

龚姗,李弘,刘叶倩,等. 复方七芍降压片对 TNF- $\alpha$  诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 733-741.

Gong S, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factors, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$  and co-cultured with smooth muscle cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 733-741.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.001

# 复方七芍降压片对 TNF- $\alpha$ 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响

龚姗<sup>1</sup>, 李弘<sup>1</sup>, 刘叶倩<sup>1</sup>, 陈春茗<sup>1</sup>, 马丹凤<sup>2</sup>, 刘林<sup>1</sup>, 任卫琼<sup>1\*</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南省儿童医院, 长沙 410006)

**【摘要】** 目的 观察复方七芍降压片对 TNF- $\alpha$  诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达情况, 探讨复方七芍降压片抑制血管重塑的作用机制。方法 利用炎症因子 TNF- $\alpha$  联合血管内皮细胞和血管平滑肌细胞共培养体系构建高血压炎症环境。将其培养好的细胞随机分为 7 组, 即正常对照组(A)、模型组(B)、空白血清对照组(C)、MRS2578 组(D)、厄贝沙坦片含药血清组(E)、复方七芍降压片含药血清组(F)、MRS2578 + 复方七芍降压片含药血清组(G)。除正常对照组外, 其余各组加入炎症因子 TNF- $\alpha$ , 浓度 10 ng/mL; 厄贝沙坦片含药血清组、复方七芍降压片含药血清组和 MRS2578 + 复方七芍降压片含药血清组加入 10% 的含药血清; MRS2578 组与 MRS2578 + 复方七芍降压片含药血清组加入 10  $\mu$ m 的 P2Y6 受体阻断剂 MRS2578; 造模与给药干预 24 h 后, 采用 CCK8 法检测内皮细胞及平滑肌细胞的存活率; 采用 ELISA 法检测培养基上清液中炎症因子 IL-8 的水平; 采用免疫荧光、Western Blot、实时荧光定量法 (qPCR) 技术检测内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的表达。**结果** 与正常对照组比较, 模型组和空白血清对照组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ), IL-8 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ), 内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的荧光强度值、灰度值比值、mRNA 水平均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 复方七芍降压片含药血清组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显升高 ( $P < 0.01$ ), IL-8 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值、灰度值比值、mRNA 水平均明显降低 ( $P < 0.01$ )。**结论** 复方七芍降压片能够改善因炎症因子 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞及平滑肌细胞的存活率, 降低 AP-1 和 MCP-1 的活性, 抑制内皮细胞炎症反应, 改善内皮损伤, 保护平滑肌细胞正常功能。

**【关键词】** 炎症; AP-1; MCP-1; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 复方七芍降压片

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0733-09

## Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factors, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$ and co-cultured with smooth muscle cells

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (81473616), 国家自然科学基金青年基金项目 (81804077), 湖南省中医药管理局重点项目 (201910), 湖南省科技厅项目 (2018SK51203), 中医内科重大疾病防治及转化教育部重点实验室开放基金 (ZYNK201703), 国家科技部重大专项 (2019ZX09301-103), 湖南省自然科学基金 (青年基金) 项目 (2019JJ50468)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81473616), National Natural Science Foundation for the Youth (81804077), Hunan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Key Project (201910), Hunan Science and Technology Department Project (2018SK51203), the Open Fund of the Key Laboratory of the Ministry of Education of the People's Republic of China (ZYNK201703), Major Project of the Ministry of Science and Technology (2019ZX09301-103), Hunan Natural Science Foundation for the Youth (2019JJ50468).

**【作者简介】** 龚姗 (1988—), 女, 药师, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病的中医药防治。Email: 564291733@qq.com

**【通信作者】** 任卫琼 (1975—), 女, 博士, 副主任药师, 研究方向: 心血管疾病的中医药防治。Email: renweiqiong1@126.com

GONG Shan<sup>1</sup>, LI Hong<sup>1</sup>, LIU Yeqian<sup>1</sup>, CHEN Chunming<sup>1</sup>, MA Danfeng<sup>2</sup>, LIU Lin<sup>1</sup>, REN Weiqiong<sup>1\*</sup>

(1. the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China.

2. Hunan Children's Hospital, Changsha 410006)

Corresponding author: REN Weiqiong. E-mail:renweiqiong1@126.com

**[Abstract] Objective** To observe the expression levels of inflammatory factors, AP-1, and MCP-1 in TNF- $\alpha$ -stimulated vascular endothelial cells and co-cultured with smooth muscle cells following treatment with the compound Qishao Jiangya tablet, and explore the mechanism by which the compound Qishao Jiangya tablet inhibits vascular remodeling. **Methods** A co-culture system was established using vascular endothelial cells and smooth muscle cells. Stimulation with TNF- $\alpha$  was used to mimic the hypertensive inflammatory environment. The cultured cells were randomly divided into seven groups: normal control, model, blank serum control, MRS2578, irbesartan tablet drug-containing serum, compound Qishao Jiangya tablet-containing serum, and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet-containing serum. Except the normal control group, all groups were stimulated with 10 ng/mL TNF- $\alpha$ ; the irbesartan tablet drug-containing serum, compound Qishao Jiangya tablet-containing serum, and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet-containing serum were treated with 10% drug-containing serum; the MRS2578 and MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet drug-containing serum groups were treated with 10  $\mu$ m P2Y6 receptor blocker MRS2578. After 24 hours of modeling and drug intervention, CCK8 assays were used to detect the survival rates of endothelial cells and smooth muscle cells. ELISA was used to detect the level of IL-8 in the culture supernatant. Immunofluorescence, Western Blot, and quantitative PCR were used to detect endothelial expression levels of AP-1 and MCP-1. **Results** Compared with the normal control group, the survival rates of smooth muscle and endothelial cells decreased significantly in the model and blank serum control groups, while the levels of IL-8 were significantly higher ( $P < 0.01$ ). Compared with the normal control group, AP-1 and MCP-1 in endothelial cells in the model and blank serum control groups were detected by fluorescence intensity value of immunofluorescence, gray value ratio by Western Blot, and mRNA levels by quantitative PCR were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the survival rates of smooth muscle and endothelial cells were significantly increased in the compound Qishao Jiangya tablet-containing serum groups, while the levels of IL-8 were significantly lower ( $P < 0.05$ ). AP-1 and MCP-1 in endothelial cells were detected by fluorescence intensity value of immunofluorescence, gray value ratio by Western blotting, and mRNA levels by quantitative PCR in the compound Qishao Jiangya tablet-containing serum groups were significantly reduced compared with the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Following stimulation with TNF- $\alpha$ , the compound Qishao Jiangya tablet can improve the survival rates of endothelial cells and smooth muscle cells, reduce the levels of AP-1 and MCP-1, prevent endothelial cell inflammation, improve endothelial damage, and protect normal function of smooth muscle cells.

**[Keywords]** inflammation; AP-1; MCP-1; endothelial cell; smooth muscle cell; compound Qishao Jiangya tablet

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

高血压是心血管疾病的独立危险因素之一,每年全球因高血压死亡人数约有 900 多万<sup>[1]</sup>,严重危害人类身体健康。血管重塑是许多血管疾病共同的关键病理环节<sup>[2]</sup>,也是高血压靶器官损害的病理基础和导致其他心血管疾病发生引起死亡的重要原因<sup>[3]</sup>。

高血压是一种慢性炎症性疾病,随着病程的发展,血管的切应力增加,更多的炎症因子会损伤内皮细胞,导致血管舒张功能降低,进一步促进血管内皮细胞的炎性损伤,引起平滑肌细胞的增殖、迁移,导致组织纤维化而出现血管结构的改变<sup>[4-5]</sup>。激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)是细胞内一类

转录激活因子,能够诱导调控多种炎症因子的释放,加速内皮损伤,促进平滑肌细胞增殖和分泌,参与血管重塑<sup>[6-7]</sup>。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是炎性反应重要的趋化因子,机体发生炎症时,导致血管内皮细胞受损, MCP-1 大量分泌,促进血管内皮修复及血管新生<sup>[8]</sup>。因此,以内皮细胞炎症反应为切入点研究高血压病血管重塑的发生机制具有重要意义。针对高血压“虚、瘀、风”的病机,我们采用养阴柔肝、化痰息风立法的复方七芍降压片治疗“肝肾阴虚、阴虚阳亢”型高血压。前期研究发现复方七芍降压片能降低患者血压<sup>[9]</sup>,有效降低原发性高血压大鼠

(spontaneous hypertension rat, SHR) 肠系膜动脉上血管重塑标志物活性和炎症因子表达, 改善血管重塑<sup>[10-11]</sup>, 但是否与调控内皮细胞 AP-1、MCP-1 蛋白表达, 影响内皮细胞炎症反应, 调节平滑肌细胞增殖有关, 尚不清楚。因此, 本实验利用炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 诱导内皮细胞与平滑肌细胞共培养体系模拟高血压炎症环境, 观察复方七芍降压片对内皮细胞炎症因子和 AP-1、MCP-1 的影响及其与血管平滑肌细胞损伤相关性, 并在此基础上探讨复方七芍降压片的干预机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

15 只 3 ~ 4 月龄的 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 230 ~ 250 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2016-0002】, 室温 22℃、湿度 50%, 12 h 光照/黑暗循环。实验动物伦理审批号(ZYFY2018112503), 由湖南省科技厅实验动物管理办公室审批实验动物环境设施合格证号【SYXK(湘)2015-0003】。

#### 1.1.2 细胞

原代大鼠血管平滑肌细胞株和内皮细胞株均购于 Procell 公司。

#### 1.2.3 主要试剂与仪器

复方七芍降压片(批号: 20181026, 规格: 每片 0.46 g), 人临床日用量为 12 片, 相当于生药量 97 g, 购自湖南中医药大学第一附属医院制剂室。厄贝沙坦片(批号: 17122111, 规格: 每片 75 mg), 人临床日用量为 300 mg, 购自扬子江药业集团北京海燕药业有限公司。

TNF- $\alpha$  购自美国 eprotech 公司, 批号: 101373A2918, P2Y6 受体阻断剂 MRS2578 购自美国 selleck 公司, 批号: S285501, IL-8 ELISA 检测试剂盒购自上海晶天生物科技有限公司, 批号: 20190305, AP-1 一抗、MCP-1 一抗、 $\beta$ -actin 内参抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为: AI03113818、AB05105689、AH11286487。

MK3 型酶标仪(雷勃, 芬兰), 电泳仪(BIO-RAD, mini protean 3 cell, 美国), 离心机(Eppendorf, Centrifuge 5424 R 型, 德国), 冰箱(Haier, BCD-196TMZL 型, 中国), 全自动化学发光分析(上海天

能科技有限公司, Tanon-5200 型), 实验室超纯水(MilliPORE, ULUPURE 型, 法国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 含药血清及对照血清的制备

SPF 级雄性 SD 大鼠 15 只, 根据体重随机分为 3 组, 即空白对照组(5 只)、厄贝沙坦片组(5 只)、复方七芍降压片组(5 只)。分别按临床等效剂量临床成人常用剂量 3 倍给予等体积蒸馏水、厄贝沙坦片(0.081 g/kg)和复方七芍降压片(1.50 g/kg), 灌胃。每天 2 次, 连续给药 7 次。末次给药后 2 h, 腹主动脉取血于血清管中, 离心 10 min(4500 r/min), 取上清液, 水浴灭活(56℃, 30 min), 置于-80℃冰箱保存备用。

#### 1.2.2 细胞培养

将原代内皮细胞和平滑肌细胞分别于专用培养液(条件: 5% CO<sub>2</sub>, 37℃)中传代培养, 取对数生长期细胞用于后续实验。

#### 1.2.3 共培养体系的建立

按细胞常规方法培养, 将内皮细胞消化后接种至康宁 24 孔细胞培养板中, 处于对数生长期的平滑肌细胞消化后接种至康宁 Transwell 小室内侧, 置于细胞培养箱内(条件: 5% CO<sub>2</sub>, 37℃), 培养 1~2 d 后, 即可成功构建内皮细胞和平滑肌细胞共培养体系<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.4 分组及给药

将共培养好的细胞随机分为 7 组, 即正常对照组(A): 内皮细胞 + 平滑肌细胞; 模型组(B): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞; 空白血清对照组(C): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 空白血清; MRS2578 组(D): 炎症因子 + 沉默内皮细胞 + 平滑肌细胞; 厄贝沙坦片含药血清组(E): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 厄贝沙坦片血清; 复方七芍降压片含药血清组(F): 炎症因子 + 内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 复方七芍降压片血清; MRS2578 + 复方七芍降压片含药血清组(G): 炎症因子 + 沉默内皮细胞 + 平滑肌细胞 + 复方七芍降压片血清。除 A 组外的共培养体系中加入 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$ , 构建模拟高血压炎症微环境, 给药组加入 10% 的含药血清, 其余各组加入等量空白血清, 沉默内皮细胞为加入 10  $\mu$ m 的 MRS2578 的内皮细胞, 造模及给药干预 24 h 后进行相关指标检测。

#### 1.2.5 细胞活力检测

采用 CCK-8 法检测各组平滑肌细胞及内皮细

胞活性。弃孔内液体,然后加入完全培养基 200  $\mu\text{L}$ ,同时每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK8 溶液,于细胞培养箱中继续培养 3 h,最后用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔 OD 值,扣除板底值,并计算各组细胞的相对存活率。其中细胞存活率 = 给药组细胞存活率/正常组细胞存活率。

1.2.6 酶联免疫吸附剂测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中炎症因子 IL-8 的水平

收集平滑肌细胞与内皮细胞共培养上清液,离心 15 min (3000 r/min),取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书,检测共培养体系中培养液中 IL-8 水平。

1.2.7 免疫荧光法检测内皮细胞中 MCP-1、AP-1 的蛋白表达

将共培养后的各组细胞,移去 Transwell 小室及孔内液体,冷 PBS 润洗,多聚甲醛固定 30 min。用 0.25% Triton-100 通透 15 min,滴加 5% BSA 封闭 10 min,根据 1:100 的体积比分别加入 AP-1、MCP-1 一抗稀释液,4 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育,PBS 润洗。根据 1:400 的体积比加入二抗稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min,冷 PBS 润洗 4 次。滴加 DAPI 避光孵育 15 min,PBS 润洗 4 次。荧光检测并采集图像,并记录细胞平均荧光强度值。

1.2.8 蛋白免疫印迹法 (Western Blot) 检测内皮细胞中 MCP-1、AP-1 的蛋白表达

严格按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书操作,根据标准曲线求出每个样本的蛋白浓度。提取各组细胞蛋白,100 $^{\circ}\text{C}$  变性后,SDS-PAGE 电泳后采用湿转转膜,用含 5% 脱脂奶粉在室温封闭 2 h。一抗孵育 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜,PBST 洗涤 5 min,3 次。二抗孵育,PBST 洗涤 5 min,3 次。取 ECL 发光液与膜的正面充分接触进行化学发光,置于全自动化学发光分析仪中曝光,通过 TANON GIS 软件读取相关蛋白的条带灰度值。

1.2.9 实时荧光定量法 (qPCR) 检测内皮细胞中 AP-1、MCP-1 mRNA 的表达

加入适量 TRIzol 试剂,离心 12 000 rpm,5 min,取上清液加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿溶液,剧烈振荡 15 s 后离心,取上清液,加入等体积的异丙醇溶液以沉淀其中的 RNA,待 RNA 沉淀干燥后加入 RNase-free 溶液反复吹打使其完全溶解。按试剂盒说明书操作,逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应。通过 Primer 5.0

软件设计引物,引物序列见表 1。

表 1 PCR 各基因引物序列

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
AP-1	Forward: CAGCCGCCGACCACTTG
	Reverse: TCCGCTCTGAGACTCCATGTC
MCP-1	Forward: GCAGGTCTCTGTGACGCTTCTG
	Reverse: GTTCTCCAGCCGACTCATTGGG
$\beta$ -actin	Forward: CCCAGGCATTGCTGACAGGATG
	Reverse: TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG

### 1.3 统计学分析

运用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。各组实验数据均用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异具显著性。

## 2 结果

### 2.1 对内皮细胞及平滑肌细胞活力的影响

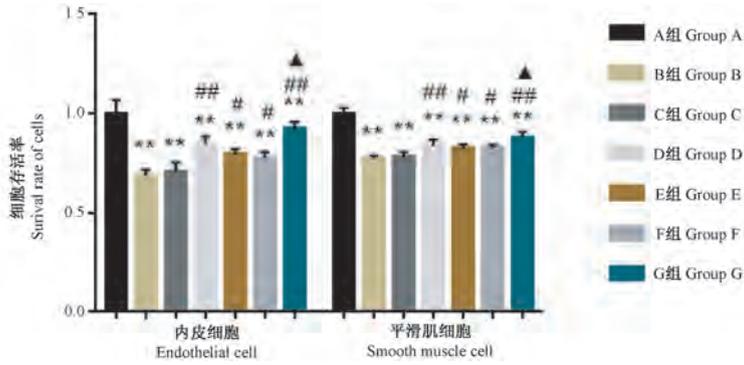
与 A 比,B 组和 C 组内皮细胞及平滑肌细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ),表明 TNF- $\alpha$  介导的炎症微环境对细胞具有一定的损伤作用;与 B 组比,D 组、E 组、F 组以及 G 组中的内皮细胞及平滑肌细胞存活率不同程度增加 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与 D 组比,G 组内皮细胞及平滑肌细胞存活率增加 ( $P < 0.05$ )。MRS2578 和复方七芍降压片含药血清均能明显恢复炎症微环境损伤后的内皮细胞及平滑肌细胞活性 (见图 1)。

### 2.2 对平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中炎症因子 IL-8 水平的影响

与 A 组比,B 组和 C 组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中 IL-8 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ),表明 TNF- $\alpha$  干预构建炎症微环境后会造成炎症因子 IL-8 分泌增加;与 B 组比,D、E、F、G 组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中 IL-8 水平不同程度降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );与 D 组比,G 组 IL-8 水平降低,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。MRS2578 和复方七芍降压片含药血清均能抑制炎症微环境损伤后炎症因子 IL-8 分泌增加 (见图 2)。

### 2.3 对内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响

免疫荧光结果显示:与 A 组比,B、C 组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值明显升高 ( $P < 0.01$ );与 B 组比,D、E、F、G 组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 D 组比,G 组 AP-1、MCP-1 蛋白荧光强度值降低,但



注:A组:正常对照组;B组:模型组;C组:空白血清对照组;D组:MRS2578组;E组:厄贝沙坦含药血清组;F组:复方七苜降压片含药血清组;G组:MRS2578+复方七苜降压片含药血清组。与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ;与MRS2578组比较,^ $P < 0.05$ ,^^ $P < 0.01$ 。(下同)

图1 各组内皮细胞及平滑肌细胞活力比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. Group A. Normal control group. Group B. Model group. Group C. Blank serum control group. Group D. MRS2578 group. Group E. Irbesartan tablet drug-containing serum group. Group F. Compound Qishao Jiangya tablet containing serum group. Group G. MRS2578 + compound Qishao Jiangya tablet containing serum group. Compared with the normal control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . Compared with the model group,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ . Compared with MRS2578 group,^ $P < 0.05$ ,^^ $P < 0.01$ .(The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of the viability of endothelial cells and smooth muscle cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。复方七苜降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白的表达水平,且与MRS2578合用时,这种抑制程度更加明显(见图3、4)。

Western Blot结果显示:与A组相比,B、C组内皮细胞中AP-1、MCP-1光密度比值明显升高( $P < 0.01$ )。与B组比较,D、E、F、G组内皮细胞中AP-1、MCP-1光密度比值均明显降低( $P < 0.01$ )。与D组比较,G组AP-1、MCP-1光密度比值明显降低( $P < 0.01$ )。复方七苜降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白的高表达,且与MRS2578合用时,作用更加明显(见图5、6)。

### 2.4 对内皮细胞中AP-1、MCP-1 mRNA的影响

qPCR结果显示:与A组比,B、C组内皮细胞中AP-1、MCP-1 mRNA表达水平均明显升高( $P < 0.01$ )。与B组比较,D、E、F、G组内皮细胞中

AP-1、MCP-1 mRNA表达水平均明显降低( $P < 0.01$ )。与D组比较,G组AP-1、MCP-1 mRNA表达水平降低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。复方七苜降压片能够抑制炎症因子诱导的内皮细胞中AP-1、MCP-1 mRNA的表达水平(见图7)。

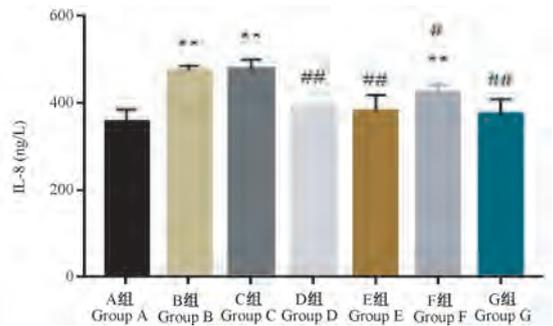


图2 各组平滑肌细胞与内皮细胞共培养液中IL-8水平比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 2 Comparison of IL-8 levels in co-culture medium of smooth muscle cells and endothelial cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

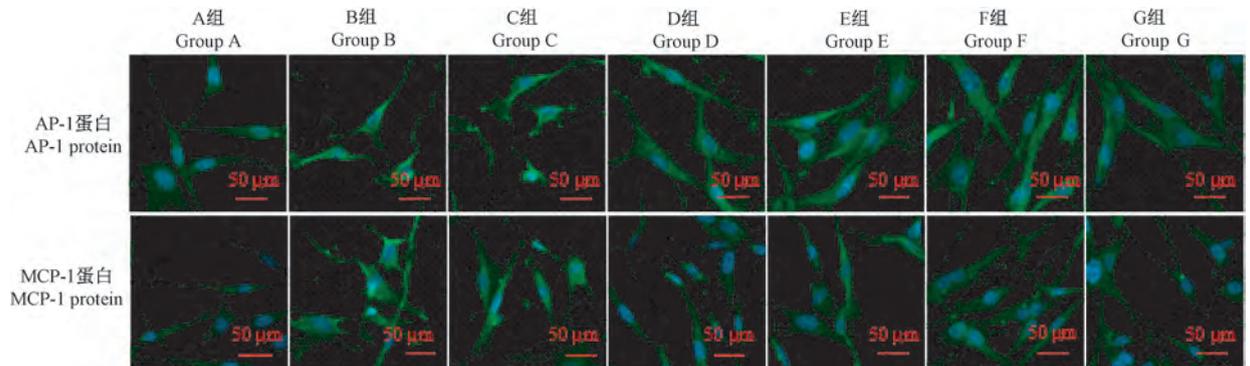


图3 各组内皮细胞中AP-1、MCP-1蛋白表达比较

Figure 3 Comparison of AP-1、MCP-1 protein expression in each group of endothelial cells

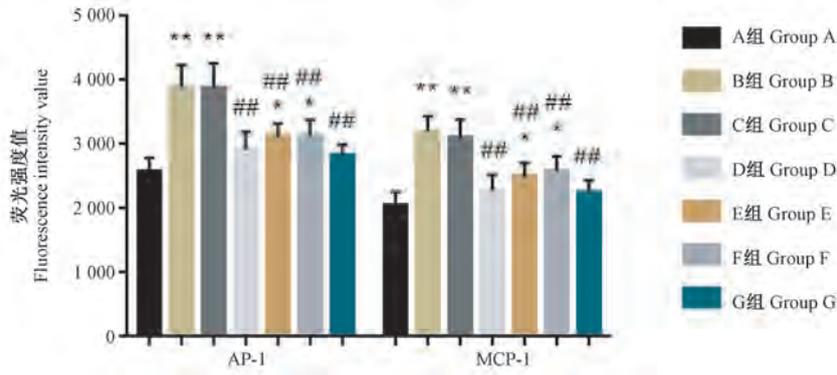


图 4 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 荧光强度值比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 4 Comparison of the fluorescence intensity value of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

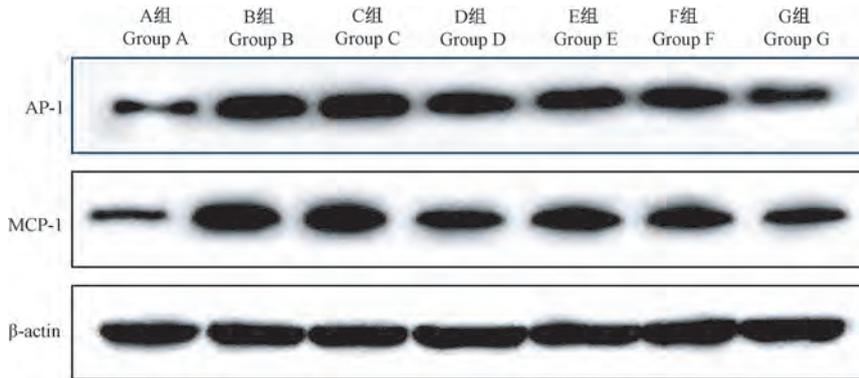


图 5 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达比较

Figure 5 Comparison of AP-1、MCP-1 protein expression in each group of endothelial cells

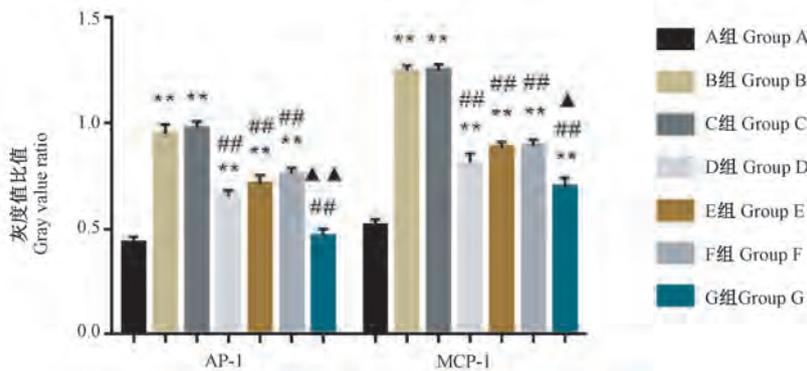


图 6 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 灰度值比值比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 6 Comparison of the gray value ratio of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

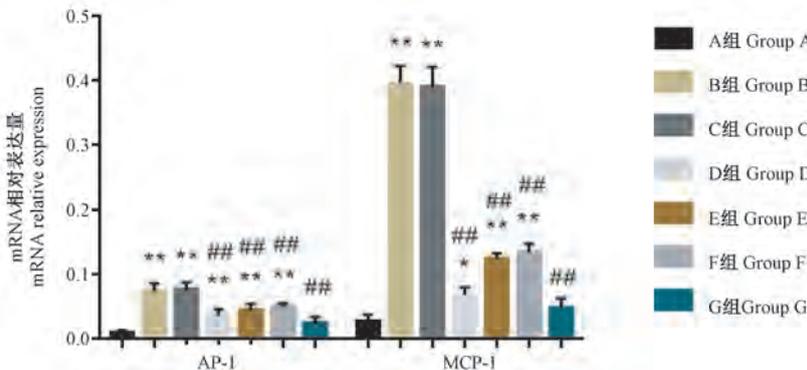


图 7 各组内皮细胞中 AP-1、MCP-1 mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 7 Comparison of the mRNA levels of AP-1 and MCP-1 in each group of endothelial cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

复方七芍降压片是根据高血压病“肝肾阴虚、瘀血阻络”的发病特点,采用“养阴柔肝、化痰息风”的立法组方而成。该方由三七、白芍、天麻、杜仲、丹参等 11 味中药组成。方中三七活血化痰通络、白芍养阴柔肝息风,共为君药;天麻平肝息风、桑寄生、杜仲补益肝肾、丹参活血祛瘀,共为臣药;芫花木平肝清热、葛根生津活血、地龙息风通络、炒香附理气疏肝,共为佐药;甘草为使,调和诸药;以上诸药合用使阴虚得补,阳亢得平,脉络得畅,髓海得濡、清窍得养、眩晕自止。现代药理研究发现:三七、天麻、丹参都具有扩张血管、减少外周血管阻力、增加血流量起到降低血压的作用<sup>[13-15]</sup>,白芍、杜仲能降低内皮素-1(endothelin-1, ET-1)和增加一氧化氮(nitric oxide, NO)浓度,改善内皮功能,调节血管重构,降低血压<sup>[16-17]</sup>。

血管平滑肌细胞和内皮细胞是血管中的两个重要组成成分,两种细胞之间存在肌内皮缝隙连接,允许电和小分子物质传递,在调节血管收缩和舒张功能中起重要作用<sup>[18]</sup>。内皮功能的损伤是发生血管重塑的始动环节<sup>[19]</sup>,在炎症因子 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞中,细胞存活率降低,凋亡细胞增多,内皮细胞大量分泌白介素 6(interleukin-6, IL-6)、白介素 8(interleukin-8, IL-8)、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 等前炎性因子,导致血管内皮细胞损伤,平滑肌细胞的增殖、迁移,组织纤维化而出现血管结构的改变<sup>[20-21]</sup>。刘雅蓉等<sup>[12]</sup>发现丹皮酚能减少血管内皮细胞炎性分泌的作用,影响血管平滑肌细胞中 p38MAPK 信号通路,最终抑制其凋亡。黄荷等<sup>[22]</sup>在内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系中发现,内皮细胞的损伤可引起 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)炎症蛋白的表达增加,导致内皮细胞炎症反应加剧,平滑肌细胞增殖、迁移,进而诱发血管重塑。以上说明内皮细胞的损伤,可以导致其分泌炎症因子增加,作用于平滑肌细胞,影响血管舒张功能以及促进血管重塑。因此,研究内皮细胞对平滑肌细胞的影响,对保护血管正常功能和改善血管重塑有重要意义。建立内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系,模拟体内细胞微环境,是目前研究内皮细胞和平滑肌细胞相互作用的理想模型<sup>[23]</sup>。本实验以 TNF- $\alpha$  联合血管内皮细胞和血管平滑肌细胞共培养体系构建高血压炎症环境,观察内皮细胞炎症对平

滑肌细胞增殖、迁移的影响。

AP-1 是机体内一类重要的核转录因子,由 c-Jun 和 c-Fos 两个亚单位组成的 AP-1 异源二聚体最为典型。MCP-1 属于趋化类细胞因子,是重要的促炎细胞因子,在单核细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等不同细胞中均有表达。内皮细胞中 AP-1 的两个亚单位 c-Jun 和 c-Fos 的激活可上调 MCP-1 的表达,促进多种炎症因子的分泌,引起血管平滑肌增殖、迁移,引发病理性血管重塑<sup>[24-27]</sup>。任卫琼等<sup>[28]</sup>通过抑制 SHR 大鼠肠系膜动脉中 AP-1 的活化,抑制 MCP-1 蛋白表达,能够降低炎症因子水平,抑制炎症反应,保护血管,改善血管重构。氧化低密度脂蛋白的内皮受体-1(lectin-like ox-LDL receptor 1, LOX-1)通过 KLF2/AP-1 途径介导内皮功能障碍和损伤,内皮功能的损伤进一步加剧内皮炎症反应,导致平滑肌细胞增殖、迁移,引发血管重塑<sup>[29-30]</sup>。李恒华等<sup>[31]</sup>发现葛根素联合丹参酮 II A 通过有效抑制糖尿病大鼠主动脉中 MCP-1、TNF- $\alpha$  的表达,减轻血管内皮炎症反应,增强对血管内皮的保护作用,促使平滑肌细胞功能修复,改善血管重塑。TNF- $\alpha$  通过诱导内皮细胞中 AP-1 蛋白的活化,可调控多种炎症因子的释放,导致内皮功能紊乱,加剧炎症因子的表达,促使血管平滑肌细胞异常增殖<sup>[32-33]</sup>;P2Y6 受体阻断剂 MRS2578 是炎性蛋白的抑制剂,能够阻断 TNF- $\alpha$  的炎性信号传递,抑制平滑肌细胞增殖,改善血管重构<sup>[34]</sup>。本实验研究结果显示, TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞和平滑肌细胞存活率明显降低,血管平滑肌细胞与内皮细胞共培养产生的炎症因子 IL-8 的含量增加,内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白表达和 mRNA 表达升高。给予药物干预后,复方七芍降压片含药血清组、厄贝沙坦含药血清组、MRS2578 组、MRS2578+复方七芍降压片含药血清组内皮细胞及平滑肌细胞存活率增加,IL-8 水平降低,内皮细胞中 AP-1、MCP-1 蛋白及其 mRNA 的表达水平降低。提示,复方七芍降压片能恢复内皮细胞和平滑肌细胞活性,抑制炎症微环境损伤后细胞炎症因子分泌,降低内皮细胞中 AP-1、MCP-1 的活性,改善内皮损伤,保护平滑肌细胞正常功能,抑制血管重塑。

本实验研究发现,复方七芍降压片能够改善因炎症因子 TNF- $\alpha$  诱导的内皮细胞及平滑肌细胞的存活率,抑制血管重塑,其机制可能与抑制 IL-8 的分泌,降低 AP-1 和 MCP-1 的活性,抑制内皮细胞炎

症反应,改善内皮损伤,保护平滑肌细胞正常功能有关。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2224–2260.
- [ 2 ] Zhang J, Sun J, Chang Z, et al. Characterization of hand, foot, and mouth disease in China between 2008 and 2009[J]. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24(3): 214–221.
- [ 3 ] Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(3): 167–173.
- [ 4 ] 卿颖平, 陈贞艳. 原发性高血压患者相关炎症因子表达的检测及临床分析[J]. *医药论坛杂志*, 2019, 40(12): 69–72.  
Qing YP, Chen ZY. Clinical value of serum cytokines detection in patients with primary hypertension[J]. *J Med Forum*, 2019, 40(12): 69–72.
- [ 5 ] 冯伟伟, 韩伟, 唐华平. 血管内皮细胞对平滑肌细胞增殖和分泌的影响[J]. *当代医学*, 2012, 18(11): 1–3.  
Feng WW, Han W, Tang HP. Effects of vascular endothelial cells on the proliferation and secretion of smooth muscle cells[J]. *Contemp Med*, 2012, 18(11): 1–3.
- [ 6 ] 姚华丽, 戴秋艳. 转录因子激活蛋白-1 在血管重构发生中的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2010, 37(4): 203–206.  
Yao HL, Dai QY. The effect of transcription factor activating protein-1 in the occurrence of vascular remodeling [J]. *Int J Cardiovasc Dis*, 2010, 37(4): 203–206.
- [ 7 ] Shaulian E. AP-1 – The Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise? [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(6): 894–899.
- [ 8 ] 毛志敏, 周如丹, 赵学凌, 等. MCP-1 在炎症反应中的研究进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(6): 10–12.  
Mao ZM, Zhou RD, Zhao XL, et al. Research developments of monocyte chemoattractant protein-1 in inflammatory reaction [J]. *Med Recapitulate*, 2013, 19(6): 10–12.
- [ 9 ] 谭元生, 谭胜真, 宋雪云, 等. 复方七苜降压片对自发性高血压大鼠血压及左室肥厚的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(3): 232–234.  
Tan YS, Tan SZ, Song XY, et al. The influence of compound qishao jiangya tablet on blood pressure and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats[J]. *Chin J Integr Med Cardio-/Cerebrovascular Dis*, 2005, 3(3): 232–234.
- [ 10 ] 雍苏南, 王顺民, 张稳. 养阴柔肝、化痰息风法对自发性高血压大鼠血管重塑的影响[J]. *中国中医急症*, 2015, 24(10): 1696–1572.  
Yong SN, Wang SM, Zhang W. Effects of the treatment of enriching yin to emolliate liver and resolving stasis to extinguish wind on vascular remodeling in rats with spontaneously hypertension[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2015, 24(10): 1696–1572.
- [ 11 ] 李弘, 刘叶倩, 龚姍, 等. 复方七苜降压片对自发性高血压大鼠肠系膜动脉中 I、III 型胶原蛋白表达及血压的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24(12): 1364–1370.  
Li H, Liu YQ, Gong S, et al. Compound Qishao Jiangya tablet reduces blood pressure in mesenteric artery of SHR rats by decreasing the deposition of type I and type III collagen[J]. *Chin J Clin Pharmacol Therapeut*, 2019, 24(12): 1364–1370.
- [ 12 ] 刘雅蓉, 吴鸿飞, 戴敏. 丹皮酚抑制脂多糖诱导的血管内皮细胞 TNF- $\alpha$  释放对共培养体系中血管平滑肌细胞凋亡及 p38MAPK 信号通路的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2018, 37(4): 65–71.  
Liu YR, Wu HF, Dai M. Effects of paeonol on the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from vascular endothelial cells with lipopolysaccharide-induced injury and the apoptosis of vascular smooth muscle cells in a Co-culture system and its influence on the p38MAPK signaling pathway [J]. *J Anhui Univ Chin Med*, 2018, 37(4): 65–71.
- [ 13 ] 张继, 赵朝伟, 赵睿. 三七的药理作用研究进展[J]. *中国药业*, 2003, 12(11): 76–77.  
Zhang J, Zhao CW, Zhao R. Advances in research on pharmacological effects of Panax notoginseng [J]. *Chin Pharm*, 2003, 12(11): 76–77.
- [ 14 ] 韩大荣. 天麻研究新进展[J]. *中国处方药*, 2018, 16(4): 19–21.  
Han DR. New progress of Gastrodia research [J]. *J Chin Prescription Drug*, 2018, 16(4): 19–21.
- [ 15 ] 王涵, 杨娜, 谭静, 等. 丹参化学成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. *特产研究*, 2018, 40(1): 48–53.  
Wang H, Yang N, Tan J, et al. Research progress on salvia miltiorrhiza bge of the chemical constituents and their pharmacological effects [J]. *Spec Wild Econ Anim Plant Res*, 2018, 40(1): 48–53.
- [ 16 ] Su HC, Qi C, Bo L, et al. Antihypertensive effect of radix paeoniae alba in spontaneously hypertensive rats and excessive alcohol intake and high fat diet induced hypertensive rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 731237.
- [ 17 ] 潘龙, 支娟娟, 许春国, 等. 杜仲糖苷对肾性高血压大鼠血压及血浆 ET、NO 的影响[J]. *现代中医药*, 2010, 30(2): 54–56.  
Pan L, Zhi JJ, Xu CG, et al. Effects of eucommia glucoside on blood pressure, plasma ET and NO in renal hypertensive rats [J]. *Modern Tradit Chin Med*, 2010, 30(2): 54–56.
- [ 18 ] Doran AC, Meller N, McNamara CA. The role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 812–819.
- [ 19 ] 谭元生, 田梦影. 血管平滑肌增殖在血管重塑过程中的作用[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 11(11): 1233–1235.  
Tan YS, Tian MY. The role of vascular smooth muscle proliferation in the process of vascular remodeling [J]. *Chin J*

- Integr Med Cardio -/Cerebrovascular Dis, 2016, 11(11): 1233-1235.
- [20] Chen Q, Jin M, Yang F, et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 928315.
- [21] 吴亚军, 苏洁, 黄浦俊, 等. 蒙花苷对 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞炎症损伤及 TLR4/ $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 637-642.
- Wu YJ, Su J, Huang PJ, et al. Buddleioside prevents TNF- $\alpha$  induced human aortic endothelial cells inflammatory injury through inhibiting TLR4/ $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ /NF- $\kappa\text{B}$  signaling pathway [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2017, 34(5): 637-642.
- [22] 黄荷, 张勇, 杨舒婷, 等. DFMG 调节 TLR-4 抑制损伤内皮细胞对平滑肌细胞增殖和迁移促进作用[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2016, 13(1): 1-5.
- Huang H, Zhang Y, Yang ST, et al. DFMG inhibited proliferation and migration of smooth muscle cells stimulated by lpc-induced injured endothelial cells through depressing TLR4 [J]. J Hunan Normal Univ(Med Sci), 2016, 13(1): 1-5.
- [23] 李玉洁, 杨庆, 翁小刚, 等. 血管内皮细胞-平滑肌细胞共培养体系研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 265-268.
- Li YJ, Yang Q, Weng XG, et al. Advance in study of vascular endothelial cell and smoothmuscle cell co-culture system [J]. Chin J Chin Mat Med, 2012, 37(3): 265-268.
- [24] Jung MK, Ha S, Son JA, et al. Polyphenon-60 displays a therapeutic effect on acne by suppression of TLR2 and IL-8 expression via down-regulating the ERK1/2 pathway [J]. Arch Dermatol Res, 2012, 304(8): 655-663.
- [25] 韩畅物, 万福生. AP-1 的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(10): 1357-1362.
- Han CC, Wan FS. Research progress on AP-1 [J]. Chin J Cell Biol, 2017, 39(10): 1357-1362.
- [26] 沈尙, 陈北冬, 关丹丹. 硫氧还蛋白 1 通过抑制核转录因子 AP-1 和氧化还原因子 Ref-1 的核转位下调血管内皮细胞对单核细胞趋化蛋白 MCP-1 的分泌和表达 [J]. 生物物理学报, 2009, 25(S1): 105.
- Shen X, Chen BD, Guan DD. Thioredoxin 1 down-regulates the secretion and expression of monocyte chemotactic protein MCP-1 by vascular endothelial cells by inhibiting nuclear translocation of nuclear transcription factor AP-1 and redox factor Ref-1 [J]. Acta Biophys Sin, 2009, 25(S1): 105.
- [27] 李志, 张梦莹, 徐亮, 等. 糖皮质激素联合环磷酰胺对人脐静脉内皮细胞增殖及其细胞间黏附分子-1 和单核细胞趋化因子-1 表达水平的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(4): 366-370.
- Li Z, Zhang MY, Xu L, et al. Effects of glucocorticoid and cyclophosphamide on the human umbilical vein endothelial cell proliferation and ICAM-I and MCP-1 expression level [J]. Chin J Clin Pharmacol Therapeut, 2014, 19(4): 366-370.
- [28] 任卫琼, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七芍降压片对 SHR 大鼠 IL-8、IL-10 水平及 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(4): 1031-1034.
- Ren WQ, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound qishao jiangya tablet on IL-8 and IL-10 levels and AP-1 and MCP-1 protein expressions in SHR rats [J]. Chin Tradit Patent Med, 2020, 42(4): 1031-1034.
- [29] Lee JY, Chung J, Kim KH, et al. Fluid shear stress regulates the expression of Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor - 1 via KLF2-AP-1 pathway depending on its intensity and pattern in endothelial cells [J]. Atherosclerosis, 2018, 270: 76-88.
- [30] Cook JP. The endothelium; a new target for therapy [J]. Vasc Med, 2000, 5(1): 49-53.
- [31] 李恒华, 周飞, 杨炆, 等. 葛根素联合丹参酮 II A 对糖尿病血管病变大鼠炎症相关因子的影响 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 77-83.
- Li HH, Zhou F, Yang Y, et al. Effect of puerarin combined with tanshinoneIIA on inflammatory factors in DM rats with vascular lesions [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(5): 77-83.
- [32] 陈铁龙, 祝光礼, 张旭栋, 等. TNF- $\alpha$  诱导人脐静脉血管内皮细胞凋亡和炎症机制研究 [J]. 中华全科医学, 2018, 16(2): 184-187.
- Chen TL, Zhu GL, Zhang XD, et al. The effect of TNF- $\alpha$  on apoptosis and inflammation of human umbilical vein endothelial cells [J]. Chin J Gen Pract, 2018, 16(2): 184-187.
- [33] 郭庶, 谭海萍, 张宗尧, 等. 血管内皮细胞对血管平滑肌细胞影响的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(24): 4801-4806.
- Guo S, Tan HP, Zhang ZY, et al. Research progress in the effect of vascular endothelial cells on vascular smooth muscle cells [J]. Med Recapitulate, 2017, 23(24): 4801-4806.
- [34] 王顺民, 陆朵梅, 黄露, 等. 复方七芍降压片含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. 中医药导报, 2020, 26(1): 34-38.
- Wang SM, Lu DM, Huang L, et al. Effect of serum with fufang qishao jiangya tablet on proliferation of vascular smooth muscle cells in rat [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(1): 34-38.

郭志斌,吴春芳,张国彬,等. 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对地塞米松诱导大鼠骨丢失的作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 742-748.

Guo ZB, Wu CF, Zhang GB, et al. Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on dexamethasone-induced bone loss in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 742-748.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.002

# 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对地塞米松诱导大鼠骨丢失的作用

郭志斌<sup>1</sup>, 吴春芳<sup>1</sup>, 张国彬<sup>2</sup>, 迟博婧<sup>2</sup>, 王玉丹<sup>2</sup>, 刘子洪<sup>3</sup>, 王宝<sup>1</sup>, 马超<sup>3</sup>, 田发明<sup>2\*</sup>

(1. 开滦总医院林西医院骨外科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学, 医学实验研究中心, 河北 唐山 063000; 3. 开滦总医院骨外科, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 目的 分析辛伐他汀和利塞膦酸钠单独使用和联合使用对地塞米松诱导的大鼠骨质疏松的作用。方法 本研究使用雌性3月龄SD大鼠,分为五组(每组8只):对照组、骨质疏松模型组、辛伐他汀组、利塞膦酸钠组和联合用药组。除对照组外,其余各组大鼠皮下注射地塞米松(2.5 mg,每周2次),药物干预组分别给予辛伐他汀5 mg/kg、利塞膦酸钠0.1 mg/kg和两者联合干预,均为每天1次,8周后处死所有大鼠取材。取左侧股骨检测其骨密度后,采用三点弯曲实验分析其最大载荷,取左侧胫骨经微计算机断层扫描技术(micro-CT)检测近端松质骨骨量及微观结构参数。取右侧股骨脱钙石蜡包埋,采用免疫组织化学染色检测OPG和RANKL的表达,提取右侧胫骨RNA,检测骨保护素(OPG)和破骨细胞分化因子(RANKL)的表达。结果 (1)骨密度:模型组( $0.207 \pm 0.02$ ) g/cm<sup>2</sup>显著低于其余各组,辛伐他汀组( $0.226 \pm 0.023$ ) g/cm<sup>2</sup>、利塞膦酸钠组( $0.237 \pm 0.021$ ) g/cm<sup>2</sup>显著低于对照组( $0.282 \pm 0.013$ ) g/cm<sup>2</sup>、联合用药组( $0.257 \pm 0.012$ ) g/cm<sup>2</sup> ( $P < 0.05$ )。 (2)生物力学:最大载荷:模型组( $90.2 \pm 7.1$ )显著低于对照组和联合用药组 ( $P < 0.05$ )。 (3)micro-CT:模型组骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁体积分数(BV/TV)显著低于其他4组,骨小梁分离度(Tb.Sp)显著高于其他4组 ( $P < 0.05$ ),辛伐他汀组( $21.6 \pm 2.8$ )、利塞膦酸钠组( $21.9 \pm 2.6$ ) BV/TV显著低于对照组( $29.5 \pm 2.7$ )、联合用药组( $25.3 \pm 2.9$ ), Tb.Sp显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。 (4)免疫组化染色:OPG:模型组、利塞膦酸钠组、联合用药组均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), C组和E组显著高于模型组 ( $P < 0.05$ )。模型组、辛伐他汀组、利塞膦酸钠组、联合用药组RANKL的表达均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), E组显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。 (5)PCR:模型组( $0.74 \pm 0.17$ ) OPG表达显著低于对照组( $1.00 \pm 0.16$ )、辛伐他汀组( $1.27 \pm 0.19$ ) ( $P < 0.05$ ); RANKL在模型组表达显著高于其余各组 ( $P < 0.05$ ), 辛伐他汀组( $1.31 \pm 0.16$ )显著高于对照组( $1.00 \pm 0.18$ )。结论 地塞米松可诱发建立大鼠骨丢失模型,辛伐他汀和利塞膦酸钠联合应用治疗可部分阻止该模型骨丢失和骨质量下降,效果优于单独用药。

**【关键词】** 辛伐他汀;利塞膦酸钠;骨丢失;生物力学;微结构

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0742-07

## Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on dexamethasone-induced bone loss in rats

GUO Zhibin<sup>1</sup>, WU Chunfang<sup>1</sup>, ZHANG Guobin<sup>2</sup>, CHI Bojing<sup>2</sup>, WANG Yudan<sup>2</sup>, LIU Zihong<sup>3</sup>, WANG Bao<sup>1</sup>, MA Chao<sup>3</sup>, TIAN Faming<sup>2\*</sup>

(1. Orthopaedic Department, Kailuan Linxi Hospital, Tangshan 063000, China. 2. Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000. 3. Orthopaedic Department, Kailuan General Hospital, Tangshan 063000)

Corresponding author: TIAN Faming. E-mail: 11907122@qq.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81874029), 河北省自然科学基金(H2013209255), 河北省医学科学研究重点课题(20190152, 20160722)。Funded by National Natural Science Foundation of China(81874029), Natural Science Foundation of Hebei Province(H2013209255), Medical Research Foundation of Hebei Province(20190152, 20160722)。

**【作者简介】** 郭志斌(1980—), 男, 学士, 主治医师, 研究方向: 老年骨代谢疾病的发病机制与诊治研究。Email: guozhibin1980@126.com

**【通信作者】** 田发明(1980—), 教授, 博士生导师, 研究方向: 骨与关节退行性疾病的发病机制与防治研究。Email: tfm9911316@163.com

**[Abstract] Objective** To analyze the effects of simvastatin and risedronate sodium, either alone or in combination, on bone loss induced by dexamethasone in rats. **Methods** Twelve-week-old female Sprague-Dawley rats were divided into five groups ( $n = 8$ ) as follows: control group, osteoporosis model group subcutaneously injected with dexamethasone (2.5 mg, twice/week), simvastatin group (5 mg/(kg·d)), risedronate group (0.1 mg/(kg·d)), and combination group. Eight weeks later, all rats were sacrificed, and the left femurs were harvested for bone mineral density (BMD) and three-point bending testing. In addition, micro-CT was performed on the left tibia. The right femurs were embedded in paraffin for immunohistochemical analysis of OPG and RANKL expression, and the right tibia samples were subjected to RNA extraction to assess OPG and RANKL expression. **Results** BMD was lowest in the osteoporosis group ( $0.207 \pm 0.02$ ) g/cm<sup>2</sup>, and BMD was markedly lower in the simvastatin ( $0.226 \pm 0.023$ ) g/cm<sup>2</sup> and risedronate ( $0.237 \pm 0.021$ ) g/cm<sup>2</sup> groups than in the control ( $0.282 \pm 0.013$ ) g/cm<sup>2</sup> and combination groups ( $0.257 \pm 0.012$ ) g/cm<sup>2</sup>. The maximum load in the osteoporosis group was significantly lower than that in the control and combination groups. BV/TV and Tb.N were significantly lower in the osteoporosis group than in the other groups, whereas the opposite trend was noted for Tp.Sp. BV/TV was significantly lower in the simvastatin ( $21.6 \pm 2.8$ ) and risedronate groups ( $21.9 \pm 2.6$ ) than in the control ( $29.5 \pm 2.7$ ) and combination groups ( $25.3 \pm 2.9$ ). Tb.Sp was significantly higher in the simvastatin and risedronate groups than in the control group. On immunohistochemistry, OPG expression was significantly lower in the osteoporosis, risedronate, and combination groups than in the control group, whereas its expression was significantly higher in the simvastatin and combination groups than in the osteoporosis group. RANKL expression was significantly higher in the osteoporosis, simvastatin, risedronate, and combination groups than in the control group and significantly lower in the combination group than in the osteoporosis group. Meanwhile, OPG expression was significantly lower in the osteoporosis group ( $0.74 \pm 0.17$ ) than in the control ( $1.00 \pm 0.16$ ) and simvastatin groups ( $1.27 \pm 0.19$ ). RANKL expression was significantly higher in the osteoporosis group than in the other groups, and its expression was significantly higher in the simvastatin group ( $1.31 \pm 0.16$ ) than in the control group ( $1.00 \pm 0.18$ ). **Conclusions** Dexamethasone induced bone loss in rats, and this effect was more obviously prevented by combined treatment with simvastatin and risedronate than by either drug alone.

**[Keywords]** simvastatin; risedronate; bone loss; biomechanics; microarchitecture

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

骨质疏松症的病理特点是骨丢失和微观结构劣变,并由此导致发生骨折的风险增加<sup>[1-2]</sup>。骨质疏松症病因复杂,荷尔蒙失调、久坐不动的生活方式、营养摄入不足、代谢和慢性炎症疾病,都可以加速骨质疏松症的发展<sup>[3]</sup>。糖皮质激素主要用于抗炎和治疗自身免疫性疾病,但是长期应用的副作用之一是可能导致骨质减少,骨质疏松症和骨折风险增加<sup>[4]</sup>。

双膦酸盐类药物,如利塞膦酸盐、阿仑膦酸盐等可通过抑制破骨细胞介导的骨吸收而阻止骨丢失。辛伐他汀是一种 3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶 A 还原酶抑制剂,临床上主要作为降脂类药物。目前国内外研究表明,辛伐他汀具有促进成骨细胞分化并抑制破骨细胞的形成,表现出一定的抗骨质疏松潜能<sup>[5]</sup>。然而上述两种药物联合应用对地塞米松诱导的骨丢失的干预效果尚不明确。本研究拟通过地塞米松皮下注射诱导建立大鼠骨质疏松模型,并给予辛伐他汀和利塞膦酸钠干预,观察两者单独或联合应用对该模型骨丢失的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

40 只 SPF 级 3 月龄雄性 SD 大鼠,购自北京维通利华实验动物中心【SCXK(京)2017-0001】,体重( $246 \pm 18$ )g。所有动物在华北理工大学动物中心屏障环境中饲养【SYXK(冀)2015-0038】。饲养期间大鼠自由进食水,饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。本研究涉及实验动物的处理和干预,均符合华北理工大学实验动物伦理委员会的相关规定,动物实验伦理审查证明(LX2018136),并遵照实验动物使用的 3R(减少、替代、优化)原则。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

地塞米松(辰欣药业股份有限公司),辛伐他汀(浙江瑞邦药业有限公司生产),利塞膦酸钠(北京双鹭药业股份有限公司),骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)、RANKL(receptor activator of

nuclear factor kappa-B ligand) 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司。

微计算机断层扫描 (micro-CT, Skyscan, 比利时), AG-IS 型万能试验机统 (日本岛津公司), PCR 仪 (Applied biosystems, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及实验干预

分为五组, 每组 8 只, A 组对照组, B 组为模型组, 皮下注射地塞米松 (2.5 mg, 每周 2 次), C、D、E 组在给予地塞米松皮下注射的基础上, 每天分别给予辛伐他汀 (5 mg/kg) 灌胃<sup>[6]</sup> (C 组)、利塞膦酸钠 (0.1 mg/kg) 灌胃<sup>[7-8]</sup> (D 组) 和联合干预 (E 组), 8 周后处死所有大鼠取材。

### 1.2.2 股骨骨密度检测

取所有大鼠左侧股骨, 采用用 Norland-XR 36 双能 X 线骨密度测量仪 (DEXA, 美国) 进行骨密度分析。

### 1.2.3 Micro-CT 分析胫骨近段松质骨微观结构

用 Sky Scan 1176 Micro-CT 系统 (电压 50 KeV、电流 270  $\mu$ A) 对大鼠左侧胫骨进行扫描检测, 感兴趣区胫骨近端松质骨生长板下 0.5 ~ 2 mm。对所有图像分别使用 CT Analyzer 与 CT vox 软件分析和处理。并分析以下参数: 骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁数 (trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁间距 (trabecular separation, Tb.Sp)。

### 1.2.4 生物力学检测股骨最大载荷

所有大鼠左侧股骨完成骨密度检测后, 进行三点弯曲试验, 跨距 20 mm, 中央垂直施加载荷, 速率 10 mm/min, 在软件里直接得到最大载荷。

### 1.2.5 免疫组化检测 OPG 和 RANKL 蛋白水平的表达

取所有大鼠右侧股骨, 常规固定、脱钙后, 脱水并用石蜡包埋, 制备 6  $\mu$ m 的石蜡切片, 经烤片、二甲苯透明脱脂、梯度乙醇至纯水水化后, 抗原修复, 过氧化氢处理后, 滴加 OPG、RANK 一抗 45  $\mu$ L, 孵育过夜。次日按照 PV6000 试剂盒滴加二抗并进行后续操作, 最终由 DAB 显色, 苏木素复染、盐酸酒精分化及自来水返蓝, 中性树胶封片。光学显微镜采图, Image-Pro Plus 软件进行积分光密度值分析 (integratal optical density, IOD)。

### 1.2.6 Real time PCR 检测 OPG 和 RANKL mRNA

水平的表达

取右侧胫骨制备组织匀浆, 采用 TRIzol 法提取 RNA, 并经反转录合成第一链 cDNA 后, 测定质量和浓度。采用 Real time PCR 体系扩增目的基因与内参基因 (GAPDH), 计算两者相对表达量的比值。PCR 反应体系: 总体积 50  $\mu$ L, 包括: Real time PCR MasterMix 25  $\mu$ L, cDNA 模板 5  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L。PCR 反应条件: OPG 和 RANKL 为同一条件: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 s; 69 $^{\circ}$ C, 30 s; 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。引物序列: GAPDH (扩增产物为 bp) 的上游引物: 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAG-3', 下游引物: 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'; OPG 上游引物: 5'-GTCCCTTGCCCTGACTACTCT-3', 下游引物: 5'-GACATCTTTTGCAAACCGTGT-3'; RANKL 上游引物: 5'-CCCATCGGGTTCCCATAAAGTC-3', 下游引物: 5'-GCCTGAAGCAAATGTTGGCGTA-3'。

## 1.3 统计学分析

实验数据录入 Excel 表格, 采用 SPSS 21.0 进行统计学分析, 采用单因素方差初步分析是否存在组间差异, 后续两两比较采用 LSD-*t* 检验, 实验数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 骨密度

骨密度检测结果: 双能 X 线骨密度分析结果如图 1 所示, A 组骨密度最高, 显著高于其余四组 ( $P < 0.05$ ), 利塞膦酸钠组显著高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 联合治疗组显著高于模型组和单独用药组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 生物力学检测

各组大鼠股骨最大载荷: 模型组 (90.2  $\pm$  7.1) N 显著低于对照组 (104.6  $\pm$  10.62) N ( $P < 0.05$ ) 和联合治疗组 (101.4  $\pm$  7.7) N。辛伐他汀组 (94.7  $\pm$  9.6) N、利塞膦酸钠组 (98.5  $\pm$  10.9) N 与其他各组比较均无显著性差异 (图 2)。

### 2.3 Micro-CT 分析

Micro-CT 检测胫骨近端松质骨结果如表 1 所示: 骨小梁体积分数: 模型组和各治疗组均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 联合治疗组显著高于模型组和单独用药组, 但仍低于对照组 ( $P < 0.05$ )。骨小梁数量: 模型组和各给药组均显著低于对照组, 联合用药组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。骨小梁厚

度:模型组显著低于对照组,联合用药组显著高于模型组( $P < 0.05$ ),其余各组间比较无显著差异。骨小梁分离度:模型组和各治疗组均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),联合治疗组显著低于模型组和单独用药组,但仍高于对照组( $P < 0.05$ )。

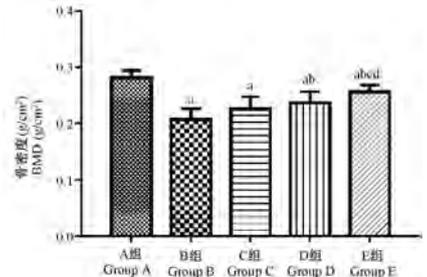
**2.4 免疫组化检测结果**

免疫组化检测 OPG 在各组右侧股骨松质骨表达的结果:模型组、利塞膦酸钠组、联合用药组均显著低于对照组( $P < 0.05$ ),辛伐他汀组和联合用药组显著高于模型组( $P < 0.05$ )(图 3)。

免疫组化检测 RANKL 在各组右侧股骨松质骨表达的结果:模型组及各用药组 RANKL 的表达均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),联合用药组显著低于模型组( $P < 0.05$ )(图 4)。

**2.5 Real time PCR 检测结果**

Real time PCR 定量分析 OPG mRNA 在各组表达结果:B 组显著低于 A 组、C 组显著高于 B 组( $P < 0.05$ ),其他组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );B 组 RANKL mRNA 的表达显著高于其他 4 组( $P < 0.05$ ),C 组 RANKL mRNA 的表达显著高于 A 组,其他两组间比较未见显著差别( $P > 0.05$ )。

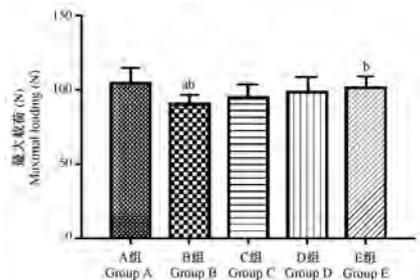


注:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 D 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。(下图/表同)

**图 1 骨密度检测结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

Note. Compared with group A, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with group B, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with group C, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with group D, <sup>d</sup> $P < 0.05$ . (The same in the following figures and tables)

**Figure 1 Results of BMD test( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**



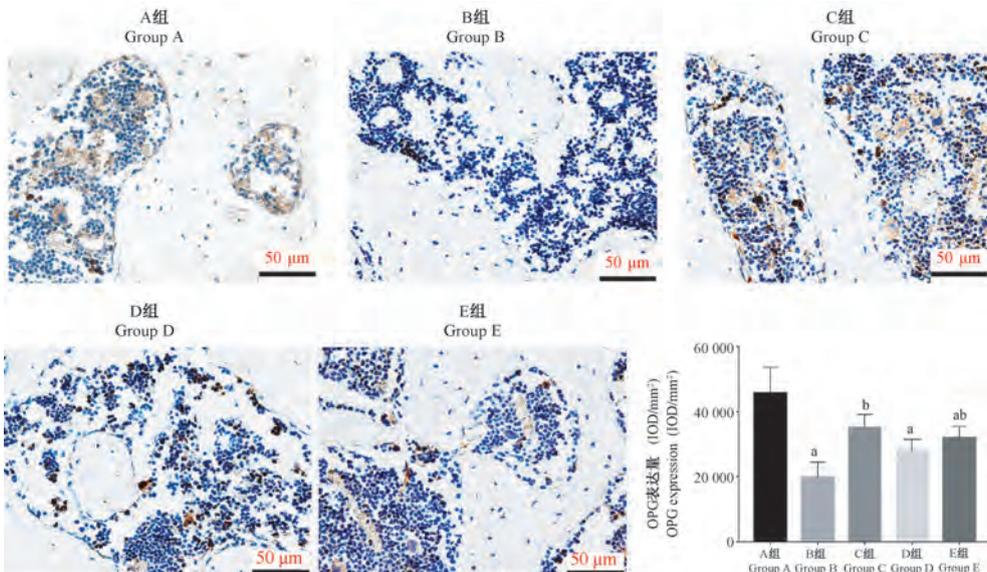
**图 2 骨密度检测结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

**Figure 2 Results of BMD test( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

**表 1 Micro-CT 分析结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

**Table 1 Results of Micro-CT test( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

组别 Groups	骨体积比 Bone volume/total volume	骨小梁数量 Trabecular number	骨小梁厚度 Trabecular thickness	骨小梁分离度 Trabecular separation
A 组 Group A	29.5 ± 2.7	2.9 ± 0.3	101.6 ± 4.9	231.4 ± 63.8
B 组 Group B	20.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	93.3 ± 4.6 <sup>a</sup>	394.1 ± 41.3 <sup>a</sup>
C 组 Group C	21.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	98.8 ± 8.0	356.1 ± 36.4 <sup>a</sup>
D 组 Group D	21.9 ± 2.6 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	98.9 ± 7.5	354.9 ± 33.7 <sup>a</sup>
E 组 Group E	25.3 ± 2.9 <sup>abcd</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>ab</sup>	103.7 ± 6.4 <sup>b</sup>	294.9 ± 49.6 <sup>abcd</sup>



**图 3 免疫组化检测各组 OPG 的表达( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

**Figure 3 Immunohistochemistry staining and IOD analysis of OPG( $\bar{x} \pm s, n=8$ )**

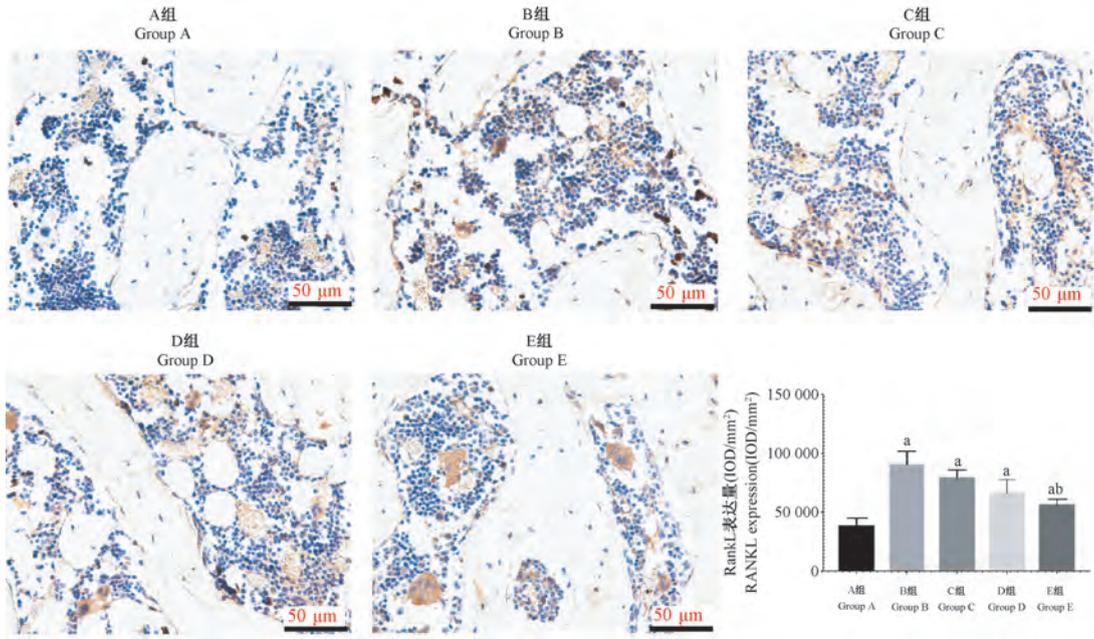


图 4 免疫组化检测各组 RANKL 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Figure 4 Immunohistochemistry staining and IOD analysis of RANKL ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

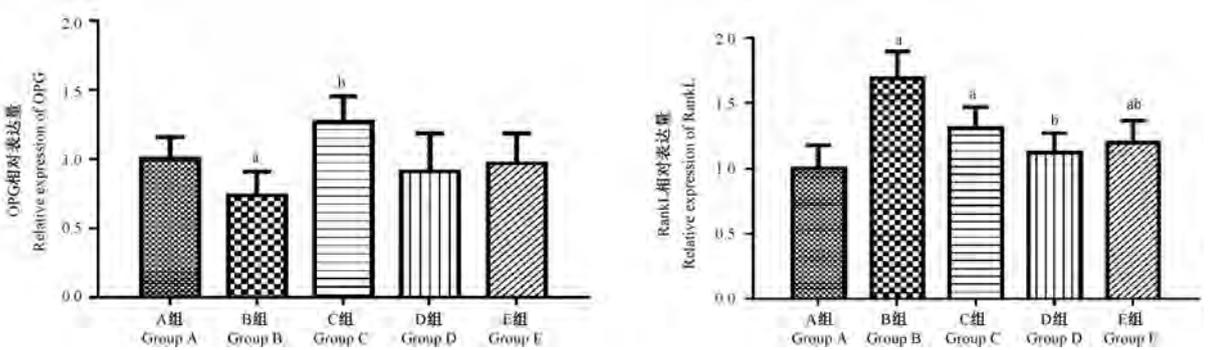


图 5 PCR 检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Figure 5 Results of PCR analysis ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

### 3 讨论

#### 3.1 地塞米松诱发大鼠骨质疏松模型

本研究证实,在大鼠皮下注射地塞米松 8 周后,诱发大量骨丢失、微结构退化、生物力学性能下降,这也与先前的研究结果一致。研究表明,地塞米松通过抑制成骨细胞细胞增殖及细胞外基质合成降低成骨能力<sup>[9]</sup>。此外,地塞米松促进破骨细胞的增殖<sup>[10]</sup>。长期接受地塞米松治疗的患者在诱发骨丢失的同时,还存在易于发生骨折的风险<sup>[11-12]</sup>。我们通过对骨保护素和破骨细胞分化因子的蛋白和 mRNA 水平的比较分析发现,地塞米松可以抑制骨保护素的表达,且同时刺激破骨细胞分化因子的表达,这些结果提示地塞米松诱发大鼠骨丢失的作用

机制与抑制成骨细胞功能同时促进破骨细胞活性有关。

#### 3.2 辛伐他汀联合利塞膦酸钠抗骨质疏松效果优于单独用药

辛伐他汀作为同类药物中应用较多的一种,除了降脂作用,其对骨代谢的影响也日益受到关注,且部分前期实验已经证实其促进骨形成或抑制骨吸收的潜能<sup>[6,13-14]</sup>,如辛伐他汀可以激活 TGF- $\beta$ /smad3 信号通路拮抗地塞米松诱导的破骨细胞凋亡<sup>[15]</sup>,其抗破骨作用还与诱导 OPG 的表达并抑制 RANKL 的表达有关<sup>[16]</sup>。然而,在本研究中,辛伐他汀对于糖皮质激素诱发的大鼠骨丢失的干预效果并不显著,未能达到预期,虽然通过对 OPG、RANKL 免疫组化和 PCR 的检测提示辛伐他汀具有刺激

OPG 并抑制 RANKL 表达的作用,但在组织学和生物力学水平的分析结果提示其作用不能阻止该模型的骨丢失。与之相对应的,利塞膦酸钠对该模型骨丢失的作用则较为显著,表现出比辛伐他汀更强的抑制骨丢失的作用,具体表现为,辛伐他汀单独用药骨密度虽然具有高于模型组大鼠的趋势,但差异并不显著;而利塞膦酸钠组大鼠的骨密度则显著高于模型组大鼠。通过进一步分析联合用药的效果,我们发现联合用药组大鼠骨密度不仅高于模型组大鼠,也显著高于两组单独用药的大鼠,提示联合用药较之单独用药抗骨质疏松的作用更强。然而,通过与正常对照组大鼠比较,我们发现,无论单独用药还是联合用药骨密度都未能恢复到正常值。此外,本研究的辛伐他汀和利塞膦酸钠药物剂量参考以往类似研究<sup>[6-8]</sup>,药物剂量在安全范围,但并未观察联合用药是否增加毒副作用,在今后的研究中应予以重视。

除骨密度外,我们进一步分析了各组大鼠股骨的最大载荷,也进一步证实了单独用药效果不及联合用药,结果发现只有联合用药组大鼠股骨的最大载荷显著高于模型组,而单独用药组与模型组比较,虽有升高趋势,但差别并不显著。相比较而言,利塞膦酸钠组较辛伐他汀最大载荷数值表现出更高的趋势。我们通过 micro-CT 分析对松质骨微结构参数的比较发现,联合用药组较单独用药组表现出更高的骨量、骨小梁数量,更低的骨小梁分离度,提示联合用药较单独用药对于保持骨量和微观结构具有更显著的作用。

### 3.3 不足与展望

此外,与辛伐他汀和利塞膦酸钠单独干预相比,联合用药组在组织学和分子水平的作用都更强。利塞膦酸钠作为第三代双膦酸盐类药物,目前仍是治疗骨质疏松的首选药物之一<sup>[17-19]</sup>。因为其作用机制主要是抑制破骨细胞的功能活性,对骨形成的影响甚微,因此为提高其应用效果和扩大适用范围,目前多项研究探讨了其与其它性质药物的联合应用对骨代谢的影响,包括分别与甲状腺激素 1-34<sup>[20]</sup> 和维生素 K<sup>[21]</sup> 的联合应用,其中与甲状腺激素 1-34 联合或序贯应用效果较单独应用更佳,但对后者而言,与维生素 K 的联合应用并未表现出优于利塞膦酸钠单独用药。因此,本研究虽然初步证实辛伐他汀与利塞膦酸钠联合应用能更好的治疗激素诱发的大鼠骨丢失,但并未能完全抑制

其进程,是否能通过调整剂量和作用周期,或者改变干预方案如序贯治疗等进一步增强联合使用的疗效,这些都有待进一步研究证实。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Dhital R, Lynn T, Tachamo N, et al. The trend of osteoporosis and osteoporotic fragility fractures in inpatients; results from a national database[J]. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2019, 9(3): 211-214.
- [ 2 ] Aziziyeh R, Amin M, Habib M, et al. A scorecard for osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina [J]. Arch Osteoporos, 2019, 14 (1): 69.
- [ 3 ] Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(2): S3-S11.
- [ 4 ] Hardy RS, Zhou H, Seibel MJ, et al. Glucocorticoids and bone: consequences of endogenous and exogenous excess and replacement therapy[J]. Endocr Rev, 2018, 39(5): 519-548.
- [ 5 ] Moshiri A, Sharifi AM, Oryan A. Role of Simvastatin on fracture healing and osteoporosis: a systematic review on *in vivo* investigations[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(7): 659-684.
- [ 6 ] 刘昊, 张岩, 张国彬, 等. 辛伐他汀不同干预方案对骨质疏松大鼠骨质量的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26 (6): 42-47.  
Liu H, Zhang Y, Zhang GB, et al. Effects of simvastatin treatment with different intervention programs on the bone quality of osteoporotic rats[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(6): 42-47.
- [ 7 ] 何立江, 柯呈辉, 戴章生, 等. 利塞膦酸钠对大鼠骨质疏松性非典型性骨折愈合的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1790-1797.  
He LJ, Ke CH, Dai ZS, et al. Effect of risedronate sodium on osteoporotic atypical fracture healing in rats [J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(12): 1790-1797.
- [ 8 ] 杨华, 吴家昌, 韦葛董, 等. 利塞膦酸钠联合脉冲电磁场治疗去势大鼠骨质疏松的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(1): 67-72.  
Yang H, Wu JC, Wei GJ, et al. Experimental study of risedronate combined with pulsed electromagnetic fields for the treatment of osteoporosis in ovariectomized rats [J]. Chin J Osteoporos, 2014, 20(1): 67-72.
- [ 9 ] Pan JM, Wu LG, Cai JW, et al. Dexamethasone suppresses osteogenesis of osteoblast *via* the PI<sub>3</sub>K/Akt signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2019, 39 (1): 80-86.
- [ 10 ] Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, et al. Glucocorticoids and the osteoclast[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1116: 335-339.
- [ 11 ] Amiche MA, Albaum JM, Tadrous M, et al. Fracture risk in oral glucocorticoid users: a Bayesian meta-regression leveraging control arms of osteoporosis clinical trials[J]. Osteoporos Int, 2016, 27(5): 1709-1718.

- [12] Caramori G, Ruggeri P, Arpinelli F, et al. Long-term use of inhaled glucocorticoids in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease and risk of bone fractures; a narrative review of the literature[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, 14: 1085–1097.
- [13] Chi B, Fan X, Li Z, et al. Identification of Gli1-interacting proteins during simvastatin-stimulated osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 18979–18994.
- [14] Kaleağasıoğlu F, Olcay E, Onur R. Statins as potential agents for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Endocrine*, 2018, 62(1): 269.
- [15] Kaji H, Naito J, Inoue Y, et al. Statin suppresses apoptosis in osteoblastic cells: role of transforming growth factor-beta-Smad3 pathway[J]. *Horm Metab Res*, 2008, 40(11): 746–751.
- [16] Stein SH, Dean IN, Rawal SY, et al. Statins regulate interleukin-1 $\beta$ -induced RANKL and osteoprotegerin production by human gingival fibroblasts[J]. *J Periodontal Res*, 2011, 46(4): 483–490.
- [17] Yang L, Kang N, Yang JC, et al. Drug efficacies on bone mineral density and fracture rate for the treatment of postmenopausal osteoporosis: a network meta-analysis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2640–2668.
- [18] Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 142: 155–170.
- [19] Raterman HG, Bultink IEM, Lems WF. Current treatments and new developments in the management of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *Drugs*, 2019, 79(10): 1065–1087.
- [20] Cosman F. Anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: combination and sequential approaches [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12(4): 385–395.
- [21] Tanaka S, Miyazaki T, Uemura Y, et al. Comparison of concurrent treatment with vitamin K<sub>2</sub> and risedronate compared with treatment with risedronate alone in patients with osteoporosis: Japanese osteoporosis intervention trial-03 [J]. *J Bone Miner Metab*, 2017, 35(4): 385–395.

[收稿日期] 2020-05-17

邱方,周杨,张严焱,等. miR-328在运动改善高血压大鼠胸主动脉L型钙通道表达中的作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 749-758.

Qiu F, Zhou Y, Zhang YY, et al. Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 749-758.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.003

# miR-328在运动改善高血压大鼠胸主动脉L型钙通道表达中的作用

邱方<sup>1</sup>,周杨<sup>1</sup>,张严焱<sup>1</sup>,金城<sup>1</sup>,刘晓东<sup>1</sup>,吴迎<sup>1,2</sup>,吕媛媛<sup>3</sup>,石丽君<sup>1,2\*</sup>

(1. 北京体育大学运动生理教研室,北京 100084; 2. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室,北京 100084; 3. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084)

**【摘要】** 目的 探讨 microRNA-328(miR-328)在有氧运动改善高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞L型电压门控钙通道(voltage-gated L-type  $Ca^{2+}$  channel, LTCC)表达的中促进作用。方法 选取12周龄雄性正常血压大鼠(Wistar Kyoto, WKY)与自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)随机分为正常血压对照组(WKY-C)、正常血压运动组(WKY-EX)、高血压对照组(SHR-C)、高血压运动组(SHR-EX),运动组进行12周中等强度跑台训练。12周后采用股动静脉置管术检测大鼠心血管反应;取大鼠胸主动脉,采用HE染色检测胸主动脉形态,qPCR检测LTCC  $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基mRNA、miR-328表达,Western Blot检测 $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基蛋白表达。离体实验,培养WKY胸主动脉平滑肌细胞,脂质体转染miR-328 mimic和miR-328 inhibitor使之过表达或沉默,检测LTCC  $\alpha_{1C}$ 及 $\beta_1$ 亚基mRNA和蛋白表达变化。结果 (1)有氧运动可显著降低SHR体重、血压和心率;(2)运动可显著降低SHR胸主动脉壁厚;(3)运动可显著降低SHR对去甲肾上腺素的升压反应和硝苯地平Nifedipine(LTCC阻断剂)的降压反应;(4)SHR-C组的LTCC  $\alpha_{1C}$ 及 $\beta_1$ 亚基mRNA、蛋白表达显著高于WKY-C组,而SHR-EX组的 $\alpha_{1C}$ 及 $\beta_1$ 亚基mRNA、蛋白表达显著低于SHR-C组;(5)SHR-C组中miR-328的表达显著低于WKY-C组,12周有氧运动后miR-328表达量显著增加;(6)离体实验中,与对照组相比,转染miR-328 mimic组 $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基mRNA、蛋白表达显著下调,而转染miR-328 inhibitor组 $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基mRNA、蛋白表达显著上调。结论 规律有氧运动可有效降低SHR血压,调控miR-328靶向抑制LTCC  $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基的表达,可能是运动改善高血压胸主动脉LTCC重构的机制之一。

**【关键词】** 高血压;miR-328;有氧运动;LTCC;血管平滑肌细胞

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0749-10

## Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats

QIU Fang<sup>1</sup>, ZHOU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Yanyan<sup>1</sup>, JIN Cheng<sup>1</sup>, LIU Xiaodong<sup>1</sup>, WU Ying<sup>1,2</sup>, LYU Yuanyuan<sup>3</sup>, SHI Lijun<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China.

2. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084.

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

Corresponding author: SHI Lijun. E-mail: shilj@bsu.edu.cn

**【基金项目】**国家自然科学基金(32071174,31771312),中央高校基本科研业务费专项资金(2020049)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(32071174,31771312), Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(2020049).

**【作者简介】**邱方(1989—),女,在读博士研究生,研究方向:运动和心血管生理学。Email:2019112031@bsu.edu.cn

**【通信作者】**石丽君(1972—),女,教授,博士,博士生导师,研究方向:运动和心血管生理学。Email:shilj@bsu.edu.cn

**[Abstract] Objective** The present study investigated the effect of microRNA-328 (miR-328) during the aerobic exercise-induced improvement of voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel (LTCC) expression in thoracic aorta smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods** Twelve-week-old male normotensive Wistar Kyoto rats (WKYs) and SHRs randomly were separated into a control group (SHR-C and WKY-C) and an exercise group (SHR-EX and WKY-EX). Rats in exercise were subjected to moderate-intensity treadmill training for 12 weeks. The cardiovascular responses of rats were then detected by femoral arterial and venous cannulation. The thoracic aorta was stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological assays. The mRNA expression levels of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits and the expression of miR-328 were detected by qPCR. The protein expression levels of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits were detected by Western Blot. For *in vitro* analysis, primary vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated and cultured from the thoracic aorta of WKYs. Both miR-328 mimic and miR-328 inhibitor were transfected into cultured arterial myocytes to produce miR-328 overexpression or silencing. The mRNA and protein expression levels of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits were detected. **Results** Aerobic exercise significantly reduced body weight, blood pressure, and heart rate in SHRs. Aerobic exercise significantly reduced the wall thickness of thoracic aorta in SHRs. Exercise significantly reduced the pressor response to norepinephrine and the depressor response to nifedipine (LTCC blocker) in SHRs. The mRNA and protein expression levels of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits were significantly upregulated in the SHR-C group, compared with the WKY-C group, while the mRNA and protein expression levels of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits were downregulated in the SHR-EX group, compared with the SHR-C group. miR-328 expression was significantly lower in the SHR-C group than that in the WKY-C group; this expression significantly increased after aerobic exercise. In the transfection experiment, compared with the negative control (NC) group, the mRNA and protein expression levels of  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits were significantly downregulated in the miR-328 mimic transfected group; these expression was significantly upregulated in the miR-328 inhibitor transfected group. **Conclusions** Regular aerobic exercise may effectively reduce blood pressure in SHR and enable miR-328 to inhibit LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunit expression. This mechanism might contribute to exercise-mediated improvement of LTCC channel remodeling in hypertensive thoracic aorta.

**[Keywords]** hypertension; miR-328; aerobic exercise; LTCC; vascular smooth muscle cells

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

据世界卫生组织最新的卫生统计数据,高血压是一个主要的公共卫生问题,影响到 25 岁及以上 40% 的成年人,其发病率和死亡率很高。长期高血压时,全身动脉系统受血管内高压力的影响会产生病变,导致血管结构和功能的改变。在高血压病理过程中,大动脉长期承受高应力的影响,导致血管顺应性下降,是心血管功能异常的主要原因。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 是构成血管壁结构和功能的主要成分, L 型电压门控钙通道 (voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, LTCC) 是存在于 VSMC 膜上的一种主要钙通道,控制外钙内流,是 VSMC 收缩的结构基础,在调节血管张力和血压中起重要作用<sup>[1]</sup>。LTCC 由成孔  $\alpha_{1C}$  和辅助  $\beta$ 、 $\alpha_2\delta$  和  $\gamma$  亚基组成,它们共同调节通道功能<sup>[2]</sup>。其中  $\alpha_{1C}$  亚基是 LTCC 的门控装置和  $\text{Ca}^{2+}$  的渗透孔道,作为支架蛋白,  $\beta$  亚基可以定位和整合细胞内信号以影响 LTCC 门控特性。研究证实, VSMC 中 LTCC 的上调是高血压的一个标志性特征,且细胞膜中 LTCC 蛋白表达量与体内血压水平呈正相关<sup>[3]</sup>,但其潜在的机制尚不清楚。有研究发现,与正常血压

大鼠 (Wistar Kyoto, WKY) 相比,自发性高血压大鼠 (Spontaneously hypertensive rat, SHR) 肠系膜动脉 LTCC 转录水平略高,但其蛋白水平高 3.4 倍<sup>[4]</sup>。在猪肺动脉高压模型中,肺动脉 LTCC 蛋白表达显著升高,但转录水平没有变化<sup>[5]</sup>。因此,转录后调控可能在 LTCC 表达中发挥更重要的作用。

MicroRNA (miRNA, miR) 是一种短的非编码 RNA 片段,通过靶向 mRNA 在转录后调控基因和蛋白质的表达<sup>[6]</sup>。miRNAs 的失调可能导致疾病的发展,因参与多种细胞功能,例如增殖、迁移和凋亡。多篇综述报道 miRNA 在高血压的病理生理过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。近期研究发现 miRNA 可能是 LTCC 转录后水平的一种调控机制, miR-1、miR-145 和 miR-328 直接靶向或调节 VSMC 中 LTCC 的功能<sup>[8-9]</sup>。在血管和心肌细胞中检测发现, miR-328 对 LTCC  $\alpha_{1C}$  亚基基因 (*CACNA1C*) 和  $\beta_1$  亚基基因 (*CACNB1*) 有靶向作用,该研究发现 miR-328 可以抑制缺氧性肺动脉高压 LTCC 的表达, miR-328 的过表达可以降低右心室收缩压和肺动脉壁厚度<sup>[10-11]</sup>。

长期规律运动是预防和控制高血压推荐的非

药物疗法。我们前期研究发现,有氧运动可逆转高血压血管平滑肌 LTCC 结构和功能重构,改善血管功能,调控血压水平<sup>[12-14]</sup>,但运动调控血管平滑肌离子通道功能的潜在机制仍不清楚。规律有氧运动作为一种环境表观遗传调制器,可通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 等表观遗传修饰,调控心血管相关基因表达,进而改善心血管结构和功能<sup>[15-16]</sup>。miRNA 作为表观调控的重要组成部分在心血管系统中高度表达,参与调节 VSMC 离子通道功能<sup>[11]</sup>。规律有氧运动作为一种良性刺激,在逆转高血压 LTCC 重构过程中,miR-328 是否参与其中,目前尚不清楚。因此,本研究通过建立有氧运动模型,观察有氧运动对正常血压大鼠和高血压大鼠胸主动脉中 LTCC 亚基和 miR-328 的表达影响,并探讨 miR-328 在其中的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 12 周龄雄性正常血压大鼠 WKY 和自发性高血压大鼠 SHR 各 24 只, WKY 体重约 270 g、SHR 体重约 245 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】, 饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】。大鼠自由饮水进食, 温度 22~24℃, 相对湿度 40%~60%, 所有实验方案获得北京体育大学运动科学实验室伦理委员会批准(IACUC 2017003A)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)和硝苯地平(Nifedipine)均购买于 sigma 公司, Rabbit polyclonal anti- $\alpha_{1c}$  (Alomone Laboratories, Israel), Anti- $\beta_1$  (Sigma, USA), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, USA), Rabbit Polyclonal to  $\alpha$ -SM-actin (Abcam, UK), BCA 试剂盒 (Pierce, USA), miRcute miRNA 提取分离试剂盒 (Tiangen, China), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG antibody (Life Technologies, USA), Lipofectamine RNAiMAX 试剂 (Invitrogen, USA), DMEM 培养基、HBSS 缓冲液、胎牛血清、双抗 Penicillin/streptomycin 均购买于 Gibco 公司。

实验仪器包括智能无创血压仪 (BP-2010A, Softron Biotechnology, 中国), PowerLab 系统

(PL3504, AD Instruments, Australia), 离体微血管环张力测定系统 (620 M, Danish Myo Technology, Denmark), PCR 仪 (ABI, USA), 荧光定量 PCR 仪 (ABI, USA), Chemi DOC XRS + 成像系统 (Bio-Rad, USA), CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Thermo, USA), 倒置生物显微镜 (IX71-F22PH, Olympus, Japan), Leica SP8 TCS 激光共聚焦系统 (Leica, Germany)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠分组和有氧运动模型建立

WKY 和 SHR 随机分为安静对照组 (WKY-C, SHR-C) 和有氧运动组 (WKY-EX, SHR-EX), 每组各 12 只。运动组大鼠先进行 1 周的适应训练, 之后进行 12 周中等强度的跑台运动, 坡度 0°, 每周 5 d, 每天 1 h, 速度为 20 m/min, 相当于 55%~65%  $\dot{V}O_2$  max。WKY-C 和 SHR-C 作为对照组不做运动干预。

#### 1.2.2 大鼠尾动脉无创血压监测

大鼠清醒、安静时的血压和心率 (heart rate, HR) 采用鼠尾动脉智能无创血压仪 (BP-2010A) 测量。

#### 1.2.3 大鼠心血管反应测定

各组大鼠于 12 周有氧运动后, 各选取 6 只, 进行股动静脉置管术测定大鼠心血管反应。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 分别于股动脉和股静脉的近心端 (2 根线) 和远心端 (1 根线) 穿线, 用动脉夹夹住血管近心端, 于远心端结扎部位前剪一小口, 将导管沿着血管行走方向插入管腔, 之后固定导管, 注射 50 IU/mL 的肝素钠 0.5 mL 左右进行封管。术后 24 h 大鼠恢复良好, 在清醒安静状态下测试, 通过 PowerLab 系统连接股动脉插管外侧头, 记录大鼠基础血压。之后在大鼠股静脉分别注射去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE, 18  $\mu$ g/kg) 和 LTCC 阻断剂硝苯地平 (Nifedipine, 1 mg/kg), 观察大鼠血压变化, 每种药物的注射间隔时间在 5 h 以上, 以保证血压恢复正常水平。

#### 1.2.4 HE 染色

取大鼠胸主动脉, 剥离周边组织后进行固定, 经梯度乙醇二甲苯脱水后溶于石蜡, 切片脱蜡后用苏木素和伊红染色, 乙醇二甲苯处理后封片并拍摄, 用 Image J 软件进行测量。每个样本组织切片随机 5 个视野, 每个视野测量 3 次并取平均值, 将 5 个视野的平均值作为胸主动脉壁厚。

#### 1.2.5 免疫蛋白印迹

大鼠胸主动脉低温下与裂解液混匀, 离心后取

上清液测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离等量蛋白质(约 50  $\mu\text{g}$ )并转至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭。加入一抗 Rabbit polyclonal anti- $\alpha_{1\text{C}}$  (1:200), Anti- $\beta_1$  (1:200) 和 GAPDH (1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。第 2 天加入二抗室温孵育 1 h,滴加 ECL 发光液到 PVDF 膜上,放入 Chemi DOC XRS + 成像系统显影。

### 1.2.6 Real time PCR

LTCC  $\alpha_{1\text{C}}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 测定,取胸主动脉的总 RNA 进行常规的 Real time PCR。miR-328 测定采用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒提取胸主

动脉的 miRNA;采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,以 U6 为内参基因,使用 miR-328 含特异茎环结构的引物<sup>[9]</sup>进行反转录反应;cDNA 扩增采用 Power SYBR Green PCR Master Mix 进行反应。LTCC  $\alpha_{1\text{C}}$  亚基 (CACNA1C) 和 LTCC  $\beta_1$  亚基 (CACNB1) 以 GAPDH 为内参照,miR-328 以 U6 为内参照。所有 PCR 反应均重复进行,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行评估,分析目的基因的相对表达。扩增引物由上海吉玛公司合成,序列如下(表 1):

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primers sequences

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
$\alpha_{1\text{C}}$	5'-GCCGCAGTAAAGTCCAATGT-3'	5'-GCACTTCTGTGAGCCAATGA-3'
$\beta_1$	5'-GCCGCGACTACTGCTAATGT-3'	5'-GCACTTAGCTGAGTCAATGA-3'
miR-328	5'-ATTATATCTGGCCCTCTCTGC-3'	5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTC-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'	5'-ACGCTTCCAGAAATTTGCCGTGTC-3'
GAPDH	5'-CCTGCCAAGTATGATGAC-3'	5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'

### 1.2.7 VSMC 原代与传代培养

取 12 周龄健康雄性 WKY,麻醉后,无菌条件下取出大鼠胸主动脉,浸于 HBSS 溶液中,剥离干净动脉周围的脂肪组织,并将动脉内血液排除,呈白色;在胶原酶培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育大鼠动脉约 45 min,剥离动脉外膜,并去除内皮;转移至弹性蛋白酶培养皿中,把动脉剪成细小碎片(1 mm  $\times$  1 mm),37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30~35 min,用巴氏吸管进行反复吹打使组织碎片消失;1800 rpm 离心 10 min,丢弃上清液,将原代 VSMC 用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液培养,放入 37 $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养细胞。当培养皿中 VSMC 密度达 80%~90% 时,加入胰酶进行消化并传代;VSMC 传至 5~7 代且细胞密度达 60%~80% 时进行转染。使用平滑肌特异性肌动蛋白  $\alpha$ -actin 鉴定 VSMC,纯度要达 90%~95% 方可进行后续转染实验。

### 1.2.8 VSMC 免疫荧光染色

吸走培养皿中的培养基,VSMC 于 4% 的多聚甲醛固定 30 min;用 0.2% Triton X-100 对细胞进行膜穿孔孵育 15 min,PBS 清洗 3 次;用 5% BSA 孵育 60 min,封闭非特异性结合抗体部位;滴加一抗 Rabbit Polyclonal to  $\alpha$ -SM-actin (1:200),4 $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育,PBS 清洗 3 次;滴加二抗 Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000),对细胞孵育 60 min,PBS 漂洗后滴加封片剂以盖玻片封片。在 24 h 后激光共聚焦成像系统进行信号捕捉与成像。

### 1.2.9 脂质体转染

取生长状态良好的 VSMC,将细胞随机分为三组 miR-328 mimic 组、miR-328 inhibitor 组和空脂质体 negative control (NC) 组,采用 Lipofectamine RNAiMAX 试剂将各 miR-328 干扰序列转染进 VSMC(表 2)。于转染后 24、48、72、96 h 收集 VSMC 进行蛋白指标检测,于转染后 12、24、48、72 h 收集 VSMC 进行 mRNA 定量。

表 2 各组 miRNA 干扰序列

组别 Groups	序列 Sequences
miR-328 mimics	5'-CUGGCCUCUCUGCCUCCGU-3'
	5'-GGAAGGCCAGAGAGGCCAGUU-3'
miR-328 inhibitor	5'-ACGGAAGGCCAGAGAGGCCAG-3'
NC	5'-UUCUCCGAAGGUGUCAGGUTT-3'
	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

### 1.3 统计学分析

实验数据均以平均值  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ) 表示,使用 GraphPad Prism7 软件作图,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素或双因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 有氧运动对高血压大鼠体重、血压和心率的影响

各组大鼠于运动干预前(12 周龄)和 12 周有氧运动干预后(24 周龄)采用尾动脉无创血压仪测量

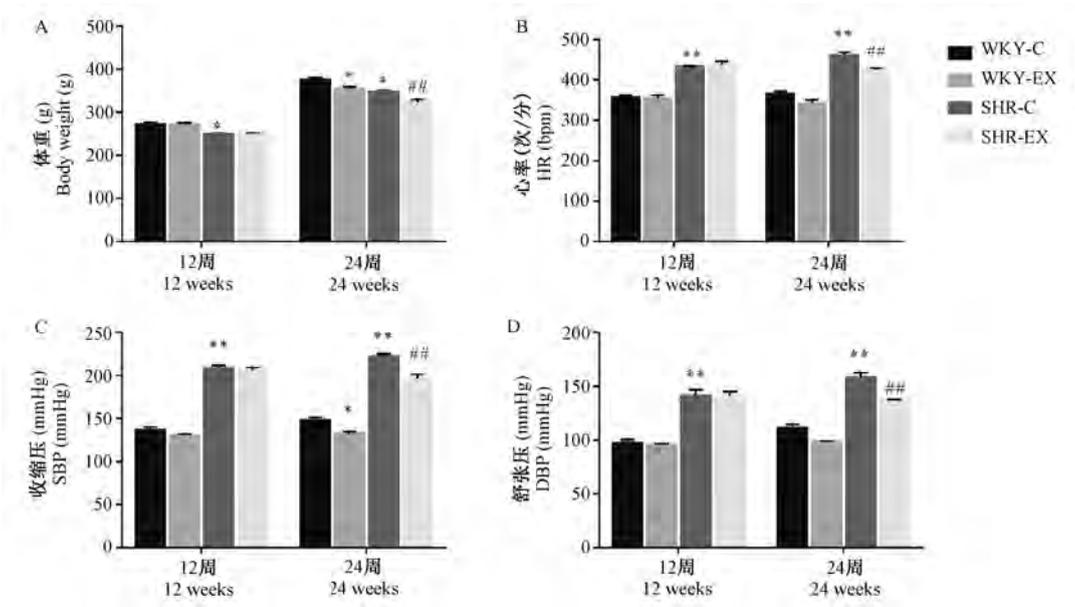
大鼠血压和心率。运动前 SHR-C 组体重显著低于 WKY-C 组 ( $P < 0.05$ ), 而 SHR-C 组的收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) 和 HR 显著高于 WKY-C 组 ( $P < 0.01$ )。WKY-EX 组和 SHR-EX 组体重、SBP、DBP 和 HR 与各自对照组相比均无显著差异 (图 1)。

12 周有氧运动后, WKY-EX 组和 SHR-EX 组体重均显著低于各自对照组 ( $P < 0.05$ ), SHR-C 组体重仍显著低于 WKY-C 组 ( $P < 0.05$ )。WKY-EX 组 SBP

显著低于 WKY-C 组 ( $P < 0.05$ ); SHR-C 组 SBP、DBP 和 HR 显著性高于 WKY-C 组, 而 SHR-EX 组 SBP、DBP 和 HR 显著低于 SHR-C 组 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

## 2.2 有氧运动对各组大鼠胸主动脉形态学的影响

HE 染色观察各组大鼠胸主动脉壁厚变化 (图 2)。WKY-C 组和 WKY-EX 组大鼠胸主动脉壁厚无明显差异, 与 WKY-C 组相比, SHR-C 组胸主动脉管壁明显增厚 ( $P < 0.01$ ); SHR-EX 组胸主动脉壁厚显著小于 SHR-C 组 ( $P < 0.05$ )。

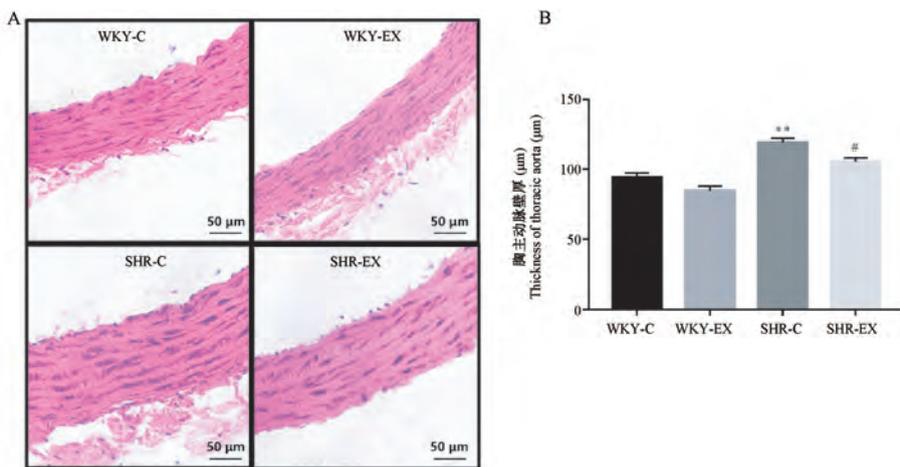


注: 与 WKY-C 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 SHR-C 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。(下同)

图 1 有氧运动对 WKY 和 SHR 体重、血压和心率的影响 ( $n = 12$ )

Note. Compared with group WKY-C, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with group SHR-C, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ . (The same in the next figures)

Figure 1 Effects of aerobic exercise on body weight, blood pressure and heart rate of WKY and SHR ( $n = 12$ )



注: A: 胸主动脉的组织学结构 (HE 染色,  $\times 400$ , 标尺 =  $50 \mu\text{m}$ ); B: 胸主动脉壁厚统计柱状图。

图 2 有氧运动对各组大鼠胸主动脉壁厚的影响 ( $n = 6$ )

Note. A. Histological structure of the thoracic aorta (HE staining,  $\times 400$ . Bar =  $50 \mu\text{m}$ ). B. Statistical histogram of thoracic aortic wall thickness.

Figure 2 Effects of aerobic exercise on the thickness of thoracic aortic aorta of rats ( $n = 6$ )

### 2.3 有氧运动对各组大鼠心血管反应的影响

各组大鼠于 12 周有氧运动后,采用股动静脉置管术监测大鼠的心血管反应。在体股静脉注射 NE (18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 后,四组大鼠血压均显著增加;与 WKY-C 组相比,SHR-C 组注射 NE 后平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 升高幅度 ( $\Delta\text{MAP}$ ) 显著增加 ( $P < 0.05$ );与 SHR-C 组相比,SHR-EX 组注射 NE

后  $\Delta\text{MAP}$  显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 3A、3C)。

股静脉注射 Nifedipine (1  $\text{mg}/\text{kg}$ ) 后,四组大鼠血压明显下降;SHR-C 组大鼠 MAP 下降幅度最明显,且显著高于 WKY-C 组的下降幅度 ( $P < 0.05$ );与 SHR-C 组相比,SHR-EX 组大鼠 MAP 降低幅度明显减少 ( $P < 0.05$ );WKY-C 组与 WKY-EX 组 MAP 降低幅度无明显差异 (图 3B、3D)。

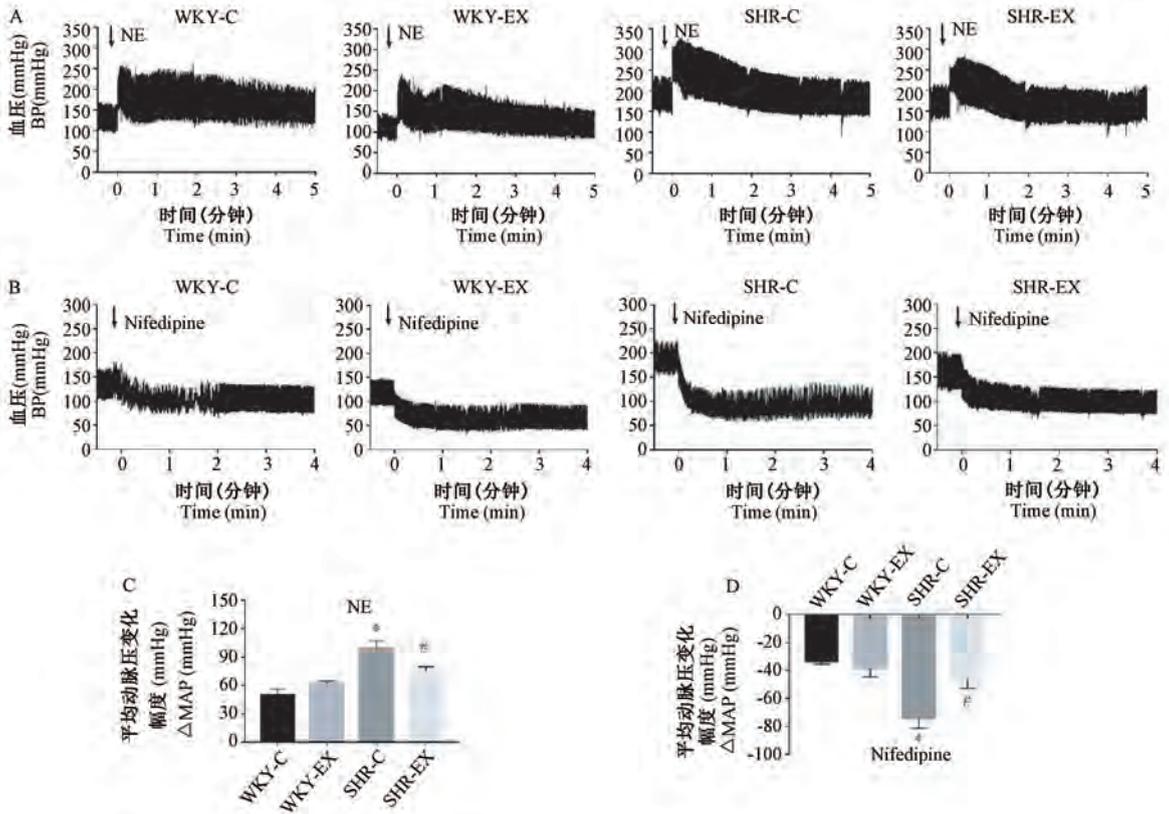


图 3 有氧运动对各组大鼠心血管反应的影响 ( $n=6$ )

Figure 3 Effects of aerobic exercise on cardiovascular response of rats ( $n=6$ )

### 2.4 有氧运动对高血压大鼠胸主动脉 LTCC $\alpha_{1C}$ 和 $\beta_1$ 亚基 mRNA 和蛋白表达的影响

qPCR 检测各组胸主动脉中 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基与相应的 GAPDH 的 mRNA 相对表达值 (图 4A、4B)。SHR-C 组 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  的 mRNA 的表达量明显高于 WKY-C 组 ( $P < 0.01$ )。经 12 周有氧运动后,WKY-EX 组和 SHR-EX 组的 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  的 mRNA 表达量都呈现下降趋势,但与各自对照组相比较,SHR-EX 的表达量显著性下调 ( $P < 0.01$ ),而 WKY-EX 组表达量无显著性差异。

Western Blot 检测各组胸主动脉 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基与相应的 GAPDH 的蛋白相对表达值 (图 4B、4D)。与 WKY-C 组相比,SHR-C 组胸主动脉中

LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  表达显著上调 ( $P < 0.01$ )。与 SHR-C 组相比,SHR-EX 组的 LTCC  $\alpha_{1C}$  蛋白表达呈显著性下调 ( $P < 0.05$ ),LTCC  $\beta_1$  蛋白表达呈非常显著性下调 ( $P < 0.01$ )。WKY-EX 组中  $\alpha_{1C}$  蛋白表达相比于 WKY-C 组也有所下降,但表达不明显。

### 2.5 有氧运动促进高血压大鼠胸主动脉中 miR-328 表达增加

运动对胸主动脉中 miR-328 与相应的 U6 相对表达值 (图 5)。与 WKY-C 相比,SHR-C 组中 miR-328 的表达呈现显著性降低 ( $P < 0.01$ )。通过 12 周有氧运动后,与各自对照组相比,SHR-EX 组中 miR-328 表达明显升高 ( $P < 0.05$ ),WKY-EX 组无显著性差异 (图 5)。

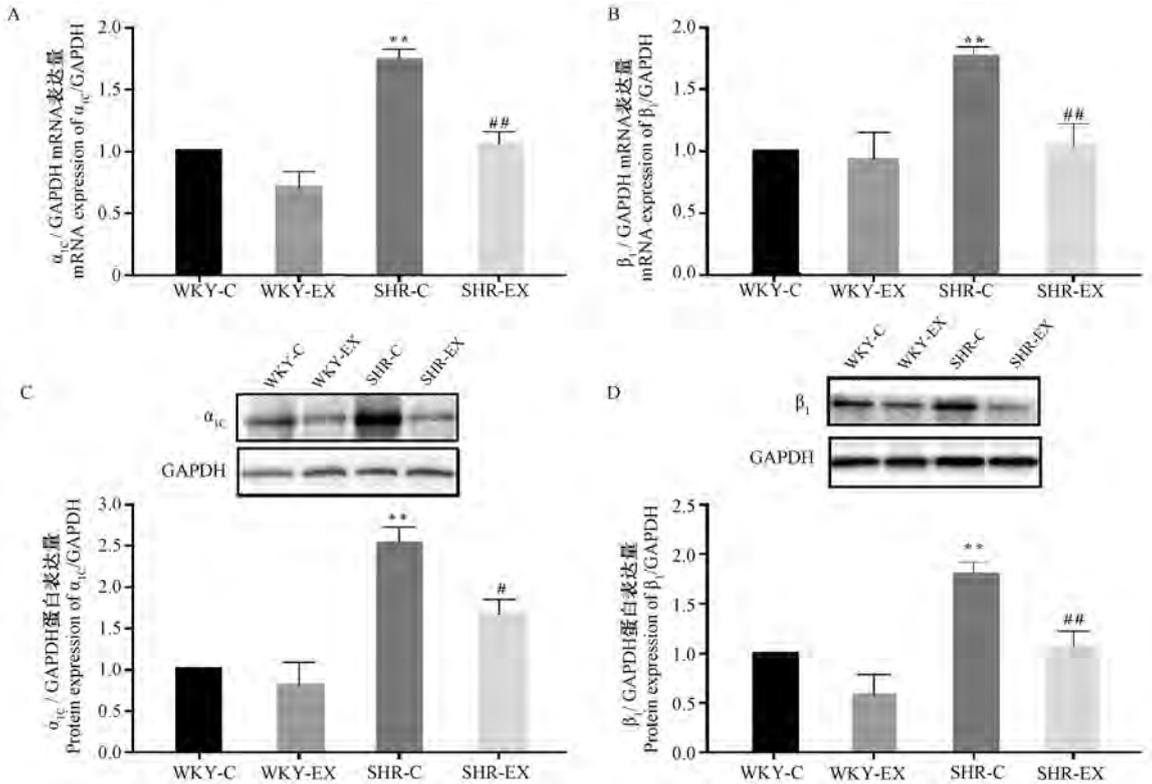


图 4 各组大鼠胸主动脉 LTCC  $\alpha_{1c}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达 ( $n=6$ )

Figure 4 The mRNA and protein expression of LTCC  $\alpha_{1c}$  and  $\beta_1$  subunits in thoracic aorta from four groups ( $n=6$ )

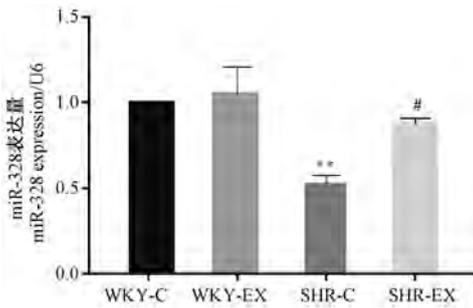


图 5 各组大鼠胸主动脉 miR-328 表达 ( $n=6$ )

Figure 5 Expression of miR-328 normalized to U6 in rat thoracic aorta ( $n=6$ )

## 2.6 miR-328 靶向调控 LTCC $\alpha_{1c}$ 和 $\beta_1$ 亚基 mRNA 和蛋白表达

### 2.6.1 VSMC 鉴定

如图 6 所示,大鼠 VSMC 原代提取、培养并传代,用平滑肌特异性肌动蛋白  $\alpha$ -actin 免疫荧光染色进行鉴定,通过激光共聚焦显微镜拍摄发现,VSMC 骨架蛋白  $\alpha$ -actin 清晰可见,细胞质内存在大量红色的细丝,表明培养的细胞为 VSMC。

### 2.6.2 miR-328 对 LTCC $\alpha_{1c}$ 亚基 mRNA 和蛋白表达量的影响

离体转染 12、24、48、72 h 后检测 VCSMs 内

LTCC  $\alpha_{1c}$  亚基 mRNA 表达, qPCR 结果如图 7A, 与相同时间段的 NC 组相比,  $\alpha_{1c}$  mRNA 表达在瞬时转染 miR-328 mimic 组 24 h 出现下降趋势 ( $P>0.05$ ), 48 h 表达呈显著性降低 ( $P<0.01$ ); 转染 miR-328 inhibitor 组的  $\alpha_{1c}$  mRNA 表达量在 24 h ( $P<0.01$ ) 和 48 h ( $P<0.05$ ) 呈显著性上调。

离体转染 24、48、72、96 h 后检测 VCSMs 内 LTCC  $\alpha_{1c}$  亚基蛋白表达, Western Blot 结果如图 7B、7C, 与同时间段 NC 组相比, 转染 miR-328 mimic 组的  $\alpha_{1c}$  蛋白表达量在 48 h ( $P<0.05$ ) 和 72 h ( $P<0.01$ ) 蛋白

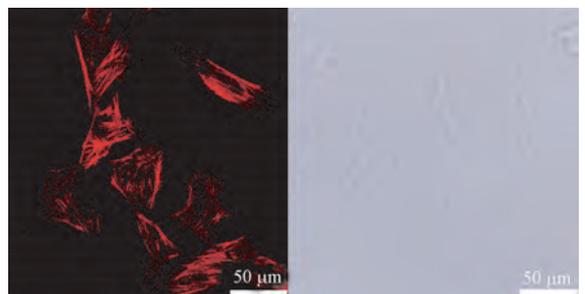


图 6 平滑肌特异性肌动蛋白  $\alpha$ -actin 免疫荧光标记的 VSMC 代表图

Figure 6 Representative immunofluorescence images of VSMC stained with  $\alpha$ -SM-actin

表达量显著降低,而 miR-328 inhibitor 组中  $\alpha_{1C}$  的蛋白表达量在 48 h ( $P < 0.01$ ) 和 72 h ( $P < 0.05$ ) 显著上调。由此可见, miR-328 对体外培养的 VSMC 的 LTCC  $\alpha_{1C}$  亚基有明显的抑制作用。

### 2.6.3 miR-328 对 LTCC $\beta_1$ 亚基 mRNA 和蛋白表达量的影响

离体转染 12、24、48、72 h 后检测 VCSMs 内 LTCC  $\beta_1$  亚基 mRNA 表达, qPCR 结果显示如图 7D, 与相同时间段 NC 组相比, 转染 miR-328 mimic 组的  $\beta_1$  mRNA 表达在 24 h 显著下调 ( $P < 0.05$ ), 而转染 miR-328 inhibitor 组的  $\beta_1$  mRNA 的表达量在 24 h ( $P < 0.05$ )、48 h ( $P < 0.01$ ) 和 72 h ( $P < 0.05$ ) 呈显著性上调。

离体转染 24、48、72、96 h 后检测 VCSMs 内 LTCC  $\beta_1$  亚基蛋白表达, Western Blot 结果如图 7B、7E, 与同时间段 NC 组相比, 转染 miR-328 mimic 组的  $\beta_1$  蛋白表达在 48 h ( $P < 0.01$ ) 和 72 h ( $P < 0.05$ ) 呈显著性下调, 而转染 miR-328 inhibitor 组中  $\beta_1$  的蛋白表达 48 h ( $P < 0.01$ ) 和 72 h ( $P < 0.05$ ) 呈显著性上调。由此可见, miR-328 对体外培养的 VSMC 的 LTCC  $\beta_1$  亚基有明显的抑制作用。

## 3 讨论

本文研究了 12 周规律有氧运动对 SHR 胸主动脉 LTCC 表达的影响, 并探讨了 miR-328 在其中的

靶向作用。结果表明, 与 WKY-C 组相比, SHR-C 胸主动脉 miR-328 表达下调, LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基的表达上调; 12 周有氧运动后可增加 SHR 胸主动脉 miR-328 表达, 靶向抑制 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基的表达, 从而有效降低 SHR 血压。

胸主动脉作为人体最大的弹性血管, 在维持整个心动周期中动脉血压的相对稳定起重要作用。因此, 我们选取胸主动脉作为研究对象。研究表明, 高血压的发生、发展与血管结构和功能变化密切相关, 主要表现为血管内皮细胞功能障碍, 血管平滑肌细胞增生, 血管壁增厚, 管腔狭窄, 血管顺应性下降, 导致血压增加<sup>[17]</sup>。有氧运动可有效降低高血压大鼠的血压和心率作用涉及多种机制<sup>[18]</sup>。如长期运动导致心脏和动脉结构及功能发生适应性变化, 心交感神经减弱, 迷走张力增高, 主动脉及大动脉血管顺应性变大, 外周血管阻力减弱, 内皮功能改善等, 从而降低心率和血压<sup>[19]</sup>。本研究 SHR-C 组胸主动脉的管壁厚度明显高于 WKY-C 组, 而 SHR-EX 组胸主动脉壁厚明显低于 SHR-C 组, 说明 12 周有氧运动可以明显改善高血压大鼠血管壁厚的现象。

LTCC 是 VSMC 上的一种  $Ca^{2+}$  通道, 有两个主要亚基  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$ ,  $\alpha_{1C}$  主要控制细胞外的钙离子内流,  $\beta_1$  则负责  $\alpha_{1C}$  生理功能的激活, 二者共同作用参与 LTCC 功能的多样性<sup>[20]</sup>。研究证明, 血管 LTCC 亚单位组成是动脉张力和血压水平的决定因素<sup>[21]</sup>。

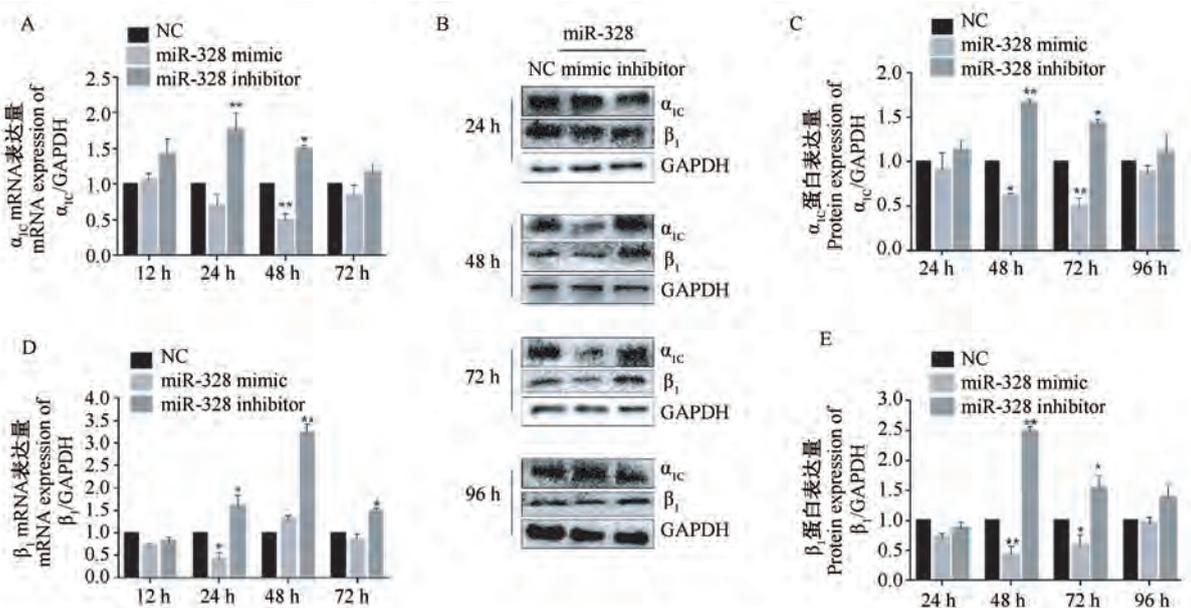


图 7 VSMC 转染 miR-328 mimic 或 inhibitor 后 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达 ( $n=6$ )

Figure 7 The mRNA and protein expression of LTCC  $\alpha_{1C}$  and  $\beta_1$  subunits after transfection with miR-328 mimic or inhibitor in VSMC ( $n=6$ )

LTCC 表达和功能异常会导致肌源性张力和血压的异常变化, VSMC 中 LTCC 上调是高血压的一个特异性标志<sup>[22]</sup>。为了研究 LTCC 功能在血压调控中的作用, 我们通过体静脉注射 NE 和 Nifedipine (LTCC 特异性阻断剂), 结果发现运动可明显降低高血压大鼠对 NE 的升压反应和 Nifedipine 的降压反应。说明高血压大鼠 LTCC 功能显著上调, 而有氧运动后可显著降低 LTCC 在调控血压中的功能亢奋。高血压血管平滑肌 LTCC 表达的增多被认为是其功能上调的原因。高血压模型 VSMC 膜上 LTCC 表达增加, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流增加, 从而引起血管收缩<sup>[23]</sup>。本研究 Western Blot 和 qPCR 检测结果亦表明, 高血压大鼠胸主动脉中 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达显著高于正常血压大鼠, 而经 12 周有氧运动后高血压大鼠的 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达明显降低。运动后 LTCC 表达降低可导致 LTCC 功能下调, 这可能是导致血管功能改善的因素之一。

表观遗传学是指在没有改变基因序列的情况下发生的基因表达的变化, 表观遗传修饰主要包括 DNA 甲基化、组蛋白质修饰和非编码 miRNA<sup>[24]</sup>。已证实 miRNA 在高血压血管重构中具有重要作用, 可调控 VSMC 的增殖、分化、凋亡和表型转换, 为心血管疾病提供新的治疗靶点<sup>[25]</sup>。miRNA 作为重要的表观调控机制之一, 很多研究表明, 规律运动可以通过表观遗传调控改善高血压<sup>[26-27]</sup>。有氧运动可使 SHR 主动脉中 miR-27a 和 miR-155 上调, miR-143 下调, 改善肾素-血管紧张素系统平衡, 进而减弱胸主动脉重构和血压<sup>[28]</sup>。Liao 等<sup>[29]</sup>发现在运动干预过程中, miR-145 上调可能参与了高血压动脉 VSMC 从去分化表型向收缩表型的转变, 从而改善血压。在本研究中, SHR-C 组胸主动脉 miR-328 的表达显著低于 WKY-C 组, 而 SHR-EX 组胸主动脉 miR-328 表达显著高于 SHR-C 组。说明 miR-328 的表达与 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达呈高度负相关, 有氧运动可诱导高血压大鼠胸主动脉 miR-328 升高, 靶向抑制 LTCC 亚基表达从而降低血压。研究发现肺动脉高压时, miR-328 可以抑制 LTCC  $\alpha_{1C}$  亚基的表达, 减弱肺动脉重塑<sup>[11]</sup>。Lu 等<sup>[10]</sup>在小鼠心肌细胞培养过程中发现, 敲除 miR-328 导致  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  蛋白表达的增高。为了进一步验证 miR-328 对胸主动脉 VSMC LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基表达的负调控作用。我们进行了胸主动脉 VSMC 体

外培养, 脂质体转染 miR-328 mimic, miR-328 inhibitor 使之过表达或沉默, 也证实 miR-328 可靶向抑制 LTCC  $\alpha_{1C}$  及  $\beta_1$  亚基 mRNA 和蛋白表达。

有氧运动可通过调节 miRNA 的水平, 调控心血管相关基因及蛋白表达, 进而起到保护心血管作用。本研究通过股动静脉置管术、HE 染色、qPCR、Western Blot、细胞培养和转染等技术, 从心血管反应、动脉形态结构、LTCC 及 miR-328 表达, 证明了规律有氧运动可有效降低 SHR 血压, 调控 miR-328 在转录后靶向抑制 LTCC  $\alpha_{1C}$  和  $\beta_1$  亚基的表达, 提示 miR-328 可能是运动改善高血压胸主动脉 LTCC 重构的机制之一, 为运动促进心血管健康提供了理论依据。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, et al. L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism[J]. *Circ Res*, 2004, 95(4): 406-414.
- [2] de Waard M, Gurnett CA, Campbell KP. Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels[J]. *Ion Channels*, 1996, 4: 41-87.
- [3] Cheng J, Wen J, Wang N, et al. Ion channels and vascular diseases[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(5): e146-e156.
- [4] Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, et al. Upregulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR[J]. *Hypertension*, 2002, 40(2): 214-219.
- [5] Hirehallur-S DK, Haworth ST, Leming JT, et al. Upregulation of vascular calcium channels in neonatal piglets with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(5): L915-L924.
- [6] Bútkai S, Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14(1): 79-87.
- [7] Shi L, Liao J, Liu B, et al. Mechanisms and therapeutic potential of microRNAs in hypertension[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(10): 1188-1204.
- [8] Liao J, Zhang Y, Ye F, et al. Epigenetic regulation of L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mesenteric arteries of aging hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2017, 40(5): 441-449.
- [9] 张严焱, 徐召霞, 陈渝, 等. 运动改善高血压肠系膜动脉 LTCC 和 BKCa 通道功能的表观遗传调控机制[J]. *体育科学*, 2018, 38(11): 39-49.  
Zhang YY, Xu ZX, Chen Y, et al. Epigenetic regulation of exercise-improved LTCC and BKCa channels function in hypertension mesenteric arteries[J]. *Chin Sport Sci*, 2018, 38(11): 39-49.
- [10] Lu Y, Zhang Y, Wang N, et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation [J].

- Circulation, 2010, 122(23): 2378–2387.
- [11] Guo L, Qiu Z, Wei L, et al. The microRNA-328 regulates hypoxic pulmonary hypertension by targeting at insulin growth factor 1 receptor and L-type calcium channel- $\alpha_{1C}$  [J]. Hypertension, 2012, 59(5): 1006–1013.
- [12] Shi L, Zhang H, Chen Y, et al. Chronic exercise normalizes changes in Cav 1.2 and KCa 1.1 channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(7): 1846–1858.
- [13] 鲁妮, 陈渝, 邱方, 等. 不同强度运动对自发性高血压大鼠肠系膜动脉 CaV1.2 通道重构的影响[J]. 体育科学, 2015, 35(06): 57–63.
- Lu N, Chen Y, Qiu F, et al. Effects of varied-intensity of exercise on Cav1.2 channel remodeling in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats[J]. Chin Sport Sci, 2015, 35(6): 57–63.
- [14] 单美玲, 陈渝, 张严焱, 等. PKC $\alpha$ /CaV1.2 在有氧运动改善高血压肠系膜动脉功能中的作用[J]. 体育科学, 2019, 39(11): 57–66.
- Shan ML, Chen Y, Zhang YY, et al. The effect of aerobic exercise on the improvement of the mesenteric artery function in hypertension through PKC $\alpha$ /CaV1.2 pathway [J]. Chin Sport Sci, 2019, 39(11): 57–66.
- [15] Ling C, Rönn T. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(7): 1015–1018.
- [16] Wang J, Gong L, Tan Y, et al. Hypertensive epigenetics: from DNA methylation to microRNAs[J]. J Hum Hypertens, 2015, 29(10): 575–582.
- [17] Safar ME, Toto-Moukoko JJ, Bouthier JA, et al. Arterial dynamics, cardiac hypertrophy, and antihypertensive treatment [J]. Circulation, 1987, 75(1): I156–I161.
- [18] Vina J, Sanchis GF, Martinez BV, et al. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise [J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(1): 1–12.
- [19] Sabbahi A, Arena R, Elokda A, et al. Exercise and hypertension: uncovering the mechanisms of vascular control[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2016, 59(3): 226–234.
- [20] Perez RE, Schneider T. Molecular biology of calcium channels [J]. Kidney Int, 1995, 48(4): 1111–1124.
- [21] Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, et al. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 44(3): 131–142.
- [22] Joseph BK, Thakali KM, Moore CL, et al. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches [J]. Pharmacol Res, 2013, 70(1): 126–138.
- [23] Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, et al. Membrane depolarization, elevated Ca<sup>2+</sup> entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(6): H2559–H2567.
- [24] 汪波, 占贞贞, 曾麒麟. 心肌纤维化的表观遗传调控研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(03): 92–97.
- Wang B, Zhan ZZ, Zeng QY. The epigenetic regulation of myocardial fibrosis: an update[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 92–97.
- [25] Jones Buie JN, Goodwin AJ, Cook JA, et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors[J]. Atherosclerosis, 2016, 254: 271–281.
- [26] Denham J. Exercise and epigenetic inheritance of disease risk [J]. Acta Physiol, 2018, 222(1): e12881.
- [27] Improta CAC, Nonaka CKV, Pereira CS, et al. Exercise training-induced changes in micromas: beneficial regulatory effects in hypertension, type 2 diabetes, and obesity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3608.
- [28] Gu Q, Wang B, Zhang XF, et al. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Pathol, 2014, 23(5): 298–305.
- [29] Liao J, Zhang Y, Wu Y, et al. Akt modulation by miR-145 during exercise-induced VSMC phenotypic switching in hypertension[J]. Life Sci, 2018, 199: 71–79.

[收稿日期] 2020-06-08

郭文文,师长宏,李苗苗,等. 前列腺癌免疫人源化小鼠模型的构建及鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 759-764.  
Guo WW, Shi CH, Li MM, et al. Establishment and identification of an immune-humanized mouse model of prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 759-764.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.004

# 前列腺癌免疫人源化小鼠模型的构建及鉴定

郭文文<sup>1,2</sup>, 师长宏<sup>2</sup>, 李苗苗<sup>2</sup>, 乔天运<sup>2</sup>, 赵菊梅<sup>1\*</sup>, 张彩勤<sup>2\*</sup>

(1. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

**【摘要】目的** 构建免疫系统人源化的小鼠模型,并移植入人前列腺癌细胞系,以期用于前列腺癌免疫治疗药物研究。**方法** 利用 Ficoll 密度梯度离心法,从新鲜的人外周血中分离出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),经尾静脉注射 NPG 小鼠,构建具有人免疫系统的小鼠模型。注射后第 3、4、5、6 周分别采用断尾法采集小鼠外周血,并用流式细胞仪监测小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞的动态变化水平。在注射后第 3 周给予小鼠皮下移植  $1 \times 10^7$  个前列腺癌 22Rv1 细胞,每周两次监测肿瘤生长情况。当肿瘤生长至  $1000 \text{ mm}^3$  左右,对小鼠施行安乐死;利用流式细胞术、免疫组化、HE 染色等方法分析人源化小鼠外周血、脾及肿瘤组织中免疫细胞的浸润情况。**结果** 模型小鼠在移植人 PBMC 后 3~6 周期间,外周血中检测到较高水平的 CD45 + CD3 + T 细胞。第 6 周时处死小鼠,HE 染色和免疫组化染色结果表明,模型小鼠的脾和肿瘤组织中具有人 CD4 +、CD8 + T 细胞的浸润。**结论** 成功构建了前列腺癌免疫人源化小鼠模型,其外周血、脾及前列腺癌肿瘤组织中均有高水平的人源性 T 细胞浸润,为下一步构建良好的前列腺癌免疫治疗临床前模型奠定了基础。

**【关键词】** 外周血单个核细胞;免疫人源化;前列腺癌;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0759-06

## Establishment and identification of an immune-humanized mouse model of prostate cancer

GUO Wenwen<sup>1,2</sup>, SHI Changhong<sup>2</sup>, LI Miaomiao<sup>2</sup>, QIAO Tianyun<sup>2</sup>, ZHAO Jumei<sup>1\*</sup>, ZHANG Caiqin<sup>2\*</sup>

(1. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, China.

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: ZHANG Caiqin. E-mail: zhangcai-qin-bei@163.com; ZHAO Jumei. E-mail: jzm2003.stu@163.com

**【Abstract】 Objective** An ideal animal model for the study of prostate cancer (Pca) immunotherapy is needed. We aimed to establish a mouse model humanized for the immune system and then transplant these mice with human Pca cells. **Methods** To humanize mice with a reconstructed human immune system, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from fresh human peripheral blood by density gradient centrifugation and injected into NOD-scid *Il2rg*<sup>-/-</sup> mice via the caudal vein. Peripheral blood from these mice was collected at the 3rd, 4th, 5th and 6th weeks following injection, and dynamic changes in human CD45+CD3+ T cells were monitored using flow cytometry analysis. At the 3rd week after humanization, cells from the Pca cell line 22Rv1 were subcutaneously implanted into the right flank of humanized mice. Tumor growth was monitored twice a week. When the tumor grew to about  $1000 \text{ mm}^3$ , the mice were euthanized. The infiltration of human immune cells in the peripheral blood, spleen and tumor tissues of humanized mice was analyzed by flow cytometry, immunohistochemistry (IHC) and hematoxylin and eosin (HE) staining. **Results** High levels

**【基金项目】**陕西省创新能力支撑计划(2020PT-005),国家自然科学基金(31772546)。

Funded by Shaanxi Provincial Innovation Capability Support Program(2020PT-005), National Natural Science Foundation of China(31772546)。

**【作者简介】**郭文文(1993—),女,硕士生,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: 2399316897@qq.com

**【通信作者】**张彩勤,女,副教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email: zhangcai-qin-bei@163.com;

赵菊梅,女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子病理与药物研究。Email: jzm2003.stu@163.com。

\* 共同通信作者

of CD45+CD3+ T cells were detected in the peripheral blood of mice from 3 to 6 weeks after PBMC transplantation. The mice were euthanized at the 6th week and the result of HE and IHC staining demonstrated that the spleen and tumor tissues of the mice were infiltrated by human immune cells CD4+ and CD8+ T cells. **Conclusions** The immune-humanized mouse model of Pca was successfully established. This model showed high levels of human immune T cells in the peripheral blood, spleen and Pca tissues, laying a foundation for the construction of an ideal preclinical model of immunotherapy for Pca.

**[Keywords]** peripheral blood mononuclear cells; humanization of immunity; prostate cancer; mouse

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

前列腺癌是男性泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤之一,并且随着我国人口老龄化趋势不断明显,其发病率也呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。由于前列腺癌的早期发展依赖于雄激素,主要治疗方法为根治性手术治疗、内分泌治疗及放射治疗等。然而,大多数患者经治疗产生一段时间反应后会复发,发展为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)<sup>[3]</sup>。而目前 CRPC 有效的治疗方法尚不明确,迫切需要探索新的治疗方法。近年来,免疫疗法在前列腺癌的治疗上取得了快速发展,它可通过激活宿主免疫细胞特异性攻击前列腺癌细胞产生特异性抗肿瘤免疫反应<sup>[4-5]</sup>。然而,传统的前列腺癌细胞系移植(cell derived xenograft, CDX)模型因缺乏完整的人免疫系统,无法用于免疫治疗研究。本研究主要目的是构建具有人免疫系统的人源化肿瘤小鼠模型,期望能够用于肿瘤免疫药物的研发及临床前评估。

NOD-PrkdcscidIl2rg<sup>ml</sup>/Vst(NPG)小鼠是一种先天性 T、B 与 NK 细胞三重免疫缺陷动物。与国外的 NSG 或 NOG 一样,均为 NOD-Prkdcscid Il2rg<sup>ml</sup> 小鼠,是目前国际公认的免疫缺陷程度最高的小鼠模型,同时也是最好的人源细胞移植的受体。将人外周血中分离的 PBMC 移植入 NPG 小鼠体内,可以重建以成熟 T 淋巴细胞为主的人免疫系统,在此基础上进一步移植人肿瘤细胞而构建的模型,即为人源化肿瘤模型。其模拟人体的生理、病理变化,可以给肿瘤提供与人体更相似的生长微环境。同时,肿瘤基质包含了人源免疫细胞成分,在阐明发病机制及肿瘤靶向治疗与肿瘤发生、发展、转移机制等研究方面具有重要的应用价值,尤其在研究肿瘤免疫治疗方面,是更理想的肿瘤模型<sup>[6-8]</sup>。但外周血中 PBMC 在 NPG 小鼠体内免疫重建时相及动态过程有待进一步研究。因此,本研究采用密度梯度离心法从新鲜人外周血中分离出 PBMC,通过尾静脉注射 NPG 小鼠,建立人源化小鼠模型;并植入前列腺癌细胞系 22Rv1 细胞,构建 Hu-CDX 模型,探讨

NPG 小鼠移植入人 PBMC 后免疫重建的水平及肿瘤生长情况,以期能为肿瘤免疫治疗药物的评估提供理想的临床前动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

12 只 4~5 周龄 SPF 级雄性 NPG 小鼠,体重 22~25 g, 购买于北京维通达生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0002】。饲养于中国人民解放军空军军医大学实验动物中心屏障环境【SYXK(陕)2019-001】。环境温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,12 h 光照/12 h 黑暗。饲料及饮水均经无菌处理,小鼠自由摄食和饮水。相关动物实验获得了空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(No. 16013)。

#### 1.1.2 细胞系

人前列腺癌细胞 22Rv1 细胞购买于 ATCC,该细胞培养于 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清 + 1%青链霉素)置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

2 份新鲜外周血供体取自空军军医大学第一附属医院输血科,并获得医学伦理委员会批注(KY20193035);胎牛血清、RPMI-1640 培养基和 0.25% 胰酶购自美国 Gibco 公司;人 Ficoll-PaqueTMPREMIUM 1.084 sterile solution 试剂购自美国 GE Healthcare;小鼠淋巴细胞分离液试剂购自天津市灏洋生物科技发展有限公司;抗人流式检测抗体:PE-CD3e 抗体, FITC-CD45 抗体为美国 BD Biosciences 产品;IHC 试剂盒购买于康为世纪有限公司;抗人 CD45、CD4 和 CD8 抗体购于英国 abcam 公司。FC500(Beckman Coulter)和 Flow Jo 软件用于流式细胞采集与数据分析。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

NPG 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为供体 1

重建组、供体 2 重建组及未重建对照组,共 3 组,每组 4 只。

### 1.2.2 人源化小鼠模型的建立

采用 Ficoll 密度梯度离心法提取人新鲜外周血中 PBMC 备用。重建组每只小鼠通过尾静脉注射  $1 \times 10^7$  个 PBMC,未重建对照组给予等体积的生理盐水。所有动物均饲养在 SPF 级环境,动态监测每组小鼠各项指标的变化情况。

### 1.2.3 流式细胞术监测小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平

移植后第 3、4、5、6 周分别用断尾法取两个免疫重建组小鼠尾静脉血,并分离出 PBMC 制成单个细胞悬液,分别标记抗人 CD3 +、CD45 + T 细胞荧光抗体后,进行流式细胞分析,动态监测小鼠外周血中人免疫细胞的重建水平。流式细胞仪所检测数据,采用 FlowJo 7.6.1 软件分析及绘图。

### 1.2.4 Hu-CDX 模型的建立

当供体 1 和供体 2 重建的小鼠外周血中人免疫细胞 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25% 时,标志人源化小鼠模型构建成功。接下来我们将对数生长期的 22Rv1 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,最终用无菌 PBS 缓冲液和基质胶 Matrigel 基质胶以 1:1 将  $1 \times 10^7$  个 22Rv1 细胞重悬至 200  $\mu$ L,皮下接种于构建成功的免疫人源化小鼠。

### 1.2.5 肿瘤生长监测及免疫浸润分析

小鼠生物学特征观察:每天观察精神状态、饮食、活动力、体重、毛顺滑度及肿瘤的生长等情况。

肿瘤细胞接种后,一周 2 次监测肿瘤体积,并绘制肿瘤生长曲线。肿瘤体积计算方法:  $V(\text{mm}^3) = \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}^2(\text{mm}^2) / 2$ 。当肿瘤长至 1000  $\text{mm}^3$  左右,实验终止时小鼠采用吸入  $\text{CO}_2$  安乐死,收集模型鼠的肿瘤组织和脾组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,作组织切片,进行 HE 染色以及免疫组化染色,在显微镜下观察染色结果。

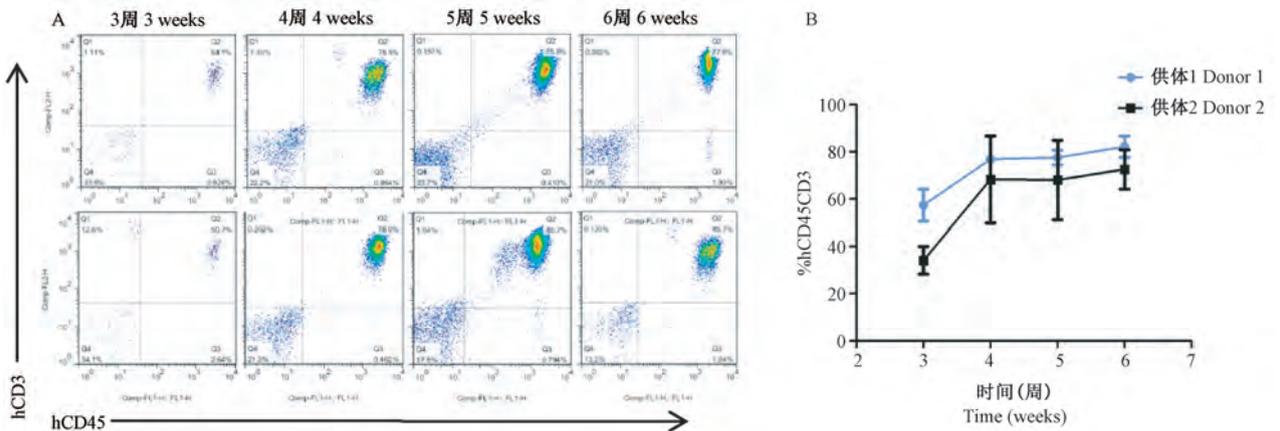
### 1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 *t* 检验法进行组间差异性分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建免疫系统人源化小鼠模型

将供体 1 来源的人 PBMC 注射入重建移植组小鼠体内,于第 3、4、5、6 周流式细胞术动态监测小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞比例。如图 1A 显示,注射后第 3 周即可检测到人源免疫细胞 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25%,标志着人源化小鼠模型构建成功。随着重建时间的延长,人 CD45 + CD3 + T 细胞明显上升,到第 6 周达到约 77.4% ~ 86.7%。此外,我们还用供体 2 来源的 PBMC 进行了免疫重建,流式数据分析发现两组供体免疫系统重建水平存在差异;人源化小鼠一般在重建第 6 周即出现包括体重下降、弓背、脱毛等移植抗宿主反应 (GVHD) (图 1B)。



注:A:在第 3、4、5、6 周流式监测供体 1 重建小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞百分比;B:供体 1 和供体 2 重建小鼠外周血中人 CD45 + CD3 + T 细胞的水平 (n=4)。

图 1 NPG 小鼠人源化重建后外周血中人免疫细胞的百分比

Note. A. The percentage of human CD45 + CD3 + T cells in the peripheral blood of donor 1 reconstructed mice was monitored by flow cytometry at the 3rd, 4th, 5th and 6th week. B. The level of human CD45 + CD3 + T cells in peripheral blood of mice reconstructed by donor 1 and donor 2 (n=4).

Figure 1 Percentages of human immune cells in peripheral blood of NPG mice after humanization

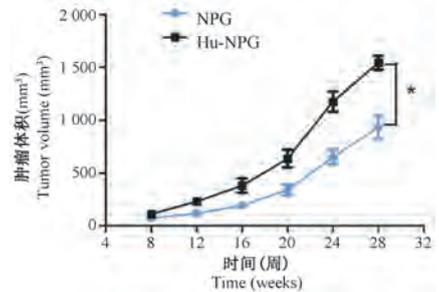
## 2.2 前列腺癌 Hu-CDX 模型的构建与评估

人源化小鼠模型于第 3 周重建成功后,进一步将人前列腺癌细胞 22Rv1 皮下移植入小鼠右侧腋下,并以正常的 NPG 小鼠为对照组。定期测量肿瘤的生长情况。结果如图 2 显示,两组小鼠中均有肿瘤生长,随着时间延长肿瘤体积增大,且 22Rv1 细胞系在人源化小鼠中生长速度缓慢,与正常的 NPG 小鼠相比有显著差别 ( $P < 0.05$ )。待肿瘤生长到  $1000 \text{ mm}^3$  左右后,对小鼠进行安乐死处理,进一步固定肿瘤组织,免疫组化染色后进行单位面积阳性细胞数量分析,观察到人免疫重建组中每只 CDX 模型鼠的肿瘤组织中均有 CD45 + 细胞及 CD4 +、CD8 + T 细胞的明显浸润,HE 染色发现免疫人源化与非人源化小鼠肿瘤细胞的组织细胞形态没有显著性改变(见图 3A、3B)。综上,重建的人免疫系统可能具有抑制肿瘤生长的作用。

## 2.3 人源化小鼠免疫器官中人免疫细胞浸润情况

为了进一步研究人免疫系统重建后小鼠脾内

人源免疫细胞的浸润情况,我们利用免疫组织化学染色方法检测了免疫重建 6 周后小鼠脾内人 CD4 + 和 CD8 + T 细胞表达情况。结果显示,人 CD4 +、CD8 + T 细胞在重建小鼠脾组织中大量表达(T 细胞膜着染棕黄色);对照组小鼠脾中未见人源细胞表达(图 4A、4B)。

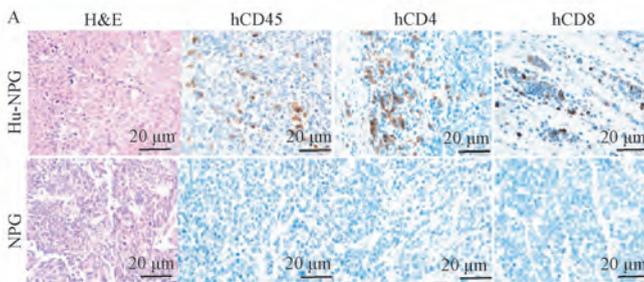


注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ 。

图 2 Hu-NPG 与 NPG 小鼠接种 22Rv1 细胞后肿瘤的生长曲线 ( $n=4$ )

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

Figure 2 Growth curve of tumor in humanized mice after inoculated with 22Rv1 cells ( $n=4$ )

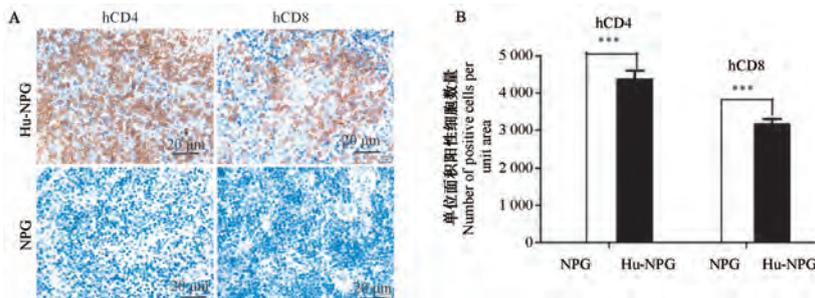


注:A:Hu-NPG 与 NPG 小鼠肿瘤组织 HE 染色及肿瘤浸润性淋巴细胞中人 CD45、CD4、CD8 的表达情况;B:肿瘤组织中人 CD4 和 CD8 免疫组化染色的半定量分析。与 NPG 相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n=4$ 。(下图同)

图 3 Hu-NPG 与 NPG 肿瘤组织中免疫细胞的表达及 HE 染色

Note. A. Expression of human CD45, CD4 and CD8 in tumor tissue and tumor infiltrating lymphocytes of Hu-NPG and NPG mice. B. Semi-quantitative analysis of human CD4 and CD8 immunohistochemical staining in tumor tissue. Compared with NPG, \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n=4$ . (The same in the next figures)

Figure 3 Expression and HE staining of human immune cells in tumor tissues of Hu-NPG and NPG



注:A:Hu-NPG 与 NPG 小鼠脾组织中 CD4、CD8 的表达情况;B:脾组织中 CD4 和 CD8 免疫组化染色的半定量分析。

图 4 Hu-NPG 与 NPG 小鼠脾组织中 CD4、CD8 免疫组化染色与半定量分析

Note. A. Expression of human CD4 and CD8 in spleen tissue of Hu-NPG and NPG mice. B. Semi-quantitative analysis of human CD4 and CD8 immunohistochemical staining in spleen tissue.

Figure 4 Immunohistochemical staining and semi-quantitative analysis of human CD4 and

CD8 in spleen tissue of Hu-NPG and NPG mice

### 3 讨论

肿瘤免疫治疗通过激活机体抗肿瘤免疫反应或阻断肿瘤免疫逃逸,以控制和杀伤肿瘤。自 2014 年 9 月, FDA 首次批准 PD-1 抑制剂 (pembrolizumab) 作为恶性黑色素瘤的一线治疗以来,免疫治疗已成为多种癌症的一线治疗方案,也为中晚期前列腺癌患者带来了曙光。以往的前列腺癌临床前研究模型是将前列腺癌细胞系或临床患者标本移植入免疫缺陷小鼠体内,然而这种模型由于缺乏人的免疫系统,无法模拟人类肿瘤与免疫微环境之间的相互作用,因而无法进行免疫检查点抑制剂等肿瘤免疫治疗研究。

通过在免疫缺陷小鼠体内植入人造造血干细胞或功能性的淋巴细胞,使其具有人的免疫功能,这样的小鼠模型称为免疫系统人源化模型。在此模型上移植肿瘤可模拟人体肿瘤与免疫系统之间的相互作用,因而在肿瘤免疫治疗药物(如新型免疫检查点抑制剂、疫苗等)的研发与临床前药物评估方面具有重要的应用前景<sup>[9]</sup>。依据人免疫系统重建方法的不同,可将免疫人源化小鼠模型分为 3 类:(1) Hu-BLT (humanized-bone marrow, liver, thymus) 小鼠模型,是人源免疫系统重建最为完善的小鼠模型,但其供体为人胚胎肝和胸腺,来源比较受限<sup>[10]</sup>; (2) Hu-HSCs (humanized-hematopoietic stem cells) 小鼠模型,是将人 CD34 + HSC 移植入免疫缺陷小鼠体内,虽然这种方法可使多系造血细胞发育,但构建模型较慢<sup>[6,11]</sup>; (3) Hu-PBL (humanized-peripheral blood mononuclear cells) 小鼠模型,是将完全分化成熟的人 PBMC 移植入免疫缺陷小鼠体内<sup>[6,12-13]</sup>,可产生效应性和记忆性 T 细胞。本研究中采用了第 3 种方法,不仅由于其构建方法快速简便,而且这种方式可以使 T 细胞移植效率高且稳定,更加准确的反应健康供体的免疫记忆状态。更为重要的是,以往很多研究中小鼠重建人免疫系统模型之前都要经过预处理,如未重建前进行化疗药环磷酰胺或亚致死剂量的<sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线辐照处理<sup>[14-15]</sup>,尾静脉注射抗 NK 细胞活性抑制剂<sup>[16]</sup>、IFN- $\gamma$ <sup>[17]</sup>等以提高重建的比例,但仍存在较高的重建失败率。而本研究中应用的 T、B、NK 重度联合免疫缺陷的 NPG 小鼠,在针对 Hu-PBMC 重建方面可以不进行辐照处理,直接用于对多个供体来源的 PBMC 进行筛选。

本研究结果显示,人源化小鼠外周血及免疫器

官中均监测到高水平的人源细胞的表达。供体 1 重建第三周外周血中即可监测到人 CD45 + CD3 + T 细胞 > 25%,第六周即可达到 77.4%~86.7%,并且重建小鼠脾中有高水平的人 CD4、CD8 + T 细胞浸润,表明人源化小鼠模型构建成功。此外,流式数据显示,不同供体来源的 PBMC 在小鼠体内免疫重建效果存在差异,这可能与供体的个体差异有关。人前列腺癌细胞系 22Rv1 中 PD-L1、AR 和 PSA 均高表达,是研究激素非依赖性前列腺癌免疫治疗理想的细胞系,因此我们选择 22Rv1 细胞系皮下移植入人源化小鼠体内,成功构建了人源化荷瘤小鼠模型。我们实验发现,肿瘤细胞移植前后人源化小鼠外周血液及脾中人 CD45 + CD3 + T 细胞维持恒定状态,且肿瘤组织中也有较高水平人 CD4 +、CD8 + T 细胞的浸润。值得指出的是,本研究发现人前列腺癌细胞 22Rv1 细胞系在人源化小鼠中较非人源化小鼠中肿瘤生长速度缓慢,提示,重建的人免疫系统可能具有抑制肿瘤生长的作用。

由于临床上前列腺癌是低免疫浸润的“冷”肿瘤,靶向免疫检查点的治疗方法在临床上的治疗效果差强人意。目前,研究者寻求通过联合化疗以提高前列腺癌的免疫浸润及免疫原性,使前列腺癌转化为对免疫治疗敏感的“热”肿瘤<sup>[18]</sup>,因此该模型不仅能够应用于免疫新药的疗效评估,还能作为免疫治疗联合化疗的临床前动物模型,这显然是人源化小鼠模型更具意义的应用方向。相关研究报道, Hu-PBL 模型由于 GVHD 出现较早,研究窗口期为 3~6 周,主要用于短期免疫治疗药物的评价,不适用于长期的肿瘤免疫机制研究<sup>[13]</sup>。因此,课题组后续将构建 Hu-HSCs 模型,以进行上述联合治疗的研究及开发新型免疫检查点抑制剂和抗肿瘤免疫机制的研究,以期为临床实验提供依据。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Dijkman GA, Debruyne FM. Epidemiology of prostate cancer [ J ]. Eur Urol, 1996, 30(3): 281-295.
- [ 2 ] 韩苏军. 中国前列腺癌发病及死亡现状和流行趋势分析 [ D ]. 北京:北京协和医学院, 2015.  
Han SJ. Analysis of the status and trends of prostate cancer incidence and mortality in China [ D ]. Beijing: Peking Union Medical College, 2015.
- [ 3 ] Terada N, Shimizu Y, Kamba T, et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model [ J ]. Cancer Res, 2010, 70 (4): 1606-1615.
- [ 4 ] Noguchi M, Koga N, Igawa T, et al. Clinical development of

- immunotherapy for prostate cancer [J]. *Int J Urol*, 2017, 24(9): 675-680.
- [ 5 ] Boettcher AN, Usman A, Morgans A, et al. Past, current, and future of immunotherapies for prostate cancer [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 884.
- [ 6 ] Lin SH, Huang GH, Cheng L, et al. Establishment of peripheral blood mononuclear cell-derived humanized lung cancer mouse models for studying efficacy of PD-L1/PD-1 targeted immunotherapy [J]. *MAbs*, 2018, 10(8): 1301-1311.
- [ 7 ] Zhao Y, Shuen TWH, Toh TB, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy [J]. *Gut*, 2018, 67(10): 1845-1854.
- [ 8 ] Tu WW, Zheng J. Application of humanized mice in immunological research [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1371: 157-176.
- [ 9 ] Yao LC, Aryee KE, Cheng MS, et al. Creation of PDX-bearing humanized mice to study immuno-oncology [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1953: 241-252.
- [ 10 ] Wege AK, Melkus MW, Denton PW, et al. Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 324: 149-165.
- [ 11 ] Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice [J]. *Science*, 1992, 255(5048): 1137-1141.
- [ 12 ] Jr MK, Roychowdhury S, Bhatt D, et al. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies [J]. *Blood*, 2005, 105(3): 1114-1120.
- [ 13 ] de La Rochere P, Guil LS, Decaudin D, et al. Humanized mice for the study of immuno-oncology [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 748-763.
- [ 14 ] Li Z, Yang X, Zhang Y, et al. A human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) engrafted humanized xenograft model for translational immuno-oncology (I-O) research [J]. *J Vis Exp*, 2019, 8(150).
- [ 15 ] 吴建红, 张飞, 赵炜, 等. 免疫重建荷人膀胱癌-SCID 鼠模型的建立 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(6): 1033-1035, 1047.
- Wu JH, Zhang F, Zhao W, et al. Establishment and identification of hu-PBL-SCID mice model of human bladder cancer model [J]. *Prog Modern Biomed*, 2014, 14(6): 1033-1035, 1047.
- [ 16 ] Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Humanized SCID mouse models for biomedical research [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 324: 25-42.
- [ 17 ] Lin XY, Zeng T, Lin JX, et al. Establishment of humanized tumor microenvironment mouse models based on the injection of peripheral blood mononuclear cells and IFN- $\gamma$  to evaluate the efficacy of PD-L1/PD-1-targeted immunotherapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(2): 130-138.
- [ 18 ] Duan QQ, Zhang HL, Zheng JN, et al. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment [J]. *Trends Cancer*, 2020, 6(7): 605-618.

[收稿日期] 2020-07-13

于志君,袁琼,金志刚,等. 基于 RIP-Seq 技术检测 MRTF-A 结合 RNA 在小鼠 MCAO/R 模型中表达[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 765-772.

Yu ZJ, Yuan Q, Jin ZG, et al. Detection of MRTF-A-binding gene expression in the MCAO/R mouse model via RIP-Seq [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 765-772.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.005

# 基于 RIP-Seq 技术检测 MRTF-A 结合 RNA 在小鼠 MCAO/R 模型中表达

于志君<sup>1</sup>,袁琼<sup>1</sup>,金志刚<sup>2</sup>,向梓非<sup>1</sup>,龙萍<sup>2</sup>,朱明<sup>2</sup>,杨越旺<sup>3</sup>,胡霞敏<sup>3\*</sup>

(1. 武汉科技大学医学院,新药创制研究所,职业危害识别与控制湖北省重点实验室,武汉 430065;  
2. 华润武钢总医院,武汉 430080; 3. 上海健康医学院,上海 200030)

**【摘要】** 目的 应用 RIP-Seq 测序技术检测小鼠 MCAO/R 模型中心肌素相关转录因子 A (MRTF-A) 结合 RNA 的表达差异,探讨 MRTF-A 潜在的作用机制。方法 将 C57BL/6 小鼠随机分成假手术组及 I/R 组,线栓法构建 MCAO 模型,再灌注 24 h 后,提取脑组织总蛋白,利用 MRTF-A 抗体免疫共沉淀后,进行 RNA 高通量测序,获得 MRTF-A 结合 RNA 的表达谱,继而对差异 RNA 进行 GO、KEGG 分析。结果 与假手术组相比,I/R 组有 429 个 RNA 发生差异表达(上调 203,下调 226),并且在功能元件和染色体分布上均具有显著差异。GO 分子功能分析显示,差异表达 RNA 主要富集 RNA 结合、Poly(A)RNA 结合等注释。KEGG 通路分析显示 10 条通路被显著富集,其中雌激素信号通路富集最显著。结论 在脑 I/R 损伤时 MRTF-A 结合 RNA 表达谱发生差异改变,为深入探讨 MRTF-A 的分子机制提供理论依据。

**【关键词】** 心肌素相关转录因子 A;RNA 结合蛋白免疫共沉淀-高通量测序;脑缺血再灌注损伤;差异基因分析

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0765-08

## Detection of MRTF-A-binding gene expression in the MCAO/R mouse model via RIP-Seq

YU Zhijun<sup>1</sup>, YUAN Qiong<sup>1</sup>, JIN Zhigang<sup>2</sup>, XIANG Zifei<sup>1</sup>, LONG Ping<sup>2</sup>, ZHU Ming<sup>2</sup>, YANG Yuewang<sup>3</sup>, HU Xiamin<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Pharmaceutical Innovation, Hubei Provincial Key Laboratory of Occupational Hazard Identification and Control, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China. 2. China Resources & WISCO General Hospital, Wuhan 430080. 3. Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 200030)

Corresponding author: HU Xiamin. E-mail: huxm@sumhs.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of RNA-bound myocardin-related transcription factor A (MRTF-A)-binding genes using RIP-Seq technology in a mouse middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion model and explore the potential mechanism of action of MRTF-A. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into the sham and cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury groups. The model of focal MCAO was constructed using the suture method. After 24 h of reperfusion, total brain tissue protein was extracted. Furthermore, the expression profile of MRTF-A-binding genes was detected using immunoprecipitation plus high-throughput sequencing. Additionally, the differentially expressed

**【基金项目】**国家自然科学基金(81770377),湖北省自然科学基金杰出青年基金(2020CFA076),湖北省卫生计生委科研项目(WJ2019H164)。Funded by National Natural Science Foundation of China(81770377), Hubei Province Funds for Distinguished Young Scholars(2020CFA076), Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission(WJ2019H164)。

**【作者简介】**于志君(1978—),女,在读博士研究生,研究方向:脑缺血再灌注损伤分子机制研究。Email:yuzhijun@wust.edu.cn

**【通信作者】**胡霞敏(1965—),女,教授,博士生导师,研究方向:脑缺血再灌注损伤分子机制研究。Email:huxm@sumhs.edu.cn

genes were analyzed using GO and KEGG. **Results** Compared with the findings in the sham group, 429 genes were differentially expressed (203 upregulated and 226 downregulated genes) in the cerebral I/R group. GO molecular function analysis revealed that the differentially expressed genes were mainly enriched in RNA binding and Poly(A) RNA binding. KEGG pathway analysis illustrated that 10 pathways were significantly enriched, among which the estrogen signaling pathway was most enriched. **Conclusions** The expression profile of MRTF-A-binding genes was significantly altered by cerebral I/R injury, which provides a theoretical basis for in-depth exploration of the molecular mechanism of MRTF-A.

**[Keywords]** myocardin-related transcription factor A; RNA-binding protein immunoprecipitation-high throughput sequencing; cerebral ischemia/reperfusion injury; differential gene analysis

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

心肌素相关转录因子 A (myocardin-related transcription factor-A, MRTF-A) 是血清反应因子 (serum response factor, SRF) 的转录共激活因子, 广泛存在于大脑皮层、心脏、血管、胚胎及肿瘤组织中, 参与包括阿尔茨海默病<sup>[1]</sup>、心脏缺血再灌注损伤<sup>[2]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[3]</sup>、恶性肿瘤<sup>[4]</sup>等在内的多种病理生理过程。研究发现, MRTF-A 主要定位于胞质, 可通过与肌动蛋白结合与解离在细胞质和细胞核之间穿梭。外界刺激 (如缺血、缺氧等) 可引起胞质内 G-肌动蛋白与 MRTF-A 解离, 促进 MRTF-A 由胞质转移至胞核, 入核的 MRTF-A 与 SRF 形成复合物后, 结合靶基因启动子上的 CC [A/T]6GG DNA 序列, 又称 CArG 盒, 引起靶基因的转录激活, 参与细胞增殖、分化、凋亡及信号转导等过程<sup>[5]</sup>, 从而对外界刺激产生快速基因反应。杨辉等<sup>[6]</sup> 研究发现, 在心肌缺血再灌注损伤时, 上调心肌中 MRTF-A 表达, 可促进 Bcl-2、Mcl-1 表达, 抑制 Bax 表达, 缩小心肌梗死面积, 抑制心肌细胞凋亡, 发挥心肌保护功能。本课题组前期研究也证实, 在脑缺血再灌注 (ischemic/reperfusion, I/R) 诱导的大鼠模型及氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导的细胞模型中, MRTF-A 可通过 SRF/CArG 途径激活抗凋亡基因 Mcl-1、Bcl-2 转录发挥重要的神经保护作用<sup>[7]</sup>。

目前, 关于 MRTF-A 机制的研究均基于对转录水平的调节, 其可否通过结合 RNA 发挥其他生物功能目前尚不清楚。因此, 为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的分子功能, 本研究利用 RIP-Seq 技术对小鼠 MCAO/R 模型中 MRTF-A 结合 RNA 的表达谱进行深度测序, 以挖掘差异基因, 继而通过生物信息方法在分子功能、信号通路等方面进行探讨, 为下一步实验研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

18 只 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 20~25 g, 购自湖北省实验动物研究中心【SCXK(鄂)2015-0018】。小鼠饲养于武汉科技大学实验动物中心【SYXK(鄂)2018-0045】。饲养期间小鼠自由进食、饮水。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 湿度恒定, 温度在 22~25℃。实验前将小鼠随机分为假手术组及 I/R 组 ( $n=9$ ), 进行 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色、RNA 结合蛋白免疫沉淀-高通量测序 (RNA immunoprecipitation, RIP-Seq) 及测序结果验证 ( $n=3$ )。所有操作均符合武汉科技大学实验动物伦理学要求 (审批号: 201849)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

线粒体购于广州佳灵生物有限公司; RIP 试剂盒、IgG 抗体购自 Millipore 公司; MRTF-A 抗体购自 CST 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠二抗购自 Santa Cruz 公司; 酚: 氯仿: 异戊醇 = 125:24:1 (pH = 4.3), 购自索莱宝科技有限公司。

体式显微镜 (Motic SMZ-140, 麦克奥迪实业集团有限公司); 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rid CFX96, 美国伯乐); 旋转混匀器 (SilentShake, 美国 CRYSTAL); 恒温摇床 (KYC-100B, 上海福玛实验设备有限公司); 测序仪器 (Hiseq 2500, 美国 Illumina 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 MCAO 模型的建立

参照改良的 Longa 法<sup>[8]</sup> 制备小鼠右侧局灶性 MCAO 模型。术前小鼠禁食 8~10 h, 自由饮水。腹腔麻醉, 仰卧固定于 37℃ 恒温手术台上。消毒颈部皮肤, 体式显微镜下暴露右侧颈部总动脉 (common

carotid arter, CCA), 颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。结扎 ECA 远心端后, 切开 ECA, 插入线栓, 使线栓经由 CCA、ICA 后入颅, 直至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA), 插入深度约 0.8~1 cm。待缺血 1 h 后缓慢拔出线栓实现再灌注, 24 h 后处死小鼠, 取样。假手术组只暴露相关血管而不插入线栓。

1.2.2 神经功能学评分

动物麻醉清醒后, 采用 Longa's 5 分法进行评分。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 不能伸展左侧前爪; 2 分: 提尾向左侧转; 3 分: 向左侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。剔除 0 分及 4 分, 选取 1~3 分的小鼠进行 RIP-Seq。

1.2.3 TTC 染色

再灌注 24 h 后, 每组随机选取 3 只小鼠, 断头取脑进行梗死体积检测。新鲜脑组织 -80℃ 速冻 3 min 后取出, 以 2 mm 厚度做冠状切片, 随后浸泡于 1% TTC 磷酸盐缓冲液中, 37℃ 避光孵育 15 min, 期间将脑片上下翻转至少 1 次, 使之染色均匀。TTC 染剂可将正常脑组织染为深红色, 梗死区脑组织染为白色。最后将脑片浸泡于 4% 多聚甲醛中, 4℃ 固定过夜, 拍片, 计算脑梗死体积百分比。脑梗死体积百分比利用 Image J 图像分析软件对梗死体积进行量化, 首先计算每片脑组织的梗死体积, 每片脑片梗死体积 = 梗死面积 × 切片厚度, 再求和算出总梗死体积, 脑梗死体积百分比 = 总梗死体积 / 全脑体积 × 100%。

1.2.4 RIP 实验

RIP 实验所有试剂均需无酶处理。再灌注 24 h 后取患侧大脑半球组织(梗死区及非梗死区), 用预冷的 PBS 冲洗匀浆, 制成单细胞悬液。4℃, 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入等体积裂解液冰

上裂解 5 min, -80℃ 保存备用。RIP 实验具体操作按照 Millipore 公司 RIP 试剂盒操作说明进行。即每组 50 μL 磁珠中, 加入 MRTF-A/IgG 抗体 5 μg, 室温孵育 1 h, 获得磁珠抗体复合物。洗涤磁珠, 900 μL RIP 免疫共沉淀缓冲液中加入 100 μL 脑组织裂解液, 4℃ 孵育过夜, 蛋白酶 K 消化后酚:氯仿:异戊醇 = 125:24:1 (pH = 4.3) 提取 RNA, 待质检合格后进行高通量测序, 验证样本则用于差异 RNA 表达 qRT-PCR 检测。

1.2.5 RNA 高通量测序

样本 (Sham MRTF-A- RIP 组及 I/R MRTF-A- RIP 组) 委托广州市锐博生物科技有限公司, 采用 Illumina HiSeq TM2500 测序方式进行。

1.2.6 测序数据分析

Illumina HiSeq TM2500 测序所得 50 nt 序列 (reads), 通过初步过滤, 得到干净序列。利用 TopHat (v2.0.13) 软件将其与参考基因组比对, 挑选出比对 reads 进行全基因组分布、结合峰 (Peak) 检测、注释及相关统计分析, 最后获得差异 Peaks, 并对差异基因进行 GO 和 KEGG 分析。基因表达采用 RPKM 法估算, 用 Zscore 值表示某 Peak 在成对样本中的差异程度, 以 |Zscore| > 2 作为 RNA 差异性表达的筛选条件。

1.2.7 qRT-PCR 验证基因表达

使用 Thermo Scientific 逆转录试剂对 RIP 纯化后的 RNA 样品进行逆转录, 逆转录条件为: 42℃ 60 min, 70℃ 10 min, 4℃, 终止反应。qRT-PCR 按照 Yeasen 试剂盒说明书进行扩增, 反应条件为: 95℃, 2 min; 95℃ 10 s, 60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环, 反应结束后对所得数据进行处理, 按 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward Primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse Primer(5'-3')
Gm33780	TTGTCTCACTTCGCTTCTCTGC	TCCAATGCTCAAACCTCTGCT
Gm3871	TCCAGTTCTCTCAGGCATTGT	TGAGGGGAAATGGAACACCG
Hic2	ACTGGTTGACCCGTCGGTTC	CTGATGAGGTTGCGCTGTGG
Malat1	GAGATGAGTGGGATCGAGCG	GAAACCTGTCTGAGGCAAACG
Hsp90b1	ACACTAGCTCGTGGAAACAACA	GCTACTCCACACGTAGATGGG
Hspa8	CCAGCCTGGTGTACTGATTCA	ATGCCTGTGAGCTCGAACTTT
Calm1	CGCCACGTCATGACAAACTT	TTGACTTGTCCGTCGCCATC

### 1.3 统计学分析

芯片数据由广州锐博生物科技有限公司分析,以  $P < 0.05$  为显著阈值。实验数据利用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,结果用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两两比较采用 Wilcoxon 秩检验(等级资料)或独立样本  $t$  检验(计量资料), $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

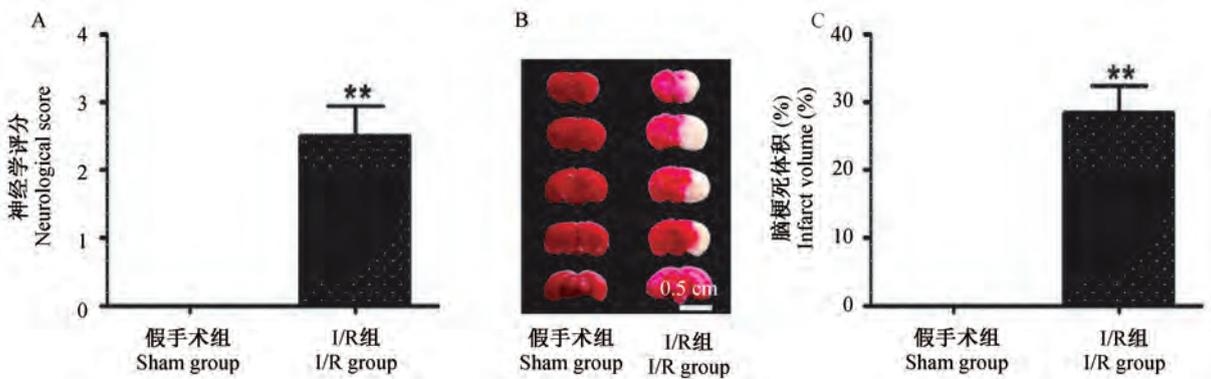
### 2.1 成功构建小鼠脑 I/R 模型

小鼠 MCAO 模型成功构建是本实验的关键,因此我们采用神经功能缺陷评分和 TTC 染色对脑损伤程度进行评估,以确保测序样本符合脑 I/R 损伤。结果显示,I/R 组均出现不同程度的神经损伤症状,评分为  $2.5 \pm 1.0$ ,而假手术组无神经损伤症状(图

1A)。每组随机选取 3 只小鼠行 TTC 染色,结果如图 1B 所示,假手术组脑组织染色正常,而 I/R 组呈现不同程度的梗死灶,梗死体积百分比为  $(28.42 \pm 7.73)\%$ (图 1C),以上结果提示,小鼠脑 I/R 模型构建成功。

### 2.2 MRTF-A 结合 RNA 差异表达

本研究以  $|Zscore| > 2$  作为筛选条件,共获得 429 个 RNA 差异结合峰,其中上调 203 个,下调 226 个;通过对 RNA 类型分析发现 mRNA 384 个,ncRNA 45 个,其中长链非编码 RNA (lncRNA) 24 个。表 2 显示变化最显著的 10 个结合峰,具体为 Gm33780、LOC105245688、Gm3871、Rpph1、Hic2、Olfir856-ps1、Gm32291、Jarid2、Gm10845、Malat1,其中 lncRNA 有 7 个,可见 lncRNA 在 MRTF-A 参与的脑 I/R 损伤中可能发挥重要作用。



注:A:神经学评分;B:脑组织 TTC 染色;C:脑梗死体积百分比。与假手术组相比,\*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 成功构建小鼠脑 I/R 模型

Note. A. Neurological score. B. TTC staining. C. Percentage of cerebral infarction volume. Compared with sham group, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 1 Successful construction of mice cerebral I/R injury model

表 2 10 个最显著 RNA 差异结合峰

Table 2 Ten most significant RNAs differential binding peaks

结合峰编号 Peak ID	起点 Start	终点 End	基因名 Gene	变化倍数 Zscore	RNA 类型 RNA type
Merged-chr2-98666801-1	98666701	98667901	Gm33780	24.51	lncRNA
Merged-chr14-19416076-1	19415976	19416176	LOC105245688	15.64	lncRNA
Merged-chr10-110009971-1	110009871	110010071	Gm3871	14.07	lncRNA
Merged-chr14-50807611-1	50807511	50807711	Rpph1	12.83	RNase_P
Merged-chr16-17222253-1	17222153	17222353	Hic2	12.42	mRNA
Merged-chr9-19657951-1	19657851	19658051	Olfir856-ps1	12.33	lncRNA
Merged-chr18-85698301-1	85698201	85698401	Gm32291	10.54	lncRNA
Merged-chr13-44869478-1	44869378	44869578	Jarid2	10.43	mRNA
Merged-chr14-79861111-1	79861011	79861211	Gm10845	10.18	lncRNA
Merged-chr19-5802218-1	5802118	5802318	Malat1	-11.96	lncRNA

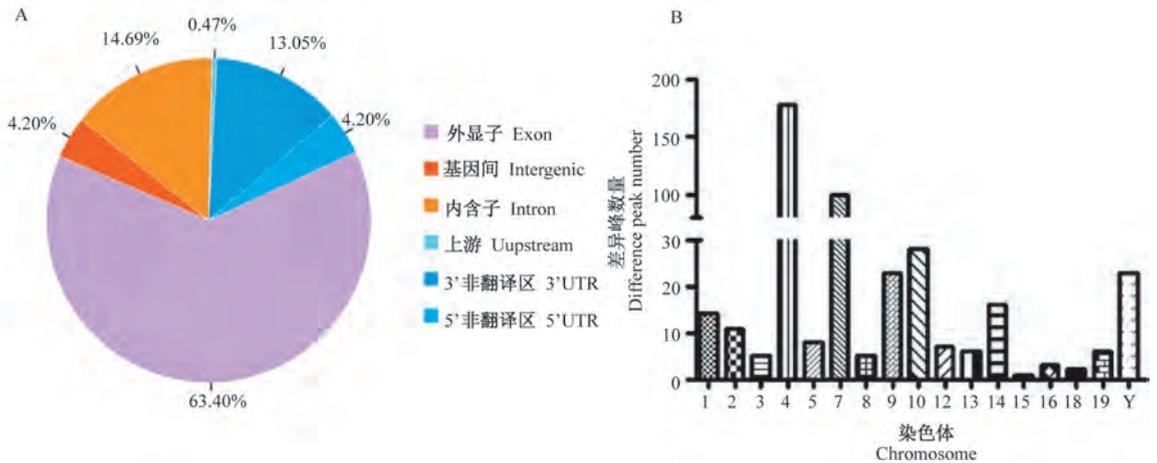
### 2.3 RNA 差异结合峰在功能元件及染色体来源上的分布分析

通过分析 RNA 差异性结合峰在不同基因组功能元件上的分布,发现差异性结合峰主要分布于外显子(exon)、内含子(intron)及 3' UTR 区,分别为 63.40%、14.69%及 13.05%,其他 8.86%分布于基因间区(Intergenic)、5' UTR 区和宿主基因上游(upstream)序列,分别为 4.20%、4.20%和 0.47%(图 2A)。染色体来源分析发现,大量差异性结合峰来源于 4 号及 7 号染色体(图 2B)。其中 4 号染色体 178 个,约占总差异性结合峰的 41.49%;7 号染色体 100 个,占总差异性结合峰的 23.31%,而 6、11、17、X 染色体未发现 peak 富集。以上结果提示,脑 I/R 后 MRTF-A 相关的 RNA 不仅在功能元件上

分布不同,且与染色体来源关系密切。

### 2.4 RNA 差异表达基因 GO 分析

对 MRTF-A 结合 RNA 差异性表达基因进行 GO 分析发现,差异基因在生物进程中主要富集 RNA、mRNA 的加工、拼接、代谢过程,细胞及骨架组成、微管解聚以及蛋白质复性等。在细胞组成方面,富集包括轴突、突触、神经元、神经元突触后密度、投射神经元等。在分子功能注释中主要富集与多种物质的结合功能,如与 MHC 的结合、钙结合素结合、脂蛋白受体结合等,其中富集最多的注释为 RNA 结合,共富集 31 个基因,而富集最为显著是 Poly(A) RNA 结合(表 3,  $P < 1.09 \times 10^{-5}$ )。结果提示,脑 I/R 损伤时 MRTF-A 可以通过募集特异性 RNA,在 RNA 结合、Poly A RNA 结合等方面发挥重要的生物功能。



注:A:RNA 差异结合峰在功能元件上的分布;B:RNA 差异结合峰染色体来源。

图 2 MRTF-A 结合 RNA 差异结合峰分析

Note. A. Distribution of RNAs differential binding peaks on functional elements. B. Chromosome source of RNAs differential binding peak.

Figure 2 MRTF-A binding RNAs differential binding peak analysis

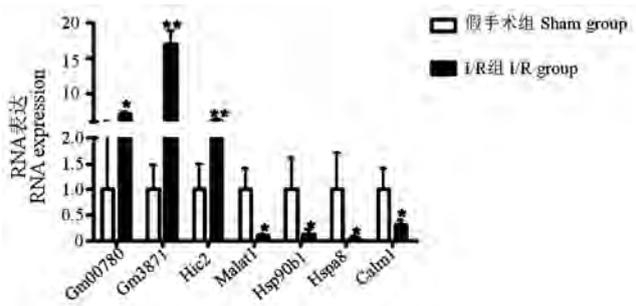
### 2.5 RNA 差异表达基因 KEGG 通路分析

通过对 MRTF-A 结合 RNA 差异性表达基因进行 KEGG 信号通路分析显示,差异表达基因主要富集 10 条信号通路,分别是甲状腺激素合成、胃酸分泌、唾液分泌、雌激素信号通路、多巴胺能突触、谷氨酸突触、胰岛素分泌、安非他明成瘾、内质网蛋白加工及 RNA 转运。在 10 条显著富集的信号通路中,雌激素信号通路是富集最显著的信号通路(表 4,  $P < 6.09 \times 10^{-4}$ ),共富集 6 个基因,分别为 Hsp90b1、Hspa8、Gabbr2、Hsp90aa1、Calm1、Atf2。提示,在脑 I/R 损伤后,MRTF-A 主要通过雌激素信号

通路发挥神经保护功能。

### 2.6 qRT-PCR 验证筛选基因的表达

为了验证测序结果及生物信息预测结果的可信度,本实验在差异表达前 10 的 RNA 中随机选取 4 个基因(Gm33780、Gm3871、Hic2、Malat1)进行测序结果的验证;同时在 KEGG 预测富集最显著的雌激素信号通路中选取 3 个基因(Hsp90b1、Hspa8、Calm1)进行生物信息预测结果验证,结果发现 MRTF-A 抗体无论在假手术组还是 I/R 组均能富集到相应 RNA 表达(图 3),且均发生差异性改变,其变化趋势与测序结果一致。



注:与假手术组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图3 差异RNA的qRT-PCR验证

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

Figure 3 qRT-PCR verification of differential RNAs

### 3 讨论

MRTF-A 是 SRF 转录共激活剂,主要通过核转位与 SRF 结合,促进 SRF 结合靶基因启动子上的 CArG 盒,激活靶基因转录,从而在转录水平发挥调节功能<sup>[5]</sup>。然而 MRTF-A 是否存在其他作用方式,目前尚未阐明。随着各种测序技术及生物信息学技术的发展,为探寻分子在不同水平的作用机制提供了技术支持。RNA 结合蛋白免疫共沉淀-高通量测序技术(RIP-Seq)是研究细胞内 RNA 与蛋白结合及转录后调控网络动态过程的工具,能帮助发现蛋白-RNA 复合体的相互作用。因此,为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的作用方式,探寻与

表3 GO 分析中的分子功能注释

Table 3 Annotation of molecular functions in GO analysis

GO 编号 GO number	GO 注释 GO annotation	基因数 Number of genes	P 值 P value
0044822	Poly(A) 结合 Poly(A) RNA binding	28	$1.09 \times 10^{-5}$
0050750	低密度脂蛋白受体结合 Low-density lipoprotein particle receptor binding	4	$1.09 \times 10^{-4}$
0003723	RNA 结合 RNA binding	31	$1.15 \times 10^{-4}$
0044877	大分子复合物结合 Macromolecular complex binding	30	$1.61 \times 10^{-4}$
0070325	脂蛋白受体结合 Lipoprotein particle receptor binding	4	$1.78 \times 10^{-4}$
0008135	翻译因子活性,核酸结合 Translation factor activity, nucleic acid binding	6	$2.12 \times 10^{-4}$
0003743	翻译起始因子活性 Translation initiation factor activity	5	$2.69 \times 10^{-4}$
0005516	钙调蛋白结合 Calmodulin binding	8	$3.04 \times 10^{-4}$
0023026	MHC II 类蛋白复合物结合 MHC class II protein complex binding	3	$3.48 \times 10^{-4}$
0023023	MHC 蛋白复合物结合 MHC protein complex binding	3	$4.39 \times 10^{-4}$

表4 KEGG 通路分析

Table 4 KEGG signal pathway analysis

KEGG 通路 KEGG signal pathway	基因数 Number of genes	P 值 P value
雌激素信号通路 Estrogen signaling pathway	6	$6.09 \times 10^{-4}$
RNA 转运 RNA transport	7	$2.03 \times 10^{-3}$
甲状腺激素合成 Thyroid hormone synthesis	4	$6.74 \times 10^{-3}$
内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	6	$8.07 \times 10^{-3}$
胰岛素分泌 Insulin secretion	4	$1.25 \times 10^{-2}$
谷氨酸能突触 Glutamatergic synapse	4	$3.01 \times 10^{-2}$
苯丙胺成瘾 Amphetamine addiction	3	$3.41 \times 10^{-2}$
胃酸分泌 Gastric acid secretion	3	$4.04 \times 10^{-2}$
唾液分泌 Salivary secretion	3	$4.44 \times 10^{-2}$

MRTF-A 相关的潜在靶基因,我们采用 RIP-Seq 技术对比正常小鼠与脑 I/R 损伤小鼠脑组织中 MRTF-A 抗体结合 RNA 表达,以获得差异表达谱。

本研究结果显示,在脑 I/R 损伤时,429 个 MRTF-A 结合 RNA 呈现显著改变,其分类主要为 mRNA,少量为 ncRNA。在变化最显著的 10 个差异 RNA 中 lncRNA 占 7/10,可见 lncRNA 可能在 MRTF-A 参与的脑 I/R 损伤中发挥着不可忽视的调控作用。lncRNA 是一类长度大于 200 nt 的 ncRNA,能够与 DNA、RNA 及蛋白质作用参与机体的各种生理病理过程<sup>[9]</sup>。研究发现,脑 I/R 损伤时存在大量 lncRNA 异常表达<sup>[10]</sup>,它们通过影响细胞凋亡、炎症、自噬、血管生成等在疾病的进展及转归中发挥作用<sup>[11]</sup>。本研究获得多条已证实脑卒中中发挥重要作用 lncRNA,如 Malat1、Meg3 及 Kcnq1ot1 等<sup>[12-13]</sup>,除此还筛选出多个尚未报道功能的 lncRNA,如 Gm33780、Gm32291、LOC105245688 等。为了验证测序结果的可靠性,我们在差异表达最显著的 10 个 RNA 中选取 4 个进行 qRT-PCR 验证,其中包括 lncRNA 3 个。结果显示 MRTF-A 抗体可以富集这些 RNA,同时在缺血性脑卒中后发生差异性改变,其变化趋势与测序结果一致,可见本次测序结果可靠,而这些 RNA,尤其是 lncRNA 如何通过 MRTF-A 结合发挥生物学功能有待进一步研究。

为了深入了解 MRTF-A 在脑 I/R 损伤中的作用机制,我们采用生物信息学方法对差异表达基因进行了 GO 及 KEGG 分析。GO 分析发现 MRTF-A 主要通过 RNA 结合、Poly (A) RNA 结合发挥生物学功能,于是推测 MRTF-A 可能作为 RNA 结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 及 Poly (A) 结合蛋白 (Poly (A) binding protein, PABP) 参与脑 I/R 损伤病理进程。RBP 是一类可与双链或单链 RNA 结合,在转录后水平发挥重要调节作用。人抗原 R (HuR) 是一种 RBP,研究发现,缺血性脑中风时, HuR 可正性调节炎症相关基因 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的 mRNA 稳定和翻译效率,参与脑损伤过程<sup>[14]</sup>。同样,存在于胞浆中 PABP,可通过 RNA 识别基序与真核 mRNA 的 3' Poly (A) 尾结合,发挥 mRNA 成熟、输出及稳定功能<sup>[15]</sup>。本实验中检测出多个与 mRNA 成熟、稳定密切相关的差异基因,如 Eef1a1、Eif5b 等。内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 是心血管系统的重要保护因子,可调节一氧化氮的产生,与缺血性脑卒中发生

密切相关<sup>[16]</sup>,研究发现 Eef1a1 可通过维持 eNOS mRNA 稳定,上调其表达,保护脑血管内皮免受脑缺血损伤<sup>[17]</sup>。而 Eif5b 在脑 I/R 损伤中目前尚无报道,但研究指出,正常非必需的 Eif5b 在缺氧条件下是缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 1 $\alpha$  和 2 $\alpha$  合成机制的重要组成部分,它们的转录和翻译表现出显著的 Eif5b 依赖性<sup>[18]</sup>。因此,推断 MRTF-A 可通过与这些基因结合发挥生物学功能。KEGG 信号通路分析发现,雌激素信号通路是富集最为显著通路。研究证实雌激素通路在脑 I/R 损伤中发挥重要作用,雌性动物脑缺血后神经元损伤弱于雄性动物,且随着生殖衰老或内源性雌激素释放停止而消失<sup>[19]</sup>,雌激素缺乏小鼠在脑 I/R 后长期给予雌激素受体激动剂可通过抑制炎症减轻脑损伤<sup>[20]</sup>。为了进一步证实生物信息学预测结果,本实验在雌激素信号通路预测富集的 6 个差异表达基因中随机选取 3 个进行验证,结果发现, MRTF-A 可以富集这些 mRNA,并且在缺血性脑卒中后发生差异性改变,其改变趋势与测序趋势一致。因此,我们推测在脑 I/R 损伤时 MRTF-A 可结合差异表达 RNA 通过雌激素信号通路发挥作用。研究报道 lncRNA 可通过雌激素通路在肿瘤增殖、转移等过程中发挥重要作用<sup>[21]</sup>, lncRNA Malat1 在乳腺癌肿瘤中的表达改变与雌激素通路及其靶基因差异表达密切相关,且与不良预后相关<sup>[22]</sup>。然而在缺血性脑卒中研究中,尚未发现 lncRNA 通过雌激素通路发挥相关功能。因此, lncRNA 通过雌激素信号通路在脑缺血神经损伤中发挥作用,还需要进一步深入研究。

综上,本研究通过 RIP-Seq 技术获得小鼠 MCAO/R 模型中与 MRTF-A 相关的潜在靶基因,通过生物信息学分析推断 MRTF-A 可能作为 RBP 或 PABP 通过雌激素信号通路等发挥生物学功能,从而为深入了解 MRTF-A 作用机制提供了理论基础,为探讨其在脑 I/R 损伤中的新机制提供研究方向,课题组将在下步实验中进行深入研究。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Zhang Y, Pan HY, Hu XM, et al. The role of myocardin-related transcription factor-A in Abeta25-35 induced neuron apoptosis and synapse injury[J]. Brain Res, 2016, 1648: 27-34.
- [2] Zhao X, Ding EY, Yu OM, et al. Induction of the matricellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection[J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 75: 152-161.
- [3] An J, Naruse TK, Hinohara K, et al. MRTF-A regulates

- proliferation and survival properties of pro-atherogenic macrophages[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 133: 26–35.
- [ 4 ] Yu OM, Benitez JA, Plouffe SW, et al. YAP and MRTF-A, transcriptional co-activators of RhoA-mediated gene expression, are critical for glioblastoma tumorigenicity[J]. *Oncogene*, 2018, 37(41): 5492–5507.
- [ 5 ] Lighthouse JK, Small EM. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 52–60.
- [ 6 ] 杨辉, 牛美芝, 郭晓丽, 等. 重组腺病毒介导 MRTF-A 基因干预缺血再灌注损伤模型大鼠心肌细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(24): 3843–3848.
- Yang H, Niu MZ, Guo XL, et al. Recombinant adenovirus encoding myocardin-related transcription factor-A prevents cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2018, 22(24): 3843–3848.
- [ 7 ] Cao XL, Hu XM, Hu JQ, et al. Myocardin-related transcription factor-A promoting neuronal survival against apoptosis induced by hypoxia/ischemia[J]. *Brain Res*, 2011, 1385: 263–274.
- [ 8 ] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [ 9 ] Simion V, Haemig S, Feinberg MW. LncRNAs in vascular biology and disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2019, 114: 145–156.
- [ 10 ] Dharap A, Nakka VP, Vemuganti R. Effect of focal ischemia on long noncoding RNAs[J]. *Stroke*, 2012, 43(10): 2800–2802.
- [ 11 ] Wang Y, Pan WY, Ge JS, et al. A review of the relationship between long noncoding RNA and post-stroke injury repair[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(10): 4619–4624.
- [ 12 ] Yu S, Yu M, He X, et al. KCNQ10T1 promotes autophagy by regulating miR-200a/FOXO3/ATG7 pathway in cerebral ischemic stroke [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12940–e12514.
- [ 13 ] Bao MH, Szeto V, Yang BB, et al. Long non-coding RNAs in ischemic stroke[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 281–292.
- [ 14 ] Ardel AA, Carpenter RS, Iwuchukwu I, et al. Transgenic expression of HuR increases vasogenic edema and impedes functional recovery in rodent ischemic stroke[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 661: 126–131.
- [ 15 ] Patel GP, Bag J. IMP1 interacts with poly(A)-binding protein (PABP) and the autoregulatory translational control element of PABP-mRNA through the KH III-IV domain[J]. *FEBS J*, 2006, 273(24): 5678–5690.
- [ 16 ] 蒋庆娟, 应燕萍. 内皮型一氧化氮合酶与血栓性疾病的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 140–144.
- Jiang QJ, Ying YP. Research progress on endothelial nitric oxide synthetase and thrombotic diseases [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 140–144.
- [ 17 ] Zhang Y, Chen J, Li F, et al. A pentapeptide monocyte locomotion inhibitory factor protects brain ischemia injury by targeting the eEF1A1/endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. *Stroke*, 2012, 43(10): 2764–2773.
- [ 18 ] Ho JJD, Balukoff NC, Cervantes G, et al. Oxygen-sensitive remodeling of central carbon metabolism by archaic eIF5B [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(1): 17–26.
- [ 19 ] Ma YL, Qin P, Li Y, et al. The effects of different doses of estradiol (E2) on cerebral ischemia in an in vitro model of oxygen and glucose deprivation and reperfusion and in a rat model of middle carotid artery occlusion [J]. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 118.
- [ 20 ] Guo H, Yang J, Liu M, et al. Selective activation of estrogen receptor beta alleviates cerebral ischemia neuroinflammatory injury[J]. *Brain Res*, 2020, 1726: 146536.
- [ 21 ] Li YH, Jiang BH, Wu XP, et al. Long non-coding RNA MIAT is estrogen-responsive and promotes estrogen-induced proliferation in ER-positive breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 45–50.
- [ 22 ] Huang NS, Chi YY, Xue JY, et al. Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1) interacts with estrogen receptor and predicted poor survival in breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(25): 37957–37965.

[收稿日期] 2020-08-11

杨玉琴,徐春华,周文江,等. 两种呼吸道感染方式建立小鼠流感病毒感染模型比较[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 773-778.

Yang YQ, Xu CH, Zhou WJ, et al. Comparison of mouse models of influenza virus infection established with two respiratory tract infection modes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 773-778.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.006

# 两种呼吸道感染方式建立小鼠流感病毒感染模型的比较

杨玉琴<sup>1</sup>,徐春华<sup>2</sup>,周文江<sup>3</sup>,周晓辉<sup>2\*</sup>

(1. 上海市第一人民医院,上海 200080; 2. 上海市公共卫生临床中心,上海 201508; 3. 复旦大学药学院,上海 201203)

**【摘要】** 目的 探讨通过两种不同呼吸道感染方式建立小鼠流感病毒感染模型的差异,为流感病毒发病机制的研究及疫苗和药物的开发选择合适的动物感染模型提供参考。**方法** 选用 A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) 病毒株,分别采用滴鼻和气溶胶的方法感染 C57BL/6 小鼠,每日称小鼠体重,肉眼观察小鼠临床症状,并于感染后 3、7、14 d 处死小鼠,取肺称其湿重并进行病毒检测、病理观察及肺内细胞因子的测定。**结果** 两种感染方式均可成功建立流感病毒小鼠模型,病程进展的总体趋势基本一致,但两组小鼠流感模型的感染特点存在一定差异。气溶胶感染组与滴鼻感染组相比,体重降低出现较早,在感染后第 3 天肺指数、病毒载量明显升高 ( $P < 0.05$ ),病变范围和炎症细胞因子的浸润程度也明显增加;肺内 IL-1 $\alpha$ 、IL-6 细胞因子水平在感染后第 3、7 天明显升高 ( $P < 0.05$ ),TNF- $\alpha$  在感染后第 7 天明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 两种感染方式均可建立小鼠流感模型,经气溶胶感染方式建立的模型在感染早期就可以引起肺部明显的炎症浸润及细胞因子表达,是一种较为理想的流感病毒感染动物模型。

**【关键词】** 气溶胶;滴鼻;流感病毒;小鼠模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0773-06

## Comparison of mouse models of influenza virus infection established with two respiratory tract infection modes

YANG Yuqin<sup>1</sup>, XU Chunhua<sup>2</sup>, ZHOU Wenjiang<sup>3</sup>, ZHOU Xiaohui<sup>2\*</sup>

(1. Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China. 2. Shanghai Clinical Center of Public Health, Shanghai 201508.

3. School of Pharmacy of Fudan University, Shanghai 201203)

Corresponding author: ZHOU Xiaohui. E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

**【Abstract】** **Objective** To explore the differences in modeling influenza virus infection with two different respiratory tract infection modes in mice; and provide a reference for choosing the appropriate infection model for pathogenic research on influenza and developing vaccines and drugs. **Methods** The A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus strain was selected to infect C57BL/6 mice by intranasal instillation and aerosol inhalation. The mice were weighed daily and their clinical symptoms were observed visually. Mice were killed on the 3rd, 7th, or 14th day after infection, and the lungs were weighed and used for virus assay, pathological observation and cytokine detection. **Results** Both infection modes successfully established an influenza virus infection model in a mouse, and their general trends of disease progression were

**【基金项目】** 上海市科委项目(12140903100)。

Funded by Project of Shanghai Science and Technology Commission(12140903100).

**【作者简介】** 杨玉琴(1980—),女,高级兽医师,研究方向:新发和再现感染病毒模型构建、发病机制和药物研究。

Email: fudanyan2007@sina.com

**【通信作者】** 周晓辉(1973—),男,研究员,研究方向:新发传染病动物模型构建与免疫机制研究。Email: zhouxiaohui@shphc.org.cn

similar. However, there are some differences in infection characteristics between the two models. Compared with the intranasal instillation group, weight loss occurred earlier in the aerosol inhalation group, and the lung index and viral load increased significantly on the 3rd day after infection ( $P < 0.05$ ). The lesion range and degree of inflammatory cytokine infiltration were also significantly increased in the aerosol group. Furthermore, the levels of cytokines interleukin(IL)-1 $\alpha$  and IL-6 in the lung increased significantly on the 3rd and 7th days after infection, and tumor necrosis factor- $\alpha$  increased significantly on the 7th day ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Both modes of infection established a model of influenza in the mouse, but aerosol inhalation caused more obvious inflammatory infiltration and cytokine expression in the lung at an early stage of infection. The aerosol inhalation mode led to a more ideal animal model of influenza virus infection.

**【Keywords】** aerosol; intranasal; influenza virus; mouse model

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

流感是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,容易引起爆发流行,对人类公共健康构成严重威胁。据统计,每年约有 25~50 万人死于季节性流感,占每年所有死亡人数的 0.5%~1%<sup>[1-2]</sup>。近年来新型的跨物种呼吸道流感病毒不断出现,如 1997 年 H5N1、2009 年 H1N1、2013 年 H7N9,这些新型呼吸道流感病毒不可预知、传播速度快、防控困难、死亡率高,对人类的威胁更为严重<sup>[3]</sup>。因此,对于流感发病机制及新型疫苗和药物的开发研究是十分必要的,而选择合适的流感动物模型是进行此类研究的基础与保证。

目前已知人类流感的传播方式主要有三种,一是气溶胶,二是飞沫,三是接触<sup>[4]</sup>。因此,选择与人类传播方式类似的感染方式对构建流感动物模型至关重要。滴鼻和气溶胶感染是目前被认为较为合理的感染方式<sup>[5-6]</sup>,本研究通过对这两种感染方式建立模型比较,分析不同建模方式对流感模型的影响,从而为流感病毒不同层面的研究选择合适感染方式建立模型提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

120 只 4~6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,体重 18~20 g。由上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0004】提供。实验在 ABSL-2(动物生物安全 II 级)实验室(注册备案号:金字第 022006005 号)中开展,温度 22~26 °C、湿度 40%~60%,12 h 日夜周期交替。所有操作均符合上海市公共卫生临床中心实验动物伦理要求(IACUC 号:公卫伦审 2018-A60-02)。

#### 1.1.2 病毒株

流感病毒株为 H1N1 PR8,经无特定病原体

(specific pathogen free, SPF) 鸡胚增殖后收集病毒尿囊液,病毒浓度为每毫升  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>, -80°C 储存备用,实验均在 BSL-2(生物安全 II 级)实验室中进行。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 培养液(Gibco, 1868707),异氟烷(上海雅培制药有限公司, B506),RNA 抽提试剂盒(QIAGEN GmbH, 52906),RT-PCR kit(Perfect Real Time, RR096A),CBA KIT(BD, 552364)。

生物安全柜(HR40-II A2, Haier, 中国),流式细胞仪(LSR Fortessa, BD 公司, 美国),PCR 仪(ViiA7, ABI, 美国),匀浆机(607EUR, Biospec, 美国),微量分光光度计(Nanodrop 1000, Thermo, 美国)。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 LD50 的测定和小鼠感染

H1N1 PR8 分别稀释 1、10、100、1000、10000, 80 只 C57BL/6 小鼠,随机分成滴鼻和气溶胶各 5 组,每组 8 只,气溶胶各组分别将小鼠放入气雾攻击装置,将不同浓度 5 mL 病毒放入吸入的玻璃管中,按照一定程序进行气溶胶感染,具体程序参考文献<sup>[7]</sup>。滴鼻各组分别给每只小鼠鼻腔滴入不同浓度 50  $\mu$ L 病毒,逐日观察小鼠死亡情况,按 Reed-Muench 法计算两种感染方式的半数致死量(LD50)。

40 只 C57BL/6 小鼠,随机分成滴鼻组和气溶胶组,用 0.5 LD50 的病毒浓度进行感染,感染当日记为 0 d,感染后小鼠分笼饲养在独立送风隔离笼具中,观察 14 d。逐日观察小鼠发病情况,并记录每日体重变化及死亡情况。

#### 1.2.2 观察指标

每日观察感染小鼠的临床表现,称体重,每组感染小鼠分别于感染后第 3、7、14 天处死,各处死 4 只,剩余小鼠继续观察。小鼠处死前称量体重和

采血,小鼠处死后打开胸腔,迅速取出肺称量肺湿重,肉眼观察肺大体病变后进行取材。取左肺上叶同一部位约 1 cm × 1 cm × 1 cm 组织做 HE 染色,镜下观察其病理变化;取部分肺组织做病毒和细胞因子检测。并统计感染小鼠体重改变率和肺指数变化,具体计算方法参考文献<sup>[7]</sup>。

### 1.2.3 肺组织总 RNA 提取及病毒载量检测

抽提组织中的总 RNA,测定核酸浓度(OD 260/OD 280)后,加 RNAase-free DNase I 37℃ 放置 20 min,然后 65℃ 放置 10 min。纯化后的样本进行荧光定量 PCR 检测,扩增体系为 25 μL: 12.5 μL TaqMan PCR 基础液,上下游引物各 1.5 μL(10 μmol/L),TaqMan 探针 1.2 μL,2.5 μL RNA 模板,水(无 RNA 酶)5.8 μL。扩增程序:42℃ 10 min;95℃ 1 min;95℃ 15 s,60℃ 45 s,45 个循环(表 1)。

### 1.2.4 肺组织细胞因子的测定

肺组织匀浆后,取上清,采用 CBA 细胞因子检测试剂盒进行检测,严格参照流式微珠阵列术说明书进行操作。

## 1.3 统计学分析

所有数据均采用平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,通过统计学软件 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析,采用非配对 *t* 检验统计分析, $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 LD50 的测定结果

根据试验结果按 Reed-Muench 法计算 H1N1

PR8 通过滴鼻和气溶胶两种方式感染 C57BL/6 小鼠的 LD50 值,结果分别为每毫升  $7.94 \times 10^3$  TCID50 和每毫升  $1.32 \times 10^2$  TCID50,用不同浓度的病毒感染小鼠,滴鼻和气溶胶感染小鼠死亡率比较见表 2。

### 2.2 临床症状观察

两组小鼠在感染后的第 3 天均开始出现反应迟钝、厌食、竖毛及体重减轻等症状,分别于第 5、7 天开始出现小鼠死亡,存活的小鼠在感染后第 10 天症状开始减轻。在体重方面,两组小鼠都是体重先降低后逐渐恢复。在感染早期的体重降低期,两组小鼠的体重降低率为气溶胶组大于滴鼻组,在感染后期的体重恢复期,体重恢复率也是气溶胶组大于滴鼻组(图 1A)。两组小鼠的肺指数变化均为先增高后降低,在感染后第 7 天达到最高。第 3 天的肺指数,气溶胶组与滴鼻组相比有显著的差异( $P < 0.05$ );第 7 天和第 14 天的肺指数,两组无差异(图 1B)。

### 2.3 感染小鼠肺组织病毒载量测定

各组小鼠于感染后第 3、7、14 天处死,肺组织匀浆后取上清进行病毒载量的测定,检测结果为各感染组均于感染后第 3 天的病毒载量最高,第 7、14 天逐渐降低。第 3 天气溶胶组小鼠的病毒量载量显著高于滴鼻组小鼠( $P < 0.05$ );第 7、14 天的气溶胶组小鼠的病毒载量仍高于滴鼻组小鼠,但无显著性差异(图 2)。

### 2.4 感染小鼠病理学观察

滴鼻感染组小鼠肺的病理变化:感染后第 3 天小鼠肺部的病变范围为 10%~30%,主要集中在主

表 1 H1N1 PR8 引物序列

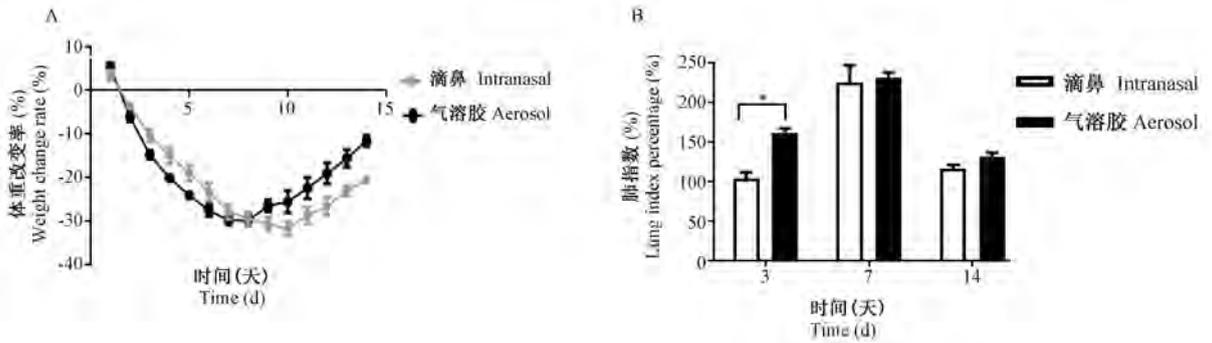
Table 1 Primer sequences of H1N1 PR8

引物名称 Name of primer	引物序列(5'-3') Sequence of primer(5'-3')	片段长度 Fragment length	退火温度 Tm(°C)
A 型流感病毒上游引物 FluA-F	5'-GACCRATCCTGTACACCTTGAC-3'		
A 型流感病毒下游引物 FluA-R	5'-AGGGCATTYTGACAAAKCGT CTA-3'	106 bp	60
A 型流感病毒探针 FluA-P	5'-FAM-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-TAMRA-3'		

表 2 两种感染方式小鼠死亡情况( $n=8$ )

Table 2 The death of mice in two modes of infection( $n=8$ )

病毒稀释倍数 Virus diluted multiples	滴鼻组 Intranasal		气溶胶组 Aerosol	
	死亡数 Number of death	死亡率(%) Death rate(%)	死亡数 Number of death	死亡率(%) Death rate(%)
$10^0$	8	100.0	8	100.0
$10^{-1}$	6	85.7	7	95.0
$10^{-2}$	5	54.5	6	80.0
$10^{-3}$	1	7.7	4	46.2
$10^{-4}$	0	0.0	2	13.3



注:滴鼻组和气溶胶组相比差异有显著性,\* $P < 0.05$ 。(下同)

图1 攻毒后小鼠体重变化率及肺指数

Note: Significant difference in lung index of the groups of intranasal and aerosol, \* $P < 0.05$ . (The same in the next figure)

Figure 1 The body weight change ratio of the mice and lung index of the mice after inoculation

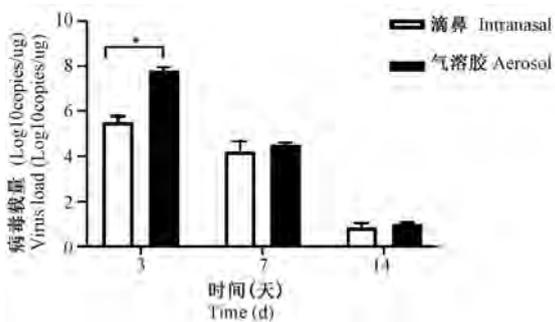


图2 攻毒后小鼠病毒载量

Figure 2 Viral load of the mice after virus inoculation

支气管肺部,镜下可见一定量的炎细胞浸润肺泡间隔;感染后第7天小鼠肺部的病变范围为70%~90%,镜下可见大量的炎细胞的浸润到肺泡间隔及肺泡内,部分区域出现间质性肺炎或肺水肿。感染后第14天小鼠肺部的病变范围为50%~70%,炎细胞浸润较7d减少,局部可见肺水肿(图3)。气溶胶组小鼠病理结果显示:感染后第3天小鼠肺的病变范围为20%~50%,从主支气管肺部向末端细支气管肺部扩散,镜下可见一定量的炎细胞浸润肺泡间隔,炎细胞数目较滴鼻组小鼠多;肉眼观察感染后第7天小鼠肺的病变范围为70%~90%,镜下可见大量的炎细胞的浸润到肺泡间隔及肺泡内,部分区域形成间质性肺炎或肺水肿。肉眼观察感染后第14天每只小鼠肺的病变范围为60%~70%,镜下观察可炎细胞浸润较7d减少,但局部仍可见肺水肿(图3)。气溶胶感染小鼠的病变进程与滴鼻感染小鼠相似,除第3天病变较滴鼻感染范围大、炎细胞多外,两种感染方式感染的小鼠都出现了间质性肺炎,肺水肿等典型病变。

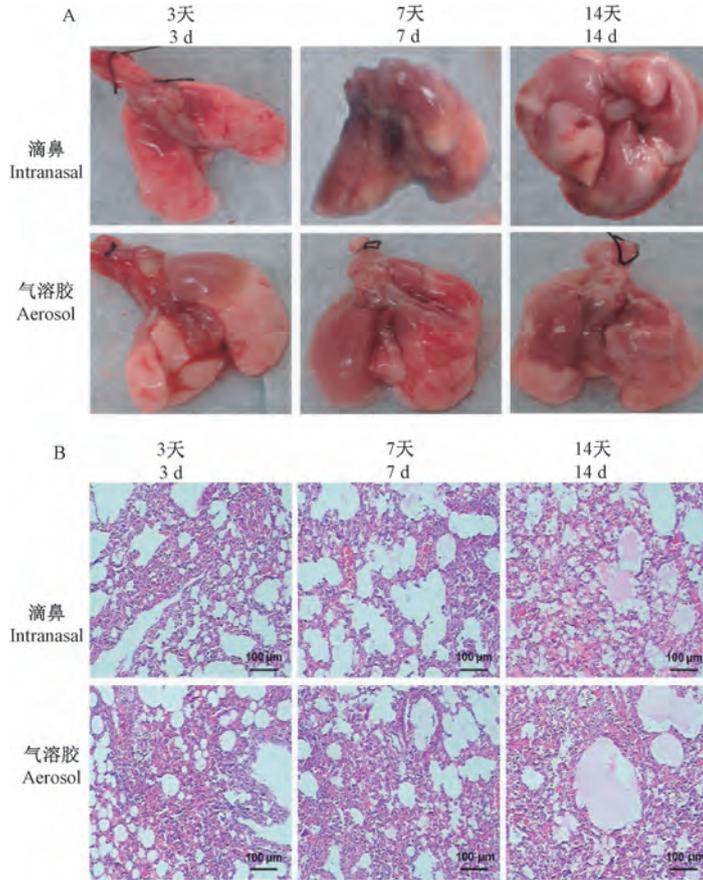
## 2.5 感染小鼠肺炎症细胞因子的测定

各组小鼠于感染后第3、7、14天处死,取肺组织匀浆上清进行IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 等炎症细胞因子的检测,结果显示气溶胶组小鼠肺内IL-1 $\alpha$ 、IL-6的表达量在感染后第3、7天均高于滴鼻组( $P < 0.05$ ),第14天稍高于滴鼻组,但无显著性差异。气溶胶组小鼠肺内TNF- $\alpha$ 的表达量在感染后第7天高于滴鼻组( $P < 0.05$ ),在感染后第3、14天稍高于滴鼻组,但无显著性差异。IFN- $\gamma$ 在各个时间点气溶胶组略高于滴鼻组,但无显著差异(图4)。

## 3 讨论

建立流感动动物模型有很多感染方式。人类流感为呼吸系统疾病,因此建立模型最有效的方式就是呼吸道感染,滴鼻和气溶胶是目前最常用的两种呼吸道感染方式<sup>[7-8]</sup>。病毒气溶胶是指病毒以单独悬浮状态、与干燥固体颗粒(尘埃)、液体微粒(液体小滴)相连接在空气中悬浮,其粒径约0.001~100  $\mu\text{m}$ <sup>[9]</sup>。Tellier<sup>[10]</sup>证实了在部分人类流感传染过程中气溶胶传染方式起主要作用,因此近年来,很多学者采用气溶胶的方式来建立流感动动物模型。滴鼻方式主要模拟人类飞沫感染方式,是目前被广泛采用的建立流感动动物模型的方法<sup>[11]</sup>,气溶胶与滴鼻两种感染方式建立的流感动动物模型有什么差异?目前未见相关报道。因此开展两种感染方式建立模型的比较研究,对于合理使用动物模型以及深入研究该疾病的发病机制都有重要意义。

本研究采用滴鼻和气溶胶两种感染方式构建流感模型,结果发现两种方式均可成功建立流感小



注:A:肉眼下的大体病理改变;B:镜下的组织病理改变;HE 染色。

图 3 攻毒后小鼠肺的病理改变

Note. A. Gross pathological changes in unaided viewing. B. Histopathological changes in microscopic. HE staining.

Figure 3 Pathological changes in the mice after virus inoculation

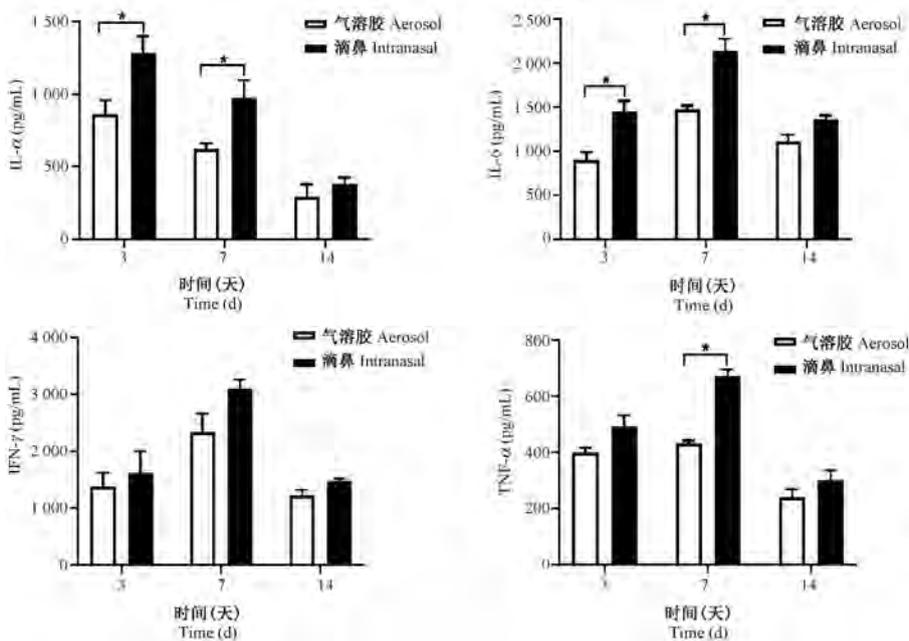


图 4 攻毒后小鼠肺内细胞因子含量

Figure 4 Level of cytokines in lung of mice after inoculation

鼠模型,病程进展的总体趋势基本一致。但两组小鼠流感模型的感染特点存在一定差异,在感染的早期,气溶胶感染组小鼠肺内病毒载量和炎症细胞因子的浸润程度明显高于滴鼻组;提示气溶胶感染方式更易快速引起肺部的感染并激活人的免疫系统。推测可能的原因是滴鼻方式感染时小鼠处于病理的麻醉状态,而气溶胶方式感染时小鼠处于清醒状态,因此病毒更容易进入肺内复制并引发体内的应答,且气溶胶方式完全模拟了流感病毒空气内的传播方式,在流感的预防感染研究方面具有优势。因此气溶胶感染方式建立的小鼠模型是更理想的流感预防和发病机制研究模型。同时气溶胶感染方式也存在缺陷,如目前并不是所有流感病毒都能够通过气溶胶传播,或即使能够在某种动物间表现出气溶胶传播特性的病毒在其它品种的易感宿主间可能不能传播<sup>[12]</sup>。因此对于一些不能用于气溶胶传播的病毒或动物感染研究时,可以选择滴鼻感染方式进行模型构建。

人类疾病模型的价值在于与人临床症状和病变程度的相似程度<sup>[13]</sup>。本文通过对气溶胶和滴鼻两种感染方式建立的模型进行了初步的研究比较,发现气溶胶感染方式建立的小鼠模型更适用于预防和发病机制研究,滴鼻方式建立的小鼠模型可用于不通过气溶胶传播的流感病毒研究。本文只是对目前与人类最相似的两种呼吸道感染方式建立的模型进行了初步研究,若想选择出更理想的小鼠流感模型及了解流感发病机制和预防,还需进一步的深入研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Bedford T, Riley S, Barr IG, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift[J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 217-220.
- [ 2 ] Carrillo SP, Ciancio BC, Nicoll A, et al. The importance of influenza prevention for public health [ J ]. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(1): 89-95.
- [ 3 ] Wang C, Horby PW, Hayden FG, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [ J ]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 470-473.
- [ 4 ] Tellier R. Review of aerosol transmission of influenza a virus[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(11): 1657-1662.
- [ 5 ] Kutter JS, Spronken MI, Fraaij PL, et al. Transmission routes of respiratory viruses among humans [ J ]. *Curr Opin Virol*, 2018, 28: 142-151.
- [ 6 ] Richard M, Fouchier RA. Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential [ J ]. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40(1): 68-85.
- [ 7 ] 杨玉琴,徐春华,朱召芹,等.三个品系小鼠流感病毒气溶胶感染模式的比较[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(2): 145-149.
- Yang YQ, Xu CH, Zhao ZQ, et al. Comparison of three mouse models infected with influenza virus by aerosol [ J ]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(2): 145-149.
- [ 8 ] 刘崇海,蒋利萍,魏钰书.流感病毒感染动物模型的研究进展[J]. *国际病毒学杂志*, 2006, 13(1): 9-12.
- Liu CH, Jiang LP, Wei YS. Advances in animal models of influenza virus infection[J]. *Int J Virol*, 2006, 13(1): 9-12.
- [ 9 ] 江恺俊,钟蕾,王晓泉,等.流感病毒气源性传播研究进展[J]. *中国家禽*, 2015, 37(13): 43-49.
- Jiang KJ, Zhong L, Wang XQ, et al. Advances in research on airborne transmission of influenza virus [ J ]. *Chin Poultry*, 2015, 37(13): 43-49.
- [ 10 ] Tellier R. Aerosol transmission of influenza virus; a review of new studies [ J ]. *J R Soc Inter- face*, 2009, 6(6): 783-790.
- [ 11 ] 于志君,孙伟洋,张醒海,等.流感病毒动物感染模型及其应用[J]. *传染病信息*, 2016, 29(3): 133-138.
- Yu ZJ, Sun WY, Zhang XH, et al. Animal infection model of influenza virus and its application [ J ]. *Infect Dis Inform*, 2016, 29(3): 133-138.
- [ 12 ] Herfst S, Mok CKP, van den Brand JMA, et al. Human clade 2.3.4.4 A/H5N6 influenza virus lacks mammalian adaptation markers and does not transmit via the airborne route between ferrets [ J ]. *mSphere*, 2018, 3(1): e00405-e00417.
- [ 13 ] 魏强.感染性疾病动物模型标准化应用问题探讨[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(6): 397-400.
- Wei Q. Discussion on standardization of animal models of infectious diseases [ J ]. *Lab Anim Comp Med*, 2010, 30(6): 397-400.

[收稿日期] 2020-05-20

张婷婷,杨漫漫,魏强,等. CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 779-787.

Zhang TT, Yang MM, Wei Q, et al. Generation of human HBB mutant knock-in porcine fibroblasts using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 779-787.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.007

## CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入

张婷婷<sup>1,3</sup>, 杨漫漫<sup>2,3</sup>, 魏强<sup>2,3</sup>, 李燕莉<sup>1,3</sup>, 李林<sup>2,3</sup>, 王然<sup>2,3</sup>, 胡莉花<sup>1,3</sup>, 姜芳芳<sup>1,3</sup>,  
刘瑜<sup>4</sup>, 赵卫华<sup>5\*</sup>, 李勇<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 深圳华大三生园科技有限公司, 广东 深圳 518000; 2. 深圳动物基因组辅助育种工程实验室, 广东 深圳 518000;  
3. 深圳市华大农业应用研究院, 广东 深圳 518000; 4. 重庆市医药卫生学校, 重庆 408000;  
5. 深圳市第二人民医院, 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518028)

**【摘要】** 目的 将人地贫相关基因 *HBB* (*hHBB*) 的高频突变体基因型 *Condons41/42* (-CTTT) 靶向敲入猪成纤维细胞, 并筛选出基因型阳性的纯合子细胞系。方法 (1) 合成人地贫相关基因 *HBB* (*hHBB*) 突变体, 并构建猪 *HBB* 位点两条同源臂载体。(2) 利用 *infusion* 技术将 *hHBB* 突变体插入两个同源臂之间, 构建同源重组终载体。(3) 用在线软件 <http://crispr.mit.edu/> 设计靶向猪 *HBB* 的 sgRNA, 并在猪 PK15 细胞中验证其活性。(4) 利用电转染法把 CRISPR/Cas9、sgRNA 和目的载体共同转入巴马猪胎儿成纤维细胞中, 筛选单细胞克隆。结果 (1) 合成了 *hHBB* 突变体, 从野生型巴马猪基因组上扩增左同源臂 ( $1.062 \times 10^3$ ) 以及右同源臂 ( $1.024 \times 10^3$ ), 并将三者连接到终载体 pGH-LA-hHBB-RA。(2) 设计合成了 11 条靶向猪 *HBB* 基因的 sgRNA, 全部验证活性后最终挑选 #2sgRNA 和 #11sgRNA 用于后续实验。(3) 通过 CRISPR 系统共制备出 15 株有 *hHBB* 突变体定点敲入的猪成纤维细胞系, 其中 6 株细胞正常表达 *hHBB* 基因。结论 本研究所制备的携带人源化 *HBB* 基因突变体的猪成纤维细胞, 将为创制高度模拟人地贫的模型猪奠定基础。

**【关键词】** 地中海贫血; *HBB* 基因突变体; 同源重组; 靶向敲入; 成纤维细胞

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0779-09

### Generation of human HBB mutant knock-in porcine fibroblasts using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination

ZHANG Tingting<sup>1,3</sup>, YANG Manman<sup>2,3</sup>, WEI Qiang<sup>2,3</sup>, LI Yanli<sup>1,3</sup>, LI Lin<sup>2,3</sup>,  
WANG Ran<sup>2,3</sup>, HU Lihua<sup>1,3</sup>, JIANG Fangfang<sup>1,3</sup>, LIU Yu<sup>4</sup>, ZHAO Weihua<sup>5\*</sup>, LI Yong<sup>1,2,3\*</sup>

(1. BGI-Shenzhen Sanshengyuan Technology Co, Shenzhen 518000, China. 2. Shenzhen Engineering Laboratory for Genomics-Assisted Animal Breeding, Shenzhen 518000. 3. BGI-Agricultural Application Research Institute, Shenzhen 518000.  
4. Chongqing Medical and Health School, Chongqing 408000. 5. the Second People's Hospital of Shenzhen, the First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518028)

**【基金项目】** 广东省深圳市大鹏新区产业发展专项资金 (KY20160305), 深圳市基因组辅助育种工程实验室提升项目和深圳市卫计委医疗卫生“三名工程” (SZSM201512003), 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210028)。

Funded by Dapeng New District Industrial Development Special Fund of Shenzhen (KY20160305), Engineering Lab for genome-assistant breeding of Shenzhen and Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZSM201512003), Guangdong Province Basic and Applied Basic Research Fund (2019B1515210028).

**【作者简介】** 张婷婷 (1991—), 女, 助理生物技术工程师, 学士, 研究方向: 基因编辑和动物克隆研究。

Email: zhangtingting100@countrygarden.com.cn

**【通信作者】** 李勇 (1981—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 动物遗传育种和克隆动物研究。Email: liyong3@genomics.cn;

赵卫华 (1966—), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 妇产科临床、高危妊娠、多种妊娠合并症及并发症处理研究。

Email: zwhyz123@163.com。 \* 共同通信作者

Corresponding author: LI Yong. E-mail: liyong3@genomics.cn; ZHAO Weihua. E-mail: zwhzyz123@163.com

**[Abstract] Objective** The high-frequency mutant genotype Codons41/42 (-CTTT) of human thalassaemia-related *HBB* gene (*hHBB*) was knocked into genome of the porcine fibroblasts by using CRISPR-Cas9 Site-specific recombination systems. Then the transfected fibroblasts were screened to establish homozygous cell lines with positive genotype. **Methods** (1) Synthesize the human *HBB* mutant with Codons41/42 (-CTTT) and cloned the left and right homology arm located at the flanking sequence of the pig *HBB* gene. (2) Then the *HBB* mutant was inserted between the left and right homology arm using infusion PCR method to building a final homologous recombination vector. (3) The sgRNA targeting pig *HBB* gene were designed using online software and then were verified its activity in pig PK15 cells. (4) Bama pig fetal fibroblasts were co-transfected with CRISPR/Cas9 vector, sgRNA and pGH-LA-hHBB-RA using by electroporation and then were screened to establish single clone. **Results** (1) We synthesized full length of the *hHBB* CDS with a mutant Codons41/42 (-CTTT). The left and right homology arm of 1.062 kb and 1.024 kb were cloned from Bama pig genome. Then we constructed a final vector pGH-LA-hHBB-RA. (2) Two sgRNAs targeted pig *HBB* gene were validated in PK15 cells and used for further experiments. (3) Finally, we identified 15 single-cell clones of the porcine fibroblast carry the human *HBB* gene mutant. **Conclusions** We generated porcine fibroblast carrying the human *HBB* gene mutant using CRISPR/Cas9. Our study provides key materials for scientist to generate pig models of human thalassaemia.

**[Keywords]** thalassaemia; *HBB* mutant; homologous recombination; targeted knock-in; fibroblast

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

地中海贫血症主要是调控珠蛋白合成的基因发生缺失或突变,导致构成血红蛋白的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链珠蛋白链表达不平衡、红细胞寿命缩短的一种溶血性血液疾病。全球 160 多个国家和地区有近 2.8 亿地中海贫血病患者。 $\beta$ 地贫是广东省发病率最高、危害最大的遗传病之一。其致病原因是第 11 号染色体的 $\beta$ -珠蛋白( $\beta$ -globin)基因发生缺失或点突变,造成 $\beta$ -珠蛋白合成完全或部分受抑,导致 $\alpha/\beta$ 链比例失衡,进而发生溶血性贫血。在多种 $\beta$ 基因突变或缺失中,Codons41/42(-CTTT)突变约占 $\beta$ -地贫突变的 36%以上<sup>[1]</sup>。一直以来,造血干细胞移植是唯一治愈 $\beta$ 地贫的手段,但配型合格的供体少之又少。近年来,基于特定突变修复的基因治疗将成为 $\beta$ 地贫永久性“治愈”最有效的手段之一。

为便于开展对 Codons41/42(-CTTT)突变型 $\beta$ 地贫的基因治疗研究,国内外已通过多种途径建立了携带该突变体的载体、细胞甚至基因工程小鼠<sup>[2]</sup>。Niu 等<sup>[3]</sup>利用来自 $\beta$ 地贫病人细胞构建的纯合 *HBB* Codons41/42(-CTTT)突变的 iPS 细胞,结合 CRISPR/Cas9 系统进行突变矫正,并评价矫正细胞的功能特性。然而,iPS 细胞实验只能体外检测编辑效率和功能特性,无法完成体内的功能和安全评价。Jamsai 等<sup>[4]</sup>利用基因打靶技术制备了人 *HBB* 41/42(-CTTT)小鼠,发现纯合子小鼠存活到妊娠后期,表现出严重的贫血症状。尽管 $\beta$ 地贫小鼠模型可以比较好的模拟其病理过程,但像地贫患者

输血后出现的铁过载现象在实验鼠的身上却不能完全拟合,不能很好反映出病程。因此,其作为临床前的药物使用剂量、安全评价并不合适<sup>[5]</sup>。因此,开发携带人 $\beta$ 地贫大动物模型十分必要。

我们发现,较小鼠而言,猪与人 $\beta$ -珠蛋白氨基酸一致性较高,达到 85%。此外,天然猪血红蛋白与人血红蛋白的分子构象几乎一致,二者有高度相似的抗原性<sup>[6]</sup>。这提示我们:猪 $\beta$ -珠蛋白在其生物学功能上或许与人 $\beta$ -珠蛋白更为相似,暗示以猪 *HBB* 蛋白突变体而构建地贫模型,更能模拟出人地贫症的机制。因此,开发携带人 $\beta$ 地贫大动物模型十分必要。同时,猪在器官发育、生理生化、疾病进程以及基因组序列方面和人类具有高度的相似性,是人类疾病的理想实验模型,被广泛应用到生物医学研究<sup>[7]</sup>。在血液生理生化方面,小型猪 19 项生理指标、9 项生化指标和人类的参考值接近<sup>[8]</sup>。以猪替代小鼠研究人地贫等相关疾病模型具有无法比拟的优势。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术制备了携带人源化 *HBB* 基因 Codons41/42(-CTTT)突变体的巴马猪胎儿成纤维细胞株,经 PCR 方法和 DNA 测序法验证了插入的 *hHBB* 突变体基因序列正确。最后,通过 PCR 方法检测到表达外源 *hHBB* Codons41/42(-CTTT)基因的细胞株 6 株。该细胞株为进一步获得人地贫的小型猪模型,为研究地贫的发生、发展及新药创制奠定基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 细胞及载体

CRR 质粒由本实验室设计并合成, hCas9 为华中农业大学种猪测定中心韩晓松博士提供, 猪 PK 细胞和巴马猪胎儿成纤维细胞为中国农业科学院北京畜牧研究所杨述林研究组提供。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

限制性内切酶、T7 核酸内切酶、T4 连接酶均购于 NEB 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒购于 Omega 公司; Lipofectamine2000 脂质体转染试剂盒购于 Invitrogen 公司; 电转染试剂盒 Amaxa Basic Nucleofector Kit Primary Fibroblasts 购于 Lonza 公司; 反转录试剂盒 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 购于北京全式金生物公司。

高速离心机 (Eppendorf, 德国), 倒置光学显微镜 (莱卡, 德国), 核转仪 (Lonza, 瑞士), 二氧化碳培养箱 (Eppendorf, 德国), 水浴锅 (北京六一仪器厂) 电泳槽 (北京六一仪器厂), PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国), 凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 sgRNA 设计及表达载体构建

根据猪 *HBB* 基因序列 (Gene ID: 407066), 利用张锋实验室在线网站 <http://crispr.mit.edu/> 设计了 11 条靶向 sgRNA (small guide RNA) 序列 (表 1), sgRNA 序列由华大基因合成, 上、下游序列按体积比 1:1 混合, 95°C, 10 min; 25°C, 30 min; 变性; 退火后, 以 T4 DNA 连接酶介导, 接入 BsaI 内切酶酶切回收后的骨架载体 CRR, 最终构建出 CRR-sgRNA 表达载体。将该载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经涂板、挑选单克隆菌落和菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

### 1.2.2 sgRNA 活性鉴定

转染前 24 h 将猪 PK15 细胞铺于 24 孔板 ( $1 \times 10^4$  细胞/孔), 次日, 将构建好的 sgRNA 转染细胞 (参照 Lipo2000 转染试剂盒说明书), 转染质粒总量 500 ng, hCas9:CRR-sgRNA = 3:1。细胞于培养箱培养 48 h。收集细胞并提取基因组 DNA (gDNA), 按表 2 引物做 PCR, 体系为: gDNA 0.1  $\mu$ g, Premix Ex Taq 10  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序: 98°C, 1 min; 98°C 10 s, 58°C 30 s, 72°C 10 s, 循环 32 次; 72°C, 5 min。

T7 变性程序: 95°C, 10 min; 95~85°C (-2.0°C/s); 85~25°C (-0.3°C/s); 25°C, 1 min。

T7 酶切反应体系: PCR 产物 17  $\mu$ L, NEB Buffer 2.2  $\mu$ L, T7 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu$ L。反应条件: 37°C, 45 min。将酶切产物电泳后利用 DNA 凝胶成像系统检测。

表 1 sgRNA 靶点序列

Table 1 Sequences of the sgRNAs	
靶序列编号 Target sequence number	靶位点序列 (5'-3') Sequences of the sgRNAs (5'-3')
pHBB-#1sgRNA	CACCTGTGGAACACGCC
pHBB-#2sgRNA	AAAGTGAATGTGGACGAAGT
pHBB-#3sgRNA	AGGCCAGGCGGTGTTCCAC
pHBB-#4sgRNA	GAGCCCTCTCGGCTGTG
pHBB-#5sgRNA	AAGCAAATGTAGTGGCTGC
pHBB-#6sgRNA	TCTAAACGCATCTCCGTTT
pHBB-#7sgRNA	AGAAGAGAGGCCGAAACGG
pHBB-#8sgRNA	CTCAGCCATGACCAAGGAGC
pHBB-#9sgRNA	TTGTTCTGCTCGCCGCT
pHBB-#10sgRNA	TGACTTCAACCCGATGTGC
pHBB-#11sgRNA	GGGAACTTAGTGTACTTG

表 2 sgRNA 活性鉴定引物

Table 2 Primers used for PCR of sgRNA targeted sites	
活性鉴定引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
pHBB (Exon1,2)-iden-F1	CAGACTTGCTAAGGAGATGAA
pHBB (Exon1,2)-iden-R1	GAGGAAATGATGGCTGTGAATA
pHBB (Exon1-3) iden-F1	TTGAGGCAAGAAGGATAAAATG
pHBB (Exon1-3) iden-R1	TTAGAGGAACACGGTCTCTTTA

### 1.2.3 人源化 *HBB* 基因打靶载体构建

靶位点上、下游 1000 bp 左右的序列作为同源臂序列, 设计含有 NotI 酶切位点的上游同源臂引物、含有 XhoI 酶切位点的下游同源臂引物及融合扩增引物 (表 3)。以猪基因组 DNA 为模板, 扩增上、下游同源臂, 反应体系为: gDNA 0.1  $\mu$ g, KOD Buffer 5  $\mu$ L, 2 mmol dNTPs 5  $\mu$ L, 25 mmol MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1.5  $\mu$ L, DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94°C, 3 min; 94°C, 15 s; 55°C, 30 s; 72°C, 2 min, 循环 35 次; 72°C, 5 min。PCR 产物回收作模板, 进行融合 PCR。把融合 PCR 产物与 pGH-T 载体 (NotI 和 XhoI 切过) 进行融合, 融合反应体系为: pGH-T 载体 5  $\mu$ L, 融合 PCR 产物 3  $\mu$ L, infusion 酶 2  $\mu$ L。反应程序为: 50°C, 15 min, 构建重组载体 pGH-LA-RA, 测序序列完全正确后, 大量提取无内毒素质粒备用。

以 *hHBB* (CD41/42, -CTTT)-T 质粒为模板, 分别扩增两个片段, 反应的引物序列见表 4。 *hHBB* (CD41/42, -CTTT) 片段扩增反应体系: DNA

0.05  $\mu\text{g}$ , KOD Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 2 mmol dNTPs 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol  $\text{MgSO}_4$  2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1.5  $\mu\text{L}$ , DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 50  $\mu\text{L}$ 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  2min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 产物回收后, 进行融合 PCR。融合 PCR 产物经 BsaI 酶介导构建于重组骨架载体 pGH-LA-RA。

表 3 左右同源臂扩增引物序列及融合扩增引物序列

Table 3 Primers used for PCR or infusion PCR of the homologous arms

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
pLA(pHBB)-F	ACATTAAGACATGGAATATGG
pLA(pHBB)-R	AGACTCACCTGAAAGTTCTCAG
pRA(pHBB)-F	TAACGTCTACACGGCAGCTCAC
pRA(pHBB)-R	TTAACGATGGATTTCAGTCTCCTC
pLA(pHBB)-infusion-F	TTAGGTACCGCGCGCAATACAGCCCGTACTATAAC
pRA(pHBB)-infusion-R	CTTCCCTTACTCGAGCAGGCATCATTATCAGTGAT

表 4 人源 hHBB 片段扩增及融合引物序列

Table 4 Primers used for PCR or infusion PCR of the human HBB gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
hHBB(Ex1-3)-F1	GCACAAACAGACAACATGGTGCATCTGACTCCTGA
hHBB(Ex1-3)-R1	CAGGAGTGGACAGATCCCCAAAGGACTCAACCTCTGGGTCCAAGGGTA
hHBB(Ex1-3)-F2	TACCCTTGGACCCAGAGGTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG
hHBB(Ex1-3)-R2	ATCAGGAAGGGGAACCTAGTGATACCTTGTGGGCCA
hHBB(Ex1-3)-infusion-F	GCACAAACAGACAACATGGTGCATCTGACTCCTGA
hHBB(Ex1-3)-infusion-R	ATCAGGAAGGGGAACCTAGTGATACCTTGTGGGCCA

### 1.2.5 单克隆细胞系筛选及鉴定

转染后的细胞, 用含 400  $\mu\text{g/mL}$  G418、20% FBS 的 DMEM 药筛培养基药筛 5 d, 而后用含 20% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 7 d, 至第 12 天形成单克隆细胞团, 用单克隆环挑选生长状态好、大小合适的单克隆细胞团到 48 孔细胞培养板。待细胞汇合度达 90% 对单克隆细胞消化, 进行 PCR 鉴定。

对收集到的单克隆细胞进行裂解, 裂解程序 60 $^{\circ}\text{C}$ , 60 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min, 以细胞裂解产物 (gDNA) 为模板, 分别用 3 对定点敲入鉴定引物进行扩增, 引物序列见表 5。

第 1 对鉴定引物为转基因阴阳性鉴定引物, 第 2 对鉴定引物为跨左同源臂鉴定引物、第 3 对为跨右同源臂鉴定引物, 三对引物反应体系为: DNA 2  $\mu\text{L}$ , Premix Ex Taq 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序均为: 98 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 98 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 kb/s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min。

3 对鉴定引物扩增均为阳性的细胞株, 将其传代到 12 孔板继续培养, 代细胞汇合度达到 90% 及以

### 1.2.4 CRISPR/Cas9 载体及同源重组载体转染巴马猪胎儿成纤维细胞

将 CRISPR/Cas9 3  $\mu\text{g}$ 、sgRNA 环状质粒 1  $\mu\text{g}$  和 hHBB 同源重组载体 3  $\mu\text{g}$  通过电穿孔转染法转染巴马猪胎儿成纤维细胞。转染 60 h 后, 采用有限稀释法将细胞悬液稀释至每个培养皿 5000 个细胞, 放入培养箱培养, 培养条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub>。

上时, 进行冻存。

### 1.2.6 人源化 HBB 基因定点敲入细胞株纯合子、杂合子鉴定

针对猪 HBB 基因序列设计了一对鉴定定点敲入细胞株为纯合子或杂合子的鉴定引物,

采用 1.2.5 中细胞裂解产物 (gDNA) 为模板, 用纯/杂合子鉴定引物进行扩增, 上游引物 sp-pHBB-iden-F1 (AGGCAGGATGCCGTTTAGAA); 下游引物 sp-pHBB-iden-R1 (CACTATCACGTTGCCAGGA)。反应体系为: DNA 2  $\mu\text{L}$ , Premix Ex Taq 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  各取 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序同步骤 1.2.5。

表 5 单克隆细胞定点敲入鉴定引物

Table 5 Primers used for hHBB knock-in examination

定点敲入引物 Targeted knock-in primer	序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
sp-hHBB-iden-F	CCAATAGAAACTGGGCATGTGG
sp-hHBB-iden-R	AATCCAGCCTTATCCCAAGC
sp-LA-iden-F	ATTCGTTACGGGGGAAGAC
sp-LA-iden-R	GCACCTTCTTGCCATGAGCC
sp-RA-iden-F	CATGCCTCTTTGCCACCATTC
sp-RA-iden-R	CCCTCCCTTTCTTTCTGAGTTG

### 1.2.7 人源化 *HBB* 基因在猪成纤维细胞中表达情况鉴定

根据人和猪 *HBB* 基因 CDS 区的差异,设计一对针对人源化 *HBB* 基因表达的鉴定引物,上游引物 hHBB-iden-qF1 (CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAC),下游引物 hHBB-iden-qR1 (CAGGCCATCACTAAA GGCAC)。提取人源化 *HBB* 基因发生定点整合细胞株的总 RNA,随后反转录为 cDNA,用鉴定引物 hHBB-iden-qF1/R1 进行检测。反转录反应体系为:RNA 500 ng, Anchored Oligo (dT) 18 1 μL, 2X TS Reaction Mix 10 μL, TransScript RT/RI Enzyme Mix 1 μL, RNase-free Water 补足体积至 20 μL。反应程序为:42℃, 30 min 孵育。

PCR 反应体系为:cDNA 1 μL, Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物浓度为 10 μmol/L 各取 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应程序为:98℃, 1 min; 98℃ 10 s, 62℃ 30 s, 72℃, 13 s, 循环 35 次; 72℃ 5min。同时,用内参引物作为对照,按照前面的体系及反应程序进行扩增。

## 2 结果

### 2.1 人、猪和鼠 *HBB* 基因比较分析

通过 MegAlign7 软件 Construct-Test Neighbor joining Tree 算法对包括小鼠、猪、猴等 8 种哺乳类动物与人 *HBB* 基因做系统发育树分析,结果发现:人 *HBB* 遗传距离与灵长类动物最近,其次为猪,再其次为小鼠。即相比于小鼠而言,猪与人类 *HBB* 基因遗传距离更近(图 1A)。我们进一步利用 UniProt 网站在线软件 Clustal Omega 对人、猪和小鼠 β-珠蛋白氨基酸序列进行比对。结果表明:小鼠与人 β-珠蛋白氨基酸一致性为 80%,而猪与人 β-珠蛋白氨基酸一致性则更高,达到 85%(图 1B)。总之,以上

结果提示:猪 β-珠蛋白在其生物学功能上或许与人 β-珠蛋白更为相似,暗示以猪 *HBB* 蛋白突变体而构建地贫模型,更能模拟出人地贫症的机制。

### 2.2 CRR-sgRNA 表达载体活性验证结果

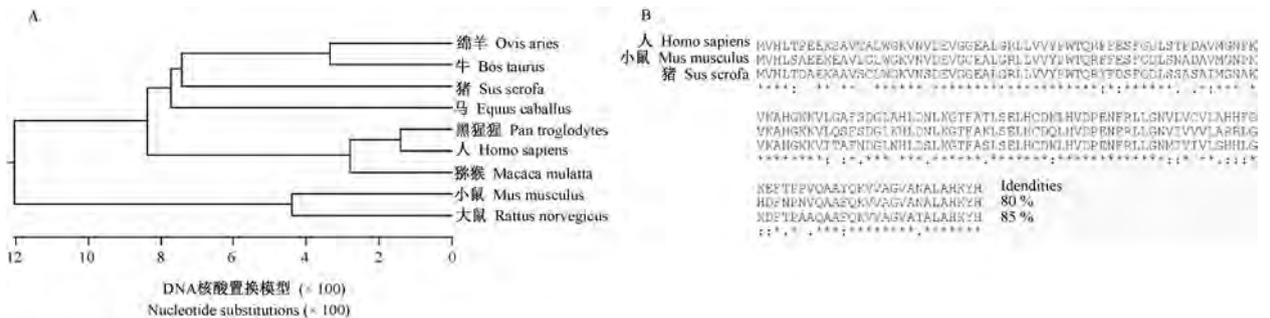
本研究中合成了 11 条靶向 sgRNA,分别连接 CRR 质粒,构建成 11 个 CRR-sgRNA 表达载体,并分别与 CRISPR/Cas9 表达载体共转染至 PK15 细胞中。48 h 后,提取细胞基因组 DNA 作为 PCR 模板,用鉴定引物做 PCR,扩增产物进行 T7 酶切和凝胶成像作鉴定。结果表明鉴定引物对#2sgRNA 扩增后产物片段大小为 913 bp, T7 酶切后片段大小为 364 bp 和 549 bp;鉴定引物对#11sgRNA 扩增后产物片段大小为 877 bp, T7 酶切后片段大小为 393 bp 和 484 bp, #2sgRNA 和#11sgRNA 这两条剪切活性高于其他 9 份(图 2)。

### 2.3 人源化打靶载体构建结果

首先,以猪基因组 DNA 为模板,构建同源臂载体 pGH-LA-RA,其中左臂  $1.062 \times 10^3$ ,右臂  $1.024 \times 10^3$ 。其次,利用融合 PCR 方法将人 *HBB* 突变体插入 pGH-LA-RA 的两个同源臂之间,构建成带有人源化 *HBB* 基因突变体(-CTTT)的同源重组终载体 pGH-LA-hHBB-RA。进行 sanger 测序验证,测序结果表明:携带有人源化 *HBB* 基因突变体的同源重组载体构建成功,图 3 所示包含“-CTTT”四碱基缺失的测序结果的峰图,可用于下一步的转染。

### 2.4 单克隆细胞株鉴定结果

利用电穿孔转染法 CRISPR/Cas9 质粒、#2sgRNA 和#11sgRNA 及 pGH-LA-hHBB-RA 同源重组载体共同转入巴马猪胎儿成纤维细胞,经 G418 筛选后共获得了 99 株单克隆细胞。再利用转基因鉴定引物对敲入的人源化 *HBB* 基因突变体做 PCR 扩增,扩增后片段大小为 1105 bp,凝胶成像结果如

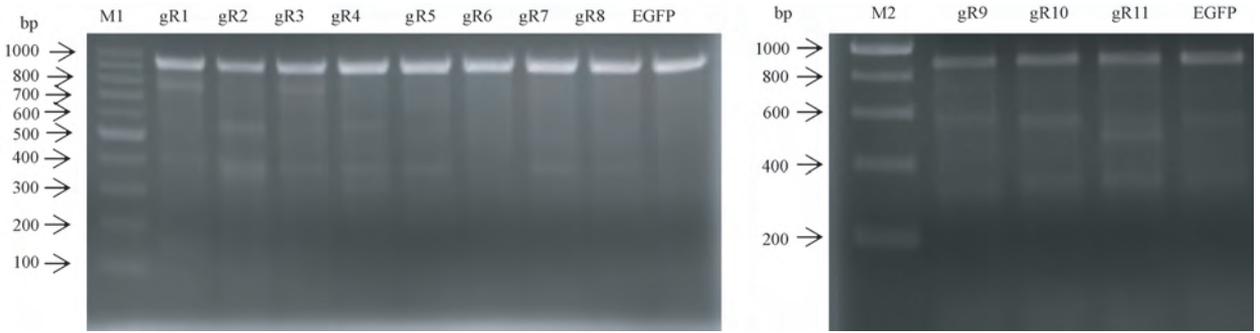


注:A:鼠、猪、猴等 8 种哺乳类动物与人 *HBB* 基因做系统发育树分析;B:人、猪和小鼠 β-珠蛋白氨基酸序列比对。

图 1 比较分析人、猪和小鼠 *HBB* 基因序列

Note. A. Building the phylogenetic trees for *HBB* genes of 8 different mammals. B. Identities of β-globin amino acid among human, pig and mouse.

Figure 1 Identities of the *HBB* gene sequence among human, pig and mouse



注: gR1~11: 分别转染 sgRNA1~11 质粒的细胞样品; EGFP: 转染 EGFP 质粒的对照组细胞样品; M1: 100 bp DNA ladder marker; M2: 200 bp DNA ladder marker。

图 2 猪 *HBB* 基因 sgRNA T7 酶切活性验证结果

Note. gR1~11. Cell samples transfected with sgRNA1~11 plasmids respectively. EGFP. Control cell sample transfected with EGFP plasmid. M1. 100 bp DNA ladder marker. M2. 200 bp DNA ladder marker.

Figure 2 T7 Enzyme digestion for Pig *HBB* gene sgRNA activity examination

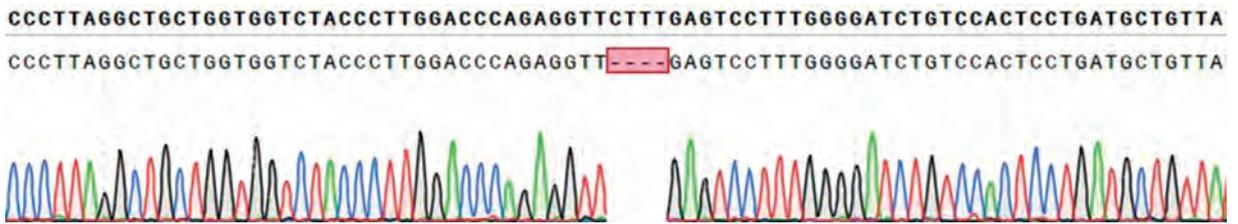


图 3 同源重组打靶载体测序结果

Figure 3 Homologous recombination targeting vector sequencing results

图 4A 所示, 结果统计如图 4B 所示: 一共鉴定了 99 株细胞, 转基因阳性细胞克隆为 69 份, 转基因阴性细胞克隆为 30 份。

左端同源臂鉴定, 上游引物位于左端同源臂外侧, 下游引物位于人源化 *HBB* 基因特异性区域内, 可完全扩增出左同源臂全长及部分 *hHBB* 基因, PCR 产物大小为 1550 bp, 扩增结果如图 5A 所示。结果统计如图 5B: 一共鉴定了 99 株细胞, 阳性细胞克隆为 25 株, 阴性细胞克隆为 74 份。

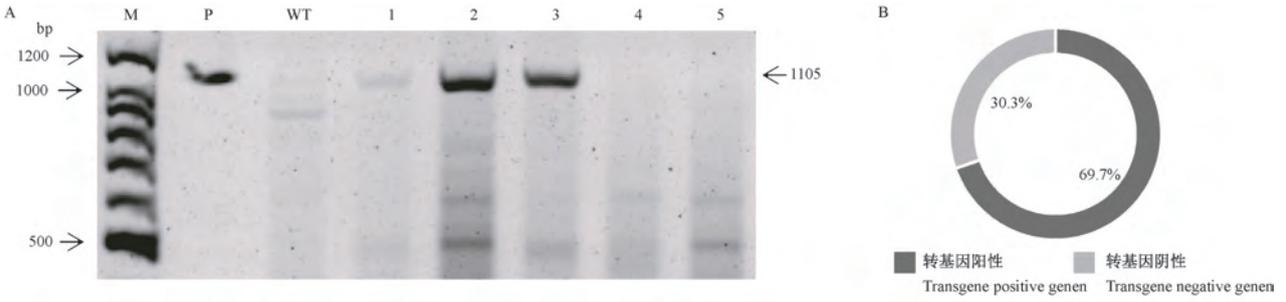
右端同源臂鉴定, 上游引物位于 *hHBB* 基因特异性区域, 下游引物位于右端同源臂外侧, PCR 产物大小为 1507 bp, 扩增结果如图 6A 所示。结果统计如图 6B 所示, 一共鉴定了 32 株细胞, 阳性细胞克隆为 15 份, 阴性细胞克隆为 17 份。总之, 通过对 99 个细胞克隆的筛选与基因型鉴定, 我们一共获得 69 株整合人 *HBB* 基因的猪成纤维细胞, 其中定点整合 15 株, 随机定点整合 54 株。

通过上述 3 重 PCR 鉴定, 筛选出 3 对引物都鉴定为阳性的单克隆细胞, 并做 *hHBB* 突变体位点的 sanger 测序。如图 7 所示, 猪 *HBB* 基因靶序列为 CTTC, 正常人源 *HBB* 基因靶序列为 CTTT, 而人源

*HBB* 基因突变体对应的位置缺少 4 个碱基 (-CTTT), 测序结果(图 7A)证明: 我们在巴马胎猪胚胎成纤维细胞中成功地插入了人源化 *HBB* 基因的突变体。随后, 我们通过对猪内源 *HBB* (*pHBB*) 基因检测, 发现全部样品均能扩增到 *pHBB* 条带, 并未鉴定到纯合子细胞, 即本实验所得 15 株细胞均为杂合子(图 7B)。最后, 通过提取细胞总 RNA 和进一步的 PCR 验证, 我们共获得 6 株阳性表达外源 *HBB* 基因的突变体(图 7C)。

### 3 讨论

我国的地贫患者主要分布于广东、广西、湖南、四川、云南和贵州等南部省份<sup>[9]</sup>,  $\beta$  地中海贫血是广东省发病率较高的地贫类型<sup>[10]</sup>。  $\beta$  地贫涉及到 200 多种  $\beta$  珠蛋白突变, 热点的突变类型包括 Codons41/42(-CTTT)、IVS-II-654(C→T)、-28(A→G)、IVS1.6(T→C)、-87(C→G)等, 其中 Codons41/42(-CTTT)作为主要的突变体约占发病人群的 36% 以上。  $\beta$  珠蛋白基因在哺乳动物中保守性较好。由于纯合敲除的小鼠致死性较高, 加上缺乏特定的突变体, 应用性较差。相比而言, 携带人源化突变体

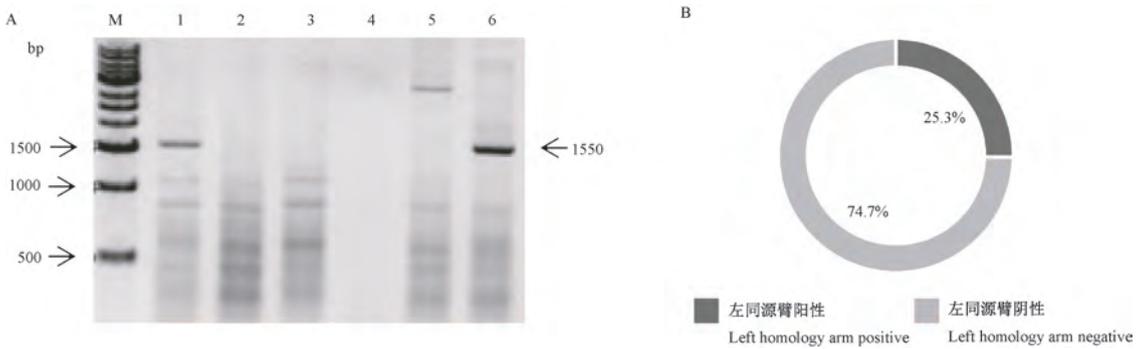


注: A:转基因鉴定引物扩增结果, M: 100 bp plus DNA ladder marker, P: 阳性质粒对照, WT: 野生型细胞对照, 1~5: 鉴定细胞克隆的编号; B: 基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 4 转基因阴阳性鉴定引物扩增结果

Note. A. Amplification result of transgene identification primer. M. 100 bp plus DNA Ladder Marker. P. Positive control. WT. Wild type control. 1~5. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 4 Amplification result of transgenic negative and positive identification primers



注: A:跨左端同源臂鉴定引物扩增结果, M: 1 kb DNA Ladder Marker, 1~6: 鉴定细胞克隆的编号; B: 基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 5 跨左端同源臂鉴定引物扩增结果

Note. A. Identify primer amplification results across the left homology arm. M. 1 kb DNA ladder marker. 1~6. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 5 Identify primer amplification results across the left homology arm

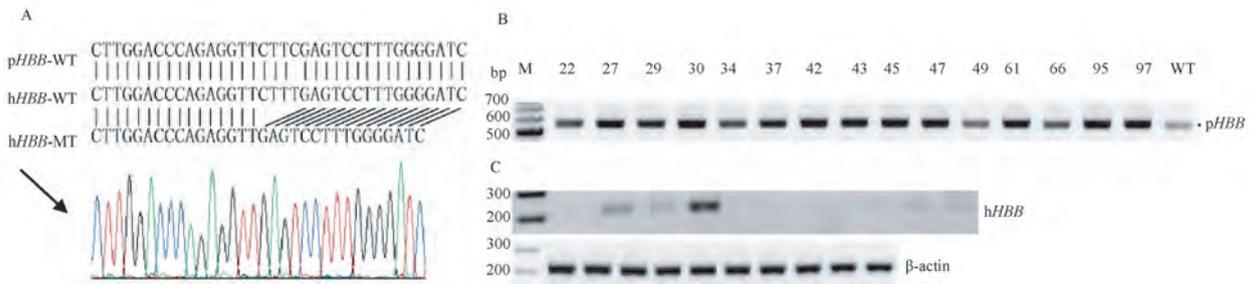


注: A:跨右端同源臂鉴定引物扩增结果, M: 1 kb DNA Ladder Marker, 1~5: 鉴定细胞克隆的编号; B: 基因型阳性和阴性细胞克隆的统计。

图 6 跨右端同源臂鉴定引物扩增结果

Note. A. Identify primer amplification results across the right homology arm. M. 1 kb DNA Ladder Marker. 1~5. The number of cell clones identified. B. Number of positive and negative cell clones.

Figure 6 Identify primer amplification results across the right homology arm



注:A:猪野生型 *HBB* 基因、人野生型 *HBB* 基因及人突变型 *HBB* 基因序列对比;B:15 株定点敲入细胞株纯合子、杂合子鉴定结果;C:定点敲入细胞株人源化 *HBB* 基因表达情况鉴定结果。

图 7 猪胎儿成纤维细胞 *hHBB* 基因型及基因表达检测

Note. A. Sequence comparison of swine wild-type *HBB* gene, human wild-type *HBB* gene and human mutant *HBB* gene. B. Identification of 15 homozygous and heterozygous site-specific knock-in cell lines. C. Identification results of humanized *HBB* gene expression in targeted knock-in cell lines.

Figure 7 *hHBB* genotype and mRNA expression examination in the pig fibroblasts

的杂合小鼠能较好模拟  $\beta$ -地贫的相关症状,同时包含特定的人类突变位点,为基因治疗提供了理想的靶点材料<sup>[4]</sup>。然而,我们对小鼠、猪与人的 *HBB* 基因和蛋白氨基酸比对发现,小鼠、猪与人的 *HBB* 蛋白同源性分别为 80% 和 85%,较小鼠而言猪与人 *HBB* 遗传距离更近。根据这些数据我们推测,无论是研究 *HBB* 基因功能,或是研究 *HBB* 突变体致地贫发病机制,利用猪为研究对象更能模拟其在人体内的生物学本质。且小鼠由于体型大小和生理生化数据一致性的限制,并不是基因治疗最为理想的疾病模型。本研究采用同样的思路构建了携带人源化 *HBB* 基因突变体同源打靶载体,并利用两条靶向切割猪内源 *HBB* 基因的 sgRNA 对其进行了敲除,同时结合同源重组修复,使得携带了目的突变体的人源 *HBB* 基因准确地敲入到巴马猪胎儿成纤维细胞基因组之中。该方法制备的突变体敲入阳性细胞可作为核供体,借助体细胞克隆技术,为下一步创制携带缺陷型人源化 *HBB* 基因的地贫模型猪奠定基础。

本研究中,我们将 CRISPR/Cas9 体系及同源重组载体经电转染方式导入巴马猪胎儿成纤维细胞,并结合 G418 药物筛选获得单克隆细胞。我们一共鉴定了 99 株单克隆,其中转基因阳性克隆 69 株,效率为 69.7%,定点敲入人源化 *HBB* 基因突变体的阳性细胞 15 株,阳性率为 15%。在这些成功定点敲入的细胞中 1 株纯合,其余为杂合,单等位基因的同源重组效率远高于双等位基因。

CRISPR/Cas9 技术的介导可提高同源重组效率达千倍以上,远远高于传统基因打靶效率,相比

而言,我们的结果稍低于同类定点整合效率。相关研究表明定点整合效率与多种因素有关,如细胞类型、同源臂的长短、细胞周期、转染效率等<sup>[11-15]</sup>。从细胞 DNA 修复机制看,非同源末端连接修复和同源重组修复同时存在,但在非分裂期的细胞中,细胞会更偏向于非同源末端连接修复,如此一来,重组效率在一定程度上受到了影响,人们常用 NHEJ 的抑制剂 Scr7 或 HDR 相关 RAD51 激动剂 RS-1,从而使同源重组修复效率显著提高<sup>[16]</sup>。在转染效率方面,一方面,不同的转染方式会影响效率,慢病毒或核转染比电转染、脂质体等其他转染方式效率更高;另一方面,转染体系的构成在一定程度上也会影响转染的效率,多个载体共转染较单个多基因表达载体效率低<sup>[17]</sup>。当然,我们可以通过药物筛选或流式细胞仪富集的方式来弥补转染效率的不足,从而提高同源重组效率。

在同源臂长度研究方面,传统的基因打靶研究表明同源臂长度与重组效率成正比<sup>[18]</sup>,但在 CRISPR/Cas9 介导的 HDR 中,同源臂的影响并不一定是正相关,不同的研究有不同的结果,如 Li 等<sup>[19]</sup>利用 5' 端  $1.2 \times 10^3$  同源臂长度,3' 端  $5.6 \times 10^3$  同源臂长度的打靶载体结合 TALEN 技术在猪 *Rosa26* 位点获得 31.3% 的整合效率;Ruan 等<sup>[20]</sup>利用左右同源臂长度均为  $0.8 \times 10^3$  的载体结合 CRISPR/Cas9 技术在猪 *H11* 位点获得 23% 的整合效率;此外,Xie 等<sup>[21]</sup>的研究结果表明当 5' 端、3' 端同源臂长度分别为  $0.5 \times 10^3$  和  $1 \times 10^3$  时整合效率较高,能达到 29.6%;相比而言,我们打靶载体左臂  $1.062 \times 10^3$ ,右臂  $1.024 \times 10^3$ 。可见,同源臂的长短能在一定程度

上影响同源重组效率,但并没有一致性的规律。

本研究以巴马猪胎儿成纤维细胞作为研究材料,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑手段,制备出携带人源化 HBB 基因突变体的转基因阳性细胞株。未来,这些阳性细胞可作为核供体,为下一步创制携带缺陷型人源化 HBB 基因的地贫模型猪奠定基础,也为人们研究地贫的发生机制和临床治疗提供珍贵的材料。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Kazazian HH Jr, Dowling CE, Waber PG, et al. The spectrum of beta-thalassemia genes in China and Southeast Asia[J]. *Blood*, 1986, 68(4): 964-966.
- [ 2 ] 赵文忠, 叶嘉玲, 王柏贤, 等. 人  $\beta$  地中海贫血  $\beta 41-41(-CTTT)$  转基因小鼠的构建[J]. *热带医学杂志*, 2014, 14(12): 1552-1555.
- Zhao WZ, Ye JL, Wang BX, et al. Establishment of transgenic mouse with human thalassemia mutation  $\beta 41-42(-CTTT)$  gene[J]. *J Trop Med*, 2014, 14(12): 1552-1555.
- [ 3 ] Niu XH, He WY, Song B, et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in  $\beta$ -thalassemia-induced pluripotent stem cells[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(32): 12576-12585.
- [ 4 ] Jamsai D, Zaibak F, Khongnium W, et al. A humanized mouse model for a common beta0 -thalassemia mutation[J]. *Genomics*, 2005, 85(4): 453-461.
- [ 5 ] Wang X, Garrick MD, Collins JF. Animal models of normal and disturbed iron and copper metabolism[J]. *J Nutr*, 2019, 149(12): 2085-2100.
- [ 6 ] Rogers CS. Genetically engineered livestock for biomedical models[J]. *Transgenic Res*, 2016, 25(3): 345-359.
- [ 7 ] 涂尾龙, 王洪洋, 张莺莺, 等. 实验用小型猪血液生理生化指标分析[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2019, 4: 45-46, 49.
- Tu WL, Wang HX, Zhang YY, et al. Analysis of blood physiological and biochemical indexes of experimental mini pigs[J]. *Shanghai J Anim Husbandry Vet Med*, 2019, 4: 45-46, 49.
- [ 8 ] 李军, 倪燕秀, 张继娟, 等. 聚乙二醇修饰猪血红蛋白的抗原性研究[J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(2): 91-94.
- Li J, Ni YX, Zhang JJ, et al. Antigenicity of PEG-modified porcine hemoglobin[J]. *Chin Pharm J*, 2008, 43(2): 91-94.
- [ 9 ] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha- and beta-thalassemia in pregnancy: the results of an 11-year prospective program in Guangzhou maternal and neonatal hospital[J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(2): 163-171.
- [ 10 ] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and Beta thalassemia in Guangdong province: implications for the future health Burden and population screening[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(5): 517-522.
- [ 11 ] Lee JS, Kallehauge TB, Pedersen LE, et al. Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8572.
- [ 12 ] Shin J, Chen J, Solnica-Krezel L. Efficient homologous recombination-mediated genome engineering in zebrafish using TALE nucleases[J]. *Development*, 2014, 141(19): 3807-3818.
- [ 13 ] Byrne SM, Ortiz L, Mali P, et al. Multi-kilobase homozygous targeted gene replacement in human induced pluripotent stem cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): e21.
- [ 14 ] Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(5): 2164-2173.
- [ 15 ] Saintigny Y, Delacôte F, Boucher D, et al. XRCC4 in G1 suppresses homologous recombination in S/G2, in G1 checkpoint-defective cells[J]. *Oncogene*, 2007, 26(19): 2769-2780.
- [ 16 ] Hu Z, Shi Z, Guo X, et al. Ligase IV inhibitor SCR7 enhances gene editing directed by CRISPR-Cas9 and ssODN in human cancer cells[J]. *Cell Biosci*, 2018, 8: 12.
- [ 17 ] 李广磊. CRISPR/Cas9 定点编辑猪基因组及克隆猪 DNA 异常甲基化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- Li GL. Site-Specific editing of pig genome using CRISPR/Cas9 and dysregulation of DNA methylation in cloned piglets[D]. Whuan: HuaZhong Agricultural University, 2015.
- [ 18 ] Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length[J]. *Genetics*, 1995, 140(2): 797-809.
- [ 19 ] Li X, Yang Y, Bu L, et al. Rosa26-targeted swine models for stable gene over-expression and Cre-mediated lineage tracing[J]. *Cell Res*, 2014, 24(4): 501-504.
- [ 20 ] Ruan J, Li H, Xu K, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knock in at the H11 locus in pigs[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14253.
- [ 21 ] Xie Z, Pang D, Wang K, et al. Optimization of a CRISPR/Cas9-mediated knock-in strategy at the porcine rosa26 locus in porcine foetal fibroblasts[J]. *Sci. Rep*, 2017, 7(1): 3036.

[收稿日期] 2020-05-28

周康,叶妙勇,赵凡,等. 两种黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 788-795.

Zhou K, Ye MY, Zhao F, et al. Effect of the Astragalus dose in Buyang Huanwu decoction on erectile dysfunction in rats with cavernous nerve injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 788-795.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.008

# 两种黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果

周康<sup>1#</sup>, 叶妙勇<sup>2#</sup>, 赵凡<sup>3</sup>, 马轲<sup>1</sup>, 吕伯东<sup>4,5,6\*</sup>, 许增宝<sup>7\*</sup>

- (1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053; 2. 温岭市第一人民医院泌尿外科, 浙江 温岭 317500; 3. 南通大学附属医院泌尿外科/男科, 江苏 南通 226001; 4. 浙江中医药大学附属第二医院泌尿男科, 杭州 310005; 5. 浙江省中医药重点实验室/男科实验室, 杭州 310053; 6. 浙江中医药大学泌尿男科研究所, 杭州 310005; 7. 湖州市中医院, 浙江 湖州 313000)

**【摘要】** 目的 探究两种黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果。方法 将32只SD大鼠随机平均分成假手术组、模型组、30 g组(模型+含黄芪30 g补阳还五汤)、120 g组(模型+黄芪120 g补阳还五汤);通过手术对SD大鼠海绵体神经进行钳夹(但不剪断)以造成海绵体神经损伤所致勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)大鼠模型;术后5 d采用不同剂量黄芪(分别设置黄芪30、120 g)的补阳还五汤灌胃干预,假手术组与模型组均予以等量生理盐水灌胃,每日1次,连续30 d。30 d后测定大鼠阴茎海绵体内压(intracavernous pressure, ICP), Masson染色技术观察海绵体组织平滑肌与胶原沉积含量,免疫荧光技术和Western Blot检测各组神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS),神经丝蛋白轻链多肽(neurofilament light polypeptide, NF-L),生长相关蛋白43(growth associated protein 43, GAP-43)变化。结果 与假手术组相比,模型组大鼠ICP明显降低( $P < 0.01$ ),阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积减少( $P < 0.01$ ),NF-L、nNOS、GAP43水平明显下降( $P < 0.01$ );与模型组相比,30 g组与120 g组大鼠ICP明显增高( $P < 0.01$ ),阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积增高( $P < 0.01$ ),nNOS、NF-L、GAP43水平明显增高( $P < 0.01$ ),其中与30 g组相比,120 g组大鼠ICP明显增高( $P < 0.05$ ),阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积增高( $P < 0.05$ ),nNOS、NF-L、GAP43水平明显增高( $P < 0.01$ )。结论 补阳还五汤可以明显改善大鼠勃起功能障碍,且《医林改错》原方所载的补阳还五汤治疗效果更优。

**【关键词】** 补阳还五汤;海绵体神经损伤;勃起功能障碍;黄芪;海绵体内压

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0788-08

## Effect of the Astragalus dose in Buyang Huanwu decoction on erectile dysfunction in rats with cavernous nerve injury

ZHOU Kang<sup>1#</sup>, YE Miaoyong<sup>2#</sup>, ZHAO Fan<sup>3</sup>, MA Ke<sup>1</sup>, LYU Bodong<sup>4,5,6\*</sup>, XU Zengbao<sup>7\*</sup>

**【基金项目】** 浙江省自然科学基金(LY18H270002)。

Funded by Natural Science Foundation of Zhejiang Province(LY18H270002).

**【作者简介】** 周康(1995—),男,硕士研究生,研究方向:泌尿外科及男科基础与临床研究。Email: 844310446@qq.com;

叶妙勇(1993—),男,硕士研究生,研究方向:泌尿外科及男科基础与临床研究。Email: yemiaoyong1993@163.com。

#共同第一作者

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

许增宝,男,主任医师,研究方向:中医学及泌尿外科研究。Email: 1643394189@qq.com。

\* 共同通信作者

(1. Second School of Clinical Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China.

2. Department of Urology, Wenling First People's Hospital, Wenling 317500. 3. Department of Urology and Andrology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001. 4. Department of Urology, the Second Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310005. 5. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine/Laboratory of Andrology, Hangzhou 310053. 6. Research Institute of Urology and Andrology, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310005. 7. Huzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huzhou 313000)  
Corresponding author: LYU Bodong. E-mail: lbd168@126.com; XU Zengbao. E-mail: 1643394189@qq.com

**[Abstract] Objective** To explore the therapeutic effects of two different doses of Buyang Huanwu decoction containing Astragalus on erectile dysfunction (ED) in rats with cavernous nerve injury. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: sham operation model, 30 g (model + Buyang Huanwu decoction containing 30 g Astragalus) and 120 g (model + Buyang Huanwu decoction containing 120 g Astragalus). The cavernous nerve of the rats was surgically clamped (but not cut) to establish the rat model of ED caused by cavernous nerve injury. Five days after the operation, a 30 g or 120 g dose of Astragalus was used for the gavage intervention of Buyang Huanwu decoction, or the same volume of normal saline (sham and model groups) was given, once a day for 30 consecutive days. After 30 days, the intracavernous pressure (ICP) of the rat corpus cavernosum was measured. Masson staining was used to observe the content of smooth muscle and collagen deposition in the spongy tissue. Fluorescence and western blotting were used to detect changes in neuronal nitric oxide synthase (nNOS), neurofilament light polypeptide (NF-L), growth associated protein 43 (GAP-43) expression in each group. **Results** Compared with the sham group, the model group showed significantly decreased ICP ( $P < 0.01$ ), decreased area of penile smooth muscle/collagen ( $P < 0.01$ ), and significantly decreased levels of NF-L, nNOS and GAP43 ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the rats in the 30 g and 120 g Astragalus groups showed significantly increased ICP ( $P < 0.01$ ), increased area of penile smooth muscle/collagen ( $P < 0.01$ ), and significantly increased levels of nNOS, NF-L and GAP43 ( $P < 0.01$ ). Compared with the 30 g group, the rats in the 120 g Astragalus group showed significantly increased ICP ( $P < 0.05$ ), increased area of penile smooth muscle/collagen ( $P < 0.05$ ), and significantly increased levels of nNOS, NF-L and GAP43 ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Buyang Huanwu decoction containing Astragalus obviously improved ED in cavernous nerve injury model rats. The higher dose of Astragalus (120 g), which is used in the original prescription of "Medical Forest Correction", was more efficacious.

**[Keywords]** Buyang Huanwu decoction; cavernous nerve injury; erectile dysfunction; Astragalus; intracavernous pressure

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

勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)是前列腺癌根治术(radical prostatectomy, RP)后最为常见的长期并发症<sup>[1]</sup>。尽管目前 RP 在不断改进,但即使采用保留双侧神经和微创 RP 仍不可避免地出现一定程度的海绵体神经(cavernous nerves, CN)损伤或神经失用,进而导致 ED<sup>[2]</sup>。5 型磷酸二酯酶抑制剂(phosphodiesterase type 5 inhibitors, PDE5i)通常作为 RP 后 ED 的一线治疗,然而据调查显示,RP 后 ED 患者于术后服用 3~36 个月 PDE5i,其国际勃起功能指数-5(IIEF-5)评分没有显著变化( $P=0.87$ )<sup>[3]</sup>,可见 PDE5i 对 RP 后 ED 治疗效果较为局限。从中医角度来看,笔者所在团队前期研究得出“气血失和”可能是勃起功能障碍的基本病因这一结论<sup>[4-5]</sup>,故治以益气活血。

补阳还五汤出自《医林改错》,由清代医家王清

任所创,功主益气活血,且近来大量研究表明补阳还五汤具有神经保护功能<sup>[6-7]</sup>。胡卫东等<sup>[8]</sup>运用加味补阳还五汤治疗糖尿病性 ED,取得较好的疗效,但细观文献中所用黄芪量仅为 30 g,而原方中所记载的 120 g 相差甚远。那么,补阳还五汤中黄芪剂量的高低与其神经保护功能从而改善勃起功能障碍是否密切相关,值得深入研究。本文就这一问题,探讨不同黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

32 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ±

15)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,【SCXK(沪)2017-0005】,并由浙江中医药大学实验动物中心饲养,【SYXK(浙)2019-0022】。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料及自由饮水,控制温度(23±2)℃、湿度60%,12h循环灯光。实验过程中对动物的处理符合2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》,所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号:IACUC-20190909-26)。32只大鼠随机分为4组,即假手术组、模型组、30g组(模型+30g黄芪补阳还五汤)、120g组(模型+120g黄芪补阳还五汤),每组8只。

### 1.1.2 药物

补阳还五汤中:赤芍:15g、桃仁:15g、当归:15g、川芎:15g、地龙:15g、红花:6g,30g组黄芪为30g,120g组黄芪为120g(所有药材由浙江中医药大学名中医馆提供)。将所有中药浸于10倍体积纯水中30min,然后煮沸2次,每次约1h,合并水煎液后,浓缩至水煎液浓度为1g/mL,4℃冰箱保存备用。

### 1.1.3 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(上海优宁维生物科技股份有限公司,批号:abs47047376),Masson三色染色试剂盒购于南京建成科技有限公司(批号:D026-1-3),神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)抗体(Abcam,批号:ab15280),神经丝蛋白轻链多肽(neurofilament light polypeptide, NF-L)抗体(Abcam,批号:ab134460),生长相关蛋白43(growth associated protein 43, GAP-43)抗体(CST,批号:5307S)。

MP160型16通道生理记录分析系统购于美国BIOPAC公司;Master-8可编程刺激器购于以色列AMPI;SDS-PAGE垂直电泳槽(MP-8001,北京凯元伯乐生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 造模及干预方法

参考课题组前期研究的造模方法<sup>[9]</sup>,将SD大鼠腹腔内注射3%戊巴比妥钠进行麻醉。剃除腹部绒毛,并用碘酒进行术前消毒。于大鼠下腹部中线处作一纵行切口,暴露前列腺组织。在外科显微镜下于背侧前列腺外侧叶表面找到盆腔神经节及其发出的海绵体神经,利用止血钳夹海绵体神经2min,继而还原周围组织正常解剖结构并逐层缝合关服。术后抗生素喂养5d。假手术组分离出海绵

体神经后,不作钳夹处理,余同上。术后5d起开始给药,给药剂量根据常用实验动物及人的体表面积比例进行剂量换算,给以12.8g/kg对应黄芪剂量的补阳还五汤灌胃,假手术组与模型组均予以等量生理盐水灌胃。每天1次,连续30d。

### 1.2.2 ICP检测

灌胃30d后,腹腔内注射3%戊巴比妥钠进行麻醉后仰卧固定,如造模方法中所操作暴露海绵体神经;阴茎包皮纵行切口,分离皮肤与白膜,暴露阴茎海绵体,插入25G金属针头后连接PE50管,置管连接于压力换能器,以测定阴茎海绵体内压。双电极钩刺激海绵体神经,记录ICP,电刺激参数:5V,15Hz,5ms,刺激持续时间1min,每次刺激间隔5min<sup>[10]</sup>。

### 1.2.3 样本收集

ICP测定后,使用眼科剪离断阴茎根部,分离阴茎龟头部分,取阴茎,于PBS中冲洗,去除海绵体内血液。冲洗完的阴茎组织分为三段,一段在预冷PBS中分离去除尿道、筋膜后放入-80℃冰箱保存,用于后续Western Blot检测;剩余阴茎组织放入4%多聚甲醛中固定。

### 1.2.4 Masson染色

经聚甲醛溶液固定的阴茎组织,常规石蜡包埋切片,蒸馏水润湿玻片30s,核染液染色60s,丢弃,冲洗液冲洗30s。浆染液染色30s,丢弃,冲洗液冲洗30s。黄色分色液分色8min左右弃去分色液,直接用蓝色复染液染色5min左右,丢弃,使用无水乙醇冲洗干净,载玻片吹干后使用封片剂封片,显微镜下观察。

### 1.2.5 免疫荧光检测

经聚甲醛溶液固定的阴茎组织,常规石蜡包埋切片,石蜡切片常规脱蜡至水,PBS冲洗3次,每次3min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温孵育10min,PBS冲洗;微波温湿和修复15min;PBS冲洗3次;5%山羊血清室温封闭30min;按1:200稀释比例分别加入抗nNOS、NF-L、GAP43一抗,DAPI行细胞核染色,4℃过夜后分别加入1:1000稀释的荧光二抗,避光孵育1h,滴加抗荧光衰减封片剂封片后置于4℃条件下保存,荧光显微镜下观察拍片,并用Image J软件测定阳性区域的面积。

### 1.2.6 Western Blot检测

取剩余阴茎组织研磨成匀浆,加入RIPA裂解液置于冰上裂解30min后,12000r/min 4℃离心15min。离心获得蛋白用BCA法测定浓度,加入

5 × 蛋白上样缓冲液 95℃ 变性 10 min; 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 电泳后的蛋白样品转移到 PVDF 膜上, 然后用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入相应一抗 4℃ 孵育过夜; 次日 TBST 洗去一抗, 加入对应种属的二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 去离子水洗膜 1 次之后, 用 ODYSSEY 双色红外激光成像系统扫膜, 并使用 Image Studio Ver 2.0 软件处理实验结果。

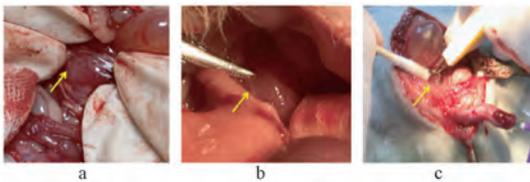
### 1.3 统计学分析

计量资料均采用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并采用 SPSS 20.0 软件分析数据。两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 海绵体神经解剖位置、夹损及阴茎海绵体内压测定

盆神经节于两侧前列腺背外侧方, 呈“人”字形, 其传出神经即为海绵体神经 (图 1a); 海绵体神经夹损 (图 1b); ICP 测定方法 (图 1c)。

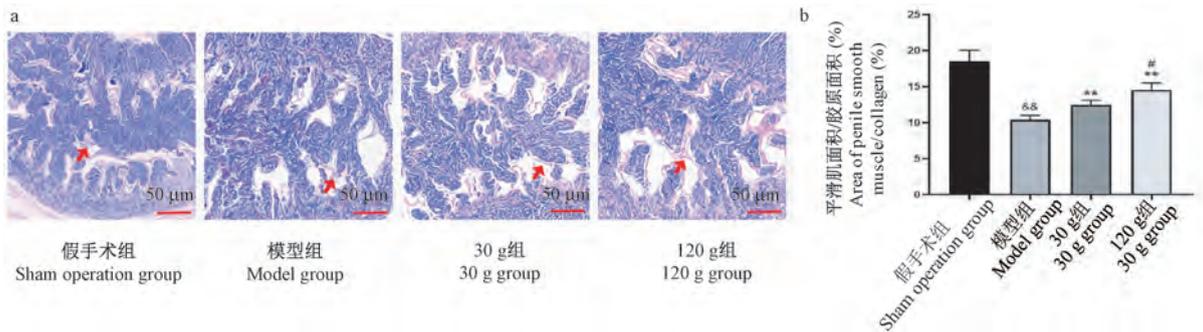


注: a: 海绵体神经解剖位置; b: 海绵体神经夹损造成 ED; c: ICP 测定。

图 1 海绵体神经解剖位置、夹损及阴茎海绵体内压测定

Note. a. anatomic location of cavernous nerve. b. ED caused by cavernous nerve clipped. c. ICP determination.

Figure 1 Anatomical location of cavernous nerve, clip injury and ICP measurement



注: 红色箭头所指为平滑肌。与假手术组比较, <sup>&&</sup>*P* < 0.01; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01; 与 30 g 组比较, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01。(下图同)

图 2 Masson 三色染色显示大鼠阴茎海绵体组织中平滑肌和胶原纤维含量 (*n* = 3)

Note. The red arrows indicate smooth muscles. Compared with sham operation group, <sup>&&</sup>*P* < 0.01. Compared with model group, <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01. Compared with group 30 g, <sup>#</sup>*P* < 0.05, <sup>##</sup>*P* < 0.01. (The same in the following figures)

Figure 2 Masson trichrome stain shows the content of smooth muscle and collagen fibers in the spongy tissues of rat penises (*n* = 3)

### 2.2 大鼠阴茎海绵体组织 Masson 三色染色

各组大鼠阴茎海绵体组织 Masson 三色染色中, 大鼠海绵窦内平滑肌如图 2a, 红色箭头所示。与假手术组比较, 模型组大鼠阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积显著下降 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 30 g 组及 120 g 组大鼠阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积明显提高 (*P* < 0.01); 与 30 g 组比较, 120 g 组大鼠阴茎海绵体平滑肌面积/胶原面积提高有统计学意义 (*P* < 0.05) (见图 2b)。

### 2.3 大鼠阴茎海绵体内压测定

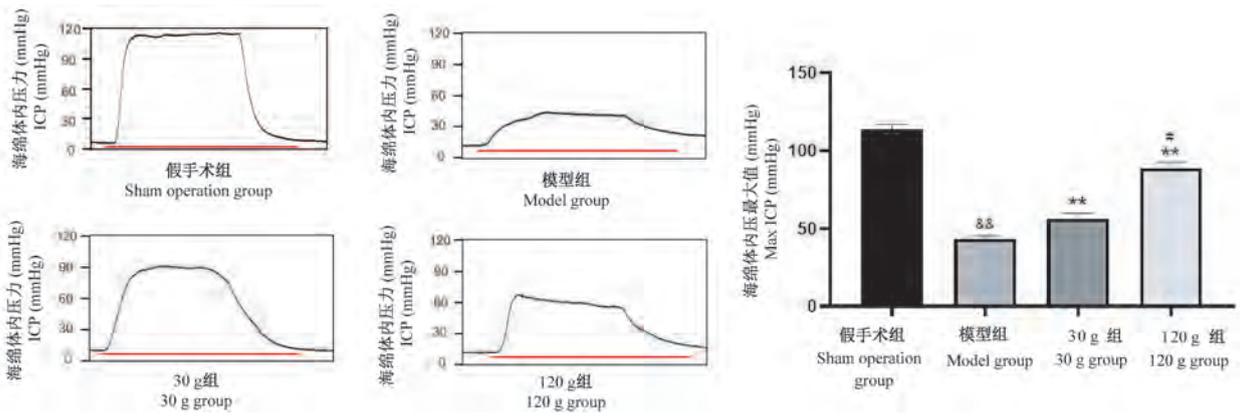
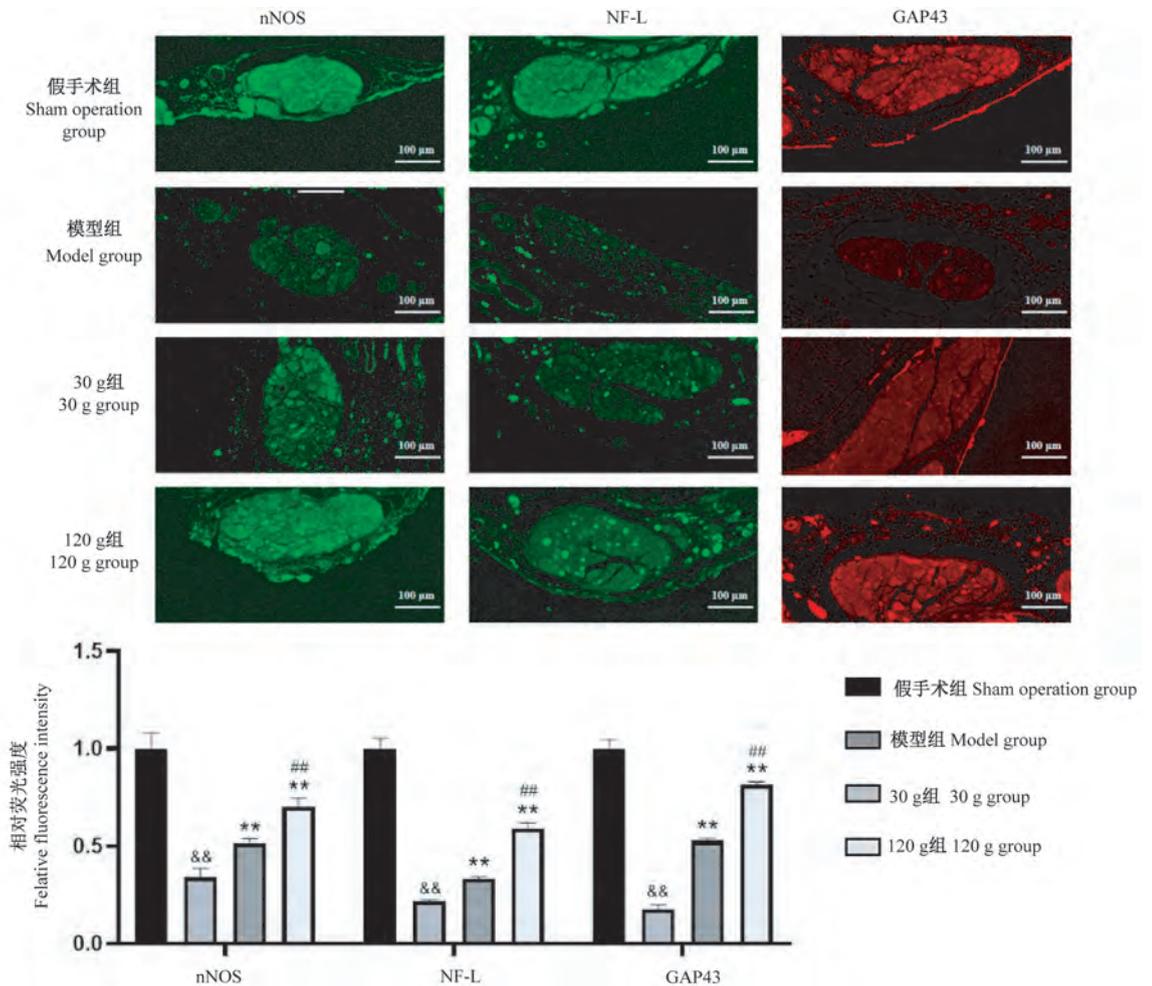
与假手术相比, 模型组大鼠勃起时 ICP 具有显著性差异 (*P* < 0.01), 即造模成功, 与模型组相比, 30 g 组与 120 g 组 ICP 均有显著提高 (*P* < 0.01), 与 30 g 相比, 120 g 组大鼠 ICP 明显升高 (*P* < 0.05) (见图 3)。

### 2.4 大鼠海绵体神经免疫荧光检测

相对于假手术组, 模型组大鼠海绵体神经中 nNOS、NF-L、GAP43 含量在海绵体神经损伤后显著降低 (*P* < 0.01), 经补阳还五汤治疗后, 30 g 组和 120 g 组大鼠阴茎海绵体神经中 nNOS、NF-L、GAP43 表达量显著增高 (*P* < 0.01), 且 120 g 组表达量显著高于 30 g 组 (*P* < 0.01) (见图 4)。

### 2.5 各组大鼠海绵体组织 nNOS、NF-L、GAP43 含量变化

与假手术组相比, 模型组大鼠海绵体组织中 nNOS、NF-L 显著下降 (*P* < 0.01), GAP43 显著提高 (*P* < 0.01); 与模型组相比, 30 g 组和 120 g 组 nNOS、NF-L、GAP43 含量显著升高 (*P* < 0.01); 与 30 g 组相比, 120 g 组 nNOS、NF-L、GAP43 含量明显增加 (*P* < 0.01) (见图 5)。

图 3 各组大鼠海绵体内压测定结果( $n=3$ )Figure 3 ICP measurement results in each group( $n=3$ )图 4 大鼠海绵体神经免疫荧光检测( $\times 100, n=3$ )Figure 4 Immunofluorescence assay of cavernosum nerve in rats( $\times 100, n=3$ )

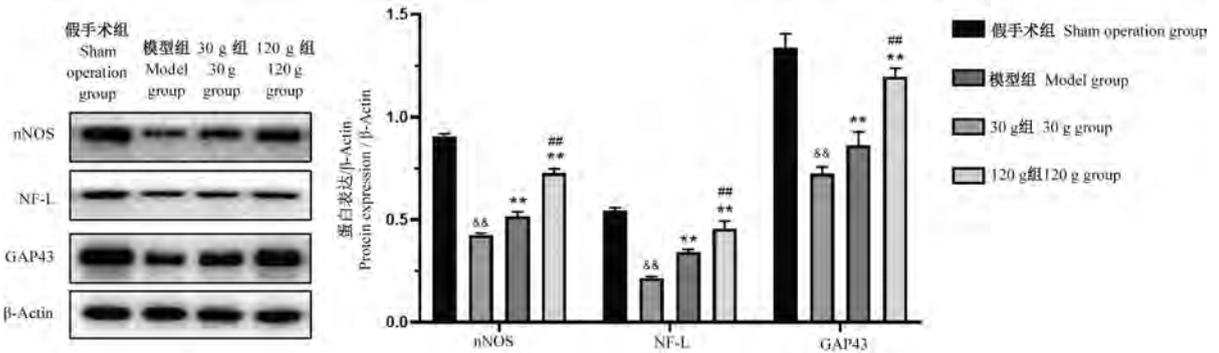


图 5 各组大鼠海绵体 nNOS、NF-L、GAP43 表达变化 (n=3)

Figure 5 Expression changes of nNOS, NF-L and GAP43 in cavernous of rats in each group (n=3)

### 3 讨论

海绵体神经损伤属于周围神经损伤,祖国医学中无此病名,但据其临床表现症状,与中医所谓“痹症”和“痿证”颇为相似,当属经络伤之范畴。《广嗣纪要·协期》曰:“气至则血至,阴茎则勃起刚”,可见男性的勃起需要健全的血气运行<sup>[11]</sup>,反而言之,当气血运行受阻则“血少不充,阴茎不怒”。RP 后 ED 病机多为经络不通,经气不续,气虚血滞,以致阴茎痿而不用。针对此病机,可考虑将益气活血法运用于临床治疗 RP 术后 ED。且中药药理学研究表明,益气活血方剂具有改善微循环、血液流变学、抗氧化等药理作用,可见,益气活血法或可于多方面调节、纠正 RP 后 ED。

补阳还五汤出自《医林改错》,是经典的益气活血方,大量研究表明,补阳还五汤可通过 SIRT1/VEGF 通路、减少自然杀伤细胞浸润、改善微循环等多个方面修复大鼠神经损伤<sup>[12-14]</sup>;Pan 等<sup>[15]</sup>通过手术造成大鼠中动脉闭塞性神经损伤大鼠模型,随后予以补阳还五汤灌胃干预,灌胃后第 7 天与第 14 天大鼠神经损伤明显改善;刘青龙<sup>[16]</sup>以补阳还五汤口服加药浴的方式干预坐骨神经损伤大鼠模型,干预后第 2、4、6 周,模型组大鼠坐骨神经传导速度较对照组显著增快;且临床数据显示,补阳还五汤能够明显改善缺血性卒中患者神经功能,经治疗后 NIHSS 评分、ADL 评分显著提高<sup>[17]</sup>。也有学者通过研究证实,补阳还五汤能够改善博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化<sup>[18]</sup>。而临床上使用补阳还五汤治疗勃起功能障碍也有报道,胡卫东等<sup>[8]</sup>运用加味补阳还五汤治疗糖尿病性 ED,亦取得较好的疗效,但细观文献中所用黄芪量仅为 30 g;且中华人民共和国药典中生黄芪最大用量也仅为 30 g<sup>[19]</sup>,而原方

中重用黄芪 120 g;全小林认为“重剂起沉疴”,治疗 ED 时一般重用生黄芪 120 g<sup>[20]</sup>大补元气,令气旺血行。那么黄芪用量是否与其神经保护效果、改善勃起效果具有密切相关性,值得研究。

本实验通过钳夹 SD 大鼠海绵体神经造成 ED 模型后予以不同黄芪剂量的补阳还五汤灌胃干预,使用 ICP 测定评估大鼠勃起功能;实验结果表明:模型组大鼠 ICP 水平显著降低,而相对于模型组而言,30 g 组与 120 g 组大鼠 ICP 明显升高,且 120 g 组高于 30 g 组,这表明了补阳还五汤确实能改善大鼠勃起功能障碍,且 120 g 组治疗效果优于 30 g 组。从分子水平来看,模型组大鼠阴茎海绵体组织 NF-L、nNOS、GAP43 表达量显著降低,阴茎海绵体组织胶原纤维面积增大,补阳还五汤灌胃干预后,30 g 组与 120 g 组大鼠 nNOS、NF-L、GAP43 表达量基于模型组有所提高,且 120 g 组与 30 g 组的差异有统计学意义。nNOS 可以通过催化左旋精氨酸来产生 NO,而 NO 则为体内主要的舒张血管的物质,通过舒张神经滋养血管进而发挥保护神经的作用<sup>[21-22]</sup>,GAP43 在神经元支撑、营养、保护、轴突再生等方面起到重要的作用<sup>[23-24]</sup>,在神经修复过程中表达上调,被认为是神经损伤后再生的重要指标<sup>[25]</sup>;NF-L 作为细胞骨架组成主要组成成分,对于维持神经形态具有十分重要的作用<sup>[26]</sup>,神经损伤后失去营养作用,不能维持正常形态导致神经细胞结构发生改变,最终导致 NF-L 表达量下降。本研究中各组大鼠 nNOS、NF-L、GAP43 表达量的变化为补阳还五汤在神经保护再生方面作用提供了确切依据,也说明了补阳还五汤可通过保护、修复海绵体神经从而改善勃起功能障碍。然而从 Masson 染色中可看到,模型组大鼠海绵体平滑肌含量下降,胶原含量增加,而 30 g 组与 120 g 组大鼠阴茎海绵体平滑肌含量

增加,原纤维含量降低,海绵体平滑肌在海绵体组织中占 45%,其作为阴茎的重要组成部分,在阴茎勃起的启动和维持中发挥关键作用<sup>[27]</sup>,Cho 等<sup>[28]</sup>提出海绵体损伤是引起阴茎纤维化的重要因素,与本实验结果相符;同时也意味着补阳还五汤在保护修复神经的同时还能在一定程度上改善阴茎组织纤维化从而改善勃起功能,但其确切机制有待深入研究。

综上所述,补阳还五汤可以通过神经修复有效改善大鼠勃起功能障碍并能在一定程度上改善阴茎海绵体组织纤维化,且《医林改错》原方所用高剂量黄芪用量的补阳还五汤治疗效果更为显著。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Clavell HJ, Wang R. The controversy surrounding penile rehabilitation after radical prostatectomy[J]. *Transl Androl Urol*, 2017, 6(1): 2-11.
- [ 2 ] Capogrosso P, Salonia A, Briganti A, et al. Postprostatectomy erectile dysfunction: a review[J]. *World J Mens Health*, 2016, 34(2): 73-88.
- [ 3 ] Sridhar AN, Cathcart PJ, Yap T, et al. Recovery of baseline erectile function in men following radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: a prospective analysis using validated measures[J]. *J Sex Med*, 2016, 13(3): 435-443.
- [ 4 ] 赵凡, 赵剑锋, 张春和, 等. 基于“气血理论”论阳痿病机及治法[J]. *中国性科学*, 2017, 26(8): 90-92.  
Zhao F, Zhao JF, Zhang CH, et al. A preliminary discussion on the pathogenesis and therapy of Impotence based on qi-blood theory[J]. *Chin J Hum Sex*, 2017, 26(8): 90-92.
- [ 5 ] 赵凡, 张翔, 石兵, 等. 结合根治性前列腺切除术术后勃起功能障碍的发病机制初探其中医药防治思路[J]. *中国男科学杂志*, 2017, 31(6): 66-69.  
Zhao F, Zhang X, Shi B, et al. A preliminary study on the pathogenesis of erectile dysfunction after radical prostatectomy [J]. *Chin J Androl*, 2017, 31(6): 66-69.
- [ 6 ] 李宏松, 龙潭, 吴惠琴, 等. 加味补阳还五汤在大鼠视神经损伤修复中的作用研究[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(11): 1032-1035.  
Li HS, Long T, Wu HQ, et al. Effects of modified Buyang Huanwu Decoction on optic nerve repair after injury in rats[J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2019, 39(11): 1032-1035.
- [ 7 ] 郭晓辉, 卜保献, 李艳侠, 等. 补阳还五汤对大鼠 SCII 自噬相关蛋白影响的实验研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2020, 34(1): 5-8, 36.  
Guo XH, Bo BX, Li YX, et al. Experimental study on the effect of Buyang Huanwu Decoction on the autophagy related proteins of SCII in rats[J]. *Mil Med J South Chin*, 2020, 34(1): 5-8, 36.
- [ 8 ] 胡卫东, 陈德宁, 邹达民, 等. 加味补阳还五汤治疗糖尿病性勃起功能障碍的疗效观察[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(1): 86-87.  
Hu WD, Chen ND, Zou DM, et al. Observation of clinical curative effect of modified Buyang Huanwu Decoction on diabetic erectile dysfunction[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2014, 32(1): 86-87.
- [ 9 ] Ye MY, Zhao F, Ma K, et al. Effect of HongJing I in treating erectile function and regulating RhoA pathway in a rat model of bilateral cavernous nerve injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1083737.
- [ 10 ] 叶妙勇, 赵凡, 马轲, 等. 静脉注射针与自制 Pe-50 管针头用于大鼠阴茎海绵体内压测定的比较[J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 753-759.  
Ye MY, Zhao F, Ma K, et al. Comparison of the use of intravenous infusion needle and self-made Pe-50 tube needle in the measurement of intracavernosal pressure in rat penis[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 753-759.
- [ 11 ] 王琦. 宗筋论[J]. *中华中医药杂志*, 2006, 10: 579-581.  
Wang Q. On theory of male external genitals[J]. *Chin J Tradit Chin Med*, 2006, 10: 579-581.
- [ 12 ] Dou B, Zhou W, Li S, et al. Buyang Huanwu Decoction attenuates infiltration of natural killer cells and protects against ischemic brain injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(4): 1286-1300.
- [ 13 ] Zheng XW, Shan CS, Xu QQ, et al. Buyang Huanwu Decoction targets SIRT1/VEGF pathway to promote angiogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 911.
- [ 14 ] 罗琳, 邓叔华, 易健, 等. 脑卒中后抑郁大鼠行为学的动态变化及中药补阳还五汤的干预作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(4): 8-13.  
Luo L, Deng SH, Yi J, et al. Dynamic changes of ethology and interventional effect of a traditional Chinese medicine Buyang Huanwu Decoction in rats with post-stroke depression[J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(4): 8-13.
- [ 15 ] Pan R, Cai J, Zhan L, et al. Buyang Huanwu decoction facilitates neurorehabilitation through an improvement of synaptic plasticity in cerebral ischemic rats[J]. *BMC Complement Alternat Med*, 2017, 17(1): 173.
- [ 16 ] 刘青龙. 补阳还五汤口服和药浴对损伤的大鼠坐骨神经传导速度的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(2): 48-49.  
Liu QL. Beneficial effect of oral administration and medicated bath of BuYang HuanWu decoction on the conduction velocity of injured rat sciatic nerve[J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23(2): 48-49.
- [ 17 ] 王晓棠. 补阳还五汤治疗脑梗死后遗症的临床疗效及安全性分析[J]. *中国医药指南*, 2020, 18(14): 186-187.  
Wang XT. Clinical efficacy and safety analysis of Buyang Huanwu Decoction in the treatment of sequelae of cerebral infarction[J]. *Guide Chin Med*, 2020, 18(14): 186-187.
- [ 18 ] Wang X, Li X, Wang LN, et al. Buyang Huanwu Decoction ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via downregulation of related protein and gene expression[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9185485.

- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 1372 - 1373 [S]. 2015.  
Chinese Pharmacopoeia Committee-Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 1372-1373 [S]. 2015.
- [20] 万方. 全小林从络辨治阳痿验案 1 则[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(11): 37-38.  
Wan F. Professor Tong Xiaolin's clinical experience in differentiating and treating impotence from collaterals; a case report[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2011, 45(11): 37-38.
- [21] Li JR, Zhao YS, Chang Y, et al. Fasudil improves endothelial dysfunction in rats exposed to chronic intermittent hypoxia through RhoA/ROCK/NFATc3 pathway[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195604.
- [22] 吴永杰, 顾文勇. 加减补阳还五汤对易卒中自发性高血压大鼠海马区一氧化氮的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(8): 463-465.  
Wu YJ, Gu WY. Effect of a Chinese traditional medicine Bu-Yang-Huan-Wu-Tang on the nitric oxide level in hippocampus in stroke-prone spontaneously hypertensive (SHR/SP) rats [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(8): 463-465.
- [23] Ma L, Shen CA, Gao L, et al. Anti-inflammatory activity of chitosan nanoparticles carrying NF- $\kappa$ B/p65 antisense oligonucleotide in RAW264.7 macrophage stimulated by lipopolysaccharide [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 142: 297-306.
- [24] Lei L, Tang L. Schwann cells genetically modified to express S100A4 increases GAP43 expression in spiral ganglion neurons in vitro [J]. Bioengineered, 2017, 8(4): 404-410.
- [25] Talman V, Amadio M, Osera C, et al. The C1 domain-targeted isophthalate derivative HMI-1b11 promotes neurite outgrowth and GAP-43 expression through PKC $\alpha$  activation in SH-SY5Y cells [J]. Pharmacol Res, 2013, 73: 44-54.
- [26] Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes [J]. Epilepsia, 2006, 47(7): 1094-120.
- [27] 乐岭, 王永, 向光大, 等. 津力达对高糖环境下大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞表型转化的影响 [J]. 华南国防医学杂志, 2018, 32(12): 817-821, 837.  
Le L, Wang Y, Xiang GD. Effect of Jinlida on phenotypic conversion of corpus cavernosum smooth muscle cells in rats under high glucose conditions [J]. Mil Med J South Chin, 2018, 32(12): 817-821, 837.
- [28] Cho MC, Song WH, Paick JS. Suppression of cavernosal fibrosis in a rat model [J]. Sex Med Rev, 2018, 6(4): 572-582.

[收稿日期] 2020-07-14

张茹鑫,李承罡,杜若琛,等. 人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 796-804.

Zhang RX, Li CG, Du RC, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on autophagy in the naturally aging rat hippocampus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 796-804.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.009

# 人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响

张茹鑫<sup>1</sup>,李承罡<sup>2\*</sup>,杜若琛<sup>1</sup>,原一桐<sup>1</sup>,李宵<sup>1</sup>,赵碧春<sup>1</sup>,张玉娟<sup>1</sup>,王春芳<sup>1\*</sup>

(1. 山西医科大学实验动物中心,太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院,太原 030001)

**【摘要】** 目的 本研究探究移植人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)是否能通过调节自然衰老大鼠自噬水平来改善学习记忆及认知衰退。方法 SD大鼠屏障环境饲养至衰老年龄(24月龄),行为学挑选出认知衰退明显的老年鼠,分为细胞移植组(H组)和生理盐水组(C组),3月龄SD大鼠为正常组(N组)。H组:尾静脉注射hUCMSCs细胞混悬液500 μL,剂量为每只 $2 \times 10^6$ 个,C组和N组分别尾静脉注射无菌生理盐水。时间均为每周1次,连续4周。通过Morris水迷宫,Y迷宫及新物体识别实验观察其学习记忆能力变化;通过HE染色观察大鼠海马神经元形态改变;通过Western Blot检测海马LC3II/I、Beclin1、P62的相对表达量。**结果** (1)行为学结果显示H组和N组学习记忆能力显著高于C组。(2)HE染色中H组和N组海马CA1区和DG区神经细胞排列较规整,细胞结构完整,细胞核饱满,C组CA1区神经元数量减少,细胞排列疏松,细胞核固缩,呈退行性病变。(3)H组和N组中P62蛋白含量显著低于C组,Beclin1和LC3 II/I显著高于C组。**结论** 静脉注射人脐带间充质干细胞改善自然衰老大鼠的学习记忆及认知衰退,可能与干预后自噬水平的恢复有关。

**【关键词】** 衰老;自噬;人脐带间充质干细胞;认知衰退;大鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0796-09

## Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on autophagy in the naturally aging rat hippocampus

ZHANG Ruxin<sup>1</sup>, LI Chenggang<sup>2\*</sup>, DU Ruo Chen<sup>1</sup>, YUAN Yitong<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, ZHAO Bichun<sup>1</sup>,  
ZHANG Yujuan<sup>1</sup>, WANG Chunfang<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.

2. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Corresponding author: WANG Chunfang. E-mail: wangchunfang@sxmu.edu.cn; LI Chenggang. E-mail: lcgzydeyjk@163.com

**【基金项目】** 山西省重点研发项目(201803D31068),山西省应用基础研究项目(201801D121212,201901D211319,201901D111384),山西省高等学校科技创新项目(2019L0445,2019L0418)。

Funded by Key R&D project of Shanxi Province (201803D31068), Applied Basic Research Project of Shanxi Province (201801D121212, 201901D211319, 201901D111384), Science and Technology Innovation Project of Colleges and Universities of Shanxi Province (2019L0445, 2019L0418).

**【作者简介】** 张茹鑫(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:干细胞与神经发育再生。Email: zhangruxin@163.com

**【通信作者】** 王春芳(1964—),女,教授,博士生导师,研究方向:干细胞与神经发育再生。Email: wangchunfang@sxmu.edu.cn;

李承罡(1971—),男,副主任医师,研究方向:脊柱脊髓损伤。Email: lcgzydeyjk@163.com。

\* 共同通信作者

**[Abstract] Objective** To explore whether transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) can improve learning, memory and cognitive decline by regulating autophagy levels in naturally aging rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were reared in a barrier environment to the age of 24 months. Behavioral studies select aging rats with obvious cognitive decline; the rats were divided into a cell transplantation group (group H) and a normal saline group (group C). For comparison, a normal group (group N) of 3-month-old rats was included. Rats in group H were injected with  $2 \times 10^6$  hUCMSCs in a volume of 500  $\mu$ L through the tail vein. Rats in groups C and N were injected with an equal volume of sterile saline through the tail vein. Injections were performed once per week for 4 weeks. Changes in learning and memory ability were assessed using the Morris water maze, Y maze, and novel object recognition test. Changes in rat hippocampal neuron morphology were assessed using hematoxylin-eosin staining. Relative expression levels of hippocampal LC3II/I, Beclin1, and p62 were assessed using Western Blot. **Results** Behavioral analyses showed that the learning and memory abilities were significantly better in groups H and N than in group C. HE staining of nerve cells in the CA1 and DG areas of the hippocampus revealed more regular arrangements, more complete cell structure, and more intact nuclei in groups H and N. Conversely, the number of neurons in the CA1 area was reduced, cell arrangement was loose, nuclei were shrunken, and degenerative disease was present in group C. p62 protein content was significantly lower in groups H and N than in group C, while Beclin1 and LC3II/I protein levels were significantly higher in groups H and N than in group C. **Conclusions** Intravenous injection of hUCMSCs improved learning, memory, and cognitive decline in naturally aging rats, presumably by restoration of autophagy.

**[Keywords]** aging; autophagy; human umbilical cord mesenchymal stem cells; cognitive decline; rats

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

随着全球人口老龄化的进程日益加快,衰老已经成为国内外神经科学与衰老生物学研究的热点问题,而脑是受衰老影响最大的器官之一,脑的衰老会引起大脑内微环境的改变,主要表现为树突棘密度的降低、树突数量的减少以及突出后模致密物的变薄,这些被认为是衰老时记忆力减退、认知功能衰退的原因。研究显示,在自然衰老的机体中,ATG 蛋白或自噬诱导所需要的其他蛋白如 Sirtuin1 表达下调<sup>[1-2]</sup>。有研究显示,通过对酿酒酵母菌中年龄老化因子的无偏筛选,发现了多个具有自噬缺陷的短寿突变体(包括 117 个短寿突变体中的 10 个 ATG 突变)<sup>[3]</sup>。在阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 和亨廷顿病中,自噬有神经保护的作用<sup>[1]</sup>。在正常人类衰老大脑中,自噬相关基因 5 (autophagy-related5, Atg5), 自噬相关基因 7 (autophagy-related7, Atg7) 和 Beclin 1 表达下调,与年龄相关的骨关节炎中 UNC-51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1)、Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 II/I (microtubule-associated protein1 light chain 3 II/I, LC3II/I) 表达也下调<sup>[4-5]</sup>。这些发现表明,自噬的减弱可能是造成衰老表型的一种原因,因此提高自噬是抗衰老的有效手段。

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 自发现以来,就因其具有高度的自我更新和多向分化潜能而备受关注,已经被用于多种疾病的基础研究和临床试验研

究。文献报道, hUCMSCs 通过改善突触可塑性和内源性神经发生恢复了老年小鼠海马依赖性学习记忆能力<sup>[6]</sup>。有研究显示 hUCMSCs-exo 可以诱导自噬并且穿过血脑屏障到达灰质,减轻帕金森 (Parkinson's disease, PD) 大鼠模型的不对称旋转缺陷<sup>[7]</sup>。在膀胱肿瘤中通过 AKT/mTOR 信号通路,使 Atg5、Atg7 和 Beclin1 上调并使磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR) 下调增强膀胱肿瘤自噬性<sup>[8]</sup>。在器官退行性病变中,移植人脐带间充质干细胞后使各脏器中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3II/I 高表达,证明 hUCMSCs 通过调节自噬提高机体抗氧化应激的能力来延缓衰老<sup>[9]</sup>。但 hUCMSCs 对于衰老进程中引起的脑部自噬水平紊乱是否有调节作用,以及是否可以通过移植来调控自噬的发生改善认知功能方面的报道较少。因此,本研究目的是评估静脉注射 hUCMSCs 对自然衰老引起的认知障碍的作用及调节脑部海马区自噬水平的潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

50 只 24 月龄清洁级雄性 SD 大鼠, 体重约为 800 g; 15 只 3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠, 体重约为 300 g。购于山西医科大学实验动物中心【SCXK (晋) 2019-0005】, 饲养于山西医科大学实验动物中心屏障

环境中【SYXK(晋)2019-0007】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。所有操作均符合实验大鼠的饲养过程和其他实验操作均符合实验动物伦理学要求(审批号:SYDL2020004)以及中华人民共和国《实验动物管理条例》。

### 1.1.2 主要试剂与仪器

Anti-LC3II/I Rabbit pAb (Wanleibio, WL01506), Anti-P62 Rabbit pAb (Wanleibio, WL02385), Anti-Beclin1 Rabbit pAb (Wanleibio, WL02508), Anti- $\beta$ -actin Rabbit pAb (Wanleibio, WL01372), HRP Conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit/mouse IgG (BOSTER, BA1054), PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™, 26616), Beyo ECL Star (Beyotime, P0018AFT), HE 染色试剂盒 (Solarbio, G1120), 通用型组织固定液 (Servicebio, G1101)。

Morris 水迷宫和动物运动轨迹跟踪系统 (Noldus, 荷兰), Y 迷宫实验箱(自制), 新物体识别实验箱(自制), 细胞培养箱 (Heal Force, HF240, 中国), 石蜡切片机 (Leica RM 2245, 德国), 荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本), 电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 转膜仪 (Bio-Rad, 美国), 高灵敏度化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及实验干预

经过行为学筛选出现学习认知衰退的 24 月龄大鼠 30 只,再将其随机分为:细胞移植组(H组)(15只),生理盐水组(C组)(15只)。3 月龄大鼠分为:正常年轻组(N组)(15只)。H组:尾静脉注射 hUCMSCs 细胞混悬液 500  $\mu$ L, 剂量为每只  $2 \times 10^6$  个。C组和 N 组分别尾静脉注射 NaCl, 连续 4 次。细胞移植组所有大鼠均无脱失,注射细胞后无免疫排斥反应和急性毒性反应,注射后 1 个月时间内所有 SD 大鼠也均无其他异常现象。

### 1.2.2 细胞培养

脐带组织来源于山西省儿童医院,经伦理委员会批准并经过产妇及家属知情同意。细胞培养方法参照<sup>[10]</sup>,将第 3~4 代细胞用 0.25% 胰酶/EDTA 消化后,再用 0.9% 的生理盐水漂洗,重悬细胞并调整密度为每毫升  $4 \times 10^6$  个。

### 1.2.3 新物体识别

细胞注射结束 1 周后,开始新物体识别实验。实验方法参照<sup>[11]</sup>新物体识别概率视为新物体探索次数/总探索次数  $\times 100\%$  表示<sup>[12]</sup>,新物体辨别系数视为(新物体探索时间 - 旧物体探索时间)/(新物

体探索时间 + 旧物体探索时间)表示<sup>[13]</sup>。数据采集处理由 ANY-Maze 软件(Stoeling, 美国)完成。

### 1.2.4 Y 迷宫

新物体识别实验结束 1 d 后,开始 Y 迷宫实验。自发交替行为测试:用于测试大鼠短期工作记忆能力。实验开始时,将大鼠放入 Y 迷宫任意臂末端,任其自由探究 8 min,摄像系统记录动物的活动,记录分析大鼠的进入各臂的顺序和总次数,并计算交替正确率。交替正确率=进臂正确的次数/(进臂总次数-2) $\times 100\%$ <sup>[14]</sup>。

新异臂探索实验:用于检测大鼠的空间探索能力,分为两部分:训练期,用挡板将新异臂隔开,将大鼠放入剩余某臂中,并使其自由活动 10 min, 24 h 后进行测试部分。测试期,取出挡板,将大鼠随机放入一臂中,使其在实验箱内活动 5 min。录像并记录每只大鼠进入新异臂的次数。数据采集处理由 ANY-Maze 软件(Stoeling, 美国)完成。

### 1.2.5 Morris 水迷宫

Y 迷宫结束 1 d 后,开始 Morris 水迷宫实验。用来测试大鼠的长期工作记忆能力。实验方法参照<sup>[15]</sup>,数据采集处理由 Ethovision 3.0 软件(Noldus Information Technology, 荷兰)完成。

### 1.2.6 HE 染色

大鼠腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠(50 mg/kg),完全麻醉后暴露心脏,先用 180 mL 0.9% 无菌生理盐水冲洗,然后 180 mL 4% 多聚甲醛灌注。待灌注成功后,分离出大脑,置于 4% 多聚甲醛内常温固定 24 h,制作石蜡切片,然后进行 HE 染色,最后中性树脂封片后镜下观察并拍片记录。通过 HE 染色观察海马内部细胞的结构变化。

### 1.2.7 Western Blot

将 SD 大鼠麻醉后快速断头,冰上取出大鼠新鲜海马组织,-80℃ 冷冻保存。取出加入组织裂解液冰上研磨、低温离心提取总蛋白。利用 BCA 法检测蛋白浓度,各样本内蛋白含量根据标准曲线计算。每组取 40  $\mu$ g 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),再将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液,室温摇床封闭 1.5 h,将封闭好的 PVDF 膜浸泡在以 TBST 稀释的 LC3II/I (1:750), P62 (1:1000), Beclin1 (1:750),  $\beta$ -actin (1:1000) 一抗中,4℃ 条件下孵育过夜,洗涤后浸泡在以 TBST(1:10000) 稀释的二抗中,室温摇床孵育 2 h。最后将 PVDF 膜放至凝胶成像仪上,加入 ECL 化学发光剂显色成像并保存。条带的灰度值采用 Image Lab 软件分析。

### 1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间均数比较采用单因素方差分析或重复测量的方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性, $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 hUCMSCs 的形态观察

原代 hUCMSCs 培养 14 d 后贴壁生长,第 3 代细胞生长状态良好,呈长梭形漩涡状,典型集落生长(图 1A,1B),细胞融合至 80~90% 时用于实验。

### 2.2 hUCMSCs 改善衰老大鼠在新物体识别实验中的学习记忆能力

H 组大鼠和 N 组大鼠新物体识别率和分辨系数显著高于 C 组 ( $P < 0.01$ ),H 组和 N 组间无显著差异(图 2A,2B)。

### 2.3 hUCMSCs 改善衰老大鼠在 Y 迷宫实验中的短期工作记忆和空间探索能力

H 组和 N 组自发交替行为显著高于 C 组 ( $P < 0.05$ ),H 组和 N 组间无显著差异(图 3A)。H

组和 N 组进入新异臂的次数显著高于 C 组 ( $P < 0.05$ ),H 组和 N 组间无显著差异(图 3B)。

### 2.4 hUCMSCs 改善衰老大鼠在经典水迷宫实验中的长期工作记忆和空间探索能力

H 组和 N 组大鼠随着训练时间延长,逃避潜伏期显著短于 C 组大鼠,在训练的第 4 天差异极显著 ( $P < 0.01$ );H 组和 N 组无差异(图 4A);在第 5 天的空间探索实验中,游泳轨迹可看出 H 组和 N 组呈直线式搜索,C 组呈曲线式搜索(图 4B);H 组和 N 组跨越平台次数和目的象限停留时间显著大于 C 组 ( $P < 0.01$ )(图 4C、4D);此外,各组大鼠的游泳速度没有统计学差异(图 4E)。

### 2.5 hUCMSCs 改善衰老大鼠海马 CA1 区和 DG 区神经元数量及形态

H 组和 N 组海马 CA1 区细胞排列较规整,结构完好,细胞核饱满,C 组 CA1 区神经元数量减少,排列疏松,细胞核有固缩、碎裂现象(图 5A、5B、5C)。H 组和 N 组海马 DG 区形态规整,神经细胞排列紧密,细胞结构完整,细胞核饱满。C 组大鼠海马 DG 区形态不规整,细胞数量减少,细胞核固缩,碎裂严重(图 5D、5E、5F、5G、5H、5I)。

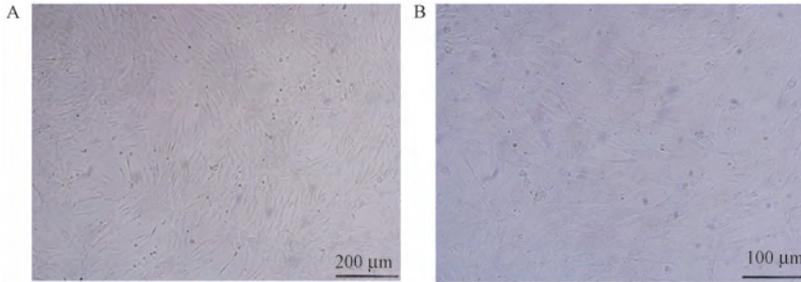
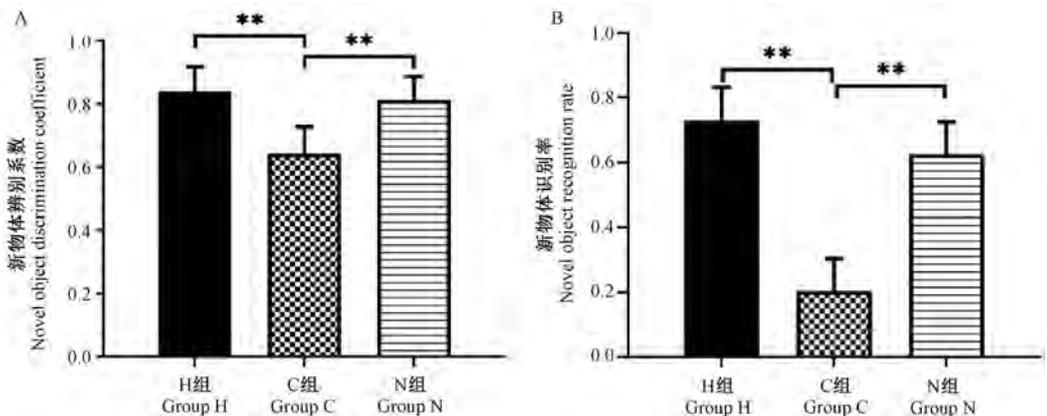


图 1 光学显微镜下处于对数期生长的第 3 代 hUCMSCs 细胞形态

Figure 1 Morphology of the third generation hUCMSCs growing in log phase under light microscope

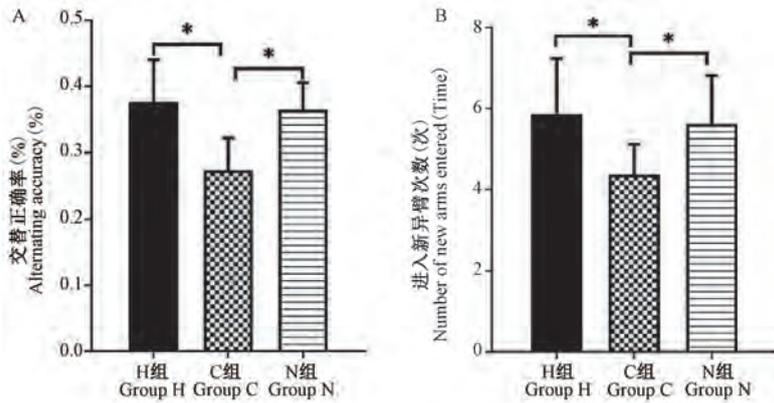
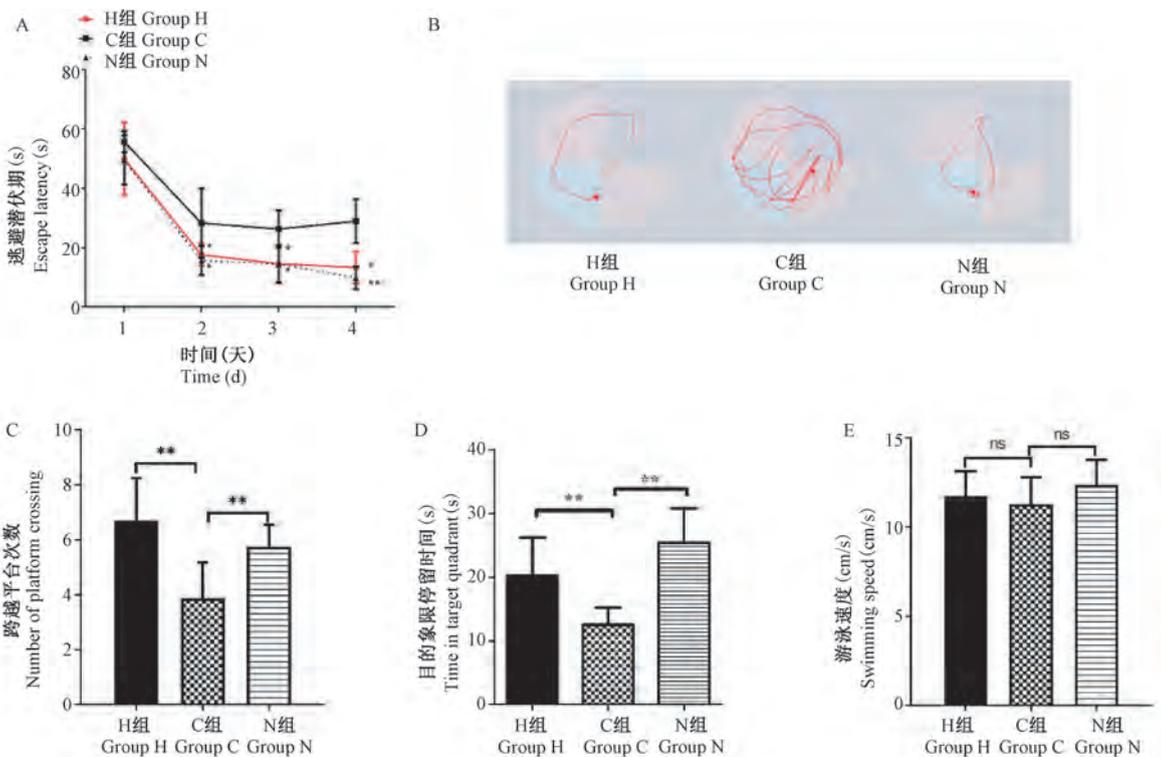


注:与 C 组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 新物体识别实验 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Note. Compared with group C, \*\*  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 2 Novel object recognition test ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

图 3 Y 迷宫实验 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Figure 3 Y Maze ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注: A, B: 大鼠在定位航巡实验中找到平台的时间以及轨迹图; C, D: 大鼠在空间探索实验中跨越平台的次数以及在目的象限停留的时间; E: 大鼠在水迷宫实验中的游泳速度。

图 4 Morris 水迷宫实验 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

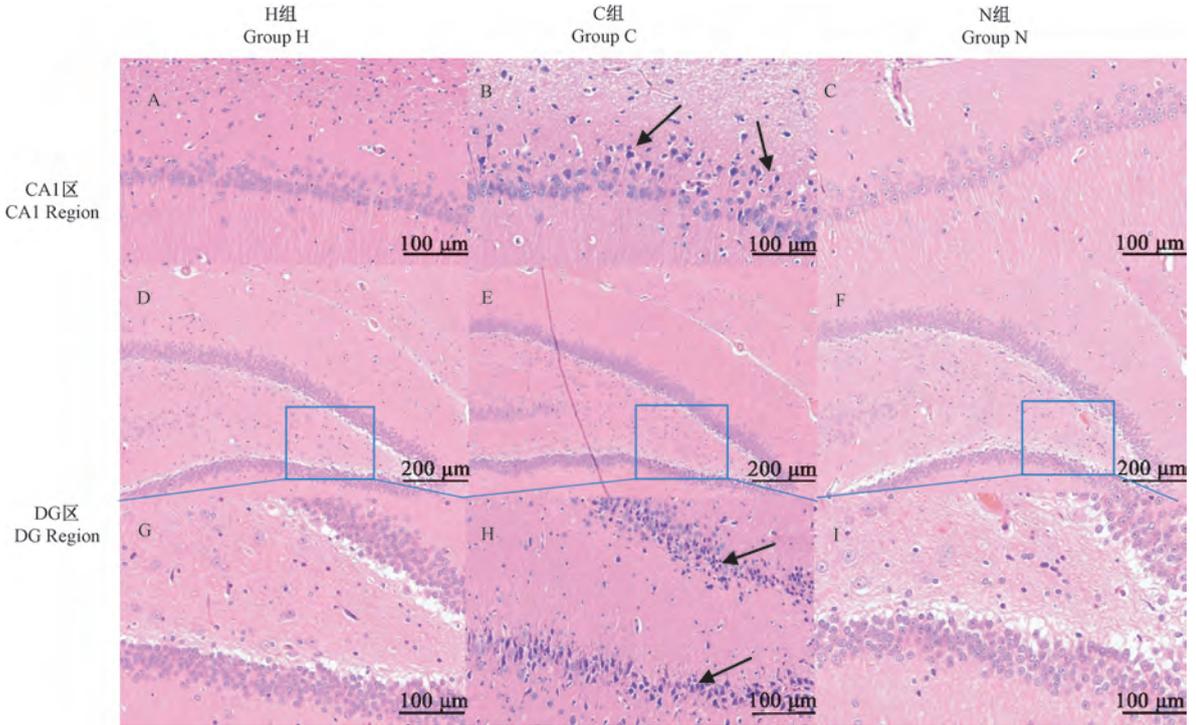
Note. A, B. The time and track of the rats to find the platform in the positioning cruise experiment. C, D. The number of times the rats crossed the platform in the space exploration experiment and the time they stayed in the target quadrant. E. Swimming speed of rats in water maze experiment.

Figure 4 Morris water maze ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

## 2.6 hUCMSCs 干预后增强了衰老大鼠海马中自噬相关蛋白的表达

H 组和 N 组大鼠海马中 LC3 II 蛋白含量较 C 组显著升高 ( $P < 0.01$ ), LC3 I 蛋白含量较 C 组显著降低

( $P < 0.05, P < 0.01$ ), LC3II 与 LC3I 的比值较 C 组显著升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) (图 6A、6C), H 组和 N 组大鼠海马中 P62 蛋白含量较 C 组显著降低, Beclin1 蛋白含量较 C 组显著升高 ( $P < 0.01$ ) (图 6A、6B)。

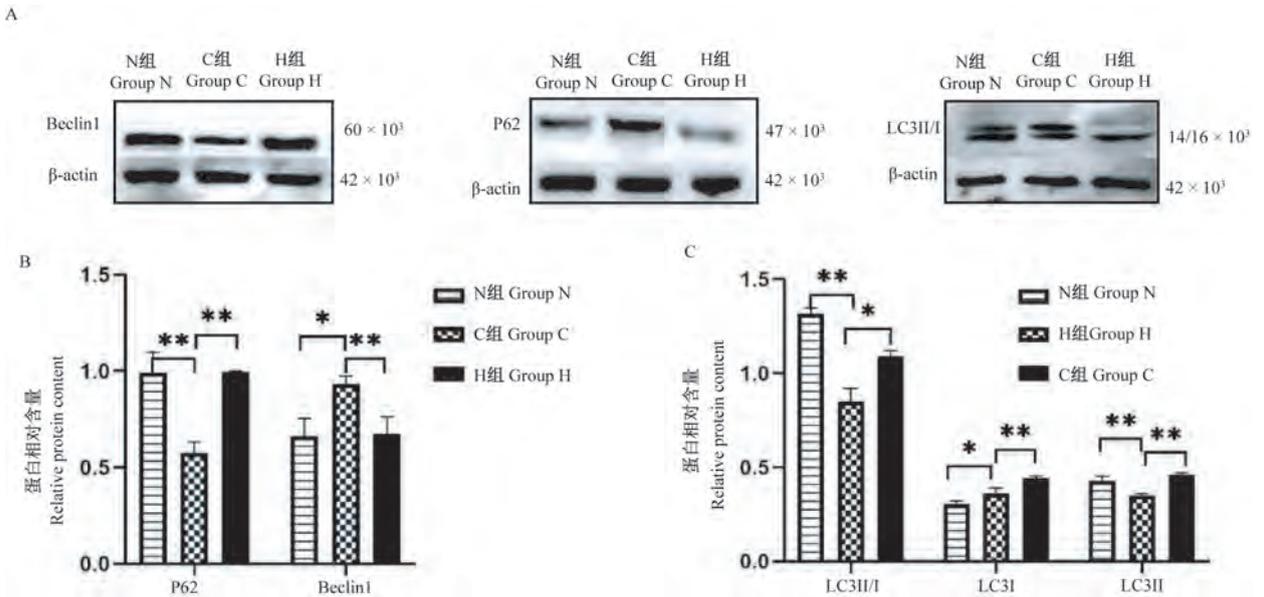


注:黑色箭头为核固缩, 碎裂。

图 5 各组海马组织 HE 染色 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. Black arrow for nuclear shrinkage, fragmentation.

Figure 5 HE staining of hippocampal tissues of each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注:A:Beclin1, P62 和 LC3II/I Western Blot 结果; B、C:与 C 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 6 蛋白条带和相对含量 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. A. Western Blot protein bands of Beclin1, P62 and LC3II/I. B, C. Compared with group C, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 6 Protein bands and relative protein content ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论

衰老是随着年龄的增长, 机体逐渐出现生物学

损伤的过程, 有研究表明, 中枢神经系统最易受到衰老影响, 常常伴随导致认知功能下降甚至神经退行性疾病的发生, 对老年人的生活造成了巨大的影

响,随着全球老龄化人口日渐增多,这一问题变得更加严峻。hUCMSCs 作为一种易获取、无伦理争议和免疫排斥反应,且具有高度自我分化及更新能力的干细胞,已经应用于很多中枢神经系统疾病的研究,能够修复神经系统的损伤和衰老过程中导致的脑部微环境的改变<sup>[6-7,16]</sup>,大多是从 DNA 损伤和氧化应激等机制入手<sup>[17]</sup>,hUCMSCs 对脑衰老与自噬之间的关系研究较少。因此,本文选取出现认知和学习记忆能力衰退的自然衰老大鼠为研究对象,通过移植 hUCMSCs 探讨其与衰老所致的认知衰退与自噬之间的关系。

考虑到实验中水迷宫雌雄鼠的体力和游泳速度的差异,造成实验结果出现明显的两极分化<sup>[18]</sup>且加入性别差异后不符合实验设计单一变量的原则,除此以外类似研究多数也用单一雄性大鼠作为实验对象<sup>[19-20]</sup>,因此在本实验中优先选择了单一性别雄鼠作为研究对象。

据我们所知,在临床上,脑室注射经常面临着颅内感染甚至更严重的脑损伤,其移植的必要性和转分化的频率仍有争议。相比之下,静脉移植 MSCs 较为安全,这一点是普遍比较认可的。最近一项研究也证明了这种方式的安全性<sup>[21]</sup>,与在中枢神经系统直接给药有明显的临床优势并且更容易接受<sup>[22]</sup>。因此我们在本实验中采取了静脉注射这种侵入性较小的方式,对自然衰老出现认知障碍的动物模型进行慢性治疗,移植的剂量与时间是通过预实验来确定的。

除此之外,有研究表明静脉移植 MSCs 在缺血性脑卒中、亨廷顿病<sup>[23]</sup>和 AD<sup>[24-25]</sup>等模型中均可迁移并定位到大脑区域<sup>[26-27]</sup>,但只有一小部分细胞会到达炎症组织,这表明它们的治疗作用可能是由于其分泌的具有免疫调节和营养活性的生物活性分子起作用<sup>[28-29]</sup>,有鉴于此,先前的研究表明,在外伤性脑损伤中,MSCs 通过与非神经系统器官(如脾)相互作用而起到神经保护作用<sup>[30]</sup>。考虑到这些因素,我们认为间充质干细胞的治疗效果可能是由分泌的生物活性分子或其他免疫细胞介导的。

Beclin1、LC3 和 P62 参与了自噬发生的起始、延长、成熟和降解的整个过程,是判断自噬过程的关键指标。Beclin1 是自噬起始的重要组成部分,其与 PI3K 结合形成复合物,招募胞浆中的自噬相关的蛋白,形成完整自噬体<sup>[31]</sup>。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 Atg8 基因的同源物,一般以 LC3I 和 LC3II 两种

形式出现<sup>[32]</sup>,在 Atg4 的作用下,LC3I 经过剪切和泛素化加工修饰,与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺相结合,形成 LC3II。一般以 LC3II 与 LC3I 的比值来评估自噬水平,作为反映自噬活性高低的一个有效指标<sup>[33-34]</sup>。p62 蛋白作为细胞自噬调控过程中的一种可选择底物,其累积提示自噬能力衰退,而当 P62 被降解时表示自噬被激活,因此 P62 与自噬水平负相关<sup>[35]</sup>,本研究发现与对照组相比移植 hUCMSCs 的自然衰老大鼠的海马组织中 Beclin1 和 LC3II/I 的比值表达量显著增加,P62 蛋白表达显著下降,表示 hUCMSCs 干预诱导 Beclin1 合成增加,激活自噬的起始阶段。LC3II 合成增加,参与自噬溶酶体膜的延伸,直到自噬溶酶体形成,并在后期与 P62 相互作用后使 P62 在溶酶体降解,形成完整的自噬流。证明 hUCMSCs 干预后增强了衰老大鼠海马自噬水平,改善了随着年龄增加导致的自噬缺陷。

本课题还发现在 Morris 水迷宫实验中,移植 hUCMSCs 后的大鼠在定位航巡实验中第 2、3、4 天的逃避潜伏期明显低于对照生理盐水组,并且与 3 月龄大鼠无差异(未给数据);在撤掉水下隐藏平台后,细胞移植组经过原平台位置的次数以及在目的象限停留的时间明显高于对照生理盐水组,说明移植 hUCMSCs 后,自然衰老大鼠的长期工作记忆和空间探索能力的水平有所提高。Y 迷宫实验用来检测大鼠的空间工作记忆及片段式学习记忆,实验发现移植 hUCMSCs 组大鼠与生理盐水组相比自发交替行为正确率和进入新异臂的次数显著增加。新物体识别实验中,细胞移植组大鼠探索新物体的次数显著高于生理盐水组大鼠,以上行为学实验表明,hUCMSCs 对自然衰老大鼠的片段式记忆,长期工作记忆和空间探索能力均有所提高。在本实验中发现干细胞移植可改善自然衰老大鼠短期内的认知衰退,长期的效果还有待探索。

综上所述,静脉注射间充质干细胞是一种很有前途的治疗方法,其对改善脑衰老引起的脑部神经元丢失,自噬减弱以及对工作记忆和对物体及方位的学习记忆衰退起着重要的作用。MSCs 治疗神经退行性病变仍处于早期研究阶段,在今后的课题研究中,应致力于解开这种治疗的具体机制,将从 hUCMSCs 如何具体影响衰老大鼠海马的自噬水平以及能否长期改善脑衰老引起的认知方面的衰退进行更加深入的研究。

#### 参 考 文 献 (References)

[1] Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC. Protein misfolding

- disorders and macroautophagy [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 190–197.
- [ 2 ] Lipinski MM, Zheng B, Lu T, et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(32): 14164–14169.
- [ 3 ] Matecic M, Smith DL, Pan X, et al. A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(4): e1000921.
- [ 4 ] Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans* [J]. *Science*, 2003, 301(5638): 1387–1391.
- [ 5 ] de Kreutzenberg SV, Geolotto G, Papparella I, et al. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms [J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 1006–1015.
- [ 6 ] Cao N, Liao T, Liu J, et al. Clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reverse cognitive aging via improving synaptic plasticity and endogenous neurogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2996.
- [ 7 ] Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 288.
- [ 8 ] Xie J, Liu B, Chen J, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviated inflammation and inhibited apoptosis in interstitial cystitis via AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 546–552.
- [ 9 ] 和法莲. 人脐带间充质干细胞对小鼠老年性器官功能退变的治疗作用及其机制研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
- He FL. The therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on senile sexual organ degeneration in mice and its mechanism [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2017.
- [ 10 ] 刘莎, 吴明, 施兵奇, 等. 脐带间充质干细胞通过上调神经营养因子表达改善 A $\beta$  损伤大鼠的学习记忆能力 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 980–985.
- Liu S, Wu M, Shi BQ, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells improve learning and memory by upregulation of neurotrophic factor expression in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(7): 980–985.
- [ 11 ] 田野, 栗懿, 原一桐, 等. 长时程抑郁小鼠模型建立及行为与神经病理特征观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 358–363.
- Tian Y, Li Y, Yuan YT, et al. Establishment of long-term depression mouse model and observation of behavioral and neuropathological characteristics [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 358–363.
- [ 12 ] Ennaceur A, Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory [J]. *Behav Brain Res*, 1992, 51(1): 83–92.
- [ 13 ] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93–110.
- [ 14 ] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105–111.
- [ 15 ] 王凯, 李强, 孙伟明, 等. 不同浓度 A $\beta$ <sub>25–35</sub> 蛋白模拟阿尔茨海默病模型学习记忆的差异 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(3): 14–19.
- Wang K, Li Q, Sun WM, et al. Learning and memory differences in models of Alzheimer's disease simulated by A $\beta$ <sub>25–35</sub> protein at different concentrations [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(3): 14–19.
- [ 16 ] Yang Y, Cao TT, Tian ZM, et al. Subarachnoid transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cell in rodent model with subacute incomplete spinal cord injury: Preclinical safety and efficacy study [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(2): 112184.
- [ 17 ] Cui Y, Ma S, Zhang C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 320: 291–301.
- [ 18 ] Kay H, Birren J. Swimming speed of the albino rat. II. Fatigue, practice, and drug effects on age and sex differences [J]. *J Gerontol*, 1958, 13(4): 378–385.
- [ 19 ] 阮波, 王瑞, 杨远坚, 等. 从 NLRP3 炎症小体途径探讨竹节参总皂苷改善自然衰老大鼠认知功能衰退的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(2): 344–349.
- Ruan B, Wang R, Yang YJ, et al. Improved effects of saponins from *panax japonicus* on decline of cognitive function in natural aging rats via NLRPS inflammasome pathway [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2019, 44(2): 344–349.
- [ 20 ] Wei BB, Liu MY, Zhong X, et al. Increased BBB permeability contributes to EGCG-caused cognitive function improvement in natural aging rats: pharmacokinetic and distribution analyses [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(11): 1490–1500.
- [ 21 ] Ra JC, Shin IS, Kim SH, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1297–1308.
- [ 22 ] Jackson JS, Golding JP, Chapon C, et al. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 2(1): 17.
- [ 23 ] Edalatmanesh MA, Matin MM, Neshati Z, et al. Systemic transplantation of mesenchymal stem cells can reduce cognitive and motor deficits in rats with unilateral lesions of the neostriatum [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(2): 166–172.
- [ 24 ] 王欣欣, 马珊珊, 孟楠, 等. hUC-MSCs 和白藜芦醇对 AD 小鼠学习记忆能力及脑内 SIRT1 信号通路的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2016, 51(5): 576–579.
- Wang XX, Ma SS, Meng N, et al. Effect of huc-Mscs and resveratrol on learning and memory ability and brain SIRT1 signaling pathway in AD mice [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Edit)*, 2016, 51(5): 576–579.

- [25] Panchenko MM, Poltavtseva RA, Bobkova NV, et al. Localization and differentiation pattern of transplanted human multipotent mesenchymal stromal cells in the brain of bulbectomized mice[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2014, 158(1): 118–122.
- [26] Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3): 635–645.
- [27] Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(2): 430.e5–e18.
- [28] Zhou X, Gu J, Gu Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve learning and memory function in hypoxic-ischemic brain-damaged rats via an il-8-mediated secretion mechanism rather than differentiation pattern induction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(6): 2383–2401.
- [29] Ding M, Shen Y, Wang P, et al. Exosomes isolated from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate neuroinflammation and reduce amyloid-beta deposition by modulating microglial activation in Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(11): 2165–2177.
- [30] Walker P, Shah S, Jimenez F, et al. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes [J]. *Exp Neurol*, 2010, 225(2): 341–352.
- [31] Hariharan N, Zhai P, Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(11): 2179–2190.
- [32] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE - 16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis[J]. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1792–1802.
- [33] Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2092–2100.
- [34] Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy[J]. *Essays Biochem*, 2013, 55(1): 51–64.
- [35] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor[J]. *FEBS J*, 2016, 282(24): 4672–4678.

[收稿日期] 2020-08-28

刘倩,鲁华,郭更新,等. 连续性血液透析滤过联合依那普利对急性重症胰腺炎大鼠肾功能及肠功能的改善作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 805-811.

Liu Q, Lu H, Guo GX, et al. Continuous hemodiafiltration combined with enalapril improves renal and intestinal function in rats with severe acute pancreatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 805-811.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.010

# 连续性血液透析滤过联合依那普利对急性重症胰腺炎大鼠肾功能及肠功能的改善作用

刘倩<sup>1\*</sup>, 鲁华<sup>1</sup>, 郭更新<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup>, 李娜<sup>2</sup>

(1. 邢台市人民医院肾内科, 河北 邢台 054001; 2. 邢台市人民医院产科, 河北 邢台 054001)

**【摘要】** **目的** 探究连续性血液透析滤过联合依那普利对急性重症胰腺炎大鼠肾功能及肠功能的改善作用。**方法** 60只SD大鼠随机分为5组:对照组、模型组、连续性血液透析滤过组、依那普利组及连续性血液透析滤过联合依那普利组,除对照组外均采用牛黄胆酸钠诱导急性重症胰腺炎大鼠模型,连续性血液透析滤过组造模后给予连续性血液透析滤过12h;依那普利组术前7d灌胃10 mg/(kg·d)的依那普利,每天1次;连续性血液透析滤过联合依那普利组作相应的联合处理。采用HE染色观察大鼠胰腺、肾及肠粘膜组织病理变化,检测血浆内毒素(ET)、D-乳酸(D-LC)、血清淀粉酶(AMY)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)水平, FITC-Dextran通透实验检测肠道通透性, Western Blot检测大鼠 $\alpha$ -血管平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、E钙黏素(E-cadherin)、高迁移率族蛋白B1(HMGB1)及闭合蛋白(occludin)的表达。**结果** 与模型组相比,连续性血液透析滤过联合依那普利可有效减轻急性重症胰腺炎大鼠胰腺、肾及肠粘膜组织损伤,显著降低大鼠肠粘膜通透性、血清AMY、BUN、Cr、血浆ET、D-LC水平、组织 $\alpha$ -SMA及HMGB1的表达,显著提高E-cadherin和Occludin的表达,且作用效果优于单项处理。**结论** 连续性血液透析滤过联合依那普利可明显改善急性重症胰腺炎所致的肾及肠组织损伤,有助于肾功能及肠功能的恢复。

**【关键词】** 连续性血液透析滤过;依那普利;急性重症胰腺炎;肾功能;肠功能

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0805-07

## Continuous hemodiafiltration combined with enalapril improves renal and intestinal function in rats with severe acute pancreatitis

LIU Qian<sup>1\*</sup>, LU Hua<sup>1</sup>, GUO Gengxin<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, LI Na<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054001, China.

2. Obstetrics Department, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054001)

Corresponding author: LIU Qian. E-mail: maozoua@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the beneficial effects of continuous hemodiafiltration (CHDF) combined with enalapril on renal and intestinal function in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into a control group and four treatment groups: SAP model, CHDF, enalapril, and CHDF + enalapril. Rats in the treatment groups were induced with SAP using sodium taurocholate. After modeling, the CHDF group was given CHDF for 12 h, and the enalapril group was given enalapril 10 mg/kg/d by gavage, for 1 day. The CHDF + enalapril group was given both treatments simultaneously. Histopathological changes in the pancreas, kidney and intestinal

**【基金项目】**河北省科技攻关项目(201724412547)。

Funded by Scientific and Technological Brainstorm Project in Hebei(201724412547).

**【通信作者】**刘倩(1984—),女,硕士,副主任医师,研究方向:血液透析、血液灌流、透析滤过、血浆置换、腹膜透析等。

Email: maozoua@163.com

mucosa were observed by hematoxylin and eosin staining. The plasma levels of endotoxin (ET) and D-lactic acid (D-LC), and serum levels of amylase (AMY), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were measured. A fluorescein isothiocyanate-dextran permeability test was used to examine intestinal permeability. Western blotting was used to detect expression of  $\alpha$ -vascular smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), E-cadherin, high mobility group box protein 1 (HMGB1) and occludin. **Results** Compared with the model, CHDF + enalapril had the following effects in rats with SAP: effectively alleviated damage to the pancreas, kidney and intestinal mucosal tissues; significantly reduced intestinal mucosal permeability, the levels of serum AMY, BUN and Cr and plasma ET and D-LC, and expression of  $\alpha$ -SMA and HMGB1 in tissues; and significantly increased expression of E-cadherin and occludin. The combined action effect was better than that of either single treatment. **Conclusions** CHDF combined with enalapril significantly improved renal and intestinal tissue damage caused by SAP, which contributed to the recovery of renal and intestinal function.

**[Keywords]** continuous hemodiafiltration; enalapril; severe acute pancreatitis; renal function; intestinal function  
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

急性重症胰腺炎具有发病急、进展快、病情重的临床特点,常伴有多器官功能的改变,如肺、肾、肠道等,急性重症胰腺炎引起的多器官功能衰竭是急性重症胰腺炎患者死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。因此,及早的防治器官衰竭有重要的临床意义。目前,针对急性重症胰腺炎合并多器官功能障碍尚无特效疗法。王锋等<sup>[3]</sup>研究发现,连续性血液透析滤过能够有效改善急性重症胰腺炎大鼠的肠功能障碍。依那普利是常用的降压药,对于肾有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。但连续性血液透析滤过联合依那普利用于急性重症胰腺炎的研究较少,依那普利(enalapril)是属于血管紧张素转换酶抑制类降压药,具有扩张血管作用,主要用于高血压、心理衰竭等疾病<sup>[5]</sup>。故本研究联合连续性血液透析滤过和依那普利,探讨其对急性重症胰腺炎大鼠肾功能和肠功能的影响,并初步分析其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60 只 6~8 周龄清洁级雄性的 SD 大鼠,体重 200~240 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号【SCXK(京)2019-0002】,动物实验实验室的使用许可证号【SYXK(冀)2019-0003】,实验动物福利伦理(审批号 2019A005 号)。饲养条件:温度 20~24℃,湿度 40%~60%,每 12 h 昼夜交错。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

依那普利,纯度为 97%,购自上海源叶生物科技有限公司;苏木素、伊红购自上海恒斐生物科技有限公司;ET 试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司;ELISA 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司;FITC-Dextran 购自美国 MCE 公司;BCA 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;蛋白一抗购自美国 Life

Technologies 公司;标记二抗辣根过氧化物酶兔抗蛋白购自上海优予生物科技有限公司。iMark 酶标仪购自美国 Bio-Rad, F-4600 型荧光分光光度计购自日本日立。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型

腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,于上腹部正中作切口,小心分离胆胰管,夹闭肝门处胰胆管,由十二指肠肠前壁进针,向胰胆管注入 3% 牛磺胆酸钠(流速为 0.1 mL/kg)。待见胰腺出现水肿出血时,提示急性重症胰腺炎大鼠模型复制成功<sup>[6]</sup>。松开血管夹,逐层缝合、关腹。术后注意保温,大鼠均自由摄食饮水。

#### 1.2.2 分组及干预

60 只 SD 大鼠随机分为 5 组:对照组、模型组、连续性血液透析滤过组、依那普利组及连续性血液透析滤过联合依那普利组,除对照组外均采用牛磺胆酸钠诱导急性重症胰腺炎大鼠模型,对照组处理:手术后进翻动肠道和胆胰管,注射等量生理盐水。术前 7 d 灌胃 10 mg/(kg·d)的依那普利,每天 1 次。建模成功后立即连续性血液透析滤过 4 h,具体操作如下:(1)腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,后续操作中每 1~2 h 追加剂量(首次剂量的 1/4),维持麻醉状态;(2)建立静脉通路,于颈部作切口,分离右侧颈动脉,结扎颈动脉远心端,并临时夹闭近心端,缓慢插入 PE50 导管,连接三通阀后松开动脉夹,缓慢注入肝素生理盐水(预防凝血),参照上述方法分离左侧颈静脉插管;(3)连续性血液透析滤过,以右侧颈动脉为体外循环的流出通路,左侧颈静脉为流入通路,连接瑞典金宝 AK100 透析机,参数设置:置换液流速 0.4~0.5 mL/h,血流速度 0.8~1.0 mL/min,过程中予以肝素抗凝。对照组和模型组分别皮下注射生理盐水,并以等量生理盐水灌胃。

### 1.2.3 观察指标

透析处理后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,取腹主动脉血 4~5 mL,分别置于 EDTA 抗凝管和普通采血管中;采集大鼠胰腺、肾及肠粘膜组织,部分固定于 4% 甲醛中,剩余冻存于液氮罐中。

#### (1) 组织 HE 染色

于 4% 甲醛中取出大鼠组织,脱水后行常规石蜡包埋,切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ ,进行苏木素-伊红染色后,光镜下观察大鼠胰腺、肾及肠粘膜组织的病理变化。参照 Shmidt 评分<sup>[7]</sup>,以水肿、坏死、出血及炎症细胞浸润评价胰腺组织损伤程度,各项评分 0~4 分,最终评分为各项目评分之和的四分之一。参照肾病理损害标准进行评估<sup>[8]</sup>,具体为:0 分为肾小球、肾小管结构正常;1 分为肾小球结构正常,肾小管上皮水肿;2 分为肾小球瘀血或缺血性改变,肾小管上皮变性,细胞界限模糊,管腔出现变窄、闭塞或水肿;3 分为在 2 分的基础上,成片出现肾小管上皮坏死。参照 Chiu 肠粘膜损伤评分<sup>[9]</sup>,具体为:0 分为肠粘膜绒毛正常;1 分为绒毛顶端出现间隙,伴有充血;2 分为上皮间间隙扩大,伴有水肿、乳糜管扩张等;3 分为水肿明显,上皮细胞变性、坏死或少数绒毛脱落;4 分为上皮细胞变性、坏死、脱落或部分绒毛脱落,固有层裸露,血管扩张、充血;5 分为绒毛脱落、固有层崩解,出血或形成溃疡。

#### (2) 血指标检测

EDTA 抗凝管中血液经离心沉淀后,取上层血浆检测内毒素(ET)、D-乳酸(D-LC)的含量;普通采血管中血液经离心沉淀后,取上层血清检测淀粉酶(AMY)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)的含量。ET 检测为终点显色法鲎试剂<sup>[10]</sup>,梯度配制 ET 标准溶液,取无热原试管加入 100  $\mu\text{L}$  ET 检查用水、标准溶液和样本,再混入 100  $\mu\text{L}$  鲎试剂,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 min,加入 100  $\mu\text{L}$  显色基质,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min,分别加入 500  $\mu\text{L}$  偶氮化试剂,混匀后静置 5 min,于 545 nm 处检测各孔吸光值,绘制标准品浓度-吸光值曲线,计算 ET 的含量。其余指标检测均为 ELISA 法<sup>[11]</sup>,梯度配制标准溶液,将标准溶液和样本(每孔 100  $\mu\text{L}$ )加入孔板中,封孔后 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 90 min,加入生物素化抗体工作液(每孔 100  $\mu\text{L}$ ),封孔后 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 60 min,加入酶结合物工作液(每孔 100  $\mu\text{L}$ ),封孔后 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,加入显色剂(每孔 100  $\mu\text{L}$ ),避光处 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 10 min,加入终止液(每孔 100  $\mu\text{L}$ ),于 450 nm 处检测各孔吸光值,绘制标准品浓度-吸光值曲线,计算相应因子的含量。

#### (3) 肠道粘膜通透性检测

采用改良 Chen 法<sup>[12]</sup>,腹腔注入 FITC-Dextran 溶

液(25 mg/mL) 0.2 mL,灌注 30 min 后取门静脉血 100  $\mu\text{L}$ ,加入 Tris 缓冲液补至 2 mL,以 4230 r/min 离心 10 min,取上清液应用荧光分光光度计检测吸光值,绘制标准品浓度-吸光值曲线,计算 FITC-Dextran 的含量。

#### (4) 蛋白的检测

取适量组织(约 200 mg)置于新鲜、预冷的蛋白裂解液中匀浆,冰上裂解 40 min;以 12 000 r/min 离心 10 min,分离上清液,按 1:50 配制 BCA 试剂盒中 A、B 工作液,并梯度稀释标准品蛋白液,于 96 孔板中分别添加标准品蛋白液、样品(每孔 20  $\mu\text{L}$ ),再快速混入 180  $\mu\text{L}$  工作液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min,应用酶标仪在 570 nm 处检测各孔吸光值,绘制标准品浓度-吸光值曲线,计算样品蛋白浓度;配制 10% SDS-PAGE 凝胶,点样 50  $\mu\text{g}$  变性蛋白在 110 V 电压(约 1.5 h)下进行电泳;待蛋白完全分离时,以 300 mA 恒定电流电转 100 min,将凝胶上的蛋白条带转移至 PVDF 膜;取出 PVDF 膜置于封闭液中,室温下孵育 2 h;取出 PVDF 膜清洗后,加入一抗蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜;取出 PVDF 膜清洗后,加入标记二抗辣根过氧化物酶兔抗蛋白,37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h;最后滴加化学发光剂进行显影<sup>[13]</sup>。以  $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参,半定量分析肾及肠道中  $\alpha$  血管平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -Vascular smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box protein 1, HMGB1)、E 钙黏素 (E-cadherin) 及闭合蛋白 (occludin) 的表达。

### 1.3 统计学分析

采取软件 SPSS 18.0 对数据进行统计学处理,数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 Students *t* 检验或 ANOVA 分析,  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠胰腺、肾和肠粘膜组织病理改变

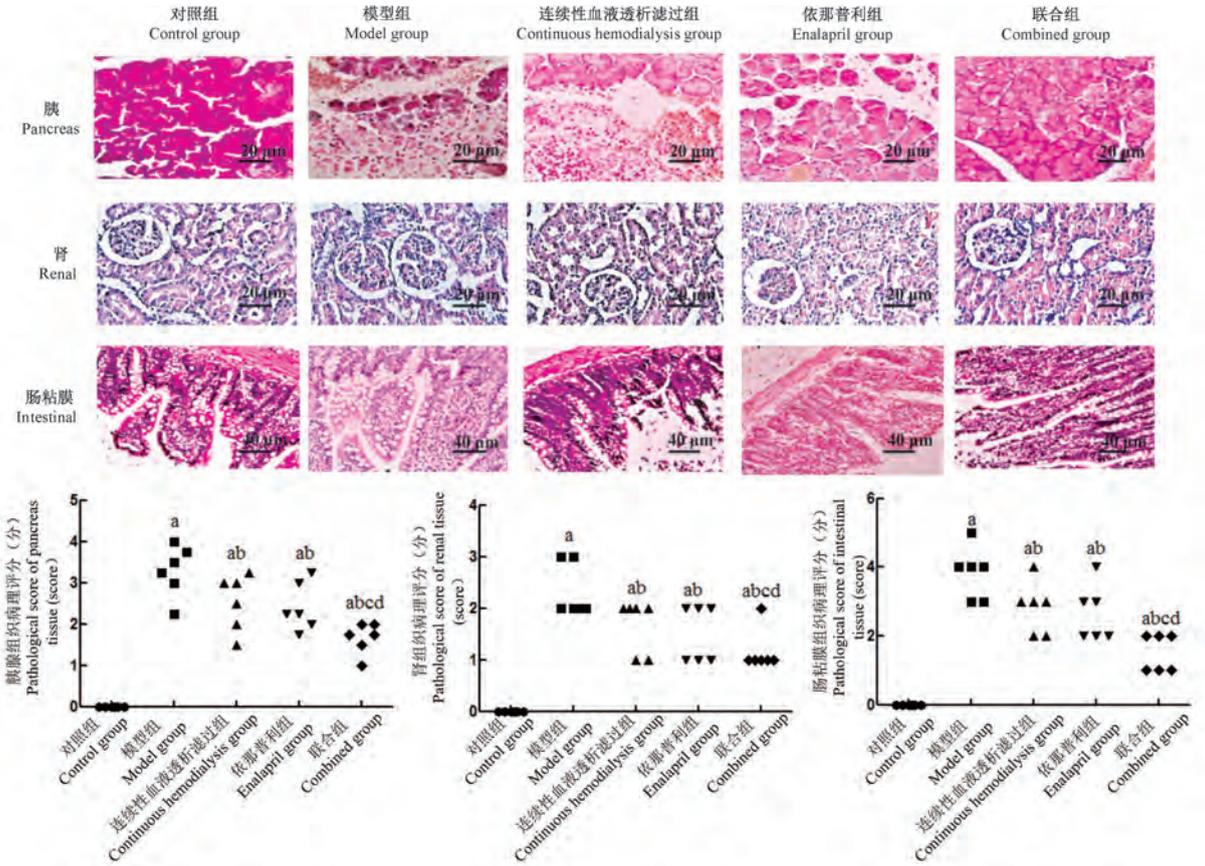
如图 1,对照组胰腺、肾和肠粘膜组织结构清晰,未见损伤。模型组胰腺组织结构紊乱,间质水肿、出血明显,大量细胞坏死和炎性浸润;肾组织出现不同程度的肾小管上皮水肿,肾小球出血或缺血性改变,间质出血、水肿严重,大量上皮细胞坏死;肠粘膜上皮细胞出现坏死、脱落、水肿及充血。与对照组比较,模型组各组织病理评分显著增加 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,经血液透析滤过、依那普利处理后,大鼠胰腺、肾和肠粘膜组织损伤明显减轻,病理评分降低,且联合处理组效果最好 ( $P < 0.05$ )。

2.2 各组大鼠肾功能指标水平的比较

如图 2,与对照组相比,模型组血清 AMY、BUN、Cr 水平显著上升( $P < 0.05$ );与模型组比,血液透析滤过、依那普利处理后显著降低 AMY、BUN、Cr 水平( $P < 0.05$ ),且联合处理组下降作用更显著( $P < 0.05$ )。

2.3 各组大鼠肠功能指标水平的比较

如图 3,与对照组相比,模型组血浆 ET、D-LC 水平显著上升( $P < 0.05$ );与模型组相比,血液透析滤过、依那普利处理后显著降低 ET、D-LC 水平( $P < 0.05$ ),且联合处理组下降作用更显著( $P < 0.05$ )。



注:与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与连续性血液透析滤过组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与依那普利组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 各组大鼠胰腺、肾和肠粘膜组织病理改变

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with CHDF group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with enalapril group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Pathological changes of pancreas, kidney and intestinal mucosa tissues of rats in each group

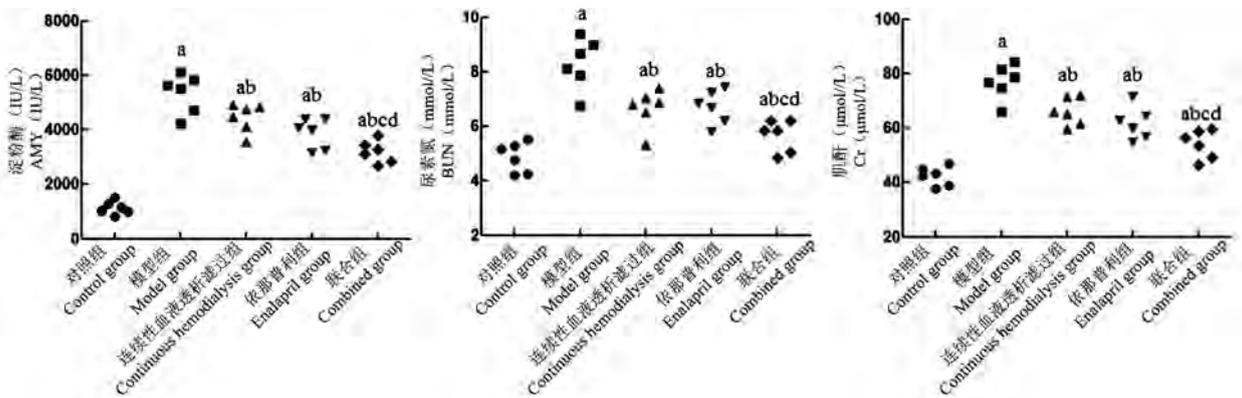


图 2 各组大鼠肾功能指标水平的比较

Figure 2 Comparison on the levels of renal function indexes among all groups

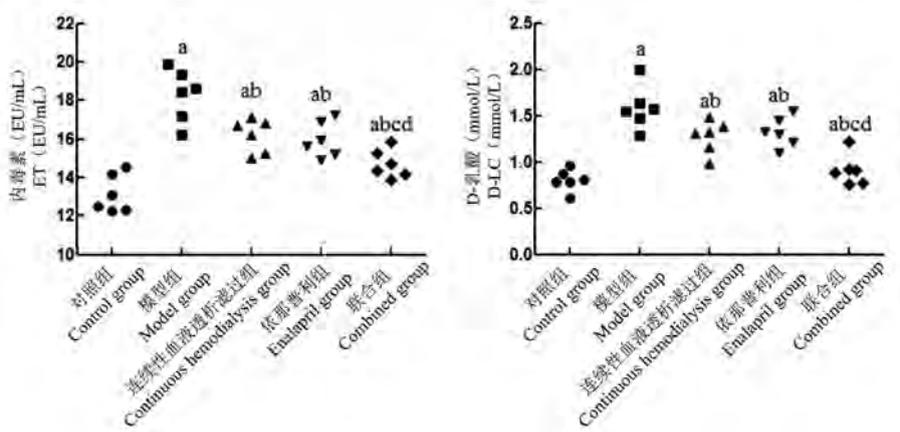


图 3 各组大鼠肠功能指标水平的比较

Figure 3 Comparison on the levels of intestinal function indexes among all groups

### 2.4 各组大鼠肠粘膜屏障功能的比较

如图 4,与对照组比,模型组肠道通透性明显增加( $P < 0.05$ );与模型组比,血液透析滤过、依那普利处理后大鼠肠道通透性明显降低( $P < 0.05$ ),且联合处理组降低更明显( $P < 0.05$ )。

### 2.5 各组大鼠相关蛋白水平的比较

如图 5,与对照组比较,模型组大鼠肾组织中  $\alpha$ -SMA 的表达显著上调, E-cadherin 的表达显著下调,肠组织中 HMGB1 的表达显著上调, Occludin 的表达显著下调( $P < 0.05$ );与模型组相比,血液透析滤过、依那普利处理后  $\alpha$ -SMA 及 HMGB1 的表达显著下调, E-cadherin 和 Occludin 的表达显著上调,且联合作用效果更好( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究采用牛磺胆酸钠诱导大鼠,胰腺组织出现明显水肿、出血症状,光镜下观察到胰腺组织不同程度的充血、水肿、坏死及炎性浸润;同时,急性重症胰腺炎发生过程中,由于炎症介质“瀑布样”释放,造成“二次打击”,容易导致多器官组织损伤和功能障碍,本研究中模型大鼠肾和肠道也出现明显损伤,表明急性重症胰腺炎大鼠模型构建成功。相关动物研究证实,依那普利在多种因素引起的肾病中,对大鼠肾功能均具有保护作用,可能介导肾素-血管紧张素系统,抑制足细胞凋亡,从而减轻肾细胞损伤<sup>[14]</sup>。另外, Dahlgren 等<sup>[15]</sup>研究发现,依那普利可通过抑制血管紧张素转换酶,增强大鼠肠道的防御作用。

肾是身体的主要排泄、内分泌器官,具有排泄代谢废物、调节代谢平衡及分泌激素等功能,有助于机体维持内环境的稳定<sup>[16]</sup>。研究发现,急性重症胰腺炎会引起有效循环血容量相对或绝对的不足,降低肾小球滤过率,引起血清 AMY、BUN、Cr 水平上升<sup>[17]</sup>。本研究发现,连续性血液透析滤过联合依那普利可明显改善模型大鼠肾组织损伤,降低血清 AMY、BUN、Cr 的水平,与 Chen 等<sup>[18]</sup>研究结果相似。表明连续性血液透析滤过联合依那普利可有效保护模型大鼠肾功能的作用。当肾组织出现损伤时,往往伴随着肾小管间质纤维化,其中肾小管细胞上皮间质转化是其主要的生理基础; E-cadherin 是细胞间维持粘附作用的主要蛋白,而  $\alpha$ -SMA 是间质细胞中的标志蛋白<sup>[19-20]</sup>。因此,肾出现损伤时, E-cadherin 表达会下调,而  $\alpha$ -SMA 会上调。本研究

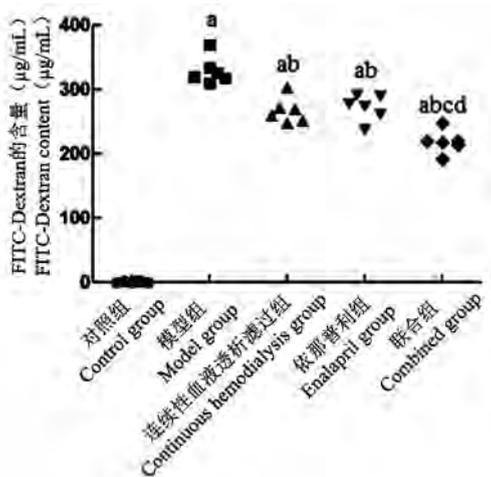


图 4 各组大鼠肠粘膜屏障功能的比较

Figure 4 Comparison of intestinal mucosal barrier function among all groups

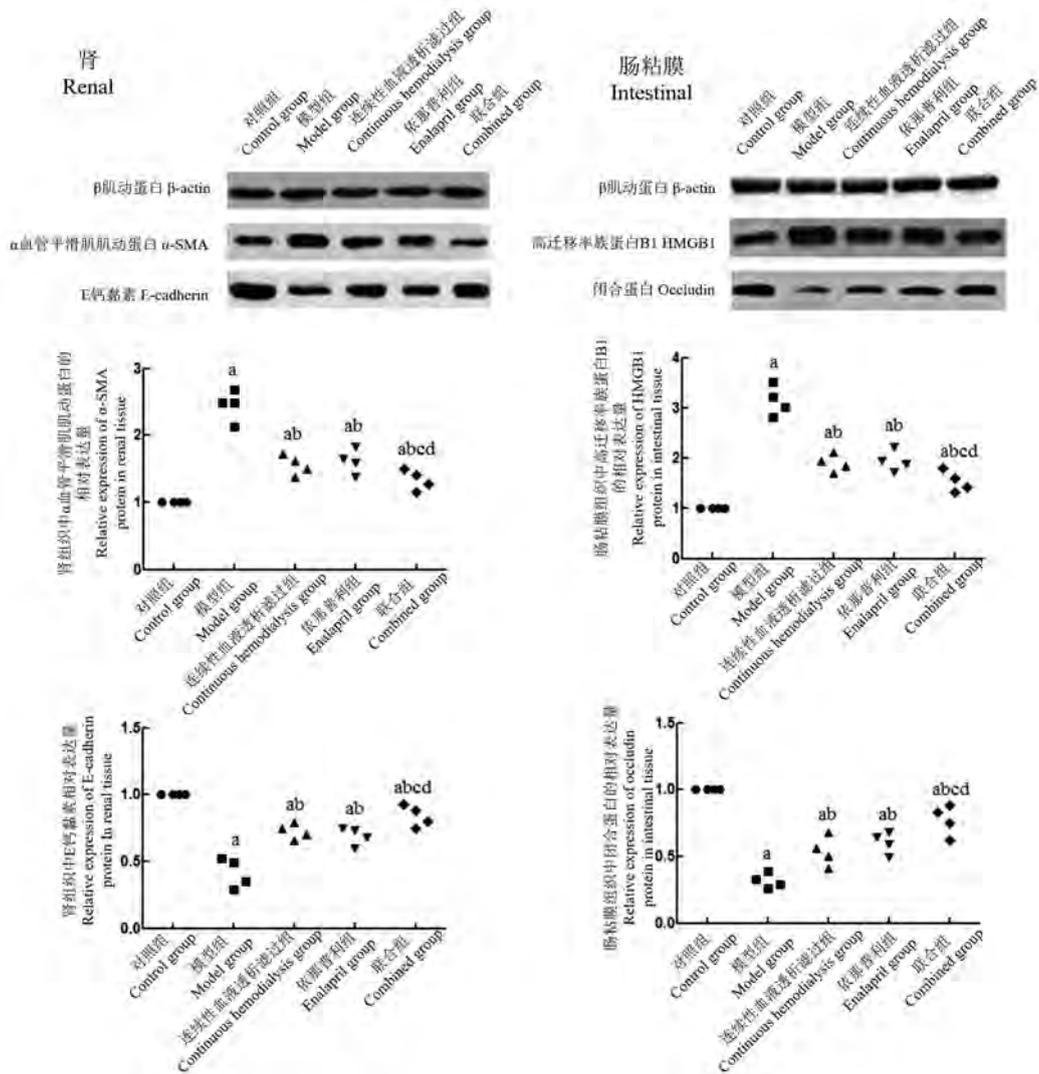


图5 各组大鼠相关蛋白的表达

Figure 5 Expression of related proteins in each group

结果显示,连续性血液透析滤过联合依那普利可显著上调模型大鼠肾中 E-cadherin 的表达,下调  $\alpha$ -SMA 的表达,提示连续性血液透析滤过联合依那普利可能通过抑制肾小管上皮间质转化,减轻肾组织损伤,从而起到保护急性重症胰腺炎肾功能的作用。

研究证实,大量炎性因子的释放会损伤肠道屏障功能,增加其通透性,导致机体易继发感染<sup>[21]</sup>,因此,急性重症胰腺炎患者往往伴随着肠道功能的损害。肠道通透性增加诱发细菌易位,使细菌及其代谢产物进入体循环,进一步活化单核-巨噬细胞,再次放大炎症信号,造成全身性炎症损伤<sup>[22]</sup>。ET 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,是炎症反应的主要触发因素;而 D-LC 是细菌发酵的代谢产物,体内 D-乳酸主要来源于肠道<sup>[23]</sup>。本研究发现,连续性血液透析滤过联合依那普利可明显改善模型大鼠肠

粘膜损伤,降低大鼠肠粘膜通透性,下调血清 ET、D-LC 的水平,与 Kang 等<sup>[24]</sup>研究结果相似。表明连续性血液透析滤过联合依那普利可有效保护模型大鼠肠道功能的作用。HMGB1 属于炎症介质,可介导肠黏膜屏障损伤,导致其通透性增加<sup>[25]</sup>。Occludin 是细胞膜紧密连接蛋白,对维持肠粘膜屏障功能有着重要的作用<sup>[26]</sup>。本研究发现,连续性血液透析滤过联合依那普利可显著上调模型大鼠肠粘膜组织中 Occludin 的表达,下调 HMGB1 的表达,提示连续性血液透析滤过联合依那普利可能通过维持肠粘膜上皮的连接,并下调炎症介质,起到保护急性重症胰腺炎肠功能的作用。

综上所述,连续性血液透析滤过联合依那普利能够有效改善急性重症胰腺炎大鼠肾功能及肠功能,可能与下调  $\alpha$ -SMA、HMGB1 的表达,上调 E-

cadherin 和 Occludin 的表达有关,为连续性血液透析滤过联合依那普利临床用于急性重症胰腺炎的治疗提供了理论基础。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Portelli M, Jones CD. Severe acute pancreatitis: pathogenesis, diagnosis and surgical management [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(2): 155-159.
- [ 2 ] Yan Y, Lu B, Li P, et al. NOD receptor and TLR9 modulation in severe acute pancreatitis-induced intestinal injury [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8471-8476.
- [ 3 ] 王锋, 刘杰, 黄仲俊. 连续性血液透析滤过对急性重症胰腺炎大鼠肠上皮细胞凋亡和肠功能障碍的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(18): 35-37.
- Wang F, Liu J, Huang ZJ. Effects of continuous hemodiafiltration on intestinal epithelial cell apoptosis and intestinal dysfunction in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2018, 27(18): 35-37.
- [ 4 ] Yim HE, Yoo KH, Bae IS, et al. Early treatment with enalapril and later renal injury in programmed obese adult rats [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 232(2): 447-455.
- [ 5 ] Ayaz SI, Sharkey CM, Kwiatkowski GM, et al. Intravenous enalaprilat for treatment of acute hypertensive heart failure in the emergency department [J]. *Int J Emerg Med*, 2016, 9(1): 28.
- [ 6 ] Qi H, Lu Q, Yin C, et al. Exogenous leptin protects rat models of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis through endocrinal and immunological pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 6306-6312.
- [ 7 ] Schmidt J, Lewandrowski K, Warsaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. *Int J Pancreatol*, 1992, 12(1): 41-51.
- [ 8 ] Seekamp A, Jochum M, Ziegler M, et al. Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion [J]. *J Trauma*, 1998, 44(5): 874-882.
- [ 9 ] Chiu CJ, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 484-488.
- [ 10 ] Yano S, Hotta Y, Takahashi S. Determination of endotoxin in injectable antibiotic preparations by the chromogenic assay method using a Limulus reagent (Tachypleus hemocyte lysate) and a chromogenic substrate [J]. *J Clin Microbiol*, 1986, 23(1): 11-16.
- [ 11 ] Butler JE. Enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Immunoassay*, 2000, 21(2-3): 165-209.
- [ 12 ] Atchison CR, West AB, Balakumaran A, et al. Drug enterocyte adducts: possible causal factor for diclofenac enteropathy in rats [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(6): 1537-1547.
- [ 13 ] Dressler F, Whalen JA, Steere RAC. Western blotting in the serodiagnosis of lyme disease [J]. *J Infect Dis*, 1993, 167(2): 392-400.
- [ 14 ] 侯建同, 鄢高亮, 王栋, 等. 马来酸依那普利叶酸片对糖尿病大鼠发生对比剂肾病的影响及初步机制研究 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(1): 96-101.
- Hou JT, Yan GL, Wang D, et al. Effects of enalapril maleate and folic acid tablets on contrast-induced nephropathy in diabetic rats and related mechanism [J]. *Chin Circ J*, 2019, 34(1): 96-101.
- [ 15 ] Dahlgren D, Sjöblom M, Hedeland M, et al. The *in vivo* effect of transcellular permeation enhancers on the intestinal permeability of two peptide drugs enalaprilat and hexarelin [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(2): 99.
- [ 16 ] Zhu S, Zhang C, Weng Q, et al. Curcumin protects against acute renal injury by suppressing JAK2/STAT3 pathway in severe acute pancreatitis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1669-1674.
- [ 17 ] Li H, Liu J, Wang W, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vasodilator-stimulated phosphoprotein related to acute kidney injury in severe acute pancreatitis rats [J]. *Digest Dis Sci*, 2015, 60(12): 3647-3655.
- [ 18 ] Chen QJ, Yang ZY, Wang CY, et al. Hydroxyethyl starch resuscitation downregulate pro-inflammatory cytokines in the early phase of severe acute pancreatitis: a retrospective study [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 3213-3220.
- [ 19 ] Romi MM, Arfian N, Tranggono U, et al. Uric acid causes kidney injury through inducing fibroblast expansion, Endothelin-1 expression, and inflammation [J]. *BMC Nephrol*, 2017, 18(1): 326-333.
- [ 20 ] Chen SJ, Wu P, Sun LJ, et al. MiR-204 regulates epithelial-mesenchymal transition by targeting SP1 in the tubular epithelial cells after acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1148-1158.
- [ 21 ] Huang L, Jiang Y, Sun Z, et al. Autophagy strengthens intestinal mucosal barrier by attenuating oxidative stress in severe acute pancreatitis [J]. *Digest Dis Sci*, 2018, 63(4): 910-919.
- [ 22 ] Sun Y, He Y, Wang F, et al. Low-methoxyl lemon pectin attenuates inflammatory responses and improves intestinal barrier integrity in caerulein-induced experimental acute pancreatitis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61(4): 1600885.
- [ 23 ] Hu J, Chen L, Zheng W, et al. Lactobacillus frumenti facilitates intestinal epithelial barrier function maintenance in early-weaned piglets [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 897.
- [ 24 ] Kang X, Lu XG, Zhan LB, et al. Dai-Huang-Fu-Zi-Tang alleviates pulmonary and intestinal injury with severe acute pancreatitis via regulating aquaporins in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 288.
- [ 25 ] Chen X, Zhao HX, Bai C, et al. Blockade of high-mobility group box 1 attenuates intestinal mucosal barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6799.
- [ 26 ] Wang L, Cui YL, Zhang Z, et al. Rhubarb monomers protect intestinal mucosal barrier in sepsis via junction proteins [J]. *Chin Med J*, 2017, 130(10): 1218-1225.

彭亮, 杨鹏, 刘冲, 等. 钙和维生素 D 膳食补充对大鼠踝关节骨折创伤模型破骨细胞活性和骨量的影响分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 812-817.

Peng L, Yang P, Liu C, et al. Effects of dietary calcium and vitamin D supplementation on osteoclast activity and bone mass in a rat ankle fracture model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 812-817.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.011

# 钙和维生素 D 膳食补充对大鼠踝关节骨折创伤模型破骨细胞活性和骨量的影响分析

彭亮, 杨鹏, 刘冲, 杨金丰, 马三辉\*

(定州市人民医院骨科, 河北 定州 073000)

**【摘要】** **目的** 探讨钙和维生素 D (Ca/VitD) 膳食对大鼠踝关节骨折创伤模型破骨细胞活性和骨量的影响。**方法** 选择 8 周龄雄性 SD 大鼠为研究对象, 将大鼠随机分为三组对照组 (C)、Ca/VitD 缺乏饮食组 (D) 及 Ca/VitD 补充饮食组 (S), 建立踝关节骨折创伤模型。通过大鼠血清分析、微型计算机断层扫描 ( $\mu$ CT) 分析、组织形态计量学和免疫组化分析及大鼠创伤愈合组织的基因表达分析研究 Ca/VitD 缺乏饮食是否会损害骨修复。此外还探讨了从创伤的时间点开始在饮食中补充 Ca/VitD 是否能增强骨折愈合。**结果** 与 C 组相比, D 组骨密度 (BMD) 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 骨量减少 ( $P < 0.001$ ), 纤维组织量增加 ( $P < 0.05$ )。在骨折的愈合组织中, D 组破骨细胞的数量和表面明显增加 ( $P < 0.01$ )。踝关节骨折后补充 Ca/VitD, 与 D 组相比, S 组愈合组织中的骨量显著增加 ( $P < 0.001$ ), 而纤维组织减少 ( $P < 0.05$ )。此外, S 组表现出较高的骨折愈合率 ( $P < 0.05$ )。S 组 I 型胶原 C 末端肽 (CTX) 水平减少, 碱性磷酸酶 (ALP) 和 X 连锁磷酸盐调节基因 (Phex) 表达增加 ( $P < 0.05$ )。与此同时, S 组 iFGF23 及 cFGF23 的血清水平均显著升高, 与 D 组, C 组相比较具有显著统计学差异 ( $P < 0.05$ )。但 iFGF23: cFGF23 三组无显著统计学差异性 ( $P > 0.05$ )。**结论** 手足创伤后补充 Ca/VitD 可减少 Ca/VitD 缺乏饮食者破骨细胞活性和骨量增加, 改善骨修复。对临床术后护理具有指导意义。

**【关键词】** 钙; 维生素 D; 破骨细胞活性; 骨量; 踝关节骨折创伤模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0812-06

## Effects of dietary calcium and vitamin D supplementation on osteoclast activity and bone mass in a rat ankle fracture model

PENG Liang, YANG Peng, LIU Chong, YANG Jinfeng, MA Sanhui\*

(Department of Orthopedics, Dingzhou People's Hospital, Dingzhou 073000, China)

Corresponding author: MA Sanhui. E-mail: y00jingf@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of calcium and vitamin D (Ca/VitD) supplementation on osteoclast activity and bone mass after hand and foot trauma. **Methods** Eight-week-old male mice were randomly divided into three groups: control (C), Ca/VitD deficiency (D), and Ca/VitD supplementary diet groups (S). Group S underwent hand and foot trauma surgery after 8 weeks of standard feeding. Mouse serum analysis, micro-computed tomography (CT), histoeconometric analysis, immunohistochemical analysis, and gene expression analysis of fracture calli were used to investigate whether Ca/VitD deficiency could impair bone repair and cause bone loss after injury. The study

**【基金项目】** 河北省卫生厅科研基金项目 (20181772)。

Funded by Scientific Research Fund Project of Hebei Provincial Department of Health (20181772).

**【作者简介】** 彭亮 (1982—), 本科, 男, 主治医师, 研究方向: 踝关节创伤基础与临床。Email: 45515287@qq.com

**【通信作者】** 马三辉 (1980—), 硕士, 男, 主治医师, 研究方向: 踝关节创伤基础与临床及营养补充剂。Email: y00jingf@163.com

also investigated whether Ca/VitD supplementation in the diet from the time of fracture could enhance fracture healing.

**Results** Compared with the findings in group C, BMD and bone mass were significantly decreased in group D, whereas the fibrous tissue volume was increased. In the fracture callus, the number and surface of osteoclasts in group D were significantly enhanced. Compared with the result in group D, the bone mass in the callus was significantly increased in group S, whereas the amount of fibrous tissue was significantly decreased after Ca/VitD supplementation. In addition, group S exhibited a higher fracture healing rate. In group S, expression of the C-terminal telopeptide of type I collagen was decreased, whereas that of alkaline phosphatase and X-linked phosphate regulatory gene was increased. Meanwhile, the serum levels of iFGF23 and cFGF23 were significantly higher in group S than in groups D and C. However, the iFGF23:cFGF23 ratio was not different among the groups. **Conclusions** Ca/VitD supplementation after hand and foot trauma reduced osteoclast activity, increased bone mass, and suppressed bone absorption in mice with Ca/VitD deficiency. These findings should have guiding significance for clinical postoperative nursing.

**【Keywords】** Ca; vitamin D; osteoclast activity; bone mass; trauma model of ankle fracture

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

踝关节骨折是临床上常见的手足创伤疾病,钙和维生素(Ca/VitD)缺乏可能是影响创伤后骨折愈合的重要因素<sup>[1]</sup>。VitD通过影响肠钙吸收、肾钙再吸收和破骨细胞骨吸收来调节钙稳态<sup>[2]</sup>。VitD缺乏和低钙供应都会通过骨吸收增加而维持血液中的钙,从而降低骨量和质量<sup>[3]</sup>。此外,Ca/VitD缺乏症也可能导致踝关节骨折患者中常见的骨折愈合并发症<sup>[4]</sup>,因为钙对骨折-愈伤组织矿化是必不可少的。但是目前Ca/VitD在手足创伤踝关节骨折愈合中的作用仍未得到很好的研究,补充Ca/VitD是否有助于手足创伤骨折愈合也存在争议<sup>[5]</sup>。最近,有团队研究了由次氯酸钠引起的钙吸收不良的大鼠骨折愈合,发现骨折后骨愈合不受影响,而骨骼破骨细胞活性显著增加<sup>[6]</sup>。这些结果表明,当骨吸收不符合愈伤组织矿化的要求时,创伤后骨吸收增强。与此结果一致,临床研究中观察到骨折后全身骨丢失,其表现为骨密度(BMD)降低高达15%<sup>[7]</sup>。创伤后骨丢失可显著增加继发性骨折的风险<sup>[8]</sup>。因此得出假设,创伤后骨丢失可能在Ca/VitD缺乏的情况下发生,然而目前缺乏相关研究。

因此,本研究采用手足创伤踝关节骨折大鼠模型,研究饮食中Ca/VitD缺乏是否会损害骨修复。此外还探讨了从踝关节创伤的时间点开始在饮食中补充Ca/VitD对Ca/VitD缺乏饮食者破骨细胞活性和骨量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

24只清洁级雄性SD大鼠,8周龄,体重约为220g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司

【SCXK(京)2015-0004】。饲养于定州市人民医院动物实验室【SYXK(冀)2015-0018】。饲养期间各组大鼠自由饮水,提供足够饲料。饲养环境:湿度恒定,温度控制在22~25℃。所有操作均符合定州市人民医院实验动物管理和使用委员会要求(审批号:DZPH-DW2018003)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

RNAlater™(Sigma-Aldrich),大鼠抗小鼠FGF23(MAB26291,R&D Systems Inc,美国),兔抗小鼠FGFR1/CD331(PA5-25979,Invitrogen,Thermo Fisher Scientific,美国),生物素偶联的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(B2770,Invitrogen,美国)和生物素偶联的山羊抗大鼠IgG(A10517,Invitrogen,美国)。

高分辨率台式CT(Skyscan 1172,比利时),倒置荧光显微镜(奥林巴斯,IX73,日本),低温高速离心机(Eppendorf,德国),TP600型PCR仪(TaKaRa,日本)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实验设计

将大鼠随机分为三组。对照组C组标准喂食(Ca 0.5%,VitD 2000 IU/kg),而D组和S组则接受Ca/VitD缺乏饮食(Ca 0.25%,VitD 0 IU/kg)。8周后,所有大鼠均接受手术构建大鼠手足创伤踝关节骨折模型。手术后立即将S组转入补充Ca/VitD的饮食(Ca 2.0%,VitD 2000 IU/kg)。第10天和第23天处死大鼠( $n=8$ ),并评估手足创伤术后踝关节骨折愈合情况。本研究动物实验经伦理委员会的审核批准。

### 1.2.2 手术

踝关节骨折手术采用2%异氟烷全麻下进行。为了镇痛,大鼠在手术前1d至术后3d饮用水中加

入 25 mg/mL 盐酸曲马多。手术前,所有大鼠均皮下注射抗生素克林霉素-2-二氢磷酸酯(45 mg/kg)。对踝关节进行无菌处理后,将大鼠仰卧卧位,右侧髋关节外展 90°。右膝关节弯曲 90°。然后在内踝处做 1 cm 纵行切口,钝性分离皮下筋膜及肌腱,暴露内踝。小骨凿与角度固定器(37°)组合后置于胫骨远端,中等力度将骨凿敲入内踝,然后采用缝线缝合,术后允许其自由活动。

### 1.2.3 血清分析

在给予手术创伤时(眼眶取血)和实施安乐死当天(心脏穿刺)获得大鼠血液样本。I 型胶原 C 末端肽(CTX)、I 型前胶原 N 末端肽(PINP)、甲状旁腺激素(PTH)和成纤维细胞生长因子 23(iFGF23,完整和 C 末端)血清水平采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测定。

### 1.2.4 微型计算机断层扫描( $\mu$ CT)分析

在第 23 天,采用  $\mu$ CT 扫描设备以 8  $\mu$ m 的分辨率,50 kV 的电压和 200  $\mu$ A 的电压对踝关节进行成像。使用  $\mu$ CT 图像在两个垂直平面上评估了每个愈合组织桥接皮质的数量。当观察到每个愈合组织  $\geq 3$  个桥接皮质时,该骨折被认为“已成功治愈”。

### 1.2.5 组织形态计量学和免疫组化

将第 10、23 天的踝关节植入甲基丙烯酸甲酯或石蜡中。采用番红 O 染色法进行组织形态学分析,用图像分析软件测定整个愈合组织中骨、软骨和纤维组织的相对数量。第 23 天采用抗酒石酸磷酸酶染色后,根据 ASBMR 指南评估骨细胞参数<sup>[9]</sup>。利用图像分析软件,在踝关节骨折愈合组织中间 1.8 mm  $\times$  0.9 mm 区域进行成骨细胞和破骨细胞计数。采用抗体和稀释液对踝关节(D23)的石蜡包埋切片进行 FGF23 和成纤维细胞生长因子受体 1(FGFR1)进行免疫组织化学染色。

### 1.2.6 骨折愈合组织的基因表达分析

在第 23 天,收集踝关节愈合组织并在 4°C 下储存在 RNAlater 中。去除 RNAlater 后,将断裂愈合组织在液氮中快速冷冻,并在振动磨中以 30 Hz 的频率粉碎 1.5 min。采用试剂盒分离总 RNA,将 1  $\mu$ g 分离的 RNA 转录为 cDNA,然后进行定量聚合酶链反应(qPCR)。引物序列如下:碱性磷酸酶(ALP, F: 5'-GCTGATCATPCCCACACTTTT-3' 和 R: 5'-GAGCCAGACCAAAGATGGAG-3'),维生素 D 受体(VDR, F: 5'-GGGCTTCCACTTCAACGCTA-3' 和 R:

5'-CATGCTCCGCCTGAAGAAAC-3'),X 连锁磷酸盐调节基因(Phex, F: 5'-TTCCCAGAGTTTGACTGGCTG-3' 和 R: 5'-TCTCCGAGGGACCAATGTCT-3'),FGF23(F: 5'-ACAGGAGCCATGACTCGAAG-3' 和 R: 5'-GCAATTCTCTGGCTGAAGT-3')和 FGFR1(F: 5'-TGACGACGACGATGACTCCT-3' 和 R: 5'-AGCTACAGGCCTACGGTTTG-3'),管家基因  $\beta$ -2-微球蛋白(F: 5'-ATACGCCTGCAGAGTTAAGCA-3' 和 R: 5'-TCACATGTCTCGATCCCAGT-3')。

### 1.3 统计学分析

本研究采用 GraphPad Prism 6 软件对数据进行整理及分析。数据结果表示为平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )。当三组相互比较时,通过单因素方差分析(ANOVA)和事后 Fishers LSD 分析数据的显著性,采用 *t* 检验比较两组样本的显著性。通过卡方检验分析骨折愈合数据。 $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 手足创伤前大鼠血清及 $\mu$ CT 分析结果

手足创伤前在未骨折(D组和S组)大鼠和对照组(C组)大鼠之间,血清、 $\mu$ CT 和组织形态学参数差异无显著性( $P > 0.05$ )(表 1)。

### 2.2 饮食中 Ca/VitD 缺乏对骨折愈合的影响

为评估 Ca/VitD 缺乏饮食对大鼠手足创伤术后骨折愈合的影响。创伤后第 10 天,未观察到 Ca/VitD 缺乏对愈合组织的显著影响。到第 23 天,与 C 组大鼠相比,D 组大鼠的骨折愈合组织中的 BMD 显著降低( $P < 0.05$ ),BV/TV 没有显著性差异( $P > 0.05$ ),而在组织形态计量学中,D 组大鼠在新形成的愈合组织中骨量显著减少( $P < 0.001$ ),纤维组织量显著增加( $P < 0.05$ )(见表 2,图 1A,1B),而在骨折的愈合组织中,D 组大鼠破骨细胞的数量和表面显著增加( $P < 0.01$ ),D 组的成骨细胞活性没有显著性差异(图 1C)。这些结果表明在 D 组大鼠中骨含量略有减少,说明在 Ca/VitD 缺乏饮食组中手足创伤术后骨愈合受到了中度干扰。

### 2.3 饮食中 Ca/VitD 补充对骨折愈合的影响

Ca/VitD 补充剂 S 组在骨折后 10 d 无明显影响。到第 23 天,S 组在踝关节愈合组织中的 BMD 略有增加,但没有显著增加。与 D 组相比,S 组大鼠的愈合组织中的骨量显著增加( $P < 0.01$ ),而纤维组织部分显著减少( $P < 0.05$ )。此外,S 组表现出

较高的骨折愈合率( $P < 0.05$ ) (表 3)。

与 D 组相比,手足创伤术后 23 d, S 组大鼠的骨痂成骨细胞标志物 ALP mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 血清 PTH 水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 和 C 组相比骨吸收标记物 CTX 的血清水平降低, 但骨形成标记 PINP 的血清水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。这些结果表明, 在手足创伤术后开始的 Ca/VitD 补充减少甚至补偿了慢性 Ca/VitD 缺乏的负面

影响(表 3)。

与此同时, S 组 iFGF23 及 cFGF23 的血清水平均显著升高, 与 D 组, C 组相比较具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。但 iFGF23; cFGF23 三组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) 说明饮食中补充 Ca/VitD 对骨折愈合组织中的 iFGF23, cFGF23 表达水平具有关联性。与 D 组的相比, S 组中 Phex mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 证实了 FGF23 运转率提高, 见表 3。

表 1 手足创伤前大鼠  $\mu$ CT 及血清分析结果( $n=8$ )

Table 1 CT and serum analysis results of rats before hand and foot trauma ( $n=8$ )

组别 Groups	I 型胶原 C 端端肽 CTX (ng/mL)	I 型前胶 原 N 端肽 PINP (ng/mL)	成纤维 细胞 生长因子 23 (pg/mL)	C 末端成 纤维 细胞生长 因子 23cFGF23 (pg/mL)	甲状旁 腺激素 PTH (pg/mL)	骨密度 (HAmg/cm) Bone mineral density (HAmg/cm)	骨小梁体 积分 数 BV/TV (%)	骨小梁宽 (%) Tb.Th (%)	骨小梁 数量 Tb.N (1/mm)	骨小梁 分离 Tb.Sp (mm)
C 组 Group C	18.122 ± 4.221	34.030 ± 6.831	190.242 ± 12.278	18.473 ± 4.221	18.247 ± 4.209	734.432 ± 27.675	19.298 ± 5.101	0.056 ± 0.006	3.212 ± 0.934	0.171 ± 0.034
D 组 Group D	17.462 ± 5.145	35.042 ± 7.098	200.092 ± 17.281	17.976 ± 4.221	320.341 ± 27.231	721.341 ± 53.041	18.924 ± 3.724	0.057 ± 0.006	3.037 ± 0.642	0.194 ± 0.043
S 组 Group S	15.443 ± 4.821	38.212 ± 5.331	200.251 ± 19.034	18.247 ± 4.209	320.128 ± 20.873	742.214 ± 40.076	19.808 ± 5.706	0.060 ± 0.006	3.195 ± 0.502	0.204 ± 0.022

表 2 创伤后第 23 天大鼠骨折愈合组织  $\mu$ CT 分析结果( $n=8$ )

Table 2 CT analysis of callus of rat fracture on day 23 after trauma ( $n=8$ )

组别 Groups	骨密度 (HAmg/cm) Bone mineral density (HAmg/cm)	骨小梁体积分数 (%) Bone volume/Total volume (%)	组织体积 (mm <sup>3</sup> ) Tissue volume (mm <sup>3</sup> )	骨折愈合 (%) Fracture healing (%)
C 组 Group C	369.871 ± 73.262	19.477 ± 5.633	5.721 ± 2.344	62.500
D 组 Group D	303.121 ± 47.273 *	16.845 ± 4.326	7.022 ± 2.565	50.000
S 组 Group S	341.984 ± 45.437	18.171 ± 5.025	6.912 ± 1.744	75.000 **

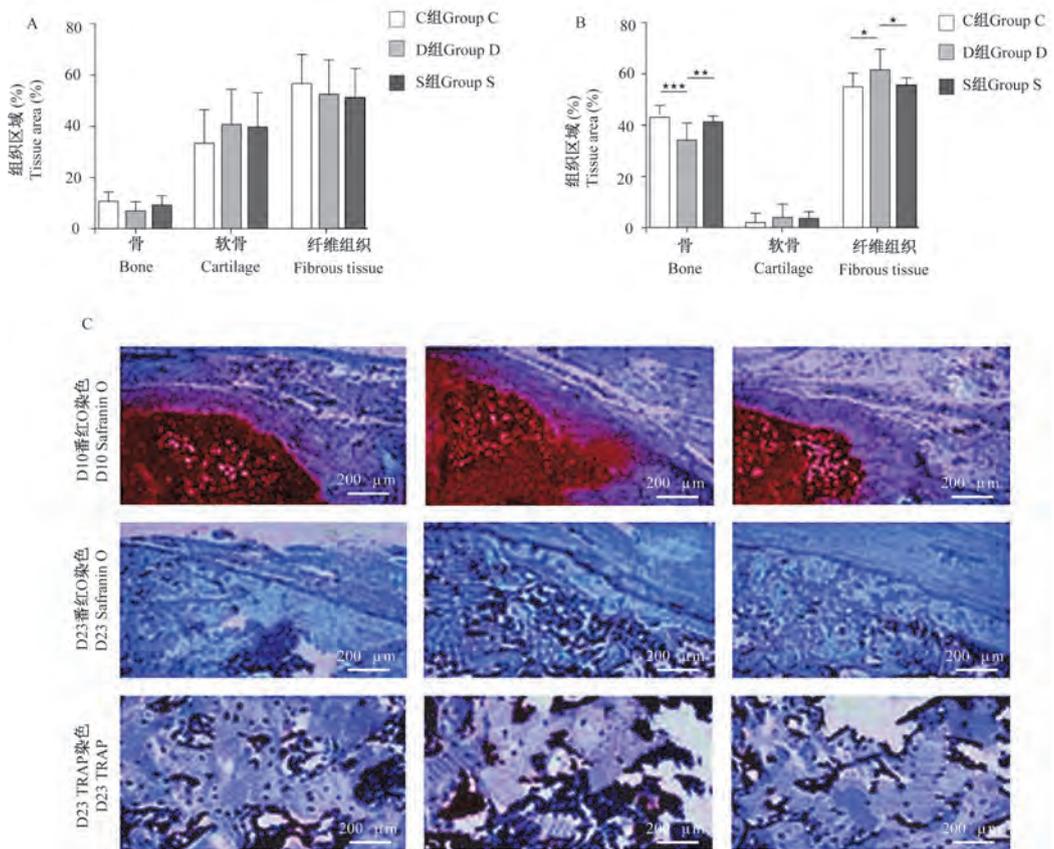
注: 与 C 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 D 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ 。(下图/表同)

Note. Compared with group C, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with group D, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ . (The same in the following figures and tables)

表 3 骨折后第 23 天大鼠骨折愈合参数及血清分析结果( $n=8$ )

Table 3 Fracture healing parameters and serum analysis results of rats on 23 d after fracture ( $n=8$ )

组别 Groups	血清参数 Serum parameters								基因表达 Gene expression				
	每骨周 破骨细 胞数 (1/mm) N.Oc/ B.Pm (1/mm)	每骨表 面破骨 细胞表 面 (%) Oc.S/ BS (%)	每骨周 成骨细 胞数 (1/mm) N.Ob/ B.Pm (1/mm)	每骨表 面成骨 细胞表 面 (%) Ob.S/ BS (%)	I 型胶 原 C 端 端肽 (ng/mL) CTX	I 型前 胶原 N 端肽 (ng/mL) PINP	成纤维 细胞生 长因 子 23 (pg/mL) iFGF23	C 末端 成纤维 细胞生 长因 子 23 (pg/mL) cFGF23	成纤维 细胞生 长因 子 23; C 末端 成纤维 细胞生 长因 子 23 (pg/mL) 23iFGF23; cFGF23	甲状旁 腺激素 (pg/mL) PTH	相对 ALP mRNA 表 达 Relative ALP expression	相对 VDR mRNA 表 达 Relative VDR expression	相对 Phex mRNA 表 达 Relative PHEX expression
C 组 Group C	4.232 ± 0.862	10.213 ± 4.432	26.321 ± 6.087	18.532 ± 5.023	19.526 ± 4.210	42.257 ± 5.098	220.651 ± 18.098	351.342 ± 34.123	0.621 ± 0.081	181.431 ± 19.221	1.000 ± 0.087	1.000 ± 0.076	1.000 ± 0.095
D 组 Group D	5.942 ± 0.762 **	14.964 ± 3.178 **	19.381 ± 5.931	16.125 ± 3.219	19.271 ± 6.109	45.753 ± 6.125	251.234 ± 12.987	422.654 ± 38.671	0.581 ± 0.053	450.443 ± 30.132 **	0.821 ± 0.076	0.821 ± 0.054	0.751 ± 0.074
S 组 Group S	4.532 ± 0.561#	9.543 ± 2.098###	28.216 ± 5.3209##	22.432 ± 4.298##	13.109 ± 3.090 *	50.231 ± 7.342	340.761 ± 32.921 ***	610.236 ± 60.640 **#	0.632 ± 0.097	80.871 ± 12.963###	1.234 ± 0.132#	1.261 ± 0.097#	1.253 ± 0.123#



注:A:第10天骨折愈合组织中骨、软骨和纤维组织的百分比;B:第23天骨折愈合组织中骨、软骨和纤维组织的百分比;C:用番红O和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色的踝关节愈合组织结果。

图1 大鼠踝关节的组织形态学分析结果

Note. A. Percentage of bone, cartilage and fibrous tissue in the fracture callus at 10 d. B. Percentage of bone, cartilage and fibrous tissue in fracture callus at 23 d. C. Ankle callus stained with safflower O and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP).

Figure 1 Histomorphological analysis results of rat ankle joint

### 3 讨论

本研究研究了Ca/VitD在手足创伤术后骨折愈合中的作用。慢性膳食Ca/VitD缺乏大鼠踝关节骨折后血清PTH水平明显升高,破骨细胞活性增加。踝关节骨折创伤术后补充Ca/VitD可促进愈合。因此,本研究证明了在创伤术后骨折愈合过程中充足的Ca/VitD的供应可减少Ca/VitD缺乏饮食者破骨细胞活性和增加骨量,改善骨修复,在临床上具有高度的相关性。

由于钙在骨再生过程中对愈合组织矿化至关重要,因此,本研究研究了Ca/VitD缺乏是否影响骨修复。D组表现出中等程度的骨折愈合,骨折愈合组织中骨含量减少及破骨细胞数量增加。D组的PTH水平高可能是愈合组织中破骨细胞活性显著增加的原因。关于Ca/VitD缺乏对骨愈合的影响,目前对大鼠的研究数量有限,已有少量研究报道了

对愈合组织矿化和生物力学骨特性的相互矛盾的影响<sup>[10-11]</sup>。与本研究结果一致,愈合受损和不愈合的患者与正常愈合的患者相比,血清维生素D水平较低<sup>[12]</sup>。此外,本研究证明了补充Ca/VitD可以消除先前缺乏饮食的负面影响,这一点可以通过骨折愈合组织中骨量增加得到证明。

VitD对骨再生的积极作用主要是通过其对钙稳态的内分泌作用间接发挥作用,从而增加骨折愈合组织矿化的钙供应。然而,维生素D对骨骼的直接影响也被广泛讨论,因为成骨细胞表达VDR,其在这些细胞上的表达直接受生物活性1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>调控<sup>[13]</sup>。体外研究表明1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>和VDR可增强成骨细胞分化和矿化,表现为成骨细胞分化标志物ALP活性增加<sup>[14]</sup>。本研究证明了补充Ca/VitD大鼠手足创伤术后骨折愈合组织中VDR和ALP的表达增加。基于这些结果,可以说明增强的1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/VDR信号在骨折愈合组织中的局部

作用可能也有助于 Ca/VitD 治疗诱导的骨折愈合改善。然而,需要进一步的研究探讨其确切机制。

此外,本研究还研究了 FGF23,是矿物质和 VitD 代谢的调节剂,对有效的骨愈合非常重要。在 S 组大鼠中,iFGF23 和 cFGF23 血清水平均显著增加,表明 FGF23 周转率提高。但是,iFGF23:cFGF23 的比例未改变,可能表明其生物活性 FGF23 不变。与此一致,骨折愈合组织中的 FGF23 和 FGFR1 表达不受 Ca/VitD 补充的影响,表明局部 FGF23 信号不受影响。骨折愈合组织中的内肽酶 Phex mRNA 表达增加,表明 FGF23 裂解支持大鼠中 FGF23 更新。但是,需要进一步的研究来证实。

总之,本研究表明,Ca/VitD 补充剂在踝关节创伤术后可减少 Ca/VitD 缺乏饮食者破骨细胞活性和增加骨量,改善骨修复,可减少患者发生继发性骨折的风险。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 吴凡,林旭. 维生素 D 与骨折相关性[J]. 国际骨科学杂志, 2014, 35(2): 100-101.  
Wu F, Lin X. Vitamin D is associated with fracture[J]. Int J Orthop, 2014, 35(2): 100-101.
- [ 2 ] Nadeem SMA, Rafique I, Hayder I, et al. Comparison of vitamin D levels with bone density, calcium, phosphate and alkaline phosphatase - an insight from major cities of Pakistan[J]. J Pak Med Assoc, 2018, 68(4): 543-547.
- [ 3 ] Suzuki T. Update on recent progress in vitamin D research. Elcalcitol(R) and fall prevention [J]. Clin Calcium, 2017, 27(11): 1595-1600.
- [ 4 ] Pang J, Ye M, Cao Y, et al. Ovariectomy-induced osteopenia influences the middle and late periods of bone healing in a mouse femoral osteotomy model[J]. Rejuvenation Res, 2015, 18(4): 356-365.
- [ 5 ] 高伟,赵明兴,张龙. 维生素 D 和钙剂的补充对 AIDS 患者骨密度影响的研究[J]. 浙江临床医学, 2018, 20(9): 1509-1511.  
Gao W, Zhao MX, Zhang L. Study on the effect of vitamin D and calcium supplement on bone mineral density in AIDS patients [J]. Zhejiang Clin Med, 2018, 20(9): 1509-1511.
- [ 6 ] Haffner LM, Heilmann A, Heidler V, et al. Hypochlorhydria-induced calcium malabsorption does not affect fracture healing but increases post-traumatic bone loss in the intact skeleton[J]. J Orthop Res, 2016, 34(11): 1914-1921.
- [ 7 ] Babu S, Sandiford NA, Vrahas M. Use of teriparatide to improve fracture healing: what is the evidence? [J]. World J Orthop, 2015, 6(6): 457-461.
- [ 8 ] 李啸群,钱进,苏佳灿. 糖皮质激素诱导小鼠骨质疏松模型构建方法的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(12): 120-124.  
Li XQ, Qian J, Su JC. Current status of research on glucocorticoid-induced mouse models of osteoporosis [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(12): 120-124.
- [ 9 ] Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee [J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(1): 2-17.
- [ 10 ] 韩龙,吴水培. 注射用骨肽对去卵巢骨质疏松大鼠骨微结构、骨密度和骨生物力学性能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 79-83.  
Han L, Wu SP. Effects of ossotide injection on bone mineral density (BMD), bone microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rats[J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(6): 79-83.
- [ 11 ] Reginster JY. Treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. BMJ Brit Med J, 2016, 10(7): 41-47.
- [ 12 ] 范佳佳,梁冰. 绝经后女性 25 羟维生素 D 与骨密度及骨折风险的相关性[J]. 中医药临床杂志, 2018, 30(6): 1072-1075.  
Fan JJ, Liang B. Correlation of bone mineral density, 25 hydroxy Vitamin D and fracture risk in postmenopausal women [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 30(6): 1072-1075.
- [ 13 ] Wang Y, Zhu J, Deluca HF. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone[J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(3): 685-692.
- [ 14 ] Yang LP, Dong YP, Luo WT, et al. Calbindin-D28K mediates 25(OH)D3/VDR-regulated bone formation through MMP13 and DMP1: Calbindin-D28K regulates osteogenesis [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(10): 8035-8047.

[收稿日期] 2020-08-04

赵楠楠,王艳,郭艳娟,等. Oct4 和 Cdx2 对牛胚胎内细胞团和滋养外胚层分化的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 818-823.

Zhao NN, Wang Y, Guo YJ, et al. Effects of Oct4 and Cdx2 on differentiation of bovine embryonic inner cell mass and trophoctoderm [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 818-823.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.012

# Oct4 和 Cdx2 对牛胚胎内细胞团和滋养外胚层分化的影响

赵楠楠\*, 王艳, 郭艳娟, 高杰, 袁金灵, 陈燕

(华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 目的 研究 Oct4 和 Cdx2 敲低对牛 ICM 和 TE 分化相关的基因表达的影响,解释 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。方法 RNA 干扰敲低牛胚胎 Oct4 或 Cdx2 基因。实时荧光定量 PCR 及免疫荧光染色检测敲低 Oct4 或 Cdx2 基因对牛胚胎早期发育及相关基因表达的影响。结果 针对 Oct4 或 Cdx2 基因的特异性 siRNA 能够抑制牛胚胎 Oct4 或 Cdx2 表达。Oct4 敲低对胚胎卵裂率和 8-细胞率无影响,但胚胎囊胚率显著降低, mRNA 水平显著下降 ( $P < 0.05$ )。Cdx2 敲低抑制 Oct4 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。结论 Oct4 通过调节 Cdx2、Sox2 及 Nanog 的表达控制牛胚胎的分化。

**【关键词】** Oct4; Cdx2; 牛; 胚胎发育; 细胞分化

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0818-06

## Effects of Oct4 and Cdx2 on differentiation of bovine embryonic inner cell mass and trophoctoderm

ZHAO Nannan\*, WANG Yan, GUO Yanjuan, GAO Jie, YUAN Jinling, CHEN Yan

(Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: ZHAO Nannan. E-mail: nn0814@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of Oct4 and Cdx2 knockdown on the expression of genes involved in ICM (Inner Cell Mass) and TE (Trophoctoderm) differentiation in cattle, and to elucidate the roles of Oct4 and Cdx2 in the early development of bovine embryos. **Methods** Oct4 and Cdx2 genes were knocked down in bovine embryos by RNA interference. Real-time quantitative PCR and immunofluorescence staining were used to observe the effects of knockdown on early embryo development and gene expression. **Results** Specific siRNAs against Oct4 and Cdx2 inhibited Oct4 and Cdx2 expression, respectively, in bovine embryos. Oct4 knockdown had no effect on embryonic cleavage and eight-cell proportions, although the blastocyst proportion was significantly reduced; moreover, the mRNA levels of Cdx2, Sox2, and Nanog were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Cdx2 knockdown inhibited the expression of Oct4 mRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Oct4 controls the differentiation of bovine embryos by regulating the mRNA expression levels of Cdx2, Sox2, and Nanog.

**【Keywords】** Oct4; Cdx2; bovine; embryonic development; cell differentiation

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

**【基金项目】** 河北省 2020 年度医学科学研究课题计划(20201249), 河北省卫生健康委科研基金项目(20180776), 河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目(JYG2019004)。

Funded by Medical Science Research Project Plan of Hebei Province in 2020(20201249), Research Fund Project of Hebei Health Commission (20180776), Research Project of Fundamental Scientific Research Business Expenses of Provincial Colleges and Universities in Hebei Province (JYG2019004).

**【通信作者】** 赵楠楠(1985—), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 妇产科。Email: nn0814@163.com

哺乳动物胚胎发育过程中第一个可见的分化事件是内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoectoderm, TE)的分离。ICM 是一群多能细胞,附着在 TE 的内部,形成胎儿和胚胎外组织。相反,TE 是围绕囊胚腔发育成胎盘的单层极化细胞<sup>[1]</sup>。ICM 和 TE 的分离由涉及多个基因相互作用的单独的发育程序调节。

Oct4 和 Cdx2 两种转录因子对 ICM 和 TE 谱系的分离和功能发挥是必需的。Oct4(Pou5f1)是 POU 转录因子家族的一员,在囊胚腔形成后仅在 ICM 中表达,对维持细胞多能性和正常分化为表皮细胞的过程不可或缺<sup>[2]</sup>。Cdx2 是正确的细胞命运决定和 TE 分化所需的 TE 特异性转录因子<sup>[3]</sup>。Cdx2、Sox2 和 Nanog 是 Oct4 的已知靶点,三者通常形成网络共同调控其他靶点基因。Oct4 基因与 Sox2、Nanog 共同形成和维持胚胎干细胞的多能性和自我更新。缺乏 Oct4 或 Cdx2 表达的小鼠胚胎仍分别形成 ICM 或 TE<sup>[3-5]</sup>。这些结果表明,Oct4 和 Cdx2 在囊胚形成后 ICM 和 TE 的分化中都发挥了作用。然而,关于 Cdx2 调节 Oct4 在牛胚胎中的作用,还未有统一的说法。Schiffmacher 等<sup>[6]</sup>指出 Cdx2 在牛胚胎中负调节 Oct4。而其他研究表明,牛胚胎 Cdx2 的下调并不影响 Oct4 的表达<sup>[7-8]</sup>。目前对牛 ICM 和 TE 分化的分子机制研究有限。本研究希望通过 Oct4 和 Cdx2 敲低对牛 ICM 和 TE 分化相关基因表达的影响,解释 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

牛卵母细胞由本院研究室采集并培养。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

QuantiTect 反转录试剂盒购自 Qiagen 公司; VECTASHIELD with DAPI 防荧光淬灭封片剂购自 Vector Labs; Oct4、Cdx2、 $\beta$ -actin 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology; 新生牛血清、RNA 提取试剂盒购自生工生物工程有限公司。

多管架自动平衡离心机 L530; 电热恒温水槽 SSW-420-2S 型; 二氧化碳培养箱 MCO-20AIC-SC; 显微操作仪 Nikon Eclipse Ti; 荧光显微镜; 博日 qPCR 仪。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 体外受精和胚胎培养

采集牛卵巢抽取卵母细胞,捡取卵丘-卵母细胞复合体(cumulus-oocyte complexes, COCs)。COCs 经洗卵液和成熟液分别洗涤 3~5 次,微滴成熟液培养 22 h,培养条件为 39℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度,无菌矿物油覆盖微滴。成熟后转移至 IVF-100 培养液。解冻的精液在 IVF-100 培养基中 2000 r/min 离心 5 min,共两次。将精子加入 COCs,终浓度为每毫升  $5 \times 10^6$  个,在 39℃、5% CO<sub>2</sub> 的湿润环境中孵育 6 h。受精后,去除卵丘细胞和多余的精子。显微注射 siRNA,使用含 1% BSA 的改良 TALP 培养基(mTALP),39℃、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub> 和 90% N<sub>2</sub> 的湿润环境下培养胚胎。第 2 天转移至含 3% 新生牛血清的 mTALP 培养基中,相同条件培养至第 7 天。培养期间统计胚胎发育情况。

#### 1.2.2 siRNA 设计和显微注射

根据 Oct4 和 Cdx2 的基因序列分析和设计原则,确定 Oct4 siRNA 的 Sense Strand 和 Antisense Strand 分别为:5'-GGAAAGGUGUUCAGCCAAATT-3', 5'-UUUGGCUGAACACCUUCCTT-3'; Cdx2 siRNA 的 Sense Strand 和 Antisense Strand 分别为:5'-ACGUGAGCAUGUAUCCAGTT-3', 5'-CUGGGAUACAUGCUCACGUTT-3'。siRNA 序列由上海吉玛制药技术公司合成。受精后,根据说明将裸露的胚胎转移至含 1 mg/mL BSA 的 mTALP 培养基微滴液中进行显微注射。洗涤胚胎并按上述条件进行培养。

根据注射情况将实验对象分为:空白对照(Ctrl)组;阴性对照 siRNA (siCtrl)组;注射 Oct4 特异性 siRNA (siOct4)组和 Cdx2 特异性 siRNA (siCdx2)组。

#### 1.2.3 实时定量荧光 PCR (qPCR)

收集桑椹胚和囊胚,蛋白酶去除囊胚透明带。根据说明进行 RNA 提取、反转录及实时荧光定量 PCR,所用引物为:Oct4 F:5'-GGTCTCTTTGGAAAGGTGTTT-3', R:5'-ACACTCGGACCACGTCTTTC-3'; Cdx2 F:5'-GCCACCATGTACGTGAGCTACC-3', R:5'-ACATGGTATCCGCCGTAGTCCGG-3'; Nanog F:5'-AATTCCCAGCAGCAAATCAC-3', R:5'-CCCTTCCCTCAAATTGACAC-3'。 $\beta$ -actin 作为内参,SYBR Green 检测产物并计算相对表达量。

### 1.2.4 免疫荧光染色

4%多聚甲醛室温固定桑椹胚 20 min; 含 0.1% Triton X-100 的 PBS(TXPBS)清洗 2 次, 每次 10 min; 清洗过的样品用含 0.2% Triton X-100 的 PBS 通透 30 min, 再清洗 2 次; 7%山羊血清封闭 1.5 h 用于 Oct4 染色, 0.5% BSA + 1% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 用于 Cdx2 染色; TXPBS 清洗 5 min, 一抗 4℃ 孵育过夜; TXPBS 清洗一抗 4 次, 每次 15 min; 二抗室温孵育 1 h; TXPBS 清洗 4 次, 每次 20 min; DAPI 染色, VECTASHIELD 封片。倒置荧光显微镜观察实验结果。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析。所有数据均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD 检验。  $P < 0.05$ , 差异具有显著性。

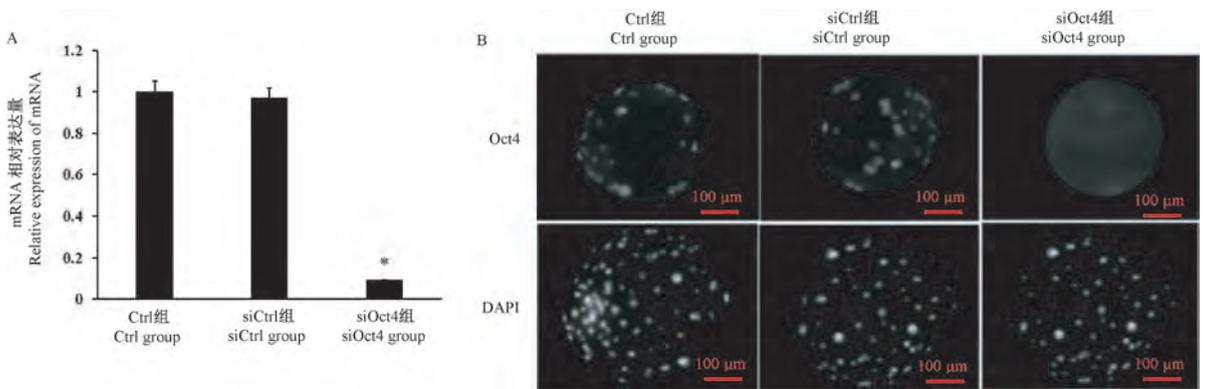
## 2 结果

### 2.1 Oct4 siRNA 干扰对 Oct4 mRNA 和蛋白表达的影响

qPCR 结果显示, siOct4 组胚胎 Oct4 mRNA 表达水平显著低于 Ctrl 组和 siCtrl 组 ( $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果显示, siOct4 组胚胎 Oct4 信号强度显著低于 Ctrl 组和 siCtrl 组。说明 RNA 干扰成功敲低牛胚胎 Oct4 基因(见图 1)。

### 2.2 Cdx2 siRNA 干扰对 Cdx2 mRNA 和蛋白表达的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较, siOct4 组胚胎中 Cdx2 的 mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。说明通过 RNA 干扰成功对牛胚胎的 Cdx2 基因进行了敲低(见图 2)。

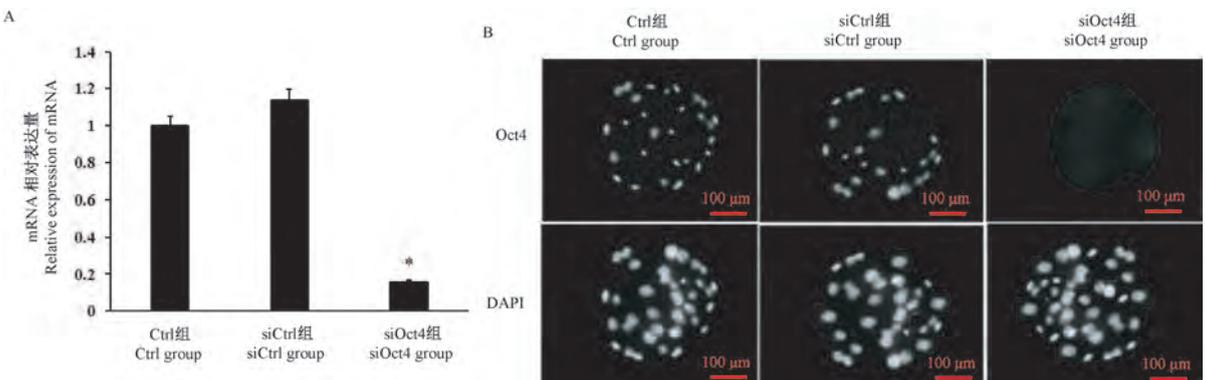


注: A: Oct4 mRNA 相对表达量; B: Oct4 免疫荧光结果。与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较, \*  $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 1 Oct4 siRNA 干扰对 Oct4 mRNA 和蛋白表达的影响

Note. A. Relative expression of Oct4 mRNA. B. immunofluorescence results of Oct4. Compared with Ctrl group and siCtrl group, \*  $P < 0.05$ . (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Effect of Oct4 siRNA interference on the expression of Oct4 mRNA and protein



注: A: Cdx2 mRNA 相对表达量; B: Cdx2 免疫荧光结果。

图 2 Cdx2 siRNA 干扰对 Cdx2 mRNA 和蛋白表达的影响

Note. A. Relative expression of Cdx2 mRNA. B. immunofluorescence results of Cdx2.

Figure 2 Effect of Cdx2 siRNA interference on the expression of Cdx2 mRNA and protein

### 2.3 siRNA 干扰对牛胚胎早期发育的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组比较, Oct4 敲低的胚胎卵裂率及 8-细胞期比例无差异 ( $P > 0.05$ ), 囊胚率显著降低 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。Cdx2 敲低的胚胎卵裂率、8-细胞率及囊胚率与 Ctrl 组和 siRNA 组均无差异 (表 2)。说明 Oct4 基因影响胚胎早期发育过程中的囊胚形成, Cdx2 对胚胎发育到囊胚阶段无影响。

### 2.4 Oct4 siRNA 干扰对 Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组相比, siOct4 组的胚胎 Cdx2、

Sox2 和 Nanog mRNA 在囊胚阶段表达水平均显著下降 (图 3,  $P < 0.05$ )。说明在牛胚胎早期发育中, Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 表达水平与 Oct4 基因有关。

### 2.5 Cdx2 siRNA 干扰对 Oct4、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

与 Ctrl 组和 siCtrl 组相比, siCdx2 组胚胎在囊胚阶段 Oct4 mRNA 表达水平显著降低 (图 4,  $P < 0.05$ ), Sox2 mRNA 和 Nanog mRNA 无差异 (图 4B 和图 4C,  $P > 0.05$ )。说明在牛胚胎早期发育中, Cdx2 基因主要影响 Oct4 基因的表达, 对 Sox2 和 Nanog 基因则无影响。

表 1 敲低 Oct4 后牛胚胎早期的发育

Table 1 Embryos early development after Oct4 knockdown

分组 Groups	胚胎总数 Embryo numbers	胚胎卵裂率 (%) Embryonic cleavage rate (%)	8-细胞期比例 (%) 8-cell stage rate (%)	囊胚率 (%) Blastocyst (%)
Ctrl	237	168 (70.89 ± 2.95)	114 (48.10 ± 3.80)	93 (39.24 ± 2.53)
siCtrl	232	160 (68.97 ± 3.45)	107 (46.12 ± 5.17)	83 (35.78 ± 4.74)
SiOct4	228	146 (64.04 ± 5.70)	112 (49.12 ± 7.02)	49 (21.49 ± 7.89)*

表 2 敲低 Cdx2 后牛胚胎早期的发育

Table 2 Embryos early development after Cdx2 knockdown

分组 Groups	胚胎总数 Embryo numbers	胚胎卵裂率 (%) Embryonic cleavage rate (%)	8-细胞期比例 (%) 8-cell stage rate (%)	囊胚率 (%) Blastocyst (%)
Ctrl	210	164 (78.10 ± 9.05)	109 (51.90 ± 10.95)	60 (28.57 ± 8.57)
siCtrl	205	157 (76.59 ± 5.85)	109 (53.17 ± 7.32)	54 (26.34 ± 6.83)
SiCdx2	192	142 (73.96 ± 11.98)	93 (48.44 ± 8.30)	44 (22.92 ± 7.29)

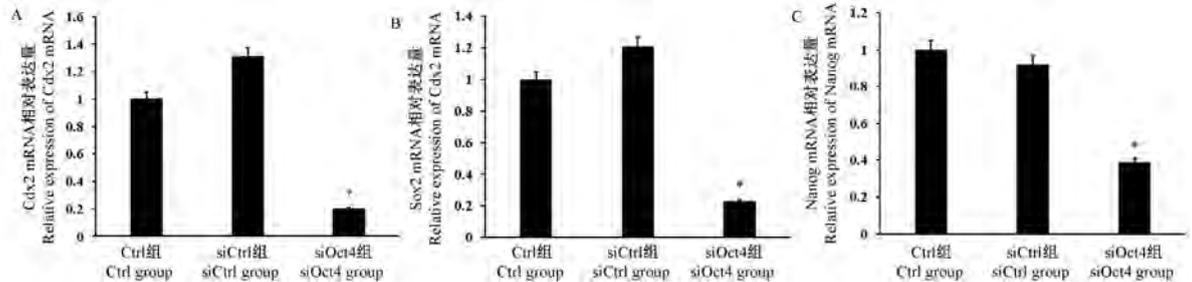


图 3 Oct4 siRNA 干扰对 Cdx2、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

Figure 3 Effect of Oct4 siRNA interference on levels of Cdx2, Sox2 and Nanog mRNA

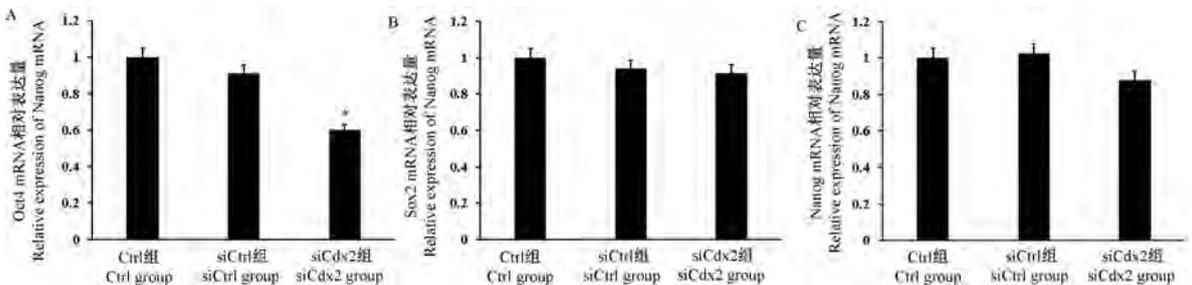


图 4 Cdx2 siRNA 干扰对 Oct4、Sox2 和 Nanog mRNA 水平的影响

Figure 4 Effect of Cdx2 siRNA interference on levels of Cdx2, Sox2 and Nanog mRNA

### 3 讨论

Oct4 和 Cdx2 是小鼠胚胎中 ICM 和 TE 分化的中心调节因子<sup>[2-4]</sup>。Oct4 仅在囊胚的滋养层中表达, Oct4 主要高表达于内细胞团<sup>[4]</sup>。Oct4 可调节 ICM 的分化, 指导胚胎干细胞的命运决定<sup>[2,9]</sup>, 且对于诱导分化细胞的多能性至关重要<sup>[10]</sup>。Cdx2 能够通过上调各种 TE 特异性基因和下调 Oct4 与 Nanog 基因促进 TE 谱系的分化<sup>[3]</sup>。Cdx2 基因缺失的囊胚不能维持囊胚腔, 无法形成完整的上皮, 且异常调节 ICM 特异性转录因子 Oct4 及 Nanog, 细胞死亡率升高。但 Cdx2 基因缺失的囊胚能够形成 ICM, 且能在体外培养得到胚胎干细胞<sup>[11]</sup>。

本项研究中, 我们利用 RNA 干扰技术探究了 Oct4 和 Cdx2 在牛胚胎早期发育中的作用。结果表明, 二者对于牛 ICM 和 TE 的正常分化和健全的囊胚形成至关重要。与小鼠胚胎相比, Oct4 下调对牛胚胎发育的影响更为严重。不同于小鼠胚胎, Oct4 在牛 TE 中的表达不会消失, 即使在完全扩张的囊胚阶段也是如此<sup>[12]</sup>。Oct4 可能在牛胚胎的囊胚阶段发挥不同的作用, 如将增殖的 TE 细胞保持在分化延迟状态<sup>[13]</sup>。然而, Nganvongpanit 等<sup>[14]</sup>表示注射 Oct4 dsRNA 与否对牛胚胎在囊胚阶段的发育率没有显著影响。在本研究中, Oct4 敲低对牛胚胎发育到桑椹胚阶段无影响, 但囊胚的形成显著低于对照组的胚胎。关于注射 Oct4 dsRNA 与 siRNA 的胚胎发育能力不同的原因尚未明确, 注射 Oct4 dsRNA 的胚胎需要相对更长的培养时间才能形成囊胚腔, ICM 细胞的数量也明显较低<sup>[14]</sup>。这表明在囊胚形成过程中, Oct4 在不同物种间可能发挥了共同或独特的作用。与 Oct4 不同的是, 本研究发现 siRNA 敲低 Cdx2 后的胚胎, 卵裂率、8-细胞期比例及囊胚率均与对照组胚胎无差别。一方面, Oct4 基因可能影响了胚胎早期发育过程中的囊胚形成。另一方面, 也有可能由于 siRNA 敲低效果减弱或消失, 从而导致注射了特异性 siRNA 的胚胎形成囊胚。

虽然对胎盘早期发育无直接影响, 敲低 Oct4 或 Cdx2 基因对早期发育相关基因的影响却是显著的。Oct4 和 Cdx2 在小鼠胚胎干细胞中抑制彼此的表达<sup>[4]</sup>。敲低或敲除 Cdx2 导致 Oct4 在小鼠胚胎中异位表达和过度表达<sup>[3,5]</sup>。但本研究发现, 单独敲低牛胚胎中的 Oct4 或 Cdx2 基因, 另一种基因在 mRNA 水平上的表达受到抑制。因此, 在牛胚胎中

可能不存在 Cdx2 与 Oct4 相互抑制的机制。Nanog 基因是 Oct4 的另一个靶基因, 编码一种同源异型蛋白转录因子, 对于维持 ICM 和胚胎干细胞的多能性必不可少。与 Oct4 不同, Nanog 在形成外胚层和内胚层中起决定性作用。小鼠 Nanog mRNA 在致密桑椹胚阶段才表达, 在 ICM 中维持, 而在 TE 中迅速下降。发育中的胚胎多能性的维持还需要转录因子 Sox2 的活性, Sox2 在调控不同细胞系中具有多种功能。小鼠 Sox2 转录产物在桑椹胚阶段开始表达, 在 ICM 中维持, 直至外胚层阶段。多项研究证实了 Sox2 在限定 ICM 分化中的作用<sup>[11]</sup>。本研究发现, Oct4 敲低导致 Sox2 和 Nanog mRNA 水平显著下降, Cdx2 敲低对 Sox2 和 Nanog mRNA 水平无影响。这说明 Oct4 通过调节各种基因控制牛胚胎的分化, 而 Cdx2 在牛胚胎的分化中可能是通过调控 Oct4 或其他基因发挥作用。

#### 参 考 文 献 (References)

- [1] Nakhuda G, Jing C, Butler R, et al. Frequencies of chromosome-specific mosaicisms in trophoctoderm biopsies detected by next-generation sequencing[J]. *Ferti Ster*, 2018, 109(5): 857-865.
- [2] Daigneault BW, Rajput S, Smith GW, et al. Embryonic POU5F1 is required for expanded bovine blastocyst formation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7753.
- [3] Huang D, Guo G, Yuan P, et al. The role of Cdx2 as a lineage specific transcriptional repressor for pluripotent network during the first developmental cell lineage segregation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17156.
- [4] Le Bin GC, Muñoz DS, Kurowski A, et al. Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst[J]. *Development*, 2014, 141(5): 1001-1010.
- [5] Das B, Pal B, Bhuyan R, et al. MYC regulates the HIF2 $\alpha$  stemness pathway via nanog and Sox2 to maintain self-renewal in cancer stem cells versus non-stem cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(16): 4015-4025.
- [6] Schiffmacher AT, Keefer CL. CDX2 regulates multiple trophoblast genes in bovine trophoctoderm CT-1 cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2013, 80(10): 826-839.
- [7] Zhang Z, Zhai Y, Ma X, et al. Down-regulation of H3K4me3 by MM-102 facilitates epigenetic reprogramming of porcine somatic cell nuclear transfer embryos [J]. *Cellular Physiol Biochem*, 2018, 45(4): 1529-1540.
- [8] Zhou H, Ni Z, Li T, et al. Activation of FXR promotes intestinal metaplasia of gastric cells via SHP dependent up-regulation of the expression of CDX2[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7617-7624.
- [9] Verner P, Echegaray CV, Osés C, et al. Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5195.

- [10] Liu P, Chen M, Liu Y, et al. CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22 (2): 252-261.
- [11] Simmet K, Zakhartchenko V, Philippou-Massier J, et al. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(11): 2770-2775.
- [12] 刘瑞琪, 王玮玮, 屈鹏祥, 等. FGF4 在牛早期胚胎发育过程中的表达[J]. 动物医学进展, 2018, 39(1): 56-60.  
Liu RQ, Wang WW, Qu PX, et al. The expression of FGF4 in the early embryonic development of cattle [J]. Prog Vet Med, 2018, 39(1): 56-60.
- [13] 吴娜娜. 不同生长因子对牛体外受精卵的发育及胚胎干细胞系的建立的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学; 2017.  
Wu NN. Effect of different growing factors on development of bovine preimplantation embryos and derivation of embryonic stem cells [D]. Huhhot: Inner Mongolian University; 2017.
- [14] Nganvongpanit K, Muller H, Rings F, et al. Selective degradation of maternal and embryonic transcripts in in vitro produced bovine oocytes and embryos using sequence specific double-stranded RNA [J]. Reproduction, 2006, 131(5): 861-874.

[收稿日期] 2020-08-12

## 《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

### 一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(双月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

### 二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

徐昊. 雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制探究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 824-830.

Xu H. Protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of MC3T3-E1 osteoblasts in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 824-830.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.013

# 雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制探究

徐昊\*

(武汉市第四医院, 武汉 430000)

**【摘要】** 目的 探讨雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制。方法 将体外培养 MC3T3-E1 细胞分为空白对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组(300 μmol/L)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 雌激素 0.1 μmol/L 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 雌激素 1 μmol/L 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 雌激素 10 μmol/L 组和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ NAC 1 mmol/L 组, 分别与相应浓度的药物进行孵育。CCK-8 检测各组细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率和线粒体膜电位; 试剂盒检测丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平; 荧光探针法检测细胞活性氧(ROS)水平; Western Blot 检测 Smad5、Runx2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组小鼠成骨细胞的增殖活性明显下降( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 JC-1 阳性细胞率明显升高( $P < 0.05$ ), MDA 和 ROS 水平明显升高( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显下降( $P < 0.05$ ), Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ ), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ); 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 雌激素 1 μmol/L 组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 雌激素 10 μmol/L 组和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ NAC 1 mmol/L 组细胞的增殖活性明显升高( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率和 JC-1 阳性细胞率明显下降( $P < 0.05$ ), MDA 和 ROS 水平明显下降( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显升高( $P < 0.05$ ), Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** 雌激素可能通过激活 Smad5/Runx2 信号轴的表达, 降低氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的 ROS 水平, 提高细胞的分化能力。

**【关键词】** 雌激素; 成骨细胞; 氧化应激

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0824-07

## Protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of MC3T3-E1 osteoblasts in mice

XU Hao\*

(Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430000, China)

Corresponding author: XU Hao. E-mail: huangkanping@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of mouse MC3T3-E1 osteoblasts (OB). **Methods** MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* were divided into a blank control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (300 μmol/L), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 0.1 μmol/L estrogen group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 1 μmol/L estrogen group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 10 μmol/L estrogen group, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 1 mmol/L NAC group, which were incubated with the corresponding concentrations of the drugs. The proliferative activities of cells in each group were determined by CCK-8. The apoptosis rate and

**【基金项目】** 湖北省卫生健康委员会科研项目(WJ2019F016)。

Funded by Scientific Research Project of Hubei Provincial Health Commission (WJ2019F016)。

**【通信作者】** 徐昊(1969—), 男, 副主任医师, 本科, 研究方向: 骨外的研究。Email: huangkanping@163.com

mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by flow cytometry. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined using kits. The level of reactive oxygen species (ROS) was determined by a fluorescent probe method. The expression of Smad5, Runx2, Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 proteins was determined by western blotting. **Results** Compared with those in the blank control group, the proliferative activities of cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), apoptosis rate and positive rate of JC-1 cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ), levels of MDA and ROS were significantly increased ( $P < 0.05$ ), SOD activity was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), expression of Smad5, Runx2, and Bcl-2 proteins was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins was significantly increased in the  $H_2O_2$  group ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the  $H_2O_2$  group, proliferative activities of cells were significantly increased ( $P < 0.05$ ), apoptosis rate and positive rate of JC-1 cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), levels of MDA and ROS were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), SOD activity was significantly increased ( $P < 0.05$ ), expression of Smad5, Runx2, and Bcl-2 proteins was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and expression of Bax and cleaved Caspase-3 proteins was significantly decreased in the  $H_2O_2 + 1 \mu\text{mol/L}$  estrogen group,  $H_2O_2 + 10 \mu\text{mol/L}$  estrogen group, and  $H_2O_2 + 1 \text{mmol/L}$  NAC group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Estrogen may reduce the level of ROS in MC3T3-E1 cells damaged by oxidative stress and improve the differentiation ability of cells by activating the expression of the Smad5/Runx2 signal axis.

**[Keywords]** estrogen; osteoblast; oxidative stress

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

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是临床常见的一种女性年龄相关的系统性骨骼退行性疾病, 早期无明显症状, 随病情发展可表现为骨痛、驼背、局部压痛等症状, 是引起老年女性骨折最常见的原因, 发病率可达 10%~20%<sup>[1-2]</sup>。既往研究认为, PMOP 主要由于雌激素缺乏引起<sup>[3]</sup>; 然而近年来研究显示<sup>[4]</sup>, 氧化应激是 PMOP 的重要发病机制, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增加可以诱导成骨细胞 (osteoblast, OB) 的氧化应激损伤, 影响骨重建, 降低骨密度, 增加骨折的风险。OB 是骨形成的主要功能细胞, 来源于骨、骨膜、骨髓及骨外组织, 可以合成并分泌多种生物活性物质, 参与调节骨的形成和重建<sup>[5]</sup>。研究显示, 随着绝经期妇女年龄的增加, 机体的抗氧化系统功能也会降低, 导致细胞内的 ROS 累积, 可损伤成骨细胞功能, 影响骨的形成<sup>[6]</sup>。雌激素是生物体重要的内源性激素, 可以调节成骨细胞和破骨细胞间的平衡, 对于骨的形成和骨量维持具有重要作用<sup>[7]</sup>。近年来研究显示, 雌激素可以通过弱化活性氧作用, 增加抗氧化酶的表达, 调节破骨细胞和成骨细胞的活性, 维持骨吸收和转换的平衡, 但其具体的作用和机制尚不清楚<sup>[8-9]</sup>。因此, 本研究探讨了雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用, 并进一步阐明了其对 MC3T3-E1 细胞分化能力的影响及机制, 旨在为雌激素在 PMOP 治疗中的应用提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

MC3T3-E1 细胞由中国科学院上海生命科学研究院提供。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

$\beta$ -雌二醇 (批号 190409) 购自上海广锐生物科技有限公司;  $\alpha$ -MEM 培养基 (批号 190615)、10% 胎牛血清 (批号 190407)、CCK-8 检测试剂盒 (批号 190712) 购自上海经科化学科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 190916) 和 ROS 荧光探针购自北京绿源伯德生物科技有限公司; JC-1 荧光探针购自 Molecular Probes 公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (批号 190410) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (批号 190326) 购自南京建成生物科技有限公司; 兔抗鼠 Smad5、Runx2、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、 $\beta$ -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 均购于美国 CST 公司。

流式细胞仪 (FACScan) 购自美国 FranklinLakes 公司; 多功能酶标检测仪 (iMark680) 购自 Bio-Rad 公司; 荧光显微镜 (ix71) 购自日本 Olympus 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MC3T3-E1 细胞氧化应激损伤模型的建立

将 MC3T3-E1 细胞培养于质量分数为 10% 热灭活胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养液, 置于 37°C、5%  $CO_2$

培养箱中贴壁培养,每周换 2 次培养液。将贴壁培养至对数生长期的细胞分为空白对照组、 $H_2O_2$  组 ( $300 \mu\text{mol/L}$ )、 $H_2O_2$ + 雌激素  $0.1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2$ + 雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2$ + 雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2$ + NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组。除空白对照组加入  $\alpha$ -MEM 培养液外,其他各组细胞均加入含  $H_2O_2$  (终浓度为  $300 \mu\text{mol/L}$ ) 的培养液孵育 3 h,诱导氧化应激损伤。处理后,采用无血清培养液洗 2 遍,除空白对照组和  $H_2O_2$  组加入  $\alpha$ -MEM 培养液外,其他各组细胞均加入含相应浓度药物的培养液继续孵育,培养 24 h 过夜,用于检测细胞的生物学特征。

### 1.2.2 CCK-8 实验检测细胞的增殖

取贴壁培养 24 h 至对数生长期的细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,以  $3 \times 10^4 \text{ mL}$  密度接种至 96 孔板,  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中贴壁培养 24 h 后,分组与相应药物孵育,分别于 24、48、72 h 的细胞,弃培养液,每孔分别加入  $10 \mu\text{L}$  CCK-8 溶液,继续培养 4 h,采用酶标仪检测 570 nm 波长的吸光度值。

### 1.2.3 试剂盒检测细胞的 MDA 和 SOD 水平

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,吸去培养基, PBS 洗 3 次后采用 IP 细胞裂解工作液裂解细胞,离心 ( $10\ 000 \text{ rpm}$ ,  $10 \text{ min}$ ),取上清,硫代巴比妥酸法检测 MDA;黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 水平。

### 1.2.4 荧光探针法检测细胞的 ROS 水平

用无血清的  $\alpha$ -MEM 培养液稀释 DCFH-DA (终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ ),装载探针。取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,吸去培养基,加入 DCFH-DA 培养基重悬细胞,孵育 20 min 后,采用无血清细胞培养液洗去未进入细胞内的 DCFH-DA,荧光酶标仪检测 ROS 水平。

### 1.2.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,离心 ( $1000 \text{ rpm}$ ,  $5 \text{ min}$ ),弃上清,依次加入  $5 \mu\text{L}$  的 AnnexinV-FITC 和 propidium iodide 进行染色,室温避光孵育 30 min,经 70 目的细胞筛过滤后,采用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

### 1.2.6 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞, 2.5% 胰酶消化,离心 ( $1000 \text{ rpm}$ ,  $10 \text{ min}$ ),加入  $1 \text{ mmol/L}$  的 JC-1 染色工作溶液  $1 \text{ mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min, JC-1 缓冲液洗 3 次后,倒置荧光显微镜下分析荧光强度,流式细胞仪分析 JC-1 阳性率。

### 1.2.7 Western Blot 检测细胞分化和凋亡相关蛋白

表达

取各组与相应浓度药物孵育 24 h 的细胞,细胞裂解液提取总蛋白后经 BCA 法进行蛋白定量, SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,室温封闭 2 h,加入一抗 (Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 Cleaved Caspase-3, 稀释比例均为 1:1000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,以  $\beta$ -actin 作为内参,洗膜加 HRP 标记的二抗 (稀释比例为 1:5000) 室温孵育 2 h,电化学发光显影,分析对比条带强弱。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行分析,满足正态分布计量资料均以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用单因素方差分析比较组间差异性,若组间比较有差异,采用 SNK-*q* 比较两组间差异性,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

表 1 结果显示,与空白对照组比较,  $H_2O_2$  组细胞在不同时间点的增殖活性明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与  $H_2O_2$  组比较,  $H_2O_2$ + 雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2$ + 雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2$ + NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组细胞在不同时间点的增殖活性明显升高 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 雌激素对 MC3T3-E1 细胞凋亡水平的影响

流式细胞仪检测结果显示 (图 1),与空白对照组比较,  $H_2O_2$  组细胞的凋亡率明显升高 [ $(11.74 \pm 2.18) \text{ vs } (4.85 \pm 0.53)$ ,  $P < 0.05$ ]; 与  $H_2O_2$  组比较,  $H_2O_2$ + 雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2$ + 雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2$ + NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组细胞的凋亡率明显下降 [ $(8.86 \pm 0.95)$ 、 $(6.71 \pm 0.72)$ 、 $(6.53 \pm 0.65) \text{ vs } (11.74 \pm 2.18)$ ,  $P < 0.05$ ]。

### 2.3 雌激素对 MC3T3-E1 细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞仪检测结果显示 (图 2),与空白对照组比较,  $H_2O_2$  组细胞的 JC-1 阳性细胞率明显增加 [ $(9.70 \pm 1.53) \text{ vs } (3.85 \pm 0.42)$ ,  $P < 0.05$ ]; 与  $H_2O_2$  组比较,  $H_2O_2$ + 雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2$ + 雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2$ + NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组 JC-1 阳性细胞率明显下降 [ $(7.82 \pm 0.93)$ 、 $(5.61 \pm 0.65)$ 、 $(5.54 \pm 0.62) \text{ vs } (9.70 \pm 1.53)$ ,  $P < 0.05$ ]。

### 2.4 雌激素对 MC3T3-E1 细胞氧化应激水平的影响

表 2 结果显示,与空白对照组比较,  $H_2O_2$  组

MDA 和 ROS 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显下降 ( $P < 0.05$ ); 与  $H_2O_2$  组比较,  $H_2O_2 +$  雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2 +$  雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2 +$  NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组 MDA 和 ROS 水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显升高 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 雌激素对 MC3T3-E1 细胞 Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达的影响

图 3、表 3 结果显示, 与空白对照组比较,  $H_2O_2$

组细胞 Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显下降 ( $P < 0.05$ ), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与  $H_2O_2$  组比较,  $H_2O_2 +$  雌激素  $1 \mu\text{mol/L}$  组、 $H_2O_2 +$  雌激素  $10 \mu\text{mol/L}$  组和  $H_2O_2 +$  NAC  $1 \text{ mmol/L}$  组细胞 Smad5、Runx2 和 Bcl-2 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显下降 ( $P < 0.05$ )。

表 1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of estrogen on proliferation of MC3T3-E1 cells ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	24 h	48 h	72 h
空白对照组 Blank control group	0.685 ± 0.024	0.804 ± 0.023	0.975 ± 0.028
$H_2O_2$ 组 $H_2O_2$ group	0.324 ± 0.018 *	0.381 ± 0.021 *	0.448 ± 0.024 *
$H_2O_2 +$ 雌激素 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $0.1 \mu\text{mol/L}$ group	0.331 ± 0.026 *	0.388 ± 0.020 *	0.452 ± 0.022 *
$H_2O_2 +$ 雌激素 $1 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $1 \mu\text{mol/L}$ group	0.427 ± 0.021 **	0.483 ± 0.025 **	0.576 ± 0.021 **
$H_2O_2 +$ 雌激素 $10 \mu\text{mol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ estrogen $10 \mu\text{mol/L}$ group	0.514 ± 0.023 **	0.587 ± 0.026 **	0.671 ± 0.027 **
$H_2O_2 +$ NAC $1 \text{ mmol/L}$ 组 $H_2O_2 +$ NAC $1 \text{ mmol/L}$ group	0.520 ± 0.025 **	0.591 ± 0.026 **	0.674 ± 0.028 **
<i>F</i>	96.752	117.341	104.593
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与空白对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与  $H_2O_2$  组相比, #  $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with blank control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with  $H_2O_2$  group, #  $P < 0.05$ . (The same in the following tables)

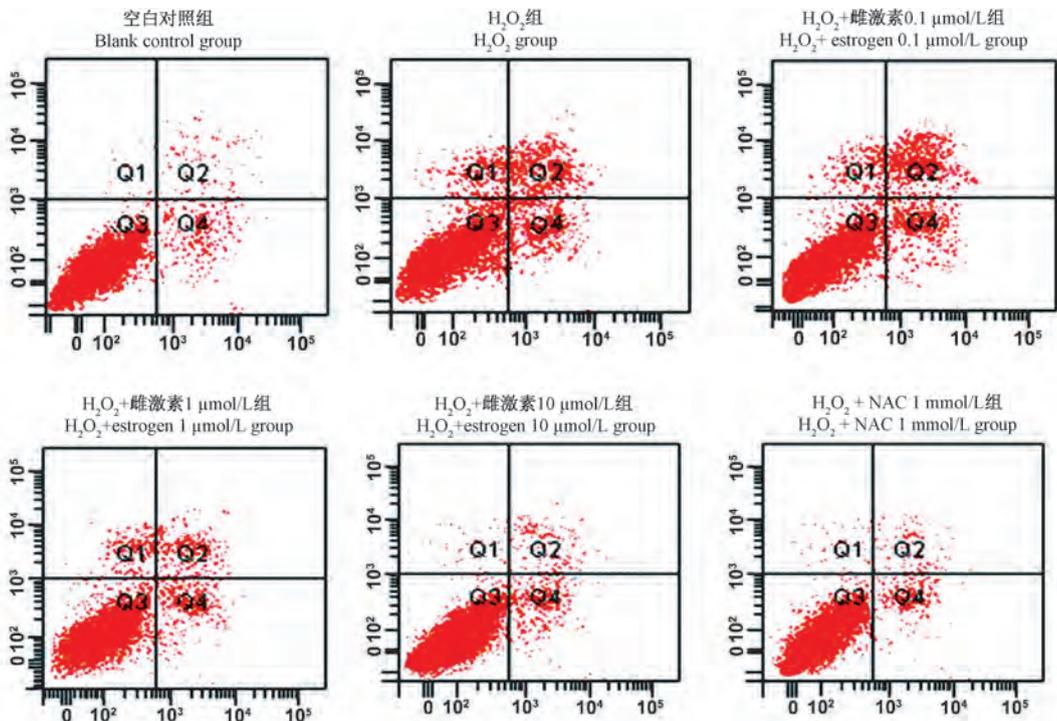


图 1 雌激素对 MC3T3-E1 细胞凋亡水平的影响

Figure 1 Effect of estrogen on apoptosis of MC3T3-E1 cells

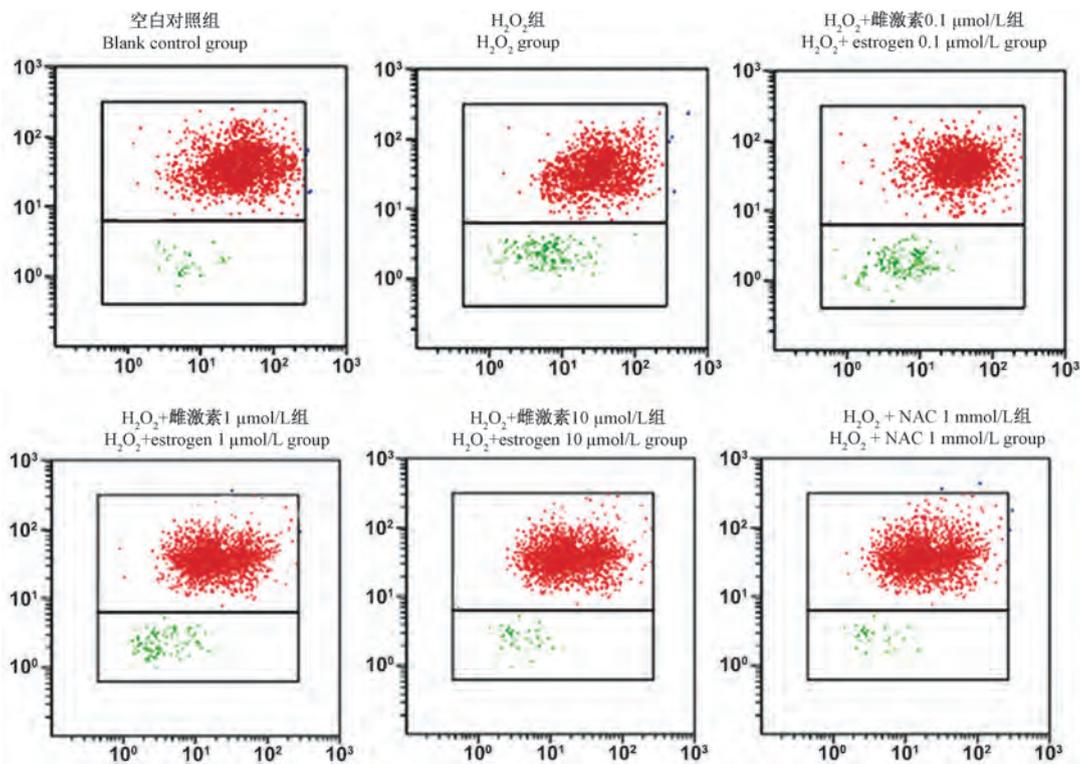


图2 雌激素对MC3T3-E1细胞线粒体膜电位的影响

Figure 2 Effect of estrogen on mitochondrial membrane potential of MC3T3-E1 cells

表2 雌激素对MC3T3-E1细胞氧化应激水平的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )Table 2 Effects of estrogen on oxidative stress in MC3T3-E1 cells ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	ROS (%)
空白对照组 Blank control group	3.45 ± 0.34	27.80 ± 2.13	9.75 ± 0.78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> group	6.78 ± 0.68 *	20.36 ± 2.07 *	14.48 ± 1.24 *
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 0.1 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 0.1 μmol/L group	6.51 ± 0.66 *	21.07 ± 2.20 *	13.42 ± 1.25 *
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 1 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 1 μmol/L group	5.32 ± 0.51 *#	23.65 ± 2.24 *#	12.56 ± 1.21 *#
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 10 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 10 μmol/L group	4.76 ± 0.43 *#	25.71 ± 2.15 *#	10.61 ± 1.06 *#
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC 1 mmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC 1 mmol/L group	4.51 ± 0.45 *#	25.89 ± 2.21 *#	10.74 ± 1.02 *#
<i>F</i>	87.451	26.143	52.695
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001

表3 MC3T3-E1细胞Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax和cleaved Caspase-3表达( $n=6, \bar{x} \pm s$ )Table 3 Expression of Smad5, Runx2, bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 in MC3T3-E1 cells ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Groups	Smad5	Runx2	Bcl-2	Bax	cleaved Caspase-3
空白对照组 Blank control group	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> group	0.18 ± 0.02 *	0.21 ± 0.02 *	0.22 ± 0.02 *	0.48 ± 0.04 *	0.45 ± 0.03 *
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 0.1 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 0.1 μmol/L group	0.18 ± 0.02 *	0.22 ± 0.02 *	0.23 ± 0.03 *	0.47 ± 0.04 *	0.44 ± 0.04 *
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 1 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 1 μmol/L group	0.20 ± 0.02 *#	0.25 ± 0.02 *#	0.27 ± 0.03#	0.41 ± 0.04 *#	0.39 ± 0.03 *#
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 雌激素 10 μmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + estrogen 10 μmol/L group	0.22 ± 0.03 *#	0.27 ± 0.03 *#	0.30 ± 0.03 *#	0.34 ± 0.03 *#	0.33 ± 0.03 *#
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC 1 mmol/L组 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NAC 1 mmol/L group	0.22 ± 0.02 *#	0.27 ± 0.02 *#	0.30 ± 0.02 *#	0.33 ± 0.03 *#	0.33 ± 0.02 *#
<i>F</i>	77.961	63.285	17.632	95.240	89.437
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

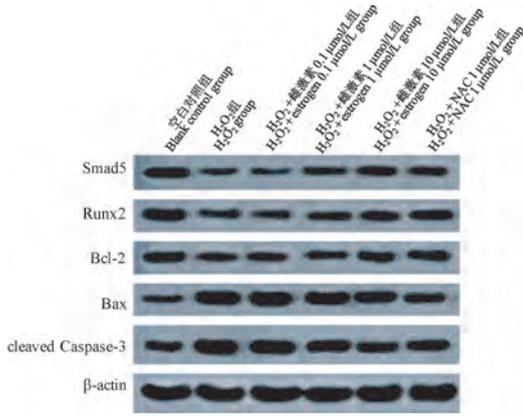


图 3 MC3T3-E1 细胞 Smad5、Runx2、Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达

Figure 3 Expression of Smad5, Runx2, bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 in MC3T3-E1 cells

### 3 讨论

氧化应激是指细胞内氧自由基尤其是 ROS 的产生与抗氧化能力失衡的一种状态,可以引起多组织细胞的氧化损伤<sup>[10]</sup>。已有多项研究显示<sup>[11-12]</sup>,氧化应激是导致 PMOP 发生的主要原因之一,细胞内过多的 ROS 可以诱导成骨细胞和骨细胞的凋亡,影响骨形成和吸收过程的平衡。雌激素是机体重要的内分泌激素,具有广泛的生物学作用,可以调节骨的形成和吸收,目前已逐步应用于 PMOP 患者的替代治疗<sup>[13]</sup>。既往研究显示<sup>[14]</sup>,雌激素可以增加细胞内抗氧化酶的表达,清除细胞内过多的 ROS,调节破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨形成的平衡,但作用机制尚不清楚。因此,本研究建立了体外成骨细胞氧化应激损伤模型,来分析雌激素成骨细胞氧化应激损伤的作用。 $H_2O_2$  是一种常见的活性氧自由基,可以穿透细胞膜,诱导细胞的氧化应激损伤,与 PMOP 的发生发展密切相关<sup>[15]</sup>。因此,本研究采用  $H_2O_2$  诱导 MC3T3-E1 细胞的氧化应激损伤,来分析雌激素的作用。本研究中, $H_2O_2$  诱导 MC3T3-E1 细胞的增殖活性明显下降,细胞凋亡率明显升高,经浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  及以上的雌激素作用后,MC3T3-E1 细胞的增殖活性明显增加,凋亡率明显下降。周雪娟等<sup>[16]</sup>的研究显示,雌二醇可以上调成骨细胞内抗氧化酶的表达,减轻骨质疏松大鼠的氧化应激损伤,提示雌激素可以促进氧化应激损伤成骨细胞的增殖,抑制其凋亡,其具体的作用机制有待于进一步深入研究。

本研究中,MC3T3-E1 细胞经  $H_2O_2$  诱导后,细

胞内 Smad5 和 Runx2 蛋白表达明显下降,经浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  及以上的雌激素作用后,细胞内 Smad5 和 Runx2 蛋白表达明显升高。已有研究显示<sup>[17-18]</sup>,Smad5/Runx2 信号轴在成骨细胞的分化中具有重要的调节作用,细胞外信号分子磷酸化 Smad5 后,可以与 Smad4 结合形成复合物并进入细胞核,与 Runx2 相互作用,调节成骨细胞的分化。王慧等<sup>[19]</sup>的研究显示,雌激素可以通过多种信号通路调节成骨细胞 Runx2 的表达,提示雌激素可能通过调节 Smad5/Runx2 信号轴的表达,提高成骨细胞的分化能力。本研究中,MC3T3-E1 细胞经  $H_2O_2$  诱导后,细胞内 MDA 和 ROS 水平明显升高,SOD 活性明显下降,经浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  及以上的雌激素作用后,细胞内 MDA 和 ROS 水平明显下降,SOD 活性明显升高,提示雌激素可以提高细胞内抗氧化酶的表达,降低 ROS 水平,改善细胞的氧化应激状态。

本研究中,MC3T3-E1 细胞经  $H_2O_2$  诱导后,JC-1 阳性细胞率明显升高,经浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  及以上的雌激素作用后,细胞 JC-1 阳性细胞率明显下降。JC-1 是实验中常用的一种检测线粒体膜电位的荧光探针,在线粒体膜电位降低时,JC-1 为单体出现绿色荧光<sup>[20]</sup>,提示雌激素可以升高氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的线粒体膜电位。线粒体是细胞内能量代谢的中心,线粒体膜内外的电位差变化可以影响细胞内的能量代谢,影响细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程<sup>[21]</sup>,提示雌激素可能通过恢复线粒体膜电位,促进  $H_2O_2$  诱导 MC3T3-E1 细胞的增殖,抑制其凋亡。本研究中, $H_2O_2$  可以诱导 MC3T3-E1 细胞 Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达上调,Bcl-2 蛋白的表达下调,经浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  及以上的雌激素作用后,Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达下调,Bcl-2 蛋白的表达上调。Bcl-2 和 Bax 为一组调控线粒体凋亡途径的蛋白,cleaved Caspase-3 为细胞内凋亡的执行蛋白,可以降解细胞内多种重要蛋白,诱导细胞凋亡<sup>[22]</sup>,提示雌激素可以恢复线粒体膜电位,上调氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞 Bcl-2/Bax 的表达,抑制细胞凋亡。

综上所述,雌激素可以调节 Smad5/Runx2 信号轴的表达,促进  $H_2O_2$  致氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的增殖和分化,降低细胞的氧化应激水平,抑制其凋亡,有望应用于临床治疗。但本研究尚处于初步探索阶段,其雌激素保护  $H_2O_2$  致氧化应激损伤 MC3T3-E1 细胞的具体机制尚需进一步验证。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Dionello CF, S -Caputo D, Pereira HV, et al. Effects of whole body vibration exercises on bone mineral density of women with postmenopausal osteoporosis without medications: Novel findings and literature review [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2016, 16(3): 193-203.
- [ 2 ] 潘心瑶, 谢欣薇, 周琦, 等. 绝经后骨质疏松症中医药研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(9): 1140-1147.  
Pan XY, Xie XW, Zhou Q, et al. Advances in traditional Chinese medicine research on postmenopausal osteoporosis [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2019, 39(9): 1140-1147.
- [ 3 ] Naylor KE, Bradburn M, Paggiosi MA, et al. Effects of discontinuing oral bisphosphonate treatments for postmenopausal osteoporosis on bone turnover markers and bone density [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(6): 1407-1417.
- [ 4 ] 孙振双, 耿元卿, 张丽君, 等. 氧化应激介导绝经后骨质疏松发病机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(8): 1063-1067.  
Sun ZS, Geng YQ, Zhang LY, et al. Research progress on the pathogenesis of oxidative stress mediated osteoporosis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2016, 22(8): 1063-1067.
- [ 5 ] Balani DH, Ono N, Kronenberg HM. Parathyroid hormone regulates fates of murine osteoblast precursors *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3327-3338.
- [ 6 ] Wolski H, Drews K, Bogacz A, et al. The RANKL/RANK/OPG signal trail: significance of genetic polymorphisms in the etiology of postmenopausal osteoporosis [J]. *Ginekol Pol*, 2016, 87(5): 347-352.
- [ 7 ] Lin PI, Tai YT, Chan WP, et al. Estrogen/ER $\alpha$  signaling axis participates in osteoblast maturation via upregulating chromosomal and mitochondrial complex gene expressions [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 1169-1186.
- [ 8 ] Siqueira R, Colombo R, Conzatti A, et al. Effects of ovariectomy on antioxidant defence systems in the right ventricle of female rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(3): 295-303.
- [ 9 ] Besse PA, L veill  M, Oropeza D, et al. Estrogen signals through peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  to reduce oxidative damage associated with diet-induced fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 243-256.
- [ 10 ] Guzik, Tomasz TJ, Touyz RM. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension [J]. *Hypertension*, 2017, 70(4): 660-667.
- [ 11 ] Yao H, Yao Z, Zhang S, et al. Upregulation of SIRT1 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced osteoblast apoptosis via FoxO1/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6681-6690.
- [ 12 ] Li DY, Yu JC, Xiao L, et al. Autophagy attenuates the oxidative stress-induced apoptosis of Mc3T3-E1 osteoblasts [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24): 5548-5556.
- [ 13 ] Prior JC, Seifert-Klauss VR, Giustini D, et al. Estrogen-progestin therapy causes a greater increase in spinal bone mineral density than estrogen therapy - a systematic review and meta-analysis of controlled trials with direct randomization [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2017, 17(3): 146-154.
- [ 14 ] 费蓓蓓, 王啸, 张弘, 等. 雌激素对铁蓄积小鼠骨代谢的影响及机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(6): 917-920.  
Fei BB, Wang X, Zhang X, et al. Effects of estrogen on bone metabolism of mice with iron accumulation [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(6): 917-920.
- [ 15 ] Ghorabi MT, Aliaghaei A, Sadeghi Y, et al. Evidence supporting neuroprotective effect of adipose derived stem cells on PC12 cells against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2017, 63(3): 1-6.
- [ 16 ] 周雪娟, 夏颖, 赵岩岩, 等. 雌二醇显著上调骨质疏松大鼠成骨细胞内抗氧化酶的表达 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(4): 402-408.  
Zhou XJ, Xia Y, Zhao YY, et al. Estradiol significantly increases the expression of antioxidant enzymes in osteoporotic rats and osteoblasts *in vitro* [J]. *J South Med Univ*, 2018, 38(4): 402-408.
- [ 17 ] Yan J, Guo D, Yang S, et al. Inhibition of miR-222-3p activity promoted osteogenic differentiation of hBMSCs by regulating Smad5-RUNX2 signal axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3): 498-503.
- [ 18 ] 程旭锋, 张新峰, 刘琦, 等. 附子-白术“药对”对成骨细胞 BMP-2/Smads/Runx2 通路的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(1): 78-81.  
Cheng XF, Zhang XF, Liu Q, et al. Effects of Fuzi-Baizhu couplet medicines on the osteoblast BMP-2/Smads/Runx2 pathway [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(1): 78-81.
- [ 19 ] 王慧, 孙惠强. 成骨细胞中雌激素与 Runx2 相互作用机制的研究与趋势 [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(2): 331-336.  
Wang H, Sun HQ. Mechanism underlying interaction between estrogen and runt-related transcription factor 2 in osteoblasts [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*, 2013, 17(2): 331-336.
- [ 20 ] Hu CH, Zhuang XJ, Wei YM, et al. Comparison of mitochondrial function in boar and bull spermatozoa throughout cryopreservation based on JC-1 staining [J]. *Cryo Letters*, 2017, 38(1): 75-79.
- [ 21 ] Mora AL, Bueno M, Rojas M. Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(2): 405-414.
- [ 22 ] Al-Qathama A, Gibbons S, Prieto JM. Differential modulation of Bax/Bcl-2 ratio and onset of caspase-3/7 activation induced by derivatives of Justicidin B in human melanoma cells A375 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(56): 95999-96012.

李小茜,何建成. 充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 831-836.

Li XQ, He JC. Thinking of study on animal model of TCM syndrome of congestive heart [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 831-836.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.014

# 充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考

李小茜,何建成\*

(上海中医药大学,上海 201230)

**【摘要】** 本文通过对现代医学动物模型的制备、中医证候动物模型的制备以及病证结合动物模型的制备等研究思路进行多方面的总结与归纳,提出建立本病一体化病证结合动物模型,贴合实际,可操作性强,对于深入开展充血性心力衰竭的中医药实验研究以及本病中医证候的客观化与规范化研究大有裨益。

**【关键词】** 充血性心力衰竭;中医证候;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0831-06

## Thinking of study on animal model of TCM syndrome of congestive heart failure

LI Xiaoqian, HE Jiancheng\*

(Shanghai University of TCM, Shanghai 201230, China)

Corresponding author: HE Jiancheng. E-mail: hejc8163@163.com

**【Abstract】** In this review, we summarized research approaches involved in animal model preparation of modern medicine, TCM syndrome, and the combination of disease and syndrome. Based on it, we proposed to set up integration animal model including congestive heart failure and TCM syndromes, which is realistic and strong operability, and will be of great advantage to carry out the experimental study, objectification and standardization research of TCM syndromes of congestive heart failure.

**【Keywords】** congestive heart failure; TCM syndrome; animal model

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

充血性心力衰竭 (congestive heart failure, CHF) 多发于各种器质性心血管疾病的终末阶段,为临床常见的重大疾病之一,发病率与致死率逐年攀升,如何积极有效的防治引发临床研究者的关注。中医药在 CHF 的防治方面发挥着越来越重要的作用<sup>[1]</sup>,病证结合是中医证候研究的指导原则。动物实验是本病发病机制及其中医证候研究的重要基础,其中动物模型的制备则为

关键所在。

目前有关 CHF 疾病的动物模型制备方法研究较多,亦有研究者对中医证候的动物模型制备进行探索。近年来,随着中医药现代化研究的发展与深入,制备符合中医证候特征的病证结合的动物模型,对于进一步揭示证候的物质基础、探求中药药物的靶向疗效机制具有较重要的理论指导以及临床实际意义。

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (81803996), 中医临床基础学科建设 (A1-Z20-302-0106), 上海市卫生系统优秀学科带头人培养计划 (XBR2011070)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81803996), the Construction of Basic Clinical Disciplines of TCM (A1-Z20-302-0106), Shanghai Health System Outstanding Academic Leaders Training Program (XBR2011070)。

**【作者简介】** 李小茜 (1979—), 女, 医学博士, 副教授, 研究方向: 心力衰竭的基础与临床研究。Email: lixiaqian5258@126.com

**【通信作者】** 何建成 (1966—), 男, 教授, 医学博士, 博士生导师, 研究方向: 中医诊断学和心力衰竭的基础与临床研究。

Email: hejc8163@163.com

# 1 CHF 动物模型的制备

建立符合人类 CHF 病理生理过程且稳定的动物模型,有助于更好地开展本病机制及药效的研究。对于目前本病的防治及新的治疗手段的研发而言,选择合适的动物模型亦极为关键。总体而言,CHF 的动物模型包括心肌缺血型、压力负荷型、容量负荷型和心肌病变型等,能够较好的复制本病的病理生理改变<sup>[2-3]</sup>,制备方法主要有药物诱导和手术制备等。

## 1.1 实验动物的选择

对于每一个基础实验的模型制备而言,实验动物的选择都十分重要,亦将直接影响实验结果的可信度及科学性。

一般而言,选择实验动物的原则主要根据相似性、经济性、标准化、特殊性、模型化和可重复性等<sup>[4]</sup>。CHF 的动物实验研究所选用的动物主要有猪、羊、犬、家兔、大鼠、小鼠等。猪的心血管系统与人类相似,可以较好地反映 CHF 疾病的分子与生理表型<sup>[5]</sup>。犬的血液循环系统发达,大鼠体型小、价格低廉,且易操作,小型啮齿类动物和人类之间的心肌能量代谢、收缩能力等方面也相对相似<sup>[6]</sup>,小鼠模型在 CHF 分子、细胞学基础与药效学研究等方面发挥重要作用<sup>[7]</sup>,可见各类实验动物有各自的优势。

总体来讲,较大动物的心脏解剖结构虽然更接近人类,但是存在造模成本较高、操作难度较大等问题,实际应用较少<sup>[8]</sup>。CHF 实验动物的选择应根据造模方法(药物法或手术法)及其易操作性等来决定。建立稳定且可靠的 CHF 动物模型,成功选择动物、模拟类似人体 CHF 发病病理过程都是关键。一般认为,大鼠的电生理特性与人相似,且价格经济,便于操作。此外,由于其造模时间短、模型复制稳定等优势,研究人员较常应用 Wistar 大鼠于 CHF 的模型制备<sup>[9]</sup>。

## 1.2 药物诱导制备 CHF 模型

药物法制备模型即通过药物诱导导致实验动物 CHF 发生,常用药物包括阿霉素、异丙肾上腺素、乙醇等。

阿霉素(ADR)是一种广谱抗肿瘤化疗药物,静脉注射数小时或数日即可能造成剂量依赖性且不

可逆转的慢性的心肌损害作用,进而导致 CHF<sup>[10]</sup>。有研究指出 ADR 这种损伤心肌机制的发挥有可能与体内自由基的释放、线粒体的损伤以及代谢失衡相关<sup>[11]</sup>。有学者应用腹腔注射 ADR 的方法制备 CHF 模型,发现这种方法的优点是简单易行,而且可以较精准预测出 CHF 出现的时间。但是同时因为 ADR 的剂量依赖性,短期内较大剂量的腹腔注射给药,可能会使动物的死亡率增加,导致模型的成功率较低,因此研究者更经常使用小剂量/低浓度、多次给药的方法<sup>[12-13]</sup>。研究表明应用 ADR 制备的 CHF 动物模型,可出现心室增大、心室壁变薄以及射血分数(LVEF)减低等病变,适合用来探究心脏病、CHF 的发病机制,或某一种药物或治疗措施的评估等。吴慧颖等<sup>[14]</sup>改变 ADR 入血方式,采用尾静脉注射法制备 CHF 模型,两周后检测心脏指数、血流动力学参数、组织病理学等指标,均提示诱导成功,且未发现腹水、腹膜肿胀等腹腔刺激的现象,提供了一种简单易行的制备方法。近来,ADR 还被运用到斑马鱼胚胎上,建立心脏毒性、心脏损伤模型,进而探讨其中发生机制<sup>[15]</sup>。

异丙肾上腺素(ISO)属于  $\beta$  受体激动剂,临床应用能提高心率、增加心肌收缩力,如果长期大量的应用可能会导致心肌细胞的纤维化、心肌重构,导致 CHF 的发生。目前应用 ISO 制备 CHF 模型有皮下注射和腹腔注射两种方式,无创伤,易于重复且诱导时间较短,但是,动物的批次、给药途径的变化以及药量的差异都会影响模型制备的效果,所以实际制备的时候必须进行预实验,最终确定实际的实验方案。ISO 诱导 CHF 的模型主要是模拟交感神经兴奋进而引发 CHF 的病理过程,实际经常用于治疗药物的筛选以及药效发挥和交感神经兴奋或抑制的相关性等实验中。罗时珂等<sup>[16]</sup>实验探讨皮下注射 ISO 制备 CHF 大鼠模型的有效剂量。给药 4 周后,观察大鼠左室收缩末期内径、血清脑钠肽(BNP)水平、心脏指数以及死亡率等指标的变化。实验结果发现,CHF 的大鼠模型制备以皮下注射 ISO 2.5 mg/(kg·d)较为合适。另外,王洋等<sup>[17]</sup>通过对 ISO 诱导造模的 CHF 大鼠给药氧化苦参碱,发现氧化苦参碱可以逆转肌钙蛋白 I 水平的异常增加,改善左心室重构,明显改善 ISO 导致的心肌损伤等病理改变等。

此外,还有研究者应用乙醇诱导制备 CHF 模型。乙醇中毒会导致乙醇及其代谢物沉积在血中,致心肌细胞凋亡、使心肌收缩力减弱,左心房静息后的增强效应受到抑制,损伤心血管,最终导致 CHF。乙醇诱导 CHF 模型的作用机制可能与兴奋交感神经系统、肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统、损伤血管内皮细胞以及加剧细胞凋亡等有关<sup>[18]</sup>。这种方式造模的诱导时间虽然较长,但是以恒速进行静脉注射的话,则可控性良好。刘昊琛等<sup>[19]</sup>曾对家兔恒速、颈外静脉注射乙醇,结果发现造模后,家兔的动脉收缩压、舒张压、左室收缩压以及左室内压上升与下降的最大速率均明显下降,而且心肌的病理变化符合 CHF 的病理特征,值得进一步探索研究。

### 1.3 手术制备 CHF 动物模型

目前常用于 CHF 动物模型制备的手术方法包括腹主动脉缩窄法与左前降支冠状动脉结扎法等。

应用腹主动脉缩窄法来建立 CHF 模型,是应用注射针头或者缩窄环类等工具,结扎部分腹主动脉,促使主动脉缩窄,进而使外周循环阻力增加,最终导致压力超负荷 CHF 的方法<sup>[20]</sup>。这种造模方法在 CHF 的基础性研究中已经有较长时间的应用,手术方法较为简单,模型亦确切,是研究 CHF 发病以及病理变化机制、药物疗效等常用且较理想的模型制备方法。对于这种方法而言,动脉的缩窄程度影响着心脏的损伤程度,有研究表明,7 号注射针头可造成 Wistar 或 SD 大鼠约 70%~80% 的腹主动脉缩窄<sup>[21]</sup>;8 号注射针头则能造成 50%~60% 的腹主动脉缩窄<sup>[22]</sup>;而 9 号针头可使得动物腹主动脉缩窄减少达到 35%~50%<sup>[23]</sup>。

左前降支冠状动脉结扎术是通过手术,结扎动物的左冠状动脉或左前降支及左旋支,导致心肌缺血,诱发心肌重构,最终导致左心衰竭。这种造模方法的操作难度比较大,需要经过长期训练的实验人员才能熟练掌握。此外,采用这种方法制备 CHF 模型时,需结合彩超检测心功能指标、心肌组织病理学分析,进而观察动物心室重构、心肌纤维化甚或心肌梗死的程度。辛伟等<sup>[24]</sup>通过在小型猪冠状动脉前降支的近端放置 Ameroid 缩窄环的方法,较为成功地制备慢性心肌缺血性的 CHF 动物模型。对于在不同位置结扎冠状动脉对大鼠 CHF 模型的

影响,陈剑等<sup>[25]</sup>研究发现,进针深度约 0.5 mm 左右,常规位结扎(距左冠状动脉开口 2 mm)可导致较大心肌梗死的面积、较显著的血液动力学改变及 CHF 等病理变化,但是造模的死亡率较高,达 33%~60% 左右。采用较低位置(6 mm)结扎左冠状动脉的方法则能提高模型的存活率到 85.7% 左右,明显节约实验的工作量且节省实验成本,值得推广应用。

## 2 CHF 中医证候动物模型的制备

随着中医药现代化研究的不断深入,单纯的疾病动物模型远不能满足基础研究的需要。中医证候的动物模型研究是从糖皮质激素诱导的阳虚证动物模型开始,模型的评价可由动物的四诊表征即症状和体征反映。比如根据模型动物毛发缺少色泽、蜷缩弓背、活动力差、懒动喜卧、行动缓慢等评价为肾阳虚证<sup>[26]</sup>。这种评价方法虽然可直观反映动物状态,且贴近中医临床辨证方法。易受主观因素影响、动物在行为表现等方面与人类存在差异,导致四诊信息的采集准确性受到影响。

此外,中医证候的动物模型研究至今虽已达几十年之久,但是从中医学研究的趋势来看,单纯的证候模型缺乏对疾病完整性的反映,且证候的致病因素较易消减,而病证结合的思路则可以较好地弥补这一不足,有研究人员从病证结合角度提出综合评价复合模型的中医证候指标及微观免疫学指标,制备免疫力低下复合证候动物模型用于现代免疫学及中医学的相关研究<sup>[27]</sup>。

有关 CHF 中医证候的动物模型研究,蔡虎志等<sup>[28]</sup>认为建立 CHF 心阳虚证的病证结合动物模型,可以应用临床医学的疾病模型与中医的证候模型相结合的方式,并通过客观指标检测与药物反证等确定,但是在如何选择客观指标与反证药物方面仍需大量探索与实践。童妍<sup>[29]</sup>选取雄性 SD 大鼠,腹腔注射 ADR 4 mg/kg,每周 1 次,连续 6 周,结果发现,与正常组比较,模型组大鼠动脉收缩压、舒张压、左室收缩内压显著下降,左室舒张末压明显增高,左室内压、左室压力最大上升及下降速度显著减小,且出现精神不振、多蜷缩、反应迟钝,活动、进食减少,竖毛且毛发无光泽、拱背、小便量多、大便稀薄等阳虚症状,进而提出这种方法可以制备 CHF 心阳虚证大鼠模型。赵明镜等<sup>[30]</sup>提出 CHF 心

气虚证的病证结合动物模型的制备思路,认为心肌缺血冠状动脉结扎法造成心气虚证的动物模型符合临床流行病学、研究报告及实验研究的成果,并通过观测实验动物的一般情况,如体重变化、饲料的消耗、活动能力、精神体能、毛发情况等,定性角度来评价该模型的证候属性。

可见,有关 CHF 中医动物模型的制备研究不多,可复制性与推广性更是少之又少,研究人员提出较多思路,为更深入、更适宜的制备方法探索提供参考。

### 3 基于病证结合的 CHF 中医证候动物模型的研究与展望

CHF 的病因与发病机制纷繁复杂,动物模型的制备方式亦是多种多样。随着人们对中医药防治 CHF 机制研究的关注与深入,符合中医学特色和临床实际要求的,CHF 病证结合动物模型亟待全面建立与发展。病证结合是中医证候研究的指导原则,是故建立具有临床中医证候特征的病证结合的动物模型,对探究中医证候的物质基础、深入了解中医药疗效发挥机制等均有重要的意义。

本课题组长期致力于 CHF 的基础与临床研究,较早地建立了兔气虚血瘀型 CHF 动物模型<sup>[31]</sup>,结果证实模型组动物在发生心肌形态学改变的基础上有显著的血流动力学异常,符合 CHF 的特点;同时模型组动物具有符合中医气虚血瘀证的表现,存在血瘀证的客观指标,为之后的深入研究打下坚实基础。

我们认为,病证结合动物模型应该能够较好地体现中医对疾病发展规律的认识以及中医证候的阶段特征,即西医的病和中医的证相结合或一体化共存的模型。无论是西医的疾病抑或是中医的证候,对于一个患者而言,出现的是同一种病理表现,虽然西医与中医的辨病、辨证理论体系大相径庭,但由于研究内容与目的相同,必然存在相通之处。

基于此,笔者认为首先要建立确切的 CHF 动物模型,通过四诊信息的判定、对标病因病机、客观指标协同、治法方药的反证等,同时结合动物实际表现等评价标准,共同来证明疾病模型确立后所表现出的中医证候类型,即为 CHF 病证结合的动物模

型。这种动物模型的干预因素相对较少,病理机制较单一,用之开展实验研究可保证研究结果的可靠性,而且结合中医学特色,证明为与该疾病模型联系最为直接的证候。在这个思路指导下,课题组在帕金森病(PD)病证结合动物模型的制备方面持续深入探究,通过模拟病因(6-羟基多巴胺立体注射于大鼠右侧纹状体)、模拟症状(对照震颤、肌强直、二便、舌象等临床症状,推断 PD 模型大鼠的证候属性)、客观指标验证(氧化应激状态)、药物反证(天麻钩藤饮、桃红四物汤、涤痰汤等),较早制备了阴虚动风证 PD 病证结合大鼠模型,证实模型具有疾病和证候的双重特征,并从不同时间点,从功能、细胞、蛋白、分子生物学角度持续进行深入的生物学基础与药效研究<sup>[32]</sup>。目前我们也在通过不同的中药药物验证,摸索制备 CHF 常见证候的病证结合动物模型。

总而言之,CHF 病证结合的动物模型是本病中医药实验研究的重要前提与保障。众所周知,动物模型用于实验研究,不能完全复制出疾病的自然发生发展进程,且每种方法制备的模型都具有各自的优势和局限性。我们应该不脱离中医学的理论指导以及研究思路,同时结合自身研究项目的需求,权衡利弊,选择较适宜的模型制备方法。我们发现,CHF 临床上的中医证候呈现动态演变趋势,早中晚期都有不同的证候类型,这一结论亦影响着 CHF 病证结合动物模型的制备,即要考虑时间因素导致的动态证候,在实际操作过程中纳入时间因素、控制影响因素,尽量提高模型成功率,保证其可复制性,为之后的基础与临床研究夯实基础。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] 李小茜,何建成. 充血性心力衰竭气阴两虚证临床特点[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(15): 4205-4206.  
Li XQ, He JC. Clinical characteristics on deficiency of qi and yin syndrome in congestive heart failure[J]. Chin J Gerontol, 2015, 35(15): 4205-4206.
- [2] Haidara MA, Assiri AS, Yassin HZ, et al. Heart failure models: traditional and novel therapy[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(5): 658-669.
- [3] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 123-145.
- [4] 邓青秀,彭成. 中医药心力衰竭动物模型的研究现状[J]. 四

- 川动物, 2011, 30(2): 296-300.
- Deng QX, Peng C. Research status of heart failure animal model of traditional Chinese medicine [J]. Sichuan J Zool, 2011, 30(2): 296-300.
- [ 5 ] Silva KAS, Emter CA. Large animal models of heart failure: a translational bridge to clinical success [J]. JACC Basic Transl Sci, 2020, 5(8): 840-856.
- [ 6 ] Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(13): 1838-1849.
- [ 7 ] 李晓梅, 马依彤, 杨毅宁, 等. 小鼠主动脉弓缩窄模型的建立及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11): 24-29.
- Li XM, Ma YT, Yang YN, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of aortic arch narrowing [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(11): 24-29.
- [ 8 ] 徐创业, 蒯嫦燕. 大动物心衰模型研究进展 [J]. 北京生物医学工程, 2013, 32(5): 536-540.
- Xu CY, Lin CY. Research progress of heart failure model in large animals [J]. Beijing Biomed Eng, 2013, 32(5): 536-540.
- [ 9 ] 石峰, 李文杰. 心力衰竭动物实验研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7): 1600-1603.
- Shi F, Li WJ. Advances in animal experiments on heart failure [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(7): 1600-1603.
- [10] Anrigemma GP. Diastolic heart failure—a common and lethal condition by any name [J]. N Engl J Med, 2006, 355(3): 308-310.
- [11] Lu L, Wu W, Yan J, et al. Adriamycin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in a rat model of heart failure [J]. Int J Cardiol, 2009, 134(1): 82-90.
- [12] He KL, Dickstein M, Sabbah HN, et al. Mechanisms of heart failure with well preserved ejection fraction in dogs following limited coronary microembolization [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(1): 72-83.
- [13] 彭成. 中医药动物实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- Peng C. Animal experimental methodology of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.
- [14] 吴慧颖, 才子斌, 王芳, 等. Wistar 大鼠慢性心力衰竭模型的制备及指标判定 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(4): 778-779.
- Wu HY, Cai ZB, Wang F, et al. Preparation and index determination of Wistar rat model of chronic heart failure [J]. Chin J Gerontol, 2012, 32(4): 778-779.
- [15] 徐卓然, 陈芳源, 沈莉蓉, 等. 阿霉素对斑马鱼心脏毒性的评估及机制探索 [J]. 诊断学理论与实践, 2016, 15(1): 30-36.
- Xu ZR, Chen FY, Shen LZ, et al. Evaluation and mechanism exploration of adriamycin on zebrafish cardiotoxicity [J]. J Diagn Concept Pract, 2016, 15(1): 30-36.
- [16] 罗时珂, 李萍, 程晓曙. 异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的建立 [J]. 重庆医学, 2012, 41(4): 352-351.
- Luo SK, Li P, Cheng XS. Establishment of rat model of chronic heart failure induced by isoproterenol [J]. Chongqing Med, 2012, 41(4): 352-351.
- [17] 王洋, 徐烨华, 熊爱琴, 等. 氧化苦参碱抑制异丙肾上腺素诱导大鼠慢性心力衰竭及对 ADMA 代谢通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 471-477.
- Wang Y, Xu YH, Xiong AQ, et al. Inhibition of oxymatrine on isoproterenol-induced chronic heart failure in rats and its effect on ADMA metabolic pathway [J]. Chin J Chin Materia Med, 2014, 39(3): 471-477.
- [18] Di Minno MN, Franchini M, Russolillo A, et al. Alcohol do-sing and the heart: updating clinical evidence [J]. Semin Thromb Hemost, 2011, 37(8): 875-881.
- [19] 刘昊琛, 邓忠, 张忆雯, 等. 乙醇致家兔急性心衰模型的建立 [J]. 西安交通大学学报, 2012, 33(4): 435-438.
- Liu HC, Deng Z, Zhang YW, et al. Establishment of acute heart failure model induced by ethanol in rabbits [J]. J Xi'an Jiaotong Univ, 2012, 33(4): 435-438.
- [20] 李梦婷, 彭成, 谢晓芳. 心力衰竭小型动物模型研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 213-219.
- Li MT, Peng C, Xie XF. Advances in small animal models of heart failure [J]. Chin J Exp Formulol, 2018, 24(5): 213-219.
- [21] 侯剑辉, 叶博然, 刘钰君, 等. 大鼠慢性充血性心力衰竭模型的建立与评价 [J]. 现代医院, 2012, 12(4): 26-28.
- Hou JH, Ye BR, Liu YJ, et al. Establishment and evaluation of rat model of chronic congestive heart failure [J]. Modern hospital, 2012, 12(4): 26-28.
- [22] 胡咏梅, 李法琦, 罗羽慧, 等. 腹主动脉缩窄大鼠模型制作及临床意义 [J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29(3): 322-324.
- Hu YM, Li FQ, Luo YH, et al. Establishment and clinical significance of abdominal aortic coarctation in rats [J]. J Chongqing Med Univ, 2004, 29(3): 322-324.
- [23] 柏胜男. 大鼠舒张性心力衰竭动物模型的建立 [J]. 黑龙江医药, 2011, 24(6): 897-898.
- Bai SN. Establishment of animal model of diastolic heart failure in rats [J]. Heilongjiang Med, 2011, 24(6): 897-898.
- [24] 辛伟, 朱堃, 蔡吉梅, 等. 小型猪慢性心肌缺血心衰模型的建立与评价 [J]. 心脏杂志, 2011, 23(3): 326-330.
- Xin W, Zhu K, Cai JM, et al. Establishment and evaluation of miniature pig model of chronic myocardial ischemia heart failure [J]. Chin Heart, 2011, 23(3): 326-330.
- [25] 陈剑, 黄穗花, 柯剑婷, 等. 不同位置结扎冠状动脉对大鼠心肌梗死后交感神经重构的影响 [J]. 广东医学, 2012, 33(12): 1717-1715.

- Chen J, Huang SH, Ke JT, et al. Effects of ligation of coronary arteries at different locations on sympathetic nerve remodeling after myocardial infarction in rats[J]. *Guangdong Med*, 2012, 33(12): 1717-1715.
- [26] 潘向军, 楼百层, 朱延涛. 肾阴虚模型制备方法及肾阴虚证研究进展[J]. *新中医*, 2019, 51(3): 23-27.
- Pan XJ, Lou BC, Zhu YT. Research progress of the preparation methods of the model of kidney yin deficiency and kidney yin deficiency syndrome[J]. *J New Chin Med*, 2019, 51(3): 23-27.
- [27] 刘美怡, 钱深思, 容蓉, 等. 后天继发性免疫低下动物模型研究及在中医证候模型的应用进展[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(5): 708-715.
- Liu MY, Qian SS, Rong R, et al. Animal models of acquired secondary immunodeficiency and their application in traditional Chinese medicine syndrome models[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(5): 708-715.
- [28] 蔡虎志, 余洪, 闫红, 等. 慢性心衰心阳虚型动物模型建立的思考[J]. *中医药导报*, 2012, 18(7): 1-3.
- Cai HZ, Yu H, Yang H, et al. Thinking on the establishment of animal model of chronic heart failure with Heart Yang Deficiency [J]. *Chin Med Guide*, 2012, 18(7): 1-3.
- [29] 童妍. 温补心阳法治疗心阳虚型慢性心力衰竭大鼠的分子机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- Tong Y. Study on the molecular mechanism of warming heart-Yang method on model rat of heart-Yang deficiency of chronic heart failure[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2012.
- [30] 赵明镜, 吴爱明, 王硕仁. 心衰心气虚病证结合动物模型的研究思路[J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(5): 306-307, 311.
- Zhao MJ, Wu AM, Wang SR. The research idea of animal model of heart failure with heart Qi deficiency syndrome[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2008, 31(5): 306-307, 311.
- [31] 曹雪滨, 李培建, 黄河玲, 等. 兔气虚血瘀型心力衰竭模型的建立[J]. *实验动物科学与管理*, 1999, 16(3): 10-13.
- Cao XB, Li PJ, Huang HL, et al. Establishment of rabbit heart failure model with qi deficiency and blood stasis[J]. *Lab Anim Sci Manage*, 1999, 16(3): 10-13.
- [32] 冉秋, 何建成. 一体化病证结合帕金森病大鼠模型中医证候属性研究[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(6): 465-471.
- Ran Q, He JC. Study on TCM syndrome properties of integrated syndrome and Parkinson's disease rat model[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2011, 19(6): 465-471.

[收稿日期] 2020-10-09

郑海香,丁明珠,张雨琪,等. 乙肝病毒相关肝细胞癌小鼠模型的构建和前沿应用现状[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 837-844.

Zheng HX, Ding MZ, Zhang YQ, et al. Research progress of the mouse model of HBV-related hepatocellular carcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 837-844.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.015

# 乙肝病毒相关肝细胞癌小鼠模型的构建和前沿应用现状

郑海香,丁明珠,张雨琪,施佳健,张璐,景月娥,王星\*

(福建医科大学基础医学院消化道恶性肿瘤教育部重点实验室,福州 350108)

**【摘要】** 病毒感染可引起世界范围内12%左右癌症的发生,每年约有130万例患者死亡。目前一个重要的瓶颈问题就是所有类型的肿瘤病毒均缺乏可广泛使用的体内研究模型。肝癌是全球第四大癌症相关死亡原因,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占80%,是最常见的类型。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)相关的HCC在我国尤为严重,占据所有病例的60%以上。慢性HBV感染是发生肝癌最重要的危险因素,但目前对此类患者仍缺乏有效治愈手段。因此,明确HBV与宿主的互作方式及其致癌机制是制定临床治疗策略的前提。近几十年来,HBV病毒相关肝癌小鼠模型的建立和应用得以不断发展,伴随精准医学的进步出现了更多复杂的新模型和大量研究成果。本综述回顾分析现有基因工程小鼠和人源化小鼠在此类模型的构建方法等方面的特点,并进一步总结需应用于研究病毒致癌机制时应特别注意的适用范围或优缺点。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒;肝细胞癌;小鼠模型;肿瘤病毒;致癌

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0837-08

## Research progress of the mouse model of HBV-related hepatocellular carcinoma

ZHENG Haixiang, DING Mingzhu, ZHANG Yuqi, SHI Jiajian, ZHANG Lu, JING Yuee, WANG Xing\*

(Key Laboratory of Gastrointestinal Malignant Tumor of Ministry of Education,  
Basic Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

Corresponding author: WANG Xing. E-mail: xwang@ips.ac.cn

**【Abstract】** Viral infections cause approximately 12% of cancers worldwide and approximately 1.3 million cancer-related deaths each year. However, representative *in vivo* models for all types of tumor viruses are lacking. Liver cancer is the fourth leading cause of cancer-related death in the world, and hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 80% of all liver cancer cases. Hepatitis B virus (HBV)-associated HCC is particularly a public health issue in China, which consists of more than 60% of domestic patients. Chronic HBV infection is the critical etiological factor for liver cancer. However, curable treatments for these patients are still lacking. The prerequisite for developing effective cancer drugs for HBV-associated HCC is to disrupt the mechanism of HBV interaction with the host. The mouse model of HBV-induced liver cancer has been remarkably advanced in recent decades, and multiple novel models have been developed by precision medicine. This review comprehensively summarizes the viral and oncogenic properties of *in vivo* models of HBV-induced

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81873966),病毒学国家重点实验室开放课题(2020KF007),福建医科大学高层次人才启动项目(XRCZX2019016)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81873966), State Key Laboratory of Virology(2020KF007), Fujian Medical University (XRCZX2019016).

**【作者简介】** 郑海香(1998—),女,本科生,研究方向:病原生物学。Email: 1050833519@qq.com

**【通信作者】** 王星(1976—),女,博士,研究员,研究方向:肿瘤病毒学及其致病机制研究。Email: xwang@ips.ac.cn

HCC, with a focus on genetically engineered mouse and humanized mouse models. In addition, we discuss the benefits and caveats of each model and present a selection of the most important findings obtained from the respective systems.

**[Keywords]** hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; mouse model; tumor virus; oncogenesis

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

全球每年约有 200 万新发癌症病例与感染相关,占全年新发癌症病例的 15.4%。感染相关肿瘤在中国占比约为 26.1%,居亚洲之首,积极预防病原体的感染对减轻未来全球癌症负担将产生重大的积极意义<sup>[1]</sup>。致癌病原体中涵盖了目前公认的 7 种人类肿瘤病毒:HBV、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV)、EB 病毒 (epstein-barr virus, EBV)、人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV)、人类 T 淋巴细胞白血病毒 I 型 (human T lymphocytic leukemia virus type I, HTLV-1)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 和最新的 Merkel 细胞多瘤病毒 (Merkel cell polyomavirus, MCPyV), HBV 是其中临床危害最严重的 DNA 肿瘤病毒<sup>[2]</sup>。在我国,HBV 或 HCV 介导的肝炎、肝纤维化和肝硬化是导致肝癌发生的根本原因之一,其中 HBV 相关的 HCC 占据所有病例的 60% 以上<sup>[3]</sup>。尽管人们对病毒相关肝癌的临床表现和干预手段已经有了相当深入的认识,但 HBV 致癌的具体机制仍不是十分清楚,一个重要的限速步骤就是缺乏感染背景下的致癌动物模型。目前最为广泛使用的 HBV 相关肝癌动物模型主要集中于模式化小鼠。主要是在联合致癌剂、细胞癌基因或单独使用组织特异性启动子情况下,观察转基因小鼠中病毒癌基因对相应表型的诱导能力,或使用 HBV 阳性的肿瘤细胞系或者肝癌组织移植到免疫缺陷小鼠身上复制出相关表型。HBV 肝癌小鼠不同模型间的功能侧重和适用范围差异巨大,本综述拟详尽梳理并比较它们之间的病毒感染复制特点及致癌特性,以期研究者选择正确的模型开展靶向药物或疫苗研究提供参考。

## 1 基于基因工程的肝癌小鼠模型

### 1.1 基于 HBx 转基因小鼠的肝癌模型 (HBx transgenic mice, HBx-Tg)

在 HBV 编码的分子中,x 蛋白在 HCC 的发生发展中起着关键的作用,被认为是主要的病毒癌蛋白。HBx 蛋白作为病毒基因转录的反式激活因子,被证实可广泛与细胞增殖和存活的关键信号通路互作,导致肝细胞癌的发生<sup>[4]</sup>。早在 1991 年,研究

人员就在病毒自身元件调控作用下将 HBx 基因插入小鼠的基因组中建立了单个病毒基因的转基因小鼠模型。然后观察到该小鼠肝中出现多灶性区域病变,继以良性腺瘤后发展为恶性肿瘤<sup>[5]</sup>。同时,84% 的 HBx 高表达小鼠被发现于 13~24 个月内发生 HCC。HBx-Tg 被认为是研究 x 蛋白在病毒基因表达调控从而致瘤的分子机制以及临床前药物筛查的良好模型。

但许多报道指出最初建立的 HBx 转基因小鼠具有如下缺陷:(1)小鼠模型技术要求高、制备周期长。一般在 13~24 个月产生肝恶性肿瘤,饲养时间长,成本高。(2)肝癌发病率不稳定且受到小鼠性别差异的影响。为弥补此类缺陷,研究人员常将病毒 HBx 基因与细胞癌基因如 c-Myc、c-Met 等联合转基因,或与传统的化学诱导方法相结合,以快速制备 HBV-HCC 小鼠模型并评价病毒-宿主互作在肿瘤发生中的功能机制<sup>[6]</sup>。

此外,近年来新出现的一种简单的肝特异性转基因方法明显缩短了小鼠模型建立的时间,简化了相应的技术。该方法通过采用 Sleeping Beauty (SB) 转座酶系统和基于流体动力学的转染 (hydrodynamic transfection, HT) 方法来创建 HBx-转基因模型。SB 转座子是一种高效稳定的基因转移工具,它能通过“剪切-粘贴”的方式将外源目的基因整合入宿主细胞基因组中<sup>[7]</sup> (图 1)。以 SB 转座子作为递送系统,通过流体动力尾静脉注射将 HBx 基因整合入 Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2r $\gamma$ <sup>-/-</sup> (FRG) 小鼠的肝细胞中。流体动力传递的过程诱导了肝炎症,随后携带 HBx 转基因的肝细胞进行选择性的再繁殖,由此证实了单个 HBx 突变可以诱导肝细胞增殖<sup>[8]</sup>。HT 模型造模时间短是其优势之一,但两个明显的缺点在于:编码癌基因的转座子随机整合到染色体中,会影响整合位点或附近的细胞基因表达。其次,转座子中的癌基因通常被置于强启动子的控制之下,因此导致基因以极高的水平表达,不符合人体正常生理机制<sup>[9]</sup>。

针对 HBx 转基因小鼠模型的研究发展迅速,其应用也较为广泛。虽然 HBx-Tg 的建模成功率高且表型显著,但其局限性在于小鼠发生肿瘤之后进展

过快,这与人类肝癌的缓慢演变大不相同。第二,小鼠肿瘤往往过于同质,无法正确反映人类肝癌的复杂性。特别是 HBx-Tg 仅能体现过表达 x 基因后对肝癌的促进作用,无法反映出完整病毒在自然感染状态下的致瘤效应。

## 1.2 基于 HBs 转基因小鼠的肝癌模型 (HBs transgenic mice, HBs-Tg)

HBV S 基因所编码的表面抗原蛋白 (HBsAg) 也被认为起到促瘤发生的作用。上个世纪末期,已有报道提示年龄为 14~16 个月的近半数 HBs 转基因小鼠中可检测到自发形成的 HCC<sup>[10]</sup>。最近,研究者通过纳入 CRISPR/Cas9 技术靶向 HBV 的 preS1/preS2 和 S 编码序列,特异性敲除肝癌细胞系中的 HBsAg,功能上进一步证实 HBsAg 所介导的细胞体外增殖和体内成瘤能力被显著抑制。机制上则阐明 HBsAg 缺失可导致炎症通路关键分子白介素 IL-6 表达量降低,并抑制下游 STAT3 的信号转导与活化,提示 HBsAg 参与促发炎症是其可能的致瘤机制之一<sup>[11]</sup>。

HBs-Tg 在自然状态下持续表达 HBsAg 并表现出系统对该抗原的免疫耐受,因此,常应用于研究病毒相关肿瘤的适应性免疫反应。据此,Zong 等<sup>[12]</sup>通过阻断 HBs-Tg 小鼠的免疫检查点受体分子 TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain),同时持续接种乙肝疫苗,观察到这种联合处理所引起的过度免疫反应可诱导肝癌发生。肝癌在 9 个月龄转基因小鼠中的发生率可达 63.64%,由此建立了新的 HBV 抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 介导的病毒相关肝癌动物模型。值得注意的是,上述结果提示在 HBV 携带者中开展免疫检查点治疗,可能增加慢性肝炎和癌症的发生风险。此外,还有研究人员在免疫系统完全的 Fah<sup>-/-</sup> 小鼠肝中通过脾注射转移 HBs-Tg 小鼠的肝细胞,同样证实了病毒特异性 T 细胞的活化是诱导小鼠发生肝癌的关键因素。该模型在 6 个月时的肿瘤发生率为 100%,较强的免疫能力使其成为研究抗 HBV 适应性免疫和免疫病理学的有效工具<sup>[13]</sup>。而最近一项研究提示,除了细胞杀伤性 T 细胞外,自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK cell) 被激活亦利于 HBs-Tg 小鼠发生肝癌。在该模型小鼠中连续 8 周使用自然杀伤细胞激活剂后,下游激活的 IFN- $\gamma$  效应分子可通过上调 EpCAM-EMT 信号轴使得全部小鼠在 6 个月后均发生肝癌<sup>[14]</sup>。

现有研究成果表明 HBs-Tg 转基因小鼠是研究病毒相关 HCC 的免疫机制和免疫相关疗法的较佳模型。但 HBs-Tg 与 HBx-Tg 小鼠具有同样缺点,即均为单个病毒基因的转基因模型,并且往往需要联合其他化学或物理方法进行协同干预,才能快速获得符合研究需要的肝癌表型。

## 1.3 基于 HBV 基因组转染小鼠的肝癌模型 (HBV transgenic mice, HBV-Tg)

小鼠肝细胞被证实是可以支持 HBV 的复制与增殖,但不支持病毒自然感染和形成 HBV cccDNA<sup>[15]</sup>。2011 年,Huang 等<sup>[16]</sup>应用腺病毒相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 作为病毒载体,研究 HBV 在免疫完全小鼠中持续表达是否可导致 HCC。通过静脉注射 AAV 荷载的 HBV 基因组至 C57BL/6 小鼠中,发现所有转染小鼠在持续 12~16 个月后均出现肝肿瘤结节,后续组织病理学分析提示 HCC 发生率为 83%。邻近的癌旁组织也呈现炎症浸润、脂肪变性和局灶性坏死等组织学异常。目前该模型已被广泛用于揭示 HBV 病毒复制和病毒抗原持续表达对肝癌发生发展的影响 (图 1)。

CRISPR/Cas9 基因组编辑工具的出现克服了腺病毒作为载体的 HBV-Tg 小鼠中造模周期长的缺点。CRISPR/Cas9 系统是一种可以对特定基因组位点进行切割置换的系统<sup>[17]</sup>。研究者们利用此系统靶向敲除肝癌中关键的细胞抑癌基因,作为辅助手段加速建模过程并研究 HBV 与宿主分子互作的致瘤机理。但是近年更多是作为新型干预治疗手段尝试性地用于清除 HBV 病毒蛋白或基因组,研究对于 HBV 持续感染关键分子 cccDNA 的表达、慢性炎症乃至肝癌的抑制作用。文献报道,通过 CRISPR/Cas9 系统向成年 C57-HBV-Tg 小鼠肝中同时引入 p53 和 Pten 突变,可加速发生肝癌,最早可提前至注射后 4 个月。荷瘤小鼠的血清甲胎蛋白、谷丙转氨酶和 HBsAg 水平显著高于对照质粒组和野生型组<sup>[18]</sup>。HBV 慢性感染的一个治疗难点即为患者肝细胞中 HBV cccDNA 高度稳定并难以清除,使得肝和血清中持续表达病毒相关分子,它是 HBV 体内复制和再复发的根本原因,因此是预防继发恶性肝病的关键靶点<sup>[19]</sup>。Greggi 等<sup>[20]</sup>、Ramanan 等<sup>[21]</sup>在高压尾静脉注射 HBV 1.3 拷贝的质粒所建立的基因组转染小鼠模型中,同时转导可靶向于 HBV 各基因型间保守序列的 24 个向导 sgRNA,结果显示病毒表达与复制及 cccDNA 水平全部被明显抑制,提示

CRISPR/Cas9 可用于体内模型研究病毒复制。但现有数据未提示其在病毒相关肝炎、肝硬化乃至肝癌的三部曲演进过程中的作用,值得长期关注。尽管目前的 CRISPR/Cas9 系统已具有强大的靶向性能,但原始的切割式基因编辑方式可能同时诱导细胞基因组双链断裂从而引发重排和损伤。与传统技术不同,最新发展出的 CRISPR/Cas9 通过联合使用部分失活的 Cas9 内切酶以及 APOBEC 脱氨酶,可精准引发 C-T/G-A 的碱基转换,但同时避免 HBV 整合位点的宿主基因断裂。在充分抑制 HBV 基因组的同时保护细胞中不出现脱靶突变。CRISPR/Cas9 系统可精准靶向病毒基因组的特性,使其成为将来可能彻底治愈慢性 HBV 感染和其他肝病的有效办法<sup>[22]</sup>。作为病毒学领域的热点技术,CRISPR/Cas9 干预病毒的功能效应研究目前主要在体外系统中展开,因此需要纳入更多类型体内模型予以精准评价<sup>[23]</sup>。

与单个基因过表达的 HBV 转基因小鼠相比,AAV/HBV-Tg 小鼠具有易于操作、结果稳定、重现性好的优点。它是在完全免疫小鼠中模拟病毒和宿主互作过程,因此是进一步研究 HBV 介导慢性肝病和肝癌发生的分子机制的有效工具。

## 2 基于异种移植或嵌合的 HBV 肝癌小鼠模型

### 2.1 应用标准化人肝癌细胞系的小鼠模型 (cell line-derived Xenograft, CDX 模型)

目前用于制备人鼠肝嵌合模型的 HBV 阳性的标准化肝癌细胞系有: HCC LM3 细胞、Hep3B 细胞、MHCC97H 细胞、HepG2. 2. 15 细胞、HepAD38 等。为成功制备 CDX 模型,必须满足两个条件:(1)受体小鼠对异种植物具备可容纳性,不会产生免疫排斥或其他严重不良反应;(2)该细胞系在

#### A. HBV 基因表达相关的小鼠肝癌模型

##### A. HBV expression-associated HCC models of mice

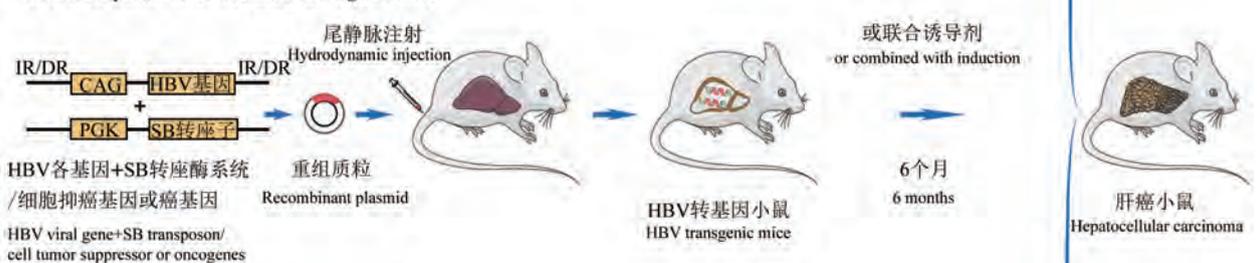
##### a. 显微注射介导的 HBV 转基因小鼠

##### a. Intracytoplasmic injection-mediated HBV transgenic mice



##### b. SB 转座酶介导的 HBV 转基因小鼠

##### b. SB transposon-mediated HBV transgenic mice



##### c. 腺病毒介导的 HBV 基因组转染小鼠

##### c. Adenovirus vectors-associated HBV transfection mice

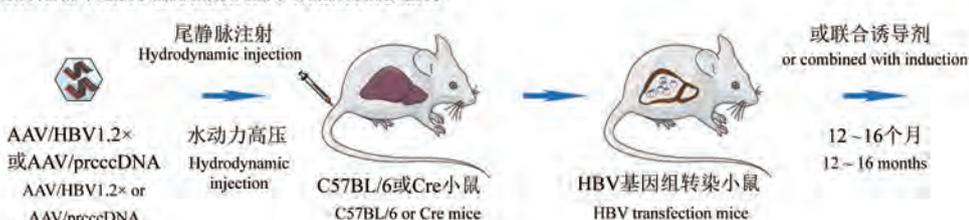


图 1 HBV 病毒基因过表达相关的肝细胞癌小鼠模型

Figure 1 Various HBV-related hepatocellular carcinoma mice model by ectopic viral genes or HBV genome

小鼠中具备可成瘤性。

目前 CDX 模型主要包括皮下移植、腹腔移植和肝内原位移植(图 2)。皮下和腹腔移植模型通常是分别将 HBV 阳性肝癌细胞混悬液注射于小鼠的腹背侧面皮下,或直接至腹腔中。CDX 的肝内原位模型则通常是先构建小鼠皮下肿瘤移植物,然后移植包埋或夹心于小鼠原位肝内<sup>[24]</sup>。最常见和最简单的模型是皮下移植模型,它可以快速获得肿瘤组织,这对于研究肿瘤细胞的药物反应或细胞-病毒互作分子机制较为便利<sup>[25]</sup>,因此,该模型应用最广泛。但是,它不能提供肝癌发生所需要的各种肝细胞、各种成分相互作用的微环境,所以原位模型在阐明疾病发生发展机制中更具有优势。2019 年, Xu 等<sup>[26]</sup>先将 HCCLM3 细胞悬液皮下注射于五只无胸腺裸小鼠中获得肿瘤包块,未发现转移。但是再次将组织块原位接种于小鼠肝左内侧叶的囊下区域时,却观察到 45% 的小鼠出现肝癌骨转移。

在病毒性肝癌的治疗策略研究中,抗病毒药物有效抑制 HBV 阳性肝癌细胞的增殖提示了抗病毒治疗的重要性<sup>[27]</sup>。研究显示替比夫定、恩替卡韦和干扰素- $\alpha$ 2b 等处理可下调肝癌细胞中 HBx 表达并抑制细胞增殖,但在恢复 HBx 蛋白表达后,三种抗病毒药物均失去了抗增殖作用,以上提示 HBx 可能是抗 HBV 药物抑制病毒阳性肝癌细胞增殖的主要靶点。

CDX 模型均具有技术简单、操作时间短、成瘤率高的特点。肝内原位移植模型更容易观察到肿瘤的侵袭和转移,皮下模型操作最为便利,腹腔模型因其引发腹腔器官广泛成瘤现象,现已较少使用。此外,由于培养条件单一,标准化细胞系在长期传代过程中往往会获得一些新的永生化表征,且体外培养条件与肝原发环境的显著差异也使得 CDX 移植物部分丢失原代肝癌细胞的特征。这导致 CDX 异种移植物缺乏临床前患者肝癌组织中典型的细胞多样性和异质性,同时因为小鼠基质细胞的大量浸润,CDX 模型在病理表现上与人类肝癌相似性较低,使得该模型不常用于药物筛选和疗效评估。

## 2.2 患者来源的异种移植物模型 (patient-derived xenograft, PDX 模型)

与 CDX 模型相比,病毒性肝癌 PDX 小鼠 (HBV-HCC PDX) 模型的移植物来自 HBV 阳性的肝细胞癌患者的新鲜肿瘤组织或所分离的原代肝

癌细胞(图 2)。该模型克服了永生化肝癌细胞系在多次传代培养中逐渐丢失肿瘤细胞异质性的缺点,表现出更接近患者组织的临床病毒学和肿瘤细胞学特征。

在该模型中,由于免疫缺陷小鼠的异种移植物在荷瘤传代过程中,其中的人源基质细胞逐渐被小鼠来源所替代,因此仅部分保留了患者原始肿瘤的基因表达模式。但其独特之处是,研究显示胞外基质、细胞黏附分子和免疫通路调节分子等基因的表达在移植物中被下调,而与细胞周期和 DNA 复制相关的基因表达则显著富集。此外,研究者通过此类皮下模型研究建模过程中 HBV 抗原表达和定位等病理变化,分析该模型是否可用于肿瘤病毒学研究<sup>[28]</sup>。结果显示,HBV-HCC PDX 模型从宿主和病毒学两方面模拟了患者来源肝癌组织的特点,尤其是 HBsAg 和 HBeAg 的表达和细胞定位较好重现了其在患者组织中的特点。HBeAg 保留了在原始组织中高水平表达且呈胞质、胞核和全细胞分布的复杂模式,HBsAg 也再现了患者癌组织中无法检出的现象。

但是,另有研究者基于 7 例新加坡 HCC 病例建立的皮下 PDX 模型显示,随着异种移植物在小鼠体内持续传代,HBV 复制逐渐丢失<sup>[29]</sup>。比起皮下模型,肝原位模型更贴合原发肝癌的肿瘤微环境。研究者将来自 HBV-HCC 患者的新鲜肿瘤组织切取为直径 2 mm 大小的组织块并嵌合于无胸腺小鼠的原位肝中,成功制备了原位 PDX 模型并观察到广泛的肿瘤自发转移。免疫组化检测结果同样证实 HBx 蛋白和人甲胎蛋白保持高表达,说明了原位模型对应肿瘤起源的器官保留了必需的微环境,更能观察到肿瘤的远距离广泛转移<sup>[30]</sup>。

PDX 模型基本保留了原始肿瘤的结构和组织学特征,因此对于研究肿瘤基因表达模式、突变状态、转移潜力和药物反应性等个体化精准医学,它更具有临床病理学优势。研发并完善 PDX 模型将加速精准医学的发展,由于具备和人类原始肿瘤组织高度的相似性,使得该模型可以用于预测患者个体化抗癌和抗病毒治疗的效果<sup>[31]</sup>。目前 HCC PDX 模型也已被用于多种药物的临床前药理学测试<sup>[32]</sup>。

该模型存在的缺点为:(1)建模需要大量的患者肿瘤资源和大量资金,且技术要求高、肝原位移植模型死亡率较高;(2)该模型建立在免疫缺陷的小鼠中,仍无法完全模拟肿瘤在人体中的发生发展

过程,对于肝癌免疫疗法和免疫治疗药物研发具有局限性<sup>[33]</sup>。因此,有研究人员通过将人类造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)注入严重免疫缺陷(NOD-scid Il2rg<sup>-/-</sup>, NSG)小鼠中以重建人源免疫系统的模型,并进一步原位移植入 I 型人白细胞抗原匹配的人肝癌组织,由此建立了免疫完全小鼠的人源肝癌 PDX 模型<sup>[34]</sup>。人源免疫小鼠可用于研究肿瘤和免疫应答的变化以及免疫检查点抑制剂的作用,其效应可基本还原临床结果。该模型更适用于探索病毒介导的人类癌症与免疫系统之间的相互作用<sup>[35]</sup>。

### 3 总结

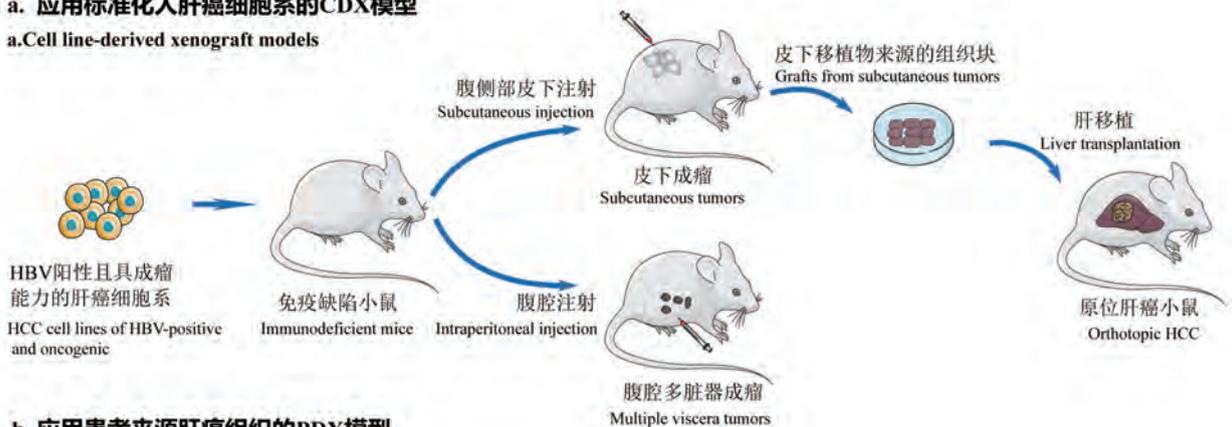
虽然 HBV 病毒相关肝癌的动物模型类别多种多样,在肿瘤病毒学研究领域居于前列,但是目前仍然没有一种动物模型能够成为广泛使用的代表性模型。该领域小鼠模型作为目前最简便和实惠的选择,在实验室中得以普遍使用,但仍存在着一些缺点。转基因小鼠模型仅选择性在小鼠基因组中插入一个或几个病毒基因,不能完全拟合 HBV 正常感染和致病过程中完整病毒各分子间复杂的时空协同作用。此外,全基因转染小鼠中则因为小鼠

#### B. 基于异种移植或嵌合的HBV小鼠肝癌模型

##### B. Xenograft or chimeric-based HBV-HCC models of mice

##### a. 应用标准化人肝癌细胞系的CDX模型

##### a. Cell line-derived xenograft models



##### b. 应用患者来源肝癌组织的PDX模型

##### b. Patient-derived xenograft models

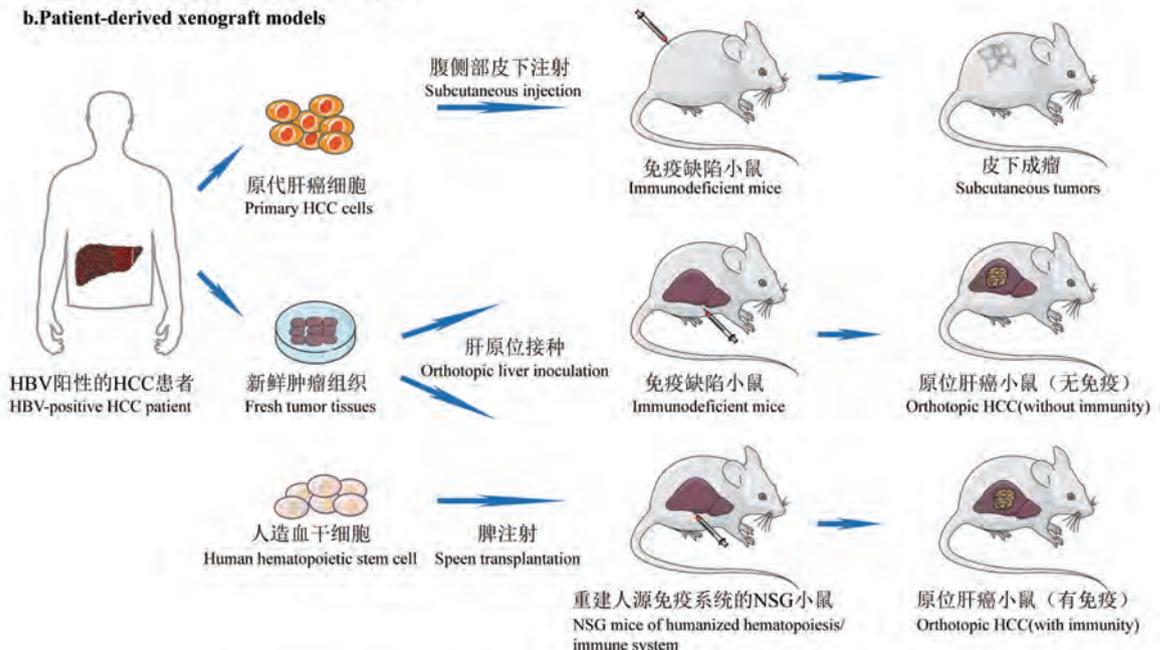


图2 基于异种移植或嵌合的HBV肝细胞癌小鼠模型

Figure 2 Xenograft or chimera-based HBV-related hepatocellular carcinoma mice model

肝细胞不表达 HBV 感染的功能性受体钠离子牛磺胆酸共转运蛋白 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP), 因此缺乏野生型 HBV 的自然感染过程。这两种模型有其优势和特色之处, 但在病毒相关肝癌中的研究还需审慎解释相关数据。传统的人源化小鼠因其缺少免疫系统, 在研究抗病毒和抗肿瘤免疫治疗方面受到极大限制, 限制了目前最前沿的免疫治疗研究。综上, 现有的病毒相关肝癌模式动物模型存在其各自优缺点和适用范围, 需要我们在实际应用中根据具体目的针对性的选择使用。同时, 为了进一步剖析病毒和肿瘤在免疫学方面的互作机制, 需要我们继续研发能够完全还原人类免疫系统的病毒相关肝癌的体内模型。建立可真实反映病毒感染和致病特征的体内模型, 将为研究肿瘤病毒的致病机制提供平台, 具备突出的临床意义和科学价值。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] de Martel C, Georges D, Bray F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2020, 8(2): e180-e190.
- [ 2 ] Vescovo T, Pagni B, Piacentini M, et al. Regulation of autophagy in cells infected with oncogenic human viruses and its impact on cancer development [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 47.
- [ 3 ] Zhao H, Zhu P, Han T, et al. Clinical characteristics analysis of 1180 patients with hepatocellular carcinoma secondary to hepatitis B, hepatitis C and alcoholic liver disease [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(2): e23075.
- [ 4 ] Zhang W, Lu Z, Kong G, et al. Hepatitis B virus X protein accelerates hepatocarcinogenesis with partner survivin through modulating miR-520b and HBXIP [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 128.
- [ 5 ] Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. *Nature*, 1991, 351(6324): 317-320.
- [ 6 ] Ahodant J, Lekbaby B, Bou Nader M, et al. Hepatitis B virus X protein enhances the development of liver fibrosis and the expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transitions and tumor progenitor cells [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(3): 358-367.
- [ 7 ] Singh H, Huls H, Kebraieci P, et al. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clinical-grade T cells to target CD19 [J]. *Immunol Rev*, 2014, 257(1): 181-190.
- [ 8 ] Keng VW, Tschida BR, Bell JB, et al. Largaespada DA. Modeling hepatitis B virus X-induced hepatocellular carcinoma in mice with the Sleeping Beauty transposon system [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 781-790.
- [ 9 ] Kebraieci P, Izsvák Z, Narayanavari SA, et al. Gene therapy with the sleeping beauty transposon system [J]. *Trends Genet*, 2017, 33(11): 852-870.
- [ 10 ] Zhang R, Real CI, Liu C, et al. Hepatic expression of oncogenes Bmi1 and Dkk1 is up-regulated in hepatitis B virus surface antigen-transgenic mice and can be induced by treatment with HBV particles or lipopolysaccharides in vitro [J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(2): 354-363.
- [ 11 ] Song J, Zhang X, Ge Q, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of HBsAg inhibits proliferation and tumorigenicity of HBV-positive hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8419-8431.
- [ 12 ] Zong L, Peng H, Sun C, et al. Breakdown of adaptive immunotolerance induces hepatocellular carcinoma in HBsAg-tg mice [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 221.
- [ 13 ] Hao X, Chen Y, Bai L, et al. HBsAg-specific CD8<sup>+</sup> T cells as an indispensable trigger to induce murine hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 10. 1038/s41423-019-0330-1, Epub ahead of print.
- [ 14 ] Chen Y, Hao X, Sun R, et al. Natural killer cell-derived interferon-gamma promotes hepatocellular carcinoma through the epithelial cell adhesion molecule-epithelial-to-mesenchymal transition axis in hepatitis B virus transgenic mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1735-1750.
- [ 15 ] Allweiss L, Volz T, Giersch K, et al. Proliferation of primary human hepatocytes and prevention of hepatitis B virus reinfection efficiently deplete nuclear cccDNA *in vivo* [J]. *Gut*, 2018, 67(3): 542-552.
- [ 16 ] Huang YH, Fang CC, Tsuneyama K, et al. A murine model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma generated by adeno-associated virus-mediated gene delivery [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39(6): 1511-1519.
- [ 17 ] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 FcγR 基因大片敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.  
Wu X, Huo GT, Liu SS, et al. Establishment of a large fragment FcγR gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 583-591.
- [ 18 ] Liu Y, Qi X, Zeng Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated p53 and Pten dual mutation accelerates hepatocarcinogenesis in adult hepatitis B virus transgenic mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2796.
- [ 19 ] Lin G, Zhang K, Li J. Application of CRISPR/Cas9 technology to HBV [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26077-26086
- [ 20 ] Gregg S, Franchi M, Aletti G, et al. Management of endometrial cancer in Italy: a national survey endorsed by the Italian Society of Gynecologic Oncology [J]. *Int J Surg*, 2014, 12(10): 1038-1044.
- [ 21 ] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10833.

- [22] 朱佩琪, 蒋伟东, 周诺. CRISPR/ Cas9 基因编辑系统的发展及其在医学研究领域的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 116-123.  
Zhu PQ, Jiang WD, Zhou N. CRISPR/ Cas9 system and its application in medical research [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(2): 116-123.
- [23] Yang YC, Chen YH, Kao JH, et al. Permanent inactivation of HBV genomes by CRISPR/Cas9-Mediated non-cleavage base editing[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20: 480-490.
- [24] Zhao GJ, Xu LX, Chu ES, et al. Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47): 7087-7092.
- [25] Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(1): 150-161.
- [26] Xu ZT, Ding H, Fu TT, et al. A nude mouse model of orthotopic liver transplantation of human hepatocellular carcinoma HCCLM3 cell xenografts and the use of imaging to evaluate tumor progression[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8694-8703.
- [27] Zhang S, Gao S, Zhao M, et al. Anti-HBV drugs suppress the growth of HBV-related hepatoma cells via down-regulation of hepatitis B virus X protein [J]. Cancer Lett, 2017, 392: 94-104.
- [28] Liu J, Chen S, Zou Z, et al. Pathological pattern of intrahepatic HBV in HCC is phenocopied by PDX-derived mice: a novel model for antiviral treatment[J]. Transl Oncol, 2019, 12(9): 1138-1146.
- [29] Huynh H, Soo KC, Chow PK, et al. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(14): 4306-4314.
- [30] Cheung PF, Yip CW, Ng LW, et al. Comprehensive characterization of the patient-derived xenograft and the paralleled primary hepatocellular carcinoma cell line [J]. Cancer Cell Int, 2016, 16: 41.
- [31] Ice RJ, Chen M, Sidorov M, et al. Drug responses are conserved across patient-derived xenograft models of melanoma leading to identification of novel drug combination therapies [J]. Br J Cancer, 2020, 122(5): 648-657.
- [32] Gao H, Korn JM, Ferretti S, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response [J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1318-1325.
- [33] Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2012, 9(6): 338-350.
- [34] Zhao Y, Shuen TWH, Toh TB, et al. Development of a new patient-derived xenograft humanised mouse model to study human-specific tumour microenvironment and immunotherapy [J]. Gut, 2018, 67(10): 1845-1854.
- [35] 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

[收稿日期] 2020-05-27

庄子锐,王明亮,张婷,等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 845-852.  
Zhuang ZR, Wang ML, Zhang T, et al. Research progress and evaluation of animal models of hepatorenal fibrosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 845-852.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.016

# 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价

庄子锐<sup>1,2</sup>,王明亮<sup>1,2</sup>,张婷<sup>1,2</sup>,苏鹏亮<sup>1,2</sup>,邵久针<sup>1,2</sup>,  
印鑫<sup>1,2</sup>,彭蕴茹<sup>1,2\*</sup>,沈明勤<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学,南京 210028; 2. 江苏省中西医结合医院,南京 210028)

**【摘要】** 肝、肾纤维化是由持续的肝、肾组织细胞损伤导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积、实质细胞减少的病理过程,肝肾纤维化是慢性肝肾疾病持续进展的必经过程。除了器官移植,早期纤维化阶段现在被认为是治疗整个慢性疾病的关键阶段。目前有很多肝纤维化或肾纤维化的啮齿动物模型以及少量肝肾纤维化的复合模型可供疾病研究和药物筛选。本文对常用的肝、肾纤维化及其复合模型的造模方法与机制进行综述,并比较不同方法间的优势与不足,为日后不断建立和完善更加贴合临床的肝肾纤维化复合动物模型提供参考。

**【关键词】** 肝纤维化;肾纤维化;肝肾纤维化复合模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0845-08

## Research progress and evaluation of animal models of hepatorenal fibrosis

ZHUANG Zirui<sup>1,2</sup>, WANG Mingliang<sup>1,2</sup>, ZHANG Ting<sup>1,2</sup>, SU Pengliang<sup>1,2</sup>,  
SHAO Jiuzhen<sup>1,2</sup>, YIN Xin<sup>1,2</sup>, PENG Yunru<sup>1,2\*</sup>, SHEN Mingqin<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China. 2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028)  
Corresponding author: PENG Yunru. E-mail: pengyunru@126.com; SHEN Mingqin. E-mail: mqshen@163.com

**【Abstract】** Fibrosis of the liver and kidneys is a pathological process in which extracellular matrix (ECM) is overdeposited and parenchyma cells are reduced by continuous damage to liver and kidney cells. Liver and kidney fibrosis is an inevitable process of chronic liver and kidney diseases. Except for organ transplantation, the early stage of fibrosis is now considered the key part of treatment for chronic disease. There are currently many rodent models of liver or kidney fibrosis, but only a few models with combined liver and renal fibrosis are available for research and drug screening. This paper summarizes the modeling method and mechanisms of common liver and kidney fibrosis, and composite models. We also compare the merits and demerits of different method to provide a reference for the future establishment and improvement of more clinically relevant compound animal models of liver and kidney fibrosis.

**【Keywords】** liver fibrosis; kidney fibrosis; liver and kidney fibrosis model

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

纤维化可发于多器官,其实质是慢性损伤长时间超出实质细胞修复能力,导致器官结构破坏、功能减退,最终脏器硬化和衰竭,目前有效疗法只有疾病晚期器官移植<sup>[1]</sup>。而肝、肾作为人体的两大免

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目(81774178,81373888),江苏省研究生实践创新计划资助项目(SJ CX20\_0572)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81774178,81373888), Practice and Innovation Program of Postgraduates in Jiangsu Province(SJ CX20\_0572)。

**【作者简介】** 庄子锐(1995—),女,在读研究生,研究方向:中药药理学研究。Email: 542065186@qq.com

**【通信作者】** 彭蕴茹,女,研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药药理学。Email: pengyunru@126.com;

沈明勤,研究员,硕士研究生导师,研究方向:中药药理学。Email: mqshen@163.com。

\* 共同通信作者

疫和代谢器官,更加容易遭受各种原因的损伤,使得肝肾处于慢性损伤的状态。在亚太地区,每年经由纤维化发展的肝硬化、肾硬化及其并发症成为亚太地区的主要死亡原因之一。因此,慢性肝病和慢性肾病一直都是研究的热点,对慢性肝病和慢性肾病的部分机制、药物筛选也有详尽的研究和说明,但在实际临床中以及在肝、肾纤维化实验模型的建立过程中,肝肾总是在功能和血液动力学方面体现紧密联系。除此之外,由于一些传统中药的肝肾同治功效需要适宜的动物模型来用进行现代科学研究与阐释。因此,近年来逐渐有人尝试建立一种肝肾纤维化的新复合模型以适应当代需求。

作为慢性疾病的早期阶段,早期纤维化阶段被普遍认为具有可逆性,并非不可逆的“疤痕组织”<sup>[2]</sup>。因此,阻断早期肝肾纤维化进程可以成为治疗慢性肝肾疾病新的切入点,使慢性肝肾病在早期阶段就有治愈的可能性。目前针对肝肾纤维化有效的药物非常有限,因此,能成功建立更加贴近临床的疾病模型,成为突破阻断纤维化、逆转肝肾硬化的关键点之一。本文总结了肝纤维化、肾纤维化和肝肾纤维化复合模型常用的建立方法,初步探讨了模型机制、对比了不同方法间的优缺点,旨在为建立更贴近人类临床肝肾纤维化的模型提供参考(见图 1)。

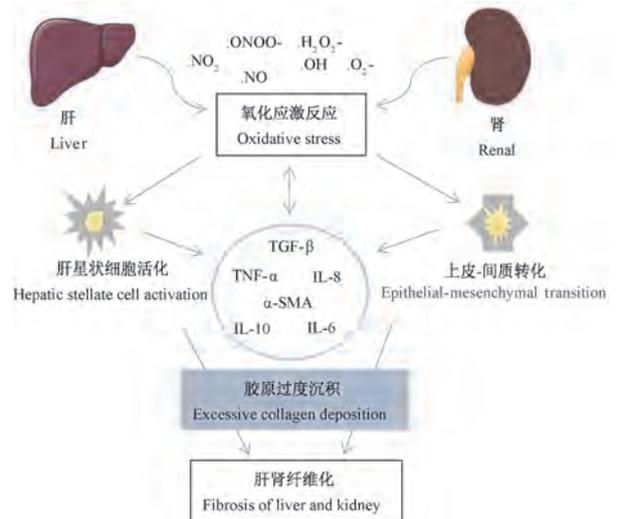
## 1 肝纤维化模型

### 1.1 化学试剂法

多采用四氯化碳、硫代乙酰胺、N-亚硝基化合物等。四氯化碳模型主要以脂肪变性为主,适合于一般肝纤维化的机制和药物研究;硫代乙酰胺在体内与肝细胞化学反应致其坏死,此模型更适用于肝硬化初期阶段的研究;N-亚硝基化合物在机体内更依赖于氧化应激反应造成损伤。

#### 1.1.1 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)

四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)为无色有毒的挥发性液体,具有令人愉快的气味,使用过程中实验人员应注意防止吸入 CCl<sub>4</sub>。因其诱导肝纤维化模型的高复制性、与人类纤维化病理变化的高相似性成为目前应用最为广泛的化学药物。CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化的分子机制现在还尚不完全清楚,但 Dong 等<sup>[3]</sup> 联合利用转录、蛋白质组学分析和生物网络技术,证实 CCl<sub>4</sub> 毒性主要涉及氧化还原、氧化应激反应,途径主要包括视黄醇代谢、花生四烯酸代谢等。



注:损伤反应可使肝、肾分泌炎症因子,活化肝星状细胞、促进肾上皮-间质转化,相反肝星状细胞的活化和上皮-间质的转化又可促进炎症因子的分泌,使损伤持续进行,从而导致细胞外基质过度沉积,脏器纤维化产生。

图 1 肝肾纤维化的形成

Note. The injury reaction can make the liver and kidney secrete inflammatory factors, activate hepatic stellate cells and promote renal epithelial mesenchymal transition. On the contrary, activation of hepatic stellate cells and epithelial mesenchymal transformation can promote the secretion of inflammatory factors, so that the injury continues, resulting in excessive deposition of extracellular matrix and organ fibrosis.

Figure 1 Formation of liver and kidney fibrosis

CCl<sub>4</sub> 通常与玉米油、花生油、橄榄油等按比例混合,通过灌胃、腹腔注射、吸入、皮下注射等方式给药。腹腔注射会造成更高的死亡率,但因建模快、稳定性好、成功率高得到更广泛的应用。一般根据不同实验动物品系,使用不同剂量 CCl<sub>4</sub> 均可在 6~8 周表现出炎症因子浸润、肝脂肪变性和坏死的明显的纤维化阶段特征。雌性啮齿类动物对 CCl<sub>4</sub> 表现出耐受难成模倾向,所以多数选取雄性大鼠进行造模。此模型具有缓慢形成肝纤维化的变化过程,形态学、病理学及血清生化指标的明显变化都具有类似人类肝纤维化的典型特征,适用于肝纤维化形成的动态研究和药物筛选。

#### 1.1.2 硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)

硫代乙酰胺是无色或白色结晶,1948 年被报导具有肝毒性<sup>[4]</sup>,2017 年 WHO 将其纳入 2B 类致癌物。TAA 在体内和体外均可被 CYP 2E1 酶激活,代谢为不稳定的反应物 TASO<sub>2</sub> 与肝大分子共价结合而引发坏死。Bashandy 等<sup>[5]</sup> 人用 TAA 诱导肝纤维

化时,肾同时表现出肾小球缩小、肾小管上皮变性、间质淋巴细胞浸润等损伤。

TAA 可用蒸馏水或生理盐水配制,通过饮用水、腹腔注射等途径给药;饮用水给药可建立比较温和的肝纤维化模型,但饮用水给药会因为个体摄入差异造成剂量偏差,因此常采用腹腔注射,剂量范围 150~250 mL/kg,最常用剂量 200 mg/kg,大概 4~6 周即可成功建立肝纤维化模型<sup>[5-8]</sup>。TAA 相比 CCl<sub>4</sub> 表现出更强肝毒性,造模过程中更高的死亡率要求实验人员扩大啮齿类动物数量,而集中在中央门静脉的病变、与人类肝纤维化血流动力学和代谢改变的相似性使其更适合肝纤维化向肝硬化发展的阶段研究。

### 1.1.3 N-亚硝基化合物

二甲基亚硝酸胺/二乙基亚硝酸胺(dimethylnitrosamine/diethylnitrosamine, DMN/DEN) 均属 N-亚硝基化合物,在 20 世纪 30 年代先后报道具有强致癌性与肝毒性。N-亚硝基化合物在各器官主要依靠细胞色素 P450 代谢激活,转变为更具活性的代谢产物,导致烷基化 DNA 和活性氧产生,从而对器官产生氧化损伤<sup>[9-10]</sup>。虽然 N-亚硝基化合物的主要损伤靶向器官除肝外还有肾,但其对肾的损伤研究较为缺乏,研究主要集中于肝毒性。

以肝萎缩、脾肿大、血小板减少和血清总胆红素水平显著升高为典型特征的 N-亚硝基化合物模型是研究肝纤维化和肝硬化发展相关的生化、病理生理以及分子改变的优秀动物模型。

Dapito 等<sup>[11]</sup>认为将 DEN 与 CCl<sub>4</sub> 合用,会促使肠道产生更多内毒素,可更好的模拟人类肝癌的微环境。Ding 等<sup>[12]</sup>利用 SD 大鼠建立了完整的肝炎-肝纤维化-肝癌模型轴,为不同阶段疾病模型的准确建立提供了参考,此研究显示每周两次注射 DEN (30 mg/kg),8~12 周肝即处在明显肝纤维化阶段。

## 1.2 手术法

肝纤维化手术法是通过手术将胆管暴露并结扎,直接人为造成胆汁淤积,是一种以胆管增生为病变特点的胆汁淤积型肝纤维化模型。

胆管结扎可通过手术在动物体内结扎胆总管,也可在体外对细胞使用抑制剂,造成胆汁阻塞性病变。胆管结扎一定程度上可较好的模拟人类因长期胆汁淤积而引起的肝细胞增殖和凋亡、门静脉纤维化及肝硬化过程,以及伴有常见的胆汁性急性肾损伤并发症<sup>[13-14]</sup>。但手术结扎会阻断所有的胆汁

流通,因此,无法更完全复制人类临床具有一定胆汁通量的原发性硬化性胆管炎和原发性胆源性胆管炎的病理过程。

Ghallab 等<sup>[15]</sup>利用荧光胆汁盐和非胆汁盐有机阴离子的双光子成像技术对胆管结扎的病理机制进行研究,结扎胆总管后,肝内和胆内胆汁酸水平急剧升高损伤细胞。氧化应激和炎症反应在胆管结扎损伤肝中起重要作用<sup>[16]</sup>。Yang 等<sup>[17]</sup>用 SD 大鼠结扎胆总管不同位置进行研究,胆总管上端结扎比胆总管中部结扎可用更小的死亡率诱导更严重的胆汁淤积性肝纤维化。胆管结扎建模周期大概在 2~4 周,在 7 d 左右开始看见病理变化,结扎时间不宜过长,否则啮齿类动物死亡率会大幅度升高以致数据缺失;手术法在所有方法中建模最快,但其病变也近似于急性损伤的变化,而纤维化是一种慢性疾病的过程,因此胆管结扎可能对于慢性疾病模型来说不够典型。

## 1.3 免疫诱导法

免疫反应本是机体免疫系统对抗外侵的正常反应,但大量免疫细胞和蛋白的堆积又会损伤正常组织细胞。免疫诱导法正是利用此原理在啮齿类动物体内模拟人类的免疫性纤维化病变,因此,免疫诱导应用的前提是作为模型的动物源要具有正常免疫系统。

### 1.3.1 刀豆蛋白(concanavalin A, Con A)

刀豆蛋白是从植物中提取的凝集素,具有强烈的促有丝分裂和促淋巴转化反应作用,是重要的生化和免疫研究试剂。Con A 诱导的免疫性肝炎模型可用于人类免疫性肝炎、急性病毒性肝炎等疾病或药物筛选的研究。Con A 的肝毒性依赖于激活体内 T 淋巴细胞和巨噬细胞,和内皮细胞表面糖蛋白结合,激活自身免疫系统分泌 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 等炎症因子,从而损伤肝细胞。因此,造模时不能选用免疫缺陷无 T 细胞应答的啮齿类动物<sup>[18-19]</sup>。

本方法建模采用小鼠居多,造模周期约 4~8 周。造模时 Con A 可用生理盐水或 PBS 配制,通过尾静脉或腹腔注射给药,关于剂量 Heymann 等<sup>[20]</sup>建议具有更多 Th1 亚系的 T 细胞免疫反应的啮齿类动物,例如 C57BL/6、C3H 小鼠对刀豆蛋白更加敏感,只需要 15~20 mg/kg 体重;而具有更多 Th2 亚系的免疫应答啮齿类动物,例如 BALB/c 品系的近交或杂交 NMRI 小鼠对刀豆蛋白不敏感则至少需要 30 mg/kg 体重的量。

### 1.3.2 猪/牛血清蛋白

血清蛋白是凭借引起自身过激免疫反应产生全身性的损伤,因此本模型更适用于免疫性纤维化病理学研究,但本模型存在自愈的问题。其所致免疫性肝纤维化模型是研究细胞水平上纤维化隔膜形成的模型,以及肝纤维化后的结构变化,例如毛细血管瘤化和静脉化;但目前未见血清蛋白诱导肝肾纤维化复合模型的诱导研究。

猪/牛血清蛋白无法在免疫缺陷或免疫耐受啮齿类动物中诱导肝纤维化,因其免疫性损伤依赖于一定周期的激活巨噬细胞、Kupffer 细胞,释放炎症因子,进而激活星状细胞和成纤维细胞纤维化<sup>[21]</sup>。用猪血清蛋白诱导的免疫性纤维化程度与血清蛋白剂量并无依赖关系,只会随时间不同呈现不同病理变化<sup>[22]</sup>。You 等<sup>[23]</sup>用牛血清蛋白(BSA)致 SD 大鼠肝小叶结构严重受损,炎性细胞浸润,广泛的纤维组织增生,纤维组织通过中央小叶增生并扩展为肝实质。

## 2 肾纤维化模型

### 2.1 化学试剂法

重金属化合物、腺嘌呤和手术法在国内建立慢性肾病模型的应用属最为广泛。建立肾纤维化模型的几种化学物质相较肝纤维化模型的几种物质,明显缺少对肾损伤的高度靶向性,且研究多集中于肾的急性损伤研究。

#### 2.1.1 氯化汞(mercury dichloride, HgCl<sub>2</sub>)

重金属汞是主要以金属汞、无机汞、有机汞三种形式普遍存在于自然环境中的污染物,对环境和人体有极大的伤害。肾是受无机汞毒性影响的主要器官之一,因为无机汞更容易在肾中累计,使肾成为受伤最严重的器官。

Zalups<sup>[24]</sup>发现 HgCl<sub>2</sub> 静脉注射 0.5 μmol/kg 或 2.0 μmol/kg 后 3 h,超过总剂量 55% 的 Hg<sup>2+</sup> 都集中在肾近段小管上皮细胞中。HgCl<sub>2</sub> 可诱导 T 细胞死亡和破坏细胞中线粒体膜,当线粒体电子传输链功能受损会产生过量活性氧自由基(ROS),氧化应激反应可激活细胞死亡程序。HgCl<sub>2</sub> 造模时多选取大鼠进行实验,原因是小鼠对 HgCl<sub>2</sub> 显示出一定的耐药性,难成模。本方法可通过皮下注射、静脉注射、灌胃等途径给药。造模中 HgCl<sub>2</sub> 剂量非常关键,过小难成模,剂量稍大啮齿类动物容易大批死亡,因此,预实验时,对于大鼠的剂量,应多进行尝试或采

取梯度给药。在国内多采用每日 8 mg/kg HgCl<sub>2</sub> 水溶液灌胃给药,8 周左右即可建立肾小管间质纤维化模型<sup>[25]</sup>。

#### 2.1.2 腺嘌呤

腺嘌呤可在体内代谢为 2,8-二羟基腺嘌呤(DHA),DHA 在肾小管积累,形成晶体(结石)堵塞肾小管造成肾损伤,虽然 DHA 的致病机理还尚未完全清楚,但已知 TGF-β 在其中起到重要作用<sup>[26]</sup>。

用腺嘌呤诱导的慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)模型会增加增加尿酸的排泄,形成蛋白尿,游离氨基酸减少,肾外表颗粒化且伴有肾纤维化,同时还会出现心血管系统的结构和功能损伤,无论是缓慢变化的慢性肾病还是并发症均与临床人类 CKD 表现高度一致。

腺嘌呤诱导肾纤维化多采用大鼠进行含有 0.75% 腺嘌呤的饲料喂食,可引起肾迅速且严重的变化,伴随肾小管损伤、肾小球、肾间质纤维化及炎症。但 Tamura 等<sup>[26]</sup>和 Imamura 等<sup>[27]</sup>仅用含有 0.2% 和 0.25% 腺嘌呤饲料喂食 C57BL/6 小鼠,也成功诱导肾纤维化,可能说明小鼠比大鼠对腺嘌呤更敏感。

#### 2.1.3 硝酸铀酰(uranyl nitrate)

硝酸铀酰目前在国外诱导急性肾损伤模型应用较多,其急性肾毒性和急性肾衰竭的病理机制有很多深入的研究和详细的描述。向啮齿类动物注射硝酸铀酰之后,50% 的铀化合物通过肾排出,铀化合物在肾中又集中在肾皮质部分,在其他器官分布的数量微不足道,具有较好的肾靶向性<sup>[28]</sup>。硝酸铀酰可使啮齿类动物尿量和肾小球过滤率减少,近端肾小管萎缩;其慢性肾毒性多与重金属汞、锌等对肾损伤的机理类似,硝酸铀酰同样可以破坏线粒体电子传输链功能,产生的氧化应激反应损伤肾<sup>[29]</sup>。

在国内不仅对硝酸铀酰的慢性肾毒性研究不多,应用都非常少,但基于硝酸铀酰对肾的靶向性,我们应尝试扩大对硝酸铀酰的慢性肾毒性研究,也许可以建立良好的慢性肾纤维化模型。在为数不多的硝酸铀酰诱导纤维化模型文章中,多采用雌性啮齿类动物,硝酸铀酰的给药方式和剂量都比较统一,多采用单次腹腔注射 5 mg 硝酸铀酰/kg 体重,大约 8~10 周即可见肾间质纤维化。

### 2.2 手术法

对肾纤维化的研究中更多会采取手术法建立

模型,一般手术法有单侧输尿管结扎、5/6 肾切除手术和缺血再灌注法;其中结扎单侧输尿管最经典,应用也是最为广泛,而缺血再灌注法则因其临床实际应用的高度需求性同样被研究的较多。5/6 肾切除法虽然也能快速建立肾的损伤,但因其需要切除大部分肾,对机体产生过大的损伤且并不是很符合临床需求的研究。

### 2.2.1 单侧输尿管结扎(unilateral ureteral ligation, UUO)

本方法适用于大鼠和小鼠,输尿管结扎后阻碍尿液正常排泄,短时间便可造成尿潴留,肾肿大,肾小管细胞坏死,肾组织结构完全被破坏从而导致肾功能不全。此模型已经成为了研究尿路梗阻肾小管间质纤维化原因和机制的标准模型。但 UUO 模型同样存在慢性病变特点不够典型的问题,并且伴随结扎时间延长,啮齿类动物死亡率会加速提升。此模型病变只发生在结扎输尿管一侧,对侧肾功能依旧正常。

单侧输尿管结扎后,从第 3 天起有髓质和皮质减少的病理变化,且有少量纤维化出现,随时间推移,结扎 7 d 后血清肌酐和尿素氮成倍增长,单核巨噬细胞浸润,间质水肿,部分近端小管上皮空泡变性<sup>[30]</sup>,两周后即可形成以小管细胞坏死和萎缩、炎症细胞渗透、细胞外基质和 I 型胶原蛋白大量沉积为特点的严重的结构破坏<sup>[31]</sup>。刘克剑等<sup>[32]</sup>等发现从侧腹开口结扎单侧输尿管两端后,不离断输尿管,可保证不影响造模效果的同时大幅提升啮齿类动物的存活率。

### 2.2.2 缺血再灌注

在临床的外科手术、器官移植、烧伤等过程均可出现缺血再灌注损伤,然而短暂缺血并不足以引起器官细胞损伤,反而缺血后的血液再灌注可造成微血管和实质细胞更严重的损伤。因此缺血再灌注模型具有高度应用局限性,基本全部用于缺血再灌注引起肾损伤的相关研究。

缺血再灌注引起的肾损伤主要与活性氧自由基和  $\text{Ca}^{2+}$  超载有关,在缺血组织中清除自由基的酶类合成能力受损,并且缺血再灌注可以直接损伤肾小球内毛细血管内皮细胞,引起炎症级联反应。因此,抑制 TLR4 通路和增强清除自由基能力可减少缺血再灌注造成的损伤<sup>[33]</sup>。张蕊<sup>[34]</sup>利用动态对比增强 MRI 监测大鼠缺血再灌注后的肾损伤,发现当大鼠肾缺血 30~45 min 时可在保证大鼠存活率的条

件下对肾造成不可逆转的伤害。

## 3 肝肾纤维化复合模型

作为人体两大免疫器官,肝肾总是有千丝万缕的联系,不仅临床上的肝肾综合征、乙肝相关性肾病、胆汁性肾病等,中医的肾病从肝论治,肝病从肾论治等均体现着肝肾协作、互滋的能力;此外,为了深入研究一些传统中药对肝肾的异病同治功效,开始尝试建立肝肾纤维化复合模型。基于以往建立肝纤维化和肾纤维化模型的经验之上,几乎所有肝损伤药物和手术法都具有高度肝靶向性的同时可轻损肾,而致肾损伤的化学药物往往肾靶向性较低,因此在建立肝肾纤维化复合模型时多采用肝靶向性损伤药物结合肾损伤药物或直接采用能造成全身损伤的化学试剂、药物。

### 3.1 四氯化碳和牛血清

Manoj<sup>[35]</sup>联合四氯化碳和牛血清蛋白腹腔注射。在本研究中,四氯化碳主要造成肝损伤,牛血清蛋白主要通过免疫复合物形成蛋白尿造成肾损伤;10 周后肝病理切片可见明显的纤维化,肾仅见结缔组织增生和炎症细胞浸润。

四氯化碳具有较高肝靶向性的同时对肾也有损伤,牛血清蛋白作为免疫性损伤药物配合四氯化碳,使肝肾损伤程度均大致处于纤维化阶段,但本试验最终并未显示严重的肾纤维化结果;反而发现牛血清蛋白对四氯化碳的肝损伤有拮抗作用,为日后造模方法提供了新发现。

### 3.2 DMN 和汞

姜哲浩等<sup>[36]</sup>在研究扶正化瘀方对大鼠肝肾纤维化的影响时采用了腹腔注射 DMN 和喂食含有重金属汞的饲料建立肝肾纤维化复合模型。8 周之后,肝组织坏死、肝细胞肿胀、大量炎症细胞浸润、假小叶形成;肾间质水肿伴炎细胞浸润、肾间质中大量胶原纤维。汞在诱导肾纤维化单独使用时,剂量难以控制,但配合对肝肾都有损伤的 DMN 使用大大提高了成功诱导肝肾纤维化的几率。

### 3.3 酪氨酸氧化产物

酪氨酸是常见的食品添加剂和药原料,容易被氧化修饰<sup>[37]</sup>;因此在售卖的牛奶、奶粉、动物饲料中等均可检测到酪氨酸及其氧化产物的存在。因此,酪氨酸及其氧化产物对人体的影响成为了研究热点。李竹青<sup>[38]</sup>发现短期 28 d 喂食酪氨酸氧化产物可对肝肾均产生损伤,随喂食时间增长,会引起肝

肾炎症因子大量分泌,产生氧化应激反应,紧接着激活肝星状细胞与内质网应激反应,促进肾小球内皮细胞-间质转化反应,引起肝肾纤维化。

### 3.4 环孢菌素 A (cyclosporine, CsA)

从 20 世纪 80 年代 CsA 作为免疫抑制剂应用于临床,主要用于器官移植手术后的排异反应,但由于较严重的肝、肾毒性副作用,使其应用受限。短期注射 CsA 可使肾血流减少,长期注射会导致具有广泛的肾小管纤维化的肾衰竭。CsA 的急性肾毒性与激活肾素-血管紧张素系统有关,慢性肾毒性是因为可触发机体分泌 TGF- $\beta$ ,大量的 TGF- $\beta$  是触发上皮间质转化的关键因素。CsA 可破坏肾近端管状细胞的形态、连接结构、细胞骨架,并且在上皮-间质转化后,成肌纤维细胞可以自由迁移到间质中,并释放大量的细胞外基质 (ECM),促进纤维化发展<sup>[30-40]</sup>。程根阳<sup>[41]</sup>先建立低盐饮食 (low salt diet, LSD) 喂养,然后每日皮下注射 CsA,14 d 后即显示肝肾功能受损、炎症细胞浸润,35 d 试验结束时,间质炎性细胞浸润减少,纤维化程度明显。

## 4 总结与展望

### 4.1 总结

现有建立肝、肾纤维化模型的方法在建模难易程度、临床相似性、重复程度都各有千秋。化学诱导法建模耗时较长,但比较符合慢性疾病病变过程,个别毒性化学物质,如氯化汞、DMN 等由于安全管控原因难以购买,因此模型出现空缺,亟待开发新的模型;手术法虽然建模过程耗时短,但对于慢性疾病的慢性病变过程来讲不够典型,同时术后感染、啮齿类动物撕咬造成刀口撕裂、结扎时间过长等使死亡率升高;免疫法虽能引起全身性的炎症,但却存在停药后可自愈的问题,这并不利于肝肾纤维化的治疗药物筛选。

现有造模方法基本可以实现从不同发病原因来模拟人类临床中出现的肝、肾纤维化的一些病理变化,可以适用于不同科研目的。相对来讲肝肾纤维化复合模型现在处于较空白的阶段,由于胆管结扎、注射硫代乙酰胺等方法能同时引起肝肾的损伤,是对肝肾同时的直接毒性还是基于肝肾功能交互的损伤,对其潜在机制及诱导复合模型的潜力还有待深入研究。近年仅有两篇报道称酪氨酸氧化产物和环孢菌素 A 均可同时引起肝肾纤维化,但在大鼠体内引起的病理变化及模型特点还需进行大

量且深入的研究;而能够引起全身性损伤的阿霉素和免疫性血清可能成为诱导肝肾纤维化复合模型的潜力物质;同时也可以尝试分别选取建立肝纤维化和肾纤维化模型的经典方法,结合使用建立肝肾纤维化复合模型,例如经典四氯化碳模型、硫代乙酰胺模型结合单侧输尿管结扎法等。

### 4.2 展望

人类慢性肝病和慢性肾病作为全球健康问题,其药物研究日益迫切。而实验性动物模型不仅可以从群体数量上满足疾病实验和药物筛选实验的要求,还可以在实验中各个环节实现条件控制,可以人为的剔除一些干扰因素,从而实现对发病机制、疾病进程、药物筛选等进行深入的研究。但现有的肝、肾纤维化动物模型依旧存在问题:(1)对动物模型本身的发病机制尚未完全清楚;(2)肝肾纤维化动物模型大多在大、小鼠身上建立,模型的动物种类较少;(3)无法完全模拟人类肝、肾纤维化进展所引起的所有变化;(4)造模过程中死亡的啮齿类动物无法确认死因,且可能会在啮齿类动物体内引发并发症或其他变化我们也无法详尽得知;(5)造模过程至今并未有统一化的规范操作标准,会因为啮齿类动物品种、实验人员操作、药品配置等方面造成成模差异。

因此,对现有建模方法继续优化以及对所有动物模型进行发病机制的探讨,都将是日后重点研究的领域。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Luo M, Peng H, Chen P, et al. The immunomodulatory role of interleukin-35 in fibrotic diseases[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2019, 15(4): 431-439.
- [2] Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2): 305-317.
- [3] Dong S, Chen QL, Song YN, et al. Mechanisms of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(4): 561-572.
- [4] Fitzhugh OG, Nelson AA. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide[J]. *Science*, 1948, 108(2814): 626-628.
- [5] Bashandy SA, Alaamer A, Moussa SA, et al. Role of zinc oxide nanoparticles in alleviating hepatic fibrosis and nephrotoxicity induced by thioacetamide in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 96(4): 337-344.
- [6] Said E, Said SA, Gameil NM, et al. Modulation of thioacetamide-induced liver fibrosis/cirrhosis by sildenafil treatment[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2013, 91(12): 1055-1063.

- [ 7 ] Algardaby MM, Breikaa RM, Eid BG, et al. Icarin protects against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats: implication of anti-angiogenic and anti-autophagic properties [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(4): 616-624.
- [ 8 ] Salguero PR, Roderfeld M, Hemmann S, et al. Activation of hepatic stellate cells is associated with cytokine expression in thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice [J]. *Lab Invest*, 2008, 88(11): 1192-1203.
- [ 9 ] Sheweita SA, Mousa N, Al-Masry HM. N-Nitrosodimethylamine changes the expression of glutathione S-transferase in the liver of male mice: the role of antioxidants [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008, 22(6): 389-395.
- [ 10 ] Sheweita SA, El Banna YY, Balbaa M, et al. N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(9): 2212-2220.
- [ 11 ] Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 504-516.
- [ 12 ] Ding YF, Wu ZH, Wei YJ, et al. Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(5): 821-834.
- [ 13 ] Krones E, Eller K, Pollheimer MJ, et al. NorUrsodeoxycholic acid ameliorates cholemic nephropathy in bile duct ligated mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 110-119.
- [ 14 ] Fahmy SR, Mohamed AS. Holoturia arenicola extract modulates bile duct ligation-induced oxidative stress in rat kidney [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 1649-1657.
- [ 15 ] Ghallab A, Hofmann U, Sezgin S, et al. Bile microinfarcts in cholestasis are initiated by rupture of the apical hepatocyte membrane and cause shunting of bile to sinusoidal blood published correction appears in arch toxicol [J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 666-683.
- [ 16 ] Zhao S, Li N, Zhen Y, et al. Protective effect of gastrodin on bile duct ligation-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 86: 202-207.
- [ 17 ] Yang Y, Chen B, Chen Y, et al. A comparison of two common bile duct ligation methods to establish hepatopulmonary syndrome animal models [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1): 71-79.
- [ 18 ] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 196-203.
- [ 19 ] Kimura K, Ando K, Ohnishi H, et al. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A [J]. *Int Immunol*, 1999, 11(9): 1491-1500.
- [ 20 ] Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice [J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1): 12-20.
- [ 21 ] Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum [J]. *Hepatology*, 1996, 23(4): 811-817.
- [ 22 ] Shiga A, Shiota K, Ikeda T, et al. Morphological and immunohistochemical studies on porcine serum-induced rat liver fibrosis [J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(3): 159-167.
- [ 23 ] You SP, Zhao J, Ma L, et al. Preventive effects of phenylethanol glycosides from *Cistanche tubulosa* on bovine serum albumin-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Daru*, 2015, 23: 52.
- [ 24 ] Zalups RK. Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride [J]. *Toxicology*, 1993, 79(3): 215-228.
- [ 25 ] Wang QL, Yuan JL, Tao YY, et al. Fuzheng Huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 631-640.
- [ 26 ] Tamura M, Aizawa R, Hori M, et al. Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131(4): 483-490.
- [ 27 ] Imamura M, Moon JS, Chung KP, et al. RIPK3 promotes kidney fibrosis via AKT-dependent ATP citrate lyase [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(3): e94979.
- [ 28 ] Appenroth D, Lupp A, Kriegsmann J, et al. Temporary warm ischaemia, 5/6 nephrectomy and single uranyl nitrate administration-comparison of three models intended to cause renal fibrosis in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2001, 53(4): 316-324.
- [ 29 ] Fleck C, Scholle T, Schwertfeger M, et al. Determination of renal porphyrin handling in rats suffering from different kinds of chronic renal failure (CRF): uranyl nitrate (UN) induced fibrosis or 5/6-nephrectomy (5/6NX) [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2003, 54(5-6): 393-399.
- [ 30 ] Roberts V, Lu B, Chia J, et al. CD39 overexpression does not attenuate renal fibrosis in the unilateral ureteric obstructive model of chronic kidney disease [J]. *Purinergic Signal*, 2016, 12(4): 1-8.
- [ 31 ] Bai Y, Wang W, Yin P, et al. Ruxolitinib alleviates renal interstitial fibrosis in UUO mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(2): 194-203.
- [ 32 ] 刘克剑, 张悦, 李靖, 等. 单侧输尿管梗阻法制作大鼠肾间质纤维化模型的改进 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(6): 410-412, 487.
- Liu KJ, Zhang Y, Li J, et al. Improvement of rat renal interstitial fibrosis model by unilateral ureteral obstruction [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2007, 15(6): 410-412, 487.
- [ 33 ] 李渭敏, 仲吉英, 陈奕豪, 等. 蛋白激酶 B 介导的 APPL1 在肾缺血再灌注损伤致肾脏慢性纤维化的机制研究 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(10): 772-777.
- Li WM, Zhong JY, Chen YH, et al. Study on the mechanism of protein kinase B-mediated APPL1 in chronic renal fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Clin Nephrol*, 2019, 19(10): 772-777.
- [ 34 ] 张蕊. 利用动态对比增强 MRI 和 Baumann-Rudin 模型评估大鼠急性肾缺血再灌注损伤后肾功能改变 [D]. 天津: 天津医

- 科大学, 2016.
- Zhang R. Dynamic contrast-enhanced MRI and Baumann Rudin model were used to evaluate the renal function changes after acute renal ischemia-reperfusion injury in rats [D]. Tianjin; Tianjin Medical University, 2016.
- [35] 马罗奇 (Manoj Hang Limbu). 大鼠肝肾纤维化复合动物模型的建立及机制初探[D]. 南京:东南大学, 2017.
- Ma LQ. Establishment and mechanism of a compound animal model of liver and kidney fibrosis in rats[D]. Nanjing; Southeast University, 2017.
- [36] 姜哲浩, 刘成海, 袁继丽, 等. 扶正化痰方对大鼠肝脏与肾脏并存纤维化的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(7): 506-508.
- Jiang ZH, Liu CH, Yuan JL, et al. Effect of Fuzheng Huayu Recipe on fibrosis of liver and kidney in rats[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2007, 13(7): 506-508.
- [37] Houée LC, Bobrowski K, Horakova L, et al. Exploring oxidative modifications of tyrosine; an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences[J]. Free Radic Res, 2015, 49(4): 347-373.
- [38] 李竹青. 酪氨酸氧化产物对大鼠肝肾氧化应激与纤维化损伤机制的研究[D]. 无锡:江南大学, 2017.
- Li ZQ. Effects of tyrosine oxidation products on oxidative stress and fibrosis of liver and kidney in rats [D]. Wuxi; Jiangnan University, 2017.
- [39] Slattery C, Campbell E, McMorro T, et al. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial-mesenchymal transition[J]. Am J Pathol, 2005, 167(2): 395-407.
- [40] Shin DH, Park HM, Jung KA, et al. The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(8): 1051-1063.
- [41] 程根阳. 罗格列酮防治环孢素 A 所致大鼠肝肾毒性的分子机制研究[D]. 郑州:郑州大学, 2010.
- Cheng GY. Molecular mechanism of rosiglitazone on cyclosporine A-induced hepatorenal toxicity in rats [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010.

[收稿日期] 2019-05-10

## 勘误声明

本刊对下述论文进行勘误:

出版信息	2020 年 28 卷 5 期, 页码为 583-592
论文标题	压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征
稿次	<input type="checkbox"/> 录用定稿 <input type="checkbox"/> 排版定稿 <input type="checkbox"/> 整期定稿 <input checked="" type="checkbox"/> 印刷版 <input type="checkbox"/> 其它
作者	谭伟江, 李想, 郑双, 马俊峰, 任学聪, 贺天真, 陈虹华, 陈建新, 杨丰华
DOI	10. 3969 /j.issn.1005-4847. 2020. 05. 001
勘误内容	<p>文章引用处 原为: 谭伟江, 李想, 郑双, 等. 压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 583 - 591.</p> <p>Tan WJ, Li X, Zheng S, et al. Structural and functional pathological characteristics of pressure-overload induced heart failure mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 583 - 591.</p> <p>更改为: 谭伟江, 李想, 郑双, 等. 压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 583 - 592.</p> <p>Tan WJ, Li X, Zheng S, et al. Structural and functional pathological characteristics of pressure-overload induced heart failure mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 583 - 592.</p>
其他说明	

特此告知并诚挚地向读者致歉。

《中国实验动物学报》编辑部  
日期: 2020 年 11 月 12 日

王泽静,王询,肖康,等. 微型CT在血管钙化动物模型中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 853-856.

Wang ZJ, Wang X, Xiao K, et al. Advances in the application of micro-CT in animal models of vascular calcification [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 853-856.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.017

# 微型CT在血管钙化动物模型中的应用进展

王泽静<sup>1</sup>, 王询<sup>2</sup>, 肖康<sup>1</sup>, 张晶<sup>2\*</sup>

(1. 河北省秦皇岛市第一医院CT室, 河北 秦皇岛 066000; 2. 河北省秦皇岛市第一医院 心内科, 河北 秦皇岛 066000)

**【摘要】** 血管钙化是钙盐过度沉积于血管壁导致的异位钙化现象, 是动脉粥样硬化的病理表现, 是糖尿病、高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、肾功能衰竭等多种疾病的共有的病理生理过程。目前的CT技术可以完整的重建钙化的动脉并提供准确的量化信息。高分辨率的微型CT可以区分和量化宏观和微观的血管钙化。将CT与<sup>18</sup>F-NaF micro-PET/CT相结合, 可以增强体内活动的微钙化的检测, 并帮助我们了解不同信号通路和药物在血管钙化发展中的作用。更重要的是3D微型CT可以和组织病理学、免疫组化、蛋白组学处理相结合, 提供同一血管片段的互补信息。微型CT的技术进步可以为血管钙化的动物活体研究提供更多的方法。

**【关键词】** 血管钙化; 微型CT; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0853-04

## Advances in the application of micro-CT in animal models of vascular calcification

WANG Zejing<sup>1</sup>, WANG Xun<sup>2</sup>, XIAO Kang<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2\*</sup>

(1. Department of CT Room, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China.

2. Department of Cardiology, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000)

Corresponding author: ZHANG Jing. E-mail: zhangjing8162@126.com

**【Abstract】** Vascular calcification is an ectopic calcification phenomenon caused by excessive deposition of calcium salts in the vascular wall. This pathological manifestation is common in diseases such as atherosclerosis, diabetes, hypertension, and chronic renal insufficiency; it is an important risk factor for cardiovascular and cerebrovascular diseases. Current computed tomography (CT) techniques can completely reconstruct calcified arteries and provide accurate quantitative information. High resolution micro-CT can distinguish and quantify areas of macroscopic and microscopic vascular calcification. CT combined with <sup>18</sup>F-sodium fluoride (<sup>18</sup>F-NaF) micro-PET/CT can enhance the detection of microcalcification in vivo and aid in understanding the roles of signaling pathways and drugs in the development of vascular calcification. Furthermore, three-dimensional micro-CT can be combined with histopathological, immunohistochemical, and proteomic analysis method to provide complementary information regarding a single vascular segment. Advances in micro-CT techniques may provide additional method for the analysis of vascular calcification in animals *in vivo*.

**【Keywords】** vascular calcification; micro-CT; Animal model

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金课题(30871086), 秦皇岛市科技计划(201602A239), 秦皇岛市科学技术研究与发展计划(201902A180)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(30871086), Science and Technology Planning of QinHuangDao(201602A239), Science and Technology Research and Development Program of QinHuangDao(201902A180)。

**【作者简介】** 王泽静(1982—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 心脑血管病变的影像学。Email: 876053997@qq.com

**【通信作者】** 张晶(1978—), 男, 博士研究生, 硕士生导师, 研究方向: 血管介入影像学、心身医学、心力衰竭的研究和临床工作。

Email: zhangjing8162@126.com

血管钙化是钙盐过度沉积于血管壁导致的异位钙化现象,是动脉粥样硬化的病理表现,是糖尿病、高血压病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、肾功能衰竭等多种疾病的共有的病理生理过程<sup>[1]</sup>。CT 作为动物模型中血管钙化分析的一种工具,能够非破坏性的在三维创建目标血管并定位和量化其钙化程度,在动脉粥样硬化病理生理研究中有重要地位。对微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用进展进行综述。

## 1 研究动脉钙化的常用小动物模型

由于小鼠和人类有许多共同的生理特征,小鼠可以为研究人类动脉钙化、畸形和主动脉瓣钙化的发病机制提供合适的模型。研究动脉中膜钙化常用慢性肾脏病的啮齿类动物模型。常见的慢性肾脏病的啮齿动物模型制做方法有:维生素 D3 超负荷、腺嘌呤注射和 5/6 肾切除术<sup>[2]</sup>。在这些模型中观察到的钙化通常是局灶性分布的,本质上是“片状”<sup>[3]</sup>,这与在慢性肾病患者中观察到的钙化模式相似<sup>[4]</sup>。研究动脉内膜钙化常用载脂蛋白 E 基因(ApoE)敲除和低密度脂蛋白受体基因(LDLR)敲除的小鼠,在这类模型中可检测到微钙化和大钙化<sup>[5]</sup>,这与人类血管的内膜钙化情况一样。

## 2 研究动脉钙化的传统方法

### 2.1 化学分析的方法

常用的方法是动脉烤干称重,放入盐酸中溶解,取上清液测钙含量,检测吸光度值,计算出钙含量。然而,使用这种方法酸性溶液将组织完全溶解破坏,并且测算到的钙化不能区分是真正的组织钙化还是仅仅含钙超量。更重要的是这种方法无法对钙化进行血管定位和分布情况的分析。

### 2.2 组织学方法

常用的组织病理学钙化染色技术包括:茜素红 S(Alizarin red S)钙染色法和冯·科萨(Von kossa)染色法。二者的原理不同:茜素红 S 钙染色法:通过螯合技术,使钙离子和茜素红 S 产生复合物,来分析固定处理的细胞样本中橘红色钙沉积。冯·科萨染色(Von kossa)利用钙盐中的磷酸根或碳酸根与硝酸银溶液与反应生成相应的磷酸银或碳酸银,后者可在紫外线条件下还原为黑色的金属银。两种方法各有利弊,茜素红 S 和钙离子复合物中,钙质容易从组织中溶解到溶液中,形成弥散物,相对不稳定。

而冯·科萨染色不直接检测钙离子,而是检测与钙离子结合的磷酸根或碳酸根,但是,磷酸根和碳酸根的存在并不意味着钙离子一定存在,所以冯·科萨染色的特异性不强。

## 3 微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用

### 3.1 微型 CT 的分类

临床工作中,血管钙化的检测几乎完全依赖 CT,目前螺旋 CT 的分辨率可以达到毫米级别,冠状动脉钙化积分是评估冠状动脉粥样硬化的进展的方法之一,但是临床 CT 的分辨率不足以用来观察小鼠这一类动物模型的血管钙化情况。因此,分辨率可达微米的高分辨微型 CT(Micro-CT)应运而生。按组装模式分类,微型 CT 系统分为两种<sup>[6]</sup>:(1)标本旋转型 CT:X 线球管和探测器固定:样品在球管和探测器之间旋转,可做上下和前后移动。空间分辨率高,但扫描速度较慢,射线剂量大,多用于离体标本扫描。(2)X 线成像系统旋转型 CT:原理和螺旋 CT 一致,X 线球管和探测器运动,球管绕样品旋转。扫描速度快,射线剂量小,但空间分辨率较低,多用于活体动物扫描。

### 3.2 微型 CT 与普通 CT 的区别

与普通 CT 成像原理相同,用 X 线束对被检查对象一定厚度的层面进行扫描,由探测器接收透过该层面的 X 线,经过数学算法构建图像。与普通 CT 所不一样的是<sup>[7]</sup>:(1)微型 CT 多使用平板探测器和锥形 X 线束,图像采集的速度和射线利用率高于普通 CT,以获得各向同性容积图像,并且有像素高、体素小的优点,成像信息丰富,获得的图像能与组织病理学结果相匹配;(2)微型 CT 成像区域较小,空间分辨率较高,分辨率可达到 1~10  $\mu\text{m}$ ;(3)微型 CT 微焦斑尺寸小于 100  $\mu\text{m}$ ,且功率远小于普通 CT,产生的 X 辐射较低。

### 3.3 软组织增强微型 CT

软组织(比如血管)与支撑材料(比如石蜡)之间 x 射线衰减对比较低,从而影响成像质量。使用重金属染色可以克服这个问题,常用的重金属染色剂有:四氧化钨<sup>[8]</sup>、磷钨酸<sup>[9]</sup>和碘<sup>[10]</sup>。这些染色剂可以结合到样品的内部,提供更高的 X 线对比度。然而,染色剂的浓度和时间必须针对特定的组织类型做出调整。

### 3.4 其他软组织 CT 成像方案

有的重金属染色如磷钨酸与随后的组织学染

色方案不兼容,包括 HE 染色和 Weigert's 弹性蛋白染色,因此,工程师们研发了不依赖重金属染色的软组织 CT 成像方案<sup>[11]</sup>。

**X 射线相位衬度 CT 成像:**相对于传统的吸收成像,相位衬度 CT 成像原理是:X 射线穿过物体时,物体内部各部位折射率的差异引起光的折射的差异,导致相位的变化。适用于弱吸收材料物体(生物软组织,聚合物),还可以减少吸收剂量。相位衬度成像可以使血管等软组织与周围的支撑结构的对比度提高 1000 倍以上。

**K 缘减影 CT 成像,**操作原理是,每一种元素吸收光子能量可以有几十倍的差异。即可使 CT 在某一元素的 K 吸收光子能量之下和之上两次扫描成像,然后减影,这样可以加大该特定元素的对比度,获得高密度分辨。

散射 CT 与荧光减影 CT 成像无需染色,但由于对技术要求很高,尚未在实验室内成熟应用。

在软组织的 CT 图像采集过程中,必须对软组织进行固定。首先使用酒精或玉米油的液体浸泡,然后使用琼脂糖凝胶、塑料包埋树脂、和石蜡等进行组织包埋。

### 3.5 微型 CT 动物模型中的血管钙化典型案例

目前为止,仅少数研究利用实验室微型 CT 分析动物模型中的血管钙化。2013 年 Huesa 等<sup>[12]</sup>对小鼠的主动脉经玉米油浸泡处理固定后,使用微型 CT 扫描并进行三维重建,获得大小为 7~10  $\mu\text{m}$  的各向同性体素,在这些三维重建的血管中对钙化区域进行了精确量化评估。整个主动脉的钙化情况被完整的呈现出来。该成像方案为研究主动脉钙化的发展和临床干预的潜在治疗提供了一个强有力的工具。然而,该项研究的一个局限性是无法将 3D CT 数据与随后的 2D 组织病理学分析结合起来。为克服这一问题,Awan 等人<sup>[13]</sup>使用动脉粥样硬化模型小鼠的主动脉用石蜡包埋,将同一动脉的钙化斑块使用微型 CT 三维重建分析与二维组织学分析相结合。然而,在这些研究中血管壁钙化斑块和细胞外基质(ECM)的精细结构并不能完美呈现,这主要是由于所使用的微型 CT 的分辨率(5~20  $\mu\text{m}$  的各向同性体素)不够。为克服血管钙化研究分辨率低的问题,使用多尺度 CT 扫描方法检测和量化血管中的钙化沉积,可以实现各向同性体素降至 0.5  $\mu\text{m}$ 。Rawson 等<sup>[14]</sup>将血管用福尔马林固定、脱水并包埋在石蜡中,首先对整个血管进行快速、低分辨率的

CT 扫描,以便在三维重建中显示钙化的位置和分布,然后以更高的分辨率对感兴趣区域进行扫描,以检查钙化斑块和血管细胞外基质的精细结构。这些更高分辨率的扫描可使用实验室 CT 实现 0.5  $\mu\text{m}$  的空间分辨率。或者使用实验室纳米 CT(NCT)可以实现亚微米(例如 150 nm)的分辨率。纳米 CT 可以观察到大鼠颈动脉的内膜<sup>[15]</sup>,随后可以对蜡包埋的血管进行组织学、免疫组织化学甚至激光捕获微型切割技术的研究<sup>[13,15-16]</sup>。

### 3.6 微型 CT 对于微钙化的识别

动脉粥样硬化斑块内膜钙化的大小和分布与斑块的破裂密切相关,微钙化可以明显增加斑块破裂的风险<sup>[17]</sup>。微型 CT 能够检测到血管中的微钙化,这些微钙化不容易被二维组织学方法发现,除非分析连续的组织切片。血管壁和钙化斑块的 X 射线衰减是相似的,导致两者之间的吸收对比度较低<sup>[18]</sup>。因此,斑块和血管壁目前必须在软件中手动区分然后进行量化分析。未来如果能将钙化血管的 3-D 数据导入可随时处理和分析平台中,将大大提高微型 CT 分析血管钙化的实用性。

### 3.7 微型 CT 在活体动物模型血管钙化研究中的应用

微型 CT 能够检测活体动物模型血管钙化的进展过程,从而受到广泛关注。活体的微型 CT 可以在长程的动物研究中连续监测动物血管钙化的变化情况,而无需在多个不同的时间点处死动物,这正符合动物研究的 3R 原则(reduction(减少)、replacement(替代)、refinement(优化))。然而目前微型 CT 还没有在啮齿类动物的活体研究中广泛应用,主要是因为普通微型 CT 的分辨率较低。高分辨的锥型束微 CT 的发展和广泛应用必将推动啮齿类动物血管钙化的活体研究。

### 3.8 微型 CT 与 18F-NaF micro-PET/CT 相结合

18F-NaF micro-PET/CT 检测活体动物血管钙化的敏感性和特异性很高,并且在临床前研究中能够非常好的区分大钙化和微钙化<sup>[18]</sup>。18F-NaF 以离子键形式结合到磷酸盐表面,更重要的是可结合到小鼠的不易被微型 CT 检测到的小血管的钙化表面<sup>[19]</sup>。F-NaF 摄取情况是测量总钙化表面积或钙化斑块代谢活动程度的一种重要方式<sup>[20]</sup>。相反,微型 CT 却无法测量钙化区域的代谢程度。因此,将微型 CT 与 18F-NaF micro-PET/CT 相结合可以很好的检测动物血管的钙化情况及病理过程。

## 4 总结

传统上血管钙化在动物研究中使用 2D 组织学和化学分析的方法进行研究分析。然而,这些技术有几个缺点,包括切片导致的伪影,以及不能同时显现钙化的空间结构和整条血管的钙化程度。目前的 CT 3D 成像技术可以完整的重建钙化的动脉并提供准确的量化信息。微型 CT 所具有的高空间分辨率使得微观和宏观钙化得以区分和量化。将 CT 与  $^{18}\text{F}$ -NaF micro-PET/CT 相结合,可以增强体内活动的微钙化的检测,并加深我们对不同信号通路和药物的作用机制。目前还可以检测到血管的 ECM 变化,例如弹性蛋白的退化。更重要的是 3D 微型 CT 的分析可以和 2D 的组织病理学、免疫组织化学、蛋白组学处理相结合,提供同一血管片段的互补的信息,例如钙化体积、钙化负荷、信号机制。微型 CT 的技术进步可以为活体研究提供更多的方法,从而使整个动物血管的大钙化斑块和小钙化斑块同时成像,实现血管钙化的实时分析。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 刘国栋,刘秀华,白静,等.白藜芦醇对血管钙化大鼠血压和心脏功能的影响[J].中国比较医学杂志,2014,(10):58-62.  
Liu GD, Liu XH, Bai J, et al. Effects of resveratrol on blood pressure and cardiac function in the rats with vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2014, (10): 58-62.
- [ 2 ] 康婷,陈波,欧三桃.慢性肾脏病血管钙化大鼠血清炎症因子抗体芯片检测及分析[J].中国比较医学杂志,2019,29(1):9-15.  
Kang T, Chen B, Ou ST. Antibody microarray analysis of serum inflammatory cytokines in rats with chronic renal disease vascular calcification [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 9-15.
- [ 3 ] Yamada S, Leaf EM, Chia JJ, et al. PiT-2, a type III sodium-dependent phosphate transporter, protects against vascular calcification in mice with chronic kidney disease fed a high-phosphate diet[J]. Kidney Int, 2018, 94(4): 716-727.
- [ 4 ] Benz K, Hilgers KF, Daniel C, et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of inflammation [J]. Int J Nephrol, 2018, 2018:4310379.
- [ 5 ] Massy ZA, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, et al. Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 109-116.
- [ 6 ] 李军,朱德生,包尚联.显微 CT 技术及其在生物医学领域的应用[J].现代仪器与医疗,2009,15(6):19-23,28.  
Li J, Zhu DS, Bao SL. The technology and application in biomedicine of micro-CT [J]. Modern Instrum, 2009, 15(6): 19-23,28.
- [ 7 ] 杨曦.显微 CT 对小动物血管三维成像的研究进展[J].中国骨与关节损伤杂志,2016,31(3):334-336.  
Yang X. Progress in the study of three-dimensional microscopic CT angiography in small animals[J]. Chin J Bone Joint Injury, 2016, 31(3): 334-336.
- [ 8 ] Pai VM, Kozlowski M, Donahue D, et al. Coronary artery wall imaging in mice using osmium tetroxide and micro-computed tomography (micro-CT)[J]. J Anat, 2012, 220(5): 514-524.
- [ 9 ] Faight E, Verdellis K, Ahearn JM, et al. 3D MicroCT spatial and temporal characterization of thoracic aorta perivascular adipose tissue and plaque volumes in the Apoe<sup>-/-</sup> mouse model [J]. Adipocyte, 2018, 7(3): 156-165.
- [ 10 ] Dummore-Buyze PJ, Cruje C, Nong Z, et al. 3D vessel-wall virtual histology of whole-body perfused mice using a novel heavy element stain[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 698.
- [ 11 ] 桂建保,胡战利,周颖,等.高分辨显微 CT 技术进展[J].CT 理论与应用研究,2009,18(2):106-116.  
Gui JB, Hu ZL, Zhou Y, et al. Technology development of Micro-CT with high spatial resolution [J]. CT Theor Appl, 2009, 18(2): 106-116.
- [ 12 ] Huesa C, Millán JL, van't Hof RJ, et al. A new method for the quantification of aortic calcification by three-dimensional micro-computed tomography[J]. Int J Mol Med, 2013, 32(5): 1047-1050.
- [ 13 ] Awan Z, Denis M, Roubtsova A, et al. Reducing vascular calcification by anti-IL-1 $\beta$  monoclonal antibody in a mouse model of familial hypercholesterolemia[J]. Angiology, 2016, 67(2): 157-167.
- [ 14 ] Rawson SD, Maksimcuka J, Withers PJ, et al. X-ray computed tomography in life sciences[J]. BMC Biol, 2020, 18(1): 21.
- [ 15 ] Walton LA, Bradley RS, Withers PJ, et al. Morphological characterisation of unstained and intact tissue micro-architecture by X-ray computed micro- and nano-tomography[J]. Sci Rep, 2015, 5:10074.
- [ 16 ] Awan Z, Denis M, Bailey D, et al. The LDLR deficient mouse as a model for aortic calcification and quantification by micro-computed tomography[J]. Atherosclerosis, 2011, 219(2): 455-462.
- [ 17 ] 李晓娜,岳春贤,练学淦,等.微钙化与动脉粥样硬化斑块易损性[J].国际脑血管病杂志,2019,27(8):624-628.  
L XN, Yue CX, Lian XG, et al. Microcalcification and vulnerability of atherosclerotic plaques[J]. Int J of Cerebrovasc Dis, 2019, 27(8): 624-628.
- [ 18 ] Vågberg W, Persson J, Szekely L, et al. Cellular-resolution 3D virtual histology of human coronary arteries using x-ray phase tomography[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11014.
- [ 19 ] Hsu JJ, Fong F, Patel R, et al. Changes in microarchitecture of atherosclerotic calcification assessed by  $^{18}\text{F}$ -NaF PET and CT after a progressive exercise regimen in hyperlipidemic mice[J]. J Nucl Cardiol, 2020, 2: 10.
- [ 20 ] Demer LL, Tintut Y. Interactive and multifactorial mechanisms of calcific vascular and valvular disease [J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(9): 646-657.

孟鑫,陈景伟. 子宫内膜异位症小鼠模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 857-863.

Meng X, Chen JW, et al. Research progress in a mouse model of endometriosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 857-863.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.018

# 子宫内膜异位症小鼠模型研究进展

孟鑫, 陈景伟\*

(河北中医学院中西医结合学院, 中西医结合研究所, 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室, 石家庄 050200)

**【摘要】** 子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是指具有活性的子宫内膜组织出现在宫腔被覆黏膜以外的部位,因其病因、发病机制尚不明确,中、西医诊断与治疗存在困难,使得EMs成为了近年来的研究热点之一。通过动物模型探讨EMs的病因、发病机制及药物治疗方法是研究EMs的重要手段。本文介绍了EMs小鼠模型的动物选择、构建方法以及各造模方法优缺点,旨在为EMs动物实验研究提供模型选择的参考。

**【关键词】** 子宫内膜异位症;小鼠;模型;造模方法

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0857-07

## Research progress in a mouse model of endometriosis

MENG Xin, CHEN Jingwei\*

(Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-Kidney Patterns, Institute of Integrative Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

Corresponding author: CHEN Jingwei. E-mail: chenjingwei1999@126.com

**【Abstract】** Endometriosis (EM) is defined by the presence of active endometrial tissue in the lining of the uterine cavity. Because its etiology and pathogenesis are unclear, the diagnosis of EM and the combined use of Traditional Chinese medicine and Western medicine are difficult, and thus, EM has become a research hotspot in recent years. Animal experiments are important for exploring the etiology, pathogenesis, and drug therapy of EM. This paper discussed the selection of animals, construction method, and advantages and disadvantages of various EM mouse models in an effort to provide a reference for model selection in animal research of EM.

**【Keywords】** endometriosis; mouse; model; building methods

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

EMs是一种常见的妇科疾病,以盆腔疼痛、不孕、盆腔包块为主要临床表现<sup>[1]</sup>。迄今为止,该病的发病机制尚未明确,其临床药物疗效和手术治疗效果也欠佳,由于伦理道德等多方面现实原因的限制,在人体进行其发病机制和治疗方法的各项研究存在一定的局限性。动物实验为研究EMs提供了极大便利,逐渐成为了研究该病的重要手段。目前,已经成功建立了非人灵长类、家兔、鼠类及鸡胚绒毛尿囊膜等的EMs动物模型<sup>[2]</sup>。本文将从各类

小鼠的造模方法、模型评价等方面作出较为综合的阐述及比较,以便研究者可以据此选择更贴合实验的造模方法。

## 1 发病机制

目前为止,国内外较为公认的发病机制有经血逆流学说、化生学说、转移学说、新生儿宫血学说<sup>[3]</sup>。经血逆流学说认为有活性的子宫内膜组织碎片经输卵管逆行至腹腔,并种植生长于盆腹腔或

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(82074483)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82074483).

**【作者简介】** 孟鑫(1995—),女,研究生,研究方向:子宫内膜异位症的发病机制及中药干预研究。Email:18232409191@163.com

**【通信作者】** 陈景伟(1980—),女,博士,副教授,研究方向:女性生殖功能障碍的中医药调控。Email:chenjingwei1999@126.com

卵巢等其他组织上。该学说目前最为广泛接受,但依然不能完全解释 EMs 的发病原因,因此,在此基础上,郎景和<sup>[4]</sup>提出了“在位内膜决定论”,认为个体在位子宫内膜的生物学特性是其能否种植生长在其他部位的决定因素。化学学说认为异位子宫内膜细胞来自于其他组织的化生;转移学说认为组织碎片是经血管或淋巴管转移至其他部位并种植生长;新生儿宫血学说提出母体激素在新生儿出生后的减少导致了子宫出血,部分子宫出血逆流到腹腔,其中可能含有干细胞<sup>[5]</sup>。除此之外,中医认为瘀血是 EMs 的基本病因病机,瘀血阻滞,气血运行不畅是导致 EMs 的基本病因<sup>[1]</sup>。尽管各学说众说纷纭,但其发病机制依然不明确,因此,选择合理的动物模型就成为了研究其发病机制的首要任务。

## 2 动物的选择

目前的动物造模方法都基于经血逆流学说,主要包括自发性、诱发性(自体移植)和种植性(异体移植)三种<sup>[6]</sup>。自发性主要应用于非人灵长类动物<sup>[7]</sup>,如猕猴、狒狒和带尾纤猕猴,因其具有类似于人类的盆腔解剖结构和有规律的月经周期,可以自发形成 EMs,是研究 EMs 发病机制及治疗的理想方案。但因为灵长类动物价格昂贵,自发性造模成功率低,周期长等原因无法普及。诱发性主要适用于兔、鼠等啮齿类动物,种植性则多见于裸小鼠、SCID 小鼠等。但因为啮齿类动物与人类之间有种属差异性,其实验结果可能与临床存在一定偏差。

在众多动物中,啮齿类动物中的小鼠因其价格便宜,体型娇小,饲养管理方便,生长繁殖速度快,并且已经培育出了大量的近交系、突变系和封闭群,成为了 EMs 研究的主要选择,不仅可以用于 EMs 发病机制的研究,还可用于研究药物对 EMs 的影响作用,为 EMs 的实验研究作出了巨大贡献。

## 3 造模方法及小鼠的选择

### 3.1 术前处理

使实验小鼠处于统一的动情周期,常用的方法为连续阴道涂片法<sup>[8]</sup>和直接给予外源性雌激素法<sup>[9]</sup>(灌胃或肌注戊酸雌二醇、苯甲酸雌二醇、乙烯雌酚等),但在操作过程中发现使大量的实验动物都处于统一的动情周期无疑加大了实验的难度与耗损。张薇等<sup>[10]</sup>分别选择在 SD 大鼠的动情期和非动情期进行自体移植术以建立 EMs 模型,发现非动情期和动情期的造模率及异位灶体积无显著差异。

陈琼华等<sup>[11]</sup>通过建立 BALB/C 小鼠 EMs 模型并观察同样发现小鼠的造模成功率与其所处的动情周期无关。这一结果在简化造模实验、节约时长、节省资源等方面均具有重要意义。

### 3.2 造模方法

EMs 小鼠的造模方法主要包括自体移植、同种异体移植和异体移植。

#### 3.2.1 自体移植

即手术缝合法<sup>[12]</sup>,选取尿道口上方 2 cm 处沿腹部正中纵行切开,找到左侧子宫,于近卵巢端结扎子宫两端,剪下中间段,剪除其他多余组织血管后纵行剪开,将其内膜面贴于小鼠腹腔壁上,并将子宫对角缝合固定,完成后关腹并进行后续操作。王智超<sup>[13]</sup>通过分别移植到小鼠腹壁内侧、大网膜及肠壁三个部位来比较异位灶种植成功率,最终结果表明三者的种植率无明显差异,研究者可根据各自的研究目的选择最佳的种植部位。

#### 3.2.2 同种异体移植

即腹腔注射法<sup>[14]</sup>,将小鼠分为供体组和受体组,将供体小鼠脱颈处死,剖开腹部,取出子宫,除去其多余组织后沿 Y 型子宫正中纵行剪开,分别放入生理盐水中,纵行切开暴露出子宫内膜后,用眼科剪将其剪碎至 1 mm<sup>3</sup> 大小的小碎片。取受体小鼠,用 16 号针头注射器将含有子宫碎片的 1 mL 生理盐水注射至受体小鼠腹腔内,进针点选取受体小鼠的小腹部偏腹中线 0.5 cm 处的左下腹,一只供体小鼠子宫平分给两只受体小鼠。关于注射量,徐建波<sup>[15]</sup>进行了阶梯性注射实验,分别向受体小鼠注射 1、2、4、8、16、32 片 1 mm<sup>2</sup> 大小的子宫内膜碎片观察,结果表明异位灶的成活率与注射量呈一定的曲线关系,当注射量  $\geq 4$  片时,注射量与成活率无显著关系。

#### 3.2.3 异体移植

异体移植是指将人子宫内膜组织植入到动物体内加以研究观察,由于裸鼠和 SCID 小鼠属于免疫缺陷小鼠,不会发生异体移植的免疫排斥反应,种植的成功率较高,被作为异体移植的首选。其造模方法包括腹腔种植法、腹腔注射法和皮下种植法。

腹腔种植法<sup>[16]</sup>:将新鲜的人子宫内膜组织标本置入含 DMEM 培养液的培养皿中,后用冷的 0.1 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3~4 次,于无菌培养皿中将组织剪至 2 mm  $\times$  3 mm 大小的碎块,分为每组约 8~10 个小碎块,分别放入 PBS 中。取麻醉后的裸鼠于下腹正中横切约 1 cm 的切口,将处理好的一组碎块随机放置盆腹腔内的不同位置

后,逐层关腹。

**腹腔注射法<sup>[17]</sup>**:人子宫内膜组织的准备清洗同上,将组织剪至 0.5~1 mm<sup>2</sup> 大小的碎片,平均分至 PBS 中。选取 SCID 小鼠下腹正中部位为进针点进行腹腔穿刺,用 16 号针头注入含有组织碎片的 PBS 液 0.2 mL 后,按压片刻,防止液体流出。

**皮下种植法<sup>[18]</sup>**:将准备好的人子宫内膜组织用无菌 PBS 清洗 3~4 次,剪至 1 mm<sup>2</sup> 大小的碎片,平均放置于含有 DMEM 培养液的培养皿中混匀。用 9 号针头将含有内膜组织碎片的培养液按每只 0.5 mL 注入,裸鼠可选取背部皮下方便后续观察,SCID 小鼠则选取下腹部皮下,以腹部中线脐下为进针点。

### 3.3 各造模方法优缺点比较

EMs 动物模型对研究其发病机制及临床治疗具有重大价值,其造模方法逐渐实现了由自发到诱发,有创到无创的进化,尽管如此,现有的造模方法仍然都存有各自的不足之处,因此,以实验目的和可行性作为选择条件,综合权衡各种模型方法的利弊,才能充分发挥不同造模方法的优势。常用的几种建立小鼠 EMs 模型方法的优缺点比较见表 1。

### 3.4 小鼠的选择

随着实验小鼠培育技术的提升,小鼠的品种逐渐丰富,更大地满足了实验的需求,结合实验目的、操作技术及环境因素选择最佳的实验小鼠,可以进一步提高造模的成功率及实验的准确性。目前,用于建立 EMs 模型的小鼠品种,优缺点及各自适用的

造模方法详见表 2。

## 4 模型评价

### 4.1 模型建立成功标准

肉眼可以观察到异位灶体积增大,呈透明囊状,内有黄色液体,异位灶表面可看到新生的细小血管。显微镜下可见异位灶中含有子宫内膜腺体和间质细胞,囊液内和间质层可见到炎症细胞<sup>[19]</sup>。

### 4.2 观察指标及方法

#### 4.2.1 大体观察

肉眼观察小鼠的精神状态,毛色质量,饮食情况及活动变化;采用皮下种植法时要观察皮下异位灶结节的大小,生长情况。处死开腹探查时,观察异位灶生成情况,形态,位置,有无粘连等,并用双脚规测量异位灶体积大小。

#### 4.2.2 组织学观察

取异位灶进行 HE 染色镜下观察及免疫组化观察,可直接观察异位灶组织细胞形态,为 EMs 的发展、恶化提供了病理学依据。

#### 4.2.3 影像学观察

影像学观察包括 MRI、超声等都在 EMs 动物模型研究中有所应用,影像学检查可以通过图像来直观的获取所需信息,并可直接进行数据分析,有效地避免了动物死亡,减少了动物的应激反应。但该方法因其价格昂贵,在实验中未得到广泛普及。

表 1 建立 EMs 小鼠模型方法优缺点比较

Table 1 Advantages and disadvantages of the mouse model of EMs

造模方法 Building methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
自体移植 Autologous transplantation	异位灶的种植部位准确,能较好的定位评估内异症的进展情况 The implantation site of heterotopic focus is accurate, which can better locate and evaluate the progress of endometriosis	操作相对复杂,创伤性较大,术后易发生粘连;另外,手术对腹腔免疫环境干预较大,不适用于内异症免疫学研究 The operation is relatively complex and traumatic, and postoperative adhesion is easy to occur. In addition, the surgical intervention on the immune environment of the abdominal cavity is relatively large, which is not suitable for the immunological study of endometriosis
同种异体移植 Allografts	操作简单,少有出血、感染死亡 Simple operation, less bleeding and infection death	种植部位不能确定,不便于后期观察,定量评估内异症进展方面稍差 The implant site is uncertain, which is not convenient for later observation, and the quantitative evaluation of the progress of endometriosis is poor
异体移植 Allografts	有利于保持人类的组织形态和各类生化指标,减少了物种差异性,使实验结果更有临床意义 It is beneficial to maintain human tissue morphology and various biochemical indicators, reduce species differences, and make the experimental results more clinically significant	实验所用小鼠因免疫功能缺陷,不能应用于内异症相关的免疫机制方面的研究,且小鼠抵抗力低下,不易成活,饲养条件高 Because of the deficiency of immune function, the mice used in the experiment can not be used to study the immune mechanism related to endometriosis; and the resistance of mice is low, it is not easy to survive, and the feeding conditions are high

表 2 实验常用小鼠的优缺点及适用造模方法

Table 2 Advantages and disadvantages of mouse and the applicable modeling are commonly used in experiments

品种 Varieties	实验常用 Experiment used	优势 Advantages	不足 Disadvantages	适用的造模方法 Applicable molding method
封闭群 Closed colony	KM 小鼠、 ICR 小鼠 KM mice, ICR mice	价格便宜、容易饲养、生命力顽强、可大量重复 Low price, easy to raise, strong vitality, can be repeated in large quantities	个体娇小、自体移植时操作较大鼠困难 Petite individual, the operation of autotransplantation is more difficult than that of rats	自体移植、腹腔注射皆可,但更适用于自体移植 Autotransplantation and intraperitoneal injection can be used, but they are more suitable for autotransplantation
近交系 Inbred strain	BALB/C 小鼠、C57BL/6 小鼠 BALB/C mice, C57BL/6 mice	个体间差异性小、基因高度纯和、基因型较稳定、几乎无异体排斥反应 The difference between individuals is small, the gene is highly homozygous; the genotype is relative stable, and there is almost no allograft rejection	抵抗力较低下、易发生死亡 Low resistance, prone to death	自体移植、腹腔注射皆可,但更适用于腹腔注射 Autotransplantation and intraperitoneal injection can be used, but they are more suitable for intraperitoneal injection
免疫缺陷性 Immunodeficient animal	裸鼠、SCID 小鼠 Nude mice, SCID mice	无免疫排斥反应、可建立人子宫内膜异位症小鼠模型;其中 SCID 小鼠移植后的种植存活率较裸鼠高,更易发生侵袭和转移 No immune rejection, the mice model of human endo-metriosisis can be established; the survival rate of SCID mice after transplantation is higher than that of nude mice, and SCID mice are more prone to invasion and metastasis	价格昂贵、饲养条件高、无法进行免疫方面的研究 High price, high feeding conditions, unable to carry out immune research	异体移植中的腹腔种植、腹腔注射和皮下种植;其中 SCID 小鼠皮下种植法造模成功率较裸鼠高 Intraperitoneal implantation, intraperitoneal injection and subcutaneous implantation in allografts; and the success rate of SCID mice using subcutaneous implantation is higher than that of nude mice

#### 4.2.4 荧光染色法观察

荧光染色是一种活体成像技术,可应用慢病毒载体将荧光素酶和红色荧光蛋白基因转入内膜组织并注入裸鼠体内,利用活体成像仪来实时监测造模情况及疾病进展情况<sup>[20]</sup>。该方法不仅实现了无创监测,而且定位更加准确,最大限度地避免动物死亡所带来的实验耗损,具有很高的优越性。

#### 4.3 造模周期

关于小鼠 EMs 造模的最佳周期,现阶段国内外的研究结果各不统一,不同的研究者选择的时间也不尽相同。徐建波<sup>[15]</sup>通过建立 C57BL/6 小鼠 EMs 模型研究,表明异位灶的重量在第 5 天趋于稳定,大小在第 9 天也达到稳定,故提示第 9 天可能为最佳观察时间。陈琼华等<sup>[11]</sup>从异位灶大小、分布及 BALB/C 小鼠的体重方面研究发现第 4 天与第 21 天无明显差异,提示第 4 天便是最佳观察时间。王智超<sup>[13]</sup>研究 KM 小鼠造模时间表明在术后第 2 周模型既已建立成功,但异位灶体积在第 4 周处于最大。任旭等<sup>[18]</sup>通过研究 SCID 小鼠造模发现模型在术后第 2 周已成功,且第 2 周与第 4 周异位灶体积无明显差异,但于第 6 周出现异位灶体积缩小现象。

综上所述,目前小鼠异位灶模型的最佳造模周期并不统一,研究过程中观察指标只有异位灶体积及重量,不能全面地反应模型的生长情况。由此可见,EMs 造模的最佳周期,以及其时间是否与小鼠种类不同而存在差异性问题仍然需要进一步深入研究。

## 5 模型的发展与优化

### 5.1 EMs 合并症模型的建立

EMs 作为一个复杂的妇科疾病,其机理,症状表现涉及多个方面,主要症状表现为不孕、疼痛;其病变过程还包括炎症,纤维化等多方面的共同作用。现阶段的动物模型是否可以用于某一方面的深入研究,需要我们在此基础上进一步评价与发展。

EMs 不孕模型:崔阳阳等<sup>[21]</sup>采用“腹腔 + 皮下”注射法建立 EMs 小鼠模型并通过生育功能检测,证实了模型小鼠的生殖能力较正常小鼠低下。王汝倩等<sup>[22]</sup>采用了供体小鼠模拟经期内膜的方法,以腹腔注射法建立 EMs 小鼠模型后,再以 2:1 的机率与雄鼠合笼,得到不孕小鼠,成功建立 EMs 不孕小鼠模型。

**EMs 疼痛模型:**陈景伟等<sup>[12]</sup>采用自体移植法成功复制小鼠 EMs 模型,于术后连续灌胃补佳乐 12 d 后,腹腔注射缩宫素,通过观察其小鼠的扭体反应建立了 EMs 痛经模型,为 EMs 疼痛的研究提供了理想的动物模型。

**EMs 纤维化模型:**锁澍萱等<sup>[23]</sup>采用腹腔注射法成功复制 EMs 小鼠模型后,用 Masson 染色法分别检测小鼠造模后第 7、14、21 天的异位病灶和在位内膜纤维化程度,发现于造模后第 14 天纤维化面积比率达到最佳。路攀等<sup>[16]</sup>用腹腔种植法复制人 EMs 裸鼠模型并观察后,同样于造模后第 14 天发现难以分离的致密粘连,可见 EMs 小鼠模型建立后 14 d 即可作为研究 EMs 纤维化机制的可靠动物模型。

## 5.2 中医病证结合模型的建立

辨证论治是中医理论体系重要的组成部分,为了更好的从中医传统理论角度认识 EMs 的发病机制及探究中医药治疗 EMs 的作用机理,单纯的 EMs 动物模型已不能满足实验需要,因此,开展中医病证结合 EMs 动物模型的研究势在必行。

**气滞血瘀型 EMs 模型:**王哲等<sup>[24]</sup>在自体移植的造模术后 1 周采用了:(1)肾上腺素皮下注射;(2)食用油灌胃;(3)在夹子上贴附纱布并夹小鼠尾部,每次 5 min;(4)45°倾斜鼠笼 2 h;(5)束缚大鼠,限制其自由 2 h;(6)冰水浴 5 min;(7)禁食水 1 d;(8)昼夜颠倒 1 d。每天随机选择以上 3 种方法干预并观察两周,成功用药物加情志刺激干预方法建立了气滞血瘀的 EMs 模型,实验动物出现精神活跃,脾气暴躁,易激惹等气滞症状,血清 CA125 值升高,提示造模成功。镜下观察可见异位灶内膜上皮细胞扁平,积层较薄,结构不清的组织病理学改变。

**寒凝血瘀型 EMs 模型:**孙博等<sup>[25]</sup>在自体移植术 1 周后,将其置于 0~1℃ 冰水混合物中浸泡 20 min,连续 2 周成功建立了寒凝血瘀小鼠模型。周世卿等<sup>[26]</sup>则采用盐酸肾上腺素皮下注射加冰水浸泡的方法成功建立了寒凝血瘀的裸鼠模型。实验动物出现精神萎靡,反应迟钝,易扎堆等寒邪致病症状,耳唇、爪甲、尾部暗淡,舌质紫暗,舌下脉络增粗等血瘀症状,结合血液流变学和凝血功能指标的变化提示造模成功。镜下观察可见异位灶内膜上皮细胞呈柱状排列,偶有假复层结构,上皮细胞层较薄,间质细胞明显增多,腺体数量增多,腺上皮呈立方排列,且血管丰富。

**肾阳虚血瘀型 EMs 模型:**贾云波等<sup>[27]</sup>先在大鼠笼中放入一定量的冰水,置于 4℃ 冰箱 20 min,每

天 2 次,1 个月后行自体移植术,术后再重复术前的冷冻行为成功建立了虚寒型 EMs 模型。实验动物出现体温降低,动情周期紊乱,反应迟钝,倦缩懒动,大便溏等虚寒症状,结合脏器指数、激素水平降低的结果提示造模成功。镜下观察可见异位内膜较厚,腺体不明显,管腔消失,炎症细胞增多,细胞排列不整齐<sup>[28]</sup>。

以上三个证型目前已有发展,但依然有许多中医理论和问题无法在实验中体现,此外,还有湿热、痰瘀等等中医表现暂不能实现,EMs 的中医病证结合模型仍需进一步研究发展与完善。

## 5.3 特殊动物模型的建立与应用

### 5.3.1 基因敲除小鼠 EMs 模型的建立

通过基因敲除技术建立转基因动物模型近年来也逐渐在 EMs 研究过程中备受关注,基因敲除技术是利用一定的生物手段,允许特定的目的基因缺失或失活,对敲除的基因进行有效的控制,从而排除其他因素对实验结果的干扰,使实验结果变得更加可靠和直观<sup>[29]</sup>。基因敲除小鼠技术是指通过基因工程的办法使小鼠体内某种基因功能缺失的生物技术<sup>[30]</sup>。宫庭钰等<sup>[31]</sup>应用雌激素受体  $\beta$  基因敲除小鼠结合自体移植法建立了 EMs 模型;Burns 等<sup>[32]</sup>分别用 IL-6 基因敲除小鼠和 ER 基因敲除小鼠结合腹腔注射法成功构建了 EMs 模型。应用基因敲除小鼠建立 EMs 模型,有利于了解已知基因在 EMs 形成过程中的作用及与相关因子之间的关系,为明确 EMs 发生发展的影响因素提供科学的实验数据,为临床合理选择有效的治疗药物提供靶向依据。

### 5.3.2 毒物暴露动物模型的建立及应用

EMs 是一种多因素复杂的疾病,受到多种因素的互相影响与调控,根据近年来相关的流行病学调查和实验依据发现,暴露于具有内分泌干扰作用的环境毒物之下可能在其发病机制中发挥了一定的作用<sup>[33]</sup>,因此建立可靠的 EMs 毒物暴露动物模型是获得准确研究结果的首要条件。崔照领等<sup>[34]</sup>采用灌胃强饲的方法使受孕雌鼠暴露于 TCDD 中并产下子鼠,再采用自体移植法建立子鼠 EMs 模型,成功构建了二恶英暴露的 EMs 小鼠模型;Bruner-Tran 等<sup>[35]</sup>采用了宫内 + 哺乳期暴露模式直接暴露雌鼠胎儿及其生殖细胞,成功培育出毒物暴露小鼠并进一步研究了暴露毒素在 EMs 中的潜在机制。越来越多的研究表明,EMs 的多基因遗传易感性与环境因子有关<sup>[36]</sup>,毒物暴露小鼠模型的建立及应用可以更好地研究环境、内分泌因素与遗传因素在 EMs 病

因学中的相互密切关系,为探索 EMs 的机制与治疗提供了新的思路。

## 6 总结与展望

EMs 作为一种复杂的妇科疾病一直以来都是研究的焦点,虽然随着动物模型不断发展与完善,为 EMs 发病机制,治疗等方面的认识提供了很大帮助,但由于该病很多方面的研究依然不甚完善,故而在未来的研究中,动物模型的创新与选择仍是实验的重要且首要部分。小鼠构建的模型因小鼠的各种优点而具有较其他动物的优越性,操作方便,成功率高,已然成为了众多实验的首选。尽管如此,现阶段各种小鼠模型中仍旧存在着不可避免的不足之处,限制了 EMs 的研究进展,故各研究者应该根据其研究目的,综合衡量考虑,充分发挥各种模型的最优点,选择最合适的模型,以便更好的研究中医药治疗 EMs 的作用机理,为中医药治疗 EMs 提供客观依据。

### 参 考 文 献(References)

[ 1 ] 俞超芹, 段华, 许泓, 等. 子宫内膜异位症中西医结合诊治指南[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(10): 1169-1176.  
Yu CQ, Duan H, Xu H, et al. Diagnosis and treatment of endometriosis with integrated traditional Chinese and western medicine[J]. Chin J Integr Tradit Western Med, 2019, 39(10): 1169-1176.

[ 2 ] 宫庭钰, 关铮. 子宫内膜异位症动物模型及其应用进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 17(1): 36-39.  
Gong TY, Guan Z. Advances in animal models of endometriosis[J]. J Int Reprod Health/Famil, 2008, 17(1): 36-39.

[ 3 ] 王国云, 袁明, 姬苗苗. 子宫内膜异位症发病机制研究进展[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(6): 33-39.  
Wang GY, Yuan M, Ji MM. Research advances in the pathogenesis of endometriosis[J]. J Shandong Univ (Health Sci), 2019, 57(6): 33-39.

[ 4 ] 郎景和. 对子宫内膜异位症认识的历史、现状与发展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020, 36(3): 193-196.  
Lang JH. The history, current situation and development of understanding endometriosis[J]. Chin J Pract Gynecol Obst, 2020, 36(3): 193-196.

[ 5 ] 朱大秀, 张真真, 朱利, 等. 子宫内膜干/祖细胞在子宫内膜异位症发病中的作用及研究进展[J]. 华西医学, 2020, 35(1): 84-88.  
Zhu DX, Zhang ZZ, Zhu L, et al. The role and advances of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of endometriosis[J]. West Chin Med J, 2020, 35(1): 84-88.

[ 6 ] 金济云, 夏亲华. 子宫内膜异位症动物模型研究进展[J]. 中国医药导报, 2016, 13(5): 28-31.  
Jin JY, Xia QH. Research progress of endometriosis animal models[J]. Chin Med Herald, 2016, 13(5): 28-31.

[ 7 ] 冯雪, 黄薇. 子宫内异位症动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 67-70.  
Feng X, Huang W. Research advances in animal models of endometriosis[J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(12): 67-70.

[ 8 ] Martins RR, Pereira NM, Silva TM. Liquid-base cytology: a new method for oestral cycle study in Wistar's rats[J]. Acta Cir Bras, 2005, 20(1): 78-81.

[ 9 ] Fowler RE, Edwards RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins[J]. J Endocrinol, 1957, 15(4): 374-384.

[ 10 ] 张薇, 沈洪沁, 黄启玲, 等. 非动情期 SD 大鼠子宫内膜异位症模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(1): 21-24.  
Zhang W, Shen HQ, Huang QL, et al. Establish of endometriosis model in SD rats during non-estrus[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2004, 12(1): 21-24.

[ 11 ] 陈琼华, 邱娜璇, 颜晓红, 等. BALB/c 小鼠子宫内膜异位症模型的建立及其形态学的动态观察[J]. 中国微创外科杂志, 2010, 10(3): 238-242.  
Chen QH, Qiu NX, Yan XH, et al. Establishment of BALB/c endometriosis model and dynamic observation of ectopic morphous[J]. Chin J Minim Invasive Surg, 2010, 10(3): 238-242.

[ 12 ] 陈景伟, 仝瑞晓, 范丽洁, 等. BALB/c 小鼠子宫内膜异位症痛经模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1): 83-86.  
Chen JW, Tong RX, Fan LJ, et al. Establishment of a mouse model of endometriosis dysmenorrhea[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(1): 83-86.

[ 13 ] 王智超. 子宫内膜异位症影响妊娠的相关因素分析及动物模型的建立[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.  
Wang ZC. The analysis of the relevant factors affecting pregnancy in endometriosis and the establishment of animal models[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2017.

[ 14 ] 李冰冰, 刘雁峰, 和翔宇, 等. BALB/c 小鼠子宫内膜异位症模型建立和异位病灶纤维化评价[J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(29): 3197-3201.  
Li BB, Liu YF, He XY, et al. Establishment of BALB/c mouse endometriosis model and evaluation of endometriotic lesions fibrosis[J]. Modern J Integr Tradit Chin Western Med, 2019, 28(29): 3197-3201.

[ 15 ] 徐建波. 腹腔注射法建立 C57BL/6 小鼠子宫内膜异位症模型[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.  
Xu JB. The establishment of C57BL/6 mouse endometriosis model by intraperitoneal injection[D]. Suzhou: Soochow University, 2013.

[ 16 ] 路攀, 米雪, 苗劲蔚, 等. 人子宫内膜异位症纤维化动物模型的建立[J]. 中国医药导报, 2016, 13(32): 8-11.  
Lu P, Mi X, Miao JW, et al. Establishment of a fibrotic nude mouse model of human endometriosis[J]. Chin Med Herald, 2016, 13(32): 8-11.

[ 17 ] 罗碧云, 李莉, 江玲. 利用 SCID 小鼠建立子宫内膜异位症模型的方法探讨[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 390-393.

- Luo BY, Li L, Jiang L. Establishment of endometriosis model in SCID mice[J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(5): 390-393.
- [18] 任旭, 王沂峰, 戴丽冰. 子宫内膜异位症 SCID 小鼠动物模型的构建[J]. 昆明医科大学学报, 2018, 39(1): 30-34.
- Ren X, Wang YF, Dai LB. The establishment of SCID mice model on endometriosis[J]. J Kunming Med Univ, 2018, 39(1): 30-34.
- [19] 杨莉, 周忠明. 小鼠子宫内膜异位症模型的建立及组织学观察[J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(5): 16-18.
- Yang L, Zhou ZM. Endometriosis mice model establishment and histological observation[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2010, 12(5): 16-18.
- [20] 关绮蕙, 史文静, 周龙书, 等. 人子宫内膜异位症的可视踪裸鼠模型构建[J]. 重庆医学, 2019, 48(7): 1110-1113, 1117.
- Guan QH, Shi WJ, Zhou LS, et al. Establishment of nude mouse model of endometriosis built by tracing human endometrium[J]. Chongqing Med, 2019, 48(7): 1110-1113, 1117.
- [21] 崔贵阳, 孙伟伟, 赵瑞华, 等. 子宫内膜异位症对小鼠生育能力的影响[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 479-483.
- Cui YY, Song WW, Zhao RH, et al. Effects of endometriosis on the reproductive ability of mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(5): 479-483.
- [22] 王汝倩, 张洁, 刘璐茜, 等. 用模拟经期内膜组织建立子宫内膜异位症小鼠模型及其生殖能力的研究[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26(6): 592-598.
- Wang RQ, Zhang J, Liu LX, et al. Establishment of mouse endometriosis model by injecting simulated menstrual endometrial tissue and its reproductive ability[J]. J Reprod Med, 2017, 26(6): 592-598.
- [23] 锁滢澹, 张真真, 开红英, 等. 子宫内膜异位症纤维化与 M2 型巨噬细胞的关系[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(12): 1928-1932.
- Suo LX, Zhang ZZ, Kai HY, et al. Relationship between fibrosis and M2 macrophages in endometriosis[J]. J Pract Med, 2017, 33(12): 1928-1932.
- [24] 王哲, 王家历, 李明, 等. 气滞血瘀型子宫内膜异位症大鼠模型的复制[J]. 中国临床研究, 2016, 29(5): 682-684.
- Wang Z, Wang JL, Li M, et al. Replication of endometriosis model of qi stagnation and blood stasis type in rats[J]. Chin J Clin Res, 2016, 29(5): 682-684.
- [25] 孙博, 马遇春, 张天婵, 等. 病证结合制备寒凝血瘀型子宫内膜异位症大鼠模型[J]. 中医药导报, 2016, 22(18): 17-22.
- Song B, Ma YC, Zhang TC, et al. Establishment of the endometriosis rat model with blood stasis due to cold accumulation by combination of disease and syndrome[J]. Chin Med Herald, 2016, 22(18): 17-22.
- [26] 周世卿, 张婷婷, 李甜甜, 等. 寒凝血瘀证裸小鼠模型的建立及评价[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 415-417.
- Zhou SQ, Zhang TT, Li TT, et al. Establishment and evaluation of nude mouse model of blood stasis[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2019, 46(2): 415-417.
- [27] 贾云波, 杜惠兰, 姚颖玉. 肾阳虚血瘀证子宫内膜异位症大鼠造模方法的建立与评价[J]. 河北中医药学报, 2017, 32(3): 9-12, 18.
- Jia YB, Du HL, Yao YY. Endometriosis of kidney yang deficiency and blood stasis syndrome[J]. J Hebei TCM Pharmacol, 2017, 32(3): 9-12, 18.
- [28] 贾云波, 杜惠兰, 高星, 等. 补肾温阳化瘀方对子宫内膜异位症肾阳虚血瘀证模型大鼠 HIF-1 $\alpha$ 、PHD2、VHL 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(10): 1210-1217.
- Jia YB, Du HL, Gao X, et al. Effects of Wenyang Huayu Recipe on expressions of HIF-1 $\alpha$ , PHD2, and VHL in endometriosis rats with Shen Yang Deficiency Blood Stasis Syndrome[J]. Chin J Integr Tradit Western Med, 2015, 35(10): 1210-1217.
- [29] 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 等. 巨噬细胞条件性 Atg5 基因敲除小鼠的构建及鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 770-775.
- Huang XR, Huang YH, Ye L, et al. Construction and identification of macrophage-conditional Atg5-knockout mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 770-775.
- [30] 王超玄, 孙航. 基因敲除小鼠技术的研究进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(5): 784-794.
- Wang CX, Song H. Progress in gene knockout mice[J]. Chin J Biotechnol, 2019, 35(5): 784-794.
- [31] 宫庭钰, 关铮, 张卓梅, 等. 雌激素受体  $\beta$  基因敲除小鼠子宫内膜异位症模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(2): 148-149, 159.
- Gong TY, Guan Z, Zhang ZM, et al. Establishment and histological observation of an ER- $\beta$  knockout mouse model of endometriosis[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2008, 16(2): 148-149, 159.
- [32] Burns KA, Thomas SY, Hamilton KJ, et al. Early endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor alpha and IL6 cross-talk[J]. Endocrinology, 2018, 159(1): 103-118.
- [33] Huang PC, Li WF, Liao PC, et al. Risk for estrogen-dependent diseases in relation to phthalate exposure and polymorphisms of CYP17A1 and estrogen receptor genes[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2014, 21(24): 13964-13973.
- [34] 崔照领, 黄向华, 宫心鹏. 二恶英暴露对子宫内膜异位症模型形成的影响[J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(10): 1162-1165.
- Cui ZL, Huang XH, Gong XP. Influence of dioxin exposure on formation of endometriosis model[J]. J Hebei Med Univ, 2015, 36(10): 1162-1165.
- [35] Bruner-Tran KL, Duleba AJ, Taylor HS, et al. Developmental toxicant exposure is associated with transgenerational adenomyosis in a murine model[J]. Biol Reprod, 2016, 95(4): 73.
- [36] Bruner-Tran KL, Yeaman GR, Crispens MA, et al. Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis[J]. Fertil Steril, 2008, 89(5): 1287-1298.

唐思璇,肖芳. 脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 864-869.

Tang SX, Xiao F. Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 864-869.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.019

# 脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展

唐思璇,肖芳\*

(中南大学湘雅公共卫生学院卫生毒理学系,长沙 410078)

**【摘要】** 肺炎是指终末气道、肺泡和肺间质的炎症,可由病原微生物、免疫损伤、理化因素、过敏等原因导致。近年来国内外学者常用脂多糖诱导建立肺炎动物模型以模拟肺炎发病情况,但其诱导剂量、建模方法及评价检测指标选择等方面多有不同,故本文对脂多糖诱导肺炎动物模型的相关文献进行检索整理并综述其研究进展,以期肺炎的发病机制、预防及治疗策略的研究提供一定的参考。

**【关键词】** 脂多糖;肺炎;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0864-06

## Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models

TANG Sixuan, XIAO Fang\*

(Department of Health Toxicology, Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

Corresponding author: XIAO Fang. E-mail: fangxiao@csu.edu.cn

**【Abstract】** Pneumonia involves the inflammation of terminal airways, alveoli and pulmonary interstitium, and can be caused by pathogenic microorganisms, immune damage, physical and chemical factors, allergies and other conditions. In recent years, many domestic and foreign scholars have used lipopolysaccharide to induce the incidence of pneumonia in animal models. However, there are many differences in these models, including the induction dose, modeling method, and selection of evaluation and detection indicators. Therefore, we sought to review the literature on animal models of lipopolysaccharide-induced pneumonia to provide a reference for the study of the pathogenesis, prevention and treatment of pneumonia.

**【Keywords】** lipopolysaccharide; pneumonia; animal model

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

肺炎(pneumonia)是指终末气道、肺泡和肺间质的炎症,可由病原微生物、免疫损伤、理化因素、过敏及药物等因素所致,主要临床症状为发热、咳嗽、咳痰,部分可发展为重型肺炎出现循环、呼吸衰竭而危及生命。细菌性肺炎是最常见的肺炎,也是最常见的感染性疾病之一。在抗菌药物应用之前,肺炎对健康的危害极大,抗菌药物的普遍应用后肺炎

的病死率一度呈下降趋势。但近年来,尽管强力抗菌药物不断被研发并应用于临床,肺炎的病死率非但无明显下降反而有所上升,目前其发病率、病死率及疾病负担仍保持在较高水平<sup>[1]</sup>。目前在老龄、幼龄和免疫力低下的人群中肺炎仍有很高的发病率和病死率,给社会及家庭带来沉重的疾病负担<sup>[2]</sup>。因此肺炎的发病机制、影响因素、预防措施

**【基金项目】**湖南省自然科学基金(2019JJ40402)。

Funded by Natural Science Foundation of Hunan Province(2019JJ40402).

**【作者简介】**唐思璇(1996—),女,硕士研究生,研究方向:环境污染致健康损害的毒理学研究。Email: tangsx@csu.edu.cn

**【通信作者】**肖芳,女,博士,副教授,博士生导师,研究方向:重金属分子毒理学,化学致癌机制,环境与健康相关研究。

Email: fangxiao@csu.edu.cn

及治疗方案一直是医学研究领域的热点问题。为了更好的了解肺炎发病机制、全面了解疾病全过程、考察药物的预防和治疗效果,在实验研究过程中建立稳定、便捷、重复性强、接近人类临床感染情况的肺炎动物模型则至关重要。

肺炎动物模型根据肺炎病原学可分为细菌性、真菌性、病毒性、衣原体支原体性、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导性、化学诱导性等多种类型,其中使用细菌建模的方法较常用。通常将细菌悬液使用不同的途径感染肺部,其与细菌感染所致肺炎相似,但操作较复杂,配置悬液时易引入杂菌影响实验结果。LPS 是革兰氏阴性(G-)细菌细胞壁中的一种成分,是 G-细菌的主要致病因子之一,由 Q-抗原、核心多糖、类脂 A 构成,其中类脂 A 是 LPS 主要的毒性中心和生物活性部分,高度保守且无种属特异性,故不同菌种感染后产生的 LPS 毒性作用大致相同<sup>[3]</sup>。LPS 在机体内可诱发炎症细胞浸润、炎症因子释放<sup>[4]</sup>,引起的炎症损伤与 G-菌真实感染相似,最初用于构建急性肺损伤的动物模型<sup>[5]</sup>,后逐渐用于建立肺炎动物模型。然而,在建立肺炎模型过程中,LPS 的诱导剂量和给药途径通常差异较大。故本文作者从 CNKI、Web of Science 及 PubMed 检索近年来利用 LPS 诱导肺炎模型的相关文献,从动物品种选择、造模方法及剂量、评价指标等多种角度进行比较,以期找到稳定、高效、易操作的脂多糖肺炎模型,为肺炎发病机制的研究提供可靠的实验依据和理论参考。

## 1 动物品系及性别选择

LPS 诱导的肺炎模型常选用啮齿动物,其中大鼠常用的品系有 Sprague Dawley 和 Wistar,小鼠常用的品系有 C57BL/6 和 BALB/c。需要注意的是,人与大鼠、小鼠的巨噬细胞的分布有所不同,大鼠、小鼠缺少肺泡巨噬细胞,其巨噬细胞主要存在于肝和脾,故全身给药后,血液中的 LPS 多在肝、脾中沉积<sup>[6]</sup>;而有肺泡巨噬细胞的物种(如人),较少量 LPS 即可引起明显的肺部炎症反应和肺损伤<sup>[7]</sup>。除此之外,选择动物时还应考虑其体型的大小,小鼠体型过小,测量一些生理参数(如动脉分压)受到限制,采集到的标本量也远不及大鼠,可能无法满足较多的研究指标检测。在性别选择方面大多数研究选择雄性动物作为实验对象,分析其原因可能为雄性动物较雌性动物体内激素水平更为稳定,对实

验干扰更小。袁伟锋等<sup>[8]</sup>在研究中使用了雌雄各半的 BALB/c 小鼠,但结果中未比较雌雄动物间的炎症反应是否存在差异。有研究指出,同物种不同品系间的动物对于 LPS 的敏感性也有差异,BALB/c 小鼠对 LPS 较 C57BL/6 小鼠更敏感<sup>[6]</sup>,但目前尚无 LPS 所致肺炎模型在不同品系或不同性别动物间的比较研究,故何种动物最适合用于构建 LPS 所致的肺炎模型还需要进一步证实。

## 2 造模方法的选择

使用 LPS 建立肺炎动物模型,常见的给药途径有:全身给药法<sup>[9-11]</sup>、气管内给药法<sup>[11-14]</sup>、吸入法<sup>[15-19]</sup>以及雾化法<sup>[20-22]</sup>等。

### 2.1 全身给药法

全身给药法包括腹腔注射法和尾静脉注射法。腹腔注射法<sup>[8,10-11]</sup>是将 LPS 溶液注射进腹膜内;尾静脉注射法<sup>[9]</sup>是将 LPS 溶液注射进尾静脉,尾静脉注射建模多使用大鼠。两种方法均是通过 LPS 作用于免疫系统引起全身免疫反应,而肺易受炎症损伤从而达到建模的目的。全身给药法在早期的肺炎建模中常用,但由于其诱发全身免疫反应较重,现也常用于建立急性呼吸窘迫综合症及脓毒症模型。

### 2.2 气管内给药法

气管内给药法又分为颈部皮肤切开气管注射法和经口气管内给药法。Conti 等<sup>[13]</sup>用异氟醚麻醉小鼠后固定,颈部备皮后切开皮肤暴露气管,使用 1 mL 注射器向管腔内注射 LPS 溶液,术后消毒并缝合伤口。Brown 等<sup>[12]</sup>使用经口可视化气管滴注法,将小鼠用氯胺酮麻醉后,用线将门齿固定在一倾斜 60°的木板上,打开口腔并拉出舌头,将 LPS 溶液通过插管滴入气道。大鼠经口气管滴注较好操作,小鼠较难操作,操作不当易导致实验失败,在 Su 等<sup>[23]</sup>的文章中使用一种透射冷光源照射声门后直视气管的灌注方法,并研究了插管深度与溶液进入肺部部位的关系,导管插入深度为 12~14 mm 液体分布至双肺,插入深度为 15~17 mm 时,则多数分布在单肺;杨彪等<sup>[24]</sup>将此方法进行了优化,并在文章中对操作过程进行了详细描述。

### 2.3 吸入法

吸入法主要包括口咽吸入法和经鼻吸入法(滴鼻法)。口咽吸入法<sup>[15-16]</sup>是将动物麻醉后置于倾斜的平板上打开口腔并牵拉舌,将 LPS 溶液滴于咽后

壁并马上捏住鼻子,待动物将药物吸入肺部后松开鼻子。滴鼻法<sup>[17-19]</sup>是将动物麻醉后,吸取 LPS 溶液滴入 2 个鼻腔中,并迅速捏住鼻孔,维持 20~30 s,待液体全部吸入鼻腔即可。

## 2.4 雾化法

雾化法需使用专用的暴露塔给药,动物不需进行麻醉,直接放入暴露塔中在清醒平静状态下吸入含有 LPS 的空气<sup>[20-22]</sup>。不同于其他方法,雾化法通常需要多次给药。由于需要专用的设备,使用该方法的研究较少。

## 2.5 不同方法间的优缺点比较

袁伟锋等<sup>[8]</sup>研究发现,气管滴入 LPS 后以肺组织破坏为主,表现为病理损伤显著而肿水肿相对较轻;腹腔注射 LPS 引起肺局部组织破坏较轻,肿水肿程度则比较显著。有研究认为腹腔注射法和尾静脉注射法不能很好的模拟肺炎发病过程,与肺部局部用药相比同样剂量下引起的肺部炎症反应较轻<sup>[11]</sup>,且容易引起全身炎症反应,若剂量过大易发生实验动物的死亡,因此研究人员多选择肺部局部给予 LPS 建立模型。张亚平等<sup>[20]</sup>在研究中比较发现滴鼻法大鼠肺组织炎症较轻,肺部病理变化组内差异较大,气管滴入法和口咽吸入法肺组织炎症较重;雾化吸入法大鼠炎症表现为中度,组内各实验动物肺部炎症损伤程度一致,病理变化表现稳定,组内差异小。在 Su 等<sup>[23]</sup>研究中发现,比起气管内滴注,滴鼻法进入肺部的溶液明显较少,溶液同样分布在鼻、气管、食管和胃中,分析可能与动物的吞咽反射有关。

因此,以上几种给药方式各有优缺点:全身给药方式早期应用较多,操作方法较为简单,但相同剂量下引起的肺部炎症反应较轻,由于引起全身炎症反应易出现中毒性休克,且血中炎症细胞及炎症因子不能很好地反映肺部受损的严重程度;颈部皮肤切开气管内注射法可精确的控制给药剂量,但其切口可能会被微生物感染而出现炎症,影响实验结果;经口气管内给药法无伤口,但对操作要求较高,需准确找到声门,否则易将 LPS 灌入食管,使造模失败,同时可能药物会仅作用在某一叶肺叶,不能造成全肺感染<sup>[25]</sup>;口咽吸入法和滴鼻法操作简单,但进入下呼吸道的 LPS 溶液量不可控,可能使实验结果产生较大变异<sup>[23]</sup>,同时由于药物可能在上呼吸道截留,达到相同的肺部炎症反应需要较多药物;雾化吸入法是通过自主呼吸给药,最接近肺炎

发病的过程,但其对实验室设备要求较高,同时吸入动物肺部的药物量无法估算,也可能会因为不同个体的呼吸深度不同而产生个体差异。

## 3 药物诱导剂量的选择

LPS 一般以动物体重给药,常见剂量为 1~10 mg/kg,需用生理盐水或 PBS 配成适宜的浓度,同时肺部局部给药的溶液不宜过多,如滴鼻法一般为 5~50  $\mu\text{L}$ <sup>[25]</sup>,过多可能引起动物窒息。张亚平等<sup>[20]</sup>以 1 mg/kg 的剂量处理大鼠后可观察到口咽吸入法和滴鼻法引起的肺部炎症与气管滴入法相比明显较轻;Chen 等<sup>[26]</sup>也提出,腹腔给药或静脉给药相同量的 LPS 溶液在肺部造成的组织损伤远不及经气管或气管内给药,故若选择以上两种方法应适当加大剂量,以确保建模的成功。LPS 5 mg/kg 是相关文献中出现频率最高的剂量,观察这些文献中肺组织病理切片可以发现,其肺部炎症反应严重,出现弥漫性的炎症细胞浸润,肺泡壁明显增厚,几乎无可辨认的肺泡结构,说明该剂量已导致重症肺炎,甚至可能已经出现了急性呼吸窘迫。D'Almeida 等<sup>[19]</sup>使用的剂量为每只 25  $\mu\text{g}$ ,换算成单位体重剂量仅约为 1.25~1.38 mg/kg,肺部切片也观察到了较明显的炎症反应。杨东等<sup>[16]</sup>使用口咽吸入法诱导小鼠急性肺炎模型时,使用剂量为每只 10  $\mu\text{g}$ ,按照小鼠体重换算后仅约为 0.5 mg/kg,已可以观察到明显的肺部炎症反应;焦光宇等<sup>[27]</sup>使用气管滴注法建立轻型肺炎模型时,使用的剂量仅为 0.1 mg/kg,处理后 4 h 可观察到肺组织有较多炎性细胞浸润,肺间隙水肿,但肺泡结构仍完好,结合血象结果后分析此剂量已成功建立肺炎模型。故在建立模型时,应充分考虑到动物体重、给药方式、研究目的,综合考虑后选择合适的诱导剂量。

## 4 评价指标

人类肺炎的诊断多依赖体查和 X 光检查,辅以血细胞计数、动脉血氧分数等实验室检查结果,但对于实验动物而言,界定其肺炎尚无统一的标准,虽然动脉血氧、影像检查等可在部分实验动物身上进行,但对实验室条件要求较高,大多数实验室并不具备完成此种检查的设备条件,故这些诊断标准并不能直接类推至实验动物。LPS 诱导的肺部炎症反应的特征为肺水肿、肺泡-毛细血管屏障的完整性的破坏以及广泛的中性粒细胞浸润和炎症介质

的释放<sup>[28]</sup>, 血浆蛋白和中性粒细胞渗漏到肺泡腔, 并伴有细胞因子的升高, 故相关评价指标主要有以下几类。

#### 4.1 肺组织病理学检查

病理学的变化是急性肺炎模型最直观的标志之一, 可直接反映肺组织炎症反应的程度。正常肺组织的特征是肺泡壁薄, 偶见肺泡内巨噬细胞, 中性粒细胞也较少; 当肺组织受外源性 LPS 刺激出现急性炎症反应时, 病理学表现为肺泡腔变小、肺泡壁充血水肿、炎性细胞尤其是中性粒细胞的浸润, 严重时几乎无法辨认肺泡结构。病理学形态学检查的结果可以通过肺组织病理学半定量评分进行量化比较。Mikawa 等<sup>[29]</sup>经典的肺组织病理半定量评分方法评分标准: 对肺泡充血、出血、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集、肺泡壁增厚和(或)透明膜形成等 4 项指标, 分别依病变轻重评为 0~4 分(0 分指无病变或非常轻微病变; 1 分为轻度病变; 2 分为中度病变; 3 分为重度病变; 4 分为极重度病变), 总分 16 分, 4 项评定分数总和为肺损伤的总评分。

#### 4.2 肺泡-毛细血管屏障的改变

肺泡-毛细血管屏障的完整性的破坏, 表现为血液中的蛋白质及体液渗漏至肺泡腔, 出现肺水肿, 常通过肺组织湿/干重比值(W/D)、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage liquid, BALF)中蛋白总量进行衡量。相比对照组, LPS 处理组肺组织湿/干重比值明显升高, 说明出现了肺水肿; 肺泡灌洗液中蛋白含量明显升高, 说明屏障受损后, 血浆蛋白向肺泡腔漏出。

#### 4.3 炎症反应的测量

与肺部炎症反应程度相关度最高的有三个指标: BALF 中中性粒细胞数量、BALF 中促炎细胞因子的浓度、肺组织中过氧化物酶的活性或浓度, 其中前两者是研究 LPS 所致肺炎中较为多见的检测指标<sup>[30]</sup>。

在 LPS 诱导的肺部炎症反应中, 中性粒细胞是诱导免疫反应的最重要的细胞之一, 在炎症早期即可观察到其显著的升高。故炎症反应的程度可以通过血液或 BALF 中中性粒细胞的数量进行评价, 但测量血液指标时多代表全身炎症反应的严重程度, 尤其是建模方式为腹腔注射或尾静脉注射时, 血液中中性粒细胞的数量可能不能完全代表局部炎症反应的严重程度。

在 LPS 诱导的肺部炎症反应中, 白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )是最早释放的主要前炎性细胞因子之一, 与肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )协同促进炎症反应的发生, 白介素-6(IL-6)也在 LPS 诱导的肺部炎症反应中起重要作用<sup>[31]</sup>。故在使用 LPS 建模的肺炎相关研究中, 这三种炎症因子是测量频率最高的炎症因子。值得一提的是, 焦光宇等<sup>[27]</sup>研究中虽然观察到了经气管注射 LPS 后, 肺组织炎症反应较腹腔注射法更为严重, 但血清和 BALF 中的 TNF- $\alpha$  水平在两种方法间却无明显差异, 表明肺部炎症反应与细胞因子水平可能不是平行关系。

#### 4.4 指标测量时间

指标测量时间也是实验成功的关键, 过早或过晚都可能得不到较好的实验结果。美国胸科协会认为观察肺部急性炎症损伤应在给予刺激后 24 h 内进行, 以区别肺部慢性及亚慢性损伤<sup>[30]</sup>。杨东等<sup>[18]</sup>在经口咽吸入 LPS 后的 3、6、12、24、48 h 分别处死小鼠, 比较其病理学改变, 发现 3 h 时仅出现轻微炎症细胞浸润, 6 h 时炎性细胞浸润明显, 12 h 时已无正常的肺泡壁结构, 24 h 时已出现明显肺实变; 宣国平等<sup>[32]</sup>在比较尾静脉给予 LPS 后 1、3、6、12 h 大鼠肺部组织切片、W/D 值、肺组织炎症因子水平后, 认为处理后 6 h 炎症反应达峰值, 为观察到的最佳测量时间, 处理后 12 h 肺组织炎症反应已较前减轻; 分析两个研究在 12 h 炎症反应程度出现差异可能由于药物给予方式不同。有研究指出, BALF 中炎症因子在 4 h 时已有明显升高, 但 24 h 时已经开始下降<sup>[11]</sup>; 在焦光宇等<sup>[27]</sup>研究中也观察到了相同的趋势, 说明若是将 24 h 作为测量点, 可能观察时间已经较晚。

## 5 小结

早期肺炎研究中, 常使用菌悬液建模, 但研究发现此种方法建模稳定性不强, 重复性不高, 影响因素较多; 后期作为 G-菌主要毒力成分的 LPS 逐渐用于建立肺炎模型、研究肺炎发病机制及预防治疗药物的研发; 但由于 LPS 仅为 G-菌主要致病成分, 与 G+菌所致肺炎的机制有所不同, 而肺炎致病菌中 G+菌也不容忽视, 故 LPS 用于构建细菌性肺炎模型可能存在一定的局限性。LPS 用于建立肺炎模型时, 给药途径较多, 各方法有各自的优缺点, 应根据研究的特点和实验室的条件综合考虑后进行选择。给药剂量方面目前尚无研究比较不同诱导剂量所

致的炎症反应的强弱,且受给药方式影响较大,而不同研究间由于操作过程、实验研究条件等因素的不同,无法进行横向比较,故仍需进一步的探索。动物实验中建立肺炎模型,通常由于给药剂量较大,引起肺部较重的炎症反应,但实际上人群中轻型肺炎发生率较高,多少剂量可以达到模拟轻型肺炎的发生,以及动物的轻型肺炎与重型肺炎如何界定,仍需进行更多的研究。只有动物模型更加地接近临床疾病发生发展情况,才能为药物研发、疾病预防、临床指导用药等方面提供更多的证据支持。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the global burden of disease study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095–2128.
- [ 2 ] Shi T, Denouel A, Tietjen AK, et al. Global and regional burden of hospital admissions for pneumonia in older adults: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Infect Dis*, 2019, 222(7): S570-S576.
- [ 3 ] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(12): 133–136.  
Zhang XY, Wu M, Li YM, et al. Progress on effects and mechanisms of lipopolysaccharides[J]. *Prog Vet Med*, 2015, 36(12): 133–136.
- [ 4 ] Meng L, Li L, Lu S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. *Mol Immunol*, 2018, 94: 7–17.
- [ 5 ] Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, et al. Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 117(3): 202–208.
- [ 6 ] 朱耀斌, 李晓峰, 张燕博, 等. 急性肺损伤动物模型[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(7): 625–628.  
Zhu YB, Li XF, Zhang YB, et al. Animal model of acute lung injury[J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2011, 25(7): 625–628.
- [ 7 ] O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, et al. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(7): 1591–1598.
- [ 8 ] 袁伟锋, 李理, 徐虹, 等. 气管内滴入与腹腔注射脂多糖致肺组织炎症损伤的动态变化比较[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2017, 16(3): 274–279.  
Yuan WF, Li L, Xu H, et al. Intraperitoneal instillation versus intratracheal injection of lipopolysaccharide: differences in establishment of acute lung injury model[J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2017, 16(3): 274–279.
- [ 9 ] 何征宇, 朱也森, 姜虹. 间断腹腔注射脂多糖制作内毒素诱导的小鼠急性肺损伤肺纤维化动物模型[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2010, 9(1): 76–80.  
He ZY, Zhu YS, Jiang H. Establishing a mouse model of acute lung injury and pulmonary fibrosis by intermittent lipopolysaccharide intraperitoneal injection[J]. *Chin J Respir Crit Care Med*, 2010, 9(1): 76–80.
- [ 10 ] Wu DQ, Wu HB, Zhang M, et al. Effects of zinc finger protein A20 on lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation/anti-inflammatory mediators in an acute lung injury/acute respiratory distress syndrome rat model[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3536–3545.
- [ 11 ] 李洪霞, 张进川, 刘岩. 气管滴入及腹腔注入内毒素致大鼠急性肺损伤机制的研究[J]. *军医进修学院学报*, 2003, 24(1): 4–6.  
Li HX, Zhang JC, Liu Y. The difference in acute lung injury caused by intratracheal instillation or intraperitoneal injection of LPS[J]. *Acad J PLA Med Sch*, 2003, 24(1): 4–6.
- [ 12 ] Brown EJ, Johansen M, Looney MR, et al. CD47 deficiency protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury and *Escherichia coli* pneumonia[J]. *J Immunol*, 2008, 180(10): 6947–6953.
- [ 13 ] Conti G, Tambalo S, Villetti G, et al. Evaluation of lung inflammation induced by intratracheal administration of LPS in mice: comparison between MRI and histology[J]. *MAGMA*, 2010, 23(2): 93–101.
- [ 14 ] 成果, 廖瑛, 周君, 等. 脂多糖诱导大鼠吸入性肺炎动物模型的建立[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(5): 396–399.  
Chen G, Liao Y, Zhou J, et al. Establishment of animal model of aspiration pneumonia in rats induced by lipopolysaccharide[J]. *Chin Prev Med*, 2019, 20(5): 396–399.
- [ 15 ] 金婉冰. 白藜芦醇对脂多糖诱导的小鼠重症肺炎的保护作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(12): 1352–1356.  
Jin WB. Protective effect of resveratrol on LPS-inducing mice acute lung inflammation[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2011, 16(12): 1352–1356.
- [ 16 ] 杨东, 仇玮玮, 张畅, 等. 地塞米松治疗 LPS 诱导急性肺炎模型小鼠病理学评价方法的建立[J]. *实验动物科学*, 2013, 30(4): 9–12, 65.  
Yang D, Qiu WY, Zhang C, et al. Establishing of pathological evaluation method for the therapeutic effect of dexamethasone in a LPS-induced mouse acute pneumonia model[J]. *Lab Anim Sci*, 2013, 30(4): 9–12, 65.
- [ 17 ] Ni YL, Shen HT, Su CH, et al. Nerolidol suppresses the inflammatory response during lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the modulation of antioxidant enzymes and the AMPK/Nrf-2/HO-1 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 9605980.
- [ 18 ] Lee JW, Ryu HW, Lee SU, et al. *Pistacia weinmannifolia* ameliorates cigarette smoke and lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting interleukin-8 production and NF- $\kappa$ B activation[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 949–959.
- [ 19 ] D'Almeida APL, Pacheco de OMT, de Souza ÉT, et al.  $\alpha$ -bisabolol-loaded lipid-core nanocapsules reduce lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice[J].

- Int J Nanomedicine, 2017, 12: 4479-4491.
- [20] 张亚平, 张广平, 苏萍, 等. 不同途径吸入脂多糖致大鼠急性肺炎模型的优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(7): 82-88.
- Zhang YP, Zhang GP, Su P, et al. Selection of acute pneumonia rat models induced by lipopolysaccharide with different inhalation pathways[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(7): 82-88.
- [21] Schuh K, Pahl A. Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury [J]. Biochem pharmacol, 2009, 77(12): 1827-1834.
- [22] Brass DM, Savov JD, Gavett SH, et al. Subchronic endotoxin inhalation causes persistent airway disease [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(3): L755-L761.
- [23] Su X, Looney M, Robriquet L, et al. Direct visual instillation as a method for efficient delivery of fluid into the distal airspaces of anesthetized mice[J]. Exp Lung Res, 2004, 30(6): 479-493.
- [24] 杨彪, 李新鸣, 严思远, 等. 应用冷光源内窥镜和点样吸头完成的新型小鼠气管滴注法[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 585-587.
- Yang B, Li XM, Yang SY, et al. A new method of mouse tracheal instillation with endoscope of cold light and gel loading tips[J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(4): 585-587.
- [25] Hraiech S, Papazian L, Rolain JM, et al. Animal models of polymicrobial pneumonia[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 3279-3292.
- [26] Chen H, Bai CX, Wang XD. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. Expert Rev Resp Med, 2010, 4(6): 773-783.
- [27] 焦光宇, 聂志伟, 刘春利, 等. 小剂量脂多糖气管内滴注制备急性肺损伤动物模型的探究[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 292-295, 231.
- Jiao GY, Nian ZW, Liu CL, et al. A rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(4): 292-295, 231.
- [28] Suda K, Tsuruta M, Eom J, et al. Acute lung injury induces cardiovascular dysfunction: effects of IL-6 and budesonide/formoterol[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(3): 510-516.
- [29] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits[J]. Anesth Analg, 2003, 97(6): 1751-1755.
- [30] Gustavo MB, Gregory D, Bethany BM, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44(5): 725-738.
- [31] Yang Y, Yi L, Wang Q, et al. Anti-inflammatory effects of physalin E from *Physalis angulate* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2017, 39(2): 74-79.
- [32] 宣国平, 张琳, 钟明媚. 脂多糖致大鼠急性肺损伤模型取材时间选择[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(2): 136-138.
- Xuan GP, Zhang L, Zhong MM. Selection of sampling time for preparing lipopolysaccharide-induced acute lung injury rat model [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2015, 29(2): 136-138.

[收稿日期] 2020-05-14

唐艺丹,王鲜忠,张姣姣. II型糖尿病动物模型构建的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 870-876.

Tang YD, Wang XZ, Zhang JJ. Research progress in the construction of type II diabetes animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 870-876.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.020

## II型糖尿病动物模型构建的研究进展

唐艺丹,王鲜忠,张姣姣\*

(西南大学动物医学院,重庆 400715)

**【摘要】** 糖尿病是以高血糖为特征的多因素引发的代谢性疾病,对人类的健康造成了严重威胁。构建相应的糖尿病动物模型对研究其发病机制、预防、诊断及新治疗药物的筛选具有十分重要的意义。本文在概述自发性和诱导性II型糖尿病动物模型构建的基础上,重点阐述了利用基因工程技术构建II型糖尿病动物模型的方法,并探讨了各种构建方法的优缺点,旨在为揭示糖尿病的发病机制及治疗提供合适的动物模型。

**【关键词】** II型糖尿病;动物模型;STZ;基因编辑

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0870-07

### Research progress in the construction of type II diabetes animal models

TANG Yidan, WANG Xianzhong, ZHANG Jiaojiao\*

(College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Corresponding author: ZHANG Jiaojiao. E-mail: zhangjjff@126.com

**【Abstract】** Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by hyperglycemia and caused by many factors. Diabetes poses a serious threat to human health. It is of great significance to construct a corresponding animal model of diabetes to study its pathogenesis, prevention, and diagnosis and to screen new drugs. On the basis of summarizing the construction of animal models of spontaneous and induced type II diabetes, this paper focused on the construction of animal models of type II diabetes using genetic engineering technology and discussed the advantages and disadvantages of various construction method to provide appropriate animal models for unraveling the pathogenesis and treatment of diabetes.

**【Keywords】** type II diabetes; animal model; STZ; gene editing

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

近年来糖尿病患病率和死亡率明显增加,在我国已成为了继心血管疾病和肿瘤之后位列第三位的多发性和慢性非传染性疾病。在糖尿病患者中,II型糖尿病约占90%以上<sup>[1]</sup>。II型糖尿病主要由胰岛素抵抗和胰岛素分泌不足引起<sup>[2]</sup>,构建糖尿病动物模型能够较好地模拟糖尿病的发生与发展过程,有利于揭示糖尿病的发病机制以及治疗药物的筛选<sup>[3]</sup>,在生物医学和转化医学等领域具有广泛的

应用价值。构建不同的糖尿病动物模型有利于进行不同领域的糖尿病研究,如糖尿病引起的心血管病变、肾病、神经病变及糖尿病足等。传统构建II型糖尿病动物模型的方法主要包括自发性和诱导性建模,其方法较成熟,操作简单,能更好地模拟II型糖尿病的发生与发展过程。啮齿类动物(如大鼠、小鼠)的基因组与人类基因组具有较高的同源性,并且关于啮齿类动物基因图谱的研究较为成

**【基金项目】** 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0056),重庆市高等教育教学改革研究项目(203259),西南大学科技论文写作课程思政项目。

Funded by General Project of Chongqing Natural Science Foundation (cstc2019jcyj-msxmX0056), Chongqing Higher Education Teaching Reform Research Project (203259), Scientific Paper Writing Curriculum Ideological and Political Project of Southwest University.

**【作者简介】** 唐艺丹(1998—),女,本科,研究方向:动物医学。Email:1411764133@qq.com

**【通信作者】** 张姣姣(1988—),女,硕士生导师,研究方向:动物生殖生理与生物技术。Email:zhangjjff@126.com

熟,因此,啮齿类动物常用作动物模型来进行病理机制的研究和药物研发。利用基因工程技术构建相关基因型的 II 型糖尿病动物模型,有利于从基因和分子水平上阐述人类糖尿病的发病机制。本文在概述自发性和诱导性 II 型糖尿病动物模型构建的基础上,着重阐述了利用基因工程技术构建 II 型糖尿病动物模型的方法及其造模机制,分析了不同 II 型糖尿病动物模型的优点、缺点和适用范围,为揭示糖尿病的发病机制及治疗奠定理论基础。

## 1 自发性 II 型糖尿病动物模型

自发性 II 型糖尿病动物模型是指在自然条件下,未经过人工处理而发生 II 型糖尿病的实验动物,利用自发性 II 型糖尿病的动物进行育种,其后代仍患 II 型糖尿病。目前筛选成功并能作为种系保存下来的自发性糖尿病动物模型主要是啮齿类动物<sup>[4]</sup>。自发性 II 型糖尿病模型动物的糖尿病发生和发展过程及表现与人类的 II 型糖尿病相似,尤其是在多基因模型中,适合于构建糖尿病及其他代谢性疾病等多因素疾病模型以及糖代谢缺陷模型<sup>[5]</sup>。主要缺点是来源相对较少,价格昂贵,繁殖和饲养条件严格,而且频繁的同系繁殖造成的单基因遗传使模型动物糖尿病的发生和发展特性与人类糖尿病有所差异<sup>[6]</sup>。

### 1.1 近远杂交系

#### 1.1.1 GK(Goto-Kakizaki)大鼠

GK 大鼠是 Wistar 大鼠经过口服糖耐量实验后筛选出轻度糖耐量减退的大鼠,经过 10 代左右反复选择高血糖鼠进行交配,最后形成与人类 II 型糖尿病近似的自发性非肥胖 II 型糖尿病的鼠种<sup>[7]</sup>。GK 大鼠主要表现为葡萄糖耐受不良, $\beta$  细胞分泌受损,空腹高血糖和高脂血症,肝糖原生成增多,肝、肌肉和脂肪组织出现中度胰岛素抵抗等,长期患病后出现肾、心脏并发症和神经元衰退及认知障碍<sup>[8]</sup>。因此,GK 大鼠已广泛应用于 II 型糖尿病研究的各个方面,不仅包括糖尿病的胰岛素分泌缺陷以及  $\beta$  细胞形态、结构和功能紊乱等研究,还涉及糖尿病各种并发症的研究。因此利用 GK 大鼠模型有利于从组织学、病因学、病理学等多个角度揭示 II 型糖尿病及其并发症的致病机理。

#### 1.1.2 OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)大鼠

OLETF 大鼠是利用 Long-Evans 大鼠进行远系

杂交后,选择体重 > 400 g 的雄性后代与体重在正常范围的 9~10 周的雌性后代进行交配,然后经过 20 代的传代筛选得到体形肥胖的 II 型糖尿病大鼠模型。OLETF 大鼠除了表现胰岛素抵抗和糖脂代谢紊乱外,还表现出肥胖,因此该动物模型适合于研究由肥胖引起的 II 型糖尿病<sup>[9]</sup>。由于 OLETF 大鼠的胆囊收缩素 A 型受体(cholecystokinin type A receptor, CCKAR)的基因表达完全缺失,因此 OLETF 大鼠常表现为出现食欲亢进和肥胖,此外,OLETF 大鼠 X 染色体上的 ODB1 基因和 14 号染色体上的 ODB2 基因与 II 型糖尿病的发病密切相关<sup>[10]</sup>。因此,OLETF 大鼠模型可作为 CCKAR、ODB1、ODB2 基因研究的动物材料。

### 1.2 基因缺陷型

#### 1.2.1 db/db 小鼠

db/db 小鼠 4 号染色体的瘦素受体基因发生缺陷,从而导致自发性 II 型糖尿病。db/db 小鼠的主要表现为肥胖、高血糖、高血脂和糖尿等症状,其生理与行为特征与人类 II 型糖尿病的表现极为相似<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.2 KKay 小鼠

KKay 小鼠是将黄色肥胖基因转入 KK 小鼠而形成的 II 型糖尿病动物模型。KKay 小鼠的主要表现为肥胖、葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗等,与人类 II 型糖尿病相似,尤其是肾小球的病理变化与人类糖尿病肾病早期观察到的病理变化一致,并且 KKay 小鼠由糖尿病并发的肾组织病变比 KK 小鼠严重<sup>[12]</sup>。

## 2 诱导性 II 型糖尿病动物模型

诱导性 II 型糖尿病动物模型是指通过物理、生物和化学等致病因素,损伤动物胰或胰岛细胞进而导致胰岛素缺乏,或运用各种拮抗剂对抗胰岛素的作用,人工诱导具有 II 型糖尿病特征动物模型。构建诱导性 II 型糖尿病动物模型应从致病原因的角度来模拟人类 II 型糖尿病,避免只从病态反应进行模拟。构建诱导性 II 型糖尿病模型的方法比较简单,造模率较高,目前广泛应用于 II 型糖尿病的研究,但缺点是造模时间较长。

### 2.1 胰腺切除法

胰腺切除法是最早的糖尿病动物模型的构建方法。狗的胰腺被切除后,出现多尿、多饮、多食和严重的糖尿现象<sup>[5]</sup>。切除胰腺的猪的葡萄糖耐量

低于正常,从而可构建糖尿病模型<sup>[13]</sup>。但胰腺切除法单独使用一般是构建 II 型糖尿病模型,要构建 II 型糖尿病模型还需要联合其他化学药物,如链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、四氧嘧啶等<sup>[14]</sup>。

## 2.2 膳食诱导法

膳食诱导法是目前较为简单方便的糖尿病动物模型的构建方法,一般利用高糖高脂的饲料连续饲喂实验动物,其原理为糖在体内直接可导致高血糖,在长期高糖膳食诱导下引起糖代谢异常,继而导致 II 型糖尿病,此外,高脂引起的脂代谢异常,进而导致 II 型糖尿病。沙鼠在饲喂高能膳食后表现出糖尿病症状,出现肌胰岛素抵抗、 $\beta$  细胞功能失常、胰岛素前体分泌增加、胰岛素信号通路失活<sup>[15]</sup>。在广西巴马小型猪<sup>[16]</sup>以及非人灵长类动物如食蟹猴<sup>[17]</sup>上使用膳食诱导法都成功诱导出了糖尿病症状。膳食诱导法目前主要用于构建糖尿病大动物模型,有利于糖尿病血管并发症等疾病的相关研究。

## 2.3 化学药物诱导法

### 2.3.1 STZ

STZ 是目前使用最广泛的糖尿病动物模型化学诱导剂,它能对哺乳动物胰岛  $\beta$  细胞产生特异性毒性,STZ 主要通过产生自由基损伤  $\beta$  细胞的功能,引起胰岛素合成减少,从而诱发糖尿病<sup>[18]</sup>。为了取得良好的 II 型糖尿病造模效果,STZ 常与胰腺切除法联合使用。通过手术切除实验动物的胰腺钩突及体尾部,然后局部或全身注射 STZ,进而构建胰岛素分泌不足的 II 型糖尿病动物模型<sup>[19]</sup>。这种方法的优点是克服了切除全部胰所致的其他器官的严重创伤,且避免了大剂量使用 STZ 对其他组织器官的严重损伤。此外,STZ 还可以联合高脂饮食诱导 II 型糖尿病。高脂饲料诱导大鼠 6 ~ 8 周后出现胰岛素抵抗,然后腹腔注射小剂量的 STZ,II 型糖尿病的造模成功率可达 79%<sup>[20]</sup>。STZ 的剂量受高能饮食喂养时间的影响,高能饮食诱导的时间越长,动物的胰岛素抵抗表现越明显,所需的 STZ 剂量就相应减少<sup>[21]</sup>,STZ 给药途径或者模型建立的标准不同也会造成所需 STZ 的剂量出现差异。

### 2.3.2 四氧嘧啶

四氧嘧啶的机理与 STZ 相似,主要通过产生超氧自由基破坏  $\beta$  细胞,导致胰岛素合成减少,但与 STZ 相比,四氧嘧啶引起的高血糖症具有不稳定性和可逆性。因此,由四氧嘧啶引起的糖尿病模型不足以恰当地评估抗糖尿病药物的降血糖作用<sup>[22]</sup>。

一次性腹腔注射四氧嘧啶的剂量在 100 ~ 250 mg/kg 范围内,造模成功率与注射剂量呈正相关,死亡率与注射剂量呈负相关。研究表明腹膜内给药 170 mg/kg 和 200 mg/kg 的四氧嘧啶的致糖尿病作用在两个剂量之间没有显示出显著( $P < 0.05$ )差异,造模成功率高达 90%。但在死亡率上,170 mg/kg 剂量组的死亡率较低<sup>[23]</sup>。

## 3 基因工程糖尿病动物模型

基因工程糖尿病动物模型是利用基因修饰技术对特定 DNA 片段进行定点敲除、敲入以及替换来实现基因表达的上调或下调,从而构建相关基因型的 II 型糖尿病动物模型。利用基因工程技术构建的 II 型糖尿病动物模型可以稳定遗传,有利于研究 II 型糖尿病及其并发症的发病机制和潜在的新疗法<sup>[24]</sup>。II 型糖尿病是由多个基因表达改变联合环境和遗传因素等共同引起的,而基因工程构建的 II 型糖尿病动物模型具有较高的单基因模拟,因此很难完全模拟临床实际中的 II 型糖尿病的发生与发展过程。相信随着基因工程技术的进步,稳定遗传的基因工程动物将会成为研究 II 型糖尿病的主要模型。

### 3.1 II 型糖尿病相关基因

外周组织器官的胰岛素抵抗和胰岛  $\beta$  细胞分泌功能障碍是 II 型糖尿病发病过程中的两个重要环节,胰岛素信号转导缺陷是产生胰岛素抵抗和影响胰岛素分泌的重要机制<sup>[25]</sup>。胰岛素、胰岛素受体(insulin receptor, IR)、胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)、胰岛素样生长因子 1 受体(insulin like growth factor 1 R, IGF1R)是常见的糖尿病相关基因<sup>[26]</sup>。胰岛素与 IR 结合后可以激活酪氨酸激酶,使 IRS 发生磷酸化,磷酸化的 IRS 可以激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)信号通路。PKB 一方面可以直接激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR),另一方面还可以通过结节性硬化复合体(tuberous sclerosis complex, TSC)间接调控 mTOR 的表达<sup>[27]</sup>,进而影响糖转运蛋白的合成和降低血糖水平<sup>[28-29]</sup>。研究发现,IR 基因缺失纯合子(IR<sup>-/-</sup>)小鼠在出生不久后会出现代谢紊乱、生长迟缓、轻度胰岛素抵抗、 $\beta$  细胞增生和高胰岛素血症<sup>[21]</sup>;IRS-1 基因缺失纯合子(IRS-1<sup>-/-</sup>)小鼠在成年后出现胰岛素抵抗

与  $\beta$  细胞增生<sup>[21]</sup>。类胰岛素生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) 与 IR 具有相似的结构, 可通过与 IGF1R 结合来介导类胰岛素效应, IGF1 基因缺失患者表现出严重的胰岛素抵抗与高血糖水平<sup>[30]</sup>。

瘦素与 II 型糖尿病的发生也有密切关系。瘦素与瘦素受体相结合后, 通过两条途径发挥其生理功能。一是作用于下丘脑的代谢调节中枢, 抑制食欲、减少能量摄入, 即中枢途径。二是影响胰岛素的释放、葡萄糖的吸收及代谢等方面, 即外周途径<sup>[31]</sup>。在外周途径中, 瘦素通过 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 依赖性途径激活肝细胞中 AMP 激活的蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)<sup>[32]</sup>, 并影响 mTOR 信号通路, 进而调节葡萄糖转运蛋白的易位和细胞表面水平。瘦素缺乏或瘦素抵抗能够影响机体脂代谢和糖代谢的过程, 从而诱发 II 型糖尿病<sup>[33]</sup>。此外, 转录因子 7 类似物 2 (transcription factor 7 like 2, TCF7L2) 基因是迄今为止发现的与 II 型糖尿病相关性最强的基因之一, 有调节胰岛素分泌、外周胰岛素抵抗以及维持血糖水平稳定的功能<sup>[34]</sup>, TCF7L2 基因变异型患者的胰岛素分泌水平降低, 更易患 II 型糖尿病<sup>[35]</sup>。葡萄糖激酶 (glucokinase, GCK) 是肝细胞和胰岛  $\beta$  细胞中葡萄糖代谢途径中的第一个关键酶, 对于血糖稳态的维持具有重要的调节作用。肿瘤坏死因子受体超家族成员 9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, TNFRSF9) 基因可以通过编码 CD137 影响非肥胖糖尿病 (no obesity diabetes, NOD) 小鼠的糖尿病进程, T 细胞在敲除 TNFRSF9 基因后可促进 II 型糖尿病的发展<sup>[36]</sup>。胰十二指肠同源盒 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1) 在胰腺发育及  $\beta$  细胞功能维持中起重要调控作用, PDX1 基因纯合缺失会导致胰腺发育不全, 胰岛素分泌障碍, 从而导致糖尿病<sup>[37]</sup>。ATP 敏感性钾 (ATP-sensitive potassium channel, K-ATP) 通道的亚基内向整流钾通道 (Kir6.2) 也能够调节胰岛素分泌, 当血糖浓度升高时,  $\beta$  细胞代谢活跃, 产生大量 ATP, ATP 与 Kir6.2 结合后使 K-ATP 通道关闭, 引起细胞膜去极化, 使电压依赖性的钙离子通道开放, 钙离子内流引起胰岛素释放<sup>[38]</sup>。因此, 这些与糖尿病相关的基因常被选择作为基因工程改造的对象, 以模拟糖尿病的发生。

## 3.2 基因工程技术在 II 型糖尿病动物模型中的应用

### 3.2.1 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 打靶

ES 细胞打靶是通过同源重组技术对特定位点的基因进行改造, 使两个同源区域之间发生基因组重排, 然后通过显微注射或者胚胎融合的方法将 ES 细胞引入受体胚胎内, 最后获得能稳定遗传的基因修饰的动物模型<sup>[39]</sup>。目前已有使用 ES 打靶技术获得的相关 II 型糖尿病动物模型。利用 ES 打靶技术敲除小鼠的 TCF7L2 基因后, 在高脂饮食的诱导下, 小鼠的葡萄糖耐量降低、胰岛素敏感性受损、胰岛素分泌减少、体重增加和脂肪组织增加<sup>[40]</sup>; 利用 ES 打靶技术敲除小鼠 GCK 基因的 C57BL6J 位点, 其后代小鼠的空腹血糖水平显著增加, 葡萄糖耐量降低<sup>[41]</sup>; 利用 ES 打靶技术敲除小鼠 Kir6.2 基因后, K-ATP 通道被激活, 使  $\beta$  细胞对高糖刺激失去反应, 钙离子不能内流, 进而降低了胰岛素的分泌<sup>[42]</sup>。因此, 通过 ES 打靶技术可构建胰岛素分泌不足的 II 型糖尿病动物模型。

### 3.2.2 基因编辑技术

基因编辑是利用核酸酶对 DNA 片段进行靶向修饰的一种基因工程技术。常用的核酸工具酶包括锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及 CRISPR 相关核酸酶 (CRISPR associated, Cas) 系统。相比于传统的细胞打靶技术, 基因编辑技术更易操作<sup>[43]</sup>, 建模效率更高, 并且可以同时实现单个基因或多个基因的改变<sup>[44]</sup>。

(1) ZFNs 由重复的锌指蛋白 (zinc finger protein, ZFP) 和 FokI 核酸内切酶组成, 锌指蛋白用于识别和结合特定的基因序列, FokI 核酸内切酶可以特异性切割目的基因<sup>[45-46]</sup>, 然后 DNA 双链发生断裂, 细胞通过同源重组或非同源末端连接进行 DNA 修复。因此, 通过人为设计引入碱基突变、片段替换、插入或缺失可以实现基因的定点修饰。利用 ZFNs 技术, 通过胚胎显微注射直接有效地敲除 NOD 小鼠的 TNFRSF9 基因, 已成功构建出 II 型糖尿病小鼠模型<sup>[47]</sup>。由于各个 ZFP 之间能相互干扰, 易产生脱靶效应, 在使用上有局限性, 因此 Nishio 等<sup>[48]</sup>对 ZFNs 进行了优化, 通过 DNA 适体将 ZFNs

与绿色荧光蛋白基因进行结合,然后转染到 HEK293 细胞内,这样 ZFP 之间的相互干扰就会明显降低,ZFNs 的基因编辑建模效率显著提高。

(2)TALENs 由激活因子样效应物和 FokI 核酸酶组成,激活因子样效应物能特异性识别和结合 DNA 碱基对,FokI 核酸酶能在特定位点切断 DNA 双链<sup>[49-50]</sup>,进而激活 DNA 双链的修复机制。与 ZFNs 技术相比,TALENs 设计更简单,特异性更高,但模块组装过程较繁琐,具有一定的细胞毒性<sup>[51]</sup>。TALENs 技术已被广泛应用于多种模式动物的基因组修饰。利用 TALENs 技术对 PDX1 基因进行编辑后,获得了 PDX1 缺陷猪,表现为胰腺缺乏,但胃肠道和其他内脏器官显示正常<sup>[39]</sup>。由于胰腺切除术较难完全切除胰腺,或者在充分切除胰腺时可能损伤到其他组织<sup>[52]</sup>,因此,利用 TALENs 技术构建的先天性胰腺缺乏的糖尿病动物模型要优于胰腺切除术构建的模型。

(3)CRISPR/Cas 是一种 RNA-蛋白质的复合体,由成簇的规律性间隔的短回文重复序列 CRISPR 和 Cas 核酸酶组成。CRISPR/Cas9 复合物能在一段小 RNA 指导下,通过 PAM 序列定向寻找目标 DNA,然后对 DNA 双链进行切割,从而启动 DNA 双链的修复。

目前 CRISPR/Cas9 基因编辑技术广泛用于胚胎水平的基因编辑,从而获得基因修饰的动物模型<sup>[53]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 敲除胰岛素基因后,仔猪的胰腺中胰岛素不表达,出现血糖升高和糖尿等症状<sup>[54]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 敲除  $\beta$  细胞的 IR,高脂饮食小鼠的 PI3K-AKT 信号转导减少,葡萄糖转运蛋白表达量下降,导致葡萄糖耐受不良,进而出现 II 型糖尿病症状<sup>[55]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠 IRS 基因,大鼠表现出糖耐受损伤,并伴随有胰岛素抵抗和高胰岛素血症等 II 型糖尿病症状<sup>[56]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 同时敲除 IRS 和瘦素受体基因后,大鼠模型出现肥胖、血脂异常、轻度血糖升高等糖尿病症状<sup>[57]</sup>。此外,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除刺鼠相关神经元中的瘦素受体基因后,小鼠模型出现体重增加、脂肪含量增加、高血糖症等糖尿病症状<sup>[58]</sup>。因此,利用 CRISPR/Cas9 系统可以有效地构建基因缺失的糖尿病动物模型。

## 4 结语

构建糖尿病的动物模型是研究糖尿病发病机

制及研发新型治疗药物的关键,但目前尚没有能够完全模拟人类糖尿病发生发展过程的动物模型。本文总结了常用的构建 II 型糖尿病动物模型的方法,并比较了各种构建方法的优缺点。由于自发性糖尿病动物模型的血糖升高不显著,化学诱导的动物模型成模率较低和死亡率较高,基因工程糖尿病动物模型耗时较长以及对技术设备和饲养环境要求较高等缺点,因此,在研究 II 型糖尿病发病机制的过程中,要尽量选择最合适的糖尿病动物模型,如何利用较低的成本在短时间内成功构建 II 型糖尿病动物模型也是以后的研究需要解决的难题。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Ma Q, Li Y, Li P, et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109-138.
- [2] Bosun-Arije FS, Ling J, Graham Y, et al. A systematic review of factors influencing type 2 diabetes mellitus management in nigerian public hospitals [J]. *Int J Africa Nurs Sci*, 2019, 11:100151.
- [3] Dennis JM, Shields BM, Henley WE, et al. Disease progression and treatment response in data-driven subgroups of type 2 diabetes compared with models based on simple clinical features: an analysis using clinical trial data [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(6): 442-451.
- [4] Asrafuzzaman M, Cao Y, Afroz R, et al. Animal models for assessing the impact of natural products on the aetiology and metabolic pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1242-1251.
- [5] Brito CY, Meliún C, Wágner AM. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models [J]. *Endocrinol Nutr*, 2016, 63(7): 345-353.
- [6] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. *Indian J Med Res*, 2007, 125(3): 451-472.
- [7] Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus [J]. *In Vivo*, 2009, 23(2): 245-258.
- [8] Bihoreau MT, Dumas ME, Lathrop M, et al. Genomic regulation of type 2 diabetes endophenotypes: contribution from genetic studies in the Goto-Kakizaki rat[J]. *Biochimie*, 2017, 143: 56-65.
- [9] Fukaya N, Mochizuki K, Tanaka Y, et al. The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol delays the development of diabetes and dysfunctional insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells in OLETF rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 624(1): 51-57.
- [10] Hirashima T, Kawano K, Mori S, et al. A diabetogenic gene, ODB2, identified on chromosome 14 of the oletf rat and its synergistic action with ODB1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(2): 420-425.

- [11] Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, et al. Animal models of metabolic syndrome; a review[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13: 65.
- [12] Omote K, Gohda T, Murakoshi M, et al. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(11): 1335–1347.
- [13] Davis SS, Goldblatt MI, Roy S, et al. Laparoscopic total pancreatectomy in domestic swine; a novel technique to provide a large animal model of insulin dependant diabetes[J]. *J Surg Res*, 2006, 130(2): 304.
- [14] Graham ML, Schuurman HJ. Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 221–230.
- [15] Shafir E, Ziv E, Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *acomys cahirinus* (spiny mice) and *psammomys obesus* (desert gerbil)[J]. *ILAR J*, 2006, 47(3): 212–224.
- [16] Wu Y, Zhang L, Liang J, et al. Comparative analysis on liver transcriptome profiles of different methods to establish type 2 diabetes mellitus models in Guangxi Bama mini-pig[J]. *Gene*, 2018, 673: 194–200.
- [17] Li X, Lin Z, Zhan X, et al. RNA-seq analysis of the transcriptome of the liver of cynomolgus monkeys with type 2 diabetes[J]. *Gene*, 2018, 651: 118–125.
- [18] Lin M, Ai J, Harden SW, et al. Impairment of baroreflex control of heart rate and structural changes of cardiac ganglia in conscious streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice[J]. *Auton Neurosci*, 2010, 155(1–2): 39–48.
- [19] Kurup S, Bhonde RR. Combined effect of nicotinamide and streptozotocin on diabetic status in partially pancreatectomized adult BALB/c mice[J]. *Horm Metab Res*, 2000, 32(8): 330–334.
- [20] 汪悦, 杨阳, 邬颖华. 高能量饮食联合 STZ 诱导 2 型糖尿病肾病动物模型研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(92): 84–86.  
Wang Y, Yang Y, Wu Y. High-energy diet joint STZ induced animal models of type 2 diabetic nephropathy; a review [J]. *World Latest Med Inform*, 2018, 18(92): 84–86.
- [21] Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat; incorporating a high-fat diet and streptozotocin[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 605–613.
- [22] Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies[J]. *Medicina*, 2017, 53(6): 365–374.
- [23] Ighodaro OM, Adeosun AM, Asejeje FO, et al. Time course effects of 5,5-dihydroxyl pyrimidine-2,4,6-trione (alloxan) as a diabetogenic agent in animal model[J]. *Alex J Med*, 2018, 54(4): 705–710.
- [24] 刘雪静, 王欢, 严放, 等. 大中型动物基因敲除技术的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2015, 46(1): 11–16.
- Liu XJ, Wang H, Yan F, et al. The development of gene knockout technologies in large and medium animal models[J]. *Prog Physiol Sci*, 2015, 46(1): 11–16.
- [25] Yin C, Liu WH, Liu Y, et al. Correction; PID1 alters the antilipolytic action of insulin and increases lipolysis via inhibition of AKT/PKA pathway activation [J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218721.
- [26] Tian Y, Xu J, Du X, et al. The interplay between noncoding RNAs and insulin in diabetes[J]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 53–63.
- [27] Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(9): 545–555.
- [28] Ardestani A, Lupse B, Kido Y, et al. mTORC1 signaling; a double-edged sword in diabetic  $\beta$  cells[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 314–331.
- [29] Ho CK, Sriram G, Dippl KM. Insulin sensitivity predictions in individuals with obesity and type II diabetes mellitus using mathematical model of the insulin signal transduction pathway [J]. *Mol Genet Metab*, 2016, 119(3): 288–292.
- [30] Aguirre GA, de Ita JR, de la Garza RG, et al. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 3.
- [31] D' souza AM, Neumann UH, Glavas MM, et al. The glucoregulatory actions of leptin[J]. *Mol Metab*, 2017, 6(9): 1052–1065.
- [32] Uotani S, Abe T, Yamaguchi Y. Leptin activates AMP-activated protein kinase in hepatic cells via a JAK2-dependent pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(1): 171–175.
- [33] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK/mTOR 信号通路的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(3): 109–116.  
Zhang XY, Mao JD, Yang XY, et al. Advances in AMPK/mTOR signaling[J]. *J Microbiol*, 2019, 39(3): 109–116.
- [34] Wang J, Zhao J, Zhang J, et al. Association of canonical wnt/ $\beta$ -catenin pathway and type 2 diabetes; genetic epidemiological study in han chinese[J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4763–4777.
- [35] Katsoulis K, Paschou SA, Hatz E, et al. TCF7L2 gene variants predispose to the development of type 2 diabetes mellitus among individuals with metabolic syndrome[J]. *Hormones (Athens)*, 2018, 17(3): 359–365.
- [36] Forsberg MH, Ciecko AE, Bednar KJ, et al. CD137 Plays both pathogenic and protective roles in type 1 diabetes development in NOD mice[J]. *J Immunol*, 2017, 198(10): 3857–3868.
- [37] Wang X, Sterr M, Ansarullah, et al. Point mutations in the PDX1 transactivation domain impair human  $\beta$ -cell development and function[J]. *Mol Metab*, 2019, 24: 80–97.
- [38] Jacobson DA, Shyng SL. Ion channels of the islets in type 2 diabetes[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(5): 1326–1346.
- [39] Kang JD, Kim H, Jin L, et al. Apncreatic pigs cloned using Pdx1-disrupted fibroblasts created via TALEN-mediated mutagenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115480–115489.
- [40] Geoghegan G, Simcox J, Seldin MM, et al. Targeted deletion of Tcf7l2 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and

- impaired glucose metabolism[J]. *Mol Metab*, 2019, 24: 44–63.
- [41] Zhang YL, Tan XH, Xiao MF, et al. Establishment of liver specific glucokinase gene knockout mice; a new animal model for screening anti-diabetic drugs[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(12): 1659–1665.
- [42] Miki T, Nagashima K, Tashiro F, et al. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(18): 10402–10406.
- [43] Song J, Yang D, Xu J, et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10548.
- [44] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 720–723.
- [45] Carroll, Dana. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773–782.
- [46] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes; zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(3): 1156–1160.
- [47] Chen YG, Forsberg MH, Khaja S, et al. Gene targeting in NOD mouse embryos using zinc-finger nucleases[J]. *Diabetes*, 2014, 63(1):68–74.
- [48] Nishio M, Matsumoto D, Kato Y, et al. DNA aptamers against FokI nuclease domain for genome editing applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 93: 26–31.
- [49] Tan WS, Carlson DF, Walton MW, et al. Precision editing of large animal genomes[J]. *Adv Genet*, 2012, 80: 37–97.
- [50] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49–55.
- [51] Li HL, Nakano T, Hotta A. Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications [J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 63–77.
- [52] Li T, D’Cruz RT, Lim SY, et al. Somatostatin analogues and the risk of post-operative pancreatic fistulas after pancreatic resection - a systematic review & meta-analysis[J]. *Pancreatology*, 2020, 20(2): 158–168.
- [53] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system; a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [54] Cho B, Kim SJ, Lee EJ, et al. Generation of insulin-deficient piglets by disrupting INS gene using CRISPR/Cas9 system [J]. *Transgenic Res*, 2018, 27(3): 289–300.
- [55] Oakie A, Zhou L, Rivers S, et al. Postnatal knockout of beta cell insulin receptor impaired insulin secretion in male mice exposed to high-fat diet stress [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 499: 110588.
- [56] 马元武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1(Irs1) 基因 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(3): 55–60.
- Ma YW, Ma J, Lu YD, et al. Generating insulin receptor substrate 1 (Irs1) knockout rat using CRISPR/Cas9 [J]. *Chin J Comp Med*, 2014, 24(3): 55–60.
- [57] Bao D, Ma Y, Zhang X, et al. Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15942.
- [58] Xu J, Bartolome CL, Low CS, et al. Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases [J]. *Nature*, 2018, 556(7702): 505–509.

[收稿日期] 2020-06-15

# 《中国实验动物学报》2020 年总目次

## 2020 年 第 28 卷 1~6 期

### 第 1 期

tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究 ..... 王菲, 原一桐, 高渊涛, 田峰, 田野, 李宵, 李承罡, 杜若琛, 李鹏飞, 王雅丽, 王春芳 (1)

诸氏鲮虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法的建立\* ..... 蔡磊, 李建军, 余露军, 黄韧 (10)

高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构分析 ..... 黄胜男, 林志健, 张冰, 吕锦涛, 王如然 (17)

斑马鱼功效模型在验证乳制品补钙和促进肠蠕动中的应用\* ..... 蒋一之, 朱晓宇, 李露露, 俞航萍, 荣佳, 李春启 (23)

诸氏鲮虾虎鱼出血病原鉴定及传播途径分析\* ..... 余露军, 李建军, 蔡磊, 黄韧 (29)

阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用 ..... 饶文婷, 罗尚菲, 张雅心, 江伟豪, 陈奕澔, 陈嘉慧, 任妍, 余楷杰, 何盈, 曾平, 周风华 (36)

电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的干预作用 ..... 邵昭霞, 费雪瑜, 瞿思颖, 王涵芝, 陈卢杭, 蒋永亮, 方剑乔, 何晓芬 (43)

淋巴细胞活化基因-3 敲除 (Lag-3<sup>-/-</sup>) 小鼠构建及初步表型分析 ..... 万颖寒, 慈磊, 王珏, 龚慧, 万志鹏, 奚骏, 何敏珠, 孙瑞林, 费俭, 沈如凌 (49)

糖尿病下肢溃疡小鼠模型的建立与评价 ..... 鲁珽, 辛永萍, 林家彬, 陈民利 (58)

低氧训练对肥胖小鼠 Ghrelin-GHSR 通路的影响 ..... 龚丽景, 付鹏宇, 朱榕鑫, 张一民, 许春艳 (66)

地鳖肽对 CCl<sub>4</sub> 诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究 ..... 刘丹, 曹硕, 刘阳, 刘杰, 王朕, 张永红, 沈红 (73)

D-半乳糖与 L-谷氨酸诱导树鼯肝组织损伤 ..... 陆姜利, 郭玉倩, 钱忠义, 角建林, 梁张, 郑红 (81)

利用心电图植入子遥感技术测定并比较不同全麻药对大鼠心电图活动的影响 ..... 李慧敏, 于玉楼, 唐贺, 赵冉, 董紫姍, 王瀚冬, 杨晶, 王川 (89)

还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用 ..... 张帆, 安学芳, 赵赫, 李丽, 肖宇宙 (96)

一种产后小鼠束缚应激模型的造模方法以及束缚装置的制作 ..... 陈漫漫, 高鹏飞 (100)

鱼类实验动物封闭群和近交系资源培育现状\* ..... 蔡磊, 李建军, 余露军, 黄韧 (108)

实验鱼质量控制标准研制的思考与建议\* ..... 余露军, 李建军, 蔡磊, 魏远征, 苗宗余, 黄韧 (115)

急性肾损伤模型塑造研究进展 ..... 杨婷, 林志健, 姜卓希, 褚梦真, 张冰, 邹丽娜 (123)

啮齿类动物插管技术用于药动学采血的研究进展 ..... 杜飞飞, 王凤清, 贾伟伟, 徐方, 马越鸣 (129)

斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展\* ..... 戴明珠, 黄燕烽, 彭逸, 张双阳, 张立将, 李春启 (137)

斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展\* ..... 郭胜亚, 朱晓宇, 周佳丽, 张勇, 彭逸, 荣佳, 张立将, 李春启 (143)

间质性膀胱炎动物模型的研究进展 ..... 昂小杰, 李森, 周峰, 蔡宗强, 陈卫国 (148)

\* : 实验鱼质量控制标准化及应用专题

### 第 2 期

模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响 ..... 卢延华, 管博文, 刘旭, 吕颖, 王卫, 魏强, 孟爱民 (153)

背根神经节 p-CaMK II 表达上调在糖尿病神经痛大鼠中的作用 .....	费雪瑜, 邵昭霞, 陈卢杭, 王涵芝, 瞿思颖, 何晓芬, 方剑乔, 蒋永亮 (161)
慢性炎性痛模型大鼠诱发焦虑抑郁样情绪行为观察 .....	邵芳冰, 房军帆, 王思思, 孙海桦, 项璇儿, 方剑乔, 杜俊英 (167)
小鼠孵化囊胚及其休眠胚胎程序化冷冻-解冻前后 Mgst1 基因的差异表达 .....	胡新宇, 邢凯, 李征, 赵志显, 常雪蕊, 齐晓龙, 盛照晖, 王相国, 倪和民, 郭勇 (175)
利用遗传多样性小鼠资源筛选 CA16 致病相关基因 .....	彭婉君, 赵彬彬, 武婧, 陈鑫, 牛栋, 刘江宁 (180)
羟氯喹对狼疮小鼠脾淋巴细胞的影响 .....	纪丽献, 段新旺, 牛海涛 (187)
小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证 .....	罗维, 艾磊, 周越 (193)
不同 FMDV 易感性豚鼠 PBLc 对模拟 FMDV 感染细胞的杀伤作用 .....	刘迪文, 卫振, 陈雁虹, 谭海明 (201)
猪的免疫球蛋白基因鉴定和注释 .....	张璞, 林育, 游斌杰, 孙静 (208)
秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究 .....	吕建敏, 龚金炎, 刘士旺 (216)
2 型糖尿病小鼠模型血糖干预评价点的实验观察 .....	蒲瑞阳, 史典, 刘莎, 程宁 (224)
慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 .....	张迪, 夏艺, 范丽, 刘士远, 管宇 (230)
APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马区磁共振波谱和超微结构分析 .....	邢敏, 毛敬洁, 陈文列, 李钻芳 (236)
心肌铁过载兔模型的制作及铁沉积规律的研究 .....	齐国将, 钟德琳, 蓝海梅, 郭敏, 郭亚楠, 彭鹏 (242)
不同年龄段小鼠抑郁及焦虑样行为的比较 .....	杨颖雯, 周瑾, 黄菲 (248)
创伤后应激障碍的啮齿类动物模型研究进展 .....	孙浩然, 徐艳玲, 李长江, 连波, 王艳郁, 孙琳 (254)
卵巢摘除诱导围绝经期综合征动物模型的研究进展 .....	陶柱萍, 韦桂宁, 王雪雪, 厉颖, 尹爱武, 李灿委, 范孟然, 巫秀美, 张成桂, 高鹏飞 (260)
结肠直肠癌小鼠模型研究进展 .....	苗晋鑫, 宋韶鹤, 李秀敏 (267)
hnRNPs 家族参与调控肿瘤免疫微环境的研究进展 .....	张国新, 张文龙, 李梦媛, 杨星九, 高苒 (273)
奥沙利铂诱导的神经病理性疼痛大鼠模型研究及其在中医方面应用进展 .....	李明珠, 王文萍, 金圣博 (278)
果蝇信息和种系资源的获得 .....	潘吉川, 姜秋实, 刘强, 郝阳光 (286)

### 第 3 期

伊马替尼在斑马鱼血管和神经发育过程中的作用研究 .....	鲍奕清, 陈思, 洪瑞晟, 朱仪, 高敏, 李乐乐, 张旭, 王新, 刘东, 石运伟 (289)
miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p 及 miR-27b-3p 对心肌梗塞后血管再生的作用 .....	袁晓龙, 潘金春, 蒋瑶, 龚宝勇, 高洪彬, 白国锋, 谭伟江, 梁十, 李加琪, 张豪, 王希龙 (297)
电针对糖尿病神经痛模型大鼠痛觉敏化及脊髓小胶质细胞 BDNF 表达的影响 .....	瞿思颖, 王涵芝, 胡群祺, 邵昭霞, 费雪, 蒋永亮, 方剑乔, 何晓芬 (307)
新型高脂血症易感 (WSHc) 大鼠非酒精性脂肪肝病模型的建立与病理特点研究 .....	马全鑫, 张利棕, 戎亦骊, 何蒙娜, 郁晨, 蔡月琴, 陈民利 (314)
基于 LC-MS 的冠心病人群小鼠代谢组学研究 .....	朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 李卓, 苏磊, 秦川 (323)
不同条件下建立过敏性结膜炎小鼠模型比较研究 .....	白梦天, 李韵, 胡竹林 (330)
复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用 .....	宣伟军, 黄力毅, 宣毅, 唐俊波, 韦瑞龙 (338)
牛磺酸对宫内生长受限孕鼠生长轴激素与基因的影响 .....	李平丽, 吴晓, 杨建成 (345)
I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精实验研究 .....	张帆, 安学芳, 赵赫, 李丽, 肖宇宙 (351)
长时程抑郁小鼠模型建立及行为与神经病理特征观察 .....	田野, 栗莹, 原一桐, 杜若琛, 李宵, 王菲, 王雅丽, 邵宏元, 王春芳 (358)

长期稳定的 SD 大鼠 2 型糖尿病模型制备方法 .....	黎娅, 范培云, 马晓雨, 常秀君, 何敏, 韩蕙竹, 粟尹, 夏晓晓, 韦秀萍, 吴穹 (364)
盐酸洛哌丁胺诱导的小鼠慢传输型便秘模型的实验研究 .....	姚一博, 王迪, 王钱陶, 肖长芳, 梁宏涛, 曹永清, 陆金根, 王琛 (370)
DHA 对高脂食物诱导体重增加的保护作用的研究 .....	张欣, 杨英, 安晓羽, 谷艳琪, 张引, 麻炎, 孙利婷, 林芳, 武强强, 王亚娜, 杨慧娣 (376)
黄芪三七合剂通过调控 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴改善糖尿病肾病小鼠肾炎症反应 .....	林晓, 李健春, 谭睿陟, 文丹, 谢席胜, 王丽 (382)
斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 .....	王明亮, 丁永芳, 印鑫, 邵久针, 庄子锐, 张婷, 苏鹏亮, 彭蕴茹 (390)
帕金森病动物模型的研究进展 .....	杨东明, 杨利峰, 赵德明, 周向梅 (397)
多发性硬化实验动物模型的研究与应用进展 .....	赵培源, 陈少昀, 刘喜红, 杨丽萍 (405)
小型猪动脉粥样硬化模型研究进展 .....	王达洋, 王显 (410)
抽动障碍动物模型的研究进展 .....	柯钟灵, 陈燕惠 (416)
血友病鼠关节病模型构建研究进展 .....	孙庆云, 闫振宇 (423)

## 第 4 期

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- $\kappa$ 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(WSHe)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, 李璘, 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)
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)

## 第 5 期

压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征 .....	谭伟江, 李想, 郑双, 马俊峰, 任学聪, 贺天真, 陈虹华, 陈建新, 杨丰华 (583)
---------------------------------	---

电针对复杂性区域疼痛综合征 I 型大鼠模型局部组织氧化应激反应的干预作用 ..... 李晓洁, 尹诚语, 郑小莉, 聂慧敏, 曾丹怡, 王洁, 陈瑞香, 刘伯宇, 台燕, 邵晓梅, 刘伯一 (593)

冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 ..... 王瑾茜, 蔺晓源, 刘侃, 胡国恒 (602)

小鼠经骨髓注射肺转移和术后复发模型的建立 ..... 焦肖宁, 侯怡飞, 朱杨壮壮, 苏琳, 张飞, 陈晓, 朱诗国, 韦璐瑶, 王万涛, 王杰, 朱娴丹, 邹纯朴, 胥孜杭 (610)

血管紧张素转换酶 2 调节肺肾素血管紧张素系统减轻肢体缺血再灌注诱导的急性肺损伤 ..... 李树民, 徐洪, 杨奕, 李雅倩, 靳馥宇, 李田, 杨秀红, 杨方 (618)

兽用疫苗制造检验用 C 型产气荚膜梭菌菌种的制备与检定标准和方法研究 ..... 彭国瑞, 李旭妮, 王秀丽, 李伟杰, 魏津, 马欣, 张一帆, 田野, 刘博, 李建, 罗玉峰, 李俊平, 彭小兵 (627)

基于病理形态学系统综述探讨猪冠状动脉球囊损伤病变与动脉粥样硬化的差异 ..... 王达洋, 徐筱青, 赵明镜, 王显 (632)

利用二乙基亚硝胺联合处理 N-亚硝基吗啉和 2/3 肝部分切除方法改良的大鼠中晚期肝癌模型 ..... 张梅, 洪泽宣, 邹昕羽, 王剑, 王自力, 李晓清, 金美兰 (638)

p21 在滋养细胞迁移和侵袭中的作用研究 ..... 王艳, 赵楠楠, 何艳舫, 董建新, 陈燕 (645)

不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥大模型建立影响的比较研究 ..... 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 张利棕, 富丹婷, 蔡兆伟, 王德军 (651)

低分子肝素通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路对胚胎植入障碍小鼠子宫内膜容受性的影响 ..... 王春雪, 牛凯迪, 于月新 (659)

盆腔脏器脱垂动物模型的建立与适用性评价 ..... 严晓, 覃彩芳, 李青先, 秦玲, 许文娟, 樊伯珍 (668)

左支结扎制备 SD 大鼠门脉高压动物模型的实验研究 ..... 王文晓, 柏娟, 刘树立 (675)

实验动物替代技术研究 ..... 宋冰, 辜吉秀, 汪永锋, 余四九, 张延英, 康万荣, 杨娇 (680)

克罗恩病大小鼠动物模型研究进展 ..... 方磊, 乔立超, 顾一帆, 徐雪梅, 杨柏霖, 陈红锦 (688)

大动物多能干细胞建立研究进展 ..... 才文道力玛, 伊敏娜, 王希生, 神英超, 纳日嘎, 陶力, 格日乐其木格, 芒来 (695)

多物种血脑屏障结构与功能研究进展 ..... 钟高亮, 张晶晶 (702)

后天继发性免疫低下动物模型研究及其在中医证候模型的应用进展 ..... 刘美怡, 钱深思, 容蓉, 杨勇 (708)

STZ 制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展 ..... 韩旭, 王璇, 余芝, 徐斌 (716)

原发性头痛动物模型的建立及评价方法的研究进展 ..... 叶淑姿, 肖芳 (726)

第 6 期

复方芍药降压片对 TNF-α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 ..... 龚姝, 李弘, 刘叶倩, 陈春茗, 马丹凤, 刘林, 任卫琼 (733)

辛伐他汀联合利塞膦酸钠对地塞米松诱导大鼠骨丢失的作用 ..... 郭志斌, 吴春芳, 张国彬, 迟博婧, 王玉丹, 刘子洪, 王宝, 马超, 田发明 (742)

miR-328 在运动改善高血压大鼠胸主动脉 L 型钙通道表达中的作用 ..... 邱方, 周杨, 张严焱, 金城, 刘晓东, 吴迎, 吕媛媛, 石丽君 (749)

前列腺癌免疫人源化小鼠模型的构建及鉴定 ..... 郭文文, 师长宏, 李苗苗, 乔天运, 赵菊梅, 张彩勤 (759)

基于 RIP-Seq 技术检测 MRTF-A 结合 RNA 在小鼠 MCAO/R 模型中表达 ..... 于志君, 袁琼, 金志刚, 向梓非, 龙萍, 朱明, 杨越旺, 胡霞敏 (765)

两种呼吸道感染方式建立小鼠流感病毒感染模型比较 ..... 杨玉琴, 徐春华, 周文江, 周晓辉 (773)

CRISPR/Cas9 介导人 HBB 基因突变体在猪成纤维细胞的靶向敲入 ..... 张婷婷, 杨漫漫, 魏强, 李燕莉, 李林, 王然, 胡莉花, 姜芳芳, 刘瑜, 赵卫华, 李勇 (779)

两种黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果 ..... 周康, 叶妙勇, 赵凡, 马轲, 吕伯东, 许增宝 (788)

人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响 ..... 张茹鑫, 李承罡, 杜若琛, 原一桐, 李宵, 赵碧春, 张玉娟, 王春芳 (796)

连续性血液透析滤过联合依那普利对急性重症胰腺炎大鼠肾功能及肠功能的改善作用 ..... 刘倩, 鲁华, 郭更新, 刘静, 李娜 (805)

钙和维生素 D 膳食补充对大鼠踝关节骨折创伤模型破骨细胞活性和骨量的影响分析 .....	彭亮, 杨鹏, 刘冲, 杨金丰, 马三辉 (812)
Oct4 和 Cdx2 对牛胚胎内细胞团和滋养外胚层分化的影响 .....	赵楠楠, 王艳, 郭艳娟, 高杰, 袁金灵, 陈燕 (818)
雌激素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 氧化应激损伤的保护作用及机制探究 .....	徐昊 (824)
充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考 .....	李小茜, 何建成 (831)
乙肝病毒相关肝细胞癌小鼠模型的构建和前沿应用现状 .....	郑海香, 丁明珠, 张雨琪, 施佳健, 张璐, 景月娥, 王星 (837)
肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价 .....	庄子锐, 王明亮, 张婷, 苏鹏亮, 邵久针, 印鑫, 彭蕴茹, 沈明勤 (845)
微型 CT 在血管钙化动物模型中的应用进展 .....	王泽静, 王询, 肖康, 张晶 (853)
子宫内膜异位症小鼠模型研究进展 .....	孟鑫, 陈景伟 (857)
脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展 .....	唐思璇, 肖芳 (864)
II 型糖尿病动物模型构建的研究进展 .....	唐艺丹, 王鲜忠, 张姣姣 (870)
《中国实验动物学报》2020 年总目次 .....	(877)

《ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA》  
CUMMULATIVE TABLE OF CONTENTS

Vol.28 Issues 1-6 2020

Issue 1

Establishment of tdTomato transgenic mouse lineages and their application in cell tracing .....	WANG Fei, YUAN Yitong, GAO Yuantao, TIAN Feng, TIAN Ye, LI Xiao, LI Chenggang, DU Ruochen, LI Pengfei, WANG Yali, WANG Chunfang( 1 )
Evaluation methods to establish the genetic quality of closed colony Mugilogobius chulae .....	CAI Lei, LI Jianjun, YU Lujun, HUANG Ren(10)
Analysis of the gut microbiota structure in quails with hyperuricemia .....	HUANG Shengnan, LIN Zhijian, ZHANG Bing, LYU Jintao, WANG Ruran(17)
Dairy products supplement calcium and promote intestinal motility in zebrafish models .....	JIANG Yizhi, ZHU Xiaoyu, LI Lulu, YU Hangping, RONG Jia, LI Chunqi(23)
Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in Mugilogobius chulae and its transmission routes .....	YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, HUANG Ren(29)
Regulatory effects of ferulic acid on hepatic steatosis and intestinal flora in hyperlipidemic mice .....	RAO Wenting, LUO Shangfei, ZHANG Yaxin, JIANG Weihao, CHEN Yihao, CHEN Jiahui, REN Yan, SHE Kaijie, HE Ying, ZENG Ping, ZHOU Fenghua(36)
Intervention effect of electroacupuncture on NF- $\kappa$ B p65 at spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathic pain rats .....	TAI Zhaoxia, FEI Xueyu, QU Siying, WANG Hanzhi, CHEN Luhang, JIANG Yongliang, FANG Jianqiao, HE Xiaofen(43)
Construction and preliminary phenotypic analysis of <i>Lag-3</i> <sup>-/-</sup> mice .....	WAN Yinghan, CI Lei, WANG Jue, GONG Hui, WAN Zhipeng, XI Jun, HE Minzhu, SUN Ruilin, FEI Jian, SHEN Ruling(49)
Establishment and evaluation of a mouse model of diabetic hindlimb ulcers .....	LU Ting, XIN Yongping, LIN Jiabin, CHEN Minli(58)
Effect of hypoxic training on the Ghrelin-GHSR pathway in obese mice .....	GONG Lijing, FU Pengyu, ZHU Rongxin, ZHANG Yimin, XU Chunyan(66)
Protective effects of ESW peptides on carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in mice .....	LIU Dan, CAO Shuo, LIU Yang, LIU Jie, WANG Zhen, ZHANG Yonghong, SHEN Hong(73)
D-galactose and L-glutamic acid induced liver tissue injury in tree shrews .....	LU Jiangli, GUO Yuqian, QIAN Zhongyi, JIAO Jianlin, LIANG Zhang, ZHENG Hong(81)
Comparison of different anesthetics on rat heart rates using a cardiac electrical implant .....	LI Huimin, YU Yulou, TANG He, ZHAO Ran, DONG Zishan, WANG Handong, YANG Jing, WANG Chuan(89)
Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice .....	ZHANG Fan, AN Xuefang, ZHAO He, LI Li, XIAO Yuzhou(96)
Method for constructing a postpartum mouse immobilization stress model and restraint device .....	CHEN Manman, GAO Pengfei(100)
Current situation of the breeding of closed colony and inbred strains of fish as laboratory animals .....	CAI Lei, LI Jianjun, YU Lujun, HUANG Ren(108)
Suggestions for the development of experimental fish quality control standards .....	YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, WEI Yuanzheng, MIAO Zongyu, HUANG Ren(115)
Research progress on rodent intubation technique for blood sampling in pharmacokinetic studies .....	DU Feifei, WANG Fengqing, JIA Weiwei, XU Fang, MA Yueming(129)
Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity .....	DAI Mingzhu, HUANG Yanfeng, PENG Yi, ZHANG Shuangyang, ZHANG Lijiang, LI Chunqi(137)
Application of zebrafish in functional food research .....	GUO Shengya, ZHU Xiaoyu, ZHOU Jiali, ZHANG Yong, PENG Yi, RONG Jia, ZHANG, Lijiang, LI Chunqi(143)

Research progress on establishing interstitial cystitis models .....  
 ..... ANG Xiaojie, LI Miao, ZHOU Feng, CAI Zongqiang, CHEN Weiguo(148)

**Issue 2**

Effects of rat senescent astrocytes on the proliferation of neural stem cells .....  
 ..... LU Yanhua, GUAN Bowen, LIU Xu, LYU Ying, WANG Wei, WEI Qiang, MENG Aimin(153)

Role of upregulated p-CaMKII expression in rat dorsal root ganglia in diabetic neuropathic pain ..... FEI Xueyu,  
 TAI Zhaoxia, CHEN Luhang, WANG Hanzhi, QU Siying, HE Xiaofen, FANG Jianqiao, JIANG Yongliang(161)

Observation of the anxiety and depression-like behavior induced by chronic inflammatory pain in rats .....  
 ..... SHAO Fangbing, FANG Junfan, WANG Sisi, SUN Haiju, XIANG Xuaner, FANG Jianqiao, DU Junying(167)

Investigation on the differential expression of Mgst1 gene on mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after  
 cryopreservation ..... HU Xinyu, XING Kai, LI Zheng,  
 ZHAO Zhixian, CHANG Xuerui, QI Xiaolong, SHENG Xihui, WANG Xiangguo, NI Hemin, GUO Yong(175)

Screening of CA16 pathogenicity-related genes using Genetic Diversity Mice .....  
 ..... PENG Wanjun, ZHAO Binbin, WU Jing, CHEN Xin, NIU Dong, LIU Jiangning(180)

Effect of hydroxychloroquine on spleen lymphocytes in lupus mice ..... JI Lixian, DUAN Xinwang, NIU Haitao(187)

Establishment and verification of transformation conditions for mouse RAW264.7 macrophages by electroporation .....  
 ..... LUO Wei, AI Lei, ZHOU Yue(193)

Peripheral blood lymphocytes from food-and-mouth disease virus resistant guinea pigs show increased cytotoxicity to cells with simulative  
 viral infection ..... LIU Diwen, WEI Zhen, CHEN Yanhong, TAN Haiming(201)

Identification and annotation of the porcine immunoglobulin genes ..... ZHANG Pu, LIN Yu, YOU Binjie, SUN Jing(208)

Anti-tumor activities of Pleurotus geesteranus fruit body powder on H22 tumor-bearing mice .....  
 ..... LYU Jianmin, GONG Jinyan, LIU Shiwang(216)

Observation of evaluation points for blood glucose intervention in a mouse model of type 2 diabetes mellitus .....  
 ..... PU Ruiyang, SHI Dian, LIU Sha, CHENG Ning(224)

Establishment and evaluation of rat models of chronic obstructive pulmonary disease .....  
 ..... ZHANG Di, XIA Yi, FAN Li, LIU Shiyuan, GUAN Yu(230)

Analyses of magnetic resonance spectroscopy and ultrastructure changes in the hippocampus of APP/PS1 double transgenic AD model  
 mice ..... XING Min, MAO Jingjie, CHEN Wenlie, LI Zuanfang(236)

Establishment of a rabbit model of cardiac iron overload and its relationship with iron deposition .....  
 ..... QI Guojiang, ZHONG Delin, LAN Haimei, GUO Min, GUO Yanan, PENG Peng(242)

Comparison of depression-like and anxiety-like behaviors in mice of different ages .....  
 ..... YANG Yingwen, ZHOU Jin, HUANG Fei(248)

Advances in rodent models of post-traumatic stress disorder .....  
 ..... SUN Haoran, XU Yanling, LI Changjiang, LIAN Bo, WANG Yanyu, SUN Lin(254)

Research advances in animal models of perimenopausal syndrome induced by ovariectomy ..... TAO Zhuping, WEI Guining,  
 WANG Xuexue, LI Ying, YIN Aiwu, LI Can-wei, FAN Mengran, WU Xiumei, ZHANG Chenggui, GAO Pengfei(260)

Advances in mouse models of colorectal cancer ..... MIAO Jinxin, SONG Shaohu, LI Xiumin(267)

Research progression of hnRNPs in tumor immunity and tumor microenvironment .....  
 ..... ZHANG Guoxin, ZHANG Wenlong, LI Mengyuan, YANG Xingjiu, GAO Ran(273)

Rat model of neuropathic pain induced by oxaliplatin and its application in traditional Chinese medicine .....  
 ..... LI Mingzhu, WANG Wenping, JIN Shengbo(278)

Requirement of Drosophila information and stock resources ..... PAN Jichuan, JIANG Qiushi, LIU Qiang, HAO Yangguang(286)

**Issue 3**

Study on the effects of imatinib on the development of blood vessels and nerves in zebrafish ..... BAO Yiqing,  
 CHEN Si, HONG Ruisheng, ZHU Yi, GAO Min, LI Lele, ZHANG Xu, WANG Xin, LIU Dong, SHI Yunwei(289)

Effects of miR-144, miR-21-3p, miR-142-5p and miR-27b-3p on angiogenesis after myocardial infarction .....  
 ..... YUAN Xiaolong, PAN Jinchun, JIANG Yao,  
 GONG Baoyong, GAO Hongbin, BAI Guofeng, TAN Weijiang, LIANG Shi, LI Jiaqi, ZHANG Hao, WANG Xilong(297)

Effects of electroacupuncture on pain sensitization and BDNF expression in spinal microglia in rats with diabetic neuropathic pain .....  
 ..... QU Siying,  
 WANG Hanzhi, HU Qunqi, TAI Zhaoxia, FEI Xueyu, JIANG Yongliang, FANG Jianqiao, HE Xiaofen(307)

- Establishment and pathological characteristics of a non-alcoholic fatty liver disease model in a new type of hyperlipidemia-susceptible (WSHc) rats ..... MA Quanxin, ZHANG Lizong, RONG Yili, HE Mengna, YU Chen, CAI Yueqin, CHEN Minli (314)
- Metabolic analysis of human flora-associated mice with coronary heart disease using liquid chromatography-mass spectrometry ..... ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LI Zhuo, SU Lei, QIN Chuan (323)
- Comparison of mouse models of allergic conjunctivitis under different conditions ..... BAI Mengtian, LI Yun, HU Zhulin (330)
- Ultrastructural age-related effects of a compound healthy ear agent on apoptosis in cochlear neurocytes and brain-derived neurotrophic factor and neuron-specific nuclear antigen expression ... XUAN Weijun, HUANG Liyi, XUAN Yi, TANG Junbo, WEI Yulong (338)
- Effects of taurine on growth axis hormones and genes in pregnant rats with intrauterine growth restriction ..... LI Pingli, WU Xiao, YANG Jiancheng (345)
- In vitro* fertilization using type I interferon receptor-deficient mice ..... ZHANG Fan, AN Xuefang, ZHAO He, LI Li, XIAO Yuzhou (351)
- Establishing a long-term depression model in mice; behavior and neuropathological features ..... TIAN Ye, LI Yun, YUAN Yitong, DU Ruochen, LI Xiao, WANG Fei, WANG Yali, SHAO Hongyuan, WANG Chunfang (358)
- A long-term and stable method for the preparation of a type 2 diabetes Sprague-Dawley rat model ..... LI Ya, FAN Peiyun, MA Xiaoyu, CHANG Xiujun, HE Min, HAN Huizhu, SU Yin, XIA Xiaoxiao, WEI Xiuping, WU Qiong (364)
- Experimental study of slow transit constipation induced by loperamide hydrochloride in mice ..... YAO Yibo, WANG Di, WANG Qiantao, XIAO Changfang, LIANG Hongtao, CAO Yongqing, LU Jingen, WANG Chen (370)
- Protective effects of docosahexaenoic acid supplementation on high-fat diet-induced body weight gain in mice ..... ZHANG Xin, YANG Ying, AN Xiaoyu, GU Yanqi, ZHANG Yin, MA Yan, SUN Liting, LIN Fang, WU Qiangqiang, WANG Yana, YANG Huidi (376)
- Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng compound improves kidney inflammatory reactions in mice with diabetic nephropathy via regulation of Arid2-IR/NF- $\kappa$ B signaling ..... LIN Xiao, LI Jianchun, TAN Ruizhi, WEN Dan, XIE Xisheng, WANG Li (382)
- Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology ..... WANG Mingliang, DING Yongfang, YIN Xin, SHAO Jiuzhen, ZHUANG Zirui, ZHANG Ting, SU Pengliang, PENG Yunru (390)
- Research progress regarding animal models of Parkinson's disease ..... YANG Dongming, YANG Lifeng, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei (397)
- Research and application progress of experimental animal models of multiple sclerosis ..... ZHAO Peiyuan, CHEN Shaoyun, LIU Xihong, YANG Lipin (405)
- Miniature swine models of atherosclerotic disease ..... WANG Dayang, WANG Xian (410)
- Research advances in animal models of tic disorder ..... KE Zhongling, CHEN Yanhui (416)
- Progress in construction of a hemophilic arthropathy mouse model ..... SUN Qingyun, YAN Zhenyu (423)

#### Issue 4

- 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 Zhixin, 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- $\kappa$ 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 ..... *LI Min, YANG Chenyu, FU Chaohui, XIONG Yigong, LING Yun*(517)

Establishment and evaluation of a rat model of vaginitis ..... *PENG Dongdong, DONG Ke, LI Qiao, ZHOU Zhimin, XIAO Sa, JIANG Dejian*(525)

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*(532)

Applications for deep hydrolyzed protein-lactose-free milk powder in germ-free rat cultivation ..... *ZHANG Jia, LI Yongjun, QU Lingling, MAO Sunbing, LI Lanjuan*(539)

Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model ..... *XU Boyang, PANG Xiaojuan, ZENG Yuming, ZHOU Yandong, GUO Yi* (545)

Research progress in the establishment of animal models of acute spinal cord injury ... *LIU Haifeng, WANG Bin, ZHAO Bin*(551)

Research progress in the metastatic model of transplanted lung cancer in mouse ..... *ZHANG Na, TIAN Yange, LIU Xuefang, WANG Qi*(557)

Research progress on the characteristics of animal models of chronic obstructive pulmonary disease and related clinical applications ..... *CHEN Meifeng, JIA Hui, XIA Shuyue*(563)

Advances in murine models for food allergies ..... *WANG Zheng, LI Xiumin, MIAO Jinxin*(570)

Research progress regarding the role of tumor necrosis factor in a zebrafish-mycobacterium marinum model ..... *YANG Jianwei, HE Shumei, FAN Hongyan, LIU Hongxu*(578)

**Issue 5**

Structural and functional pathological characteristics of pressure-overload induced heart failure mouse model ..... *TAN Weijiang, LI Xiang, ZHENG Shuang, MA Junfeng, REN Xuecong, HE Tianzhen, CHEN Honghua, CHEN Jianxin, YANG Fenghua*(583)

Intervention of electroacupuncture on oxidative stress response from local tissues of a CRPS-I rat model ..... *LI Xiaojie, YIN Chengyu, ZHENG Xiaoli, NIE Huimin, ZENG Danyi, WANG Jie, CHEN Ruixiang, LIU Boyu, TAI Yan, SHAO Xiaomei, LIU Boyi*(593)

Study on the establishment of a rat model of coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis ..... *WANG Jinxi, LIN Xiaoyuan, LIU Kan, HU Guoheng*(602)

Establishment of a model of lung metastasis and recurrence of mice after bone marrow injection ..... *JIAO Xiaoning, HOU Yifei, ZHU Yangzhuangzhuang, SU Lin, ZHANG Fei, CHEN Xiao, ZHU Shiguo, WEI Luyao, WANG Wantao, WANG Jie, ZHU Xiandan, ZOU Chunpu, XU Zihang*(610)

Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates acute lung injury induced by limb ischemia reperfusion in mice via regulation of pulmonary renin-angiotensin system ..... *LI Shumin, XU Hong, YANG Yi, LI Yaqian, JIN Fuyu, LI Tian, YANG Xiuhong, YANG Fang*(618)

Standard and method of preparation and verification of *Clostridium perfringens* (C) for production and testing of veterinary vaccines ..... *PENG Guorui, LI Xuni, WANG Xiuli, LI Weijie, WEI Jin, MA Xin, ZHANG Yizhi*(627)

Morphology of lesions induced by balloon injury in coronary arteries of swine: a systematic review ..... *WANG Dayang, XU Xiaoqing, ZHAO Mingjing, WANG Xian*(632)

A modified rat model for advanced hepatocellular carcinoma treated by N-diethylnitrosamine combined with N-nitrosomorpholine and two-thirds partial hepatectomy ..... *ZHANG Mei, HONG Zexuan, ZOU Xinyu, WANG Jian, WANG Zili, LI Xiaoqing, JIN Meilan*(638)

Role of p21 in trophoblast migration and invasion ... *WANG Yan, ZHAO Nannan, HE Yanfang, DONG Jianxin, CHEN Yan*(645)

A comparative study on the effects of different factors on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy model in rats ..... *LIU Jingyan, ZHU Liang, CAI Yueqin, ZHANG Lizong, FU Danting, CAI Zhaowei, WANG Dejun*(651)

Effect of low-molecular-weight heparin on the endometrial receptivity of mice with blastocyst implantation disorder through EGFR/PI3K/Akt signaling pathway ..... *WANG Chunxue, NIU Kaidi, YU Yuexin*(659)

Establishment and evaluation of the applicability of an animal model of pelvic organ prolapse ..... *YAN Xiao, QIN Caifang, LI Qingxian, QIN Ling, XU Wenjuan, FAN Bozhen*(668)

Experimental study on the impact of ligation of left portal vein on portal vein pressure in SD rats ..... *WANG Wenxiao, BAI Juan, LIU Shuli*(675)

Research on alternative technology of laboratory animals ..... *SONG Bing, GU Jixiu, WANG Yongfeng, YU Sijiu, ZHANG Yanying, KANG Wanrong, YANG Jiao*(680)

Progress on animal model of Crohn's disease in rats and mice .....	FANG Lei, QIAO Lichao, GU Yifan, XU Xuemei, YANG Bolin, CHEN Hongjin(688)
Research progress on the establishment of pluripotent stem cells in large animals .....	Caiwendaolima, Yiminna, WANG Xisheng, SHEN Yingchao, Nariga, Taoli, BOU Gerelechimeg, Manglai(695)
Research progress on the structural and functional studies of blood brain barrier in different species .....	ZHONG Gaoliang, ZHANG Jingjing(702)
Animal models of acquired secondary immunodeficiency and their application in traditional Chinese medicine syndrome models .....	LIU Meiyi, QIAN Shensi, RONG Rong, YANG Yong(707)
Research progress on factors influencing streptozotocin-induced diabetic rat models .....	HAN Xu, WANG Xuan, YU Zhi, XU Bin(716)
Advances in the establishment and evaluation of animal models of primary headache .....	YE Shuzi, XIAO Fang(726)

## Issue 6

Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factors, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$ and co-cultured with smooth muscle cells .....	GONG Shan, LI Hong, LIU Yeqian, CHEN Chunming, MA Danfeng, LIU Lin, REN Weiqiong(733)
Effects of risedronate sodium combined with simvastatin on dexamethasone-induced bone loss in rats .....	GUO Zhibin, WU Chunfang, ZHANG Guobin, CHI Bojing, WANG Yudan, LIU Zihong, WANG Bao, MA Chao, TIAN Faming(742)
Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats .....	QIU Fang, ZHOU Yang, ZHANG Yanyan, JIN Cheng, LIU Xiaodong, WU Ying, LYU Yuanyuan, SHI Lijun(749)
Establishment and identification of an immune-humanized mouse model of prostate cancer .....	GUO Wenwen, SHI Changhong, LI Miaomiao, QIAO Tianyun, ZHAO Jumei, ZHANG Caiqin(759)
Detection of MRTF-A-binding gene expression in the MCAO/R mouse model via RIP-Seq .....	YU Zhijun, YUAN Qiong, JIN Zhigang, XIANG Zifei, LONG Ping, ZHU Ming, YANG Yuewang, HU Xiamin(765)
Comparison of mouse models of influenza virus infection established with two respiratory tract infection modes .....	YANG Yuqin, XU Chunhua, ZHOU Wenjiang, ZHOU Xiaohui(773)
Generation of human HBB mutant knock-in porcine fibroblasts using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination .....	ZHANG Tingting, YANG Manman, WEI Qiang, LI Yanli, LI Lin, WANG Ran, HU Lihua, JIANG Fangfang, LIU Yu, ZHAO Weihua, LI Yong(779)
Effect of the Astragalus dose in Buyang Huanwu decoction on erectile dysfunction in rats with cavernous nerve injury .....	ZHOU Kang, YE Miaoyong, ZHAO Fan, MA Ke, LYU Bodong, XU Zengbao(788)
Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on autophagy in the naturally aging rat hippocampus .....	ZHANG Ruxin, LI Chenggang, DU Ruochen, YUAN Yitong, LI Xiao, ZHAO Bichun, ZHANG Yujuan, WANG Chunfang(796)
Continuous hemodiafiltration combined with enalapril improves renal and intestinal function in rats with severe acute pancreatitis .....	LIU Qian, LU Hua, GUO Gengxin, LIU Jing, LI Na(805)
Effects of dietary calcium and vitamin D supplementation on osteoclast activity and bone mass in a rat ankle fracture model .....	PENG Liang, YANG Peng, LIU Chong, YANG Jinfeng, MA Sanhui(812)
Effects of Oct4 and Cdx2 on differentiation of bovine embryonic inner cell mass and trophectoderm .....	ZHAO Nannan, WANG Yan, GUO Yanjuan, GAO Jie, YUAN Jinling, CHEN Yan(818)
Protective effect and associated mechanism of action of estrogen on oxidative stress injury of MC3T3-E1 osteoblasts in mice .....	XU Hao(824)
Thinking of study on animal model of TCM syndrome of congestive heart failure .....	LI Xiaoqian, HE Jiancheng(831)
Research progress of the mouse model of HBV-related hepatocellular carcinoma .....	ZHENG Haixiang, DING Mingzhu, ZHANG Yuqi, SHI Jiajian, ZHANG Lu, JING Yuee, WANG Xing(837)
Research progress and evaluation of animal models of hepatorenal fibrosis .....	ZHUANG Zirui, WANG Mingliang, ZHANG Ting, SU Pengliang, SHAO Jiuzhen, YIN Xin, PENG Yunru, SHEN Mingqin(845)
Advances in the application of micro-CT in animal models of vascular calcification .....	WANG Zejing, WANG Xun, XIAO Kang, ZHANG Jing(853)
Research progress in a mouse model of endometriosis .....	MENG Xin, CHEN Jingwei(857)
Research progress on lipopolysaccharide-induced pneumonia animal models .....	TANG Sixuan, XIAO Fang(864)
Research progress in the construction of type II diabetes animal models .....	TANG Yidan, WANG Xianzhong, ZHANG Jiaojiao(870)