese Medicine (RSBSJJ2018-36), Laboratory Construction and Talent Training of Henan University of Traditional Chinese Medicine (38103009-2020-2).

【作者简介】 王峥(1996—),女,硕士,主要从事过敏性疾病研究。Email:15038001835@163.com

【通信作者】 李秀敏,女,教授,主要从事过敏性疾病研究。Email: xiu-min.li@outlook.com;

苗晋鑫,男,医学博士,助理研究员,主要从事转基因动物及肿瘤防治研究。Email: jinxin.miao@yahoo.com。

* 共同通信作者

食物过敏 (Food allergy, FA) 是世界第五大公共卫生问题,其临床特征为口腔粘膜、喉咙、胃肠道等组织或器官局部炎症,常伴有皮肤反应,严重时危及生命^[1]。食物过敏因其反应的严重程度及终身性引起了人们广泛的关注^[2]。研究 FA 发病机制、防治手段对改善食物过敏患者病情至关重要。目前,仍缺乏完全模拟人类食物过敏临床特征的动物模型。不同动物模型对同一食物过敏原识别模式和过敏的敏感性存在差异,在蛋白质致敏研究中,猪和狗的食物过敏模型具有与人类非常相似的过敏反应,但是致敏周期长,致敏剂量大和价格昂贵,且缺乏相关的分子免疫试剂,因此它们更多是用于过敏机制研究而非致敏性评价。食物过敏小鼠模型体积小,易于繁殖和价格便宜,并有多种小鼠免疫分子试剂及近亲交配和转基因小鼠,已广泛用于各种 IgE 介导的过敏性疾病的分子和细胞机制研究。FA 小鼠模型为研究食物过敏原致敏性发生、发展和治疗食物过敏的基本工具^[3-4]。FA 小鼠模型分为依赖佐剂模型、无佐剂模型、转基因模型和人源化模型。然而,尚无小鼠模型模拟全部人类 FA 疾病的病理学特征,使用特定的食物过敏小鼠模型对解决特定食物过敏研究问题至关重要。本综述旨在总结不同 FA 小鼠模型与人 FA 疾病的相似性以及应用范围,为食物过敏性疾病的研究提供理论及科学基础。

1 佐剂辅助致敏小鼠模型

小鼠免疫系统是目前研究体内复杂的免疫反应的绝佳模型^[5]。已开发多种特定 IgE 产生的过敏小鼠模型,过敏原口服途径是食物过敏小鼠模型常用制备方法^[6]。但是,口服途径对诱导 IgE 的敏感性较低。佐剂辅助致敏可增强免疫激活作用,导致非过敏性蛋白诱导 Th2 反应,有助于 FA 小鼠模型的成功建立^[7]。本文主要阐述 4 种常用的佐剂致敏物,氢氧化铝、霍乱毒素 (cholera toxin, CT)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、金黄色葡萄球菌肠毒素 B (staphylococcal enterotoxin B, SEB)。

1.1 氢氧化铝辅助致敏

氢氧化铝是经典的免疫激活剂。研究发现通过对 BALB/c 小鼠皮下注射 1 mg 氢氧化铝佐剂与

100 μ g 花生粗提蛋白 (crude peanut extract protein, CPE),共注射两次,间隔时间为 3 周,第二次免疫 1 周后,皮下注射 200 μ g CPE 进行激发,成功获得致敏小鼠模型。结果,该致敏小鼠出现与人类相似的临床症状,腹泻、精神萎靡、挠头搔耳、呼吸急促,肺泡灌洗液中肥大细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞数量都显著升高和血清中 IgE 表达上升^[8]。研究提示,该模型采用去除脂肪和多糖类物质中的花生粗蛋白对小鼠进行致敏,其致敏性强,能反映花生作为食品引起的过敏反应。氢氧化铝佐剂价格便宜和购买方便,但其配制方法繁琐,对 pH 值范围要求较高。值得注意的是采用皮下致敏途径,因佐剂的吸收速度较慢会在注射部位引起较严重的局部反应,导致皮下注射后易形成肿块^[9]。

1.2 CT 辅助致敏

Song 等^[10]采用 CT 和花生对 C3H/HeJ 小鼠灌胃,结果出现腹泻、体温下降及血浆中组胺、嗜酸性粒细胞数量增加的过敏症状。利用 FAHF-2 药物对 CT 辅助致敏的小鼠治疗,小鼠体温恢复正常、外周血中的组胺表达量和嗜酸性粒细胞数量明显减少^[10]。

1.3 LPS 辅助致敏

Rodriguez 等^[11]在第 0、7、14、21、28 和 35 天对 BALB/c 小鼠进行桃蛋白 prup 3 和 LPS 腹腔注射,结果小鼠出现体温下降、呆滞、呼吸频率增加、IgE 抗体水平升高等全身的过敏反应特征。Th1/Th2 向 Th2 偏移是产生过敏的关键因素,食物过敏时 Th2 型细胞活化增加,IL-4 的生成显著增多,进而诱导 B 细胞生成大量 sIgE,并诱发机体发生过敏性炎症反应^[12]。研究发现,佐剂可以增强某些蛋白质诱导 Th2 反应作用,根据 LPS 浓度调节反应趋向于 Th1 模式或增强 Th2 反应的诱导^[11,13-15]。

1.4 SEB 辅助致敏

SEB 与抗原一起使用可导致系统免疫反应。Ganeshan 等^[16]每周 1 次对小鼠灌胃 100 mg 卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 和 10 mg SEB,最终剂量为 100 mL,持续 8 周,在第 9 周后,5 mg OVA 灌胃攻击,成功建立 SEB 辅助 OVA 致敏小鼠模型。该小鼠模型血清中 IgE、组胺水平升高,嗜酸性粒细胞数量增加、空肠组织出现水肿等临床过敏症状。SEB 辅助

致敏相对于 CT 辅助致敏能促进嗜酸性粒细胞数量的增加,并且可通过降低剂量来促进花生的过敏反应^[17]。

2 无佐剂小鼠模型

关于食物过敏原的性质以及造成患者缺乏或丧失耐受性的机制信息仍然不足,因此研究人员对无佐剂致敏小鼠模型进行了深入研究。费巧玲等^[18]采用含有 OVA 的纱布贴于小鼠背部脱毛皮肤处,经皮肤成功建立小鼠肠道过敏模型。无佐剂经皮致敏建立的小鼠模型不仅能增加过敏原特异性 IgE 抗体的产生还能诱导肠道病理改变。小鼠肠道过敏模型表现为直肠温度下降、空肠毛细血管炎性渗透、肠黏膜出现轻度糜烂,固有层可见较多肥大细胞聚集、伴随细胞膜破裂、肠绒毛损伤,排列紊乱、断裂或缺失。除了通过皮肤致敏还有无佐剂口服增敏方法,首先采用不含佐剂的 80 mg 花生灌胃 C3H/HeJ 小鼠,两周后腹腔注射 30 mg 花生提取物腹腔注射,小鼠过敏反应表现为体温下降、血清中肥大细胞蛋白酶-1 (Mast cell protease 1, Mmcp1) 和花生特异性 IgE 表达升高。该模型提供了量化且客观的花生致敏指标,还原了人类食物过敏的方式,因为他们不需要用佐剂来塑造对食物的过敏性免疫反应^[19]。

3 转基因小鼠模型

随着科学研究的深入,基因学改变了我们对包括过敏疾病在内的大多数生物学领域的理解。转基因动物的出现有助于全面认识疾病的本质特点,并且逐渐成为研究人类疾病的发展规律和疾病防治机理的重要工具之一^[20-21]。本文主要探讨 *Was* 基因敲除小鼠、*Il4raF709* 小鼠和 *CNS1* 基因敲除小鼠三种基因工程小鼠。

3.1 *Was* 基因敲除小鼠

Snapper 等^[22]建立了 *Was* 基因敲除小鼠模型,并发现 *Was* 基因敲除小鼠与 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白 (Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP) 缺陷的患者在轻度血小板减少、淋巴细胞减少、缺陷性 T 细胞活化、肠道固有层炎性细胞浸润、结肠隐窝囊

肿等方面具有相同特征。Lexmond 等^[23]在特定食物致敏的不同背景下检测 *Was*^{-/-} 小鼠血清中 IgE, 结果发现,在 BALB/c 和 C57BL/6 背景下的动物对结肠炎具有抗性,表明结肠炎症不会引起对摄入抗原的致敏。多敏化是人类食物过敏的标志,可将 WASP 缺陷型小鼠模型来定义潜在的多敏化机制。因此,条件删除 FOXP3 + Treg 中的 *Was* 导致 Th2 型肠道炎症的食物过敏反应程度加重,相比于整体 WASP 缺乏小鼠模型更显著,与临床症状相似^[24],为研究 T 细胞活化缺陷的过敏反应提供良好的动物模型。

3.2 *Il4raF709* 小鼠

IL-4 和 IL-13 通过 IL-4 受体 α 链 (IL-4R α) 在过敏性疾病中起关键作用。通过采用苯丙氨酸替换 709 位的酪氨酸残基,诱变 IL-4R α 的抑制性 ITIM 基序失活建立 *Il4raF709* 小鼠^[25]。该模型破坏 Treg 的功能,促进 Treg 细胞向 Th2 分化及细胞因子 IL-4 的表达,形成 Th2 介导的过敏反应。经 OVA 致敏的 *Il4raF709* 小鼠出现过敏相关的临床症状,针对 OVA 特异性 IgE 增加,出现局部或全身性 Th2 介导过敏反应以及体温下降、腹泻等^[26-27]。病理组织观察发现该小鼠的小肠肥大细胞增殖和绒毛增生。*Il4raF709* 小鼠肠绒毛中粘膜肥大细胞数量较多,这个位置有利于与吸收食物蛋白相互作用,支持肠道肥大细胞扩增并驱动 IgE 依赖性过敏反应。

3.3 *CNS1* 基因敲除小鼠

粘膜界面的促炎和消炎机制之间的平衡与防止过敏、哮喘和肠道炎症相关的不良反应密切相关^[28]。调节性 T 细胞可防止粘膜界面特异性自身免疫和炎性病变。*CNS1* 基因敲除小鼠通过破坏 Treg 分化和功能促进对食物过敏原的致敏作用。非编码 DNA 序列 1 (*CNS1*) 在肠道相关淋巴组织中诱导 Treg 的产生中发挥重要作用。*CNS1* 基因敲除小鼠由于肠道抗原特异性 Treg 细胞的缺乏,胃肠道的免疫平衡可能受到损害。因此表现出体重下降、IL-4 表达增加,出现 Th2 型过敏反应^[29-30]。其中,*CNS1* 缺陷小鼠的血清抗体对小肠、大肠、胰腺与食物抗原具有反应性,整个胃肠道出现了不同程度的病变,如隐窝脓肿、胃炎、浆细胞肠炎等。

4 人源化食物过敏小鼠模型

人源化小鼠重建了人源免疫系统,能够更好的模拟人体免疫微环境,是研究免疫发病机制和疫苗开发的理想动物模型^[31-33]。人源化小鼠模型为食物过敏疾病提供可靠的医学研究。本文介绍常用于食物过敏疾病的人源化小鼠模型,人胸腺植入 NSG-SCF/GM-CSF/IL3 小鼠模型、肝和造血干细胞模型、人类免疫细胞或干细胞植入 NOD-sciD- $\gamma^{-/-}$ 小鼠和表达人免疫球蛋白 E 受体 (Fc ϵ RI) 小鼠模型,研究食物过敏在人体内免疫机制。

4.1 人胸腺、肝和造血干细胞植入 NSG-SCF/GM-CSF/IL3 小鼠模型

研究发现,将人胸腺、肝和造血干细胞植入 NSG-SCF/GM-CSF/IL3 小鼠后,人源化小鼠中人肥大细胞发育并产生于腹膜腔和周围组织,并启动具有包含人恒定区嵌合的 IgE 导致小鼠被动皮肤过敏反应 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) 及被动全身性过敏反应 (passive systemic anaphylaxis, PSA),用于研究人类 IgE 依赖性过敏反应^[34]。对 NSG-SCF/GM-CSF/IL3 小鼠组织染色,发现小鼠的肺和脾中都含有较多人肥大细胞的标志物 (人胰蛋白酶),该小鼠模型中的人类肥大细胞的表型与原代人肥大细胞相似,并表达 CD117、类胰蛋白酶和 Fc ϵ RI,所以 NSG-SCF/GM-CSF/IL3 小鼠模型独特的优势在于肥大细胞可以进行脱颗粒,且可在体外培养用于其他研究^[35]。

4.2 人类免疫细胞或干细胞植入 NOD-sciD- $\gamma^{-/-}$ 小鼠

NOD-sciD- $\gamma^{-/-}$ 小鼠的特点是非肥胖糖尿病 (non-obese diabetic, NOD),严重免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID),并且缺乏通用的 γ 链 (γ c; IL-2R γ) 功能。该小鼠没有小鼠 T 细胞和 B 细胞,缺乏残留的 NK 细胞活性,并且存在高植入人细胞的比率^[36-37]。Weigmann 等^[38] 通过腹腔注射来自过敏原供体的外周血单核细胞建立肠道炎症模型。在细胞转移后三周,对肠道进行口服过敏原激发,并采用高分辨率视频微型内窥镜系统监测肠道炎症以及组织,发现小鼠肠道粘膜增多,肠壁增厚肥大、炎症细胞浸润等肠道炎症病变。此模型

小鼠建模具有可靠性且重现性好等特点。

4.3 Fc ϵ RI 小鼠模型

人类食管树突状细胞和小肠固有层 Fc ϵ RI 是 IgE 的主要受体。Sallmann 等^[39] 建立了树突状细胞表面携带人的 Fc ϵ RI 的人源化小鼠,并采用 100 μ g OVA 腹腔致敏,研究发现来自 α -DC TG 小鼠的树突状细胞对 IgE 具有强烈的结合力,同时 Fc ϵ RI 依赖性增强以及体内发生了 T 细胞活化的过程。 α -DC TG 小鼠 OVA 特异性 T 细胞增殖与野生型相似,体内 DC 上 IgE 与 Fc ϵ RI 的结合诱导对 Ag 特异性记忆 T 细胞的增殖。Platzer 等^[40] 利用表达人 Fc ϵ RI 小鼠,连续两次腹膜注射 100 μ g OVA 致敏,隔日连续 3 ~ 6 次 50 mg OVA 灌胃,发现小鼠出现较高的致敏反应。小鼠肠部组织中肥大细胞特异性蛋白酶及数量、Th2 型细胞因子 (IL-4 和 IL-13) 和 DC 衍生的炎症介质迅速增加,其中肠和肠粘膜肥大细胞数量是用来评估食物过敏小鼠的组织炎症程度;同时在这些实验性食物过敏的小鼠模型中,可分析 IgE/Fc ϵ RI 结合对肠粘膜炎症反应。该模型为研究 IgE/Fc ϵ RI 介导的树突状细胞与过敏性炎症反应提供可靠小鼠模型。

5 结论

小鼠食物过敏模型可分为依赖佐剂模型、无佐剂模型、基因工程模型、人源化模型 (表 1)。比较目前可用的食物过敏模型只能部分地模拟食物过敏疾病的特征,不能完全反应临床特征。食物诱导和佐剂辅助的模型常用于研究食物过敏疾病,除了蛋白质本身的致敏性外,佐剂辅助也会影响蛋白质的免疫原性和过敏原性,此致敏方式较贴近实际生活中食物蛋白摄入的情况;人类 IgE 具有高度的物种特异性,并且不会交叉与啮齿动物受体反应,转基因小鼠模型不仅可用于研究某一基因的改变在食物过敏疾病的发生和发展的重要性,还可获得能够对人的 IgE 产生的过敏反应模型;人源化小鼠模型可以克服种族特异性,真实的模拟人类食物过敏,表现出更强的针对性,对免疫系统功能失调导致的疾病和新细胞亚群的发现及功能研究提供了很好的模型^[41]。这些小鼠模型为人类食物过敏发病机制、药物开发提供科学基础。

表 1 食物过敏小鼠模型

Table 1 Mouse model of food allergy

品系 Mouse strain	致敏 Sensitization	激发 Challenge	过敏表型 Allergy Phenotype	参考文献 Reference
佐剂辅助致敏 Adjuvant sensitization				
C3H/HeJ	10 mg CPE 和 20 μ g CT, 灌胃 10 mg CPE + 20 μ g CT, i.g.	200 mg CPE 和 20 μ g CT, 灌胃 200 mg CPE + 20 μ g CT, i.g.	腹泻、体温下降;花生特异 IgE 产生; 嗜酸性粒细胞增加、肥大细胞脱颗粒和血浆组胺释放。 Diarrhea, decreased body temperature. Peanut-specific IgE production. Increased eosinophils, mast cell degranulation, plasma histamine release.	[9]
BALB/c	100 μ g CPE 和 1 mg 氢氧化铝,腹腔注射 100 μ g CPE + 1 mg Alum, i.p.	200 μ g CPE,腹腔注射 200 μ g CPE, i.p.	抓痒、呼吸急促、腹泻; 肥大细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞升高; 血清中 IgE 水平增高。 Scratching, shortness of breath, diarrhea. Elevated mast cells, lymphocytes, and eosinophils. Increased serum IgE levels	[7]
BALB/c	20 μ g Prup 3 和 20 ng LPS,腹腔注射 20 μ g Prup 3 + 20 ng LPS, i.p.	100 μ g Prup 3, 腹腔注射 100 μ g Prup 3, i.p.	体温下降、呼吸频率增加、不爱活动; 特异性 IgE、IL-4 及 IFN- γ 的产生增加; 脾细胞中 IL-10 减少。 Temperature drop, inactivity, increased respiratory rates. Increased specific IgE, IL-4 and IFN- γ . Decreased IL-10 in splenocytes.	[10]
BALB/c	100 μ g OVA 和 10 mg SEB,灌胃 8 周 100 μ g OVA + 10 mg SEB, 8 weeks, i.g.	5 mg OVA,灌胃 5 mg OVA, i.g.	皮肤炎症;Th2 倾斜反应; Treg 数量减少,嗜酸性粒细胞增加; 空肠组织出现水肿;脾中 IFN- γ 产生增加; 血浆中 IgE 和组胺升高。 Skin inflammation. Th2 response, Treg count decreased, eosinophils increased. Edema in jejunum tissue. Increased IFN- γ production in splenocytes. Increased IgE and histamine in plasma.	[17]
无佐剂致敏 Free-adjuvant				
BALB/c	200 μ g OVA 和 100 μ L PBS,经皮致敏 200 μ g OVA + 100 μ L PBS, skin sensitization	50 mg OVA,灌胃 50 mg OVA, i.g.	腹泻、呼吸频率增加、抓挠、弓背; 血浆中 tIgE、Mmcp-1 升高; 直肠温度下降、空肠血管炎性渗透、肠粘膜轻度糜烂、肥大细胞聚集、胞膜破裂、肠绒毛损伤、排序紊乱。 Diarrhea, increased respiratory rate, scratching, arched back. Increased plasma tIgE and Mmcp-1. Rectal temperature drop, Intestinal vascular inflammatory infiltration, mild erosion of intestinal mucosa, mast cell aggregation, membrane rupture, intestinal villus damage, sorting disorders.	[18]
C3H/HeJ	1 $\times$ 80 mg CPE,灌胃 1 $\times$ 80 mg CPE, i.g.	1 $\times$ 30 mg CPE, 腹腔注射 1 $\times$ 30 mg CPE, i.p.	花生特异性 IgE;肥大细胞活化。 Peanut-specific IgE. Mast cell activation in the skin.	[19]
基因工程小鼠模型 Genetically engineered mouse model				
K5-rTA TetO-Tslp	阿霉素 0.01 mg/mL 和 10 μ g OVA,皮下注射 0.01 mg/mL Dox + 10 μ g OVA, s.c.	50 mg OVA,灌胃 50 mg OVA, i.g.	胃肠型过敏;空肠炎性细胞浸润;Mmcp-1 水平升高。 GI allergy. Jejunal inflammatory cell infiltration. Increased Mmcp-1 expression.	[42]
Was ^{-/-}	5 mg OVA,灌胃 5 mg OVA, i.g.	50 mg OVA,灌胃 50 mg OVA, i.g.	血清 IgE 和特异性 IgE 水平升高; Th2 型小肠炎症; 肥大细胞脱颗粒,缺陷性 T 细胞活化; 血小板、淋巴细胞减少, MLN 中 CD4 ⁺ T 细胞的增殖。 Increased serum IgE and specific IgE levels. Th2 small bowel inflammation. Mast cell degranulation, defective T cell activation. Platelet and lymphocyte reduction, proliferation of CD4 ⁺ T cells in MLN.	[23]

品系 Mouse strain	致敏 Sensitization	激发 Challenge	过敏表型 Allergy Phenotype	参考文献 Reference
Il4 α F709	5 mg OVA (和 20 mg CT), 灌胃 5 mg OVA + 20 mg CT, i.g.	150 mg OVA, 灌胃 150 mg OVA, i.g.	体温下降、腹泻; 肠道肥大细胞数量增加; IL-4、IgE 表达增加; STAT6 磷酸化增强。Temperature drop, diarrhea. Increased number of intestinal mast cells. Increased expression of IL-4 and IgE. Enhanced phosphorylation of STAT6.	[23]
CNS1 $^{-/-}$	—	—	体重下降; 胃肠道病理变化; 肺部炎症特征, 肠炎症; Th2 反应倾斜; IL-4、IL-5、IL-13 表达升高; GATA3 $^{+}$ 、CD4 $^{+}$ T 细胞数量增加; 特异性 IgE 和 IgA 水平升高。Weight loss. Gastrointestinal pathological changes. Pulmonary and intestinal inflammatory characteristics. Th2 reaction. IL-4, IL-5, IL-13 increased expression. Increased number of GATA3 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells. Increased specific IgE and IgA levels.	[29]
人源化小鼠模型 Humanized mouse model				
NOG IL-3/GM	植入人胸腺、肝和造血干细胞 Transfer of human thymus, liver and hematopoietic stem cells.	—	人总骨髓细胞 (CD33 $^{+}$), 粒细胞 (CD66b $^{+}$) 和单核细胞 (CD14 $^{+}$) 显著增加; 具有人嗜酸性粒细胞, 嗜碱性粒细胞, 嗜中性粒细胞和肥大细胞; 人胰蛋白酶表达升高。Significant increase in human total bone marrow cells (CD33 $^{+}$), granulocytes (CD66b $^{+}$) and monocytes (CD14 $^{+}$). With human eosinophils, basophils, neutrophils and mast cells. Increased expression of human trypsin.	[35]
NOD-sciD- $\gamma^{-/-}$	注射过敏性供体外周血与相对的过敏原 (20 μ g), 8 d 后过敏原增加 20 μ g Inject allergic donor PBMC and the opposite allergen (20 μ g), the allergen increased by 20 μ g after 8 days.	过敏原直肠注射 (20 μ g) 或口服 (50 μ g) Allergen rectal (20 μ g) injection or oral (50 μ g).	胃肠道炎症; 产生过敏原特异性 IgE; 特异性 T 细胞增殖和细胞因子产生。Gastrointestinal inflammation. Production of allergen-specific IgE. Specific T cell proliferation and cytokine production.	[38]
α -DC	—	100 μ g OVA 腹腔注射或表皮致敏 (4 周), OVA (4% w/v) 或桦树粉提取物 (1% w/v) 雾化两天 100 μ g OVA Intraperitoneal injection or epidermal sensitization (4 weeks), OVA (4% w/v) or birch powder extract (1% w/v) atomization for two consecutive days.	肠部组织中肥大细胞数量、Th2 型细胞因子、特异性蛋白酶表达增加; 脾、淋巴结等器官中树突状细胞增加; T 细胞刺激增强。Increased number of mast cells, Th2 cytokines, and specific proteases in intestinal tissue. Increased dendritic cells in spleen, lymph nodes and other organs. T cell stimulation increased.	[39]

参 考 文 献 (References)

- [1] Schülke S, Albrecht M. Mouse models for food allergies: Where do we stand? [J]. Cells, 2019, 8(6): 546.
- [2] Itazawa T, Adachi Y, Takahashi Y, et al. The severity of reaction after food challenges depends on the indication: A prospective multicenter study [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2020, 31(2): 167-174.
- [3] 赵新风, 曾本华, 谭毅, 等. 两品系小鼠食物过敏模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, (3): 35-39.
Zhao XF, Zeng BH, Tan Y, et al. Comparison of the BALB/C and Kunming mouse models of food allergy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 35-39.
- [4] Bai J, Hui J, Lu Q, et al. Effect of transglutaminase cross-linking on the allergenicity of tofu based on a BALB/c mouse model [J]. Food Funct, 2020, 11(1): 404-413.
- [5] Arumugam M, Ahrens R, Osterfeld H, et al. Increased susceptibility of 129SvEvBrd mice to IgE-Mast cell mediated anaphylaxis [J]. BMC Immunol, 2011, 12(1): 14.
- [6] Knippels LM, Penninks AH. Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(2 Suppl): 157-160.
- [7] Gonipeta B, Kim E, Gangur V. Mouse models of food allergy: how well do they simulate the human disorder? [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015, 55(3): 437-452.
- [8] 刘志刚, 杨成彬, 闫浩, 等. Balb/c 小鼠花生过敏模型的建立及发病机理 [J]. 深圳大学学报 (理工版), 2012, 29(2): 165-170.

- Liu ZG, Yang CB, Yan H, et al. Establishment and pathogenesis of mouse peanut allergy model [J]. J Shenzhen Uni (Science and Engineering), 2012, 29(2):165-170.
- [9] 曹冲, 张岱州, 刘宜辉, 等. 大鼠被动皮肤过敏试验两种佐剂选择的探讨[J]. 食品与药品, 2018, 20(4): 44-48.
- Cao C, Zhang DZ, Liu YH, et al. Discussion on two adjuvants for passive cutaneous anaphylaxis test in rats[J]. Food Drug, 2018, 20(4):278-282.
- [10] Song Y, Qu C, Srivastava K, et al. Food allergy herbal formula 2 protection against peanut anaphylactic reaction is via inhibition of mast cells and basophils[J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(6):1208-1217.
- [11] Rodriguez MJ, Aranda A, Fernandez TD, et al. LPS promotes Th2 dependent sensitisation leading to anaphylaxis in a Pru p 3 mouse model[J]. Sci Rep, 2017, 7:40449.
- [12] 吴群, 邵洁, 俞善昌, 等. 食物过敏动物模型中辅助性 T 淋巴细胞 1/辅助性 T 淋巴细胞 2 相关细胞因子变化[J]. 实用儿科临床杂志, 2007(21):1642-1643.
- Wu Q, Shao J, Yu SC, et al. Change of helper T lymphocyte cell 1/helper T lymphocyte cell 2 cytokine in food allergy animal model[J]. Chin J App Clin Ped, 2007(21):1642-1643, 1661.
- [13] Eisenbarth SC, Cassel S, Bottomly K. Understanding asthma pathogenesis: linking innate and adaptive immunity [J]. Curr Opin Pediatr, 2004, 16(6):659-666.
- [14] Zhang Y, Zhou X, Zhou B. DC-derived TSLP promotes Th2 polarization in LPS-primed allergic airway inflammation[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(7):1735-1743.
- [15] Gerhold K, Avagyan A, Reichert E, et al. Lipopolysaccharides modulate allergen-specific immune regulation in a murine model of mucosal tolerance induction [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2008, 147(1):25-34.
- [16] Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, et al. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: A new murine food allergy model[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(1): 231-238.
- [17] Forbes-Blom E, Camberis M, Prout M, et al. Staphylococcal-derived superantigen enhances peanut induced Th2 responses in the skin[J]. Clin Exp Allergy, 2012, 42(2): 305-314.
- [18] 费巧玲, 齐睿娟, 张小雨, 等. 经皮致敏小鼠肠道过敏模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 619-625.
- Fei QL, Qi RJ, Zhang XY, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of intestinal allergy by epicutaneous sensitization [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(5):619-625.
- [19] Proust B, Astier C, Jacquenet S, et al. A single oral sensitization to peanut without adjuvant leads to anaphylaxis in mice [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2008, 146(3): 212-218.
- [20] Miao J, Ying B, Li R, et al. Characterization of an N-Terminal non-core domain of RAG1 gene disrupted syrian hamster model generated by CRISPR Cas9[J]. Viruses, 2018, 10(5):243.
- [21] 潘赫, 谷奕诺, 左旭, 等. 转基因动物模型在哮喘疾病诊断中的应用展望[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(10): 1859-1861.
- Pan H, Gu YN, Zuo X, et al. Application prospect of Transgenic animal models in the diagnosis of asthma [J]. Chin J Lab Diagn, 2019, 23(10):1859-1861.
- [22] Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, et al. Wiskott-aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation[J]. Immunity, 1998, 9(1): 81-91.
- [23] Lexmond WS, Goettel JA, Lyons JJ, et al. FOXP3 + Tregs require WASP to restrain Th2-mediated food allergy [J]. J Clin Invest, 2016, 126(10):4030-4044.
- [24] Lexmond WS, Goettel JA, Sallis BF, et al. Spontaneous food allergy in Was ^{-/-} mice occurs independent of FcεRI-mediated mast cell activation[J]. Allergy, 2017, 72(12): 1916-1924.
- [25] Tachdjian R, Al Khatib S, Schwingishackl A, et al. In vivo regulation of the allergic response by the IL-4 receptor alpha chain immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(5):1128-1136.
- [26] Burton OT, Darling AR, Zhou JS, et al. Direct effects of IL-4 on mast cells drive their intestinal expansion and increase susceptibility to anaphylaxis in a murine model of food allergy [J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(4): 740-750.
- [27] Mathias CB, Hobson SA, Garcia-Lloret M, et al. IgE-mediated systemic anaphylaxis and impaired tolerance to food antigens in mice with enhanced IL-4 receptor signaling [J]. J Allergy Clin Immunol, 2011, 127(3):795-805.
- [28] Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease [J]. Nature, 2011, 474(7351): 298-306.
- [29] Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation [J]. Nature, 2012, 482(7385): 395-399.
- [30] Ye Z, Josefowicz S, Chaudhry A, et al. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate [J]. Nature, 2010, 463(7282): 808-812.
- [31] 任晓楠, 周晓辉. 用于肝脏疾病研究的人源化小鼠模型概述 [J]. 中国实验动物学报, 2014, (5): 95-99.
- Ren XN, Zhou XH. Humanized mouse models for Liver disease research: a review [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, (5):95-99.

- [32] 连晶瑶, 丁苗慧, 秦国慧, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 113–119.
Lian JY, Ding MH, Qin GH, et al. Research progress of humanized mouse models in immune system[J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(10): 113–119.
- [33] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 98–104.
Guo WW, Qiao TY, Zhang CQ, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 98–104.
- [34] Bryce PJ, Falahati R, Kenney L, et al. Humanized Mouse Model of Mast Cell-Mediated Passive Cutaneous Anaphylaxis and Passive Systemic Anaphylaxis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(3): 769–779.
- [35] Ito R, Takahashi T, Katano I, et al. Establishment of a human allergy model using human IL-3/GM-CSF-transgenic NOG mice [J]. J Immunol, 2013, 191(6): 2890–2899.
- [36] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells [J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6477–6489.
- [37] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: An excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. Blood, 2002, 100(9): 3175–3182.
- [38] Weigmann B, Schughart N, Wiebe C, et al. Allergen-induced IgE-dependent gut inflammation in a human PBMC-engrafted murine model of allergy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(4): 1126–1135.
- [39] Sallmann E, Reininger B, Brandt S, et al. High-affinity IgE receptors on dendritic cells exacerbate Th2-dependent inflammation [J]. J Immunol, 2011, 187(1): 164–171.
- [40] Platzer B, Baker K, Vera MP, et al. Dendritic cell-bound IgE functions to restrain allergic inflammation at mucosal sites [J]. Mucosal Immunol, 2015, 8(3): 516–532.
- [41] Fukasaku Y, Goto R, Ganchiku Y, et al. Novel immunological approach to assess donor reactivity of transplant recipients using a humanized mouse model [J]. Hum Immunol, 2020, S0198–S8859(19)31452–1
- [42] Han H, Xu W, Headley MB, et al. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma [J]. Mucosal Immunol, 2012, 5(3): 342–351.

[收稿日期] 2020-02-10

杨建伟,何树梅,樊红艳,等. 肿瘤坏死因子在斑马鱼-海分枝杆菌模型中的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 578-582.

Yang JW, He SM, Fan HY, et al. Research progress regarding the role of tumor necrosis factor in a zebrafish-mycobacterium marinum model[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 578-582.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.04.021

肿瘤坏死因子在斑马鱼-海分枝杆菌模型中的研究进展

杨建伟,何树梅*,樊红艳,刘红旭

(西藏民族大学基础医学院,陕西 咸阳 712082)

【摘要】 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)对于结核病的发生和控制是至关重要的。斑马鱼-海分枝杆菌模型是结核研究中应用的越来越多的模型,该模型能够帮助我们探讨 TNF 与巨噬细胞、肉芽肿、分枝杆菌三者之间的关系,更好地了解影响 TNF 生成的相关因素和其在结核病程中所发挥的作用。

【关键词】 结核病;肿瘤坏死因子;斑马鱼;海分枝杆菌;巨噬细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 04-0578-05

Research progress regarding the role of tumor necrosis factor in a zebrafish-mycobacterium marinum model

YANG Jianwei, HE Shumei*, FAN Hongyan, LIU Hongxu

(School of Basic Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China)

Corresponding author: HE Shumei. E-mail: 573447802@qq.com

【Abstract】 Tumor necrosis factor (TNF) is essential for the development and control of tuberculosis. The zebrafish-marine mycobacterium model is one of a growing number of models currently used in tuberculosis research. This model can help us to explore the relationship between TNF and macrophages, granuloma, or mycobacterium, so as to better understand the relevant factors affecting TNF production and the role of TNF in the course of tuberculosis.

【Keywords】 tuberculosis; tumor necrosis factor; zebrafish; Mycobacterium marinis; macrophage

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

结核病(tuberculosis)作为“死亡”和“消耗性疾病”的代名词,数百年来困扰着医生和科学家们,对于医疗水平高度发展的今天,结核病仍然危及着全世界人民的健康^[1]。对于结核病的预防和治疗,我们依旧依赖于唯一的疫苗——卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin Vaccine, BCG vaccine)并不能有效的预防结核病,几种结核病治疗药物存在着治疗周期长,容易耐药等缺点^[1]。再加上潜伏性结核病的

多发,使结核病的预防和治疗依旧是科学家们研究的难题。在2019年世界卫生组织发表的结核病报告中显示,2018年全世界范围内仍有约1000万人发病,并且这一数字在近几年保持稳定^[2]。出于结核病的严峻性,研究人员对它的研究从未停止,而在结核病中发挥重要作用的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)一直备受关注。肿瘤坏死因子正如它的名字一样,这是一种能使肿瘤细胞出血性

【基金项目】 西藏自治区自然科学基金(XZ2019ZR G-37(z))。

Funded by Natural Science Foundation of Xizang (Tibet) Autonomous Region (XZ2019ZR G-37(z))。

【作者简介】 杨建伟(1995—),男,硕士在读,主要从事高原相关疾病研究。Email: 945151689@qq.com

【通信作者】 何树梅,女,硕士,副教授,硕士研究生导师,主要从事机体免疫研究。Email: 573447802@qq.com

坏死的细胞因子,是一种强大的抗癌细胞因子,并且是调控炎症的主要细胞因子^[3]。除了感染分枝杆菌的巨噬细胞会产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 以外,T 淋巴细胞、CD4 和 CD8 细胞亚群、自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)等也参与了肿瘤坏死因子的产生^[4]。TNF 是控制结核病的关键因子,可以通过诱导巨噬细胞的其他免疫细胞的聚集形成肉芽肿发挥保护作用。TNF 拮抗剂治疗疾病将会导致结核病的再激活风险增加,并且 TNF 的中和会导致小鼠肉芽肿的组织紊乱,巨噬细胞发生溶解,表明 TNF 对于维持肉芽肿的结构是必不可少的^[5]。所以在结核进程中,TNF 是一种非常重要的细胞因子,研究 TNF 在结核病中的作用和机制能够更好的了解结核病。结核病的研究需要动物模型,对于一些常用的动物模型如鼠,某些非人类灵长类动物,受到成本和道德伦理的制约,并且老鼠复制人类病理能力也有局限性^[6]。近些年来,斑马鱼-海分枝杆菌模型走进人们的视线,越来越多的运用于结核病的研究。这是由于斑马鱼(*Danio rerio*, Zebrafish)幼鱼通体透明易于观察,特别是可以独立研究先天免疫与细菌感染,而海分枝杆菌(*Mycobacterium marinis*)作为感染性的致病菌,和结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)在感染宿主方面有着类似致病机理和毒力因子,同样可以存活于巨噬细胞内^[7]。基因组研究表明这两个物种之间有着密切的亲缘关系,因为它们有大约 3000 个同源基因,平均氨基酸同源率为 85%^[8]。传统的结核菌研究只能在生物安全三级实验室进行,而海分枝杆菌的主要宿主是鱼类和两栖类,对人的感染是机会型的,所以海分枝杆菌的研究可以在生物安全二级实验室进行。由于海分枝杆菌感染斑马鱼以后,同样会诱导受感染的巨噬细胞聚集,形成结核性肉芽肿^[9],能够很大程度上模拟人类结核病程。并且 Praveen 等^[10]研究发现鱼类与哺乳动物的 TNF- α 具有大致相同的基因同源性,并且生物学功能相似。所以应用这个模型去探究 TNF 在结核病中扮演的角色,可以很大程度上作为 TNF 与人类结核病作用的参照。TNF 的缺乏会导致人结核病发病几率增加,并且结核分支杆菌感染小鼠肉芽肿组织紊乱,结构破坏^[5],鉴于目前 TNF 信号在此过程中的作用尚不明确,因此需要对 TNF 在结核病及其模型中的作用进行综述,本文是对近些年来 TNF 在斑马鱼-海分枝杆菌模型上的研究进展进行综述。

1 在斑马鱼-海分枝杆菌模型中影响 TNF 分泌的因素

1.1 细菌因素

1.1.1 海分枝杆菌 SecA2 分泌位点对 TNF 的影响

细菌存在蛋白输送系统,可以将蛋白质从细胞质转运到细胞外,这一作用在细菌的生理和致病机制中发挥着重要作用。除了正常的 SecA 蛋白输送系统外,分枝杆菌还有一个蛋白分泌位点 SecA2,这是一种与运输相关的 ATP 酶^[11]。分枝杆菌 SecA2 蛋白分泌位点可以阻滞巨噬细胞吞噬小体的成熟,使细菌在巨噬细胞中得以继续生长^[12]。在斑马鱼模型中,Watkins 等^[13]使用缺乏 SecA2 分泌位点的海分枝杆菌注入斑马鱼后很快被清除,无法在斑马鱼体内寄生,证明海分枝杆菌上的 SecA2 分泌位点是其生长和生存所必须的。接下来使用缺乏 SecA2 分泌位点的海分枝杆菌研究 SecA2 分泌位点与 TNF- α 分泌间的关系,发现无论是在小鼠还是斑马鱼体内,缺乏 SecA2 分泌位点的菌株诱导生成的 TNF- α 量都低于正常菌株所诱导生成的 TNF- α 的量,并且实验后期发现正常菌株在斑马鱼体内诱导的 TNF- α 量是缺乏 SecA2 分泌位点菌株的 4 倍,虽然其中的机制尚不清楚,但是 SecA2 分泌位点明显在细菌感染后期增加了 TNF- α 的合成^[13]。

1.1.2 卡介苗接种对 TNF 生成的影响

TNF 的发现和卡介苗的关系很是紧密,TNF 最初是由于将脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)注射到接种过卡介苗的小鼠体内后,检测小鼠血清发现的一种可以使肿瘤组织或细胞坏死的细胞因子^[14]。一直以来,卡介苗作为唯一的结核病疫苗被广泛使用,但是接种卡介苗的人并不会不患结核病。使用斑马鱼-海分枝杆菌模型能很好的呈现接种卡介苗以后机体的变化。与人类一样,斑马鱼接种卡介苗以后并不能完全避免海分枝杆菌的感染,但是斑马鱼抵抗力明显增强,探究斑马鱼接种卡介苗后细胞因子的变化,发现卡介苗疫苗能够减少海分枝杆菌诱导的 TNF 表达,表明斑马鱼接种卡介苗会限制 TNF 的过度表达,有助于减少炎症^[15]。与斑马鱼中的发现相似,接种卡介苗的小鼠体内 TNF- α 显著降低,并且接种疫苗的小鼠体内分支杆菌数量明显减少,减轻了小鼠的肺部损害^[16]。

1.2 宿主因素

1.2.1 白三烯 A4 水解酶(Leukotriene A4 Hydrolase, LTA4H)对 TNF 的影响

白三烯水解酶是参与花生四烯酸代谢过程的一种酶,其作用是可以将 LTA₄ 转化为其另一种强效促炎物质 LTB₄^[17]。当斑马鱼感染海分枝杆菌时,无论 LTA₄H 的表达水平过高或者过低都会引起幼鱼对分枝杆菌感染的高敏感性,使分枝杆菌数量增多,这一反应经研究发现是与 TNF 表达相联系的^[18]。LTA₄H 缺乏的时候,TNF 会缺乏,表现为细菌的数量的增加,最后使得巨噬细胞裂解,可以通过加入 TNF 进行补充控制细菌生长,而 LTA₄H 量过高的时候 TNF 高表达,虽然细菌的量有所减少,但是巨噬细胞还是会坏死,能够使用敲除 TNF 基因的方法进行正常表达^[18]。除此之外,还可以通过抑制 LTA₄H 的生成降低 TNF 的表达进而控制炎症。在大鼠身上的研究发现,通过使用白三烯 A₄ 水解酶抑制剂,可以显著抑制 TNF 的生成^[19]。

1.2.2 糖酵解抑制剂对 TNF 生成的影响

当结核分枝杆菌感染宿主时,机体的先天免疫在对抗细菌的感染中发挥非常重要的作用,而巨噬细胞(macrophage)作为先天免疫中重要的一环,一些对巨噬细胞起作用的因素可能会影响巨噬细胞与分枝杆菌之间的作用。巨噬细胞受到结核分枝杆菌感染时会发生代谢转变,从氧化磷酸化转变为糖酵解,使巨噬细胞内分枝杆菌的存活受到限制^[20]。糖酵解对结核分枝杆菌的作用为结核辅助治疗提供了新的研究方向,接下来研究人员使用 2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-d-glucose, 2-DG)糖酵解抑制剂进一步研究相关机制。2-DG 作为一种葡萄糖类似物,可以抑制糖酵解,同时也是一种天然抗生素,已然发现它在治疗癌症、病毒感染、抗衰老、癫痫等相关疾病中有显著疗效^[21]。在 2-DG 预处理过的海分枝杆菌感染的斑马鱼模型中,海分枝杆菌的增长受到限制,使幼鱼得到保护性生长,并且这种作用与 TNF- α 相关,因为使用 2-DG 预处理后,斑马鱼体内 TNF- α 表达增加。与此相反的是,当斑马鱼被海分枝杆菌感染后再加入 2-DG 并不能阻止海分枝杆菌的增长^[22]。这与之前在小鼠模型中的研究一致,感染分枝杆菌的小鼠使用 2-DG 处理后,发现肺部细菌数量增加,并且在离体的小鼠肺部细胞中发现 TNF- α 分泌减少^[23]。总之,我们可以知道的是糖酵解对于结核感染来说具有双面性,2-DG 预处理可以增加 TNF- α 表达量,进而控制斑马鱼体内海分枝杆菌的增长。而当宿主感染分枝杆菌以后再阻断糖酵解,则会损伤宿主免疫能力,导致分枝杆菌的

增长。

2 TNF 与斑马鱼结核性肉芽肿之间的关系

结核分枝杆菌感染宿主发病会形成典型的肉芽肿病理结构。把海分枝杆菌注入斑马鱼体内,发现斑马鱼对这一细菌感染十分敏感,会在体内产生肉芽肿一样的病理结构,而且还能观察到发生干酪样坏死,与人类结核性肉芽肿很是相似^[24]。斑马鱼因为其幼鱼的通体透明性,能够很好的观察肉芽肿病理进展和研究它的形成机制。肉芽肿的形成需要巨噬细胞的参与,而巨噬细胞又与分枝杆菌存在紧密联系。Clay 等^[25]发现,在没有巨噬细胞的条件下,海分枝杆菌不能迁移到宿主其他组织,表明巨噬细胞介导了海分枝杆菌的体内迁移。而巨噬细胞对海分枝杆菌的这种运输能力并不需要 TNF 的参与,因为在敲除 TNF 受体的斑马鱼幼鱼中,巨噬细胞仍然能够携带海分枝杆菌进行跨膜运输^[26]。对于巨噬细胞来说,TNF 的作用是将那些没有被感染的巨噬细胞募集到感染初始部位和使已经感染的或者没有被感染的巨噬细胞聚集到一起^[27]。当分枝杆菌感染巨噬细胞时,巨噬细胞上的 TLR2 受体产生的肿瘤坏死因子,称之为 TNF- α ^[28]。由于 TNF 与巨噬细胞之间的紧密关系,而肉芽肿的形成主要是巨噬细胞和其他免疫细胞的聚集,那么 TNF 与肉芽肿间必然有着联系。Clay 等^[26]后期实验发现,在缺乏 TNF 信号的斑马鱼中,肉芽肿形成数量增多,体积增大,并且细菌的生长和体内传播加速,这是由于 TNF 信号缺乏导致肉芽肿破损或者单个巨噬细胞死亡加速释放胞内海分枝杆菌。类似的是,在 TNF 缺乏的小鼠体内,分枝杆菌增长速度加快,数量增多,而肉芽肿形成不受影响,只是形成延迟,结构紊乱^[5,29]。斑马鱼实验研究表明,肉芽肿的形成并不需要 TNF,而是通过抑制海分枝杆菌的生长和防止巨噬细胞死亡来维持肉芽肿的完整性,所以 TNF 对肉芽肿的维持至关重要^[26]。

3 TNF 介导的巨噬细胞的坏死

TNF 信号缺乏会导致巨噬细胞的坏死,而 TNF 表达过量也会对巨噬细胞有影响。研究发现,TNF 过多会使得活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加,刚开始时可以杀死斑马鱼体内海分枝杆菌,对机体有益,但随着 ROS 的增加,巨噬细胞会发生坏死,胞内细菌释放到胞外,对机体产生有害影

响^[30]。高 TNF 条件下的巨噬细胞坏死是通过 RIP1-RIP3 激酶途径介导的,该途径介导的坏死需要 ROS 的参与^[30]。细胞内的 ROS 主要是由线粒体生成的,线粒体的氧化损伤可以增加线粒体释放如细胞色素 c(cytc)这样的蛋白通过线粒体外膜透化作用进入细胞质,从而激活细胞的凋亡机制^[31]。所以感染结核分枝杆菌的巨噬细胞 RIP1-RIP3 激酶坏死途径需要线粒体产生 ROS 进行介导。高 TNF 除了在线粒体途径诱导坏死,还有别的途径。通过抑制组织蛋白酶 D, BID 和 BAX 蛋白, TNF 介导的感染巨噬细胞的坏死也被抑制,这个途径是由溶酶体介导的,溶酶体神经酰胺通过激活组织蛋白酶 D 导致 BID 激活进而激活 BAX 介导巨噬细胞的坏死^[32]。而 BAX 介导坏死的机制是通过 RyR 受体作用于内质网,促进 Ca^{2+} 从内质网进入线粒体,最终导致线粒体钙离子超载和坏死;而 TNF 诱导的线粒体 ROS 会使溶酶体活化,最后导致线粒体钙离子超载,这就让我们明白钙离子超载需要 TNF 的参与^[32]。TNF 仅在感染的巨噬细胞中诱导线粒体 ROS 的产生,而线粒体 ROS 会激活线粒体-溶酶体-内质网回路,导致线粒体钙离子超载和巨噬细胞坏死^[32],所以 ROS 将 TNF 和各细胞器介导的巨噬细胞坏死联系在了一起。关于 TNF 介导的细胞坏死很早之前就有在小鼠模型中的相关报道,斑马鱼模型中 TNF 介导的细胞坏死与小鼠模型中的发现是一致的,ROS 在坏死过程中扮演着重要角色,通过阻断 ROS 的生成,相关细胞的坏死也被抑制^[33]。斑马鱼结核模型在更细致的角度研究了 TNF 与巨噬细胞坏死之间的关系,还介绍了相关坏死途径及与细胞器之间的关系。我们还知道了钙离子超载对巨噬细胞坏死的重要性,通过使用钙离子拮抗剂去治疗 TNF 高表达的斑马鱼,发现 TNF 介导的巨噬细胞坏死和钙离子超载被抑制^[32]。鉴于钙离子拮抗剂发挥的重要作用,在未来结核病的辅助治疗中会有非常好的应用前景。

4 结论与展望

以上我们重点介绍了 TNF 在斑马鱼-海分枝杆菌模型上进行的研究及取得的成果,加深了我们对 TNF 在结核病程中扮演角色的理解, TNF 过高或者过低都会引起巨噬细胞的坏死,假如要把 TNF 作为结核的一个治疗靶点还需要更加深入的研究。要在之前的研究基础上结合斑马鱼模型的优势,可以

把 TNF 作为实验靶点,无论是结核治疗药物还是疫苗开发都可以利用斑马鱼模型结合对 TNF 的作用进行研究,比如目前应用 TNF 拮抗剂治疗疾病引起潜伏性结核的再激活病例屡见不鲜,可以利用斑马鱼建立潜伏性结核病研究模型,探究 TNF 拮抗剂激活潜伏性结核病的机制。目前已经有人将斑马鱼模型用于新药的开发,尽管还处于探索阶段,但是鉴于斑马鱼模型在结核研究和药物测试中所取得的重要进展,这个研究是非常有前景和价值的。对于还没被发现的可以影响 TNF 表达量的因素,可以通过斑马鱼模型进行验证。斑马鱼作为结核病研究模型是可行的,其养殖周期短,幼鱼通体透明可进行可视化观察,荧光探针技术,高内涵显微镜等都可用于斑马鱼的研究,并且遗传操作技术成熟,再加上海分枝杆菌与结核分支杆菌的类似致病机理和高基因组同源性,使用该模型进行结核病的研究,将为人类结核病的探索提供新的见解和思路。总之,通过斑马鱼-海分枝杆菌模型去研究 TNF,对于一些还未被发现的 TNF 观点,在之前的研究基础上一定会取得新的发现。

参 考 文 献 (References)

- [1] Ramakrishnan L. The zebrafish guide to tuberculosis immunity and treatment. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2013;78:179-192.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019[R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2019.
- [3] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2009,5(9): 361-371.
- [4] Dorhoi A, Kaufmann SH. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection[J]. Semin Immunol, 2014,26(3):203-209.
- [5] Chakravarty SD, Zhu G, Tsai MC, et al. Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs [J]. Infect Immun, 2008,76(3): 916-926.
- [6] Myllymäki H, Bäuerlein CA, Rämert M. The zebrafish breathes new life into the study of tuberculosis [J]. Front Immunol, 2016,7:196.
- [7] Tobin DM, Ramakrishnan L. Comparative pathogenesis of Mycobacterium marinum and Mycobacterium tuberculosis [J]. Cell Microbiol, 2008,10(5):1027-1039.
- [8] Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, et al. Insights from the complete genome sequence of Mycobacterium marinum on the evolution of Mycobacterium tuberculosis [J]. Genome Res, 2008,18(5):729-741.
- [9] Gomes MC, Mostowy S. The case for modeling human infection in zebrafish [J]. Trends Microbiol, 2020, 28(1):10-18.

- [10] Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor- α in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity[J]. Mol Immunol, 2006,43(3):279-291.
- [11] Braunstein M, Bensing BA, Sullam PM. The two distinct types of secA2-dependent export systems [J]. Microbiol Spectr, 2019;7(3):10.1128/microbiolspec.PSIB-0025-2018.
- [12] Sullivan JT, Young EF, McCann JR, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages [J]. Infect Immun, 2012, 80(3):996-1006.
- [13] Watkins BY, Joshi SA, Ball DA, et al. *Mycobacterium marinum* SecA2 promotes stable granulomas and induces tumor necrosis factor α in vivo [J]. Infect Immun, 2012, 80(10):3512-3520.
- [14] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975,72(9):3666-3670.
- [15] Oksanen KE, Myllymäki H, Ahava MJ, et al. DNA vaccination boosts *Bacillus Calmette-Guérin* protection against mycobacterial infection in zebrafish [J]. Dev Comp Immunol, 2016,54(1):89-96.
- [16] Li W, Huang H, Hua W, et al. Neonatal revaccination with *Bacillus Calmette-Guérin* elicits improved, early protection against *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. Vaccine, 2012;30(21):3223-3230.
- [17] Tobin DM, Vary JC Jr, Ray JP, et al. The *lta4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans [J]. Cell, 2010,140(5):717-730.
- [18] Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections [J]. Cell, 2012,148(3):434-446.
- [19] Whittle BJ, Varga C, Berko A, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase [J]. Br J Pharmacol, 2008,153(5):983-991.
- [20] Gleeson LE, Sheedy FJ, Pálsson-McDermott EM, et al. Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* induces aerobic glycolysis in human alveolar macrophages that is required for control of intracellular bacillary replication [J]. J Immunol, 2016,196(6):2444-2449.
- [21] Xi H, Kurtoglu M, Lampidis TJ. The wonders of 2-deoxy-D-glucose [J]. IUBMB Life, 2014, 66(2):110-121.
- [22] Kan Y, Meng L, Xie L, et al. Temporal modulation of host aerobic glycolysis determines the outcome of *Mycobacterium marinum* infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 96: 78-85.
- [23] Huang L, Nazarova EV, Tan S, et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis in vivo* segregates with host macrophage metabolism and ontogeny [J]. J Exp Med, 2018,215(4):1135-1152.
- [24] Swaim LE, Connolly LE, Volkman HE, et al. *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity [J]. Infect Immun, 2006,74(11):6108-6117.
- [25] Clay H, Davis JM, Beery D, et al. Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish [J]. Cell Host Microbe, 2007,2(1):29-39.
- [26] Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death [J]. Immunity, 2008,29(2):283-294.
- [27] Miller EA, Ernst JD. Illuminating the black box of TNF action in tuberculous granulomas [J]. Immunity, 2008,29(2):175-177.
- [28] Inoue M, Niki M, Ozeki Y, et al. High-density lipoprotein suppresses tumor necrosis factor α production by mycobacteria-infected human macrophages [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):6736.
- [29] Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. Immunity, 1995,2(6):561-572.
- [30] Roca FJ, Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to *Mycobacteria* through mitochondrial reactive oxygen species [J]. Cell, 2013,153(3):521-534.
- [31] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. Biochem J, 2009,417(1):1-13.
- [32] Roca FJ, Whitworth LJ, Redmond S, et al. TNF induces pathogenic programmed macrophage necrosis in tuberculosis through a mitochondrial-lysosomal-endoplasmic reticulum circuit [J]. Cell, 2019,178(6):1344-1361.
- [33] Lin Y, Choksi S, Shen HM, et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation [J]. J Biol Chem, 2004,279(11):10822-10828.

[收稿日期] 2020-03-25