

张静怡,邓永宁,张萌,等. *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体及稳定表达的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 1-8.

Zhang JY, Deng YN, Zhang M, et al. RNA interference of *Sirt3* in human neuroblastoma SH-SY5Y cell [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.001

Sirt3 基因 RNA 干扰慢病毒载体及稳定表达的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株的构建

张静怡¹, 邓永宁², 张萌², 屈秋民^{2*}

(1.河南省人民医院老年医学科,郑州大学人民医院,郑州 450003;
2.西安交通大学第一医院神经内科,西安 710061)

【摘要】 目的 构建 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,建立 *Sirt3* 基因稳定干扰的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株。**方法** 从 Genbank 中检索到 *Sirt3* 基因序列,根据此序列设计 *Sirt3* 基因的 4 条 siRNA 干序列和 1 条阴性对照序列,将它们分别与含绿色荧光蛋白(GFP)编码基因的线性化慢病毒载体连接,获得 4 种重组慢病毒质粒。将 4 种重组的干扰病毒质粒分别与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,测定病毒滴度。将 4 种构建的慢病毒载体感染 SH-SY5Y 细胞,采用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 *Sirt3* 的沉默效果,筛选出最有效干扰 *Sirt3* 基因表达组。**结果** 测序证实成功构建了 4 种 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,病毒滴度分别为:LV-SIRT3-RNAi-1 8×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-2 3×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-3 8×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-4 8×10^8 TU/mL。与空白对照组(CON)和阴性对照组(NC)相比, LV-Sirt3-RNAi-3 组 mRNA 表达水平及蛋白表达水平显著下降($P<0.001$, $P<0.001$)。**结论** 成功构建 *Sirt3* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,并筛选出最佳干扰序列组,获得稳定沉默 *Sirt3* 表达的 SH-SY5Y 细胞株,为后续研究 *Sirt3* 在帕金森病细胞模型中的作用奠定了基础。

【关键词】 *Sirt3* 基因;RNA 干扰;慢病毒载体;帕金森病;人神经母细胞瘤细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0001-08

RNA interference of *Sirt3* in human neuroblastoma SH-SY5Y cell

ZHANG Jingyi¹, DENG Yongning², ZHANG Meng², QU Qiumin^{2*}

(1. Department of Geriatrics, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China.

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061)

【Abstract】 Objective To construct a lentiviral vector for RNA interference of the *Sirt3* gene and to establish a *Sirt3* knockdown human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. **Methods** According to the *Sirt3* nucleotide sequence archived in the GenBank database, four siRNAs targeting *Sirt3* and one negative control were designed, and cloned into a linear vector containing the green fluorescent protein (GFP) gene to produce four recombinant lentivirus plasmids. The recombinant plasmids and helper plasmids were transfected into 293T cells, and the titer of the virus was determined. SH-SY5Y cells were infected with the constructed lentivirus, and the silencing effect on *Sirt3* was accessed by real-time PCR

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81801122)。

[作者简介] 张静怡(1988—),女,硕士,主治医师,研究方向:帕金森、痴呆。E-mail: zhjy98@126.com

[通信作者] 屈秋民(1964—),男,博士生导师,主任医师,研究方向:帕金森、痴呆。E-mail: quqiumin@126.com

and Western blot. The lentivirus-infected cells were screened for the most significant *Sirt3* knockdown. **Results** Recombinant lentiviral vectors expressing siRNAs targeting *Sirt3* were successfully constructed and confirmed by DNA sequencing. The viral titers of the recombinant lentivirus were as follows: LV-SIRT3-RNAi-1 8×10^8 TU/mL, LV-SIRT3-RNAi-2 3×10^8 TU/mL, LV-SIRT3-RNAi-3 8×10^8 TU/mL, and LV-SIRT3-RNAi-4 8×10^8 TU/mL. The levels of *Sirt3* mRNA and SIRT3 protein in the LV-Sirt3-RNAi-3 group were significantly less than those in the negative control group and the blank control group ($P < 0.001$, $P < 0.001$). **Conclusions** A lentivirus vector for RNA interference of *Sirt3* was successfully constructed and SH-SY5Y cell lines with *Sirt3* gene knockdown were selected, which will be useful for future research of *Sirt3* function in Parkinson's disease cell models.

[Keywords] *Sirt3*; RNA interference; lentivirus vector; Parkinson's disease; human neuroblastoma cells

随着全球人口老龄化,衰老问题日益突出,寻找衰老相关疾病的治疗靶点成为研究的热点。Sirtuin 家族是一种线粒体 NAD 依赖的去乙酰化酶,越来越多的研究发现 Sirtuin 家族七个成员 (*Sirt1-Sirt7*) 与衰老相关疾病密切相关^[1-2]。*Sirt3* 主要位于线粒体内,研究发现它通过改善线粒体功能、减轻氧化应激、增加三磷酸腺苷(ATP)生成、抑制凋亡等机制,在衰老相关的神经退行性疾病中发挥神经保护作用^[3-5]。帕金森病作为第二大神经退行性疾病,严重影响了患者的生活质量并且威胁着患者的生命,给社会增加了沉重的经济负担。帕金森病的发病机制包括线粒体功能障碍、氧化应激等^[6],所以 *Sirt3* 在其中的作用研究受到关注。本实验利用基因干扰 RNAi (RNA interference) 技术,拟构建含有 RNAi 片段的慢病毒载体,抑制人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* 基因的表达。人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞具有多巴胺能神经元的特性,是帕金森病体外细胞模型中常用的细胞。实验拟构建稳定沉默 *Sirt3* 基因表达的细胞株,为后续研究 *Sirt3* 在帕金森病细胞模型中的作用提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 购买于美国 ATCC; 293T 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所。

1.2 主要试剂与仪器

GV248 载体、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体购自上海吉凯基因技术有限公司; PCR 用试剂 primer (R&F)、dsDNA oligo 均购自上海吉凯基因技术有限公司; 质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; SYBR Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒购

自飞捷生物公司; 胎牛血清、胰蛋白酶、细胞培养基均购自 Hyclone, USA; Western blot 制胶试剂盒购自西安先锋生物科技有限公司; β -actin 鼠抗单克隆抗体及 HRP 标记山羊抗兔 IgG (sc-2005) 购买于 Santa Cruz, USA; *Sirt3* 兔抗多克隆抗体购买于 Abcams, UK; 二氧化碳培养箱 (Thermo Election, USA); 高速台式离心机 (上海市安亭科学仪器厂); PCR 仪 (Applied Biosystems); 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); 荧光显微镜 (Nikon, Tokyo, Japan)。

1.3 实验方法

1.3.1 RNAi 慢病毒载体的制备

(1) siRNA 的设计合成

利用 RNAi 设计软件按照 RNA 干扰序列设计原则, 设计合成 4 条针对人 *Sirt3* 基因 (GenBank: NM_004612) 的 siRNA 干扰序列和 1 条阴性对照序列, 4 条 siRNA 序列分别为: SIRT3-RNAi-1: 5'-ACCTGCACAGTCTGCCAAA-3'; SIRT3-RNAi-2: 5'-GGCTCTACACGCAGAACAT-3'; SIRT3-RNAi-3: 5'-CAACGTCACACTACTTT-3'; SIRT3-RNAi-4: 5'-GGGTGCTTCAAGTGTTGTT-3'。阴性对照序列: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。序列由吉凯基因技术有限公司合成。同时, 用 BLAST 同源性分析确认 4 对干扰片段的特异性。

(2) RNAi 慢病毒载体的构建

根据以上设计的靶序列, 首先合成含各干扰序列及阴性对照的单链 DNA oligo (见表 1), 然后退火配对产生双链 DNA, 再通过 T4 连接酶将 DNA 片段与经过 AgeI 和 EcoRI 双酶切后的 GV248 线性化载体 (hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin) 在适当的缓冲液中进行连接; 将连接产物转入制备好的细菌感受态细胞, PCR 鉴定阳性重组子, 利用质粒试剂盒提取质粒, 然后送 DNA 测序分析进行验证。

表 1 Oligo 序列
Table 1 Oligo sequence

Oligo 名称 Oligo name	5'	STEM	Loop	STEM	3'
RNAi-1-a	CCGG	CCACCTGCACAGTCTGCCAAA	CTCGAG	TTTGCCAGACTGTGCAGGTGG	TTTTTG
RNAi-1-b	AATTCAAAA	CCACCTGCACAGTCTGCCAAA	CTCGAG	TTTGCCAGACTGTGCAGGTGG	
RNAi-2-a	CCGG	GCGGCTCTACACGCAGAACAT	CTCGAG	ATGTTCTGCGTGTAGAGCCGC	TTTTTG
RNAi-2-b	AATTCAAAA	GCGGCTCTACACGCAGAACAT	CTCGAG	ATGTTCTGCGTGTAGAGCCGC	
RNAi-3-a	CCGG	CCCAACGTCACTCACTACTTT	CTCGAG	AAAGTACTGAGTGACGTTGGG	TTTTTG
RNAi-3-b	AATTCAAAA	CCCAACGTCACTCACTACTTT	CTCGAG	AAAGTACTGAGTGACGTTGGG	
RNAi-4-a	CCGG	GTGGGTGCTTCAAGTGTGTGTT	CTCGAG	AACAACACTTGAAGCACCCAC	TTTTTG
RNAi-4-b	AATTCAAAA	GTGGGTGCTTCAAGTGTGTGTT	CTCGAG	AACAACACTTGAAGCACCCAC	
NC-a	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTG
NC-b	AATTCAAAA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	AAGTTCTCT	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

1. 3. 2 慢病毒载体的包装与滴度测定

(1)慢病毒载体的包装

将重组慢病毒质粒、pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体与 Opti-MEM 混合均匀进行稀释,同时也将 Lipofectamine 2000 试剂稀释,然后将二者进行混合,转移至 293T 细胞的培养液中;转染 8 h 后弃掉含有转染液的培养基,PBS 液洗后加入 10%血清继续培养 48 h。收集转染后 48 h 的 293T 细胞上清液,于 4℃,4000 r/min 离心 10 min,除去细胞碎片,以 0.45 μm 滤器过滤离心后收集病毒液。

(2)慢病毒载体的滴度测定

将 293T 细胞铺板;准备 8 个无菌的 Ep 管,在每个管中加入 90 μL 的无血清培养基。然后取待测定的病毒原液 10 μL 加入到第一个管中混匀,再从中取 10 μL 加到第二个管中,继续相同的操作直到最后一管进行稀释。将细胞孔中的培养基吸去 90 μL 丢弃,然后加入等量稀释好的病毒溶液放入培养箱培养。24 h 后加入完全培养基继续培养。4 d 后观察荧光表达情况,病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量。

1. 3. 3 慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞

复苏 SH-SY5Y 细胞,将细胞分为六组:空白对照组(CON)为不加入病毒液而仅仅加入普通培养基的细胞,阴性对照组(NC)是感染阴性对照病毒的细胞、LV-Sirt3-RNAi-1 组、LV-Sirt3-RNAi-2 组、LV-Sirt3-RNAi-3 组、LV-Sirt3-RNAi-4 组是分别感染了 LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒的细胞。将细胞铺于六孔板中进行培养,提前进行慢病毒转染的预实验确定好 MOI 值,从而据此计算加入病毒液的量。感染 3 d 后在荧光显微镜下观察细胞内荧光表达情况,若 80%细胞均表达荧光则表明慢病毒感染成功。

1. 3. 4 Real-time PCR

收集以上 6 组 SH-SY5Y 细胞,按照 RNA 提取试剂盒操作流程提取总 RNA,并测定 RNA 浓度。将提取的 RNA 与试剂盒中的试剂配成反应液,按照 37℃、15 min,85℃、5 s,4℃反应条件进行反转录反应,然后将反转录液按照操作流程进行 Real-time PCR 反应。Sirt3 引物:上游引物:5'-TCCTCCTTCC TAGCATCACA-3',下游引物 5'-ATCATAACACC GCACTCCA-3',以 GAPDH 为内参,上游引物为:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物为:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 Sirt3 RNA 表达水平。

1. 3. 5 Western blot

收集以上 6 组细胞,配取裂解液裂解细胞提取蛋白,然后用 BCA 法测定蛋白浓度;按照 Western blot 说明书、根据目的蛋白分子量制胶,然后在胶中加入蛋白液上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将蛋白转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜放在 PBST 缓冲液中漂洗后立即用 5%脱脂牛奶的封闭 2 h,然后用一抗(Sirt3、内参 β-actin)、二抗进行孵育。PBS 液充分洗膜后发光成像。

1. 3. 6 确定嘌呤霉素筛选最佳浓度及获得稳定表达细胞株

将 SH-SY5Y 细胞铺板培养 24 h,吸取各孔中的细胞培养基,依次加入嘌呤霉素浓度为 0、2、4、6、8、10 μg/μL 的新鲜无血清的培养基。每天在镜下观察细胞生长状况,3~5 d 后能够使几乎所有细胞死亡的最小嘌呤霉素浓度即为最佳浓度。应用慢病毒感染后的 SH-SY5Y 细胞中加入确定浓度的嘌呤霉素培养基继续培养可以得到稳定表达细胞株。

1. 4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件录入和分析数据。实

验均重复三次,得到的计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计量资料间进行比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 Sirt3 表达的 siRNA 成功插入慢病毒载体

对重组干扰慢病毒阳性克隆进行 DNA 测序,结果显示:插入的针对 Sirt3 基因的 siRNA 核苷酸序列

正确,即构建的干扰 Sirt3 基因表达的 4 种 siRNA 重组慢病毒干扰载体的 DNA 序列与设计的序列完全相符,结果表明成功构建了 4 个沉默 Sirt3 基因的慢病毒载体。(见图 1、2、3、4)

2.2 慢病毒载体成功转染进 293T 细胞

重组慢病毒质粒与 2 种包装质粒共转染 293T 细胞,转染后第 2 天在倒置荧光显微镜下观察,可以看到细胞内发出绿色荧光(见图 5),收集浓缩病毒液测定病毒滴度,根据荧光细胞数计算病毒的滴度

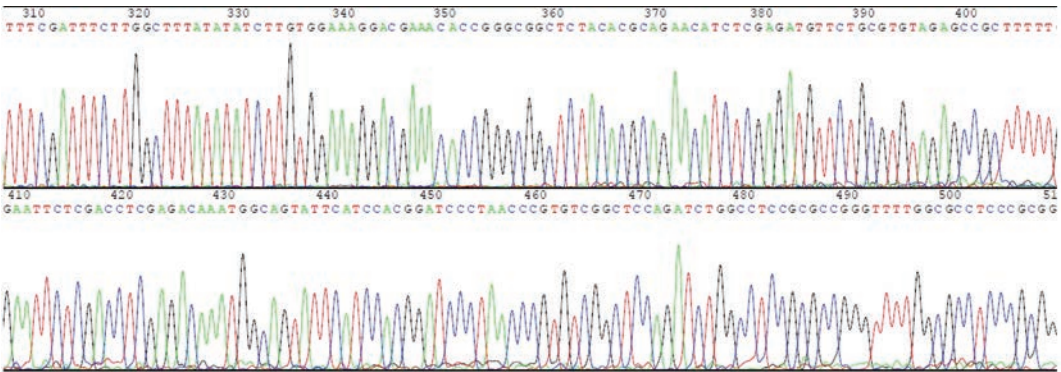


图 1 SIRT3-RNAi-1 慢病毒载体测序结果
Figure 1 Sequencing result of SIRT3-RNAi-1 lentiviral vector

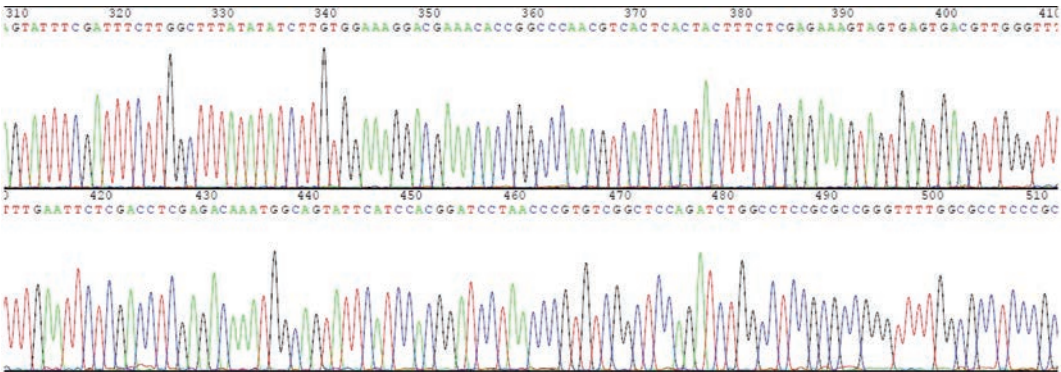


图 2 SIRT3-RNAi-2 慢病毒载体测序结果
Figure 2 Sequencing result of SIRT3-RNAi-2 lentiviral vector

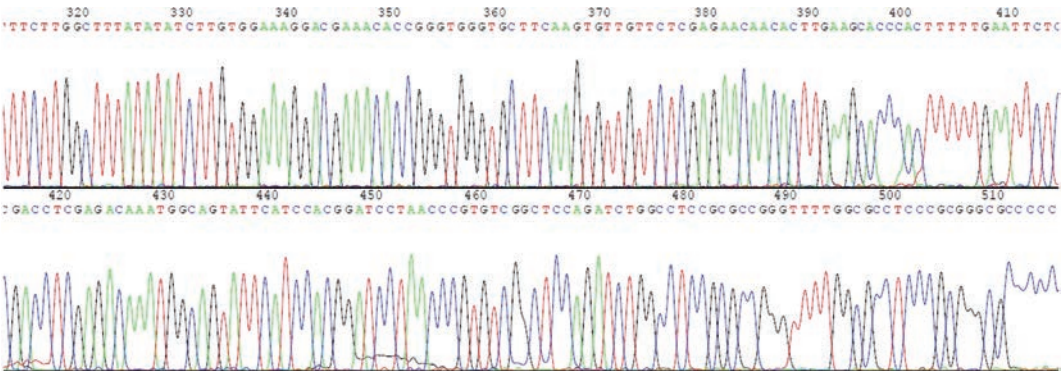


图 3 SIRT3-RNAi-3 慢病毒载体测序结果
Figure 3 Sequencing result of SIRT3-RNAi-3 lentiviral vector

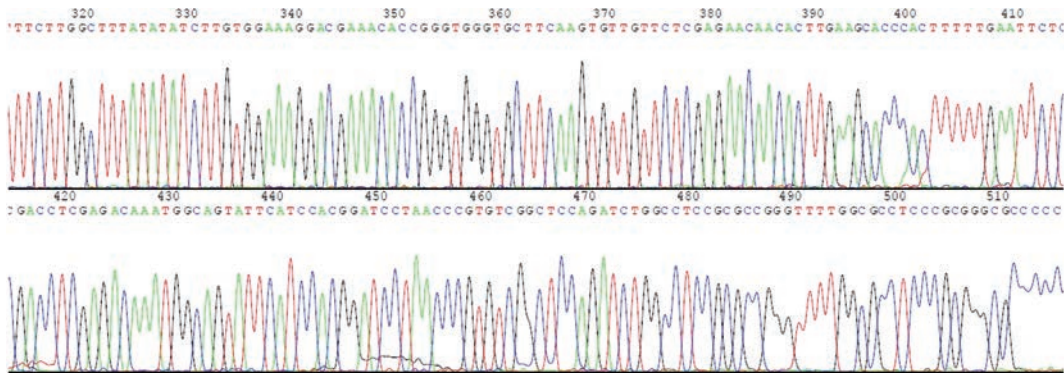


图 4 SIRT3-RNAi-4 慢病毒载体测序结果

Figure 4 Sequencing result of SIRT3-RNAi-4 lentiviral vector

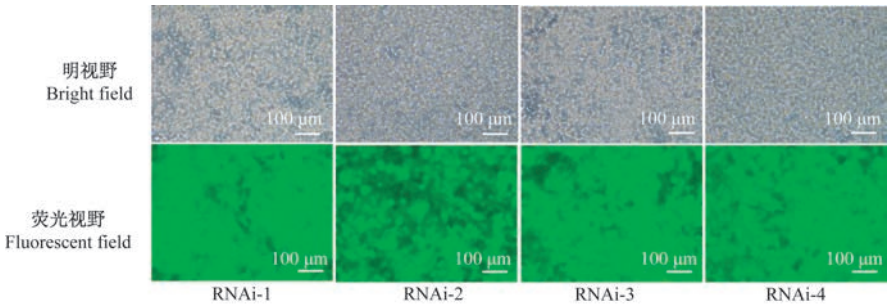


图 5 慢病毒载体共转染 293T 细胞 24 h

Figure 5 Lentiviral vectors were co-transfected into the 293T cells for 24 h

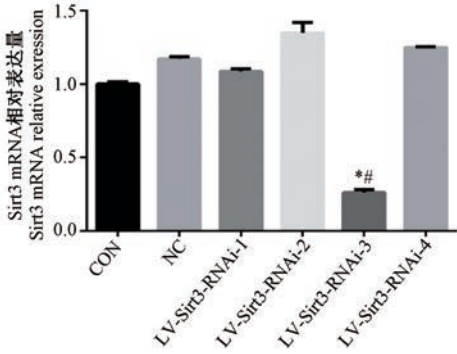
为: LV-SIRT3-RNAi-1 8×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-2 3×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-3 8×10^8 TU/mL、LV-SIRT3-RNAi-4 8×10^8 TU/mL。这表明慢病毒载体成功转染进 293T 细胞,成功包装的慢病毒载体可以用于后续的研究。

2.3 LV-Sirt3-RNAi-3 显著抑制 *Sirt3* mRNA 表达

慢病毒感染人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞,实验分为六组。Real-time PCR 方法检测六组 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* mRNA 表达量分别是: CON (1.0854 ± 0.0944), NC (1.1706 ± 0.0167), LV-Sirt3-RNAi-1 组 (1.0875 ± 0.0156), LV-Sirt3-RNAi-2 组 (1.3492 ± 0.0697), LV-Sirt3-RNAi-3 组 (0.2630 ± 0.0184), LV-Sirt3-RNAi-4 组 (1.2490 ± 0.0049)。统计学分析显示, LV-Sirt3-RNAi-3 组的 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* mRNA 表达量显著低于空白对照组和阴性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。(见图 6)

2.4 LV-Sirt3-RNAi-3 显著抑制 *Sirt3* 蛋白表达

六组 SH-SY5Y 细胞中 *Sirt3* 蛋白表达量分别是: CON 组 (0.4038 ± 0.0355), NC 组 (0.4638 ± 0.0411), LV-Sirt3-RNAi-1 组 (0.4533 ± 0.0750), LV-Sirt3-RNAi-2 组 (0.5491 ± 0.0683), LV-Sirt3-RNAi-3 组 (0.1633 ± 0.0132), LV-Sirt3-RNAi-4 组 (0.5167 ± 0.0416)。统计学分析结果提示 LV-Sirt3-RNAi-3 组



注: CON 组代表没有感染病毒的 SH-SY5Y 细胞内 *Sirt3* mRNA 表达量,其余五组依次代表 SH-SY5Y 细胞感染阴性对照病毒 (NC)、LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒后细胞内 *Sirt3* mRNA 的表达量。与空白对照组 (CON) 相比, $* P < 0.001$; 与阴性对照组相比, $\# P < 0.001$ 。

图 6 各组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞后 *Sirt3* mRNA 的表达

Note. CON group bar shows *Sirt3* mRNA expression in SH-SY5Y cells untreated with lentivirus, the other five groups of bars show *Sirt3* mRNA expression in SH-SY5Y cells infected by negative control lentivirus, LV-Sirt3-RNAi-1, LV-Sirt3-RNAi-2, LV-Sirt3-RNAi-3, LV-Sirt3-RNAi-4 lentivirus. Compared with CON group, $* P < 0.001$. Compared with NC group, $\# P < 0.001$.

Figure 6 *Sirt3* mRNA expression in different cells infected by corresponding lentivirus

的 SH-SY5Y 细胞中 Sirt3 蛋白表达量显著低于空白对照组和阴性对照组,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。(见图 7)

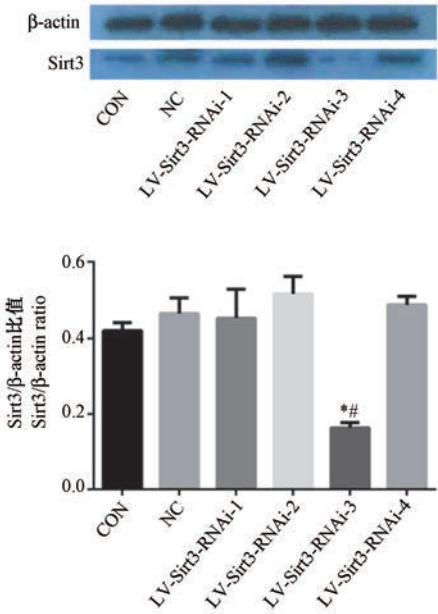
2.5 LV-Sirt3-RNAi-3 转染 SH-SY5Y 细胞稳定表达绿色荧光

加入嘌呤霉素培养基培养后获得稳定表达株通过嘌呤霉素浓度确定实验,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 含有嘌呤霉素培养基为最佳浓度。在 LV-Sirt3-RNAi-3 组细胞中加入嘌呤霉素培养基培养后获得稳定表达株。在荧光显微镜下观察,通过可见光视野与荧光视野

对比,可见 90% 以上细胞均可见绿色荧光。(见图 8)

3 讨论

Sirt3 基因定位在 11 号染色体(11p15.5)上,主要存在于肾、心脏、脑、棕色脂肪等代谢活跃的组织中^[7]。早期对 Sirt3 基因多态性研究发现,Sirt3 基因外显子 3 上 G447T 碱基颠换与老年男性长寿有着紧密联系^[8]。也有研究发现通过节食(热量限制)延缓动物衰老进程的机制可能是激活了 Sirt3^[9]。后来的大量针对 Sirt3 的生物功能研究,证实了 Sirt3 作为一种去乙酰化酶,可以通过去乙酰化长链乙酰脱氢酶(LCAD)、AceCS2(acetyl-CoAsynthetase II)酶、异柠檬酸脱氢酶 2(IDH2)等调控细胞内的能量代谢平衡^[10],Sirt3 还通过去乙酰化 MnSOD、SOD2 等并增加其活性从而减少氧化应激损伤^[11],此外 Sirt3 可以减少活性氧介导的线粒体 DNA 损伤^[12]。这些研究让人们意识到 Sirt3 在衰老、肿瘤等疾病中的潜在作用^[13]。近年来,Sirt3 在神经退行性疾病如阿尔茨海默病、亨廷顿病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症等疾病的研究中,均证实了 Sirt3 的神经保护作用^[14-16]。帕金森病是老年人常见的神经系统疾病,以中脑黑质多巴胺能神经元的变性坏死及残存的神经元内出现路易小体为主要病理特点^[17]。目前对帕金森病的发病机制研究认为,主要是线粒体功能障碍、氧化应激损伤增加、 α -Synuclein 蛋白的异常沉积以及三者之间的相关影响^[18-20]。在 MPTP 诱导的帕金森病小鼠模型中发现,中脑组织 Sirt3 的表达量减少,且 Sirt3 的减少



注:左图为 Western blot 代表图,β-actin 为内参;右图为 Sirt3 的相对表达量,CON 组代表没有感染病毒的 SH-SY5Y 细胞内 Sirt3 蛋白表达量,其余五组依次代表 SH-SY5Y 细胞感染阴性对照病毒(NC)、LV-Sirt3-RNAi-1、LV-Sirt3-RNAi-2、LV-Sirt3-RNAi-3、LV-Sirt3-RNAi-4 慢病毒后细胞内 Sirt3 蛋白的表达量。与空白对照组(CON)相比,* $P < 0.001$;与阴性对照组相比,# $P < 0.001$ 。

图 7 各组慢病毒感染 SH-SY5Y 细胞后 Sirt3 蛋白表达

Note. Left graph shows Western blot images, β-actin was used as a loading control. Right bar graph shows relative expression of Sirt3. CON group bar shows Sirt3 protein expression in SH-SY5Y cells untreated with lentivirus, the other five groups of bars show Sirt3 protein expression in SH-SY5Y cells infected by negative control lentivirus, LV-Sirt3-RNAi-1, LV-Sirt3-RNAi-2, LV-Sirt3-RNAi-3, LV-Sirt3-RNAi-4 lentivirus. Compared with CON group, * $P < 0.001$. Compared with NC group, # $P < 0.001$.

Figure 7 Sirt3 protein expression in different cells infected by corresponding lentivirus

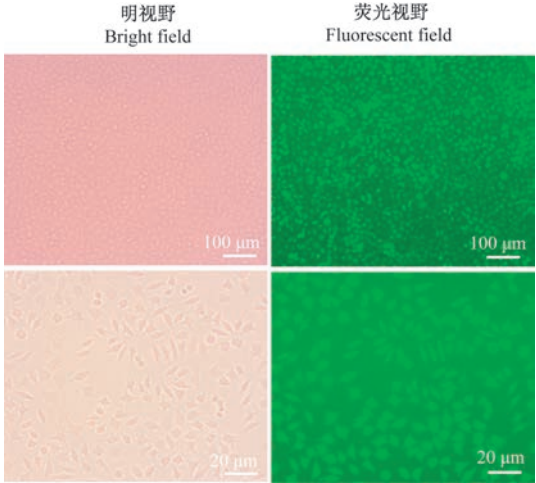


图 8 Sirt3 基因稳定干扰的 SH-SY5Y 细胞
Figure 8 SH-SY5Y cells with stable Sirt3 gene silencing

加剧了黑质纹状体多巴胺能神经元的退化^[21]。实验研究表明,褪黑激素通过上调 *Sirt3* 表达抵抗 PD 多巴胺能神经元损伤,作用机制与其抑制小胶质细胞激活减轻氧化应激和炎症损伤有关^[22]。柴胡皂甙 d 对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞具有神经保护作用,且机制可能为上调 *Sirt3* 的表达水平^[23]。另有研究发现嘌呤生物碱 Theacrine 通过激活线粒体 *Sirt3*,抑制 ROS 生成,最终抑制多巴胺能神经元的凋亡^[24]。马振凯等作者实验中发现,姜黄素可降低 SH-SY5Y 细胞 ROS 水平,上调 *Sirt3* 表达^[25]。以上结果提示,*Sirt3* 与 PD 发生具有一定的关系,但关于 *Sirt3* 在 PD 发展中具体作用分子机制的研究,还不够深入。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,通过导入与靶基因 mRNA 序列具有同源性的双链 RNA,诱导同源靶基因 mRNA 的降解,从而沉默该基因表达^[26]。慢病毒来源于人类免疫缺陷病毒(HIV),能感染分裂期与非分裂期细胞,还具有可容载较大基因片段、目的基因稳定持久表达、诱发宿主免疫反应率低等特点,因此慢病毒成为了携带干扰 RNA 的理想载体^[27]。慢病毒载体介导的 RNAi 技术,将基因干扰技术与慢病毒结合起来,特异性抑制基因的表达,现在已被广泛应用于基因工程^[28-29]。目前针对 *Sirt3* 基因干扰及过表达的慢病毒载体构建的已有报道,但 *Sirt3* 基因稳定干扰的人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞株建立的详细方法及验证未见报道。

本实验中我们首先利用 RNAi 设计软件按照 RNA 干扰序列设计原则,设计合成 4 条干扰序列及 1 个阴性对照序列,然后将其分别与慢病毒载体连接。通过对重组干扰慢病毒阳性克隆进行 DNA 测序,结果提示插入的 siRNA 核苷酸序列是正确的,表明我们成功构建了 4 个沉默 *Sirt3* 基因的慢病毒载体。然后将重组慢病毒质粒与包装质粒共转染 293T 细胞进行包装、测定滴度,从而获得了 *Sirt3* 基因干扰慢病毒载体。并将慢病毒载体感染 SH-SY5Y 细胞,利用 Real-time PCR 及 Western blot 方法检测了 *Sirt3* 的基因及蛋白表达情况,结果发现 LV-*Sirt3*-RNAi-3 慢病毒感染组细胞内的基因表达及蛋白表达量均显著下降,因此筛选出了有效干扰序列 LV-*Sirt3*-RNAi-3,再次说明我们成功构建了针对 *Sirt3* 基因的 RNA 干扰慢病毒载体,最终通过嘌呤霉素筛选获得稳定表达株。实验中,其它设计的干

扰载体并没有使 SH-SY5Y 细胞内 *Sirt3* 的表达明显减少,这与以往的文献报道有差别。但我们的实验成功获得了稳定沉默 *Sirt3* 基因的 SH-SY5Y 细胞株,为后续进一步了解 *Sirt3* 基因的生物学特性以及探讨 *Sirt3* 引起的帕金森病细胞模型中的分子生物学变化,提供了有效的工具,具有重要的实验价值。

参考文献:

- [1] Sun W, Liu C, Chen Q, et al. SIRT3: a new regulator of cardiovascular diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7293861.
- [2] Sosnowska B, Mazidi M, Penson P, et al. The sirtuin family members SIRT1, SIRT3 and SIRT6: Their role in vascular biology and atherogenesis [J]. Atherosclerosis, 2017, 265: 275-282.
- [3] Wu J, Zeng Z, Zhang W, et al. Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases [J]. Free Radic Res, 2019, 53(2): 139-149.
- [4] Liu J, Li D, Zhang T, et al. SIRT3 protects hepatocytes from oxidative injury by enhancing ROS scavenging and mitochondrial integrity [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3158.
- [5] Anamika, Khanna A, Acharjee P, et al. Mitochondrial SIRT3 and neurodegenerative brain disorders [J]. J Chem Neuroanat, 2019, 95: 43-53.
- [6] Tönges L, Metzdorf J, Zella S. Parkinson's disease and neuroinflammation - cellular pathology, mechanisms and therapeutic options [J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2018, 86(1): S10-S20.
- [7] Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, et al. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling [J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 28(8): 643-661.
- [8] Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, et al. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages [J]. Genomics, 2005, 85(2): 258-263.
- [9] Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle [J]. Aging (Albany NY), 2009, 1(9): 771-783.
- [10] Porter LC, Franczyk MP, Pietka T, et al. NAD(+)-dependent deacetylase SIRT3 in adipocytes is dispensable for maintaining normal adipose tissue mitochondrial function and whole body metabolism [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 315(4): E520-E530.
- [11] Yi X, Guo W, Shi Q, et al. SIRT3-dependent mitochondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo [J]. Theranostics, 2019, 9(6): 1614-1633.
- [12] Wang T, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism [J]. Mol Cell,

- 2019, 75(4): 823–834.
- [13] Ansari A, Rahman MS, Saha SK, et al. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(1): 4–16.
- [14] Lee J, Kim Y, Liu T, et al. SIRT3 deregulation is linked to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(1): e12679.
- [15] Salvatori I, Valle C, Ferri A, et al. SIRT3 and mitochondrial metabolism in neurodegenerative diseases [J]. *Neurochem Int*, 2017, 109: 184–192.
- [16] Neo SH, Tang BL. Sirtuins as modifiers of Huntington's disease (HD) pathology [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 154: 105–145.
- [17] Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and management of Parkinson's disease [J]. *Semin Neurol*, 2017, 37(2): 118–126.
- [18] Park JS, Davis RL and Sue CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5): 21.
- [19] Puspita L, Chung SY, Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease [J]. *Mol Brain*, 2017, 10(1): 53.
- [20] 罗海玉, 吴正存, 马开利. 基于 α -突触核蛋白原纤维的帕金森氏疾病模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(9): 103–108.
- [21] Liu L, Peritore C, Ginsberg J, et al. SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(3): 600–608.
- [22] 蒋德旗, 徐兰程, 毛书慧, 等. SIRT3 介导褪黑激素保护帕金森病多巴胺能神经元的作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 121–126.
- [23] 杨军. 柴胡皂甙 d 通过调节 SIRT3 对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞模型的神经保护作用 [D]. 武汉: 武汉大学, 2016.
- [24] 汪婷美. 嘌呤生物碱 Theacrine 通过 Sirt3 调控线粒体蛋白去乙酰化发挥多巴胺能神经元保护作用 and 机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [25] 马振凯, 李梦楠, 白宏英. 姜黄素对 PD 模型细胞活性氧簇水平及沉默信息调控因子 3 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2017, 57(40): 50–52.
- [26] Rosa C, Kuo YW, Wuriyangan H, et al. RNA interference mechanisms and applications in plant pathology [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2018, 56: 581–610.
- [27] 孟凡荣, 陈琛, 万海粟, 等. 慢病毒载体及其研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2014, 17(12): 870–876.
- [28] 王琴, 付宇, 王平. 沉默 miRNA16 对肺结核模型小鼠免疫功能调控作用及其机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 86–91.
- [29] 刘宇, 陈恒伟, 温悦婷, 等. 基于 Tet-On 系统构建 Alb 启动子调控猪 uPA 转基因表达的慢病毒载体 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 23–28.

〔收稿日期〕2020-06-22

黄钟,孙洁,姚振滨,等. 下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 9-16.

Huang Z, Sun J, Yao ZB, et al. Alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by miR-128-3p down-regulation and effects on lung tissue morphology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 9-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.002

下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响

黄 钟¹, 孙 洁², 姚振滨¹, 李桂花^{1*}, 许晓刚¹

(1. 石河子大学医学院第一附属医院 急诊内科, 新疆 石河子 832000;
2. 石河子大学医学院第一附属医院 院内感染控制办公室, 新疆 石河子 832000)

【摘要】 目的 探究下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响。方法 选取 60 只健康 3 周龄 SD 大鼠, 采用随机分组法将大鼠分为: 假手术组、脓毒症模型组、空白转染组和 miR-128-3p 沉默组, 每组 15 只。除假手术组外各组大鼠采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型; 空白转染组构建空白质粒并转染大鼠; miR-128-3p 沉默组构建慢病毒质粒并转染大鼠。RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达, 确定干扰成功; 检测各组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换情况; 采用 ELISA 检测外周血清 IL-6、TNF- α 、iNOS 的含量; 采用 HE 染色观察肺上皮组织纤维化情况及病理损伤情况; 采用 TUNEL 染色结合蛋白质印记检测肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达; 采用 MASSON 染色结合蛋白质印记检测 TGF- β 和 α -SMA 的表达情况。结果 HE 染色结果显示: miR-128-3p 沉默组细胞分布较为均匀, 且坏死细胞较少。MASSON 染色结果显示: 脓毒症模型组肺组织出现严重纤维化和损伤, miR-128-3p 沉默组肺组织纤维化程度得到改善。相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠 miR-128-3p 表达、气道阻力、IL-6 含量水平、iNOS 含量水平、TNF- α 含量水平、肺组织细胞凋亡率、cleaved cas3/Caspase-3、cleaved cas9/Caspase-9、TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达均显著升高 ($P<0.05$), 静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著降低 ($P<0.05$)。相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p 表达、气道阻力、IL-6 含量水平、iNOS 含量水平、TNF- α 含量水平、肺组织细胞凋亡率、cleaved cas3/Caspase-3、cleaved cas9/Caspase-9、TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达均显著降低 ($P<0.05$), 静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高 ($P<0.05$)。结论 下调 miR-128-3p 可以缓解脓毒症大鼠急性肺损伤, 其作用机制可能与降低大鼠体内炎症反应并抑制肺组织细胞的凋亡相关。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 组织形态学; 炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0009-08

Alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by miR-128-3p down-regulation and effects on lung tissue morphology

HUANG Zhong¹, SUN Jie², YAO Zhenbin¹, LI Guihua^{1*}, XU Xiaogang¹

(1. the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College Department of Emergency Medicine, Shihezi 832000, China.
2. the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College Nosocomial Infection Control Office, Shihezi 832000)

【基金项目】 新疆维吾尔自治区地区科学基金项目 (81260363)。

【作者简介】 黄钟 (1981—), 男, 本科, 主治医师, 主要从事急诊危重症、急性肺损伤方面研究。E-mail: hz09932121@163.com

【通信作者】 李桂花 (1965—), 女, 硕士, 主任医师, 主要从事急诊危重症研究。E-mail: lgh169@126.com

【Abstract】 Objective To explore alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by down-regulation of miR-128-3p and effects on lung tissue morphology. **Methods** Sixty healthy 3-week-old SD rats were divided into a sham-operated group, a sepsis model group, a blank transfection group and an miR-128-3p inhibitor group by a random grouping method with 15 rats in each group. Sepsis models were prepared by cecal ligation and puncture. In the blank transfection group, blank plasmids were constructed and were transfected into rats. In the miR-128-3p inhibitor group, lentiviral plasmids were constructed and were transfected into rats. The expression of miR-128-3p was detected by RT-PCR to determine the success of interference. Resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were determined in each group. The contents of serum IL-6, TNF- α and iNOS in peripheral blood were detected by ELISA. Lung tissues and pathological injury were observed by hematoxylin & eosin (HE) staining. The expression of Caspase-3 and Caspase-9 in lung tissue was detected by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) staining and western blotting. The expression of TGF- β and α -SMA was detected by Masson's trichrome staining and western blotting. **Results** HE staining showed that cell distribution was even in the miR-128-3p inhibitor group, with few necrotic cells. MASSON staining showed that there was severe fibrosis and damage of lung tissues in sepsis model group, and degree of lung tissue fibrosis in miR-128-3p silencing group was improved. Compared with the sham-operated group, expression of miR-128-3p, airway resistance, levels of IL-6, iNOS and TNF- α , apoptosis rate of lung tissue cells, relative expression of cleared cas3/Caspase-3, cleared cas9/Caspase-9, and TGF- β and α -SMA protein levels were significantly increased ($P < 0.05$), while resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were significantly decreased in the sepsis model group ($P < 0.05$). Compared with the blank transfection group, expression of miR-128-3p, airway resistance, levels of IL-6, iNOS and TNF- α , apoptosis rate of lung tissue cells, relative expression of cleared cas3/Caspase-3, cleared cas9/Caspase-9, and TGF- β and α -SMA protein levels were significantly decreased ($P < 0.05$), while resting ventilation, changes in airway resistance and lung volume were significantly increased in the miR-128-3p inhibitor group ($P < 0.05$). **Conclusions** Down-regulation of miR-128-3p can alleviate acute lung injury in sepsis rats and the mechanism of action may be related to a reduced inflammation response and inhibited apoptosis of lung tissue cells.

【Keywords】 sepsis; acute lung injury; histomorphology; inflammatory response

脓毒症是机体对感染反应失调所致的危及生命的器官功能障碍,其发病率和死亡率均较高^[1]。虽然近年来,医药发展迅速,但对于严重的脓症患者机体对感染刺激的机体的免疫、内分泌代谢、炎症、凝血等系统在感染时的综合反应的治疗仍不完善^[2]。临床上所采取的治疗方法以支持治疗为主,但随着对分子细胞学研究的深入,miRNA 在调控细胞凋亡及相关恶性生物学特征中发挥了重要作用^[3]。近年来随着研究的深入发现 miR-128-3p 在相关疾病中扮演重要角色。赵阳等^[4]研究表明 miR-128-3p 过表达可以靶向 MAPK1 抑制膀胱癌细胞株的侵袭,迁移和上皮间质转化。侯绍蔚研究表明 miR-128-3p 靶向 TCF4 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭^[5]。张华东等^[6]研究表明 miR-128-3p 能通过靶向 BMI 调控炎症反应。由此我们推测 miR-128-3p 对毒症大鼠急性肺损伤中相关细胞的凋亡及炎症反应可能有一定的影响。但目前关于 miR-128-3p 在脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响研究较少。本文旨在研究 miR-128-3p 对脓毒症大鼠急性肺损伤炎症反应、肺组织形态学的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 3 周龄 SD 大鼠,体重(60 ± 6)g,60 只,购自广东医学院实验动物中心[SCXK(粤)2019-0050],于广东省检迅检测科技有限公司 SPF 级动物房中进行饲养[SYXK(粤)2019-0216],自由饮水和进食,温度维持 25℃ 左右,光照/黑暗各 12 h,常规饲养。本实验通过本院动物伦理委员会批准(20180201);动物实验严格遵循动物实验减少(reduction)、优化(refinement)和替代(replacement)-3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

TRAIL(英国 Pepro Tech 公司);Caspase-3、Caspase-9、转化生长因子- β (Transformed growth factor- β , TGF- β)抗体(货号:ab179695;批号:20190103)和 α -平滑肌肌动蛋白(Alpha-smooth muscle actin, α -SMA)抗体(货号:ab240678;批号:20190401)(艾博抗公司);HRP 羊抗兔 IgG、HRP 羊抗鼠 IgG 抗体(美国 Thermo 公司);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)试剂盒(货号:SBJ-H0465;

批号 20190301)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒(货号: SBJ-H0038; 批号 20190304)、一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) ELISA 试剂盒(货号: SBJ-H1350; 批号: 20190307)(南京森贝伽生物科技有限公司); MASSON 染液(货号: SNM346, 北京百奥莱博科技有限公司); TUNEL 染液(货号: 11684817910, 上海意杰生物科技)。

Sysmex-chemix-180 全自动生化分析仪(日本 Furuno Electric 公司); TDL-5 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 3w-5 低温离心机(湖南恒诺离心机有限公司); SG-51 金相显微镜(上海光学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及建立模型

将 60 只大鼠适应性喂养 1 周, 采用随机分组法将大鼠分为: 假手术组、脓毒症模型组、空白转染组和 miR-128-3p 沉默组, 每组 15 只, 除假手术组其余各组大鼠采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型, 操作流程参考文献^[7]: 大鼠麻醉, 去毛发, 腹正中中线作长 3 cm 的切口, 结扎位置选取距离盲端 1.5 cm 处, 结扎远端进行针穿并挤出少许肠管内粪便, 再将盲肠回纳腹腔, 关腹并进行补液。假手术组不结扎及针头对穿盲肠, 其余步骤相同。判断模型成功标准参考秦怡等^[8]研究, 大鼠活动减少、摄食减少、嗜睡、蜷缩、眼角出现分泌物等, 7 h 血培养阳性为模型成功, 同时导致肺功能损伤为造模成功。肺纤维化评价标准^[9]: 呈现出慢性肺泡炎且其中成分出现进行性损害, 纤维组织大量增生、间质胶原紊乱甚至出现囊性变化, 肺泡阴影呈现出磨玻璃状, 严重进展时可出现结节状或网状阴影。

1.3.2 干预

空白转染组构建空白质粒并转染大鼠; miR-128-3p 沉默组构建慢病毒质粒并通过尾静脉注射转染大鼠, 设计 3 个 miR-128-3p 基因的干扰片段, 合成单链 DNA 片段, 片段两端分别含酶切位点, 退火形成双链 DNA。双酶切 miR-128-3p 沉默基因载体和 DNA 片段, 3"4 DNA 连接酶连接(由武汉华联科有限公司完成)。

1.3.3 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

肺功能检测完毕 24 h 后, 处死大鼠并取出肺组织, TRIzol 提取总 RNA、反转录 cDNA 链并作为 PCR 扩增模板, 95℃ 2 min、95℃ 8 s、58℃ 35 s、72℃ 40 s、

40 个循环, 使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 计算出待测基因相对表达量。miR-128-3p: 上游引物: 5'-GTGCAGGGTCCGA GGT-3' 下游引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'。

GADPH: 上游引物: 5'-CTCAGACACCATGGG GAGGTGA-3' 下游引物: 5'-ATGATCTTGAGGCTG TTGTCATA-3'。

1.3.4 各组大鼠肺功能的检测

完成大鼠基因干预 24 h 后, 采用 AniRes2005 动物肺功能分析系统, 在常温下, 将大鼠置体描器内, 检测大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换情况。

1.3.5 大鼠外周血相关因子检测

断颈法处死大鼠后立即取大鼠血液 2 mL, 在离心机中以 1500 r/min 离心 15 min, 取上清液用 ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 、iNOS 含量水平, 按照试剂盒说明书操作。

1.3.6 HE 染色观察肺组织及病理损伤情况

HE 染色观察大鼠肺上皮组织及病理损伤情况, 取大鼠肺上皮组织, 依次进行常规石蜡包埋、切片、苏木精染色、伊红染色、封片、高倍镜观察大鼠肺组织情况。

1.3.7 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况

将肺上皮组织切片, 依次经过二甲苯清洗、乙醇清洗、蛋白酶 K 室温反应 15 min、10% 中性甲醛固定、乙醇乙酸浸润、3% 过氧化氢浸润、TdT 酶缓冲溶液孵育 5 min、终止液终止反应 20 min、过氧化酶标记物抗体孵育 20 min、DAB 显色 30 min、无水乙醇和二甲苯固定、晾干、封片, 于荧光显微镜下观察, 凋亡率=阳性细胞/总细胞 $\times$ 100%。

1.3.8 Western blot 检测蛋白表达水平

提取肺组织总蛋白, 依次经过 SDS 电泳、蛋白转 PVDF 膜、室温封闭 2 h、加入待检测蛋白一抗, 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 37℃ 孵育 2 h, 显色液显色, 进行目标蛋白条带灰度值吸光度分析。

1.3.9 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况

大鼠肺组织石蜡切片, 进行 Masson 染色试剂盒中 A、B 染色液染色前和染色后步骤与 HE 染色相同。

1.4 统计学方法

使用 Sigma Stat 3.5 软件进行数据统计, 使用 GraphPad Prism 5 软件作图, 计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

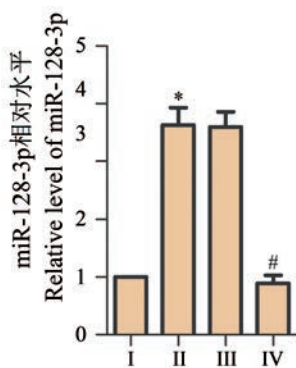
由 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠 miR-128-3p 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 12.321; P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 miR-128-3p 表达显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 13.368; P = 0.000$), 见图 1。

2.2 各组大鼠肺功能的检测结果

检测大鼠肺功能可以看出, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 大鼠外周血相关因子检测

使用 ELISA 检测大鼠外周血炎症因子检测结果显示, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠外周血 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。



注: I: 假手术组; II: 脓毒症模型组; III: 空白转染组; IV: miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 RT-PCR 检测 miR-128-3p 表达

Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of miR-128-3p detected by RT-PCR

2.4 HE 染色观察肺组织及病理损伤情况

HE 染色观察各组大鼠肺组织病理损伤发现, 假手术组细胞分布均匀, 且基本无坏死细胞; 脓毒症模型组和空白转染组大鼠肺组织细胞排列散乱, 且数量缺失明显增多, 坏死细胞较多; miR-128-3p 沉默组细胞排列较均匀, 坏死细胞明显较少, 见图 2。

2.5 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况

TUNEL 染色观察各组大鼠肺组织细胞凋亡情况发现, 相比假手术组凋亡率为 $(2.00 \pm 2.00)\%$, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠肺组织细胞凋亡率分别为 $(38.50 \pm 5.00)\%$ 和 $(41.05 \pm 7.00)\%$ 显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 8.984; P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织细胞凋亡率为 $(9.00 \pm 3.00)\%$ 显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 5.321; P = 0.000$), 见图 3。

2.6 各组大鼠肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达检测结果

蛋白质印记实验检测大鼠肺组织凋亡蛋白表达结果发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠肺组织 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 15.054, P = 0.000; t = 9.698, P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 33.696, P = 0.000; t = 7.369, P = 0.000$), 见图 4。

2.7 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况

MASSON 染色观察各组大鼠肺组织伤发现, 假手术组的大鼠肺组织细胞分布均与且有序, 脓毒症模型组肺组织纤维化和损伤程度严重, miR-128-3p 沉默组肺组织纤维化和损伤程度减轻, 见图 5。

2.8 各组大鼠肺组织 TGF- β 和 α -SMA 表达情况

蛋白质印记实验检测大鼠肺组织炎症相关蛋白表达结果发现, 相比假手术组, 脓毒症模型组大鼠和空白转染组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 15.874, P = 0.000; t = 10.087, P = 0.000$); 相比空白转染组, miR-128-3p 沉默组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 10.344, P = 0.000; t = 5.360, P = 0.000$), 见图 6。

表 1 各组大鼠肺功能的检测结果($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 1 Test results of lung function of rates in each group

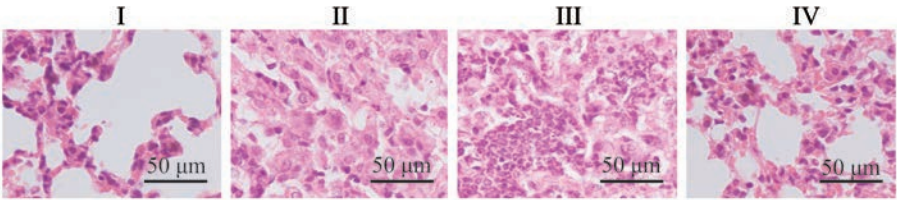
组别 Groups	静息通气量(mL/kg) Resting ventilation	气道阻力改变 Airway resistance changes	肺容积变换(mL) Lung volume changes
假手术组 Sham-operated group	3.42±0.19	74.34±6.36	0.27±0.03
脓毒症模型组 Sepsis model group	1.59±0.22 *	53.42±9.23 *	0.11±0.04 *
空白转染组 Blank transfection group	1.62±0.24 *	52.46±5.16 *	0.12±0.01 *
miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p silencing group	2.81±0.32 #	68.02±7.18 #	0.24±0.02 #
F	201.767	34.370	134.000
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

表 2 大鼠外周血炎症因子检测($\bar{x} \pm s, n = 15$)
Table 2 Detection of inflammatory factors in peripheral blood of rats

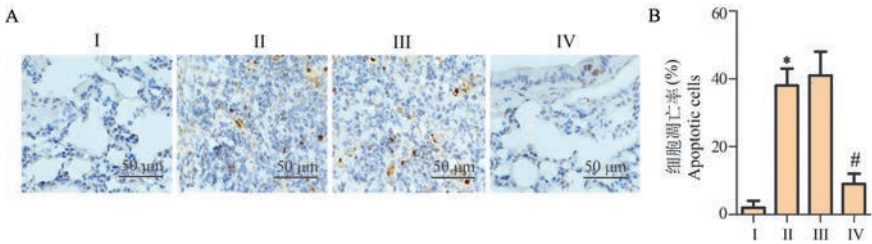
组别 Groups	IL-6(pg/mL)	iNOS(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
假手术组 Sham-operated group	18.07±3.35	42.08±6.09	27.03±2.35
脓毒症模型组 Sepsis model group	94.85±11.23 *	205.92±24.11 *	136.35±17.43 *
空白转染组 Blank transfection group	98.83±16.44 *	201.08±21.24 *	138.53±13.26 *
miR-128-3p 沉默组 miR-128-3p silencing group	37.12±4.67 #	81.77±7.52 #	59.19±8.28 #
F	232.139	370.188	340.164
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。
Note. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.



注:I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IIV:miR-128-3p 沉默组。
图 2 HE 染色观察肺组织病理损伤情况($n = 15$)
Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group.

Figure 2 Observation of lung tissue and pathological damage by HE staining

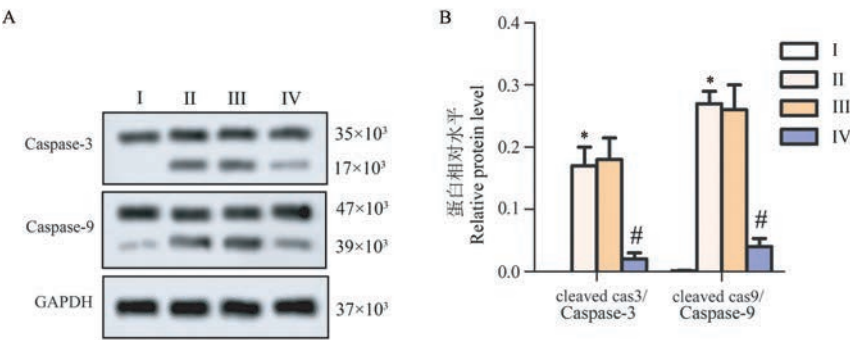


注:A:TUNEL 染色图;B:肺组织细胞凋亡率。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IIV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P < 0.05$; 与空白转染组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 TUNEL 染色检测大鼠肺组织细胞凋亡情况($n = 15$)

Note. A, TUNEL staining images. B, Apoptosis rates of lung tissues. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P < 0.05$. Compared with blank transfection group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Apoptosis of lung tissues detected by TUNEL staining

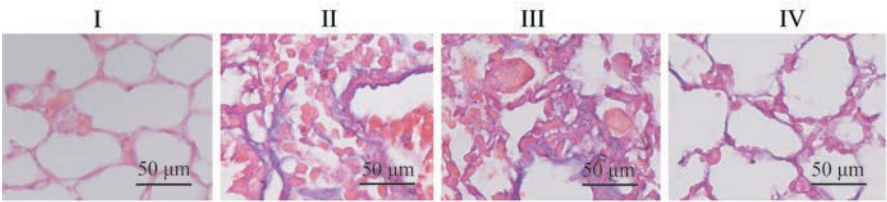


注:A:蛋白质印记图;B:相关蛋白相对表达量。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P<0.05$;与空白转染组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠肺组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达情况 ($n=15$)

Note. A, Western blot images. B, Relative expression levels of related proteins. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P<0.05$. Compared with blank transfection group, # $P<0.05$.

Figure 4 Expression of Caspase-3 and Caspase-9 in lung tissues of rats in each group

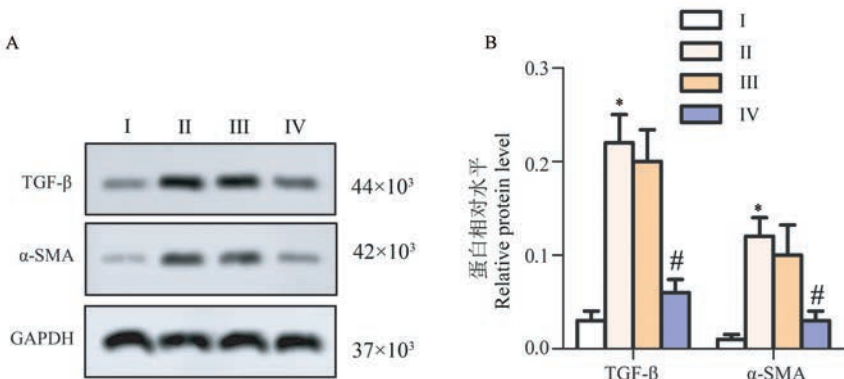


注:I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。

图 5 MASSON 染色检测大鼠肺组织情况结果 ($n=15$)

Note. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group.

Figure 5 Lung tissue conditions of rats detected by MASSON staining



注:A:蛋白质印记图;B:相关蛋白相对表达量。I:假手术组;II:脓毒症模型组;III:空白转染组;IV:miR-128-3p 沉默组。与假手术组相比, * $P<0.05$;与空白转染组相比, # $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠肺组织 TGF-β 和 α-SMA 表达情况 ($n=15$)

Note. A, Western blot images. B, Relative expression levels of related proteins. I, Sham-operated group. II, Sepsis model group. III, Blank transfection group. IIV, miR-128-3p silencing group. Compared with sham-operated group, * $P<0.05$. Compared with blank transfection group, # $P<0.05$.

Figure 6 Expression of TGF-β and α-SMA in lung tissues of rats in each group

3 讨论

脓毒症可以序贯出现多个器官功能损伤,其中肺部损伤较为常见^[10]。其中静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换是常见的几个肺功能指标。静息通气量是指每分钟静息通气量是指在平静状态下每分钟进或出肺的气体总量^[11];气道阻力是指气道内单位流量所产生的压力差^[12];当静息通气量和气道阻力改变降低后可能因为肺部出现水肿或炎症反应引起肺阻塞。本研究发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠静息通气量、气道阻力改变和肺容积变换显著升高。说明抑制 miR-128-3p 的表达后,大鼠肺功能的到了有效缓解,这可能是因为炎症得到了有效抑制,使得大鼠肺部的水肿也得到了缓解。黄小洵等^[13]研究表明:改善静息通气量及相关肺功能指标可以有效缓解脓毒症导致的肺损伤,与本研究得出的结论相一致。

细胞因子主要可分为促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子两种^[14]。目前研究较多的促炎性细胞因子包括:TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 等;抗炎性细胞因子则包括:IL-4、IL-10、TNF 受体(TNF-sr)等^[15],本研究中主要研究 IL-6、iNOS 和 TNF- α 这几种相关因子。为探究大鼠肺功能得到了改善是否与降低炎症反应相关,本研究检测了大鼠外周血的相关因子发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 IL-6 含量水平、iNOS 含量水平和 TNF- α 含量水平均显著降低。说明大鼠的肺功能得到有效的改善确实与炎症反应相关。同时为了进一步验证,通过 MASSON 染色观察各组大鼠肺组织发现,miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织损伤及炎性浸润也有显著的改善。吴松林等^[16]研究表明:长链非编码 RNA 的表达可以有效抑制脓毒症导致的肺损伤患者外周血内的炎症因子水平,与本研究得出的结论相类似。

除了抑制炎症反应以外,防止细胞的凋亡也是重要方法之一。本研究通过 TUNEL 染色,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠肺组织细胞凋亡数目显著降低,为了探究其原因,使用蛋白质印迹检测了相关凋亡基因的表达发现,相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 cleaved cas3/Caspase-3 和 cleaved cas9/Caspase-9 比值显著降低。这可能是因为 Caspase 家族蛋白为调控凋亡的主要蛋白之一。抑制了 miR-128-3p 的表达,使得肺组织细胞凋亡启

动子 Caspase-3 的表达受到了抑制,减缓了下游 caspase-9 的活化,使得凋亡信号减弱,反过来抑制了 Caspase-3 的激活,防止了肺组织细胞的凋亡。姜永帅等^[17]研究表明:抑制脓症患者体内的 Caspase 家族凋亡蛋白的表达可以有效缓解脓毒症导致的相关器官功能损伤,与本研究得出的结论相一致。

肺纤维化是以成纤维细胞增殖及大量细胞外基质聚集并伴炎症损伤、组织结构破坏为特征的一大类肺疾病的终末期改变^[18]。大鼠肺部出现损伤后会伴随肺部纤维化。肺纤维化主要标志包括: α -SMA 和 TGF- β 等; α -SMA 主要存在于肌成纤维细胞浆,是肌成纤维细胞的主要标志分子^[19];TGF- β 是肺纤维化最关键的细胞因子,它与肺纤维化发生发展、细胞外基质代谢关系密切^[20]。本实验通过 MASSON 染色观察发现,脓毒症模型组大鼠肺组织出现明显的组织纤维化,与脓毒症模型组相比,肺组织的纤维化和损伤明显得到改善为探究其原因,检测了与肺纤维化相关的蛋白,发现相比空白转染组,miR-128-3p 沉默组大鼠 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达显著降低。说明抑制 miR-128-3p 基因的表达可以有效防止肺纤维化,其作用机制可能与抑制肺纤维化相关蛋白的表达相关。秦静等^[21]研究表明:抑制大鼠体内 TGF- β 蛋白相对表达和 α -SMA 蛋白相对表达可以有效治疗肺纤维化进展,与本研究得出的结论相一致。

综上所述,下调 miR-128-3p 可以缓解脓毒症大鼠急性肺损伤,其作用机制可能与降低大鼠体内炎症反应并抑制肺组织细胞的凋亡相关。

参考文献:

- [1] 全锦花, 张新超, 王红霞. 白细胞分化抗原 14 亚型在老年急性感染患者诊断和预后评价中的作用 [J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38(3): 246-250.
- [2] 刘宏飞, 聂宏光. 肺上皮跨膜离子通道与急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征关系研究进展 [J]. 生理科学进展, 2019, 50(4): 307-315.
- [3] 侯果, 余追. miRNA 作为脓毒症及其并发症生物标志物的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2018, 28(4): 81-85.
- [4] 赵阳, 万银绪, 车吉忠, 等. miR-128-3p 过表达靶向 MAPK1 抑制膀胱癌 5637 细胞株的侵袭, 迁移和上皮间质转化 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2019, 37(5): 534-541.
- [5] 侯绍蔚, 张连清, 席海英, 等. miR-128-3p 靶向 TCF4 抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖、侵袭和上皮-间充质转化 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(11): 1999-2005.
- [6] 张华东, 张显峰, 刘桂琴, 等. miR-128-3p 在宫颈癌中的表

达及其发病机制 [J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(7): 1405-1401.

[7] 周凤高, 徐冕, 颜悦新, 等. 盲肠结扎穿孔术致脓毒症的代谢网络基础研究 [J]. 重庆医学, 2019, 48(5): 765-769, 774.

[8] 秦怡, 李新宇, 王晓燕, 等. 腹腔注射人粪便悬液建立大鼠脓毒症及严重脓毒症模型 [J]. 内科急危重症杂志, 2013, 19(6): 362-364.

[9] 刘春明, 张洪, 李一鸣. Fleischner 学会关于特发性肺纤维化诊断标准的白皮书解读 [J]. 国际医学放射学杂志, 2018, 41(6): 653-657.

[10] 覃小兰, 郭权来, 刘云涛, 等. 降钙素原及 C-反应蛋白联合序贯器官衰竭评分对肺部感染致脓毒症老年患者预后的评估价值 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31(5): 562-565.

[11] 孙建, 代文静, 马春兰, 等. 适应性支持通气在慢性阻塞性肺疾病呼吸衰竭治疗中的应用分析 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(9): 667-671.

[12] 叶蕊, 王翠红, 赵立, 等. 慢性阻塞性肺疾病频繁急性加重表型气道阻力的研究 [J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(6): 511-514.

[13] 黄小洵, 孟繁魁, 谢昌联, 等. 脓毒症患者静息能量代谢测定指导营养目标能量治疗的临床研究 [J]. 吉林医学, 2018, 39(6): 1061-1063.

[14] 吴建魏, 黄觉生, 谭利斌, 等. 姜黄素预处理对肺缺血再灌注损伤模型大鼠炎性及抗炎性细胞因子的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(4): 668-672.

[15] Khan J, Noboru N, Young A, et al. Pro and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) in rat model of neuroma [J]. Pathophys, 2017, 24(3): 155-159.

[16] 吴松林, 田小利, 徐陶, 等. microRNA-125b 在脓毒症急性肺损伤中的表达及其与炎症因子水平相关性 [J]. 天津医药, 2019, 47(8): 810-814, 898.

[17] 姜永帅, 姜树民, 宋囡, 等. 养胃解毒合剂对脓毒症大鼠肠组织凋亡因子 Bax、Bcl2 和 Caspase3 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1450-1453.

[18] 许露, 张妍蓓, 徐蒙蒙, 等. 肺纤维化小鼠模型建立方法的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(23): 1830-1834.

[19] 孙丽霞, 李英俊, 崔仁哲, 等. 氯离子通道阻滞剂 NPPB 在 TGF- β 1 诱导 HConF 细胞纤维化中的作用及其机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(6): 411-418.

[20] 周钱辉, 彭红, 颜又新, 等. TGF- β 1 及其信号通路对话在肺纤维化中的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(4): 315-320.

[21] 秦静, 赵铭山, 李君. 丹参素干预对肺纤维化大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(5): 937-940, 946.

[收稿日期] 2020-05-15

《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、被中国生物医学文献数据库、《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://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

张少华,张彦芳,曹萌,等. 胍基丁胺通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 17-22,119.

Zhang SH, Zhang YF, Cao M, et al. Agmatine attenuates propofol-induced neurotoxicity in newborn rats by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 17-22,119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.003

胍基丁胺通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性

张少华^{1*}, 张彦芳¹, 曹 萌², 李 燕², 廖立夏¹, 王贝贝¹

(1.南阳市第一人民医院儿一科,河南 南阳 473000; 2.新乡医学院第一附属医院 内分泌二病区,河南 新乡 453100)

【摘要】 目的 本文旨在探讨胍基丁胺对丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性的影响。方法 通过腹腔注射

丙泊酚诱导神经损伤模型将大鼠分为 5 组: Control 组、Propofol 组、Propofol + Agmatine 1.25 mg/kg 组、Propofol + Agmatine 2.5 mg/kg 组和 Propofol + Agmatine 5 mg/kg 组。跳台实验检测犯错次数,2,3,5-三苯基氯化四氮唑法检测脑含水率、脑指数,Longa 法评价神经功能缺陷评分、姿势反射评分 HE 染色检测海马区病理损伤程度,Nissl 染色检测海马区组织凋亡,蛋白免疫印迹检测各组大鼠脑组织 BDNF、NGF、Bax、Bcl-2、Nrf2、p-Nrf2、HO-1 蛋白表达水平。

结果 结果表明,与 Control 组相比较,Propofol 组犯错次数显著升高 ($P<0.05$),脑含水率、脑指数显著升高 ($P<0.05$),神经功能缺陷评分、姿势反射评分显著升高 ($P<0.05$),呈现明显病理损伤,BDNF、NGF 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$),Nissl 小体数目明显减少,Bax/Bcl-2 比值显著升高 ($P<0.05$),p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol + Agmatine 2.5、5 mg/kg 组犯错次数显著降低 ($P<0.05$),脑含水率、脑指数显著降低 ($P<0.05$),神经功能缺陷评分、姿势反射评分显著降低 ($P<0.05$),病理损伤程度明显改善,BDNF、NGF 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$),Nissl 小体数目明显增多,Bax/Bcl-2 比值显著降低 ($P<0.05$),p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。

结论 胍基丁胺通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性。

【关键词】 胍基丁胺;丙泊酚;凋亡;Nrf2/HO-1 信号通路

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2020) 12-0017-06

Agmatine attenuates propofol-induced neurotoxicity in newborn rats by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway

ZHANG Shaohua^{1*}, ZHANG Yanfang¹, CAO meng², LI Yan², LIAO Lixia¹, WANG Beibei¹

(1. Department of Pediatrics, Nanyang First People's Hospital, Nanyang 473000, China.

2. the Second Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of agmatine on Propofol-induced neurotoxicity in newborn rats. **Methods** Rats were divided into five groups for follow-up experiments: Control, Propofol, Propofol + 1 mg/kg Agmatine, Propofol + 2.5 mg/kg Agmatine, and Propofol + 5 mg/kg Agmatine. The number of errors was detected in a platform experiment, while brain moisture content and brain index were determined by a 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride method. The Longa method was used to evaluate neural functional defect and postural reflex scores. HE staining was used to

【基金项目】河南省医学科技攻关项目(20150311)。

【作者简介】张少华(1977—),女,本科,副主任医师,研究方向:遗传、风湿免疫、康复与血液。E-mail:zhangshaohuaz@163.com

detect the degree of pathological damage in the hippocampus. Apoptosis of hippocampal tissue was detected by Nissl staining. Western blot was used to detect protein expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), Bax, Bcl-2, Nrf2, p-Nrf2, and heme oxygenase 1 (HO-1). **Results** Compared with the Control group, the Propofol group exhibited significant increases in the number of platform errors ($P < 0.05$), brain water content and cerebral index ($P < 0.05$), neural function defect scores, and posture reflex scores ($P < 0.05$), as well as obvious pathological damage. Moreover, the Propofol group exhibited significantly reduced expression of BDNF, NGF, and HO-1 proteins ($P < 0.05$), p-Nrf2/Nrf2 ratio ($P < 0.05$), and numbers of Nissl bodies ($P < 0.05$), but a significantly higher Bax/Bcl-2 ratio ($P < 0.05$). Compared with the Propofol group, Propofol+Agmatine groups (2.5 and 5 mg/kg) exhibited significantly decreased numbers of platform errors ($P < 0.05$), brain water content and cerebral index ($P < 0.05$), neurologic deficit scores ($P < 0.05$), and posture reflex scores ($P < 0.05$). Moreover, the degree of pathological damage was significantly improved in Propofol+Agmatine groups, which exhibited significantly increased BDNF and NGF protein expression ($P < 0.05$), and numbers of Nissl bodies ($P < 0.05$), and a significantly decreased Bax/Bcl-2 ratio ($P < 0.05$); p-Nrf2/Nrf2 ratio and HO-1 protein expression were also significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Agmatine attenuates Propofol-induced neurotoxicity in newborn rats by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

[Keywords] agmatine; propofol; apoptosis; Nrf2/HO-1 signaling pathway

丙泊酚因其起效快,连续输注而无累积和恢复快等特点,已在儿科和产科患者中普遍用作静脉麻醉药和镇静药^[1]。胎儿和新生儿应用丙泊酚可引起短期和长期神经毒性,导致神经变性^[2]。丙泊酚会引起剂量依赖的变化,导致新生神经元和胚胎神经干细胞的损伤,并对啮齿动物造成永久性的神经损伤^[3-4]。丙泊酚对婴儿大脑发育的潜在副作用也引起了人们对其安全性的关注,因此开发新的药物来预防丙泊酚的神经元副作用具有重要意义。

胍基丁胺(agmatine)是 L-精氨酸在精氨酸脱羧酶作用下的产物,分布于哺乳动物体内所有器官和组织,在中枢神经系统可作为抗抑郁药物,促进记忆的巩固^[5],具有抑制肝癌细胞、血管平滑肌细胞、星形胶质细胞等细胞增殖的作用^[6]。相关研究表明,胍基丁胺可在 OGD 模型中明显减少神经元死亡,保护缺血神经元,并减少 NCAO 模型脑梗死面积^[7]。目前未见关于胍基丁胺对丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性具体作用机制的相关报道。本文旨在探讨胍基丁胺对丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只无特定病原级 (specific pathogen free, SPF) 健康雄性 SD 大鼠,来源于成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2019-031],3 周龄,体重(50 ± 3)g,饲养于河南省精神病医院[SYXK(豫)2020-0010]。常规饲养 7 d。本文研究均经过我院伦理

委员会批准(IACUC-20191012-11),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂

胍基丁胺(S98238)购自上海源叶生物科技有限公司,化学式: $C_5H_{14}N_4$,分子量:130.19,纯度 $\geq 97\%$;丙泊酚(100806-201803)购自中国食品药品检定研究院,化学式: $C_{12}H_{18}O$,分子量:178.27,纯度 $\geq 99.9\%$;TTC 染液(D025-1-3)、苏木素-伊红染液(D006-1-1)购自南京建成生物工程研究所;Nissl 染色液(C0117)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗 BDNF(ab226843)、NGF(ab6199)、Bax(ab53154)、Bcl-2(ab196495)、Nrf2(ab31163)、p-Nrf2(ab137550)、HO-1(ab13243)单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组

将大鼠随机分为 5 组:Control 组、Propofol 组、Propofol + Agmatine 1.25 mg/kg 组、Propofol + Agmatine 2.5 mg/kg 组和 Propofol + Agmatine 5 mg/kg 组。参照 Xiao 等^[8]方法对除 Control 组外各组腹腔注射丙泊酚 50 mg/kg 诱导神经毒性损伤,Control 组腹腔注射等量生理盐水。当前期进行预实验给药时,给药剂量低于或等于 5 mg/kg 时,均未出现明显毒性作用,因此选择给药剂量 5 mg/kg 为最高给药剂量,倍数递减剂量确定给药梯度为:5、2.5、1.25 mg/kg。Propofol+Agmatine 1.25 mg/kg 组、Propofol+Agmatine 2.5 mg/kg 组和 Propofol+Agmatine 5 mg/kg 组腹腔注射胍基丁胺 1.25、2.5、5 mg/kg^[9],Control 组和 Propofol 组腹腔注射等量生理盐水。

1.3.2 跳台实验

将各组大鼠于实验前 1 d 置于反应箱中适应 3 min,实验时将大鼠放在平台上并接通铜栅电源,记录各组大鼠 3 min 内错误次数;第 2 天直接将大鼠放于接通铜栅电源的平台上,记录 3 min 内错误次数。

1.3.3 2,3,5-三苯基氯化四氮唑法

处死所有大鼠,取脑,称取重量并石蜡包埋切片。按照染液说明书,将新鲜脑组织切片置于装有 TTC 染液的培养皿中,37℃ 避光孵育 30 min,用组织冲洗应用液将组织表面多余染色液冲洗掉,正常脑组织呈玫瑰红色,梗死组织呈灰白色。再将切片置于 10% 甲醛中固定 24 h,称重,记为湿重;剥离梗死组织,与正常组织一起放入烘箱,烘至恒重,称重,记为干重。然后计算大鼠脑含水率、脑指数。脑含水率(%)=(湿重-干重)/湿重×100%,脑指数(%)=大脑重量/体重×100%。

1.3.4 脑损伤评分

通过 Longa 法^[10]对各组大鼠神经功能缺陷、姿势反射进行评分。

1.3.5 HE 染色

取各组大鼠脑组织石蜡包埋切片,采用苏木素-伊红(HE)染液,将石蜡切片脱蜡,蒸馏水润湿组织,核染液染色 5 min,水洗 5 s,浆染液染色 30 s,水洗后,滤纸吸干,无水乙醇脱水 2 次后封片,在荧光

显微镜下观测。

1.3.6 Nissl 染色

取各组大鼠脑组织用 10% 福尔马林固定液固定,常规脱水,石蜡包埋,冠状切片,片厚 5 μm,二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,Nissl 染色液染色,中性树脂封片,光镜下观察大脑海马组织尼氏小体变化。

1.3.7 Western blot

取各组大鼠脑组织用含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取,BCA 试剂盒测定蛋白质含量。提取等量的蛋白质样品在 100℃ 条件下变性 5 min。然后使用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离并转移至 PVDF 膜,在 4℃ 条件下加入相应一抗并孵育过夜,清洗,然后在 4℃ 下加入辣根过氧化物酶标记的二抗,孵育 2 h,最后加入发光液,曝光处理。Image J 软件统计灰度值。

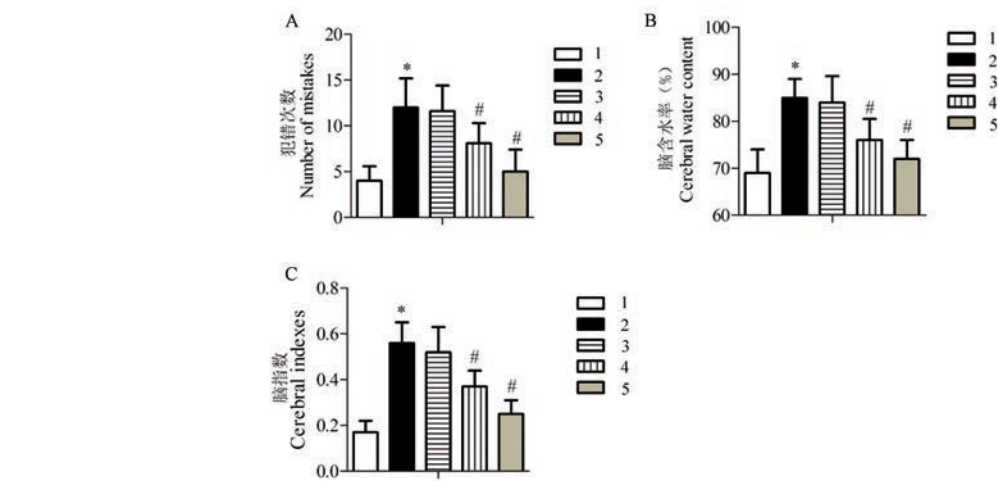
1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胍基丁胺降低丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型犯错次数、脑含水率和脑指数

通过跳台实验检测各组大鼠犯错次数结果如



注:A:犯错次数;B:脑含水率;C:脑指数。1:对照组;2:丙泊酚组;3:丙泊酚+胍基丁胺 1.25 mg/kg 组;4:丙泊酚+胍基丁胺 2.5 mg/kg 组;5:丙泊酚+胍基丁胺 5 mg/kg 组。与 Control 组比较,**P*<0.05;与 Propofol 组比较,#*P*<0.05。

图 1 胍基丁胺对丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型犯错次数、脑含水率、脑指数的影响

Note. A, number of mistakes. B, Cerebral water content. C, Cerebral index. 1, Control group. 2, Propofol group. 3, Propofol+Agmatine 1.25 mg/kg group. 4, Propofol+Agmatine 2.5 mg/kg group. 5, Propofol+Agmatine 5 mg/kg group. Compared with Control group, **P*<0.05. Compared with Propofol group, #*P*<0.05.

Figure 1 Effects of guanidine on the number of errors, brain water content and brain index of propofol induced nerve injury in rat model

图 1A 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组犯错次数显著升高 ($P<0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol+Agmatine 2.5、5 mg/kg 组犯错次数显著降低 ($P<0.05$);通过 2,3,5-三苯基氯化四氮唑法检测各组大鼠脑含水率、脑指数结果如图 1B、1C 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组脑含水率、脑指数显著升高 ($P<0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol+Agmatine 2.5、5 mg/kg 组脑含水率、脑指数显著降低 ($P<0.05$)。

2.2 胍基丁胺降低丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型神经功能缺陷评分、姿势反射评分

通过 Longa 法评价各组大鼠神经功能缺陷评分、姿势反射评分结果如图 2A、2B 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组神经功能缺陷评分、姿势反射评分显著升高 ($P<0.05$)。与 Propofol 组相比较,

Propofol+Agmatine 2.5、5 mg/kg 组神经功能缺陷评分、姿势反射评分显著降低 ($P<0.05$)。

2.3 胍基丁胺改善丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型病理损伤程度,升高 BDNF、NGF 蛋白表达水平

通过 HE 染色检测各组大鼠海马区病理损伤程度结果如图 3A 所示,Control 组海马区神经元细胞排列整齐,结构清晰。Propofol 组神经细胞排列紊乱,细胞形态发生变化,间隙增大,细胞核染色变深,核固缩。Propofol+Agmatine 2.5、5 mg/kg 组较 Propofol 组病理损伤程度均有不同程度明显改善。通过 Western blot 检测各组大鼠 BDNF、NGF 蛋白表达水平结果如图 3B 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组 BDNF、NGF 蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol+Agmatine 2.5、5 mg/kg 组 BDNF、NGF 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。

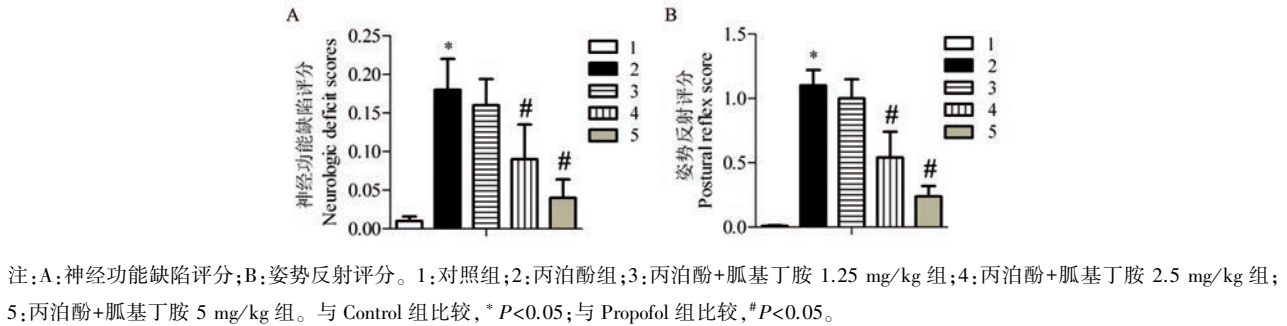
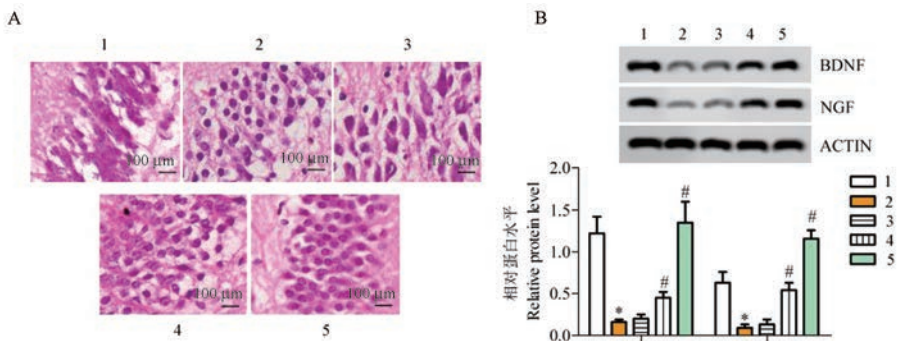


图 2 胍基丁胺对丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型神经功能缺陷评分、姿势反射评分的影响
Note. A, Neurologic deficit scores. B, Postural reflex score. 1, Control group; 2, Propofol group; 3, Propofol+Agmatine 1.25 mg/kg group; 4, Propofol+Agmatine 2.5 mg/kg group; 5, Propofol+Agmatine 5 mg/kg group. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Propofol group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effects of guanidine on scores of neural functional defects and postural reflex in propofol-induced nerve injury rats



注:A:HE 染色检测海马区病理损伤;B:BDNF、NGF 蛋白表达。1:对照组;2:丙泊酚组;3:丙泊酚+胍基丁胺 1.25 mg/kg 组;4:丙泊酚+胍基丁胺 2.5 mg/kg 组;5:丙泊酚+胍基丁胺 5 mg/kg 组。与 Control 组比较, * $P<0.05$;与 Propofol 组比较, # $P<0.05$ 。

图 3 胍基丁胺对丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型病理损伤程度和 BDNF、NGF 蛋白表达水平的影响
Note. A, HE staining was used to detect pathological damage in the hippocampus. B, protein expression of BDNF and NGF. 1, Control group; 2, Propofol group; 3, Propofol+Agmatine 1.25 mg/kg group; 4, Propofol+Agmatine 2.5 mg/kg group; 5, Propofol+Agmatine 5 mg/kg group. Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with Propofol group, # $P<0.05$.

Figure 3 Effects of guanidine on the degree of pathological damage and the expression levels of BDNF and NGF proteins in propofol-induced nerve injury rat models

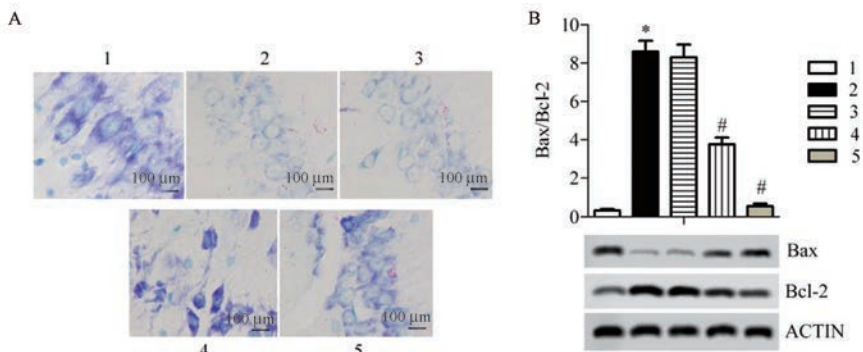
2.4 胍基丁胺抑制丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型海马区组织凋亡,降低 Bax/Bcl-2 比值

通过 Nissl 染色检测各组大鼠海马区组织凋亡情况结果如图 4A 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组大鼠 Nissl 小体数目明显减少,而 Propofol +Agmatine 2.5、5 mg/kg 组相比较 Propofol 组 Nissl 小体数目明显增多,说明胍基丁胺可以作用海马体,提高神经元的存活;通过 Western blot 检测各组大鼠 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平结果如图 4B 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组 Bax/Bcl-2 比值显著升高 ($P < 0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol +

Agmatine 2.5、5 mg/kg 组 Bax/Bcl-2 比值显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5 胍基丁胺升高丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型 p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白表达水平

通过 Western blot 检测各组大鼠 Nrf2、p-Nrf2、HO-1 蛋白表达水平结果如图 5 所示,与 Control 组相比较,Propofol 组 p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 Propofol 组相比较,Propofol +Agmatine 2.5、5 mg/kg 组 p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。

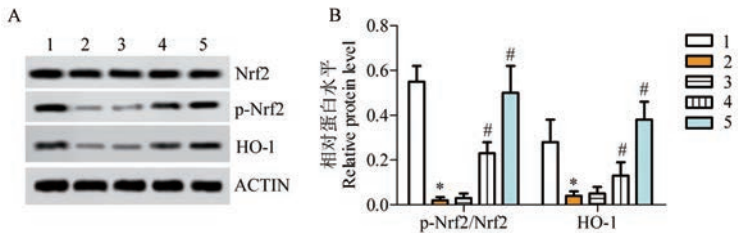


注:A;Nissl 染色检测海马区组织细胞凋亡;Bax、Bcl-2 蛋白表达。1:对照组;2:丙泊酚组;3:丙泊酚+胍基丁胺 1.25 mg/kg 组;4:丙泊酚+胍基丁胺 2.5 mg/kg 组;5:丙泊酚+胍基丁胺 5 mg/kg 组。与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 Propofol 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 4 胍基丁胺对丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型海马区组织凋亡和 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的影响

Note. A, Nissl staining was used to detect the apoptosis of hippocampal tissue cells. Expression of Bax and Bcl-2 proteins. 1, Control group. 2, Propofol group. 3, Propofol+Agmatine 1.25 mg/kg group. 4, Propofol+Agmatine 2.5 mg/kg group. 5, Propofol+Agmatine 5 mg/kg group. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with Propofol group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Effects of guanidine on propofol induced hippocampal tissue apoptosis and Bax and Bcl-2 protein expression levels in rats with nerve injury



注:A; Nrf2、p-Nrf2、HO-1 蛋白表达;B; Nrf2、p-Nrf2、HO-1 蛋白表达直方图。与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 Propofol 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 5 胍基丁胺对丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型 Nrf2、p-Nrf2、HO-1 蛋白表达水平的影响

Note. A, Nrf2, p-Nrf2, HO-1 protein expression. B, the protein expression histogram of Nrf2, p-Nrf2 and HO-1. Compared with Control group, * $P < 0.05$. Compared with Propofol group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of guanidine on the expression levels of Nrf2, p-Nrf2 and HO-1 proteins in propofol induced nerve injury rat models

3 讨论

本研究显示,胍基丁胺具有降低丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型犯错次数、脑含水率和脑指数的作用。犯错次数的降低表明大鼠被动记忆能力升高。脑指数的升高反映了脑水肿的严重程度,控制脑水肿可以改善神经损伤。表明胍基丁胺能有效缓解丙泊酚诱导的神经损伤大鼠脑水肿。

神经功能缺陷评分是评价大鼠学习记忆能力的重要方法^[11]。由于脑损伤时可致姿势反应性异常,出现异常姿势、异常姿势反射和异常运动,姿势反射评分可早期发现脑损伤^[12]。本文研究结果说明,应用丙泊酚会对幼年大鼠学习记忆功能产生明显影响。而腹腔注射胍基丁胺后神经功能缺陷评分和姿势反射评分降低,则表明胍基丁胺改善丙泊酚诱导的神经损伤大鼠的神经功能。

脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是中枢神经级联信号传递的关键分子,能促进神经突触生长而建立神经元和靶细胞之间的突触联系^[13]。BDNF 参与中枢神经系统神经元的生长、发育、分化、再生以及修复,维持成熟神经元功能,防止神经元坏死及凋亡^[14]。BDNF 可作为判定幼儿脑损伤的检测指标。NGF 则是中枢神经系统重要的神经营养因子,在神经元保护和神经损伤后功能重建等方面起重要作用。王宏燕等^[15]研究发现严重神经元损伤可造成神经元 NGF、BDNF 表达下调,可通过升高 NGF 和 BDNF 等神经营养因子表达修复大脑海马区神经元。本文研究发现,胍基丁胺具有升高丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型 BDNF、NGF 蛋白表达水平的作用。提示胍基丁胺改善丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型神经元损伤。

注射丙泊酚可增加大鼠海马细胞凋亡的频率,由于丙泊酚对不同物种的未成熟神经元有不利影响,即使使用亚麻醉剂量的丙泊酚进行治疗,也会在新生鼠的大脑皮层,尾状和壳状核中引起神经元凋亡^[8]。在本研究中,我们观察到尼氏小体在胍基丁胺药物组中增多,且 Bax/Bcl-2 比值降低, Bax/Bcl-2 比值是决定细胞凋亡发生的关键指标^[16]。表明胍基丁胺可抑制丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型神经元细胞凋亡。

Nrf2 是一种体内的抗氧化转录因子,当机体受到不利刺激时在胞质中从 Keap-1 上解离出来,启

动下游 HO-1、NQO1 及 SOD 等抗氧化基因的转录^[17]。HO-1 在体内具有抗氧化、细胞保护作用,其降解血红素的产物代谢中可清除氧自由基、超氧阴离子,阻止蛋白、脂质过氧化。在脑内激活 Nrf2 途径能起到神经保护的作用^[18]。本文研究发现,胍基丁胺具有升高丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型 p-Nrf2/Nrf2 比值和 HO-1 蛋白表达水平。提示胍基丁胺通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性。

综上所述,胍基丁胺具有降低丙泊酚诱导的神经损伤大鼠模型犯错次数、脑含水率、脑指数、神经功能缺陷评分、姿势反射评分、Bax/Bcl-2 比值,改善病理损伤程度,升高 BDNF、NGF 蛋白表达水平,抑制海马区组织凋亡,这可能是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] Bolkenius D, Dumps C, Halbeck E. Drugs for intravenous induction of anesthesia: Propofol [J]. *Anaesthesist*, 2018, 67(2): 147-162.
- [2] McCann ME, Soriano SG. General anesthetics in pediatric anesthesia: Influences on the developing brain [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(7): 944-951.
- [3] Kahraman S, Zup SL, McCarthy MM, et al. Gabaergic mechanism of propofol toxicity in immature neurons [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2008, 20(4): 233-240.
- [4] Zou WW, Xiao HP, Gu MN, et al. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic and intrinsic pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1123-1128.
- [5] Arteni NS, Lavinsky D, Rodrigues AL, et al. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2002, 78(2): 465-469.
- [6] 张言慧, 吉武科, 高爱存, 等. 酶法转化精氨酸生产胍基丁胺 [J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(24): 40-44.
- [7] Kim JH, Yenari MA, Giffard RG, et al. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury [J]. *Exp Neurol*, 2004, 189(1): 122-130.
- [8] Xiao Y, Zhou L, Tu Y, et al. Dexmedetomidine attenuates the propofol-induced long-term neurotoxicity in the developing brain of rats by enhancing the pi3k/akt signaling pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14: 2191-2206.
- [9] Noorbakhshnia M, Rashidkhaboli A, Pakatchian M, et al. Agmatine attenuates methamphetamine-induced passive avoidance learning and memory and camkii- α gene expression deteriorations in hippocampus of rat [J]. *Physiol Behav*, 2018, 194: 491-496.

(下转第 119 页)

徐涛,顾鹏,陈傍柱,等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *HMGA2* 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 23-29.

Xu T, Gu P, Chen BZ, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *HMGA2* knockout hepatoma carcinoma cell line [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 23-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.004

利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *HMGA2* 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定

徐 涛^{1,2}, 顾 鹏^{1,2}, 陈傍柱^{1,2}, 叶 行^{1,2}, 梁春锦^{1,2}, 张映辉^{3*}, 顾为望^{1,2,3*}

(1.南方医科大学实验动物管理中心暨比较医学研究所,广州 510515; 2.东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司,广东 东莞 523808; 3.五邑大学生物科技与大健康学院,广东 江门 529020)

【摘要】 目的 采用 CRISPR/Cas9 系统敲除肝癌细胞系 HepG2 的高迁移率蛋白 A2 (*HMGA2*) 基因,探讨 *HMGA2* 敲除对于肝癌细胞生长、增殖、迁移以及侵袭的影响。**方法** 根据 GenBank 数据库搜索人 *HMGA2* 序列,利用在线 sgRNA 设计软件针对 *HMGA2* 的第一外显子以及第二外显子各设计一条 sgRNA,构建靶向 *HMGA2* 的 sgRNA 重组敲除载体 sgE1 和 sgE2,将 sgRNA 载体转染细胞,通过有限稀释法筛选得到 *HMGA2*^{-/-} 细胞株。通过 CCK8 实验以及平板克隆形成实验检测 *HMGA2* 敲除对于 HepG2 细胞生长以及克隆形成能力的影响;采用 Transwell 实验检测 *HMGA2* 敲除对于 HepG2 细胞迁移与侵袭的影响。**结果** 相比于野生型,*HMGA2*^{-/-} 细胞株的生长速率减慢,克隆形成能力(121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68, *P* < 0.01)、迁移(359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23, *P* < 0.05)与侵袭(251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00, *P* < 0.01)能力显著下降。**结论** *HMGA2* 敲除降低了肝癌细胞 HepG2 的体外生存能力以及转移能力,*HMGA2* 基因可以作为一个肝癌治疗的潜在靶点。

【关键词】 肝癌;*HMGA2*;CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0023-07

Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *HMGA2* knockout hepatoma carcinoma cell line

XU Tao^{1,2}, GU Peng^{1,2}, CHEN Bangzhu^{1,2}, YE Xing^{1,2}, LIANG Chunjin^{1,2}, ZHANG Yinghui^{3*}, GU Weiwang^{1,2,3*}

(1. Laboratory Animal Center & Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.
2. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Science and Technology Ltd., Dongguan 523808.
3. School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020)

【Abstract】 Objective To knock out the high-mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) gene using the CRISPR/Cas9 system in HepG2 cells and investigate the effect of *HMGA2* knockout on the growth, proliferation, migration, and invasion of hepatoma carcinoma cells. **Methods** The human *HMGA2* gene sequence was obtained from GenBank. Two sgRNAs were designed for each of the first and second exons of the *HMGA2* gene using online sgRNA design software. The recombinant

[基金项目] 广东省科技计划项目(2016A020208004);国家自然科学基金项目(31271042);国家科技部国际合作项目(2011DFA33290);江门市创新团队项目(2017TD02);广州市科技计划项目(201704020012)。

[作者简介] 徐涛(1994—),男,硕士研究生,研究方向:基因修饰动物模型研究。E-mail: hzxutao94@126.com

[通信作者] 张映辉(1973—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:生物化学与遗传学。E-mail: zhangyh@wyu.edu.cn

顾为望(1956—),男,教授,博士生导师,研究方向:实验动物培育、人类疾病动物模型制备与比较医学。
E-mail: Guww100@163.com * 共同通信作者

sgRNA vectors sgE1 and sgE2 were constructed and transfected into HepG2 cells to obtain the *HMGA2*^{-/-} cell line. The effects of *HMGA2* knockout on the growth and proliferation of HepG2 cells were investigated via CCK8 and clone formation assays, while the migration and invasion abilities were measured using Transwell assays. **Results** Compared with wild-type HepG2 cells, the knockout cell line showed reduced proliferation, clone formation (121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68 , $P < 0.01$), invasion (359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23 , $P < 0.05$), and migration (251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00 , $P < 0.01$). **Conclusions** *HMGA2* knockout in hepatoma carcinoma cells inhibited both cellular proliferation and tumor metastasis *in vitro*. Therefore, *HMGA2* may constitute a target for hepatoma gene therapy.

【Keywords】 liver cancer; *HMGA2*; CRISPR/Cas9

高迁移率蛋白 A2 (high-mobility group AT-hook 2, *HMGA2*) 属于高迁移率蛋白超家族成员, 是一种非组蛋白染色质结合蛋白, 主要包括三个 AT-hook 区以及一个酸性 C 末端^[1]。AT-hook 区可以高亲和力的结合到基因组中 AT 富集区域, 这些区域一般都是相关基因表达调控元件, 从而调控靶基因的表达。*HMGA2* 基因位于 12 号染色体长臂, 由 5 个外显子构成。*HMGA2* 一般在胚胎发育早期以及未分化的细胞中高表达, 而在成体正常细胞或高度分化的细胞中基本不表达或表达量很低^[2]。但是, 研究发现在肺癌^[3]、乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、结直肠癌^[6]等肿瘤组织中 *HMGA2* 的表达均显著升高, 提示 *HMGA2* 可能是一个致癌基因, 可以作为癌症早期诊断的潜在分子靶标^[7]。*HMGA2* 的异常表达通常与肿瘤发生相关, 它主要影响肿瘤细胞的增殖、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、转移以及肿瘤组织内的微血管生成等过程^[8-9]。

肝癌作为一种常见肿瘤, 其发病率与致死率均在各种肿瘤中名列前茅, 而且肝癌细胞转移性强^[10]、对常规化疗药物耐受性较强^[11]、预后较差等特点进一步加剧了治疗难度。因此, 筛选肝癌治疗的潜在分子靶点, 对于肝癌的早期诊断、临床治疗以及预后评估具有重大意义^[12]。虽然 *HMGA2* 已证明在多种肿瘤中均可作为分子靶标以及预后评估的潜在分子, 但 *HMGA2* 在肝癌中的作用目前研究较少。本研究采用 CRISPR/Cas9 系统引起肝癌细胞系 HepG2 中的 *HMGA2* 基因大片段删除, 进而失活该基因, 建立 *HMGA2* 敲除细胞株, 并对此进行了相关功能的鉴定, 探讨 *HMGA2* 对于肝癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响, 从而为肝癌的靶向治疗提供一定的思路。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人肝癌细胞系 HepG2 购自美国 ATCC。

1.2 主要试剂

PX458 质粒购自 Addgene; 高糖 DMEM (8115247)、胎牛血清 (42A0378 K)、双抗 (21442)、0.25% 胰蛋白酶 (25200) 购自 Gibco; Lipofectamine[®] 2000 (2004957)、Opti-MEM[®] (1119701)、TRIzol (15596026) 购自 Thermo; 反转录试剂盒 (A140826A)、荧光定量 PCR 试剂盒 (AJ51622A)、细胞基因组提取试剂盒 (AK2101)、Premix Taq[™] 酶 (A191625A)、T4 连接酶 (AH70103A) 购自 TaKaRa; DH5 α 感受态细胞 (180428) 与质粒小提试剂盒 (S7923) 购自 TIANGEN; Bbs I 内切酶 (00397116)、T4 PNK 磷酸化酶 (10020296) 购自 NEB; Transwell 小室 (11919023)、Matrigel 胶 (9119018) 购自 Corning; 全蛋白提取试剂盒 (20190213) 购自凯基生物; *HMGA2* 一抗 (79h6360) 及 Western blot 二抗 (12v9698) 购自 Affinity; GAPDH 一抗 (AH08191878) 购自 Bioss; CCK8 试剂盒 (EG20180126) 购自南京恩晶生物。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HepG2 细胞培养在含有 10% FBS、1% 青/链霉素的高糖 DMEM 培养基中, 于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养, 每隔 3 d 换一次液。取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.3.2 sgRNA 寡核苷酸链设计

根据 GenBank 中发表的 *HMGA2* 序列信息 (ID: NM_003483), 利用 CRISPR/Cas9 sgRNA 在线设计软件 (<http://crispor.tefor.net/>) 分别在 *HMGA2* 基因的第一外显子与第二外显子处各设计一条 sgRNA, 分别命名为 sgE1 与 sgE2 (如图 1), 并在正义链的 5' 端添加 CACC 接头, 在反义链的 5' 端添加 AAAC 接头, 便于与酶切载体连接; 此外, 由于 sgE2 不是以 G 开头, 所以需在接头与 sgE2 的 5' 端之间加上 G, 以提高 U6 启动子的转录活性。最终 oligo 序列如表 1 所示。

1.3.3 重组载体 PX458-sgRNA 构建

两条 sgRNA 进行末端磷酸化与退火反应,反应体系为:sgRNA-T 1 μL,sgRNA-B 1 μL,T4 PNK 0.5 μL,T4 Ligase Buffer 1 μL,ddH₂O 6.5 μL,37℃ 反应 30 min 后于沸水中加热 5 min,自然冷却至室温。用 T4 连接酶将退火产物与经 Bbs I 酶切的 PX458 质粒连接,16℃ 连接 30 min,并将连接产物转化入大肠杆菌 DH5α 中,均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体平板上 37℃ 过夜培养,挑取单克隆鉴定并由睿博兴科广州分公司采用 Sanger 测序法进一步鉴定正确插入。

1.3.4 细胞转染与单克隆筛选

将状态良好的细胞铺到 24 孔板中,待细胞汇合度达到 80% 时采用 Lipo2000 将两个 sgRNA 重组质粒混合转染 HepG2 细胞,转染 2 d 后于荧光显微镜下观测转染效率。将细胞悬液稀释至每毫升 100 个细胞,以每孔 10 μL 加入 96 孔板,进行单克隆筛选,待克隆长至合适大小后挑取克隆于 24 孔板中,并进行敲除鉴定。

1.3.5 细胞敲除株鉴定

采用 NP40 裂解细胞,程序为:56℃ 1 h,95℃ 10 min。扩增 *HMGA2* 基因敲除后的短序列片段,PCR 引物序列为:*HMGA2*-F: 5'-GACGTCCGGTGTGATGCTG-3', *HMGA2*-R: 5'-CAAATTCCTGGCTGCGGAGT-3',扩增程序为:95℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,36 个循环;72℃ 2 min。PCR 产物经

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并送睿博兴科广州分公司进行 Sanger 测序。对经测序鉴定为可能 Indel 的片段采用 pMD19-T Vector Cloning Kit 进行 TA 克隆,随机挑取 10 个单克隆进行 Sanger 测序,并通过 BLAST 在线软件比对,鉴定敲除株基因型。

1.3.6 实时荧光定量 PCR

采用 TRIzol 法提取 RNA,并利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,采用嵌合荧光法对 *HMGA2* 的表达情况进行定量分析,以 *GAPDH* 为内参。qPCR 反应条件为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环;60℃ 2 min。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析基因相对表达情况。所用引物如表 2 所示。

1.3.7 蛋白表达水平检测

将对照组与敲除株细胞铺于六孔板,待细胞长至 80% 汇合度时,用冷的 PBS 洗两遍,加入 200 μL 细胞裂解液于冰上裂解 30 min。4℃,12000 r/min 离心 5 min。吸取上清,用 BCA 法进行蛋白定量,并用 5×Loading buffer 调整蛋白至适当浓度,100℃ 水浴 5 min。SDS-PAGE 电泳,恒压 80 V 30 min,120 V 60 min,切下目的条带与内参条带,转 PVDF 膜。用 5% BSA 室温封闭 1 h,一抗 4℃ 过夜孵育,TBST 洗膜 5 min×4 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 5 min×4 次。采用 ECL 化学发光法显影。

1.3.8 CCK8 细胞增殖实验

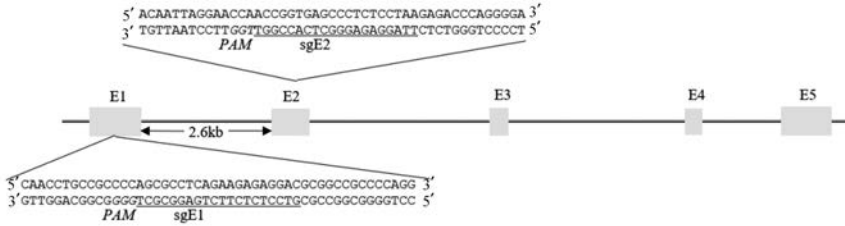


图 1 sgRNA 位点

Figure 1 Locus of sgRNA

表 1 sgRNA oligo 序列
Table 1 Sequence of sgRNA oligo

序列名称 Sequence name	序列(5'→3') Sequence
sgE1-T	<u>CACCGTCTCTCTTCTGAGGCGCT</u>
sgE1-B	<u>AAACAGCGCTCAGAAGAGAGGAC</u>
sgE2-T	<u>CACCGTTAGGAGAGGGCTACCCGT</u>
sgE2-B	<u>AAACACCGGTGAGCCCTCTCCTAAC</u>

注:下划线为接头序列;斜体为额外添加的 G。
Note. Adaptor is marked by underline. Additional G is marked by italic.

表 2 qPCR 引物
Table 2 qPCR amplification primers

基因 Gene	方向 Direction	序列(5'→3') Sequence
<i>HMGA2</i>	F	CAGCAAGAACCAACCGGTGA
	R	CTTGGCCGTTTTTCTCCAGTG
<i>GAPDH</i>	F	GGCAAATTCCATGCCACCGT
	R	TGTTTCACACCCATGACGAA

用 0.25%胰酶消化细胞,制成单细胞悬液。将细胞密度调整为每毫升 1×10^4 个,每孔 200 μL 。加入 96 孔板中,每个样品 6 个重复,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。分别在 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 96 h 每孔加入 10 μL CCK8, 37°C 避光孵育 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。用样品吸光度减去空白吸光度得到相对吸光度值,采用 Graphpad prism 5 软件绘制生长曲线。

1.3.9 克隆形成实验

用 0.25%胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,以 1000 个/孔将细胞均匀铺到六孔板中,每 3 d 换一次液。待长出肉眼可见单克隆后,采用 4%多聚甲醛固定细胞,1%结晶紫溶液染色,计数细胞数大于 50 的单克隆数量。

1.3.10 肿瘤迁移与侵袭实验

用胰酶消化细胞后,将细胞移入离心管中,1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗两遍并用无血清培养基重悬细胞,将细胞密度调整为每毫升 5×10^5 个。对于迁移实验,每个 Transwell 上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的全培,培养箱中孵育 24 h;对于侵袭实验,先以 1:8 的比例于冰上采用无血清培养基稀释 Matrigel 胶,每个 Transwell 上室加 70 μL 稀释的 Matrigel 胶,培养箱中孵育 6 h,待胶完全凝固后,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的全培,培养箱中孵育 30 min,向上室中轻柔加入 200 μL 细胞悬液,培养箱中孵育 24 h。取出上室, PBS 洗 3 遍后用棉签擦去上室孔内的细胞与 Matrigel 胶,4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫溶液染色 10 min,在 10×10 倍镜下随机选取十个视野,计数细胞数量。

1.4 统计学方法

用 SPSS 24.0 进行数据处理以及统计学分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PX458-sgRNA 载体鉴定

将两对 sgRNA oligo 退火形成双链后连接到经 Bbs I 酶切的 PX458 质粒上,转化入大肠杆菌并挑取单克隆菌落,经 PCR 鉴定后将阳性质粒测序。测序结果显示两对 sgRNA 均正确插入到酶切位点内(图 2)。

2.2 细胞敲除株鉴定

将两对 PX458-sgRNA 载体混合转染 HepG2 细胞,采用有限稀释法获得单克隆细胞集落,用一对鉴定引物,采用短片段扩增程序进行 PCR 鉴定,敲除株由于大片段删除可以得到 400 bp 左右的片段(图 3A)。将扩增片段测序,结果显示在 sgRNA 位点处存在套峰,即插入/缺失突变(图 3B)。进一步基因型分析显示,敲除株的基因组存在大片段缺失(表 3)。对敲除株细胞进行 RT-qPCR 检测,结果表明在 mRNA 水平上 HMGA2 的表达已有大幅度下降 ($P < 0.01$, 图 3C)。Western blot 检测显示已经完全没有 HMGA2 蛋白的表达(图 3D)。综合结果可知,获得的细胞株为 HMGA2^{-/-}细胞株。

2.3 HMGA2 敲除引起细胞增殖速率的改变

采用 CCK8 细胞增殖实验以及克隆形成实验检测细胞的增殖能力以及克隆形成能力。CCK8 实验表明, HMGA2 敲除后细胞的增殖速率明显减慢(图 4A);而克隆形成实验也表明 HMGA2 敲除引起克隆形成能力减弱,细胞存活率降低 (121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68 , $P < 0.01$, 图 4B)

2.4 HMGA2 敲除对于肿瘤细胞迁移与侵袭的影响

Transwell 迁移实验表明, 相对于野生型, HMGA2 敲除后 HepG2 的迁移能力明显减弱 (359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23 , $P < 0.05$) (图 5)。Transwell 侵袭实验也表明 HMGA2 的敲除也会导致 HepG2 细胞体外侵袭能力减弱 (251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00 , $P < 0.01$) (图 5)。

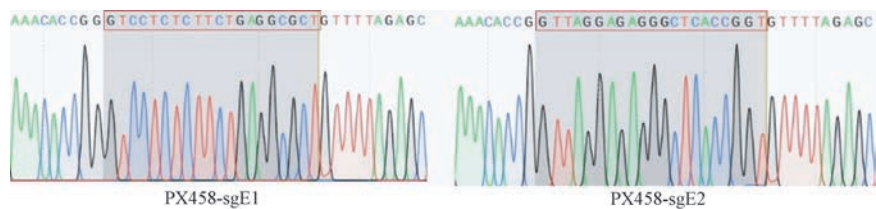
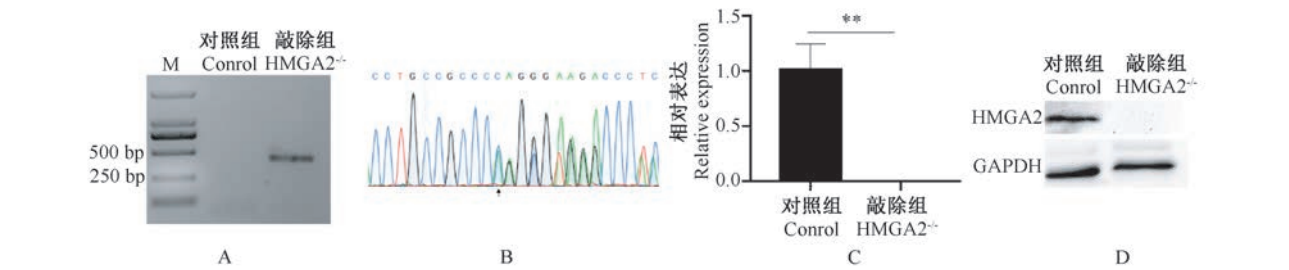


图 2 PX458-sgRNA 载体测序结果

Figure 2 Sequencing results of PX458-sgRNA vectors



注:A:PCR 鉴定大片段删除(M:DL1000 marker);B:Sanger 测序显示在 sgRNA 位点处存在插入/缺失突变;C:RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平;D:Western blot 检测 HMGA2 蛋白水平表达。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 细胞敲除株鉴定结果

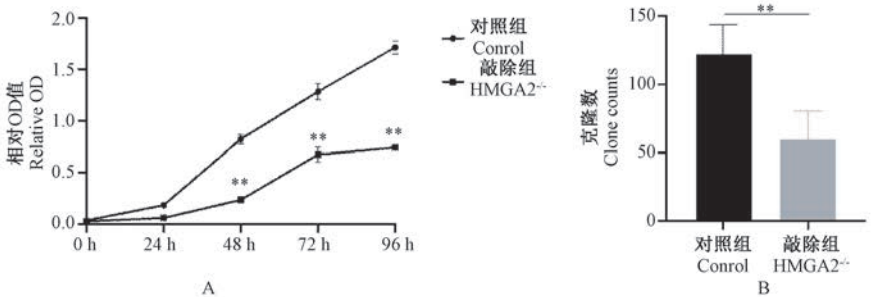
Note. A, Larger fragment deletion was tested by RCR (M, DL 1000 marker). B, Indel in sgRNA locus was investigated by Sanger sequencing. C, Expression levels were measured by RT-qPCR. D, Western blot to analyze HMGA2 protein upon knockout *HMGA2*. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Identification of knockout cell line

表 3 细胞株基因型
Table 3 Genotypes of cell line

表型 Phenotype	序列(5'→3') Sequence	基因型 Genotype
对照组 Control	CCTGCCGCCCCAGCGCCTCAGAAGAGAGGAC GCGGCCGCCCCAGGAAGCAGCAGCAA TCACAATTAGGAACCAACCGGTGAGCCCTCTCCTAAGAGA CCCAGGGGAAGACCCAAA GGCAGCAAAAA	WT 2.61 kb
敲除组 HMGA2 ^{-/-}	CCTGCCGCCC-----G----- ---CCCAGGGGAAGACCCAAAGGCAGCAAAAA CCTGCCGCCCCAGCG----- -GTGAGCCCTCTCCTAAGAGACCCAGGGAAGACCCAAAGGCAGCAAAAA	-2.696 kb / -2.671 kb

注:下划线为 sgRNA 位点。
Note. The sgRNA locus were marked by underline.

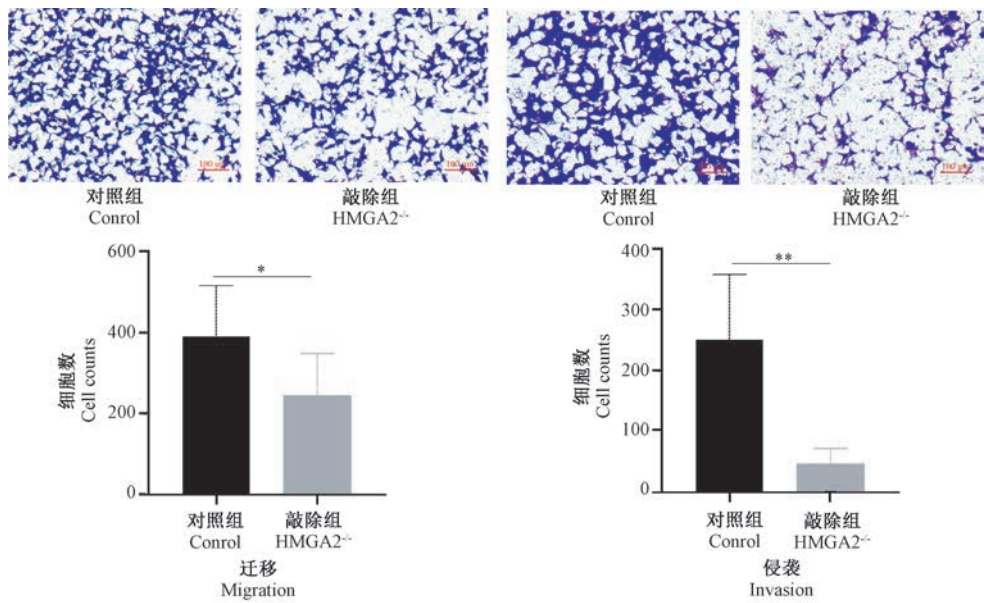


注:A:CCK8 实验检测细胞增殖速率;B:克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 4 HMGA2 敲除对于细胞增殖的影响

Note. A, Proliferation rates were evaluated via CCK8 trial. B, Ability of clone formation was investigated by clone formation assay. Compared with control, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of proliferation in HMGA2 knockout



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

图 5 HMGA2 敲除对于细胞迁移与侵袭的影响

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

Figure 5 Effect of HMGA2 knockout on migration and invasion

3 讨论

人类 *HMGA2* 基因位于染色体 12q15 区域,其编码的蛋白属于高迁移率蛋白家族成员,主要作为一种转录调控因子,通过蛋白-蛋白或者蛋白-DNA 互作调控靶基因的表达。有研究表明,*HMGA2* 主要在胚胎早期以及肿瘤细胞中高表达,而在正常成体组织中则表达量很低或不表达,提示 *HMGA2* 对于胚胎早期的正常发育极为重要,同时也是一个重要的致癌因子。Yang 等^[13]发现沉默 *HMGA2* 抑制急性髓性白血病细胞的迁移、侵袭以及生存能力,增强其凋亡速率以及对药物的敏感性。同样的,Zhu 等^[14]沉默鳞状细胞癌中的 *HMGA2* 也引起细胞中 EMT 有关基因的下调,而过表达则可使癌细胞获得干细胞样特征。对胃癌的病例研究发现,*HMGA2* 有助于胃癌的血管生成,从而促进癌细胞的生长,此外还与肿瘤患者的预后不良有关^[15]。但是对自发性胰腺癌小鼠的研究发现,*HMGA2* 敲除鼠与野生型鼠在胰腺癌的发生率、对药物的敏感性以及预后等指标上并没有太大差别,表明 *HMGA2* 作为胰腺癌分子标记以及预后标志物还有待商榷^[16]。本研究发现在肝癌细胞系 HepG2 中敲除 *HMGA2* 后细胞的迁移与侵袭能力显著降低,表明 *HMGA2* 也与肝癌细胞的迁移与侵袭有关。此外,通过对原发性

肝癌的病例研究也发现 *HMGA2* 阳性患者明显预后不良^[17],提示 *HMGA2* 也可能作为评估肝癌预后的分子标记。

HMGA2 除了与细胞的迁移、侵袭以及肿瘤预后有关外,还与肿瘤细胞的增殖与抗凋亡有关。研究表明,在急性髓性白血病细胞中,*HMGA2* 主要通过 PI3K/Akt/mTOR 通路促进癌细胞的生长增殖,*HMGA2* 的敲除会引起细胞 G2/M 期阻滞^[18]。在膀胱癌中,*HMGA2* 抑制了 TGF- β /Smad 通路以及 Wnt/ β -catenin 通路,同时沉默 *HMGA2* 降低了 MMP2 以及 MMP9 的表达水平,提高了癌细胞的凋亡速率^[9]。与此类似,李鹏等^[19]发现敲减 *HMGA2* 抑制了 TGF- β 1 诱导的人胚肾成纤维细胞的胶原合成,促进了 ROS 的产生。ROS 的产生则会引发细胞的凋亡反应,有助于阻止癌细胞的生长。Wang 等^[20]研究发现 *HMGA2* 的三个 AT-hook 区可以与 P53 结合,从而提高 P53 泛素化水平,加快 P53 蛋白的降解。本研究通过 CCK8 实验以及克隆形成实验表明,*HMGA2* 敲除也同样引起了 HepG2 细胞的增殖速率以及克隆形成能力的显著降低,但具体的分子机制还有待进一步阐明。

综上所述,*HMGA2* 在多种肿瘤中均发挥了促进肿瘤细胞增殖,增强迁移与侵袭能力以及降低细胞凋亡速率等作用。与此类似,本研究发现 *HMGA2*

在肝癌细胞 HepG2 中也发挥相似的功能, 敲除 HMGA2 显著抑制了 HepG2 细胞的增殖速率、克隆形成能力、迁移与侵袭能力, 表明 HMGA2 也可能作为一个肝癌治疗的潜在分子靶标。

参考文献:

[1] Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function [J]. *Gene*, 2001, 277(1-2): 63-81.

[2] Hock R, Furusawa T, Ueda T, et al. HMG chromosomal proteins in development and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(2): 72-79.

[3] Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer [J]. *J Pathol*, 2006, 209(2): 206-212.

[4] Oliveira-Mateos C, Sánchez-Castillo A, Soler M, et al. The transcribed pseudogene RPSAP52 enhances the oncofetal HMGA2-IGF2BP2-RAS axis through LIN28B-dependent and independent let-7 inhibition [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3979.

[5] Zha L, Wang Z, Tang W, et al. Genome-wide analysis of HMGA2 transcription factor binding sites by ChIP on chip in gastric carcinoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 243-251.

[6] 徐广麓, 张海娜, 姜丹, 等. 沉默 HMGA2 表达对人结肠癌 HCT116 细胞增殖及侵袭能力的影响 [J]. *癌症进展*, 2019, 17(19): 2255 - 2258, 2325.

[7] Chen RX, Chen X, Xia LP, et al. N(6)-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4695.

[8] Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, et al. HMGA2 is a driver of tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14): 4289-4299.

[9] Shi Z, Li X, Wu D, et al. Silencing of HMGA2 suppresses cellular proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7515-7523.

[10] Sung YC, Liu YC, Chao PH, et al. Combined delivery of

sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4): 894-905.

[11] Mou SJ, Yang PF, Liu YP, et al. BCLAF1 promotes cell proliferation, invasion and drug-resistance through targeting lncRNA NEAT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117177.

[12] Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261.

[13] Yang S, Gu Y, Wang G, et al. HMGA2 regulates acute myeloid leukemia progression and sensitivity to daunorubicin via Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 427-436.

[14] Zhu M, Zhang C, Chen D, et al. MicroRNA-98-HMGA2-POSTN signal pathway reverses epithelial-to-mesenchymal transition in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 108998.

[15] Sun J, Sun B, Sun R, et al. HMGA2 promotes vasculogenic mimicry and tumor aggressiveness by upregulating Twist1 in gastric carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2229.

[16] Chiou SH, Dorsch M, Kusch E, et al. Hmga2 is dispensable for pancreatic cancer development, metastasis, and therapy resistance [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14008.

[17] 杨晋, 夏先明, 贺凯, 等. 高迁移率族蛋白 A2 与原发性肝细胞癌患者临床病理特征及其预后的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(24): 49-53.

[18] Tan L, Wei X, Zheng L, et al. Amplified HMGA2 promotes cell growth by regulating Akt pathway in AML [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2): 389-399.

[19] 李鹏, 刘咏梅, 刘振华. 敲减 HMGA2 基因抑制 TGF-β1 诱导的人胚肺成纤维细胞生长及胶原合成 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9): 1648-1653.

[20] Wang Y, Hu L, Wang J, et al. HMGA2 promotes intestinal tumorigenesis by facilitating MDM2-mediated ubiquitination and degradation of p53 [J]. *J Pathol*, 2018, 246(4): 508-518.

[收稿日期] 2020-02-28

苏军华,焦永伟,魏宏莲. 姜黄素通过下调 microRNA-125b 保护人视网膜色素上皮细胞免受高糖诱导的细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 30-35.

Su JH, Jiao YW, Wei HL. Curcumin protects human retinal pigment epithelial cells from damage induced by high glucose by down-regulating microRNA-125b [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 30-35.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.005

姜黄素通过下调 microRNA-125b 保护人视网膜色素上皮细胞免受高糖诱导的细胞损伤

苏军华^{1*}, 焦永伟², 魏宏莲¹

(1.河北医科大学第二医院检验科,石家庄 050000; 2.河北省中医院骨科,石家庄 050000)

【摘要】 目的 探究姜黄素对高糖诱导的人视网膜色素上皮(RPE)细胞中 microRNA-125b(miR-125b)表达及细胞损伤的影响。**方法** 体外培养 ARPE-19 细胞,分为对照组、高糖组、高糖+姜黄素组、高糖+miR-125b 抑制物(inhibitor)组、高糖+抑制物阴性对照(inhibitor-NC)组,MTT 检测 ARPE-19 细胞活性,Annexin V-FITC/PI 双染法检测 ARPE-19 细胞凋亡情况,2'-7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针负载法检测细胞内活性氧(ROS)水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)水平,RT-qPCR 检测细胞中 miR-125b 表达水平。**结果** MTT 实验结果显示,姜黄素可显著提高高糖环境下 ARPE-19 细胞活性。姜黄素可显著降低高糖环境下 ARPE-19 细胞凋亡率及 ROS 生成,增加 SOD 表达。RT-qPCR 实验结果显示,姜黄素可显著降低 miR-125b 表达水平。**结论** 姜黄素可能通过下调 miR-125b 表达降低 ROS 生成及增加 SOD 表达,提高 ARPE-19 细胞抗氧化能力保护其免受高糖诱导的细胞损伤。

【关键词】 姜黄素;microRNA-125b;人视网膜色素上皮细胞;细胞损伤;高糖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0030-06

Curcumin protects human retinal pigment epithelial cells from damage induced by high glucose by down-regulating microRNA-125b

SU Junhua^{1*}, JIAO Yongwei², WEI Honglian¹

(1. Department of Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China.
2. Department of Orthopaedics, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of curcumin on microRNA-125b(miR-125b) expression and cell damage in high glucose-induced human retinal pigment epithelial(RPE) cells. **Methods** ARPE-19 cells were cultured *in vitro* and divided into a control group, a high glucose group, a high glucose + curcumin group, a high glucose + miR-125b inhibitor group and a high glucose + inhibitor-negative control(NC) group. MTT assays were used to detect the activity of ARPE-19 cells. Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect apoptosis of ARPE-19 cells. A 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) probe loading method was used to detect the level of reactive oxygen species(ROS). An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the level of superoxide dismutase(SOD) and RT-qPCR was used to detect the expression of miR-125b in cells. **Results** MTT assays showed that curcumin significantly

[基金项目] 河北省 2017 年度医学科学研究重点课题计划项目(20170120)。

[作者简介] 苏军华(1978—),女,副主任技师,硕士,研究方向:临床诊断学。E-mail:su78jy@163.com

improved the activity of ARPE-19 cells in a high glucose environment. Curcumin significantly reduced the rate of ARPE-19 cell apoptosis and ROS production in a high glucose environment, and increased the expression of SOD. RT-qPCR showed that curcumin significantly reduced the expression level of miR-125b. **Conclusions** Curcumin may reduce ROS production and increase SOD expression by down-regulating miR-125b expression. This would improve the antioxidant capacity of ARPE-19 cells and protect them from high glucose-induced cell damage.

[Keywords] curcumin; microRNA-125b; human retinal pigment epithelial cells; cell damage; high glucose

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,全球约有 4.15 亿糖尿病患者,而亚洲患病人数约超过 2.3 亿,且呈逐年上升趋势,严重危害患者身心健康及生活质量^[1]。糖尿病长期进展可损害眼、肾、神经、血管等多种组织并引起严重并发症^[2]。人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是视网膜细胞重要营养及代谢组织,糖尿病患者长期处于高糖环境下,易使 RPE 细胞因高糖刺激机体产生过多氧自由基造成氧化应激损伤,从而导致多种视网膜病变^[3]。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见眼部微血管并发症之一,是导致患者视力损伤甚至失明的重要原因^[4-5]。姜黄素是一种酚性色素,存在于姜黄、郁金、莪术等中药的根茎中,具有抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]、降血糖^[8]等多种药理活性,但关于其对 DR 的影响鲜有报道。miR-125b 是 miR-125 家族中一员,其异常表达与糖尿病^[9]及其胰岛素抵抗^[10]等密切相关,是糖尿病治疗的新型靶点分子。因此通过高葡萄糖浓度建立高糖环境,拟探究姜黄素对高糖诱导人 ARPE-19 细胞损伤的作用及 miR-125b 表达的影响,以期揭示其作用机制,为临床应用提供一定参考。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

ARPE-19 细胞 (目录号: CC-Y1051) 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F-12 培养基 (批号: 12634010)、胎牛血清 (FBS, 批号: 10099141) 均购自美国 Gibco 公司; PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (批号: 6210A)、Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (批号: 638314) 均购自大连 TaKaRa 生物技术有限公司; 引物及 miR-125b 抑制物 (inhibitor)/阴性对照 (negative control, NC) 由上海生工生物工程股份有限公司合成; SOD 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (批号: 69-21389) 购自武汉默沙克生物科技有限公司; MTT 试

剂盒 (批号: C0009)、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号: C1062S) 购自上海碧云天有限公司。CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司; FACS-Calibur 流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司; MODEL550 型酶标仪、7500 RT-qPCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与处理

常规复苏 ARPE-19 细胞后于含体积分数 10% FBS, 1% 青链霉素的 DMEM/F-12 培养基中置于体积分数 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。细胞传代用 0.25% 胰蛋白酶消化。将对数期生长 ARPE-19 细胞分为 5 组: 对照组 (5 mmol/L 葡萄糖处理)、高糖组 (30 mmol/L 葡萄糖处理)、高糖+姜黄素组 (30 mmol/L 葡萄糖+80 μmol/L 姜黄素共处理)、高糖+inhibitor 组 (30 mmol/L 葡萄糖+miR-125b inhibitor 转染共处理)、高糖+inhibitor-NC 组 (30 mmol/L 葡萄糖+miR-125b inhibitor-NC 转染共处理), 每组 6 个重复, 培养 48 h 后收集细胞进行后续检测。实验重复 4 次。

1.3.2 MTT

采用 MTT 试剂盒检测各组 ARPE-19 细胞活性, 具体操作严格按照试剂盒说明书进行。细胞活性 = (OD_{处理组}/OD_{对照组}) × 100%。

1.3.3 Annexin V-FITC/PI

每孔 ARPE-19 细胞培养结束后添加 500 μL 结合缓冲液重悬, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 添加 5 μL PI, 避光轻振混匀, 室温放置 15 min。同时设置对照 (无 Annexin V-FITC 和 PI), 放入流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 并计算细胞凋亡率。

1.3.4 ROS 检测

各组细胞培养结束后分别用磷酸盐缓冲液洗涤, 以终浓度为 10 μmol/L 2'-7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2'-7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 避光 37℃ 孵育 2 h, 荧光显微镜下观察各组 ARPE-19 细胞荧光强度, 以荧光强度的强弱反映细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平。

1.3.5 SOD 检测

收集各组细胞,破碎细胞后离心取上清液,采用 ELISA 检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.6 RT-qPCR

采用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA,纯度及浓度检测合格后反转录合成 cDNA,采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒进行 miR-125b 扩增,miR-125b 上游引物序列: 5'-TGTGATCCCTGAGACCCTAAACTTGTGA-3',下游引物序列: 5'-CACAGCTCGTAGAACAGGAGG-3'。内参 U6 上游引物序列: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游引物序列: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'。反应体系: SYBR (2×) 10 μL, ROX Dye II (50×) 0.4 μL, cDNA (50 ng/μL) 2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, ddH₂O 6.0 μL。每个样品设置 3 个复孔。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT} 法分析其相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖环境下姜黄素增强 ARPE-19 细胞活性

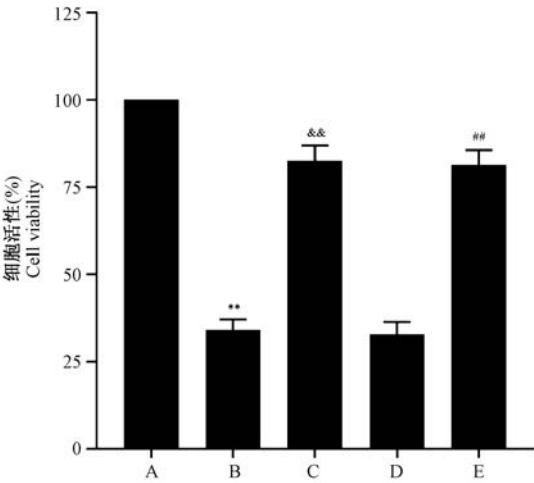
与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞活性显著降低 (图 1, *P*<0.01),而姜黄素和 miR-125b inhibitor 可显著升高 ARPE-19 细胞活性 (*P*<0.01)。

2.2 高糖环境下姜黄素降低 ARPE-19 细胞凋亡

与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞凋亡率显著增加 (图 2, *P*<0.01)。姜黄素处理及 miR-125b inhibitor 转染后,ARPE-19 细胞凋亡率显著降低 (*P*<0.01)。

2.3 高糖环境下姜黄素抑制 miR-125b 表达

与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞中 miR-125b 表达水平显著升高 (图 3, *P*<0.01),而姜黄素处理及转染 miR-125b inhibitor 可显著降低 ARPE-19 细胞中 miR-125b 表达水平 (*P*<0.01)。



注:A;对照组;B;高糖组;C;高糖+姜黄素组;D;高糖+inhibitor-NC 组;E;高糖+inhibitor 组。与对照组比较, ***P*<0.01;与高糖组比较, &&*P*<0.01;与高糖+inhibitor-NC 组比较, ##*P*<0.01。

图 1 高糖环境下姜黄素对 ARPE-19 细胞活性的影响 (*n*=6)

Note. A, Control group. B, High glucose group. C, High glucose + curcumin group. D, High glucose + inhibitor-NC group. E, High glucose+inhibitor group. Compared with the control group, ***P*<0.01. Compared with the high glucose group, &&*P*<0.01. Compared with the high glucose + inhibitor-NC group, ##*P*<0.01.

Figure 1 Effect of curcumin on cell viability of ARPE-19 cells in a high glucose environment

2.4 高糖环境下姜黄素抑制 ROS 生成

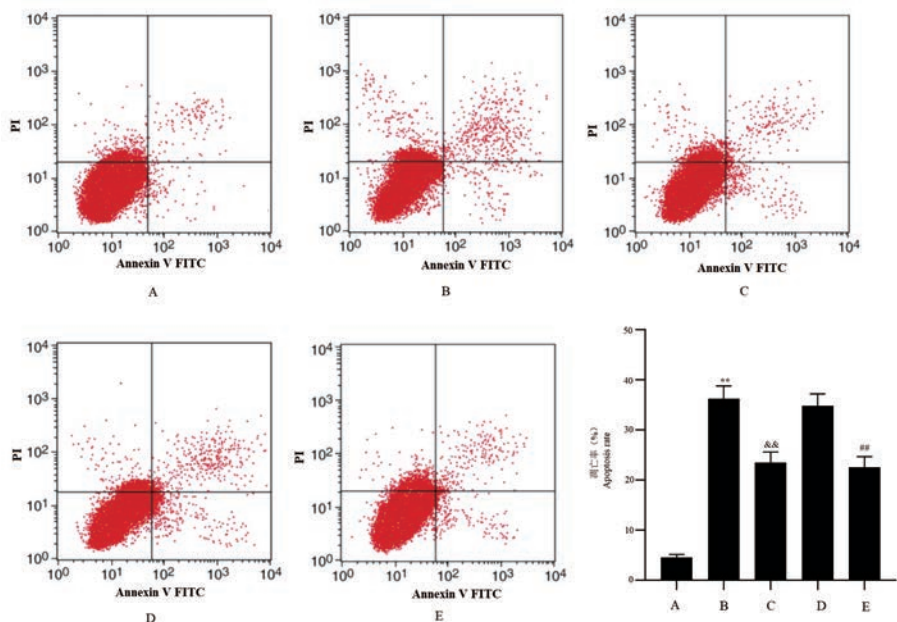
与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞中 ROS 生成水平显著增加 (图 4, *P*<0.01),而姜黄素处理及转染 miR-125b inhibitor 可显著降低 ARPE-19 细胞中 ROS 生成水平 (*P*<0.01)。

2.5 高糖环境下姜黄素促进 SOD 表达

与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞中 SOD 表达水平显著降低 (图 5, *P*<0.01),而姜黄素处理及转染 miR-125b inhibitor 可显著增加 ARPE-19 细胞中 SOD 表达水平 (*P*<0.01)。

3 讨论

目前用于治疗 and 预防糖尿病血管病变的药物有限,且存在一定副作用^[11]。现代研究认为,糖尿病的发生可能与环境因素、遗传因素及自身免疫功能等共同作用有关,提高机体抗氧化能力是治疗糖尿病及其血管并发症疾病的新方向^[12]。姜黄素是

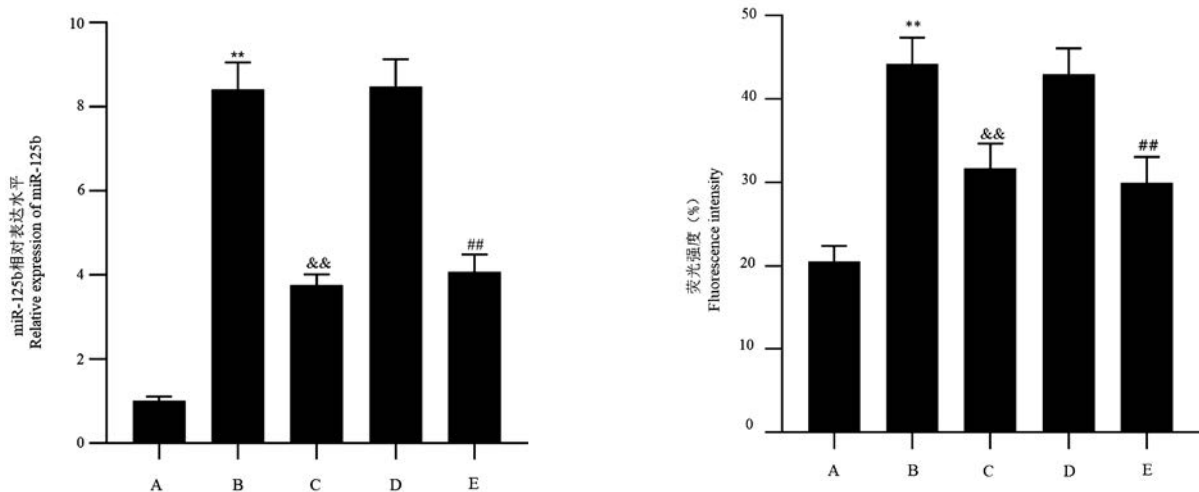


注:A:对照组;B:高糖组;C:高糖+姜黄素组;D:高糖+inhibitor-NC 组;E:高糖+inhibitor 组。与对照组比较, ** $P<0.01$;与高糖组比较, && $P<0.01$;与高糖+inhibitor-NC 组比较, ## $P<0.01$ 。

图2 高糖环境下姜黄素对 ARPE-19 细胞凋亡的影响 (n=6)

Note. A, Control group. B, High glucose group. C, High glucose+curcumin group. D, High glucose+inhibitor-NC group. E, High glucose+inhibitor group. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the high glucose group, && $P<0.01$. Compared with the high glucose+inhibitor-NC group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Effect of curcumin on cell apoptosis of ARPE-19 cells in a high glucose environment

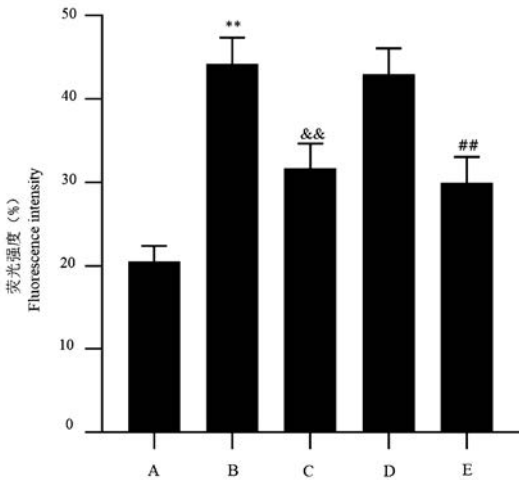


注:A:对照组;B:高糖组;C:高糖+姜黄素组;D:高糖+inhibitor-NC 组;E:高糖+inhibitor 组。与对照组比较, ** $P<0.01$;与高糖组比较, && $P<0.01$;与高糖+inhibitor-NC 组比较, ## $P<0.01$ 。

图3 高糖环境下姜黄素对 ARPE-19 细胞中 miR-125b 表达的影响 (n=6)

Note. A, Control group. B, High glucose group. C, High glucose+curcumin group. D, High glucose+inhibitor-NC group. E, High glucose+inhibitor group. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the high glucose group, && $P<0.01$. Compared with the high glucose+inhibitor-NC group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effects of curcumin on the expression of miR-125b in ARPE-19 cells in a high glucose environment

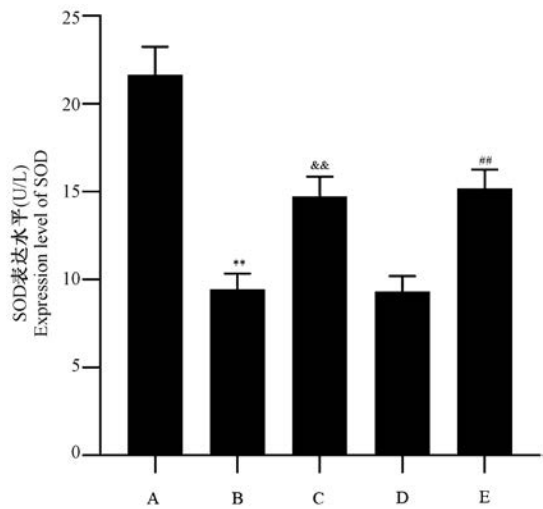


注:A:对照组;B:高糖组;C:高糖+姜黄素组;D:高糖+inhibitor-NC 组;E:高糖+inhibitor 组。与对照组比较, ** $P<0.01$;与高糖组比较, && $P<0.01$;与高糖+inhibitor-NC 组比较, ## $P<0.01$ 。

图4 高糖环境下姜黄素对 ARPE-19 细胞中 ROS 生成的影响 (n=6)

Note. A, Control group. B, High glucose group. C, High glucose+curcumin group. D, High glucose+inhibitor-NC group. E, High glucose+inhibitor group. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the high glucose group, && $P<0.01$. Compared with the high glucose+inhibitor-NC group, ## $P<0.01$.

Figure 4 Effects of curcumin on the expression of ROS content in ARPE-19 cells in a high glucose environment



注:A:对照组;B:高糖组;C:高糖+姜黄素组;D:高糖+inhibitor-NC 组;E:高糖+inhibitor 组。与对照组比较, ** $P<0.01$;与高糖组比较, && $P<0.01$;与高糖+inhibitor-NC 组比较, ## $P<0.01$ 。

图 5 高糖环境下姜黄素对 ARPE-19 细胞中 SOD 表达的影响 ($n=6$)

Note. A, Control group. B, High glucose group. C, High glucose + curcumin group. D, High glucose + inhibitor-NC group. E, High glucose+inhibitor group. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared with the high glucose group, && $P<0.01$. Compared with the high glucose + inhibitor-NC group, ## $P<0.01$.

Figure 5 Effects of curcumin on the expression of SOD in ARPE-19 cells in a high glucose environment

一种多酚类化合物,其结构中有 2 个邻甲基化酚和 1 个 β -二酮功能基团,与多种生物活性密切相关,具有调节血脂代谢、抗炎和抗氧化等多种功能^[13]。研究报道,姜黄素在改善糖尿病、肥胖及促进 GLUT4 基因表达等方面具有一定治疗作用^[14],还可减轻糖尿病大鼠海马的内质网应激、凋亡和胆碱能功能障碍^[15],且可通过提高 DR 大鼠视网膜抗氧化能力及抗凋亡能力,改善糖尿病引起的视网膜变薄、基底膜增厚及感光细胞膜盘紊乱等^[16]。本研究结果发现,与正常细胞相比,姜黄素处理后 ARPE-19 细胞活性、SOD 表达水平显著增加,凋亡率、ROS 生成水平显著降低,与刘俊平等^[17]人研究结果一致,表明姜黄素处理可逆转高糖对 ARPE-19 细胞的损伤作用,清除氧自由基,增强其抗氧化能力,促进 ARPE-19 细胞存活,抑制其凋亡,但其具体作用机制尚不清楚。

miR-125 家族进化过程中高度保守,由 miR-125a、miR-125b-1、miR-125b-2 三个成员组成,其中

miR-125b 是糖尿病治疗的新型靶点生物分子^[18]。有研究显示,miR-125b 在 2 型糖尿病患者外周血中显著上调^[19],可通过靶向血管紧张素转化酶 2 (ACE2) 介导高糖诱导的 HK-2 肾小管上皮细胞 ROS 的产生和凋亡,是预防糖尿病肾病的潜在治疗靶点^[20]。且有研究报道,下调 miR-125b 可增加大鼠视杆双极细胞异常突起,增强内层神经元信息输入,改善变性视网膜功能^[21]。本研究结果发现,与正常 ARPE-19 细胞比较,高糖诱导环境下 ARPE-19 细胞中 miR-125b 表达水平显著升高,而姜黄素处理及转染 miR-125b inhibitor 可显著降低 ARPE-19 细胞中 miR-125b 表达水平,与 Gong 等^[22]人研究报道下调 miR-125b 可抑制 DR 进展结果一致,提示姜黄素可能通过下调 miR-125b 减轻 ARPE-19 细胞氧化应激损伤,促进 ARPE-19 细胞活性,抑制其凋亡。

综上所述,本研究初步揭示了姜黄素可通过下调 miR-125b 降低 ARPE-19 细胞 ROS 生成及增加 SOD 表达,提高其抗氧化能力,减轻 ARPE-19 细胞受高糖诱导的细胞损伤,可能为姜黄素用于 DR 治疗及研究提供新的治疗手段。但关于姜黄素对 miR-125b 下游靶向基因调控机制尚不明确,是本研究不足之处,有待进一步深入探究。

参考文献:

[1] 姚媛. 银杏提取物 50 通过调节自噬降低 ROS 水平保护高糖对血管内皮细胞的损伤作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 71-76.

[2] van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, et al. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2020, 8(4): 325-336.

[3] 朱华. 小剂量多次注射链脲佐菌素建立糖尿病早期视网膜病变动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 487-493.

[4] 赵庆芳, 魏会宇, 胡丽影. 2 型糖尿病患者糖尿病视网膜病变程度与肾功能指标的相关性 [J]. 眼科新进展, 2018, 38(5): 471-474.

[5] Zhang X, Pek SLT, Tavintharan S, et al. Leucine-rich α -2-glycoprotein predicts proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes [J]. J Diabetes Complications, 2019, 33(9): 651-656.

[6] Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, et al. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases [J]. Chem Biol Interact, 2016, 244(1): 187-194.

[7] Negrette-Guzmán M. Combinations of the antioxidants sulforaphane or curcumin and the conventional antineoplastics

cisplatin or doxorubicin as prospects for anticancer chemotherapy [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 859(1): 172513–172528.

[8] 田硕, 白明, 苗明三. 姜黄素对大鼠糖尿病模型的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 53–55.

[9] Du X, Li X, Chen L, et al. Hepatic miR-125b inhibits insulin signaling pathway by targeting PIK3CD [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(8): 6052–6066.

[10] Yu CY, Yang CY, Rui ZL. MicroRNA-125b – 5p improves pancreatic beta-cell function through inhibiting JNK signaling pathway by targeting DACT1 in mice with type 2 diabetes mellitus [J]. Life Sci, 2019, 224(1): 67–75.

[11] 李毅斌. 抗 VEGF 时代糖尿病视网膜病变治疗的策略和发展方向 [J]. 眼科, 2019, 28(4): 245–248.

[12] Ajiboye BO, Ojo OA, Oyinloye BE, et al. *In vitro* antioxidant and inhibitory activities of polyphenolic-rich extracts of Syzygium cumini (Linn) Skeels leaf on two important enzymes relevant to type II diabetes mellitus [J]. Pak J Pharm Sci, 2020, 33(2): 523–529.

[13] 曹佳, 严瑾, 郜振彦, 等. 姜黄素对铅氧化损伤大鼠的保护作用 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(12): 942–945.

[14] Al-Saud NBS. Impact of curcumin treatment on diabetic albino rats [J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(2): 689–694.

[15] Keshk WA, Elseady WS, Sarhan NI, et al. Curcumin attenuates cytoplasmic/endoplasmic reticulum stress, apoptosis and cholinergic dysfunction in diabetic rat hippocampus [J]. Metab Brain Dis, 2020, 35(4): 637–647.

[16] 杨敏, 翟光喜. 姜黄素对糖尿病及其并发症的作用及机制研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38(2): 65–70.

[17] 刘俊平, 范竹萍, 李海, 等. 姜黄素对非酒精性脂肪性肝炎的氧化和抗氧化调节作用 [J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(3): 139–144.

[18] Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, et al. Diabetes mellitus and cardiovascular risk assessment in mothers with a history of gestational diabetes mellitus based on postpartal expression profile of micrnas associated with diabetes mellitus and cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2437.

[19] Shen Y, Xu H, Pan X, et al. miR-34a and miR-125b are upregulated in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(6): 5589–5596.

[20] Huang YF, Zhang Y, Liu CX, et al. microRNA-125b contributes to high glucose-induced reactive oxygen species generation and apoptosis in HK – 2 renal tubular epithelial cells by targeting angiotensin-converting enzyme 2 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(19): 4055–4062.

[21] Fu Y, Hou B, Weng C, et al. Functional ectopic neuritogenesis by retinal rod bipolar cells is regulated by miR-125b–5p during retinal remodeling in RCS rats [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1011.

[22] Gong Q, Xie J, Li Y, et al. Enhanced ROBO4 is mediated by up-regulation of HIF-1alpha/SP1 or reduction in miR-125b–5p/miR-146a–5p in diabetic retinopathy [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(7): 4723–4737.

[收稿日期] 2020–05–15

勘误声明

本刊对下述论文进行勘误：

出版信息	2020 年 30 卷 5 期, 页码为 31–39
论文标题	利用 Pdl1 敲除的巨噬细胞转录谱分析结核感染中 PD–L1 作用相关的候选基因
稿次	☐ 录用定稿 ☐ 排版定稿 ☐ 整期定稿 ☒ 印刷版 ☐ 其它
作者	石亚男, 唐军, 李军丽, 王杰, 占玲俊
DOI	doi: 10. 3969/ j. issn. 1671–7856. 2020. 05. 006
勘误内容	“脚注”一栏 原为： 国家自然科学基金(81701986)。 应更正为： 国家自然科学基金(81801986)。

特此告知并诚挚地向读者致歉。

李坤阳,陈栋,左春然,等. VPS4B 调控 Notch 通路对促进牙髓干细胞成牙本质分化的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 36-41.

Li KY, Chen D, Zuo CR, et al. Effects of VPS4B on the Notch pathway and odontogenic differentiation in dental pulp stem cells [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 36-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.006

VPS4B 调控 Notch 通路对促进牙髓干细胞成牙本质分化的机制研究

李坤阳¹, 陈 栋^{2*}, 左春然¹, 刘爱群¹, 朱兰省¹, 牛 兵¹

(1.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)口腔科,郑州 450001; 2.郑州大学第一附属医院·河南省口腔医院口腔科,郑州 450052)

【摘要】 目的 探讨细胞液泡分选蛋白 4B(VPS4B)对人牙髓干细胞(hDPSCs)成牙本质分化及 Notch 通路的影响。**方法** hDPSCs 分正常组、矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组,除正常组(正常培养,不做任何处理)外,其余各组添加矿化液(0.785 g/L 地塞米松、0.05 g/L 维生素 D₃、1.6 g/L β-甘油磷酸钠),同时阴性对照组和 VPS4B-siRNA 组均用脂质体 Lipofectamine 2000 分别和阴性对照 siRNA、VPS4B-siRNA 共转染。CCK8 检测细胞增殖情况;蛋白免疫印迹检测细胞中 VPS4B、Notch 受体释放其胞内结构域(NICD)、Hairy 相关转录因子 1(Hey1)蛋白水平;茜素红染色观察细胞矿化情况;钙浓度检测试剂盒检测细胞钙浓度;实时荧光定量 PCR 检测细胞 Runx2、骨桥蛋白(OPN)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)mRNA 水平。**结果** 正常组茜素红染色较浅,面积较小;矿化组、阴性对照组染色较深,且面积较大;VPS4B-siRNA 组染色颜色有所减轻,面积减少。与正常组相比,矿化组、阴性对照组 OD₄₅₀ 水平, NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$),矿化结节相对数量, VPS4B 蛋白水平,钙浓度, Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$);VPS4B-siRNA 组矿化结节相对数量, OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$);OD₄₅₀ 水平, NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$)。分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高($P<0.05$); OD₄₅₀ 水平, VPS4B 蛋白水平,矿化结节相对数量,钙浓度, Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低($P<0.05$)。**结论** 干扰 VPS4B 后可抑制 hDPSCs 牙本质分化,并初步探究可能是通过激活 Notch 通路实现的。

【关键词】 牙髓干细胞;成牙本质分化;细胞液泡分选蛋白 4B;Notch 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0036-06

Effects of VPS4B on the Notch pathway and odontogenic differentiation in dental pulp stem cells

LI Kunyang¹, CHEN Dong^{2*}, ZUO Chunran¹, LIU Aiqun¹, ZHU Lansheng¹, NIU Bing¹

(1. Department of Stomatology, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450001, China.

2. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University·Stomatologic Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450052)

【基金项目】2018 年度河南省医学科技攻关计划项目(SBGJ2018038);河南省高等学校重点科研项目计划(18A310036)。

【作者简介】李坤阳(1984—),男,硕士研究生,研究方向:牙周病学。E-mail:li1984ky@sina.com

【通信作者】陈栋(1970—),男,医学博士,教授,硕士生导师。E-mail:chendongfmmu@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) on odontogenic differentiation and Notch pathway signaling in human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods** hDPSCs was divided into normal, mineralized, negative control, and VPS4B-siRNA groups. The normal group was grown in normal culture, without any additional treatment. The remaining groups underwent treatment with mineralized liquid (0.785 g/L dexamethasone, 0.05 g/L vitamins, 2.16 g/L sodium β -glycerophosphate); the negative control and VPS4B-siRNA groups underwent transfection of negative control siRNA and VPS4B-siRNA, respectively, using Lipofectamine 2000. The CCK8 assay was used to detect cell proliferation. The protein levels of VPS4B, Notch intracellular domain (NICD), and hairy and enhancer of split-related with YRPW motif1 (Hey1) were detected by Western blotting. Cell mineralization was observed by alizarin red staining. Cell calcium concentrations were determined using a calcium detection kit. The mRNA levels of Runx2, osteopontin (OPN), and dentin sialophosphoprotein (DSPP) were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** In the normal group, the alizarin red staining area was light and small. The mineralized and negative control groups exhibited a darker and larger staining area, while the VPS4B-siRNA group exhibited a lighter and smaller staining area. Compared with the normal group, the levels of OD₄₅₀, NICD, and Hey1 proteins were reduced in the mineralized and negative control groups (all $P < 0.05$), while the relative number of mineralized nodules, level of VPS4B protein, concentration of calcium, and levels of Runx2, OPN, and DSPP mRNA were enhanced (all $P < 0.05$). The relative number of mineralized nodules and levels of OPN and DSPP mRNA were enhanced in the VPS4B-siRNA group (all $P < 0.05$), while the levels of OD₄₅₀, NICD, and Hey1 proteins were reduced (all $P < 0.05$). Compared with the mineralized and negative control groups, NICD and Hey1 protein levels were enhanced in the VPS4B-siRNA group (both $P < 0.05$), while the levels of OD₄₅₀ and VPS4B protein, the relative number of mineralized nodules, concentration of calcium, and levels of Runx2, OPN, and DSPP mRNA were reduced (all $P < 0.05$). **Conclusions** Interference with VPS4B activity can inhibit odontogenic differentiation in hDPSCs, presumably through modulation of the Notch pathway.

[Keywords] dental pulp stem cells; odontogenic differentiation; vacuolar protein sorting 4B; Notch pathway

人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)是从牙齿上分离出的成体间充质干细胞,具有高度增殖能力,且具有多向分化潜能,是牙齿再生的重要细胞^[1]。因此 hDPSCs 的定向分化对于牙齿再生至关重要。细胞液泡分选蛋白 4B (vacuolar protein sorting 4B, VPS4B)在 hDPSCs 中高表达,可促进向成牙本质分化,但机制尚不明确^[2]。Notch 通路与细胞增殖、分化等关系密切,并且几乎涉及机体所有器官、组织和细胞,在牙齿发育和再生过程中发挥重要作用^[3-4]。Notch 受体释放其胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD)作为 Notch 通路激活金标准,过表达 NICD 可以抑制 hDPSCs 分化^[5]。推测 VPS4B 可能调控 Notch 通路影响 hDPSCs 成牙本质分化。因此,本研究采用矿化液和干扰 VPS4B 同时处理 hDPSCs,探讨其对成牙本质分化的影响,并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收集本院 18~30 岁因正畸或阻生齿拔除的健康完整恒牙,无菌工作台上取出牙髓,分离纯化和鉴定得 hDPSCs^[6]。经核实,所有操作经患者知情同

意并签订知情同意书,本研究经本院伦理协会审核并通过(20190014)。

1.2 主要试剂与仪器

地塞米松、维生素、 β -甘油磷酸钠、茜素红(德国 Sigma 公司,批号分别为:170412、181113、171207、180415);脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂盒(赛默飞世尔公司,批号:20170418);一抗 VPS4B、NICD、hairy 相关转录因子 1(hairy and enhancer of split-related with YRPW motif1, Hey1)、GAPDH、钙浓度检测试剂盒(美国 abcam 公司,批号分别为:ab224736、ab83232、ab22614、ab181602、ab102505);VPS4B-siRNA、阴性对照 siRNA、Runx 相关转录因子 2(runt-related transcription factor2, Runx2)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)引物序列均由生工生物工程股份有限公司合成。CO₂ 培养箱(深圳瑞沃德公司,型号:D180-P);酶标仪、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 仪(赛默飞世尔公司,型号分别为:Multiskan Sky、7500);凝胶成像系统(上海天能公司,型号:4800)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理

参考文献^[7]设计 VPS4B-siRNA, VPS4B-siRNA-

1:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'、VPS4B-siRNA-2:5'-AACATTTGAGAAACGAATT-3'、VPS4B-siRNA-3:5'-TGATCCTAACCATCTTGTA-3',最终三者 1:1:1 混合为 VPS4B-siRNA。阴性对照 siRNA:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。VPS4B-siRNA 及阴性对照 siRNA 均用 50 μL 无血清 MEM 稀释成 20 μmol/L;2 μL 脂质体 Lipofectamine 2000 用 50 μL DMEM 培养液稀释,轻轻混匀后室温孵育 5 min,上述稀释的 siRNA 与稀释的脂质体 Lipofectamine 2000 轻轻混合后室温孵育 20 min,现配现用。

10% FBS+90% DMEM 培养液制成完全培养液培养 hDPSCs,采用生长良好的第 3 代 hDPSCs 进行后续实验,实验分为正常组、矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组。正常组正常培养相同时间,其余组添加矿化液(0.785 g/L 地塞米松、0.05 g/L 维生素、2.16 g/L β-甘油磷酸钠),在添加矿化液基础上阴性对照组(添加脂质体 Lipofectamine 2000+阴性对照 siRNA)、VPS4B-siRNA 组(添加脂质体 Lipofectamine 2000+VPS4B-siRNA),6 h 后弃去培养液再添加含矿化液完全培养液培养,其余 2 d 换一次液,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 14 d。

1.3.2 蛋白免疫印迹检测细胞中 VPS4B、NICD、Hey1 蛋白水平

按 1.3.1 对细胞处理后,蛋白裂解液冰上裂解细胞 20 min,4℃ 12000 r/min 离心 20 min,上清为总蛋白,凝胶电泳分离蛋白,PVDF 转膜,分别加入一抗 VPS4B、NICD、Hey1、GAPDH 置于 4℃ 孵育过夜,添加对应二抗,室温孵育 1 h。凝胶成像系统拍照并分析条带灰度。目的蛋白相对表达=目的蛋白条带灰度/GAPDH 条带灰度。

1.3.3 CCK8 检测细胞增殖情况

每孔 3×10⁴ 个细胞接种至 96 孔板中,添加 200 μL 培养液培养细胞,待细胞贴壁后添加 CCK8 试剂,继续培养 2 h,酶标仪检测各组细胞光密度 OD₄₅₀ (optic density, OD)。

1.3.4 茜素红染色观察细胞分化情况

按 1.3.1 处理各组细胞,弃去培养液,40 g/L 多聚甲醛固定,茜素红染液染色,肉眼及倒置显微镜下观察矿化结节情况。Image-J 软件定量分析,每个样品显微镜视野下计数 5 个孔,求平均值,每个视野下矿化结节数量为矿化结节相对数量。

1.3.5 钙浓度检测试剂盒检测细胞钙水平

按 1.3.1 处理细胞后按照钙浓度检测试剂盒说明书配置 MTB 试剂和碱性溶液,钙标准液 2.5 mmol/L,4℃ 避光保存。100 μL MTB+200 μL 碱性溶液+各 10 μL(待测样品、钙标准液、ddH₂O),混匀后置于 1 cm 比色皿,ddH₂O 用于调零,测定 OD₆₁₀。待测样品钙浓度=OD_{测定管}/OD_{标准管}×2.5。

1.3.6 qRT-PCR 检测细胞中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平

按 1.3.1 方法处理细胞后,RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录 cDNA 试剂盒合成 cDNA,qRT-PCR 仪检测细胞中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平。引物序列 Runx2-F:5'-CCATAACCGTCTTCACAAATCC-3'、R:5'-GCGGGACACCTACTCTCATACT-3',OPN-F:5'-ACACATATGATGGCCGAGGTG-3'、R:5'-GTGTGAGGTGATGTCCTCGTCTGTA-3,DSPP-F:5'-CCATTCCCACGGACTCCCA-3'、R:5'-TGGCGATGCAGGTCACAAT-3',20 μL 反应体系:2×mix 10 μL,ddH₂O 7.8 μL,50 ng/μL cDNA 1 μL,(F/R)(0.6/0.6)μL。反应条件:94℃、90 s;94℃、60 s,61℃、60 s,40 个循环。2^{-ΔΔCt} 法计算 Runx2、OPN、DSPP mRNA 相对表达水平。8 个平行。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析,计量数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。*P*<0.05,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干扰 VPS4B 对 hDPSCs VPS4B 蛋白的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组 VPS4B 蛋白水平升高(*P*<0.05);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 VPS4B 蛋白水平降低(*P*<0.05)。见图 1、表 1。

2.2 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 增殖的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组 OD₄₅₀ 水平降低(*P*<0.05);分别与矿化组、

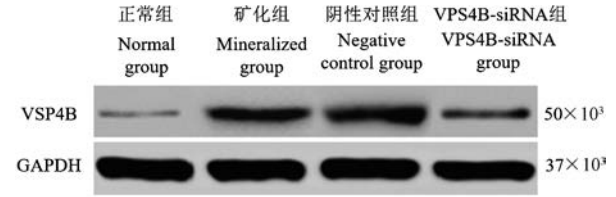


图 1 4 组细胞中 VPS4B 蛋白表达情况
Figure 1 Expression of VPS4B protein in 4 groups of cells

阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组 OD₄₅₀ 水平降低 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 成牙本质分化的影响

正常组茜素红染色较浅, 面积较小。与正常组相比, 矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组染色较深, 且面积较大, 矿化结节相对数量升高 ($P<0.05$); 分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组染色颜色有所减轻, 面积减少, 矿化结节相对数量降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

2.4 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 钙化的影响

与正常组相比, 矿化组、阴性对照组钙浓度升高 ($P<0.05$); 分别与矿化组、阴性对照组相比, VPS4B-siRNA 组钙浓度降低 ($P<0.05$)。见表 4。

表 1 4 组细胞 VPS4B 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of VPS4B protein levels in 4 groups of cells

组别 Groups	VPS4B
正常组 Normal group	0.11±0.02
矿化组 Mineralized group	0.47±0.05 [#]
阴性对照组 Negative control group	0.49±0.04 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.16±0.03 ^{*&}
<i>F</i>	237.975
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

表 2 4 组细胞 OD₄₅₀ 比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Comparison of OD₄₅₀ in 4 groups of cells

组别 Groups	OD ₄₅₀
正常组 Normal group	2.14±0.05
矿化组 Mineralized group	1.24±0.15 [#]
阴性对照组 Negative control group	1.28±0.12 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.87±0.05 ^{*&}
<i>F</i>	220.786
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

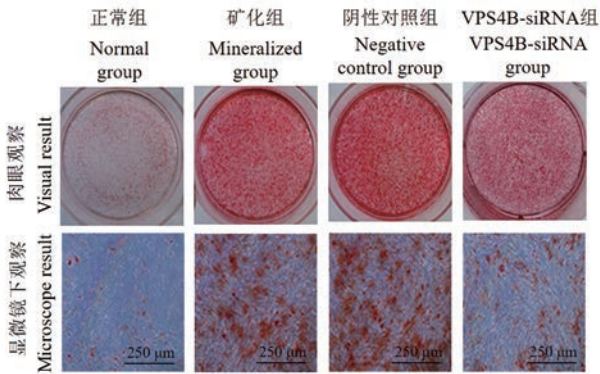


图 2 4 组细胞茜素红染色结果

Figure 2 Results of alizarin red staining in 4 groups of cells

表 3 4 组细胞矿化结节相对数量比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of relative number of mineralized nodules in 4 groups of cells

组别 Groups	矿化结节相对数量(<i>n</i>) Relative number of mineralized nodules
正常组 Normal group	13.45±3.56
矿化组 Mineralized group	73.58±6.89 [#]
阴性对照组 Negative control group	71.74±5.47 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	48.98±5.18 ^{*&}
<i>F</i>	214.482
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

表 4 4 组细胞钙浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 4 Comparison of calcium concentration in 4 groups of cells

组别 Groups	钙浓度 (mmol/L) Calcium concentration
正常组 Normal group	1.53±0.18
矿化组 Mineralized group	2.48±0.45 [#]
阴性对照组 Negative control group	2.50±0.43 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	1.95±0.25 ^{*&}
<i>F</i>	14.395
<i>P</i>	0.000

注: 与正常组相比, [#] $P<0.05$; 与矿化组相比, ^{*} $P<0.05$; 与阴性对照组相比, [&] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$. Compared with the mineralized group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the negative control group, [&] $P<0.05$.

2.5 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 中 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高,VPS4B-siRNA 组 OPN、DSPP mRNA 水平升高($P<0.05$);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低($P<0.05$)。见图 3。

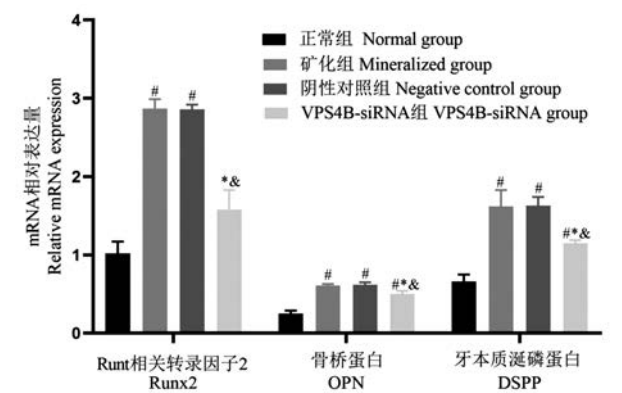
2.6 干扰 VPS4B 对 hDPSCs 中 Notch 通路蛋白的影响

与正常组相比,矿化组、阴性对照组、VPS4B-siRNA 组细胞中 NICD、Hey1 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与矿化组、阴性对照组相比,VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 4、表 5。

3 讨论

hDPSCs 具有多向分化和自我更新能力,牙髓损伤可促使 hDPSCs 迁移至受损部位定向分化,从而修复损伤,检测未分化和分化后基因表达差异对于维持 hDPSCs 定向分化具有重要意义^[8]。VPS4B 作为 AAA-ATPase 家族成员,VPS4B 的破坏可能导致某些功能改变,主要表现为改变 VPS4B 二级结构,导致其功能降低或丧失;VPS4B 基因突变已成为牙本质异常的致病基因^[9-10]。但具体机制尚不清楚,因此研究 VPS4B 在 hDPSCs 成牙本质分化的机制对于治疗疾病意义重大。本研究发现,与正常组相比,矿化组 VPS4B 蛋白水平升高;提示矿化 hDPSCs 可促进 VPS4B 蛋白的表达。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 VPS4B 蛋白水平降低;说明干扰 VPS4B 后矿化 hDPSCs 细胞中蛋白水平下降,干扰成功。与正常组相比,矿化组 OD₄₅₀下降,矿化结节相对数量、钙浓度升高,提示矿化 hDPSCs 促进 VPS4B 表达,可抑制细胞增殖、促进成牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组茜素红染色颜色有所减轻,面积减少,OD₄₅₀、矿化结节相对数量、钙浓度降低;提示干扰 VPS4B 后进一步抑制细胞增殖、hDPSCs 成牙本质分化。

Runx2 具有多个结合位点,可以结合在靶基因的启动子上从而调控众多成骨相关的靶基因,如骨钙素、OPN 等,影响细胞分化;增强 Runx2 表达可促进 hDPSCs 分化为成牙本质细胞^[11-12]。OPN 可结合羟基磷灰石晶体从而参与钙离子信号传导过程,在初期矿化中起重要作用;DSPP 作为牙本质特异性蛋白,其水平反映 hDPSCs 成牙本质分化水



注:与正常组相比,# $P<0.05$;与矿化组相比,* $P<0.05$;与阴性对照组相比,& $P<0.05$ 。

图 3 4 组细胞 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平比较
Note. Compared with the normal group, # $P<0.05$. Compared with the mineralized group, * $P<0.05$. Compared with the negative control group, & $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of Runx2, OPN and DSPP mRNA levels in four groups of cells

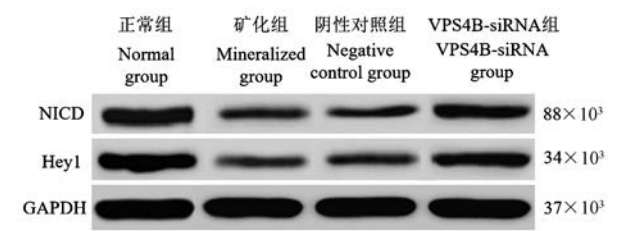


图 4 4 组细胞中 NICD、Hey1 蛋白表达情况
Figure 4 Expression of NICD and Hey1 protein in 4 groups of cells

表 5 4 组细胞 NICD、Hey1 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 5 Comparison of NICD and Hey1 protein levels in 4 groups of cells

组别 Groups	Notch 受体释放其胞内 结构域 NICD	Hairy 相关转录 因子 1 Hey1
正常组 Normal group	0.57±0.06	0.72±0.05
矿化组 Mineralized group	0.13±0.04 [#]	0.11±0.01 [#]
阴性对照组 Negative control group	0.14±0.05 [#]	0.13±0.04 [#]
VPS4B-siRNA 组 VPS4B-siRNA group	0.46±0.05 ^{#*&}	0.43±0.05 ^{#*&}
<i>F</i>	157.386	396.856
<i>P</i>	0.000	0.000

注:与正常组相比,# $P<0.05$;与矿化组相比,* $P<0.05$;与阴性对照组相比,& $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, # $P<0.05$. Compared with the mineralized group, * $P<0.05$. Compared with the negative control group, & $P<0.05$.

平^[13-14]。本研究发现,与正常组相比,矿化组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平升高,提示 Runx2 促进参与矿化过程中的 OPN 和形成牙本质的相关基因水平升高,促进 hDPSCs 牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 Runx2、OPN、DSPP mRNA 水平降低,提示干扰 VPS4B 后 Runx2 水平降低,对 OPN 的促进作用减弱,导致牙本质分化相关基因如 DSPP 等水平降低,hDPSCs 牙本质分化能力减弱。

活化 Notch 信号通路可暴露出 NICD,活化的 NICD 可与 DNA 结合蛋白结合,从而活化 Notch 靶基因,Hey1 作为 Notch 靶基因可受 NICD 调控^[15-17]。Hey1 可与 DNA 蛋白结合从而发挥作用,被认为转录抑制物,可与 Runt 结构家族羧基端结合从而发挥作用^[18-19]。同时发现高表达 NICD 可直接抑制 Runx2 的表达从而抑制成骨分化^[20]。本研究发现,与正常组相比,矿化组细胞中 NICD、Hey1 蛋白水平降低,提示 hDPSCs 成牙本质分化过程中 NICD 受到抑制,调控 Hey1 的作用减弱,从而导致 Hey1 对 Runx2 的转录抑制作用减弱,促进 hDPSCs 成牙本质分化。与矿化组相比,VPS4B-siRNA 组 NICD、Hey1 蛋白水平升高,提示干扰 VPS4B 后 VPS4B 二级结构改变,而改变 ATP 的结合结构,导致 ATP 功能改变,经过一系列影响,激活 NICD, NICD 调控 Hey1 水平升高,Hey1 对 Runx2 的抑制作用加强,Runx2 水平降低调控 OPN、DSPP 能力降低,hDPSCs 分化能力降低,导致疾病发生。

综上所述,干扰 VPS4B 后可抑制 hDPSCs 牙本质分化,可能是通过激活 Notch 通路实现的。但 VPS4B 与 Notch 之间的作用结合部位尚未发现,仍需深入探究分析。

参考文献:

- [1] 罗孟亚男,赵娜,戴楠楠,等.骨髓间充质干细胞调节 Notch 表达可有效治疗放射性唾液腺损伤[J].中国组织工程研究,2019,23(25):3967-3972.
- [2] Pan Y, Lu T, Peng L, et al. Vacuolar protein sorting 4B regulates the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells through the Wnt- β -catenin signalling pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2575-2584.
- [3] Mills EA, Goldman D. The regulation of notch signaling in retinal development and regeneration [J]. *Curr Pathobiol Rep*, 2017, 5(4): 323-331.
- [4] Bhola NE, Jansen VM, Koch JP, et al. Correction; treatment of triple-negative breast cancer with torc1/2 inhibitors sustains a drug-resistant and notch-dependent cancer stem cell population [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(4): 875-879.
- [5] 邱申彩,龙晏,陈晓燕,等.超表达 Notch 胞内结构域对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响[J].中华口腔医学杂志,2019,54(5):315-321.
- [6] 王军强,曹伟靖. CCN2 对人牙髓干细胞增殖及分化的影响[J].中国医药导报,2014,11(16):24-27,169.
- [7] 陈昱延,周一凡,蒋大伟,等.干扰 VPS4B 表达对肝癌细胞增殖和细胞周期的影响[J].南通大学学报(医学版),2016,36(1):10-13.
- [8] Zhou M, Liu NX, Shi SR, et al. Effect of tetrahedral DNA nanostructures on proliferation and osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via activation of the notch signaling pathway [J]. *Nanomedicine*, 2018, 14(4): 1227-1236.
- [9] Yang Q, Chen D, Xiong F, et al. A splicing mutation in VPS4B causes dentin dysplasia I [J]. *J Med Genet*, 2016, 53(9): 624-633.
- [10] Lin HH, Li X, Chen JL, et al. Identification of an AAA ATPase VPS4B-Dependent pathway that modulates epidermal growth factor receptor abundance and signaling during hypoxia [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(6): 1124-1138.
- [11] Xin BC, Wu QS, Jin S, et al. Berberine promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through activating EGFR-MAPK-Runx2 pathways [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(3): 1677-1685.
- [12] Zhan FL, Liu XY, Wang XB. The role of microRNA-143-5p in the differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts by targeting Runx2 via the OPG/RANKL signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 536-546.
- [13] An Y, Song Y, Wang Z, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the biological behaviors of bone marrow mesenchymal stem cells on titanium with different surface topographies [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(1): 67-76.
- [14] Rahman SU, Oh JH, Cho YD, et al. Fibrous topography-potentiated canonical wnt signaling directs the odontoblastic differentiation of dental pulp-derived stem cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(21): 17526-17541.
- [15] 李长龙,杜小燕,王冬平,等.长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育及其发病机制研究进展[J].中国实验动物学报,2018,26(4):512-517.
- [16] Zhang X, Qiao B, Hu Z, et al. BMP9 promotes the extracellular matrix of nucleus pulposus cells via inhibition of the Notch signaling pathway [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(4): 358-366.
- [17] 郭彩霞,于洪涛,石红梅,等. COX-2 基因对 TGF- β 1 诱导的人胚肺成纤维细胞生长及 Notch 信号通路的影响及其作用机制[J].中国比较医学杂志,2019,29(3):54-59.
- [18] 薄剑波,邵志翔,蔺广荣. Yes 相关蛋白 1 和胶原三股螺旋重复蛋白 1 在三阴性乳腺癌中的表达及其与 E-钙黏蛋白表达的相关性[J].肿瘤研究与临床,2019,31(1):11-15.
- [19] Zeng Z, Yin X, Zhang X, et al. Cyclic stretch enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation through the inhibition of Hey1 [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(5): 1273-1281.
- [20] 王南,谭涛,林端阳,等.过表达 NICD 通过下调基因 JunB 的表达抑制 BMP9 诱导间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化[J].重庆医科大学学报,2018,43(10):14-19.

光姣娜,左琴,魏杰,等. 应用微卫星技术比较两个实验小鼠群体遗传结构的差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 42-49.

Guang JN, Zuo Q, Wei J, et al. Genetic structure differences in different laboratory mouse populations analyzed by microsatellites [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 42-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.007

应用微卫星技术比较两个实验小鼠群体遗传结构的差异

光姣娜,左琴,魏杰,周佳琪,王洪*,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

【摘要】 目的 应用微卫星标记比较两个实验小鼠群体的遗传结构组成。**方法** 应用 36 个微卫星标记分析两个实验小鼠群体的遗传结构组成。从两个群体中各提取 38 份基因组 DNA,进行 PCR 扩增和基因测序,应用统计分析软件 PopGen1.32 和 Littleprogram0.6 计算两个群体的遗传结构参数。**结果** A 群的平均等位基因数为 2.4839,平均杂合度为 0.3376,平均多态性信息含量为 0.2875。B 群的平均等位基因数为 3.4839,平均杂合度为 0.4806,平均多态性信息含量为 0.4088。**结论** 两个实验小鼠群体的遗传结构组成存在差异,长期封闭繁育导致群体遗传结构发生改变。建议对封闭群实验动物种群进行定期的遗传结构监测,确保实验动物的遗传质量。

【关键词】 实验小鼠;遗传结构监测;微卫星标记;ddY

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0042-08

Genetic structure differences in different laboratory mouse populations analyzed by microsatellites

GUANG Jiaona, ZUO Qin, WEI Jie, ZHOU Jiaqi, WANG Hong*, YUE Bingfei*
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective The genetic structure composition of the ddY mouse population, which was bred in isolation for a long time, was compared with that of the newly introduced ddY mouse population by microsatellite analysis. **Methods** Thirty-six microsatellite loci were analyzed. Thirty-eight DNA samples were randomly collected from each of the two groups. The DNA samples were then amplified by PCR and the PCR products were sequenced. PopGen1.32 and Littleprogram0.6 were used to process the data. **Results** The average allele number of group A was 2.4839, the average heterozygosity was 0.3376, and the average polymorphism information content was 0.2875. Group B had an average allele number of 3.4839, average heterozygosity of 0.4806, and an average polymorphism information content of 0.4088. **Conclusions** The genetic structure of the two laboratory mouse populations was different, and closed breeding resulted in genetic structure changes in the populations. It is necessary to monitor the genetic structure of closed laboratory animal populations regularly to ensure the genetic quality of populations.

【Keywords】 laboratory mice; genetic structure monitoring; microsatellites; ddY

[基金项目] 国家科技重大专项(2017ZX10304402-002-006)。

[作者简介] 光姣娜(1995—),女,硕士研究生。研究方向:分子遗传学。E-mail: guangjn2018@126.com

[通信作者] 王洪(1977—),女,研究员,研究方向:实验动物遗传质量控制。E-mail: littstar@163.com

岳秉飞(1960—),男,研究员,博士。研究方向:动物遗传学。E-mail: y6784@126.com * 共同通信作者

ddY 小鼠是一种可自发出现多种疾病,具有较高建模成功率的实验小鼠,多种疾病包括肺癌,恶性淋巴瘤,卵巢癌,乳腺癌,以及自发性肾小球肾炎等^[1-3]。其中,ddY 小鼠自发性肾病的症状以及基因位点与肾小球肾炎患者的临床状况十分相似^[3]。由于具备其他品系实验小鼠没有的独特优势,ddY 小鼠已经成为应用前景良好的实验小鼠。

实验动物封闭群是指在不从外部引入新个体的条件下,至少连续繁殖 4 代以上的实验动物种群^[4]。封闭群实验动物的繁育特点有可能导致实验小鼠群体发生遗传漂变,突变或选择,进一步引起群体遗传结构的改变。遗传结构组成的变化会直接影响实验动物的表现型,直接决定实验结果的准确性、科学性和可比性。因此,定期对长期封闭繁育的封闭群实验动物群体进行遗传质量监测是非常必要的。

微卫星标记和 SNP 标记是广泛应用于大鼠、小鼠、兔、猫、小型猪等多种实验动物的遗传质量检测方法^[5-7]。相较于 SNP 技术,微卫星检测技术具有更丰富多态性,并且具有较好的保守性,其可以检测同一群体不同个体之间的遗传差异,以定量的方式精确展现实验动物的遗传状况^[8]。与 SNP 相比,采用较少的微卫星位点即可实现对封闭群小鼠的遗传质量检测。

本研究旨在应用微卫星技术监测两个 ddY 实验小鼠群体的遗传结构,分析长期封闭繁育对实验动物群体遗传结构的影响,探讨对封闭群实验动物群体进行定期遗传结构监测的必要性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

A 群:本单位 2013 年从日本脏器制药有限责任

公司引进的 ddY 小鼠,已在本单位屏障系统繁育 6 年。B 群:本单位 2019 年从日本脏器制药有限责任公司引进的 ddY 小鼠。从两个群体中各自随机选取 38 只,雌雄各半,SPF 级,28~30 g,8 周龄 ddY 小鼠的鼠尾 1~2 cm。

ddY 小鼠均于本单位屏障系统中繁育[SCXK(京)2017-0005]。小鼠取材操作于中国食品药品检定研究院动物实验设施内进行[SYXK(京)2017-0013]。所有实验操作均符合“3R”原则,经中国食品药品检定研究院动物福利伦理审查委员会审批(中检动(福)第 2019(A)001 号)。

1.2 主要试剂与仪器

100 bp DNA marker(批号:A2601A)和 PCR 反应试剂盒(批号:R007A)均购自 TaKaRa 公司;50' TAE Buffer(批号:F521KA1898)购自生工生物工程股份有限公司。

PCR 仪:Veriti 96 well Thermal cycler(美国 ABI 公司);电泳仪:Power Pac Basic(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像分析仪:GL 212 Pro(美国 Kodak 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取

酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测其完整性,纯度和浓度。所有 DNA 样本的 A260/280 均为 1.7~1.9,样品纯度合格;DNA 样本稀释到 50 ng/μL 作为 DNA 工作液,-20℃保存备用。

1.3.2 引物的选择

本实验采用的 36 个微卫星位点均来自本实验室前期研究成果^[9],文献中未注明的 6 个微卫星位点引物序列信息详见表 1。由北京擎科新业生物技术有限公司标记正向引物的 5' 端并合成引物。

表 1 6 个微卫星位点引物序列信息
Table 1 Primer sequence of six microsatellites loci

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequence	染色体位置 Chromosome	荧光标记 Fluorescence
D1Mit7	F: TGGTAGAGGAAGGTGCACG R: CAGGGGACTAGTACCACCA	1	FAM /
D2Nds3	F: CCAAGCTTCCTTGTGCAAGTA R: AAGCCCAAAGTCCATCAGTGG	2	TAMRA /
D3Mit21	F: AAGCTCTACAGCGGAAGCAC R: CTGGGGAGTTTCAGGTTTCCT	3	TAMRA /
D9Mit24	F: CCTTCTAAACACAGGCTTTTTGAG R: CTGATGATCACCTCATTTCTGAG	9	HEX /
D14Mit5	F: CACATGAACAGAGGGGCAG R: GTCATGAAGTGCCACCTTT	14	HEX /
D17Mit23	F: TCGAGCTGTTGAACGAAC R: CGGGAAGCATGGAATTTAA	17	FAM /

1.3.3 PCR 扩增与优化

20 μL PCR 反应体系: H₂O 13.8 μL, 10× Buffer 2 μL, dNTP Mixture 1 μL, 上下游引物各 1 μL, 样品 DNA 1 μL, Taq 酶 0.2 μL。PCR 扩增程序: 94℃, 5 min; 94℃, 30 s, 退火温度, 30 s, 72℃, 30 s, 35 个循环; 72℃, 7 min。其中不同引物的退火温度 (annealing temperature, T_m) 不同。扩增产物 5 μL 与 6× loading Buffer 1 μL 混匀上样, 用 2.5% 琼脂糖凝胶以 200 V, 30 min 进行电泳, 紫外凝胶成像仪拍照记录。

1.3.4 测序

PCR 扩增结果由北京擎科新业生物技术有限公司进行 STR 测序。

1.4 统计学方法

根据 STR 测序结果, 将数据转换为 AA, BB, AB 样格式, 应用 PopGen 1.32 软件分析两个群体的等

位基因数、有效等位基因数、期望杂合度、观测杂合度、平均杂合度以及香隆指数。通过等位基因数和各个等位基因频率在统计软件 Littleprogram 0.6 中计算多态性信息含量。用统计分析软件 SPSS 21 作独立样本 *t* 检验比较两个群体之间遗传结构参数的差异, 结果用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 两个群体遗传结构信息中单态性的微卫星位点

选取的 36 个微卫星位点均匀分布于小鼠所有染色体。其中有 5 个位点在 A 群和 B 群均为单态性位点, 另 5 个位点在 A 群中为单态性位点而在 B 群中为多态, 具体位点名称详见表 2。两个群体中均为单态的微卫星位点, 多态性欠佳, 在后续遗传结构的分析中不予采纳。

表 2 36 个微卫星位点名称和相关信息
Table 2 36 microsatellite loci and their related information

序号 No.	位点 Locus	退火温度 (℃) Temp	等位基因范围 Allele range	荧光标记 Fluorescence
1	D1Mit365	54	100	HEX
2	D2Mit15	54	150~200	FAM
3	D3Mit29	64	150	FAM
4	D4Mit235▲	55	100	FAM
5	D5Mit48▲	57	200	HEX
6	D6Mit102	54	150~200	FAM
7	D7Mit281	60	100~150	FAM
8	D8Mit33	60	200	HEX
9	D9Mit23	65	200	HEX
10	D10Mit12	54	200~250	HEX
11	D11Mit4	59	250~300	TAMRA
12	D12Mit7▲	60	100	FAM
13	D13Mit3	57	200	HEX
14	D14Mit5	66	200	HEX
15	D15Mit5▲	54	100	FAM
16	D16Mit9	55	100~150	HEX
17	D17Mit11	54	150~200	FAM
18	D18Mit19	55	100~150	HEX
19	D19Mit16	54	100~150	FAM
20	DXMit16	58	100	HEX
21	D1Mit7	60	100	FAM
22	D2Nds3▲▲	62	250	TAMRA
23	D3Mit21▲	60	200~250	TAMRA
24	D6Mit8	62	200	TAMRA
25	D6Mit15▲▲	60	200~250	TAMRA
26	D7Mit12▲▲	58	200	TAMRA
27	D8Mit14	63	150	FAM
28	D9Mit21	59	200	TAMRA
29	D9Mit24	60	150	HEX
30	D12Nds11	54	200	TAMRA
31	D14Mit3	54	200~250	TAMRA
32	D15Mit15	60	150	TAMRA
33	D17Mit23▲▲	54	150	FAM
34	D17Nds3	58	100~150	HEX
35	D18Mit9▲▲	60	150~200	TAMRA
36	D19Mit3	60	200	TAMRA

注: ▲▲: 该位点在 A 群和 B 群均为单态; ▲: 该位点在 A 群中为单态而在 B 群为多态。
Note. ▲▲, The site is monomorphic in groups A and B. ▲, This site is monomorphic in group A, while polymorphic in group B.

2.2 PCR 反应条件退火温度的优化

以初选退火温度 (annealing temperature, T_m) 对样本进行 PCR 扩增,30 个位点得到特异性扩增,6 个位点出现非特异扩增条带。后续优化这 6 个位点的退火温度: D5Mit48 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 57^{\circ}\text{C}$), D11Mit4 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 59^{\circ}\text{C}$), D13Mit3 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 57^{\circ}\text{C}$), D6Mit8 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 62^{\circ}\text{C}$), D15Mit15 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 60^{\circ}\text{C}$), D19Mit3 ($52^{\circ}\text{C} \rightarrow 57^{\circ}\text{C}$),使之均扩增出理想条带。以 D6Mit8 为例, T_m 值为 60°C 时凝胶图谱有非特异性扩增条带 (图 1)。将 T_m 值分别做 60°C , 61°C , 62°C 梯度,结果发现产物特异性逐渐变好。图 2 是优化后 A 群 38 个样本在 D6Mit8 位点上的凝胶图。

2.3 STR 测序结果

STR 测序通过检测 DNA 的具体长度,精确区分相差 1 bp 的 DNA 片段并以不同峰型显示结果^[10]。图 3 为 A 群 1 号样本扩增产物在 D4Mit235 和 D7Mit281 位点上的 STR 测序结果。其中 D4Mit235

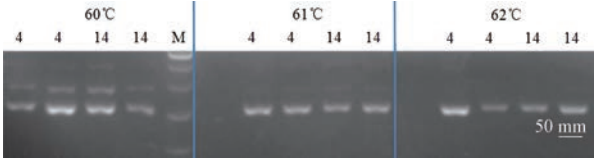
位点上为单峰,属于纯合 (图 3A);而 D7Mit281 位点上则为双峰,属于杂合 (图 3B)。

2.4 两个实验小鼠群体的遗传结构信息

遗传结构参数可定量的体现实验动物群体的遗传结构组成。去除 2.1 表 2 中两个群体均为单态的 5 个位点后,利用 31 个微卫星位点分析两个群体的遗传结构参数。表 3 和表 4 分别是 A 群和 B 群的遗传结构参数分析结果。统计分析结果如表 5 所示,除有效等位基因数外,两组在其余遗传参数均有显著差异。

3 讨论

本实验应用 31 个多态性良好的微卫星位点进行扩增和测序后分析发现,ddY 小鼠两个群体的观测杂合度、期望杂合度、平均杂合度、等位基因数、多态性信息含量、香隆指数均有显著差异。平均杂合度是反映群体遗传多样性的重要遗传指标,若封闭群杂合度为 0.5~0.7,则说明封闭群遗传质量好^[11]。A 群和 B 群平均杂合度分别是 0.338 和 0.481。统计结果显示两组在杂合度方面有显著差异 ($P<0.01$),表明两个群体遗传杂合度均较低,但相较于 A 群,B 群 ddY 小鼠遗传多样性更丰富。等位基因数是指同一微卫星位点上不同等位基因的数量^[12],等位基因与有效等位基因数越接近,则该群体内的等位基因分布越均匀,遗传一致性越高^[12]。A 群平均等位基因数和平均有效等位基因数分别是 2.484 和 1.743;B 群平均等位基因数和平均有效等位基因数为 3.484 和 2.130。这种等位基因数和有效等位基因数出现偏差的现象在吴盈萍等^[12]、万倩倩等^[13]关于伊犁鹅的研究中也有出现,

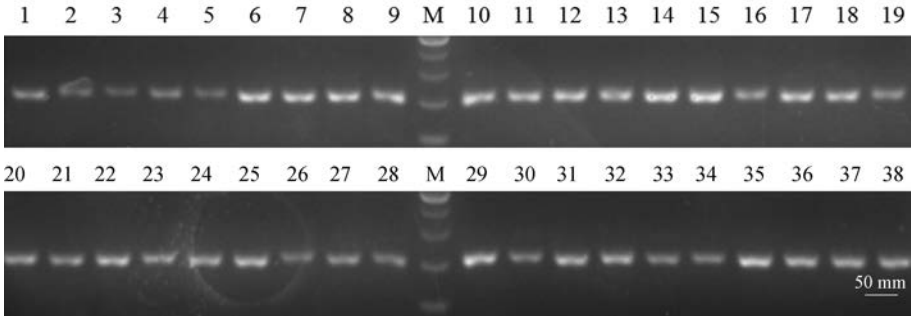


注:4;A 群体中 4 号样品在 T_m 分别为 60°C , 61°C , 62°C 时的凝胶图;14;A 群体中 14 号样品在 T_m 分别为 60°C , 61°C , 62°C 时的凝胶图;M:100 bp DNA Marker。

图 1 不同退火温度条件下的 D6Mit8 微卫星位点 PCR 结果电泳图

Note. 4, Results of No.4 in group A when T_m was 60°C , 61°C and 62°C , respectively. 14, Results of No.14 in group A when T_m was 60°C , 61°C and 62°C , respectively. M, 100 bp DNA Marker.

Figure 1 Electrophoresis of PCR products at site D6Mit8 at different annealing temperatures



注:1~38;A 群体 ddY 小鼠 DNA 样本号;M:100 bp DNA Marker,分子量从大至小依次为 500、400、300、200、100 bp。

图 2 退火温度为 62°C 时 A 群体 38 个样本在 D6Mit8 微卫星位点上的凝胶图谱

Note. 1~38, Numbers of ddY mice genomic DNA in group A. M, 100 bp DNA marker (500, 400, 300, 200, and 100 bp).

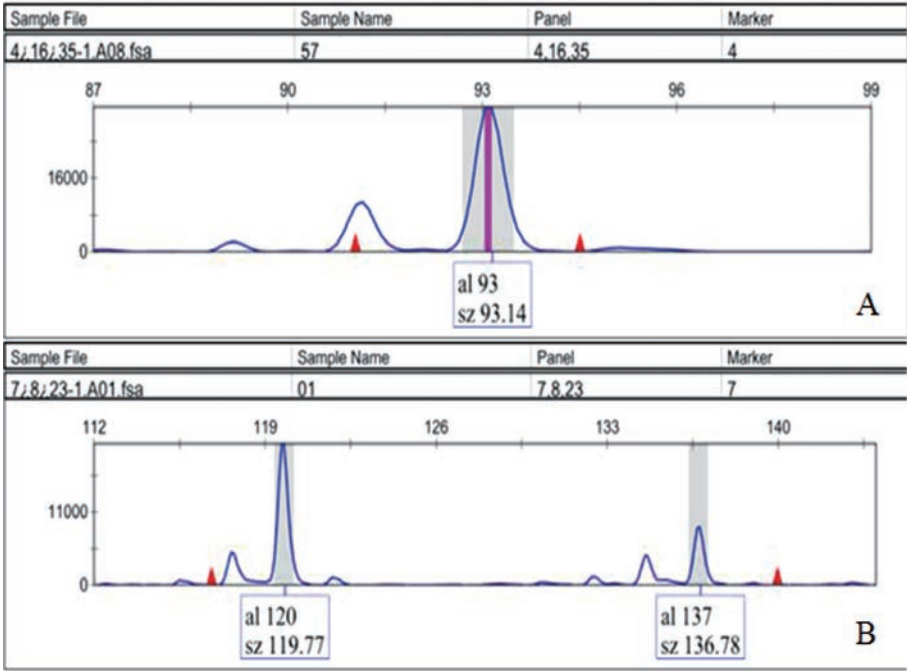
Figure 2 Gel map of 38 samples from group A at site D6Mit8 at the annealing temperature of 62°C

可能由封闭群动物的定向选育,群体规模缩小,遗传多样性降低导致。多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 主要用于评估微卫星位点用于研究群体多态性的价值,是与等位基因数目和等位基因频率相关的直观表现遗传多态性的遗传参数^[14], PIC>0.5 表示高度多态, 0.25<PIC<0.5 表示中度多态, PIC<0.25 表示低度多态^[15]。A 群 PIC 的平均数为 0.287, B 群为 0.4088。虽然两个封闭实验动物群体都处于中度多态,但多态性信息含量有显著差异($P<0.01$)。由此可见,ddY 小鼠在繁育过程中未能完全实现随机交配,以致近交程度升高。

微卫星标记,又称短串联重复序列,由 2~6 bp 重复碱基核心序列和侧翼序列组成,微卫星序列的重复碱基通常有数个到数十个拷贝,具有多态性丰富、保守性好、易操作和实用性强^[16]等优点,是国际实验动物学会(ICLAS)^[17]和实验动物国家标准 GB 14923-2010 推荐研究群体遗传结构组成和遗传多样性的重要工具^[9, 18]。近年来,美国杰克逊实验室和 Charles River 实验室均采用微卫星方法对实验动物质量进行监测,国内也有很多研究者筛选出不同组微卫星位点监测不同品系小鼠,大鼠,兔,小型猪

等实验动物以及伊犁鹅,坡鹿等畜牧动物的遗传质量^[19-21]。为使一组微卫星位点尽可能完整体现特定实验动物群体的遗传多样性,我们需对微卫星位点进行筛选和优化。参考王洪等^[9]和 Barker (1994)提出的建议,初步筛选均匀分布于小鼠所有染色体的微卫星位点。多个群体内均为单态的微卫星位点不能体现群体的遗传多样性,可提供的遗传信息含量很少,属于群体间保守位点,常用于鉴别不同近交系实验动物^[22-24]。本实验旨在分析 ddY 小鼠 A 群体和 B 群体的遗传结构组成及遗传多样性是否有明显差异。因此,在后续的遗传结构分析中,剔除两个群体均为单态的 5 个微卫星位点,保证实验数据的可靠性。

实验中的 STR 测序是通过毛细管电泳检测 DNA 片段通过激光扫描窗口的实际时间而计算出 DNA 片段长度^[25]。非特异性扩增条带会影响 STR 测序结果甚至导致 STR 测序结果出现错误。在进行 STR 测序之前,确保 PCR 扩增出特异性良好的条带对实验结果准确性至关重要,而退火温度是 PCR 扩增结果最主要的影响因子。本实验通过优化退火条件使 PCR 扩增出理想条带,为 STR 测序实验结果准确性提供了先决条件。



注:A;D4Mit235 位点;B;D7Mit281 位点;横坐标为 DNA 片段长度;纵坐标为波峰高度。

图 3 D4Mit235 和 D7Mit281 位点的 STR 测序图谱

Note. A, Locus D4Mit235, B, Locus D7Mit281, X-axis is DNA length, Y-axis is peak height.

Figure 3 STR sequencing results of locus D4Mit235 and D7Mit281

表 3 实验小鼠 A 群的遗传结构参数
Table 3 Genetic structure parameters of laboratory mice group A

序号 No.	微卫星 位点 Locus	等位基 因数 Na	有效等位 基因数 Ne	观测杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	平均杂合度 Ave_Het	香隆指数 I	多态信息 含量 PIC	哈代温 伯格平衡 HWE
1	D1Mit365	2	1. 871	0. 474	0. 472	0. 465	0. 658	0. 357	$P>0. 05$
2	D2Mit15	3	1. 581	0. 29	0. 372	0. 367	0. 598	0. 309	$P>0. 05$
3	D3Mit29	4	2. 097	0. 421	0. 53	0. 523	0. 998	0. 484	$P<0. 01$
4	D4Mit235	1	1	0	0	0	0	0	单态性 Monomor phism
5	D5Mit48	1	1	0	0	0	0	0	单态性 Monomor phism
6	D6Mit102	2	1. 232	0. 211	0. 191	0. 188	0. 337	0. 171	$P>0. 05$
7	D7Mit281	2	1. 761	0. 526	0. 438	0. 432	0. 624	0. 339	$P>0. 05$
8	D8Mit33	5	3. 877	0. 5	0. 752	0. 742	1. 41	0. 696	$P<0. 01$
9	D9Mit23	3	1. 929	0. 474	0. 488	0. 482	0. 841	0. 433	$P>0. 05$
10	D10Mit12	2	1. 894	0. 5	0. 478	0. 472	0. 665	0. 361	$P>0. 05$
11	D11Mit4	4	1. 558	0. 158	0. 363	0. 358	0. 631	0. 311	$P<0. 01$
12	D12Mit7	1	1	0	0	0	0	0	单态性 Monomor phism
13	D13Mit3	3	1. 175	0. 158	0. 151	0. 149	0. 331	0. 143	$P>0. 05$
14	D14Mit5	2	1. 845	0. 342	0. 464	0. 458	0. 651	0. 353	$P>0. 05$
15	D15Mit5	1	1	0	0	0	0	0	单态性 Monomor phism
16	D16Mit9	2	1. 232	0. 211	0. 191	0. 188	0. 337	0. 171	$P>0. 05$
17	D17Mit11	2	1. 027	0. 026	0. 026	0. 026	0. 07	0. 026	$P>0. 05$
18	D18Mit19	2	1. 819	0. 474	0. 456	0. 45	0. 642	0. 349	$P>0. 05$
19	D19Mit16	3	2. 389	0. 737	0. 589	0. 581	0. 976	0. 514	$P>0. 05$
20	DXMit16	4	2. 27	0. 342	0. 567	0. 56	1. 008	0. 503	$P<0. 01$
21	D1Mit7	2	1. 845	0. 395	0. 464	0. 458	0. 651	0. 353	$P>0. 05$
22	D3Mit21	1	1	0	0	0	0	0	单态性 Monomor phism
23	D6Mit8	2	1. 995	0. 316	0. 505	0. 499	0. 692	0. 374	$0. 01<P<0. 05$
24	D8Mit14	3	1. 904	0. 5	0. 481	0. 475	0. 715	0. 374	$P>0. 05$
25	D9Mit21	3	1. 651	0. 421	0. 4	0. 394	0. 629	0. 326	$P>0. 05$
26	D9Mit24	2	1. 362	0. 211	0. 27	0. 266	0. 436	0. 231	$P>0. 05$
27	D12Nds11	3	1. 667	0	0. 406	0. 4	0. 662	0. 339	$P<0. 01$
28	D14Mit3	2	1. 667	0. 237	0. 405	0. 4	0. 589	0. 32	$P<0. 01$
29	D15Mit15	2	1. 17	0. 158	0. 147	0. 145	0. 276	0. 135	$P>0. 05$
30	D17Nds3	6	4. 971	0. 974	0. 81	0. 799	1. 675	0. 769	$P<0. 01$
31	D19Mit3	2	1. 232	0. 158	0. 191	0. 188	0. 337	0. 171	$P>0. 05$
均值 Mean	/	2. 484	1. 743	0. 297	0. 342	0. 338	0. 562	0. 287	/
标准差 St.Dev	/	1. 18	0. 835	0. 236	0. 226	0. 223	0. 401	0. 198	/

本研究中 ddY 实验小鼠两个群体的遗传结构参数存在显著差异。研究结果表明,经过长期封闭繁育,实验小鼠 A 群体的遗传结构已经发生改变。本单位 2019 年引进的 ddY 实验小鼠 B 群的群体遗传多样性更丰富,更符合封闭群实验动物群体的遗传结构特征。因此,长期封闭繁育的实验动物群体应定期进行遗传质量监测,保证群体遗传结构的稳定性,从而确保动物实验结果的准确性、重复性和科学性。

表 4 实验小鼠 B 群的遗传结构参数

Table 4 Genetic structure parameters of laboratory mice group B

序号 No.	微卫星 位点 Locus	等位基 因数 Na	有效等位 基因数 Ne	观测杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	平均杂合度 Ave_Het	香隆指数 I	多态信息 含量 PIC	哈代温 伯格平衡 HWE
1	D1Mit365	3	2. 010	0. 711	0. 509	0. 502	0. 743	0. 389	$P>0. 05$
2	D2Mit15	3	1. 236	0. 211	0. 193	0. 191	0. 376	0. 177	$P>0. 05$
3	D3Mit29	5	1. 945	0. 290	0. 492	0. 486	1. 001	0. 458	$P<0. 01$
4	D4Mit235	2	1. 396	0. 290	0. 287	0. 284	0. 458	0. 243	$P>0. 05$
5	D5Mit48	4	2. 413	0. 526	0. 593	0. 586	1. 071	0. 530	$0. 01<P<0. 05$
6	D6Mit102	5	1. 352	0. 211	0. 264	0. 260	0. 576	0. 249	$P>0. 05$
7	D7Mit281	2	1. 978	0. 474	0. 501	0. 495	0. 688	0. 372	$P>0. 05$
8	D8Mit33	4	2. 719	0. 684	0. 641	0. 632	1. 084	0. 559	$P>0. 05$
9	D9Mit23	5	2. 407	0. 684	0. 592	0. 585	1. 029	0. 497	$P<0. 01$
10	D10Mit12	2	1. 995	0. 421	0. 505	0. 499	0. 692	0. 374	$P>0. 05$
11	D11Mit4	4	2. 031	0. 474	0. 514	0. 508	0. 848	0. 423	$P>0. 05$
12	D12Mit7	2	1. 082	0. 079	0. 077	0. 076	0. 166	0. 073	$P>0. 05$
13	D13Mit3	5	2. 714	0. 421	0. 640	0. 632	1. 169	0. 569	$P>0. 05$
14	D14Mit5	2	2. 000	0. 947	0. 507	0. 500	0. 693	0. 375	$P<0. 01$
15	D15Mit5	4	1. 932	0. 605	0. 489	0. 482	0. 941	0. 451	$P>0. 05$
16	D16Mit9	2	1. 264	0. 132	0. 212	0. 209	0. 364	0. 187	$0. 01<P<0. 05$
17	D17Mit11	2	1. 498	0. 421	0. 337	0. 332	0. 515	0. 277	$P>0. 05$
18	D18Mit19	3	2. 307	0. 790	0. 574	0. 567	0. 911	0. 472	$P<0. 01$
19	D19Mit16	3	2. 604	0. 553	0. 624	0. 616	1. 026	0. 546	$P>0. 05$
20	DXMit16	7	3. 406	0. 553	0. 716	0. 706	1. 421	0. 657	$P<0. 01$
21	D1Mit7	2	1. 978	0. 579	0. 501	0. 495	0. 688	0. 372	$P>0. 05$
22	D3Mit21	2	1. 995	0. 526	0. 505	0. 499	0. 692	0. 374	$P>0. 05$
23	D6Mit8	3	2. 035	0. 895	0. 515	0. 509	0. 750	0. 392	$P<0. 01$
24	D8Mit14	2	1. 966	0. 553	0. 498	0. 491	0. 685	0. 371	$P>0. 05$
25	D9Mit21	5	2. 155	0. 658	0. 543	0. 536	0. 984	0. 473	$P<0. 01$
26	D9Mit24	3	1. 344	0. 237	0. 259	0. 256	0. 498	0. 237	$P>0. 05$
27	D12Nds11	4	2. 790	0. 658	0. 650	0. 642	1. 105	0. 573	$P>0. 05$
28	D14Mit3	2	1. 999	0. 605	0. 506	0. 500	0. 693	0. 375	$P>0. 05$
29	D15Mit15	5	2. 458	0. 658	0. 601	0. 593	1. 034	0. 508	$P>0. 05$
30	D17Nds3	9	5. 289	0. 816	0. 822	0. 811	1. 819	0. 785	$P>0. 05$
31	D19Mit3	2	1. 730	0. 395	0. 428	0. 422	0. 613	0. 333	$P>0. 05$
均值 Mean	/	3. 484	2. 130	0. 518	0. 487	0. 481	0. 817	0. 409	/
标准差 St.Dev	/	1. 691	0. 785	0. 218	0. 164	0. 162	0. 332	0. 150	/

表 5 两个实验小鼠群体遗传结构参数的比较

Table 5 Comparison of genetic structure parameters of group A and group B

遗传结构参数 Parameter	群体 Groups	
	A	B
等位基因数 Na	2. 48±1. 18 ^a	3. 48±1. 69 ^a
有效等位基因数 Ne	1. 74±0. 83	2. 13±0. 78
观测杂合度 Obs_Het	0. 30±0. 24 ^a	0. 52±0. 22 ^a
期望杂合度 Exp_Het	0. 34±0. 23 ^a	0. 49±0. 16 ^a
平均杂合度 Ave_Het	0. 34±0. 22 ^a	0. 48±0. 16 ^a
香隆指数 I	0. 56±0. 4 ^a	0. 82±0. 33 ^a
多态信息含量 PIC	0. 29±0. 2 ^a	0. 41±0. 15 ^a

注:a:该项遗传结构参数在两个群体之间有显著差异,即 $P<0. 01$ 。
Note. a, There is a significant difference in the genetic structure parameter between the two groups ($P<0. 01$).

参考文献:

- [1] Chino F, Sato F, Sasaki S. Retrovirus particles in spontaneously occurring and radiation-induced tumors in ddY mice [J]. Acta Patholog Japon, 1981, 31(2): 233-247.
- [2] Suzuki H, Suzuki Y. Murine models of human IgA nephropathy [J]. Seminars in Nephrol, 2018, 38(5): 513-520.
- [3] Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, et al. Genome-wide scan in a novel IgA nephropathy model identifies a susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human IGAN1 on chromosome 6q22-23 [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(5): 1289-1299.
- [4] 蔡磊, 李建军, 余露军, 等. 鱼类实验动物封闭群和近交系资源培育现状 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 108-114.
- [5] Chang WH, Chu HP, Jiang YN, et al. Genetic variation and phylogenetics of Lanyu and exotic pig breeds in Taiwan analyzed by nineteen microsatellite markers [J]. J Anim Sci, 2009, 87(1): 1-8.
- [6] Islam MR, Zhang Y, Li ZZ, et al. Genetic diversity, population structure, and historical gene flow of Nelumbo lutea in USA using microsatellite markers [J]. Aquatic Botany, 2020, 160(10): 31-62.
- [7] Charoensook R, Gatphayak K, Brenig B, et al. Genetic diversity analysis of Thai indigenous pig population using microsatellite markers [J]. Asian-Australas J Anim, 2019, 32(10): 1491-1500.
- [8] 陈丙波, 张聪, 王根, 等. DNA 分子标记在实验动物遗传分析中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(10): 70-74.
- [9] 王洪, 魏杰, 冯育芳, 等. 实验小鼠、大鼠微卫星 DNA 检测法标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 97-102.
- [10] 王洪, 杜小燕, 徐平, 等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 27-32.
- [11] 刘先菊, 滕永康, 丛日旭, 等. 雪貂微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 43-48.
- [12] 吴盈萍, 高凤, 彭箫, 等. 利用微卫星标记分析伊犁鹅的保种效果 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(6): 1746-1755.
- [13] 方倩倩, 刘雅丽, 李祥龙, 等. 利用微卫星标记技术分析太湖鹅保种效果 [J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(12): 19-24.
- [14] 信超. 基于 COI 和微卫星的中国沼泽山雀种群分化和遗传多样性研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2015.
- [15] 张烨华, 王立民, 王聪慧, 等. 6 个绵羊品种微卫星多态性分析 [J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2015, 33(5): 558-562.
- [16] 王洪, 戴方伟, 王静, 等. 实验动物遗传质量控制微卫星标记检测法重复性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 84-89, 118.
- [17] Fahey JR, Katoh H, Malcolm R, et al. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research [J]. Mamm Genome, 2013, 24(3-4): 89-94.
- [18] 贾松华. 实验用猫 SNP 位点和微卫星标记遗传检测方法的建立及初步应用 [D]. 中国食品药品检定研究院, 2019.
- [19] 陈振文, 欧阳兆和, 王承利, 等. 用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析 [C]. 中国实验动物学会第六届学术年会, 杭州, 2004.
- [20] 李慧明, 陈兴永, 陈金平, 等. 一种用于坡鹿亲子鉴定的 SSR 荧光标记引物和鉴定方法, CN111662989A [P]. 2020-09-15.
- [21] 孙瑞萍, 魏立民, 晁哲, 等. 一种封闭群五指山小型猪遗传质量检测的方法, CN106755417B [P]. 2020-08-25.
- [22] 黄建芳, 李小楷, 蒋钦杨, 等. 广西巴马小型猪近交群体的遗传结构分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(2): 426-431.
- [23] 李银银, 吴绍亮, 王洪, 等. 微卫星 DNA 分析国内 24 个近交系小鼠遗传状况 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 43-49.
- [24] 孙芳园, 王越甲, 杨炜峰, 等. 大小鼠微卫星和 SNP 遗传检测的研究进展 [J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 60-65.
- [25] 赵丽丽, 陆涛峰, 张晓萍, 等. 无特定病原体金定鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 299-303.

[收稿日期] 2020-04-14

莫国艳,韩祥志,穆丹丹,等. 石榴补血糖浆对 Wistar 大鼠贫血症影响的探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 50-56.
Mo GY, Han XZ, Mu DD, et al. Effect of pomegranate blood-enriching syrup on anemia in Wistar rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 50-56.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.008

石榴补血糖浆对 Wistar 大鼠贫血症影响的探究

莫国艳¹, 韩祥志², 穆丹丹², 董雨薇², 韩林涛^{1*}, 黄芳¹, 尹强^{2*}

(1.湖北中医药大学,武汉 430065; 2.新疆维吾尔药业有限责任公司,乌鲁木齐 830026)

【摘要】 目的 探究石榴补血糖浆对 Wistar 大鼠贫血症的影响。**方法** 通过喂食 Wistar 大鼠低铁饲料并辅以少量尾静脉放血建立血虚模型。造模成功后大鼠随机分为模型组,石榴补血糖浆高、中、低剂量组和阳性药物组,另设空白对照组,各组给予相应的干预措施。在第 10 天和第 20 天采血测定血常规;在第 20 天处死大鼠,采集血液和骨髓,测量血清中促红细胞生成素(EPO)含量,检测骨髓内有核细胞数量和有核细胞中干细胞因子(SCF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的核酸和蛋白表达。**结果** 各石榴补血糖浆组相较于模型组临床症状有所缓解,死亡率降低,外周血细胞增多,血清中 EPO 含量降低。中剂量组与模型组相比,骨髓有核细胞数增加,且有核细胞中 SCF、GM-CSF 的核酸和蛋白表达水平升高。**结论** 石榴补血糖浆对 Wistar 大鼠贫血症有明显的缓解作用。

【关键词】 石榴补血糖浆;复方阿胶浆;硫酸亚铁;促红细胞生成素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0050-07

Effect of pomegranate blood-enriching syrup on anemia in Wistar rats

MO Guoyan¹, HAN Xiangzhi², MU Dandan², DONG Yuwei², HAN Lintao^{1*}, HUANG Fang¹, YIN Qiang^{2*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China.
2. Xinjiang Uygur Pharmaceutical Co., Ltd., Urumqi 830026)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pomegranate blood-enriching syrup on anemia in Wistar rats. **Methods** An anemia model was established in rats by feeding a low-iron diet. Different doses of pomegranate blood-enriching syrup were then given for 20 consecutive days. Blood samples were taken on the 10th day for routine blood analysis. On the 20th day, rats were euthanized and blood and organs were collected. Serum erythropoietin (EPO) levels and the number of nucleated cells were determined. Nucleic acid and protein levels of stem cell factor (SCF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in bone marrow mesenchymal stem cells were detected. **Results** The clinical symptoms of the different pomegranate blood-enriching syrup dose groups were relieved compared with those of the model group. Mortality was reduced and the number of peripheral blood cells increased. Serum EPO levels were decreased. Compared with the model group, the number of nucleated cells in the bone marrow and the levels of SCF and GM-CSF in the medium dose group were increased. **Conclusions** Pomegranate blood-enriching syrup has a clear therapeutic effect on anemia in Wistar rats.

【Keywords】 pomegranate blood-enriching syrup; compound donkey-hide gelatin; ferrous sulfate; erythropoietin

[基金项目] 国家重大专项(2018ZX09303-201);新疆维吾尔自治区重大科技专项(2016A03005-2)。
[作者简介] 莫国艳(1976—),女,硕士,副研究员,研究方向:天然药物的作用机制研究。E-mail:314788001@qq.com
[通信作者] 尹强(1981—),男,硕士,教授,研究方向:生物医药/新药研发及产业化。E-mail:yinqiang@renfu.com.cn
韩林涛(1976—),男,博士,研究员,研究方向:中药物质基础研究。E-mail:hanlt711@163.com * 共同通信作者

血虚症指血液亏虚,形体失养,以面色淡白,唇舌色淡,心悸多梦,手足发麻,等为常见证候。与西医中的红细胞生成减少性贫血,失血性贫血,红细胞破坏过多性贫血等疾病相对应。铁是形成血红蛋白的必需元素,血红蛋白是合成血红蛋白的原料,含铁元素蔗糖溶液或复方硫酸亚铁叶酸片对贫血,尤其是对妇女妊娠期或产后贫血有良好的恢复作用^[1-2]。复方阿胶浆是一种纯中药制剂,有气血双补的功效,临床上主要应用于治疗各种贫血、经期保健等^[3-4]。石榴补血糖浆以石榴为其主要组成成分,具有补气血的作用,可用于治疗气血亏虚所致的心悸、气短、头晕、贫血、健忘等症。本研究所用石榴补血糖浆是经国家药监局批准,由新疆维吾尔自治区药业有限责任公司生产。石榴补血糖浆以酸石榴和甜石榴为主要原料,性味酸、甘,是补血、生血良药。酸石榴:血液质调节药,降低肝之热,清心安神。甜石榴:补心药,功能生湿生寒,清热补心,补肝壮阳。实验中用复方阿胶浆和硫酸亚铁作为对照,采用灌胃的方法,来探讨石榴补血糖浆对血虚证模型大鼠造血功能的影响及其相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 4 周龄 Wistar 雄性大鼠 35 只,体重 160~200 g,来源于湖北省疾控中心[SCXK(鄂)2017-0012]。无菌手术在武汉华联科生物技术有限公司动物实验中心屏障动物实验设施进行[SYXK(鄂)2018-0104]。实验经过武汉华联科生物技术有限公司动物实验中心伦理委员会批准(HLK-20181211-01),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

复方阿胶浆购自东阿阿胶股份有限公司,国药准字 Z20083345,批号:1708005;硫酸亚铁购自阿拉丁公司,CAS 号:7782-63-0,批号:lot.#E1815087;石榴补血糖浆购自新疆维吾尔自治区药业有限责任公司,国药准字 Z20026094,批号:0180411;EPO ELISA 检测试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司,货号:MU30110;兔抗 SCF 抗体、兔抗 GM-CSF 抗体、兔抗 GAPDH 抗体、羊抗兔二抗 IgG 购自 Thermo 公司,货号分别为:26582-1-AP、PAB34381、PAB36264、PAB160011;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 bioswamp 公司(货号:PAB180007);SYBR Green

PCR 试剂盒购自 KAPA Biosystems 公司,货号:KM4101。

酶标仪:芬兰(Labsystems Multiskan MS)公司产品,型号:352 型;全自动化学发光分析仪:上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200;全自动血液分析仪:美国 MASCOT 公司,型号:HEMAVET 950;荧光定量 PCR 仪:美国 Bio-Rad 公司,型号:CFX-Connect 96。

1.3 实验方法

1.3.1 动物建模

将大鼠随机分为 7 组,1 个对照组和 6 个实验组。对照组喂食普通饲料,实验组喂食低铁饲料,喂食 4 周,并辅以少量尾静脉放血(每周放血一次,每次 1~1.5 mL)建立缺铁性贫血模型。6 个实验组分为模型组、石榴补血糖浆低剂量组 3.125 mL/(kg·d)、中剂量组 9.375 mL/(kg·d)、高剂量组 28.125 mL/(kg·d)、复方阿胶浆组 6.25 mL/(kg·d)、硫酸亚铁组 0.27 mL/(kg·d),给药周期为 20 d,每天灌胃给药,每 10 d 采集大鼠全血一次,用于血象指标的检测。给药结束时,采血分离血清,并采集两侧胫骨。

1.3.2 外周血象分析

在给药的第 0、10、20 天,采血测定血象指标:红细胞数目、白细胞计数,血小板计数,血红蛋白浓度以及红细胞比容。

1.3.3 大鼠骨髓有核细胞分离

依据鄢星等^[5]方法,取小鼠双侧股骨,剪开股骨暴露出骨髓腔,用 2 mL 培养液冲洗骨髓腔,收集细胞。

1.3.4 ELISA 检测促红细胞生成素(EPO)

96 孔板每孔加血清 40 μ L,加生物素标记的 EPO 抗体 10 μ L,混匀,再加辣根过氧化物酶结合物,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,洗涤 5 次,每孔分别加显色液 A 和显色液 B 各 50 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,每孔加终止液 50 μ L,在酶标仪 450 nm 处读数。

1.3.5 Real-time PCR 检测骨髓有核细胞 SCF、GM-CSF 核酸表达

提取骨髓有核细胞内 RNA,逆转录成 cDNA,再进行 Real-time PCR 扩增,扩增体系如下:SYBR Green Mix 10 μ L,上、下游引物 0.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L,ddH₂O 8 μ L,总体积 20 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C,3 min;95 $^{\circ}$ C,5 s;56 $^{\circ}$ C,10 s;72 $^{\circ}$ C,25 s;39 cycles;65 $^{\circ}$ C,5 s;95 $^{\circ}$ C,50 s。以 GAPDH 作为内参,结果采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行分析。引物序列见表 1。

1.3.6 Western blot 检测骨髓有核细胞 SCF、GM-CSF 蛋白表达

将细胞裂解,离心后取上清进行蛋白质浓度测定。然后用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶进行蛋白质电泳、90 V 转膜 50 min、5% 脱脂奶粉封闭 2 h、孵育兔抗大鼠 SCF 抗体(1:1000 稀释)、兔抗大鼠 GM-CSF 抗体(1:2000 稀释)、兔抗大鼠 GAPDH 抗体(1:2000 稀释),37℃ 孵育 2 h,洗涤 3 次,加羊抗兔二抗 IgG(1:20000 稀释)37℃ 孵育 1 h,洗涤 3 次,暗室中与 ECL 发光液充分接触,于全自动化学发光分析仪中检测。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,结果采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad prism 6 软件制作统计图。

表 1 Real-time PCR 检测引物序列
Table 1 Real-time PCR Primer sequence

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	大小(bp) Size
SCF-F	TTGTTGGCTACGAGA	138
SCF-R	AACACGAGGTCATCC	
GM-CSF-F	TGGGCATTGTGCTCT	199
GM-CSF-R	ATCTTCAGGCGGGTC	
GAPDH-F	CCTTCCGTGTTCTCTAC	152
GAPDH-R	GACAACCTGGTCTCTCA	

2 结果

2.1 石榴补血糖浆对大鼠存活率的影响

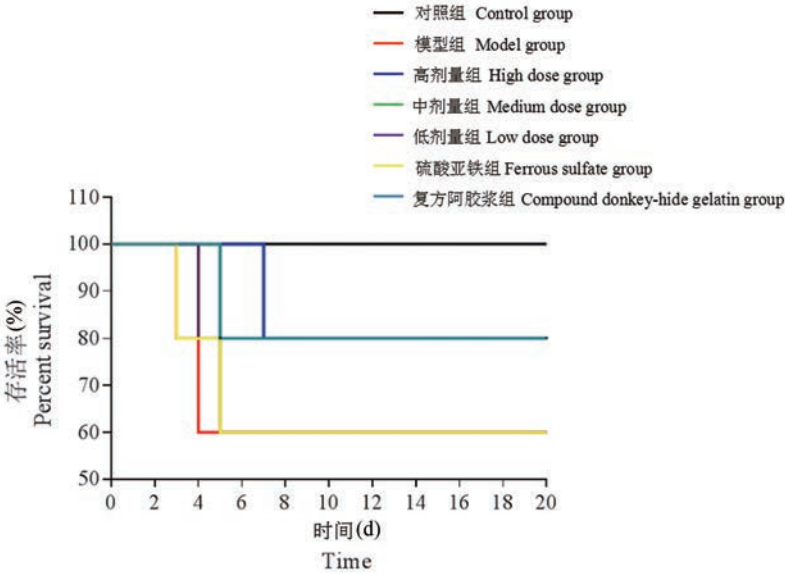
饲喂低铁饲料 4 周后,大鼠出现精神萎靡,可视粘膜苍白症状。存活率情况见图 1。在连续给药 20 d 后,石榴补血糖浆高、中、低组、硫酸亚铁组和复方阿胶浆组,临床症状消失。模型组在连续观察期的第 2、3、4 天各有一只大鼠死亡;石榴补血糖浆高剂量组在第 7 天死亡一只;中剂量组在第 5 天死亡一只;低剂量组在第 4、5 天各死亡一只;硫酸亚铁组在第 3、5 天各死亡一只;复方阿胶浆组在第 5 天死亡一只。

2.2 石榴补血糖浆对大鼠血象的影响

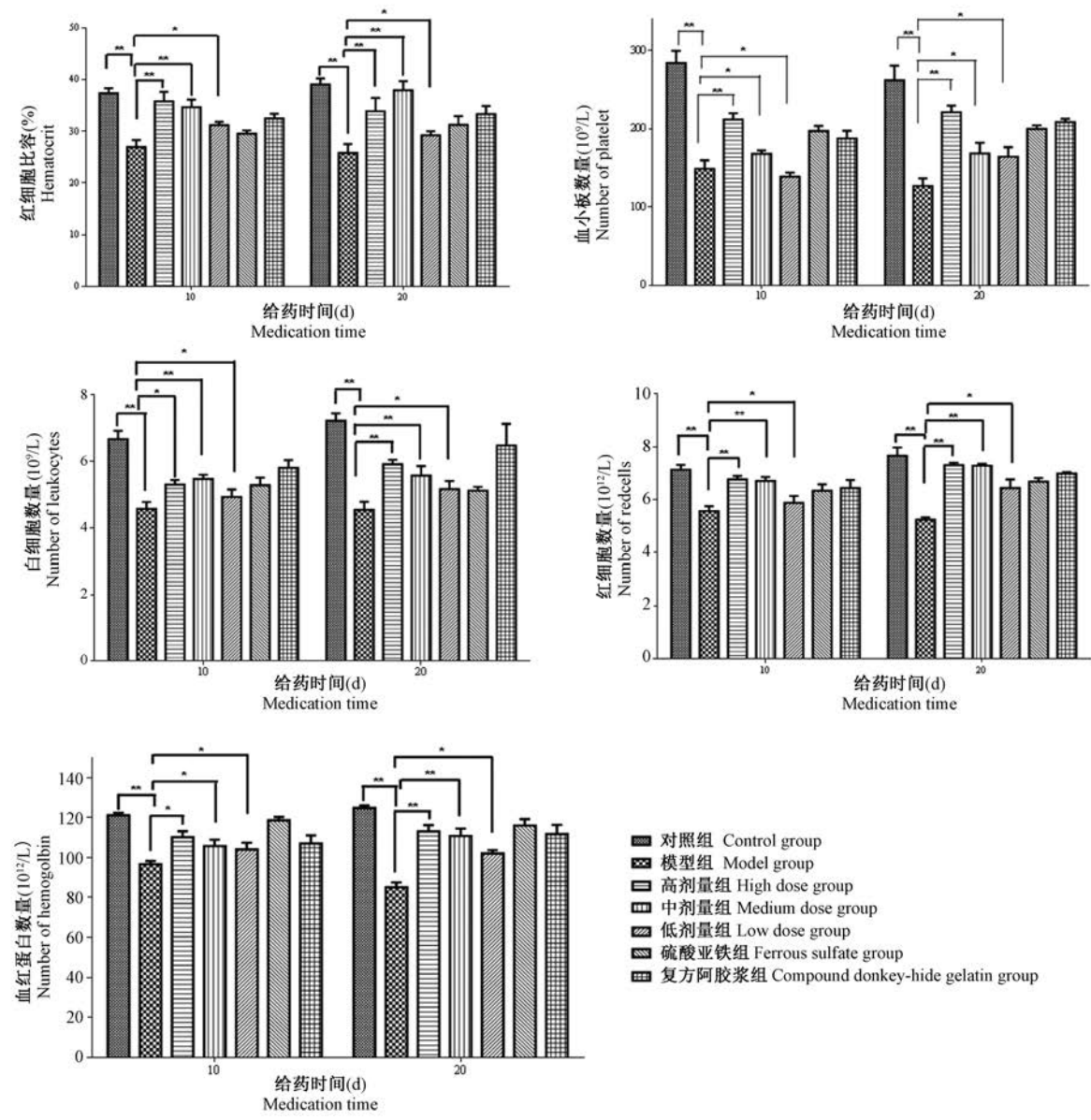
石榴补血糖浆对大鼠的血象的影响情况见图 2。红细胞数量显示在第 10 天,与模型组比较,对照组、石榴补血糖浆高、中、低剂量组均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在第 20 天,与模型组比较,对照组、石榴补血糖浆高、中、低剂量组均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。血红蛋白含量与红细胞比容和红细胞变化趋势基本相同。在第 10 天和第 20 天,与模型组比较,对照组、石榴补血高、中、低剂量组组血小板及白细胞数量均明显增多($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 石榴补血糖浆对 EPO 含量的影响

第 20 天,模型组 EPO 含量有明显的上升,而其



注:不同颜色代表不同组小鼠存活率。
图 1 药物使用后大鼠存活率($n = 5$)
Note. Different colors represent the survival rate of different groups of mice.
Figure 1 Rat survival rate after drug use



注:图中各组 bar 依次代表分别给药处理 10 d 和 20 d 后的血象指标。与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 不同给药时间点血常规结果($n=5$)

Note. The each group of bar in the figure represents the blood indicators after 10 and 20 days of treatment respectively. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Blood routine results at different time points

它组均有一定的降低,其中模型组和对照组、石榴补血糖浆高剂量组有显著性差异($P<0.05$)。详见图 3。

2.4 石榴补血糖浆对骨髓有核细胞数的影响

根据血象分析和动物的体征,中剂量组的效果较好,且接近半数有效量(ED_{50}),后续实验选择了中剂量。与模型组比较,对照组、中剂量组、硫酸亚铁组、复方阿胶浆组有核细胞数量均显著增多($P<0.01$)。详见图 4。

2.5 石榴补血糖浆对骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF 的核酸表达的影响

在骨髓有核细胞中,中剂量组、硫酸亚铁组、复方阿胶浆组 SCF 基因表达量均有所上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。GM-CSF 基因表达量也呈现相似趋势,中剂量组、硫酸亚铁组、复方阿胶浆组 GM-CSF 基因表达量均有所上升,其中,模型组与对照组有较显著差异($P<0.01$),模型组与中剂量组和硫酸亚铁组有显著性差异($P<0.05$)。详见图 5。

2.6 石榴补血糖浆对骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF 的蛋白表达水平的影响

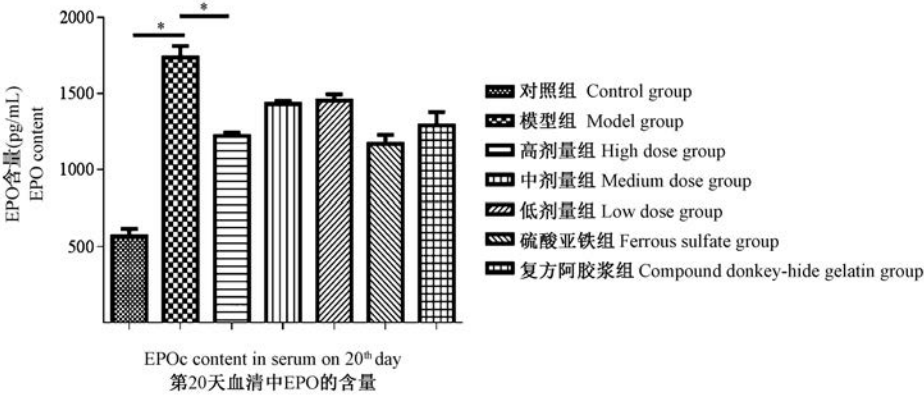
与模型组相比,对照组、中剂量组、硫酸亚铁组、复方阿胶浆组骨髓有核细胞内 SCF、GM-CSF 的表达水平明显升高。中剂量组与模型组有较显著性差异($P<0.01$),且模型组与对照组也有较显著差异($P<0.01$)。详见图 6。

3 讨论

治疗血虚证,常用药物有阿胶,黄芪,石榴,复方硫酸亚铁叶酸片等。本研究用硫酸亚铁和复方阿胶浆作为对照,来探究石榴补血糖浆对血虚症的作用,结果显示,石榴补血糖浆组大鼠存活率有所升高,且死亡时间比模型组靠后,说明石榴补血糖

浆能降低大鼠血虚证死亡率。在用石榴补血糖浆高、中剂量的第 10 天和第 20 天,红细胞数量和模型组相比有显著性增高($P<0.01$),另外对血小板的恢复作用也相当明显,这说明石榴补血糖浆有良好的补血效果,能有效地缓解大鼠的血虚症状,这与李学强等^[6]人研究结果一致。在第 20 天,石榴补血糖浆组白细胞数量和模型组相比有显著性增高,这表明石榴补血糖浆能较好地恢复大鼠白细胞数量,有一定的增强免疫的功能。

机体在缺血的情况下,会快速启动骨髓的造血功能,组织学上表现为血细胞前体细胞(幼稚红细胞、多核聚细胞)增多^[6-8],在本研究中,石榴补血糖浆组骨髓内有核细胞数有明显的升高,这表明石榴补血糖浆在机体外周血细胞降低的情况下,能有效

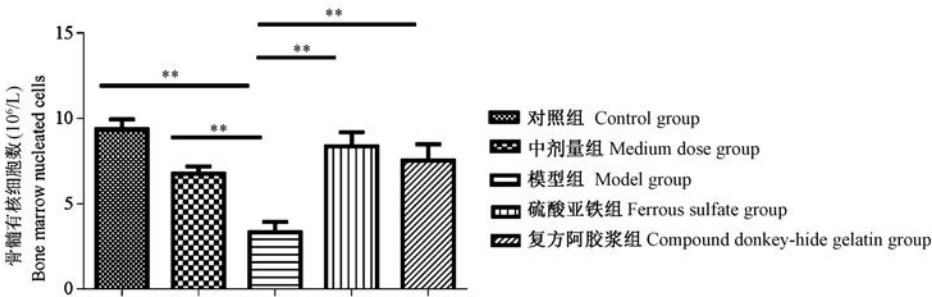


注:图中各组 bar 依次代表分别给药处理 20 d 后的 EPO 的含量。与模型组比较, * $P<0.05$ 。

图 3 第 20 天血清中 EPO 含量($n=5$)

Note. The each group of bar in the figure represents the EPO content in serum on 20th day. Compared with model group, * $P<0.05$.

Figure 3 EPO content in serum on 20th day

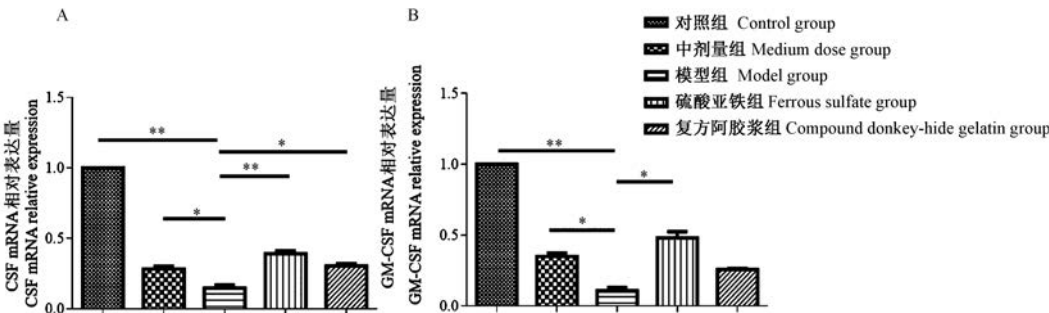


注:图中各组 bar 依次代表分别给药处理 20 d 后的骨髓有核细胞数。与模型组比较, ** $P<0.01$ 。

图 4 第 20 天骨髓有核细胞数($n=5$)

Note. The each group of bar in the figure represents the number of bone marrow nucleated cells on 20th day. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 4 Number of bone marrow nucleated cells on 20th day

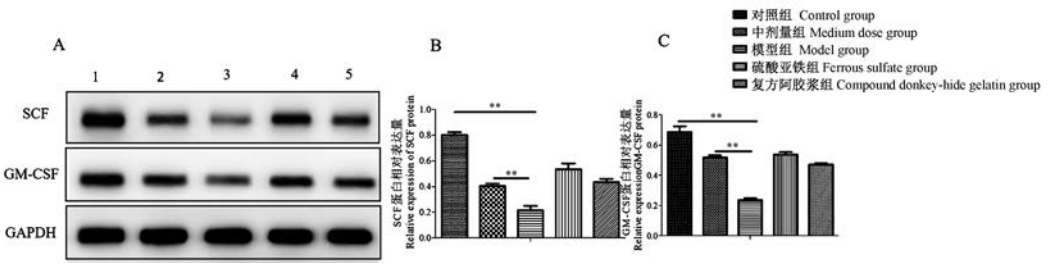


注:图中各组 bar 依次代表分别给药处理 20 d 后的骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF mRNA 表达。A:SCF mRNA 相对表达量;B:GM-CSF mRNA 相对表达量。与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF mRNA 表达 (n=5)

Note. The each group of bar in the figure represents expression of SCF and GM-CSF mRNA in bone marrow nucleated cells. A, Relative expression of SCF mRNA. B, Relative expression of GM-CSF mRNA. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression of SCF and GM-CSF mRNA in bone marrow nucleated cells



注:图中各组 bar 依次代表分别给药处理 20 d 后的骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF 蛋白表达。A:1:对照组;2:中剂量组;3:模型组;4:硫酸亚铁组;5:复方阿胶浆组;B:SCF 蛋白相对表达量;C:GM-CSF 蛋白相对表达量。与模型组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 骨髓有核细胞中 SCF、GM-CSF 蛋白表达 (n=5)

Note. The each group of bar in the figure represents expression of SCF and GM-CSF protein in bone marrow nucleated cells. A, 1, Control group. 2, Medium dose group. 3, Model group. 4, Ferrous sulfate group. 5, Compound donkey-hide gelatin group. B, Relative expression of SCF protein. C, Relative expression of GM-CSF protein. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 6 Expression of SCF and GM-CSF protein in bone marrow nucleated cells

地促进骨髓造血。促红细胞生成素 EPO,生理功能主要是与红系祖细胞的表面受体结合,促进骨髓内红系定向干细胞分化为红系母细胞、骨髓内网织红细胞和红细胞的释放。在机体外周血缺少红细胞的情况下,机体会通过负反馈调节机制,来促进机体合成更多的 EPO,EPO 作用于骨髓红系祖细胞,进而产生更多的红细胞^[9-10]。邓家刚等^[11]人发现,鸡血藤总黄酮可以通过提高血清中 EPO 的含量,从而缓解因各种化学因素所致的血虚症状。在本研究中,模型组红细胞含量明显低于对照组,且模型组 EPO 含量有明显的上升,并和石榴补血糖浆高剂量组有显著性差异,这说明高剂量石榴补血糖浆可能通过调节 EPO 含量,进而提高大鼠红细胞数量。

SCF、GM-CSF 对髓系干细胞到成熟粒细胞的增殖与分化过程均有刺激作用。丛培玮等^[12]发现脾气虚证大鼠模型的外周血象中,红细胞数及 SCF 含量均出现明显降低。王琰等^[13]对 35 例慢性再生障碍性贫血患者骨髓样本进行分析后发现,患者体内的 SCF 水平明显低于正常人。姚楠等人^[14]用加味当归补血汤对血虚证大鼠进行干预后,发现血虚大鼠的 EPO 和 GM-CSF 的表达量均出现不同程度的升高,红细胞和血红蛋白数量明显增加。因此,EPO,SCF,GM-CSF 均可正向调控造血,表达量减少,则会出现造血调节因子不能充分促进骨髓造血而导致贫血,而表达增加则促进骨髓造血,进而增加血细胞生成,增加血管中的血容量^[15-20]。本研究

中,石榴补血糖浆组和模型组相比,SCF、GM-CSF 表达量均有明显升高,这表明石榴补血糖浆能增加大鼠 SCF、GM-CSF 表达量,进而促进骨髓造血,产生大量的血细胞,用于恢复外周血细胞数量,这也可能是石榴补血糖浆恢复机体血细胞水平的主要机制之一。

综上所述,石榴补血糖浆可缓解血虚症的临床症状,增加血细胞数量和红细胞比容,促进造血功能相关的细胞因子 EPO、SCF、GM-CSF 的表达,且可以提高骨髓有核细胞数量,提示石榴补血糖浆可能通过提高造血细胞因子 EPO、SCF、GM-CSF 的表达量来改善血虚证模型大鼠的造血功能。

参考文献:

- [1] 党纪红. 蔗糖铁注射液联合复方阿胶浆对改善产妇产后贫血的影响 [J]. 实用中西医结合临床, 2017, 17(11): 83-84.
- [2] 吴丽霞, 张蕊. 正常剂量复方硫酸亚铁叶酸片治疗妊娠期缺铁性贫血的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2019, 4(14): 43-44.
- [3] 张荻, 侯丽, 孙韬, 等. 复方阿胶浆改善化疗相关性贫血的临床研究 [J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2012, 19(3): 15-18.
- [4] 张公正, 陈红涛. 复方阿胶浆与重组人促红细胞生成素改善化疗相关性贫血临床研究 [J]. 新中医, 2017, 49(10): 123-126.
- [5] 鄢星, 林苗苗, 朱敏, 等. 气虚模型大鼠骨髓造血功能的研究 [J]. 饮食保健, 2016, 3(22): 44-45.
- [6] 李学强, 耿东升, 兰建国, 等. 石榴补血糖浆对血虚证的防治作用研究 [J]. 新疆中医药, 2009, 27(4): 43-45.
- [7] Kaushansky K. Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis [J]. Hematology, 2009, 6(5): 147-152.
- [8] Molinaro R, Herman JH, Stickle DF, et al. Average glucose from hemoglobin A_{1c} for altered red blood cell lifetimes: Predictions based on a model for hemoglobin A_{1c} formation [J]. 2017, 474: 124-129.
- [9] Hirano I, Suzuki N. The neural crest as the first production site of the erythroid growth factor erythropoietin [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 105.
- [10] Farsijani NM, Liu Q, Kobayashi H, et al. Renal epithelium regulates erythropoiesis via HIF-dependent suppression of erythropoietin [J]. J Clin Invest, 2016, 126(4): 1425-1437.
- [11] 邓家刚, 梁宁, 李学坚, 等. 鸡血藤总黄酮对血虚大鼠 IL-3、EPO 影响的实验研究 [J]. 中国药物应用与监测, 2007, 6: 21-22.
- [12] 丛培玮, 尚冰, 史冰洁, 等. 脾气虚证模型大鼠骨髓 CD34+ 与血清 SCF 含量变化的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(4): 808-810, 963.
- [13] 王琰, 徐瑞荣. 造血细胞因子 EPO、SCF、GM-CSF 在慢性再生障碍性贫血患者骨髓中的表达 [J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(5): 1100-1102.
- [14] 姚楠, 黄雪君, 杜铁良, 等. 加味当归补血汤对血虚大鼠 EPO 和 GM-CSF 表达的影响 [J]. 广东药学院学报, 2013, 29(2): 177-180.
- [15] Wang K, Wu J, Xu J, et al. Correction of anemia in chronic kidney disease with angelica sinensis polysaccharide via Restoring EPO production and improving iron availability [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 803.
- [16] Landau D, London L, Bandach I, et al. The hypoxia inducible factor/erythropoietin (EPO)/EPO receptor pathway is disturbed in a rat model of chronic kidney disease related anemia [J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0196684.
- [17] Zhang Z, Zhu P, Zhou Y, et al. A novel slug-containing negative feedback loop regulates SCF/c-Kit-mediated hematopoietic Stem cell self-renewal [J]. Leukemia, 2017, 31(2): 403-413.
- [18] Tan KS, Inoue T, Kulkeaw K, et al. Localized SCF and IGF-1 secretion enhances erythropoiesis in the spleen of murine embryos [J]. Biol Open, 2015, 4(5): 596-607.
- [19] Politikos I, Kim HT, Nikiforow S, et al. il-7 and scf levels inversely correlate with t cell reconstitution and clinical outcomes after cord blood transplantation in adults [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132564.
- [20] Plett PA, Chua HL, Sampson CH, et al. PEGylated G-CSF (BBT-015), GM-CSF (BBT-007), and IL-11 (BBT-059) analogs enhance survival and hematopoietic cell recovery in a mouse model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome [J]. Health Phys, 2014, 106(1): 7-20.

[收稿日期] 2020-05-18

管博文,卢延华,白琳,等. SD 大鼠老龄化过程中外周血及免疫细胞表型的性别差异研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (12): 57-63.

Guan BW, Lu YH, Bai L, et al. Gender differences in peripheral blood and immune cell phenotypes in aging Sprague-Dawley rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 57-63.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.009

SD 大鼠老龄化过程中外周血及免疫细胞表型的性别差异研究

管博文, 卢延华, 白琳, 石桂英, 苏路路, 王玉全, 魏强, 王卫*, 孟爱民*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 比较分析不同月龄 SD 大鼠外周血和免疫器官的免疫细胞分型指标性别差异。**方法** 选用 12 月龄 SD 大鼠和 2 月龄 SD 大鼠, 雌雄各半, 检测外周血细胞计数及分类、脏器指数、外周血和脾免疫细胞分型、脾 T 细胞 P16 表达量, 并对结果进行性别差异比较。**结果** 年轻大鼠的各项检测指标未见性别差异。外周血计数与分类结果显示, 与青年大鼠比较, 老年雌性大鼠白细胞下降; 老年雄性大鼠和老年雌性大鼠红细胞上升, 两项指标均具有性别差异; 老年雄性大鼠和老年雌性大鼠均表现为中性粒百分比上升、淋巴细胞百分比下降、嗜酸性粒细胞百分比升高, 未见性别差异; 外周血其他指标未见明显改变。老年雌性大鼠胸腺指数低于老年雄性大鼠; 老年雄性大鼠脾指数升高, 并高于老年雌性大鼠。外周血免疫细胞流式分析结果显示, 老年雌性大鼠辅助 T 细胞、调节 T 细胞和细胞毒性 T 细胞上升; 老年雌性大鼠 B 细胞下降; 老年雄性大鼠自然杀伤细胞升高; 这几项指标均具有性别差异。脾淋巴细胞分型结果显示, 老年雌性大鼠 CD3+ 升高, CD45RA+ 下降。脾 T 细胞 P16 表达量老年大鼠 P16 均升高, 未见性别差异。**结论** 本研究各项指标在青年组大鼠未见性别差异, 老年大鼠在外周血白细胞、红细胞计数, 中性粒、单核细胞百分比; 免疫脏器指数; 免疫细胞分型分析中调节 T 细胞, 细胞毒 T 细胞, 自然杀伤细胞, B 细胞, CD3 阳性细胞等指标改变均存在性别差异。提示老年大鼠的免疫系统的内稳态(homeostasis)平衡失调, 在老年性改变中的一些指标出现性别差异。本研究结果为研究老年疾病及衰老动物模型提供了性别对老龄化影响的基础数据。

【关键词】 老年 SD 大鼠; 性别差异, 免疫细胞分型; 免疫脏器; P16

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0057-07

Gender differences in peripheral blood and immune cell phenotypes in aging Sprague-Dawley rats

GUAN Bowen, LU Yanhua, BAI Lin, SHI Guiying, SU Lulu, WANG Yuquan, WEI Qiang, WANG Wei*, MENG Aimin*
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences; Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Laboratory Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【基金项目】 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2017-I2M-3-015); 国家重点研发计划(2017YFA0105204); 国家自然科学基金(81573094)。

【作者简介】 管博文(1992—), 男, 技师, 研究方向: 比较医学。E-mail: guanbw@cnilas.org

【通信作者】 孟爱民(1963—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 比较医学。E-mail: aiminmeng@cnilas.org

王卫(1981—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 病原生物学。E-mail: wangw@cnilas.org * 共同通信作者

[Abstract] Objective Gender differences in immune cell types in peripheral blood and spleen were compared between aged and young Sprague-Dawley rats. **Methods** Twelve-month and 2-month-old rats were used. Rats in each age group were half male and half female. Classification and counts of peripheral blood cells, organ index, peripheral blood and spleen immune cell typing, and P16 expression in spleen T cells were determined and the result compared with respect to age and gender differences. **Results** The peripheral blood leucocyte count was decreased in the aged female rats, and there was a gender difference. The erythrocyte count was increased in both aged male rats and aged female rats, but there was a difference between them. The neutrophil percentage was increased and the lymphocyte percentage was decreased in the aged male and female rats. The eosinophil percentage was increased in the aged male and female rats. The monocyte percentage in the aged female rats was lower than that in the aged male rats. No significant changes in other peripheral blood indices were found. The thymus index of the aged female rats was decreased and was lower than that of the aged male rats. The spleen index of the aged male rats was increased and was higher than that of the aged female rats. Peripheral blood immunophenotyping indicated that the percentages of T helper cells, regulatory T cells and cytotoxic T cells were increased in the aged female rats. The percentage of B cells was decreased in the aged female rats. The percentage of natural killer cells was increased in the aged male rats. Splenic lymphocyte typing showed that numbers of CD3+ cells increased and CD45RA+ cells decreased in aged female rats. P16 expression in splenic T cells increased in all aged rats, and no gender difference was observed. **Conclusions** No gender differences were found in the various indices among young rats. Some indices showed a gender difference in aged rats, including peripheral blood leucocyte count, erythrocyte count, neutrophil percentage, monocyte percentage, thymus index, spleen index, and immune cell typing for regulatory T cells, cytotoxic T cells, natural killer cells, B cells and CD3-positive cells. These result indicate altered immune system homeostasis in aged rats, leading to gender differences in some indices in aged rats. The present result provided basic data for studying the impact of gender on aging-related diseases and animal models of aging.

[Keywords] aged rats; gender difference; immunophenotyping; immune organ; P16

中国在逐步步入老龄化国家,衰老的研究日趋重要。进入老年后,免疫系统逐渐发生改变,患炎症疾病、自身免疫性疾病和恶性肿瘤的风险也随之上升。老龄化疾病的发生及转归具有明显的性别差异,对衰老发生过程中性别差异的机制受到研究者的关注^[1-2]。SD 大鼠属于封闭群动物,在遗传多样性方面更接近人群,基因,毒理和代谢与人类很接近,封闭环境和固定的饮食排除了其他干扰因素,为研究衰老过程中的性别差异提供了动物模型^[3-4]。

我们在前期研究中比较了自然衰老大鼠与青年大鼠外周血、免疫分型以及 P16 表达的差异^[5]。本文在前期工作的基础上,比较分析不同月龄 SD 大鼠在上述各项指标中的性别差异为衰老和老龄化比较医学研究提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

使用 SPF 级 SD 大鼠,8 周龄雄性 5 只、雌性 5 只,体重范围分别为 265~285 g 和 199~205 g。12 月龄 SPF 级 SD 大鼠雄性 10 只,雌性 10 只,体重分别为 720~970 g 和 360~490 g。所有大鼠购于北京

华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0004]。在中国医学科学院医学实验动物研究所动物房屏障环境下饲养[SYXK(京)2018-0002],屏障内温度保持在 20℃~26℃,保障屏障内相对湿度为 40%~70%,内部压力大于外部压力 10 Pascal,屏障内照明亮度 15~20 lm/m² 且每隔 12 h 昼夜交替一次。经过医科院动研所伦理审查委员会的批准(IACUC MAM17001),动物福利依照 3R 原则,保障取食饮水等自由^[5]。

1.2 主要试剂与仪器

外周血荧光抗体 CD4-APC(201509)、CD45RA-APC (202313)、CD161-FITC (205608) 购于 BioLegend;CD11b-PE(Mac, MA5-17512)、CD8 PE-Cy7 (25-0084-80) 购于 Thermofisher scientific;CD25-PE(MA1-80772)、CD3-FITC(MA1-81619) 购于 eBioscience;脾淋巴细胞荧光抗体 CD3-FITC(201403)、CD45RA-APC(202313) 购于 BioLegend;eBioscience™ 1×RBC Lysis Buffer 购于 Thermofisher scientific Invitrogen(00-4333-57);大鼠 T 细胞富集试剂盒购于 STEMCELL Technologies(EasySep™ Rat T Cell Isolation Kit, #19641);ficoll 分离液购于 Solarbio Life Sciences(大鼠脾单个核细胞分离液试

剂盒, P4870);全自动血液分析仪 PentraDX120 (ABX);BD 流式分析仪(BD FACS Aria II)。

1.3 实验方法

1.3.1 外周血细胞计数及分类

使用戊巴比妥钠按照 60 mg/kg 进行腹腔注射,麻醉。腹主动脉取血,抗凝,进行血计数分类检测^[6]。

1.3.2 免疫脏器指数

取大鼠大脑、胸腺和脾称重,按照下述公式计算胸腺指数和脾指数。免疫脏器指数=脏器重量(g)/大鼠大脑重量(g)。因性别和月龄的差异,大鼠体重差异较大,故采用脏脑比^[7-8]。

1.3.3 外周血免疫细胞分型检测

取 50 μL 外周血,加入 1 mL 红细胞裂解液,室温条件下裂解 8 min 后离心 5 min,条件 1500 r/min, 4℃。沉淀,弃上清,保持每个样本 100 μL 体系,加入抗体,条件 4℃,避光,孵育 30 min。2 mL PBS 洗一遍,离心条件不变。加入 300 μL PBS 过滤到流式管中,上机检测^[5]。

1.3.4 脾淋巴免疫细胞分型检测

制备脾细胞悬液。每个样品取 50 μL 进行检测。其余步骤同 1.3.3。

1.3.5 脾 T 细胞分离及 P16 mRNA 表达量检测

将剩余脾细胞悬液,用 ficoll 分离单个核细胞, EasySep™ Rat T Cell Isolation Kit 富集 T 细胞。按照 $1\times10^6\sim5\times10^6$ /mL 的细胞浓度加入 TRIzol,提取总 RNA,保存在-80℃。交由上海欧易生物医学科技有限公司采测定 P16 mRNA 的表达量^[9]。

1.4 统计学方法

数据处理和绘图利用软件 GraphPad Prism 6,计量资料数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。利用 ANOVA 检验和 *t* 检验进行组间差异分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血细胞计数及分类性别差异比较

外周血细胞计数结果显示,青年雌性大鼠白细胞计数(white blood cell, WBC)低于雄性($P>0.05$),老年大鼠雌性比雄性低 48.83%($P<0.01$)。老年组大鼠与青年组大鼠同性别之间比较有降低趋势,但

未见统计学差异。

红细胞(red blood cell, RBC)计数结果青年组未见性别差异。老年组雌性比雄性下降了 9.38%($P<0.05$)。但与青年雄性组和青年雌性组相比,对应性别的老年组,均有明显上升($P<0.01, P<0.05$)。

外周血白细胞分类结果显示,青年组和老年组中性粒细胞(neutrophilic granulocyte, NE)百分比未见性别差异。但是相同性别中,老年组比青年组有明显的升高,其中老年雄性组比青年雄性组上升了 60.58%($P<0.01$),老年雌性组比青年雌性组上升了 23.81%($P<0.05$)。

青年组和老年组淋巴细胞(lymphocyte, LY)百分比未见性别差异。但是相同性别中,老年组比青年组有明显的降低。其中,老年雄性组比青年雄性组下降 23.06%($P<0.01$),老年雌性组比青年雌性组下降了 14.26%($P<0.05$)。

青年组及老年组嗜酸性粒细胞(eosinophilic granulocyte, EOS)百分比结果未见性别差异。但是老年雄性和雌性大鼠对应青年雄性和雌性大鼠均有明显上升,分别升高了 88.16%和 121.53%($P<0.05, P<0.01$)。

老年组与青年组单核细胞(monocyte, MO)百分比比较未见差异,青年 SD 大鼠未见性别差异,老年雄性大鼠 MO 高于老年雌性大鼠 95.83%,具有性别差异($P<0.05$)。

血红蛋白(hemoglobin, HGB)浓度、血小板(platelet, PLT)计数和嗜碱性粒细胞(basophilic granulocyte, BAS)百分比三项结果老年组与青年组比较、性别比较未见差异。结果如表 1 所示。

2.2 免疫脏器指数

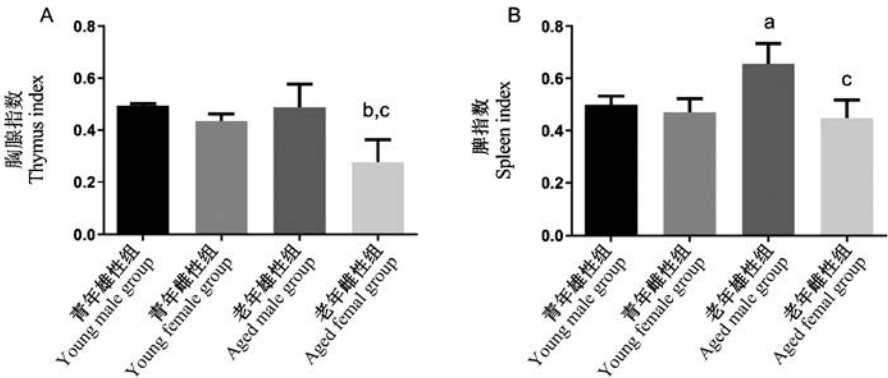
青年大鼠胸腺指数未见性别差异。老年雌性大鼠与老年雄性大鼠比较降低 43.09%,具有性别差异($P<0.01$)。与青年雌性大鼠相比,老年雌性大鼠降低 36.27%($P<0.01$)。提示老年雌性大鼠出现了胸腺指数下降。青年 SD 大鼠脾指数未见性别差异。老年雄性组高于老年雌性组 46.28%,有性别差异($P<0.01$)。和青年雄性组相比,老年雄性组上升了 31.34%($P<0.01$),提示老年雄性大鼠脾指数明显上升。结果如图 1 所示。

表 1 老年大鼠与青年大鼠外周血细胞计数及分类性别差异比较

Table 1 Sex difference of peripheral blood cell counts between aged and young rat

组别\项目 Groups\Items	青年雄性组 (n=5) Young male group	青年雌性组 (n=5) Young female group	老年雄性组 (n=10) Aged male group	老年雌性组 (n=10) Aged female group
白细胞 (10 ⁹ /L) WBC	9.6±2.06	6.74±2.34	7.7±2.55	3.94±1 ^c
红细胞 (10 ¹² /L) RBC	6.21±1.2	5.84±0.15	7.6±0.36 ^a	6.89±0.42 ^{bc}
血红蛋白 (g/L) HGB	130.2±5.22	123.8±2.17	135.8±8.12	132.8±7.89
血小板 (10 ⁹ /L) PLT	772.6±202.9	919.8±121.3	854.2±126	764.7±65.97
中性粒细胞百分比 (%) NE	24.76±4.08	30.7±3.55	39.76±4.02 ^a	38.01±5.75 ^b
淋巴细胞百分比 (%) LY	72.3±4.9	66.52±3.53	55.63±4.43 ^a	57.03±6.29 ^b
嗜酸性粒细胞百分比 (%) EOS	1.52±0.68	1.44±0.57	2.86±0.93 ^a	3.19±1.01 ^b
嗜碱性粒细胞百分比 (%) BAS	1.08±0.22	1.1±0.27	1.28±0.23	1.53±0.45
单核细胞百分比 (%) MO	0.34±0.09	0.24±0.11	0.47±0.2	0.24±0.13 ^c

注:a:与青年雄性大鼠相比;b:与青年雌性大鼠相比;c:与老年雄性大鼠相比。
Note. a, Compared with young male rat. b, Compared with young female rat. c, Compared with aged male rat.



注:A:胸腺指数;B:脾指数。a:与青年雄性大鼠相比;b:与青年雌性大鼠相比;c:与老年雄性大鼠相比。

图 1 老年大鼠与青年大鼠脏器指数性别差异比较

Figure 1 Sex difference of organ index between aged and young rat

2.3 外周血免疫细胞分型

流式分析外周血门的设置参考之前的研究^[5]。外周血免疫细胞分型结果显示,青年组大鼠各项指标未发现性别差异。

老年组辅助 T 细胞(helper T cell,Th)未见性别差异。相比于青年雌性大鼠,老年雌性大鼠 Th 从 (27.54±3.34)% 上升到 (43.14±6.51)% (P<0.01)。

老年雄性大鼠调节 T 细胞(regulatory T cell,Treg)为 (3.7±0.93)%,老年雌性大鼠 Treg 为 (9.46±4.18)%,有性别差异 (P<0.01)。相比于青年雌

性大鼠,老年雌性大鼠 Treg 明显升高,分别为 (1.7±0.59)% 及 (9.46±4.18)%,具有明显的统计学差异 (P<0.01)。

老年雄性大鼠细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)比例为 (7.79±2.26)%,与老年雌性大鼠 (16.38±5.6)% 比较,有性别差异 (P<0.01)。老年雄性大鼠较青年雄性大鼠,CTL 从 (13.72±1.34)% 下降到 (7.79±2.26)% (P<0.05)。与青年雌性大鼠比较,老年雌性大鼠 CTL 则从 (10.1±3.98)% 上升到 (16.38±5.6)% (P<0.05)。

老年雄性大鼠 B 细胞为 (36.48±8.09)%,老年

雌性大鼠为(26.52±5.38)%,具有明显性别差异($P<0.05$)。相比于青年雌性组,老年雌性大鼠 B 细胞从(41.66±9.82)%下降到(26.52±5.38)%,具有明显的统计学差异($P<0.01$)。

老年雄性大鼠自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)检测结果为(7.61±3.33)%,老年雌性大鼠(4.82±1.72)%,有性别差异($P<0.05$)。相比于青年雄性组,老年雄性大鼠 NK 从(3.97±0.56)%上升到(7.61±3.33)%($P<0.05$)。老年雌性组比青年雌性组有明显的上升,但未见统计学差异。

单核细胞结果中各组大鼠结果分别为(0.19±0.18)%、(0.66±0.3)%、(1.02±0.71)%和(1.00±0.64)%,未见统计学差异。结果见图 2。

2.4 脾免疫细胞分型

老年雄性大鼠脾单个核细胞 CD3 结果为(35.55±6.28)%,老年雌性大鼠(42.81±4.29)%,具有性别差异($P<0.05$)。与青年雌性大鼠相比,老年雌性大鼠从(33.72±3.51)%上升到(42.81±4.29)%($P<0.05$);青年雄性大鼠与老年雄性大鼠 CD3 结果分别为(37.7±3.54)%和(35.55±6.28)%,未见统计学差异。

CD45RA 结果中各组结果分别为(44.32±2.12)%、(48.52±3.79)%、(41.3±4.83)%和(36.08±5.08)%。相比于青年雌性组,老年雌性组从(48.52±3.79)%下降到(36.08±5.08)%($P<0.01$),雌性具有年龄差异。结果见图 3。

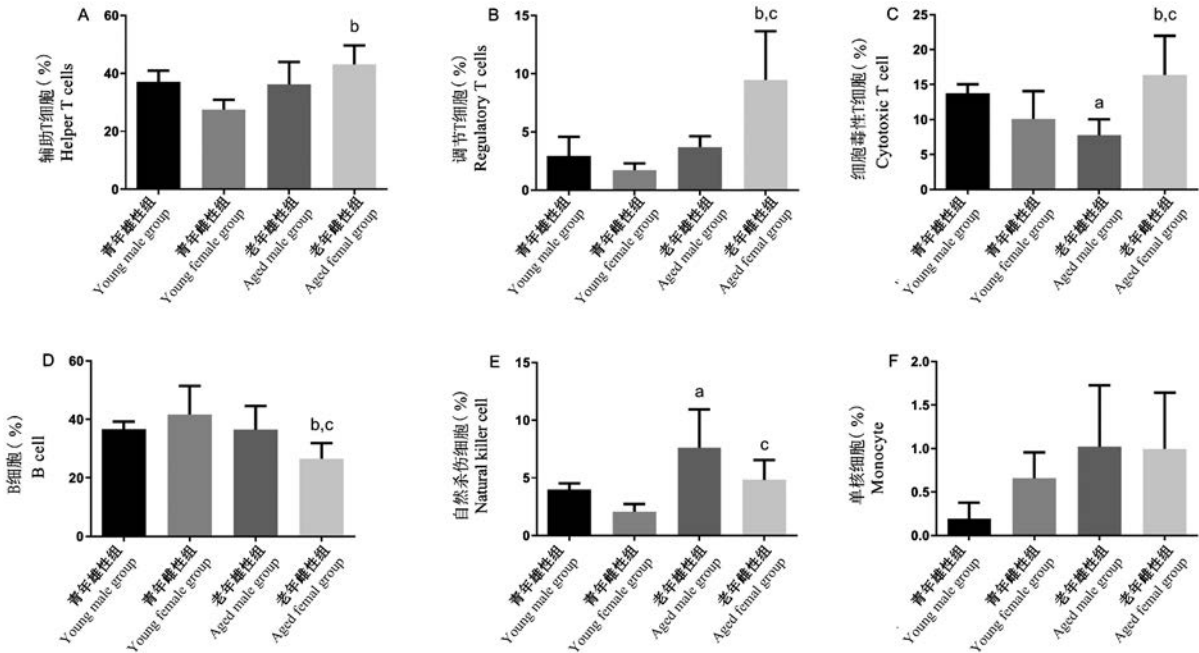
2.5 脾 T 细胞 P16 mRNA 表达量检测

分离大鼠脾 T 淋巴细胞,检测 P16mRNA 表达量,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。结果显示,相比于青年大鼠,老年大鼠上升了272.05%($P<0.01$),结果见图 4。相比于青年雄性大鼠,老年雄性大鼠上升了232.72%($P<0.01$),老年雌性大鼠比青年雌性大鼠上升了307.57%($P<0.01$)。青年组大鼠及老年组大鼠的 P16mRNA 均未见性别差异。

3 讨论

本文进行了青年、老年大鼠外周血计数及白细胞分类、免疫细胞分型、免疫脏器指数及脾细胞免疫细胞分型、脾 T 细胞 p16 表达水平的检测和性别差异比较分析。青年大鼠各项指标检测结果未见性别差异。

外周血计数及分类结果显示,老年大鼠表现为

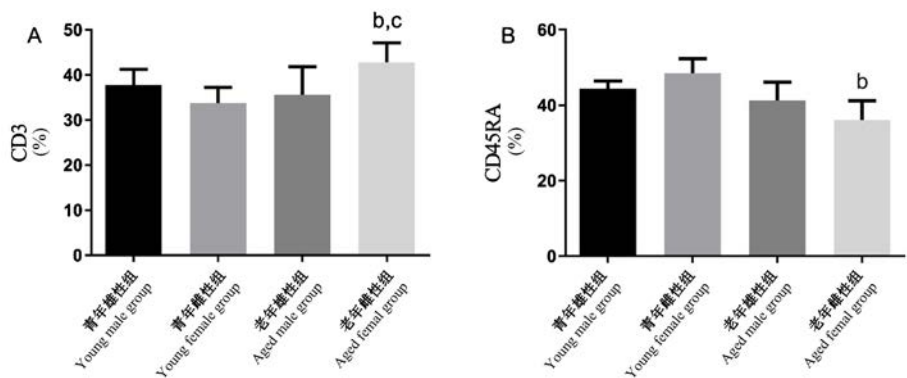


注:A:调节T细胞;B:辅助T细胞;C:细胞毒性T细胞;D:B细胞;E:自然杀伤细胞;F:单核细胞。a:与青年雄性大鼠相比;b:与青年雌性大鼠相比;c:与老年雄性大鼠相比。

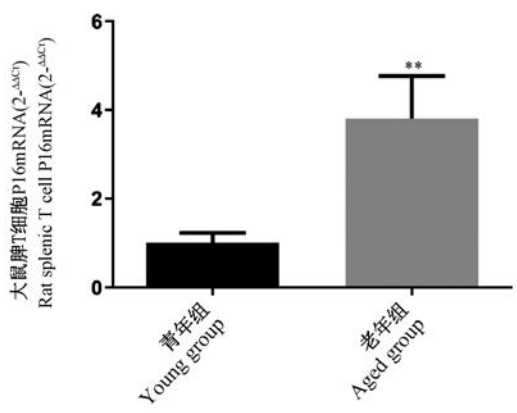
图2 老年大鼠与青年大鼠外周血免疫细胞分型性别差异比较

Note. A, Helper T cells. B, Regulatory T cells. C, Cytotoxic T cell. D, B cell. E, Natural killer cell. F, Monocyte. a, Compared with young male rat. b, Compared with young female rat. c, Compared with aged male rat.

Figure 2 Sex difference of peripheral blood immune cell typing between aged and young rat



注:A;CD3+;B;CD45RA+。b:与青年雌性大鼠相比;c:与老年雄性大鼠相比。
图 3 老年大鼠与青年大鼠脾免疫细胞分型性别差异比较
Note. A, CD3+. B, CD45RA+. b, Compared with young female rat. c, Compared with aged male rat.
Figure 3 Sex difference of spleen immune cell typing between aged and young rat



注:与青年大鼠相比, ** $P<0.01$ 。
图 4 老年大鼠和青年大鼠脾 T 细胞的 P16 mRNA 表达比较
Note. Compared with young male rat, ** $P<0.01$.
Figure 4 Comparison of P16 mRNA expression in splenic T cells between aged female rat and young female rat

WBC 下降,NE%升高,LY%降低,EOS%升高等老龄化改变。其中 WBC 出现性别差异,表现为雌性大鼠 WBC 下降更为明显。在健康老年人群中女性 WBC 低于男性^[10-11]。老年大鼠的肥胖可能也是引起 WBC 性别差异的诱因之一,在代谢综合征研究中,体重、腰围等指标与 WBC 呈明显正相关^[12]。相比于老年雌性大鼠,老年雄性大鼠的体重上升,腹部脂肪增加可能与 WBC 高于雌性有关。老年雄性大鼠的中性粒百分比上升,淋巴百分比下降,发生髓系分化偏移,这是造血系统出现衰老和易发急性髓系白血病的血液学特征^[13]。本文中主要体现为老年雄性大鼠中性粒升高,与老年男性更易患髓系白血病相契合^[14]。与之前未发表的老年 C57 小鼠结果进行对比发现,EOS%的升高属于老年性

改变,暗示着老年人造血系统的紊乱和高发湿疹皮炎等相吻合^[15-17]。

免疫细胞分型结果显示,老年大鼠 T 细胞比例升高,B 细胞降低。外周血与脾免疫细胞分型变化趋势一致。外周血 T 细胞分型检测结果显示,老年大鼠 CD4 升高,数据显示主要是老年雌性升高所致,但未见性别差异。老年大鼠 CD8、Treg 升高,也是以雌性升高为主,具有性别差异。雌性激素对 Th1 细胞具有抑制作用,对 Th2 具有刺激作用;老年雌性大鼠雌性激素水平降低,对 Th1 和 Th2 的调节作用发生变化,表现为 T 细胞比例升高和 B 细胞比例下降^[18-20]。调节性 T 细胞的上升主要是随着时间的积累而增加,但是雌激素的下降会导致雌性大鼠体内受雌激素激活的 T 细胞失去功能^[21];所以在老年状态,有些细胞数量增加但功能会减退^[22-23]。也有研究认为老年雌性大鼠 T 细胞升高和老年女性对疫苗的免疫效力要高于老年男性,同时发生不良反应概率高相吻合^[21]。

先天免疫细胞分型结果显示老年大鼠 NK 细胞比例升高,雄性高于雌性,有性别差异;老年大鼠单核细胞比例升高,未见性别差异。在朱丽华的研究中显示,健康中国成年人,大龄组的 NK 细胞百分比和绝对值有性别差异,其他各项指标无差异^[24]。与大鼠的 NK 和单核细胞比例变化结果一致。

脾 T 细胞的 p16INK4a 基因表达代表大鼠整个机体的衰老水平。我们之前的研究中发现,雄性大鼠 P16 mRNA 表达水平与衰老程度成正相关^[5]。本文检测了雌性大鼠 P16 的表达情况。相比于青年雌性大鼠,老年雌性大鼠 P16 mRNA 表达量明显升高。但老年组内未见性别差异。说明大鼠中 P16

mRNA 的表达升高主要与增龄有关,与 Liu 等^[25]和 Melk 等^[26]的结论一致。

上述结果显示,老年大鼠出现外周血 NE% 升高、LY% 降低、EOS% 升高、脾 T 细胞 P16 升高等老龄化改变,未见性别差异,提示这些改变主要与增龄有关。老龄化改变中,WBC,T 细胞和 B 细胞这三项,老年雌性大鼠变化更为显著。青年组大鼠未见明显性别差异,随着月龄的增加和激素的变化,破坏了老年大鼠的免疫系统的内稳态(homeostasis)平衡^[22, 27],尤其是处于围绝经期的雌性大鼠,雌激素下降,周期紊乱^[28],导致免疫系统衰老的进程中出现性别差异。在今后的老年化研究中,若采用单一性别动物要注意研究结果可能会与实际情况存在偏差。

参考文献:

- [1] 房思思. 代谢综合征发生及转归的影响因素分析 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2014.
- [2] 周玉梅, 张晶. 性别和激素水平对脉络膜循环的影响 [J]. 眼科新进展, 2002, 22(1): 33-34.
- [3] 李超, 张丹参, 宋金燕, 等. 衰老机制的研究进展 [J]. 空军医学杂志, 2011, 27(2): 99-101.
- [4] Goetzl EJ, Huang MC, Kon J, et al. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging [J]. FASEB J, 2010, 24(9): 3580-3589.
- [5] 管博文, 卢延华, 石桂英, 等. 老年和青年 SD 大鼠外周血及免疫细胞分型测定分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 64-70.
- [6] 翟青新, 黄爱军, 钱丽萍. SD 大鼠标本血量不足对凝血四项检测结果的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 42-45.
- [7] 柳云恩, 姚宝玉, 杨冬华, 等. 不同周龄 SD 大鼠脏器重量及其变化趋势分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(1): 22-27.
- [8] Sellers RS, Morton D, Michael B, et al. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(5): 751-755.
- [9] 韩燕, 朱文华, 何晓静, 等. 小反应体积实时定量 PCR 的可行性评价 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(2): 177-180.
- [10] 沈燕, 徐冰馨, 王剑飏. 健康老年人静脉全血细胞计数参考范围调查 [J]. 检验医学, 2012, 27(11): 904-907.
- [11] 莫荣新, 张志强, 郝珊, 等. 广东省肇庆市 60 岁以上老年人静脉全血细胞计数参考范围调查 [J]. 吉林医学, 2016, 37(3): 615-616.
- [12] 谢讚明. 白细胞计数与社区老年人代谢综合征相关分析 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.

- [13] Pang WW, Schrier SL, Weissman IL. Age-associated changes in human hematopoietic stem cells [J]. Semin Hematol, 2017, 54(1): 39-42.
- [14] 张彦. 老年急性白血病的临床分析 [D]. 青岛: 青岛大学, 2014.
- [15] 卢会秀. 嗜酸性粒细胞及伴嗜酸性粒细胞增多性疾病 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [16] 黄英河, 罗光浦, 梁海东. 嗜酸性粒细胞计数在湿疹诊断中的应用 [J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(22): 75-76.
- [17] 李春婷, 李邻峰. 外周血嗜酸性粒细胞增高对泛发湿疹患者预后的影响 [A]. 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会. 2010 全国中西医结合皮肤性病学术会议论文汇编 [C]. 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会: 中国中西医结合学会, 2010.
- [18] Roved J, Westerdahl H, Hasselquist D. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences [J]. Horm Behav, 2017, 88: 95-105.
- [19] 周智军, 俞远京, 丁志刚, 等. 大豆异黄酮对老龄大鼠雌激素水平和子宫雌激素受体表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(4): 288-291.
- [20] 江青东, 霍军, 程会昌. 大鼠不同时期血液中雌激素及孕激素的变化规律研究 [J]. 家畜生态学报, 2011, 32(5): 60-62.
- [21] Flanagan KL, Fink AL, Plebanski M, et al. Sex and gender differences in the outcomes of vaccination over the life course [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017, 33: 577-599.
- [22] Pomatto LCD, Davies KJA. The role of declining adaptive homeostasis in ageing [J]. J Physiol, 2017, 595(24): 7275-7309.
- [23] Pomatto LCD, Sun PY, Davies KJA. To adapt or not to adapt: consequences of declining adaptive homeostasis and proteostasis with age [J]. Mech Ageing Dev, 2019, 177: 80-87.
- [24] 朱立华, 王建中. 中国人血液淋巴细胞免疫表型参考值调查 [J]. 中华检验医学杂志, 1998, 21(4): 3-5.
- [25] Liu Y, Sanoff HK, Cho H, et al. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging [J]. Aging Cell, 2009, 8(4): 439-448.
- [26] Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, et al. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney [J]. Kidney Int, 2004, 65(2): 510-520.
- [27] Pomatto LCD, Tower J, Davies KJA. Sexual dimorphism and aging differentially regulate adaptive homeostasis [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018, 73(2): 141-149.
- [28] 刘晓宇, 王娇, 钱欣, 等. 围绝经期大鼠动情周期变化的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(5): 358-360.

[收稿日期]2020-05-03

王洪,魏杰,光姣娜,等. 能力验证计划中酯酶-1 血清样本稳定性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 64-69.
Wang H, Wei J, Guang JN, et al. Stability of esterase-1 serum samples in proficiency testing [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 64-69.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.010

能力验证计划中酯酶-1 血清样本稳定性研究

王 洪,魏 杰,光姣娜,周佳琪,肖 镜*,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

【摘要】 目的 对能力验证计划中的血清样本进行稳定性检验。**方法** 依据 CNAS-CL04,对样本进行保藏稳定性检验,加速稳定性检验,运输稳定性检验以及最终稳定性验证。**结果** 该样本在-20℃和 4℃条件下可以稳定保存 50 d;该样本在 37℃和室温(19.5℃~21.5℃)条件下可以稳定保存 27 d;在运输条件下,样本可以稳定保存;样本通过最终稳定性验证。**结论** 该样本能够满足能力验证计划的要求,酯酶-1 血清样本是开展能力验证计划的理想样本。

【关键词】 能力验证;实验动物;生化标记;稳定性;酯酶-1
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0064-06

Stability of esterase-1 serum samples in proficiency testing

WANG Hong, WEI Jie, GUANG Jiaona, ZHOU Jiaqi, XIAO Jing*, YUE Bingfei*
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 Objective To test the stability of serum samples in proficiency tests. **Methods** In accordance with CNAS-CL04(CNAS: China National Accreditation Service for Conformity Assessment), serum samples of inbred mice were tested for storage stability, acceleration stability, transport stability, and final stability. **Results** The samples were stable at -20℃ or 4℃ for 50 days. The samples were stable at 37℃ or room temperature for 27 days. The samples were stable during transportation. All samples passed the final stability test. **Conclusions** The collected serum samples met the requirements for proficiency tests. Serum samples of esterase-1 were adequate for proficiency testing.

【Keywords】 proficiency test; laboratory animals; biochemical markers; stability; esterase-1

能力验证的定义是利用实验室间比对,按照预先制定的准则评价参加者的能力^[1]。检测或校准实验室通过参加能力验证计划,有助于实验室发现问题,并找到问题的根本原因,完成纠错,有助于实验室实现修改和完善现有质量管理体系的目标,同时防止同类问题再次发生,为实验室提供培训机会,提升实验室的质量管理水平和检测水平。能力验证计划对计划中使用的样本的稳定性有一定的要求:应证实能力验证物品足够稳定,确保这些材料在能力验证实施过程(如储存和运输条件)中不会发生明显变化^[1]。比对样品的一致性对利用实验室间比对进行能力验证至关重要。在实施能力验证计划时,组织方应确保能力验证中出现的不满意结果不归于样品之间或样品本身的变异性。因此,对于能力验证样品的检测特性量,必须进行均匀性检验和(或)稳定性检验^[2]。由此可见,样本

[基金项目] 国家科技重大专项(2017ZX10304402)。
[作者简介] 王洪(1977—),女,硕士,研究员,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: littstar@163.com
[通信作者] 岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物质量评价。E-mail: y6784@126.com
肖镜(1979—),女,硕士,副主任技师,研究方向:检验检测实验室质量管理。E-mail: xiaojing@nifdc.org.cn * 共同通信作者

稳定性对于能力验证计划至关重要,直接决定能力验证计划的成败。因此,有必要根据样本自身的特性,建立稳定性检验程序,执行稳定性检验方案,证实能力验证样本足够稳定,确保能力验证样本在能力验证实施过程中不会发生明显变化,保证能力验证计划顺利实施。

实验动物在生物医药研究领域应用广泛,实验动物的质量直接影响生物医药研究中实验数据的准确性和可重复性。实验动物的质量控制归根究底是对动物实验产出数据的质量控制。本能力验证计划中的酯酶-1 血清样本用于考察实验室在实验动物遗传质量控制领域的检测能力。该能力验证计划中的检测项目酯酶-1 的本质是蛋白质,容易受温度影响发生变化,血清内成分复杂,温度升高的情况下,在血清内生化学因子作用下,酯酶-1 容易发生降解。对于制备批量样品的检测能力验证计划,通常必须进行样品均匀性检验。对于稳定性检验,则可根据样品的性质和计划的要求来决定。对于性质较不稳定的检测样品如生物制品,以及在校准能力验证计划中传递周期较长的测量物品,稳定性检验是必不可少的^[2]。因此,有必要制定稳定性检验程序,考察该样本的保藏稳定性,加速稳定性,运输稳定性和最终稳定性验证。

本研究旨在考察酯酶-1 血清样本的稳定性能否满足能力验证计划的实施要求。探讨样本稳定性检验对于能力验证计划的必要性和重要性。研究结果能够为能力验证计划中检测项目的选择提供基础数据,同时为实验动物领域能力验证计划的开展提供参考依据,从而进一步促进我国实验动物质量检测水平的提升。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄,雌性,SPF 级,CBA 雌性小鼠,体重 19.3~20.9 g,8 周龄,20 只,SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠,体重 19.1~21.6 g,8 周龄,20 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。所有实验在中国食品药品检定研究院进行[SYXK(京)2017-0013]。实验经中国食品药品检定研究院审批(中检动(福)第 2019(A)001 号),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:6-Dec - 2018Naphthyl acetate; 品牌:

SIGMA,货号:N6875,批号:Lot#BCBF8417 V; Fast Blue RR Salt,品牌:SIGMA,货号:F0500,批号:Lot# MKBK9189 V;Na₂HPO₄,品牌:国药集团化学试剂有限公司,批号:20170109;KH₂PO₄,品牌:国药集团化学试剂有限公司,批号:20171011。

仪器:匀浆机,品牌:OMNI,型号:19-2241E;离心机,品牌 Thermo,型号:X1R;真空冷冻干燥机,品牌:LABCONCO,型号:FREEZONE 4.5;电泳仪,品牌: BIO-RAD,型号: Model 3000i;温度计,品牌: SENSI TECH,序列号:FKS1100KYO,校准日期:2018 年 12 月 6 日。

1.3 实验方法

1.3.1 样本的制备

依据国家标准 GB/T14927.1-2008 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法进行血清样本取样,冻干样本制备和稳定性检验。CNAS (China National Accreditation Service for Conformity Assessment) 文件 CNAS-CL04:2010 要求,应评定标准物质/标准样品的稳定性,确定样品的稳定程度与目的相符。针对血清样本的特点和能力验证计划的特点,设计样本稳定性检验方案。以时间为函数评估温度对样本的影响。本计划中的血清样本按照 CNAS 的能力验证和标准物质相关文件要求完成样本的制备和均匀性检验稳定性检验^[3-11]。

1.3.2 保藏稳定性检验

样本制备完成后到发出之前,预计有 3~6 个月的时间,需保存在低温条件下,以保证样本的稳定性。方案中选择-20℃和 4℃两个温度条件,保存 50 d 后,进行稳定性检验。

1.3.3 加速稳定性检验

样本在运输过程中或者检测过程中有可能暴露较高温度条件下。方案中选择室温(实际检测温度为 19.5℃~21.5℃)和 37℃两个温度条件,分别在 1、2、3、24、25、26、27 d,进行稳定性检验。

1.3.4 运输稳定性检验

应对标准物质/标准样品在运输条件下的稳定性进行评估^[4]。模拟实际运输条件:干冰,冰袋和泡沫箱。选择广州,杭州和乌鲁木齐,三个地点,快递发出样本,回收样本后,进行运输稳定性检验。

1.3.5 最终稳定性验证

在能力验证计划全部实施完成后,选取保存在-20℃条件下的 2 份小鼠血清样本,进行稳定性验证。

2 结果

2.1 保藏稳定性和加速稳定性结果

分别将样品放置在 37℃、室温 (19.5℃ ~ 21.5℃)、4℃ 和 -20℃ 条件下,检测结果表明:酯酶-1 在 37℃ 条件下,可以稳定至 27 d。酯酶-1 在室温 (19.5℃ ~ 21.5℃) 条件下,可以稳定至 27 d。酯酶-1 在 4℃ 条件下,可以稳定至 50 d。酯酶-1 在 -20℃ 条件下,可以稳定至 50 d。具体检测结果详见表 1、图 1、图 2、图 3。

保藏稳定性检验结果表明,样本在 -20℃ 和 4℃ 条件下,可以稳定保存 50 d;室温 (19.5℃ ~ 21.5℃) 条件下,可以稳定保存 27 d;37℃ 条件下,酯酶-1 样本可以稳定保存 27 d。

2.2 运输稳定性结果

模拟运输条件,泡沫保温箱,干冰制冷,保温箱内放一个校准合格的电子温度计,记录保温箱内运输过程中的温度。选择有代表性的 3 个目的地:广州、杭州和乌鲁木齐,EMS 快递,发出-收回样本后,进行运输稳定性检验。发往广州的样本经过 7 d 返回北京,经历最高温度为 20.2℃,样本依然稳定;发往杭州的样本经过 3 d 返回北京,经历最高温度为 0.1℃,样本依然稳定;发往乌鲁木齐的样本经过 14 d 返回北京,经历最高温度为 14.5℃,样本依然稳定。具体结果详见表 2、图 4、图 5、图 6 和图 7。

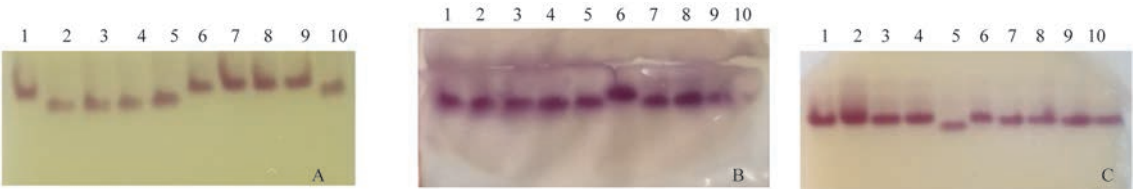
2.3 最终稳定性验证

本年度能力验证计划实施完成后,对剩余样本 (保存于 -20℃) 进行稳定性检验。取 2 份 B6 样本和 2 份 CB 样本,酯酶-1 结果表明样本依然稳定,如图 8 所示。

表 1 样品保藏稳定性和加速稳定性检验结果
Table 1 Testing results of sample storage stability and acceleration stability

位点名称 Loci	1 d	2 d	3 d	24 d	25 d	26 d	27 d	50 d
ES-1 37℃ B6	○	○	○	○	○	○	○	-
ES-1 37℃ CB	○	○	○	○	○	○	○	-
ES-1 室温 RT B6	○	○	○	○	○	○	○	-
ES-1 室温 RT B6	○	○	○	○	○	○	○	-
ES-1 4℃ B6	-	-	-	-	-	-	-	○
ES-1 4℃ CB	-	-	-	-	-	-	-	○
ES-1 -20℃ B6	-	-	-	-	-	-	-	○
ES-1 -20℃ CB	-	-	-	-	-	-	-	○

注:○,样品稳定;-:无检测结果;室温的实际测量温度为 19.5℃~21.5℃。B6;C57BL/6 小鼠;CB;CBA 小鼠;RT:室温。
Note. ○, Stable sample. -, No test result. Room temperature is the actual measured temperature, 19.5℃~21.5℃. B6, C57BL/6 mouse, CB, CBA mouse. RT, Room temperature.

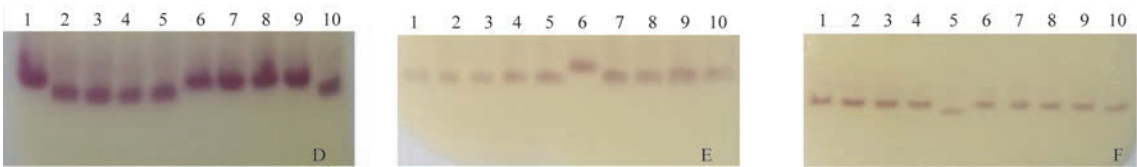


注:图 A:1:标准 b;2:1 d(B6);3:2 d(B6);4:3 d(B6);5:标准 a;6:标准 b;7:1 d(CB);8:2 d(CB);9:3 d(CB);10:标准 a。
图 B:1:27 d(B6);2:27 d(B6);3:26 d(B6);4:26 d(B6);5:标准 a;6:标准 b;7:25 d(B6);8:25 d(B6);9:24 d(B6);10:24 d(B6)。
图 C:1:27 d(CB);2:27 d(CB);3:26 d(CB);4:26 d(CB);5:标准 a;6:标准 b;7:25 d(CB);8:25 d(CB);9:24 d(CB);10:24 d(CB)。

图 1 在室温 (19.5℃ ~ 21.5℃) 条件下酯酶-1 稳定性检验结果

Note. Figure A, 1, Marker b; 2, 1 d(B6); 3, 2 d(B6); 4, 3 d(B6); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 1 d(CB); 8, 2 d(CB); 9, 3 d(CB); 10, Marker a.
Figure B, 1, 27 d(B6); 2, 27 d(B6); 3, 26 d(B6); 4, 26 d(B6); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 25 d(B6); 8, 25 d(B6); 9, 24 d(B6); 10, 24 d(B6).
Figure C, 1, 27 d(CB); 2, 27 d(CB); 3, 26 d(CB); 4, 26 d(CB); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 25 d(CB); 8, 25 d(CB); 9, 24 d(CB); 10, 24 d(CB).

Figure 1 Testing results of the stability of esterase-1 at room temperature



注:图 D:1:标准 b;2:1 d(B6);3:2 d(B6);4:3 d(B6);5:标准 a;6:标准 b;7:1 d(CB);8:2 d(CB);9:3 d(CB);10:标准 a。
图 E:1:27 d(B6);2:27 d(B6);3:26 d(B6);4:26 d(B6);5:标准 a;6:标准 b;7:25 d(B6);8:25 d(B6);9:24 d(B6);10:24 d(B6)。
图 F:1:27 d(CB);2:27 d(CB);3:26 d(CB);4:26 d(CB);5:标准 a;6:标准 b;7:25 d(CB);8:25 d(CB);9:24 d(CB);10:24 d(CB)。

图 2 在 37℃ 条件下酯酶-1 稳定性检验结果

Note. Figure D, 1, Marker b; 2, 1 d(B6); 3, 2 d(B6); 4, 3 d(B6); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 1 d(CB); 8, 2 d(CB); 9, 3 d(CB); 10, Marker a.
Figure E, 1, 27 d(B6); 2, 27 d(B6); 3, 26 d(B6); 4, 26 d(B6); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 25 d(B6); 8, 25 d(B6); 9, 24 d(B6); 10, 24 d(B6).
Figure F, 1, 27 d(CB); 2, 27 d(CB); 3, 26 d(CB); 4, 26 d(CB); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, 25 d(CB); 8, 25 d(CB); 9, 24 d(CB); 10, 24 d(CB).

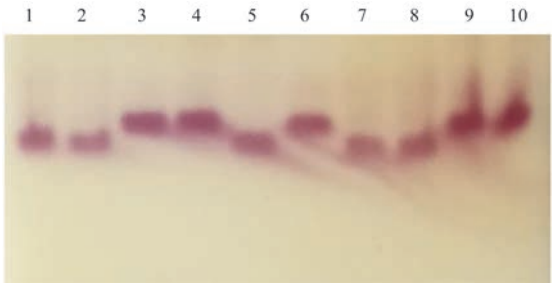
Figure 2 Testing results of the stability of esterase -1 at 37℃

表 2 样品运输稳定性检验结果

Table 2 Testing results of sample transportation stability

地点 Location	广州 Guangzhou 2. 25~3. 4 7 d	杭州 Hangzhou 3. 4~3. 7 3 d	乌鲁木齐 Wulumuqi 3. 7~3. 21 14 d
ES-1 B6	○	○	○
ES-1 CB	○	○	○

注:○, 样品稳定;B6:C57BL/6 小鼠;CB:CBA 小鼠。
Note, ○, Stable sample. B6, C57BL/6 mouse. CB, CBA mouse.



注:1:B6(4℃);2:B6(4℃);3:CB(4℃);4:CB(4℃);5:标准 a;6:标准 b;7:B6(-20℃);8:B6(-20℃);9:CB(-20℃);10:CB(-20℃)。

图 3 酯酶-1 50 d 稳定性检验结果

Note. 1, B6(4℃); 2, B6(4℃); 3, CB(4℃); 4, CB(4℃); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, B6(-20℃); 8, B6(-20℃); 9, CB(-20℃); 10, CB(-20℃).

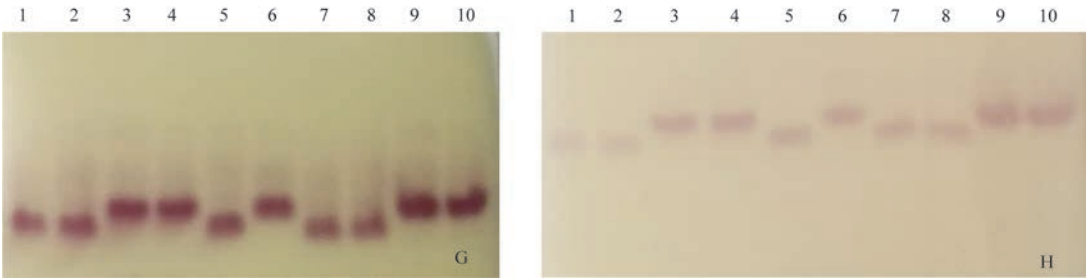
Figure 3 Testing results of the stability of esterase-1 and transferrin at 50 d

3 讨论

3.1 保藏稳定性对于能力验证样品的重要性

文件 CNAS-CL04 要求,应评估各种贮存条件对

候选标准物质/标准样品特性的影响^[4]。本研究考察 4 个温度的贮存条件对标准样品的影响,主要基于以下几方面的考虑:1,样本在不使用的情况下通常保存在低温条件下,而且保存时间较长,比如样本制备完成后,发放给参加实验室之前。选择 4℃ 和-20℃ 作为长期稳定性考察点。2,样本在运输过程中或者使用过程中有可能经历较高温度,但是这个时期不会很长,选择 37℃ 和室温作为短期稳定性/加速稳定性考察点。3,能力验证计划对于参加实验室收到样本后,反馈实验结果的时限有一定的要求,通常是 10 个工作日,即使实验室没有第一时间开展实验,样本保存的时间也不会太长。长期稳定性考察 50 d,短期稳定性考察 27 d。该流程的设置满足能力验证计划实施的需求。国家标准 GB/T14927. 1-2008 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法中有 14 个生化标记位点,该 14 个位点对温度的敏感度差异悬殊,实验结果表明酯酶-1 是其中最为稳定的一个位点,酯酶-1 是能力验证计划的理想检测项目^[12-13]。



注:图 G(广州):1:B6;2:B6;3:CB;4:CB;5:标准 a;6:标准 b;7:B6;8:B6;9:CB;10:CB。图 H:1:B6 (杭州);2:B6 (杭州);3:CB(杭州);4:CB(杭州);5:标准 a;6:标准 b;7:B6 (乌市);8:B6 (乌市);9:CB (乌市);10:CB (乌市)。

图 4 酯酶 1 运输稳定性检验

Note. Figure G(Guangzhou), 1, B6; 2, B6; 3, CB; 4, CB; 5, Marker a; 6, Marker b; 7, B6; 8, B6; 9, CB; 10, CB. Figure H, 1, B6(Hangzhou); 2, B6(Hangzhou); 3, CB(Hangzhou); 4, CB(Hangzhou); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, B6(Wulumuqi); 8, B6(Wulumuqi); 9, CB(Wulumuqi); 10, CB(Wulumuqi).

Figure 4 Testing results of esterase -1 transportation stability

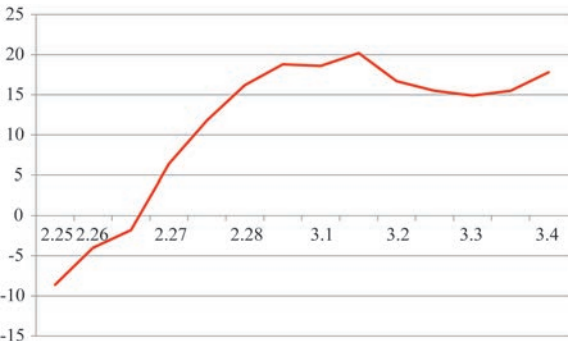


图 5 北京-广州-北京温度曲线图(最高温度 20.2℃)
Figure 5 Beijing-Guangzhou-Beijing temperature curve
(The highest temperature is 20.2℃)

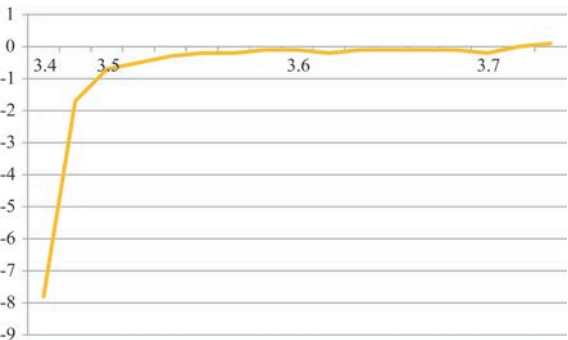


图 6 北京-杭州-北京温度曲线图(最高温度 0.1℃)
Figure 6 Beijing-Hangzhou-Beijing temperature curve
(The highest temperature is 0.1℃)

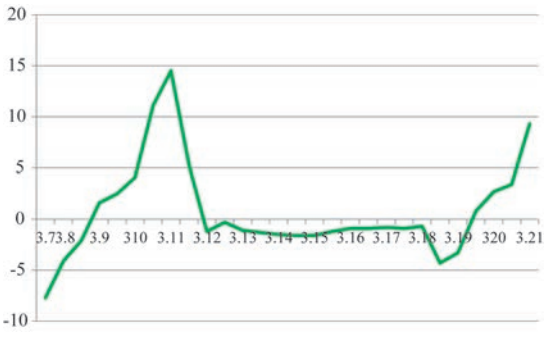


图 7 北京-乌鲁木齐-北京温度曲线图(最高温度 14.5℃)
Figure 7 Beijing-Wulumuqi-Beijing temperature curve
(The highest temperature is 14.5℃)



注:1:B6(1);2:CB(1);3:B6(2);4:CB(2);5:标准 a;6:标准 b;7:CB(1);8:B6(1);9:CB(2);10:B6(2)。

图 8 酯酶-1 最终稳定性验证

Note. 1, B6(1); 2, CB(1); 3, B6(2); 4, CB(2); 5, Marker a; 6, Marker b; 7, CB(1); 8, B6(1); 9, CB(2); 10, B6(2).

Figure 8 Final stability verification of Es-1

3.2 能力验证样品的运输稳定性

应对标准物质/标准样品在运输条件下的稳定性进行评估^[4]。需要说明的是,只有证明充分均匀之后才能进行稳定性检验。该样品已经过均匀性检验,在本文中不做讨论。在运输过程中有很多不可控的因素:停留时间,包装气密性对干冰挥发速

度的影响,接收样本的单位与发出单位的距离等方面,都有可能影响样本的稳定性。本研究中模拟实际运输条件,考察样本的稳定性。样本的发出地为北京,选择 3 个具有代表性的城市:杭州,广州,乌鲁木齐,作为运输稳定性的目的城市。从样本发出到返回,分别经历了 3 d,7 d 和 14 d,样本依然稳定。发往广州的样本经过 7 d 返回北京,经历最高温度

为 20.2℃,样本依然稳定;发往杭州的样本经过 3 d 返回北京,经历最高温度为 0.1℃,样本依然稳定;发往乌鲁木齐的样本经过 14 d 返回北京,经历最高温度为 14.5℃,样本依然稳定。研究结果表明,运输条件能够保证该样本的稳定性。

3.3 能力验证计划完成后样本的稳定性验证

本次能力验证计划的样本依据标准物质相关要求完成样本的均匀性检验和稳定性检验,同时满足能力验证和标准物质的双重要求。能力验证计划实施完成后,剩余的标准样本可用于后续测量审核活动和新一轮能力验证计划的开展。为保证样本能够继续适用于测量审核和能力验证, CNAS-CL04 要求,稳定性评估应在测定之后定期进行^[4]。因此,有必要制定稳定性评估的标准操作规程,定期实施稳定性评估计划,保证标准样本的稳定性,留存相关记录备查。定期进行稳定性评估能够保证标准样本的充分利用。

3.4 稳定性信息应及时告知参加实验室

CNAS-CL04 要求,稳定程度应在伴随标准物质/标准样品的文件中表明,生产者应将有效期的变化及使用的可能后果告知客户^[4]。测量值没有必要向客户公布,但是样本的稳定程度,有效期及可能后果,应告知客户。保证客户在使用样本过程中实施安全操作,最大程度避免由于操作不当影响样本的稳定性^[14-15]。

综上所述,研究结果表明酯酶-1 血清样本可以作为标准样本用于能力验证,测量审核,以及作为标准物质在实验动物质量控制领域广泛应用。该样本的稳定性能满足能力验证计划的实施要求,是开展能力验证计划的理想样本。能力验证样本的标准化和稳定性研究对于能力验证计划的实施至关重要^[16-20]。

参考文献:

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证提供者认可准则: CNAS-CL03 [S]. 2010.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南: CNAS-GL003 [S]. 2018.
- [3] 中国国家标准化管理委员会. 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法: GB/T14927. 1-2008 [S]. 2008.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. 标准物质/标准样品生产者能力认可准则: CNAS-CL04 [S]. 2017.
- [5] 魏杰, 王洪, 贾松华, 等. 过氧化氢酶-2 能力验证样品的制备及均一性和稳定性测定 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(4): 39-43.
- [6] 刘娜, 洛海朋, 陈怡文, 等. 食品中副溶血性弧菌检验能力验证样品的研制及其应用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 1816-1820.
- [7] 王洪, 魏杰, 冯育芳, 等. 实验小鼠肾匀浆中肽酶-3 样本稳定性分析 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(5): 73-76.
- [8] 何冬梅, 柯碧霞, 谭海玲, 等. 沙门菌和志贺菌实验室能力比对验证的模拟粪便标本的研制和评估 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(7): 506-511.
- [9] 何平, 鞠玲燕, 崔嘉, 等. 鸡肉冻干粉中妥曲珠利及妥曲珠利残留标准样品的研制 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(7): 811-818.
- [10] 刘来福, 张鹤晓, 张利峰, 等. 动物检疫实验室禽流感检验能力验证样本制备技术的研究 [J]. 中国动物检疫, 2007, 24(9): 45-48.
- [11] 曹文博, 倪长鹏, 董伟峰, 等. 沙门氏菌能力验证样品制备 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 134-139.
- [12] 王吉, 付瑞, 李晓波, 等. 实验小鼠呼吸肠病毒Ⅲ型抗体的实验室检测能力验证结果评价 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 183-187.
- [13] 苗玉发, 顾玥, 王超, 等. 六种肝功能指标检测能力验证研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1599-1604.
- [14] 王洪, 魏杰, 付瑞, 等. 2011-2017 年实验动物遗传质量评价能力验证结果分析 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(1): 1-4, 9.
- [15] 邢进, 冯育芳, 王洪, 等. 六年实验动物病原菌检测能力验证结果分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 103-107.
- [16] 吕文, 陈晓健. 能力验证试样选择的探讨 [J]. 现代测量与实验室管理, 2009, 17(1): 36-39.
- [17] 刘忠华, 陶雨风, 唐丹舟, 等. 检测和校准实验室能力认可准则在实验动物检测领域应用说明的详解 [J]. 实验动物科学, 2016, 36(1): 41-44.
- [18] 贺争鸣, 岳秉飞, 巩薇, 等. 加强实验动物质量检测实验室参与能力验证工作 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(5): 393-395.
- [19] 刘来福, 谷强, 韩玥, 等. 我国兽医实验室能力验证体系研究 [J]. 中国动物检疫, 2017, 34(11): 38-41.
- [20] 裴超信, 陈斌, 张毅, 等. 浅谈兽医实验室能力验证 [J]. 畜禽业, 2018, 29(10): 28, 30.

[收稿日期] 2020-04-29

韦雪梅,冯海妹,徐志新. 异氟醚麻醉前应用咪达唑仑与布托啡诺对小鼠麻醉效果影响评价[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 70-75.

Wei XM, Feng HM, Xu ZX. Anesthetic effects of premedication midazolam combined with butorphanol on isoflurane-anesthetized mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 70-75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.011

异氟醚麻醉前应用咪达唑仑与布托啡诺对小鼠麻醉效果影响评价

韦雪梅,冯海妹,徐志新*

(海南医学院第二附属医院麻醉科,海口 570311)

【摘要】 目的 观察小鼠异氟醚麻醉前接受咪达唑仑联合布托啡诺给药后的麻醉效果、内环境稳定,评价安全性。**方法** 选择 75 只小鼠随机分为 3 组,分布为:对照组,仅予以小鼠异氟醚麻醉;观察组,小鼠异氟醚麻醉前接受咪达唑仑联合布托啡诺给药;空白组,不予以小鼠任何麻醉处理。每组 25 只。分别于诱导即刻及诱导后 1 h 内每 5 min 测定心率及血氧饱和度(SpO₂)。比较麻醉前、麻醉中各组小鼠血清血糖(Glu)及皮质醇(Cor)水平。比较各组小鼠诱导和恢复时间、镇痛镇静效果等指标的差异。比较诱导过程中各组不良反应发生率差异。**结果** 与对照组相比,观察组诱导时间、镇静起效时间与疼痛消失时间显著较低($P<0.05$),而恢复时间无差异($P>0.05$)。空白组心率高于对照组和观察组($P<0.05$);诱导后 5~35 min 时刻,对照组心率高于观察组($P<0.05$);诱导后 35~60 min 时刻,对照组心率低于观察组($P<0.05$)。诱导后 1 h 对照组 SpO₂ 低于观察组及空白组($P<0.05$);观察组及空白组 SpO₂ 无显著差异($P>0.05$)。三组心率的变化趋势有差别($F=15.215, P=0.000$)。三组 SpO₂ 的变化趋势无差别($F=1.015, P=0.180$)。麻醉前三组 Cor、Glu 水平无统计学差异($P>0.05$);麻醉中对对照组 Cor、Glu 水平高于空白组和观察组($P<0.05$),而空白组和观察组 Cor、Glu 水平无统计学差异($P>0.05$)。对照组术中 Cor、Glu 较术前升高($P<0.05$),而空白组和观察组 Cor、Glu 水平无统计学差异($P>0.05$)。对照组和观察组不良反应总发生率无显著差异($P=0.626$)。**结论** 异氟醚麻醉前接受咪达唑仑联合布托啡诺给药后的麻醉效果确实,麻醉诱导平稳,呼吸抑制减轻,且安全性高。

【关键词】 布托啡诺;咪达唑仑;异氟醚;诱导麻醉

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0070-06

Anesthetic effects of premedication midazolam combined with butorphanol on isoflurane-anesthetized mice

WEI Xuemei, FENG Haimei, XU Zhixin*

(Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the anesthetic effect and safety of premedication midazolam combined with butorphanol on isoflurane-anesthetized mice. **Methods** Seventy five mice were randomly divided into three groups of 25 mice: control group(receiving isoflurane anesthesia only), observation group(receiving premedication midazolam combined with butorphanol with isoflurane anesthesia)and blank group(receiving no anesthesia). The indices of heart rate(HR)and

[基金项目] 海南省科技厅自然科学基金资助课题(818QN319)。

[作者简介] 韦雪梅(1978—),女,本科,研究方向:从事麻醉学基础及临床研究。E-mail:hkwxm1978@163.com

[通信作者] 徐志新(1963—),男,教授,主任医师。E-mail:drexzhixin@tom.com

oxygen saturation(SpO_2) were assessed at induction and every 5 min post-induction for 1 h. The serum levels of glucose (Glu) and cortisol(Cor) were measured and compared pre- and post-induction. The indices of induction and recovery time, and analgesic and sedative time were measured and compared among the three groups. Adverse reactions during induction were also recorded. **Results** Compared with the control group, the indices of induction time, sedation onset time and pain-loss time were shorter in the observation group($P<0.05$), but the recovery time was no different($P>0.05$). The HR index in the blank group was the highest among the three groups($P<0.05$). The HR index of the control group was higher than that of the observation group during 5~35 min post-induction($P<0.05$), and the HR index of the control group was lower than that of the observation group during 35~60 min post-induction($P<0.05$). The SpO_2 index of the control group was the lowest among the three groups after 1 h post-induction($P<0.05$), and the SpO_2 index was not different between the observation and blank groups($P>0.05$). The HR variation tendency was different among the three groups($F=15.215$, $P=0.000$). The SpO_2 variation tendency was not different among the three groups($F=1.015$, $P=0.180$). The serum levels of Glu and Cor were not different among the three groups pre-anesthesia(all $P>0.05$). The serum levels of Glu and Cor in the control group were the highest among the three groups at mid-anesthesia(all $P<0.05$), but no difference was found between the blank and observation groups at mid-anesthesia(all $P>0.05$). The serum levels of Glu and Cor at mid-anesthesia were higher than at pre-anesthesia in the control group($P<0.05$), but the serum levels of Glu and Cor in the blank and observation groups were not different between pre-anesthesia and mid-anesthesia($P>0.05$). The incidences of adverse reactions were not different between control and observation groups($P=0.626$). **Conclusions** The anesthetic effects of premedication midazolam combined with butorphanol on isoflurane-anesthetized mice are safe and reduce the degree of respiratory inhibition.

【Keywords】 midazolam; butorphanol; isoflurane; induced anesthesia

目前临床手术麻醉已极少使用单一麻醉剂,而是倾向于采用平衡麻醉,不仅可以有效避免单一麻醉药物导致的一些不良反应,而且能有效确保较好的麻醉质量^[1]。异氟醚是常用吸入麻醉药之一,适合实验动物药理和代谢研究,然而会引起呼吸抑制、心血管动力学不稳定等不良反应^[2-3]。因此近年来临床研究者提出在异氟醚麻醉前可予以镇静镇痛药物,以此减少异氟醚的不良反应。目前临床研究证实,咪达唑仑(midazolam)和布托啡诺(butorphanol)作为麻醉前组合具有较好的镇静和镇痛作用,对心肺影响较小,可以抑制全麻患者气管插管时的应激反应^[4-6]。但目前咪达唑仑和布托啡诺联合麻醉前使用对异氟醚浓度及麻醉效果的影响研究鲜见文献报道,因此本研究通过观察咪达唑仑和布托啡诺联合麻醉前用药对小鼠麻醉效果的影响,为临床应用提供实验数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 75 只清洁级 BALB/c 小鼠,鼠龄 49 d,雌雄不限,体重 18~22 g,所有小鼠在动物房进行适应性饲养 1 周,保持环境清洁,温度、湿度相对稳定,正常饮食饮水。由长沙市天勤生物技术有限公司生产提供[SCXK(湘)2014-0011],饲养由长沙市天勤

生物技术有限公司完成[SYXK(湘)2014-006]。动物处理及实验过程得到海南医学院动物关怀及使用委员会的许可(IACUC0023)。实验研究过程中严格遵守 3R 原则。

1.2 主要仪器与试剂

ABS 小动物专用气体麻醉机(武汉医用仪表有限公司);HN13-GY-6620 呼吸监护仪(Datex Engstorm 仪器公司,芬兰);NW-TP01 商用体温传感器(Philips 公司,德国);MouseOx 啮齿动物脉搏血氧计和心率监测仪(Philips 公司,德国);迈瑞 PM7000 循环监护仪(Philips 公司,德国);重症监护仪 G80(Datex Engstorm 仪器公司,芬兰);罗康全活力 II 型血糖检测仪(罗氏公司,瑞士);YLS-13 A 大小鼠抓力测定仪(济南益延科技发展有限公司);异氟醚(批号:090822,河北九派制药有限公司);布托啡诺(批号:090056,江苏恒瑞医药股份有限公司);咪达唑仑注射液(批号:20110412,国药准字 H19990027,江苏恩华药业股份有限公司);皮质醇(Cor)检测试剂盒(批号:081005,江苏恒瑞医药股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

本研究预实验应用 probit 法测算量效关系,以小鼠捏尾反射消失为达到麻醉深度标准,咪达唑仑

ED₅₀ 值(95%可信限)为 2.5(2.2~2.9) mg/kg, 布托啡诺 ED₅₀ 值(95%可信限)为 2.0(1.6~2.3) mg/kg。应用随机数字表将 75 只小鼠随机分成 3 组:对照组,仅予以吸入 3%异氟醚全麻,麻醉前腹腔注射生理盐水 1 mL;对照组,在吸入异氟醚前 15 min 腹腔注射咪达唑仑(2.5 mg/kg)及布托啡诺(2 mg/kg),上述药物溶于 1 mL 生理盐水中进行腹腔注射;空白组,不予以小鼠任何麻醉处理。每组各 25 只小鼠。对照组及观察组小鼠注射药物统一进行,事先将药物配伍溶解完全后,进行随机编号,由另一工作人员进行腹腔注射操作,注射前抽签数字,注射标注相应数字药物,并对小鼠编相应数字。实验结束后揭盲,确定小鼠具体分组情况。

1.3.2 麻醉处理

空白组小鼠仅固定于小鼠固定板上,不予以麻醉处理,接 MouseOx 啮齿动物脉搏血氧计和心率监测仪检测心率及氧饱和度(SpO₂)。

将小鼠放入麻醉箱,置于 35℃ 环境中连接麻醉机,以混有 30%氧气的空氧混合气体作为载体气体,通气流速(mL/min)=0.65×体重(g)。

当小鼠达到麻醉深度捏尾反射消失,即可开始气管插管。立起小鼠插管台,将小鼠门齿悬挂与放入自制小鼠插管台上端的细绳,镊子拉出小鼠舌头后,用左手将小鼠舌头往腹侧拉出,直视下将光纤置入气管,然后在光纤引导下,将 16 号套管针粗的金属插管插入气管约 5 mm,并用胶带将连接金属插管的塑料管固定。接上呼吸机观察小鼠胸廓起伏,判断插管是否成功。见图 1。启动呼吸机,调节每次通气量为 200 μL,通气频率为每分钟 120 次。行间歇正压通气(IPPV),呼吸比为 1:2潮气量设定 15~20 mL/kg,呼吸次数每分钟 15~20 次,维持 PetCO₂ 在 35~40 mmHg。麻醉过程中对照组及观察组小鼠均存活。

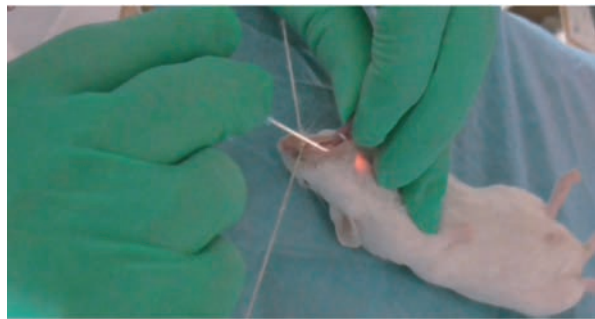
1.3.3 观察指标

(1)诱导和恢复时间

记录每只小鼠的诱导及恢复时间。其中诱导时间定义为吸入 3%异氟醚或腹腔注射咪达唑仑+布托啡诺后翻正反射消失的时间。恢复时间为诱导 60 min 后停止吸入异氟醚,翻正反射恢复正常时间。

(2)镇静和镇痛时间

记录每只小鼠的镇静时间和镇痛时间。其中镇静时间为以翻正反射消失为指标,将动物背朝下



注:小鼠悬挂在立起的插管台上,牵出舌体,显露咽腔。

图 1 小鼠固定及咽腔显露

Note. Mice hanged in the standing intubation table, pull out the tongue, then the pharynx will be revealed.

Figure 1 Mice fixed and exposed pharynx

轻轻放在马口铁皮上铁皮保持 30℃,并轻轻振动,若动物背向下的姿势保持 30 s 以上,则翻正反射消失。镇痛时间为疼痛消失时间,即小鼠扭体反应消失时间,扭体反应具体表现为腹部收缩内陷,躯体扭曲,后肢伸展、蠕动。

(3)生命体征指标

每只小鼠插管即刻、插管后每 5 min 记录心率和氧饱和度(SpO₂)等生命体征指标,观察 1 h,共测定 13 次。麻醉开始后,小鼠被放置在恒温毯上以保持参数的稳定。使用啮齿动物脉搏血氧计和心率监测仪记录心率(Beats/min)和 SpO₂(%),并计算各自指标的变异系数(CV)=标准偏差/平均值。

(4)血糖及皮质醇水平

分别于麻醉前 30 min 及麻醉后 30 min 抽取每只小鼠尾静脉血 50 μL,采用放射免疫法检测血清皮质醇(Cor),微量血糖仪测定法检测血糖(glucose, Glu)水平。

1.3.4 不良反应

根据以前关于啮齿类动物的麻醉不良反应的报告^[7],记录各组小鼠不良反应发生率,包括头部摇晃、排尿、排便和呼吸暂停。同时评估麻醉后 1 周异常反应。

1.4 统计学方法

本研究采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布资料 2 组间比较采用 *t* 检验;同组小鼠不同时间点心率及 SpO₂ 数值比较采用重复测量的方差分析。计量资料使用%表示,组与组之间比较采用 χ^2 检验。并发症发生率应用 Fisher's *t* 检验。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉效果指标比较

空白组小鼠未予以麻醉处理。观察组和对照组小鼠均能快速诱导,观察组与对照组诱导时间差异具有统计学意义($P<0.05$),恢复时间差异无统计学意义($P>0.05$)。全部小鼠吸入异氟醚 6 min 后,肌肉紧张状态消失。停药后(7.03 ± 1.06)min,肌力恢复正常。观察组小鼠镇静起效时间(3.35 ± 0.11)min、疼痛消失时间(4.06 ± 0.14)min 短于对照组小鼠(6.48 ± 0.23)min、(8.11 ± 0.21)min,差异具有显著统计学意义($P<0.001$)。见表 1。

2.2 生命体征比较

三组小鼠插管后各时间点的心率、 SpO_2 比较,采用重复测量数据的方差分析,结果:①空白组心率高于对照组和观察组($P<0.05$);诱导后 5~35 min 时刻,对照组心率高于观察组($P<0.05$);诱导后 35~60 min 时刻,对照组心率低于观察组($P<0.05$)。诱导后 1 h 对照组 SpO_2 低于观察组及空白组($P<0.05$);观察组及空白组

SpO_2 无显著差异($P>0.05$)。②三组心率的变化趋势有差别($F=15.215, P=0.000$)。三组 SpO_2 的变化趋势无差别($F=1.015, P=0.180$)。见图 2。

2.3 血清 Cor、Glu 水平比较

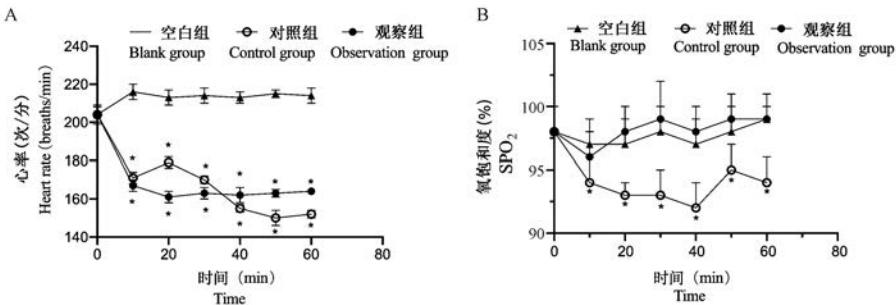
麻醉前三组 Cor、Glu 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);麻醉中对照组 Cor、Glu 水平高于空白组和观察组($P<0.05$),而空白组和观察组 Cor、Glu 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组术中 Cor、Glu 较术前升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),而空白组和观察组 Cor、Glu 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.5 不良反应发生的比较

空白组小鼠无死亡,无不良反应发生。麻醉后 1 周对照组死亡 1 只,生存率 96%,观察组死亡 2 只,生存率 92.6%,两组无显著差异($P=0.552$)。两组小鼠不良反应主要为摇头、排尿、排便、呼吸抑制,两组总不良反应发生率无显著差异($P=0.626$)。见表 3。

表 1 麻醉效果指标比较
Table 1 Comparison of indexes of anesthetic effects between two group

组别 Groups	诱导时间(s) Induction time	恢复时间(s) Recovery time	疼痛消失时间(min) Pain-loss time	镇静起效时间(min) Sedative time
对照组 Control group	240±67	180±83	8.11±0.21	6.48±0.23
观察组 Observation group	191±89	208±92	4.06±0.14	3.35±0.11
<i>t</i>	2.199	1.130	80.233	61.384
<i>P</i>	0.032	0.264	<0.001	<0.001



注:A:麻醉各时间点心率比较;B:麻醉各时间点 SpO_2 比较。与空白组比较,* $P<0.05$ 。

图 2 三组麻醉期间心率及 SpO_2 比较

Note. A, Heart rate over time in each group. B, SpO_2 over time in each group. Compared with blank group, * $P<0.05$.

Figure 2 Measured heart rate and SpO_2 in each anesthetic group

表 2 三组血清 Cor 及 Glu 水平的比较
Table 2 Comparison of serum levels of Cor and Glu among three groups

组别 Groups	皮质醇 Cor(ng/mL)		血糖 Glu(mmol/L)	
	麻醉前 Before anesthesia	麻醉中 In anaesthesia	麻醉前 Before anesthesia	麻醉中 In anaesthesia
空白组 Blank group	116.82±22.38	117.19±20.94	4.70±0.61	4.68±0.62
对照组 Control group	117.37±37.54	249.28±41.11 [*]	4.67±0.64	6.91±1.02 [*]
观察组 Observation group	116.51±29.82	133.27±37.05 [#]	4.68±0.53	5.05±0.88 [#]
F	0.090	10.481	0.001	6.903
P	0.929	<0.001	0.999	<0.001

注:与空白组相比,^{*} P<0.05;与对照组相比,[#] P<0.05。
Note. Compared with the blank group, ^{*} P<0.05. Compared with the control group, [#] P<0.05.

表 3 两组不良反应比较(%)
Table 3 Comparison of incidences of clinical adverse reactions during induction

组别 Groups	例数 Cases	摇头 Shake head	排尿 Urinate	排便 Defecation	呼吸抑制 Respiratory depression
对照组 Control group	24	1(4.0)	6(25.0)	3(12.5)	4(16.7)
观察组 Observation group	23	0(0)	4(16.0)	0(0)	1(4.0)
P				0.626	

3 讨论

由于吸入麻醉剂存在着镇痛不足缺点,在某些精准手术麻醉效果欠佳,影响手术操作及手术效果,因此常需加用镇静药或镇痛药配合^[8]。咪达唑仑为苯二氮卓类药物,由于其迅速起效而适合用作麻醉前药物,常用于实验动物镇静药,既往被认为不具有镇痛作用^[9]。布托啡诺是合成阿片类镇痛药,属于激动κ受体,也是常用的实验动物止痛剂,研究显示其易导致呼吸抑制,影响术后复苏^[10]。既往研究报道^[11],阿片类镇痛药曲马多能降低异氟烷 MAC 至 15%。而有学者提出,苯二氮卓类药物咪达唑仑除了辅助镇痛,它还可以起到镇痛功能。Kim 等^[12]、Tamura 等^[13]将咪达唑仑与芬太尼复合,显著降低异氟醚的夹尾疼痛反射,从而明显降低异氟醚的 MAC 值。然而目前尚无关于镇静药和止痛药麻醉前联用对实验动物异氟醚麻醉效果的影响报道,因此本研究采用布托啡诺与咪达唑仑麻醉前联用评估对小鼠异氟醚麻醉效果影响。

本研究结果表明,布托啡诺、咪达唑仑复合可以降低诱导时间,其原因推测可能是布托啡诺与咪达唑仑的协同作用从而降低了异氟醚的 MAC 值。研究结果观察组小鼠镇痛、镇静及肌松效果良好,且麻醉效果及麻醉深度达到外科手术要求。同时也发现布托啡诺、咪达唑仑复合用药小鼠恢复时间延长,具体机制尚需进一步研究。

异氟醚主要通过其刺激性、降低局部或全身循环阻力及对交感神经、副交感神经的抑制等方面对循环系统产生一定的抑制作用,具体表现为心率增快、血压下降、血管扩张等,但异氟醚对心功能的抑制小于恩氟烷及氟烷。以往研究表明^[14-15],异氟醚单次麻醉比联合注射麻醉如戊巴比妥和氯胺酮导致心脏的影响更低。异氟醚又具有较强的呼吸抑制,因此麻醉前给药主要目的是通过降低异氟醚的浓度来减轻呼吸抑制。本研究观察了咪达唑仑和布托啡诺对心肺的影响。结果表明,观察组小鼠麻醉期间心率均略有变化,而对照组小鼠心率变化波动较大,两组小鼠的心率变异系数也存在显著差异,也即观察组小鼠麻醉期间循环系统指标更稳定,因此咪达唑仑和布托啡诺联合麻醉方案对心血管影响更小。与观察组应用的平衡麻醉相比,单纯异氟醚麻醉组小鼠麻醉期间呼吸速率的不稳定性更明显。此外,在整个麻醉期间,观察组小鼠 SpO₂ 没有明显减少,而异氟醚单独麻醉 SpO₂ 持续降低,并且观察组显著高于对照组。SpO₂ 在观察组的平衡麻醉中的稳定可能与异氟醚浓度的降低有关,从而导致麻醉期间潮气量增加。

麻醉会引起机体应激反应,引起心率增加、血压升高和激素、血糖含量升高等。本研究结果中观察组小鼠 Cor、Glu 水平低于对照组,表明咪达唑仑+布托啡诺能降低小鼠麻醉中应激反应。本次研究结果也提示与异氟醚单麻相比,观察组小鼠麻醉减

少了低血压、尿失禁等不良事件的发生^[16-18],缩短诱导时间,这可能与咪唑安定在诱导期间的镇静性有关。

综上所述,咪达唑仑和布托啡诺联合麻醉前用药对可减少异氟醚用药,有效抑制异氟醚诱导的小鼠呼吸抑制,且诱导平稳,不良反应发生率低。

参考文献:

- [1] Kubiak M, Roach L, Eatwell K. The influence of a combined butorphanol and midazolam premedication on anesthesia in psittacid species [J]. J Avian Med Surg, 2016, 30(4): 317-323.
- [2] Murai H, Suzuki H, Tanji H, et al. A simple method using anesthetics to test effects of sleep-inducing substances in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2020, 142(2): 79-82.
- [3] 胥良, 牛思泉, 袁义强, 等. MD1 的缺失通过激活 TLR4/MyD88 信号通路增加肥胖小鼠室性心律失常的易感性 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 76-82.
- [4] Kiriha Y, Takechi M, Kurosaki K, et al. Effects of an anesthetic mixture of medetomidine, midazolam, and butorphanol and antagonism by atipamezole in rabbits [J]. Exp Anim, 2019, 68(4): 443-452.
- [5] Tsukamoto Y, Yamada N, Miyoshi K, et al. Anesthetic effect of a mixture of alfaxalone, medetomidine, and butorphanol for inducing surgical anesthesia in ICR, BALB/c, and C57BL/6 mouse strains [J]. J Vet Med Sci, 2019, 81(6): 937-945.
- [6] Gaudio E, Voltan L, De Benedictis GM. Alfaxalone anaesthesia in Lemur catta following dexmedetomidine-butorphanol-midazolam sedation [J]. Vet Anaesth Analg, 2018, 45(3): 351-356.
- [7] Martel A, Mans C, Doss GA, et al. Effects of midazolam and midazolam-butorphanol on gastrointestinal transit time and motility in cockatiels(Nymphicus hollandicus) [J]. J Avian Med Surg, 2018, 32(4): 286-293.
- [8] Shibuta H, Yamana R, Kashimoto J, et al. Comparison of the anesthetic effect by the injection route of mixed anesthesia (medetomidine, midazolam and butorphanol) and the effect of this anesthetic agent on the respiratory function [J]. J Vet Med Sci, 2020, 82(1): 35-42.
- [9] Miwa Y, Tsubota K, Kurihara T. Effect of midazolam, medetomidine, and butorphanol tartrate combination anesthetic on electroretinograms of mice [J]. Mol Vis, 2019, 25: 645-653.

- [10] Khenissi L, Nikolayenkova-Topie O, Broussaud S, et al. Comparison of intramuscular alfaxalone and ketamine combined with dexmedetomidine and butorphanol for castration in cats [J]. J Feline Med Surg, 2017, 19(8): 791-797.
- [11] Higuchi S, Yamada R, Hashimoto A, et al. Evaluation of a combination of alfaxalone with medetomidine and butorphanol for inducing surgical anesthesia in laboratory mice [J]. Jpn J Vet Res, 2016, 64(2): 131-139.
- [12] Kim YW, Suh SI, Choi R, et al. Evaluation of quality of anesthesia and analgesia and of vital signs after intramuscular administration of a combination of butorphanol, medetomidine and alfaxalone in cats [J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(3): 431-433.
- [13] Tamura J, Hatakeyama N, Ishizuka T, et al. The pharmacological effects of intramuscular administration of alfaxalone combined with medetomidine and butorphanol in dogs [J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(6): 929-936.
- [14] Murdock MA, Ricc6 Pereira CH, Aarnes TK, et al. Sedative and cardiorespiratory effects of intramuscular administration of alfaxalone and butorphanol combined with acepromazine, midazolam, or dexmedetomidine in dogs [J]. Am J Vet Res, 2020, 81(1): 65-76.
- [15] Doss GA, Fink DM, Mans C. Assessment of sedation after intranasal administration of midazolam and midazolam-butorphanol in cockatiels (Nymphicus hollandicus) [J]. Am J Vet Res, 2018, 79(12): 1246-1252.
- [16] Ohmura H, Okano A, Mukai K, et al. Cardiorespiratory and anesthetic effects of combined alfaxalone, butorphanol, and medetomidine in Thoroughbred horses [J]. J Equine Sci, 2016, 27(1): 7-11.
- [17] Eshar D, Huckins GL, Shrader TC, et al. Comparison of intramuscular administration of alfaxalone-ketamine-dexmedetomidine and alfaxalone-butorphanol-midazolam in naked mole-rats (Heterocephalus glaber) [J]. Am J Vet Res, 2019, 80(12): 1089-1098.
- [18] Taylor PM, Hoare HR, de Vries A, et al. A multicentre, prospective, randomised, blinded clinical trial to compare some perioperative effects of buprenorphine or butorphanol premedication before equine elective general anaesthesia and surgery [J]. Equine Vet J, 2016, 48(4): 442-450.

[收稿日期] 2020-05-19

文莉,何涛,康婷,等. c-Myc、RhoA、YAP 在腺嘌呤诱发慢性肾病中的表达意义[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 76-84.
Wen L, He T, Kang T, et al. Expression and significance of c-Myc, RhoA and YAP in adenine-induced chronic kidney disease [J].
Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 76-84.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.012

c-Myc、RhoA、YAP 在腺嘌呤诱发慢性肾病中的表达意义

文莉^{1,2},何涛^{1,2},康婷^{1,2},熊琳^{1,2},朱婷婷^{1,2},欧三桃^{1,2*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科,四川 泸州 646000; 2.四川省肾脏疾病临床医学研究中心,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察腺嘌呤诱发大鼠慢性肾病模型中肾 c-Myc、RhoA 和 YAP 蛋白的表达及其与肾小管间质纤维化的关系。**方法** 将 30 只大鼠随机分为对照组 (Con 组) 和模型组 (CKD 组,腺嘌呤灌胃诱导的 CKD 大鼠模型),分别于第 4、6、8 周处死大鼠。检测两组大鼠肾功及 24 h 尿蛋白水平;HE 染色观察肾病理改变并进行肾间质损伤程度评分;天狼星红染色观察肾小管间质纤维情况并判断其纤维化程度;免疫组化染色观察肾组织中 c-Myc、RhoA 和 YAP 蛋白的表达情况;RT-PCR 检测大鼠肾 c-Myc、RhoA、YAP 和 Vimentin、Col1、 α -SMA mRNA 水平,分析 c-Myc、RhoA 和 YAP 表达程度与肾小管间质纤维化的关系。**结果** 与 Con 组比较,CKD 组大鼠各时间点肾功能和 24 h 尿蛋白水平均明显升高 ($P<0.05$),HE 染色可见肾组织中肾小管明显扩张,天狼星红染色见肾间质内胶原纤维明显增多。免疫组化显示 CKD 组大鼠各时间点肾小管上 c-Myc、RhoA、YAP 和 Col1、 α -SMA 蛋白表达明显高于 Con 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。c-Myc、RhoA、YAP mRNA 水平与 Col1 mRNA ($r=0.927 P=0.001$; $r=0.988 P=0.001$; $r=0.745 P=0.013$) 和 α -SMA mRNA 的表达均呈正相关关系 ($r=0.988$; $P=0.001$; $r=0.818$; $P=0.004$; $r=0.770 P=0.009$)。此外,c-Myc 和 RhoA mRNA、RhoA 和 YAPmRNA 之间也明显正相关 ($r=0.721 P=0.019$; $r=0.661 P=0.038$)。**结论** 在腺嘌呤诱发大鼠肾小管间质纤维化模型中,c-Myc、RhoA 和 YAP 呈现高表达且与肾小管间质纤维化程度密切相关。

【关键词】 慢性肾病;c-Myc;RhoA;YAP;肾小管间质纤维化
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0076-09

Expression and significance of c-Myc, RhoA and YAP in adenine-induced chronic kidney disease

WEN Li^{1,2}, HE Tao^{1,2}, KANG Ting^{1,2}, XIONG Lin^{1,2}, ZHU Tingting^{1,2}, OU Santao^{1,2*}
(1. Department of Nephrology, Affiliated hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe the expression of c-Myc, RhoA and YAP proteins in the kidney and to determine their relationship with tubulointerstitial fibrosis in adenine-induced chronic kidney disease. **Methods** Thirty rats were randomly divided into a control (Con) group and a CKD (adenine-induced chronic kidney disease rat model) group. Rats were euthanized at weeks 4, 6, and 8. The levels of renal function and 24-hour urine protein in the two groups were determined. Hematoxylin & Eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in the kidney and to score the

[基金项目] 2018 年度西南医科大学校级基金 (2018-ZRQN-152)。
[作者简介] 文莉 (1991—), 女, 硕士研究生, 现于四川大学华西医院攻读博士学位, 研究方向: 慢性肾病、急性肾损伤。
E-mail: 821535347@qq.com
[通信作者] 欧三桃 (1976—), 女, 教授, 硕士生导师。E-mail: ousantao@163.com

degree of renal interstitial injury. Interstitial fibers of renal tubules were observed by Sirius red staining and the degree of fibrosis was determined. Immunohistochemical staining was used to observe the expression of c-Myc, RhoA and YAP proteins in renal tissue. RT-PCR was used to detect the mRNA levels of c-Myc, RhoA, YAP, Vimentin, Col1, and α -SMA. The relationship between the expression of c-Myc, RhoA, and YAP and renal tubular interstitial fibrosis was analyzed. **Results** Compared with the Con group, the blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), cystatin C (Cysc), and the 24-hour urine protein level of the CKD group were significantly increased ($P < 0.05$). HE staining showed that the renal tubules were significantly expanded, and Sirius red staining showed a significant increase in collagen fibers. Immunohistochemistry showed that the expression of c-Myc, RhoA, YAP, Col1, and α SMA proteins in the CKD group was significantly higher than that in the Con group ($P < 0.05$). The levels of c-Myc, RhoA, and YAP mRNA were positively correlated with Col1 mRNA ($r = 0.927 P = 0.001$; $r = 0.988 P = 0.001$; $r = 0.745 P = 0.013$, respectively) and α SMA mRNA levels ($r = 0.988$; $P = 0.001$; $r = 0.818$; $P = 0.004$; $r = 0.770$; $P = 0.009$, respectively). Additionally, a significant positive correlation was found between c-Myc and RhoA mRNA ($r = 0.721 P = 0.019$), and RhoA and YAP mRNA ($r = 0.661 P = 0.038$). **Conclusions** In a rat adenine-induced renal tubular interstitial fibrosis model, c-Myc, RhoA and YAP proteins were highly expressed and were closely related to the degree of renal tubular interstitial fibrosis.

[Keywords] chronic kidney disease; c-Myc; RhoA; YAP; renal tubular interstitial fibrosis

慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种严重危害人类健康的常见的慢性疾病,而肾小管间质纤维化 (tubulointerstitial fibrosis, TIF) 是各种肾疾病进展到终末期的共同途径和主要病理学特征之一^[1]。CKD 进展过程中,肾小管上皮细胞和肾间质成纤维细胞可以转化为肌成纤维细胞,进而合成和分泌大量细胞外基质促使肾小管间质纤维化^[2-3]。肾小管间质纤维化程度可以反映肾功能下降严重程度,并可作为判断患者预后最重要的指标之一^[4],了解其发病机制对指导治疗十分重要。

肾间质纤维化病变机制复杂,受多种细胞因子和多条信号通路的调控,目前研究较多的是 TGF- β /Smad3、JAK/STAT 和 PI-3 K 通路等^[5-6]。过去关于 c-Myc、RhoA 和 YAP 的研究多集中在肿瘤的发生发展领域,但是近年来也有研究发现,c-Myc 和 RhoA 均具有促纤维化作用^[7-8],YAP 的持续过度活化也可促进肾间质纤维化的发生^[9-10],但关于三者慢性肾病肾间质纤维化模型中的表达情况,以及其与肾间质纤维化的相关关系尚无报道。RhoA-YAP 信号轴可促进多囊肾 (Autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 的发展,而 c-Myc-YAP 相互作用可促进肿瘤进展,故推测在慢性肾病肾间质纤维化方面,c-Myc-RhoA-YAP 之间可能也存在一定联系进而加速肾纤维化进程。因此,本研究主要观察 c-Myc、RhoA 和 YAP 在腺嘌呤诱发慢性肾病大鼠肾小管间质纤维化中的表达情况,并分析其与肾小管间质纤维化之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体重 (200 $\pm$ 10) g,8 周龄,购自西南医科大学实验动物中心 [SCXK (川) 2018-17]。于西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心动物房饲养并取材 [SYXK (川) 2018-065]。本实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批 (20180306114),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤 (货号 V900471,批号 XWBC5614 V,规格 100 g, Sigma 公司,美国);天狼星红染色液 (批号:19.09,货号:BM1403-2 $\times$ 50 mL,规格 2 $\times$ 50 mL,合肥博美公司);RhoA 抗体、c-Myc 抗体、 α -SMA 抗体 (批号分别为:00048176、00060703、00070177,货号分别为:10749-1-AP、10828-1-AP、14395-1-AP,规格:50 μ L,武汉三鹰公司);YAP 抗体 (货号:BS1701,规格:50 μ L,bioworld 公司,美国);Col1 抗体 (货号:XS20180914013,bioworld 公司,美国);即用型 ABC 试剂盒 (bioworld 公司,美国),DAB 显色试剂盒 (货号:c02-04001,武汉博士德公司);荧光定量 PCR 试剂盒 (Thermo scientific,美国),上下游引物:c-Myc、RhoA、YAP、Vimentin、Col1、 α -SMA、GAPDH 均购自上海生物工程有限公司。

高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司,德国);全自动生化分析仪 (西门子,德国);石蜡切片机 (Thermo 公司,美国);光学显微镜 (Nikon 公司,日本);POLYTRON[®] 台式匀浆机 (Kinematica 公司,瑞

士);逆转录仪(Eppendorf 公司,德国);实时荧光定量 PCR 仪(Eppendorf 公司,德国)

1.3 实验方法

1.3.1 分组及造模

30 只 8 周龄雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周,大鼠依次编号后随机将编号进行分组,分为对照组($n=15$)和模型组($n=15$)。腺嘌呤溶于蒸馏水,制成 2.5%混悬液,CKD 组第 1~4 周每日定时给予腺嘌呤混悬液 250 mg/(kg·d)灌胃,第 5~8 周腺嘌呤混悬液 200 mg/(kg·d)隔日灌胃;对照组给予等体积生理盐水灌胃,两组均予以普通饲料喂养。所有大鼠自由进食及饮水,光照时间明暗各半,室温 18℃~25℃。

1.3.2 标本采集

分别于第 4、6、8 周末处死大鼠,经腹主动脉采血,测定肾功(血清尿素氮 BUN、肌酐 SCr、胱抑素 CysC);留取 24 h 尿液做 24 h 尿蛋白定量(24 h Pro)检测;留取肾组织置于 10%中性福尔马林液中固定,制成石蜡切片,另一部分肾组织冻存于-80℃冰箱中用。

1.3.3 HE 染色观察肾病理改变

取大鼠肾组织石蜡块切片(4 μm),常规脱蜡,至水后苏木精液染色、透明、封片,观察肾病理改变,包括肾小球、肾小管和肾间质等,重点观察小管间质情况。参考 Radford 等^[11]肾间质损伤的评分标准,每张标本随机选取皮质区的 10 个不含肾小球的

非重复视野(×200),根据以下 8 个参数判定肾小管间质损伤情况(肾小管上皮细胞空泡变性、坏死;肾小管扩张;小管萎缩;红细胞管型;蛋白管型;间质水肿;间质细胞浸润;间质纤维化程度),具体评分细则见表 1。每个视野小管间质评分 0~24 分,以 10 个视野的均值作为该标本的肾间损伤指数。

1.3.4 天狼星红染色观察肾间质纤维化

肾组织固定,常规脱水包埋,切片,常规脱蜡至水;天狼星红染色液滴染 1 h;流水稍微冲洗,去除切片表面染液;Mayer 苏木素染色液染细胞核 5~8 min;流水冲洗 10 min;常规脱水透明,中性树胶封固、观察。

参照胶原纤维相对面积的评定方法^[12],评估天狼星红染色胶原纤维沉积情况;每例切片选取 10 个非重复视野(×200),以红色染色为阳性表达。着色面积评分标准:每个视野中,无损伤,间质纤维化少于皮质区 5%=0 分;轻度损伤,间质纤维化占皮质区的 6%~25%=1 分;中度损伤,间质纤维化占皮质区 26%~50%=2 分;重度损伤,间质纤维化大于皮质区 50%=3 分。把 10 个视野总分值求和后取平均值,得到该切片的纤维化程度评分。

1.3.5 免疫组化检测大鼠肾组织 c-Myc、RhoA、YAP、Col1、α-SMA 蛋白表达

肾组织石蜡切片经脱蜡至水处理后,按照 ABC 法依次行热修复抗原,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min,山羊血清封闭非特异抗原,滴加一抗、

表 1 肾小管间质损伤指数评分标准
Table 1 Scoring criteria of renal tubulointerstitial injury

分值 Score	肾小管空泡变性 Vacuolar degeneration of renal tubules	肾小管扩张 Renal tubules dilate	肾小管萎缩 Renaltubules atrophy	红细胞管型 RBC cast	蛋白管型 Protein cast	间质水肿 Interstitial edema	间质纤维化 Interstitial fibrosis	间质细胞浸润 Interstitial infiltrate cells
0 Zero	无 No	无 No	无 No	无 No	无 No	无 No	无 No	无 No
1 One	轻度局灶变性 Mild focal degeneration	轻度 <25% Slightly less than 25%	轻度 <25% Slightly less than 25%	轻度 (偶见) Mild (occasional)	轻度 (偶见) Mild (occasional)	轻度局灶分离 Mild focal separation	轻度 <25% Slightly less than 25%	轻度局灶浸润 Mild focal infiltration
2 Two	轻度局灶或轻度弥漫变性 Mild focal or diffuse degeneration	25%~50%	25%~50%	中度<10%小管 Moderate less than 10% tubules	中度<10%小管 Moderate less than 10% tubules	中度(轻度弥漫或局灶中度) Moderate (mild diffuse or focal)	中度 25%~50% Moderate 25%~50%	中度(轻度弥漫或局灶中度) Moderate (mild diffuse or focal)
3 Three	广泛或弥漫中度以上变性 Widespread or diffuse above moderate degeneration	重度>50% Severe more than 50%	重度>50% Severe more than 50%	重度>10% Severe more than 10%	重度>10% Severe more than 10%	肾小管重度分离 Renal tubules were severely separated	重度>50% Severe more than 50%	重度细胞浸润 Severe cell infiltration

二抗、ABC 复合物、DAB 显色液,苏木素复染,常规脱水、透明、中性树胶封片,显微镜下观察,出现棕黄色颗粒为阳性信号。

1.3.6 RT-PC 检测 c-Myc、RhoA、YAP、Col1、 α -SMA、Vimentin mRNA 水平

根据试剂盒说明书提取肾组织总 RNA,再用逆转录试剂盒将 mRNA 反转录为 cDNA。再采用 PCR 仪进行 PCR 反应,扩增条件为:95℃ 预变性 10 min,40 个循环(95℃ 5 s,55℃ 15 s,72℃ 30 s)。实时记录 cDNA 的扩增,然后进行常规溶解曲线分析。依据样本 PCR 反应的 CT 值,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因的相对表达量。

引物序列: c-Myc 上游: 5'-TTCTATCACCAGCAACAGCAGAGC-3' 下游: 5'-CGTAGCGACCGCAACATAGGAC-3'; RhoA 上游: 5'-GCTTGTGGTAAGACATGCTTGCTC-3' 下游: 5'-GGCCTCAGACGGTCATAATCTTCC-3'; YAP 上游: 5'-GCCATGAACCAGAGGATCACTCAG-3' 下游: 5'-AGCCTCTCCTTCTCCATCTGTAGC-3'; Col-1 上游: 5'-TGTTGGTCCTGCTGGCAAGAATG-3' 下游: 5'-GTCACCTTGTTGCGCTGTCTCAC-3'; α -SMA 上游: 5'-GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC-3' 下游: 5'-CCATCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC-3'; Vimentin 上游: 5'-GTCCGTGTCCTCGTCCTCCTAC-3' 下游: 5'-TAGAGGCTGCGGCTAGTGCTG-3'。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,符合正

态分布的计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,两变量间的相关性分析用 *Pearson* 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

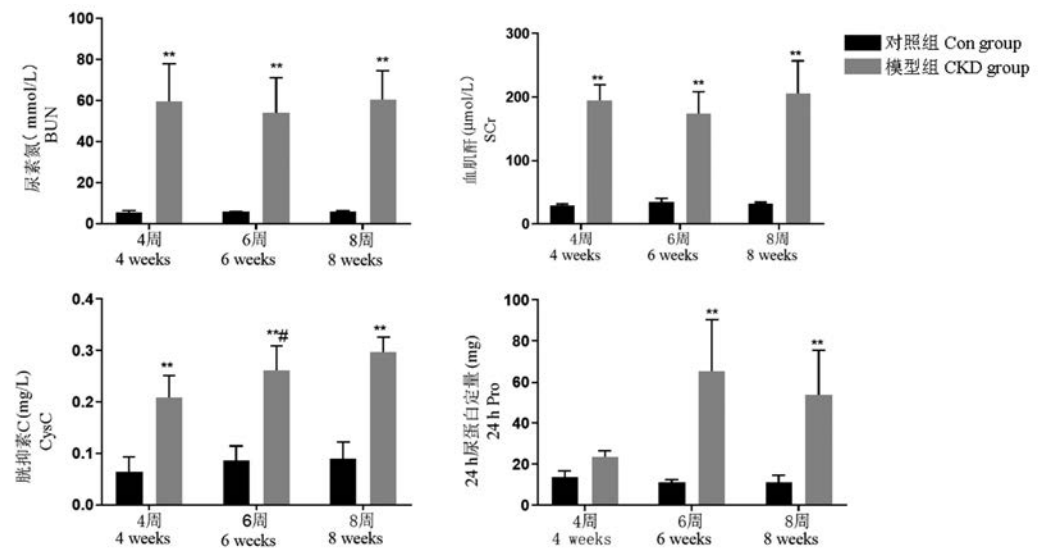
2.1 两组大鼠不同时间点血、尿指标情况

与对照组比较,CKD 组各时间点血 BUN、Scr、CysC 均明显升高,CKD 组大鼠 24 hPro 水平从 6 周开始较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.01$;图 1)。

2.2 大鼠肾组织 HE 染色和肾间质损伤评分情况

HE 染色结果:对照组大鼠整体肾组织结构清晰,皮、髓质分界清楚,肾小球、肾小管和肾间质的形态结构均无明显异常;CKD 组肾组织:第 4 周末可见肾小管扩张,以近端小管为主,管腔内可见棕褐色物质沉积;第 6 周末可见远端肾小管和肾小球囊腔扩张;第 8 周末,肾组织结构紊乱,肾小球部分萎缩,肾小管扩张明显,小管上皮细胞变性坏死,有较多炎细胞浸润(图 2)。

与对照组比较,CKD 组大鼠肾间质损伤评分明显增高($P<0.01$),且肾间质损伤评分随时间延长而逐渐升高,CKD 组 6 周肾间质损伤评分较 4 周有所增加,但差异无统计学意义;CKD 8 周较 6 周肾间质损伤评分显著增高,差异具有统计学意义($P<0.05$;图 3)。



注:与 CKD 组比较, # $P<0.05$;与 Con 组比较, ** $P<0.01$ 。

图 1 两组大鼠不同时间点血、尿生化指标变化

Note. Compared with the CKD group, # $P<0.05$. Compared with the Con group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Changes of blood and urine biochemical indexes in the two groups of rats at different time points

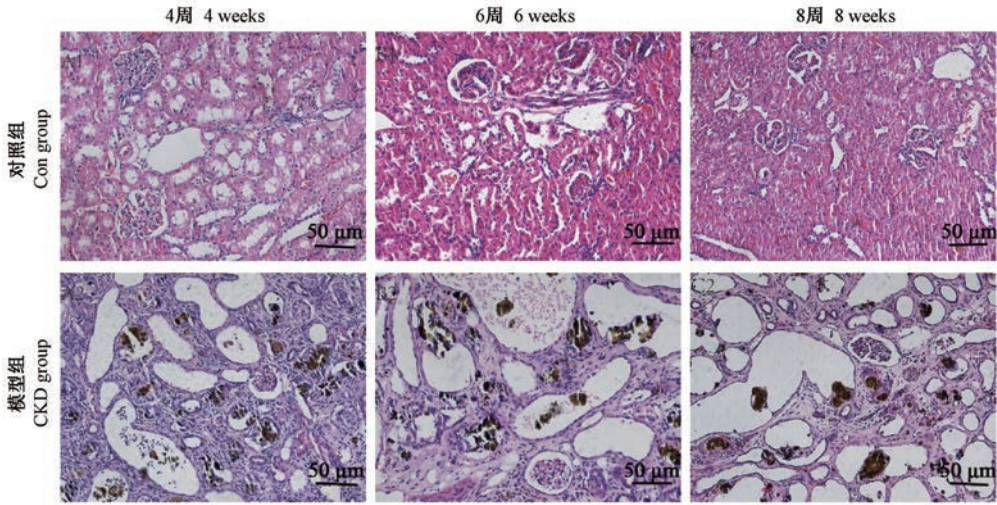


图 2 两组大鼠肾组织 HE 染色

Figure 2 HE staining of renal tissue in two groups of rats

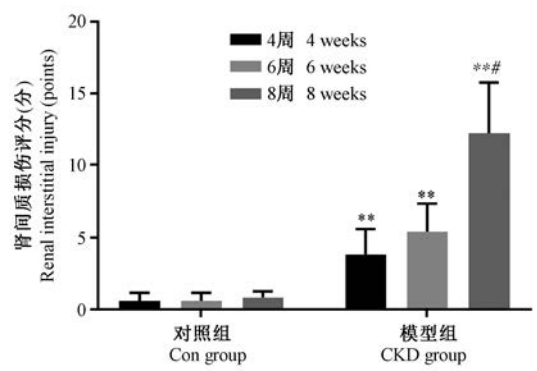


图 3 肾间质损伤评分

注:与 CKD 组前一时间点比较, $^{\#}P < 0.05$;与 Con 组同一时间点比较, $^{**}P < 0.01$

Note. Compared with the previous time point of CKD group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with the same time point of Con group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 3 Renal interstitial injury score

2.3 大鼠肾组织天狼星红染色情况及肾间质纤维化评估

天狼星红染色结果可见:对照组大鼠肾组织无明显胶原纤维沉积;CKD 组自第 4 周开始可见肾间质少许淡红色胶原纤维沉积;随着造模时间的延长,CKD 组 6 周时肾间质红染胶原纤维较前增多,8 周时可见肾间质有大量淡红色胶原纤维沉积(图 4)。天狼星红染色半定量评分结果显示,自第 6 周开始肾间质胶原面积较对照组明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$;图 5),而 CKD 组不同时间点胶原面积虽然是逐渐增加的,但差异并无统计学意义。

2.4 两组大鼠肾组织免疫组化染色结果

对照组大鼠肾组织中 RhoA 和 c-Myc 在肾小球

和肾小管细胞胞核中几乎不表达;而 CKD 大鼠肾小球细胞胞核可出现 RhoA 和 c-Myc 表达,而肾小管细胞胞核中表达较对照组均明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),但各时间点之间无明显差异。对照组大鼠肾小球细胞无 YAP 表达,肾小管细胞胞质中仅有 YAP 少量表达;CKD 大鼠肾小球细胞核中也有少量 YAP 表达,第 4 周和 6 周肾小管细胞胞质和胞核中 YAP 表达均有所增加,但差异无统计学意义;第 8 周 CKD 大鼠肾小管细胞胞质和胞核中 YAP 表达明显增加,且差异具有统计学意义($P < 0.05$),以胞核表达增加更为显著。另外,对照组大鼠肾间质中几乎不表达 Col1 和 α -SMA,但在 CKD 大鼠中肾间质 Col1 和 α -SMA 表达明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$),且 CKD 大鼠肾小球 Col1 表达也明显增加,见图 6。

2.5 大鼠肾组织 c-Myc、RohA、YAP、Col1、 α -SMA 和 Vimentin 的 RT-PCR 结果

RT-PCR 结果显示:CKD 组大鼠肾组织各时间点 c-Myc、RohA、YAP、Col1、 α -SMA 和 Vimentin mRNA 表达量均较对照组显著增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$;图 7)。

2.6 相关性分析

c-Myc、RhoA 和 YAP mRNA 表达与 α -SMA mRNA 表达水平均呈显著正相关关系($r = 0.818$, $P = 0.004$; $r = 0.77$, $P = 0.009$; $r = 0.83$, $P = 0.003$),与 Col1 mRNA 的表达水平也呈明显正相关($r = 0.988$ $P = 0.000$; $r = 0.745$ $P = 0.013$; $r = 0.927$ $P = 0.000$),表明 RhoA、YAP 和 c-Myc 表达与肾纤维

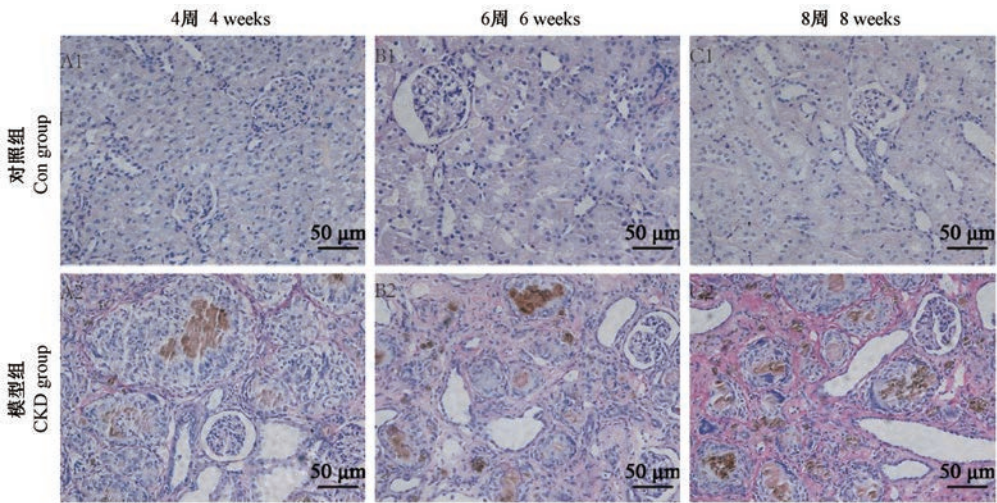
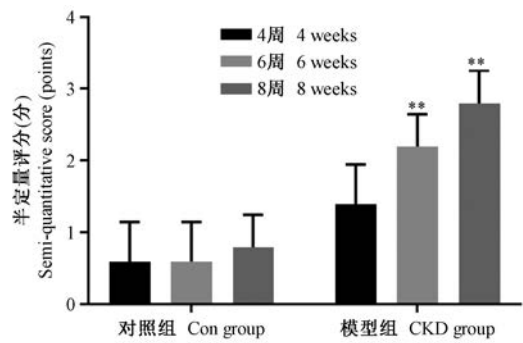


图 4 大鼠肾组织天狼星红染色

Figure 4 Sirius red staining of rat kidney tissue



注:与 Con 组同一时间点比较,** $P<0.01$ 。

图 5 天狼星红染色胶原面积半定量评分

Note. Compared with the same time point of Con group, ** $P<0.01$.

Figure 5 Semi-quantitative scoring of collagen area by Sirius red staining

化程度密切相关。为了进一步探讨这三者之间的关系,进行 c-Myc、YAP 与 RhoA 相关性的分析,结果显示:YAP 与 RhoA、c-Myc 与 RhoA 之间同样存在着明显的正相关关系 ($r = 0.661$ $P = 0.038$; $r = 0.721$ $P = 0.019$;图 8)

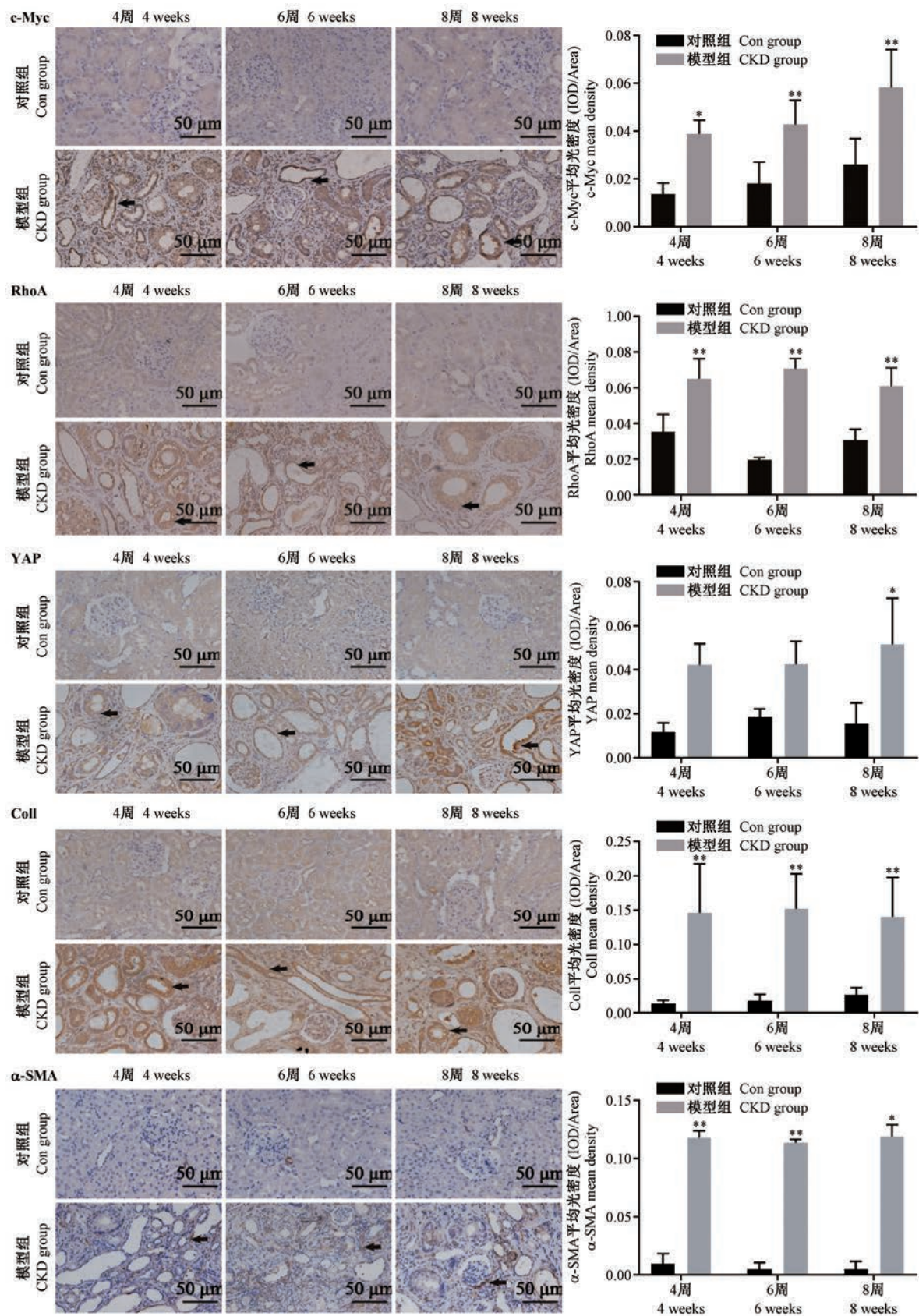
3 讨论

肾小管间质纤维化是终末期肾疾病的主要病变之一,主要表现为肾损伤后过量的细胞外基质 (ECM) 的合成和聚集,其病变机制复杂,可受多种细胞因子和信号通路的调控。近年来有学者提出 Hippo 信号通路在肾间质纤维化过程中扮演着重要角色,其中 YAP 是关键因素。c-Myc、RhoA 与 YAP 在肿瘤的发生发展过程中存在着联系,也有研究表

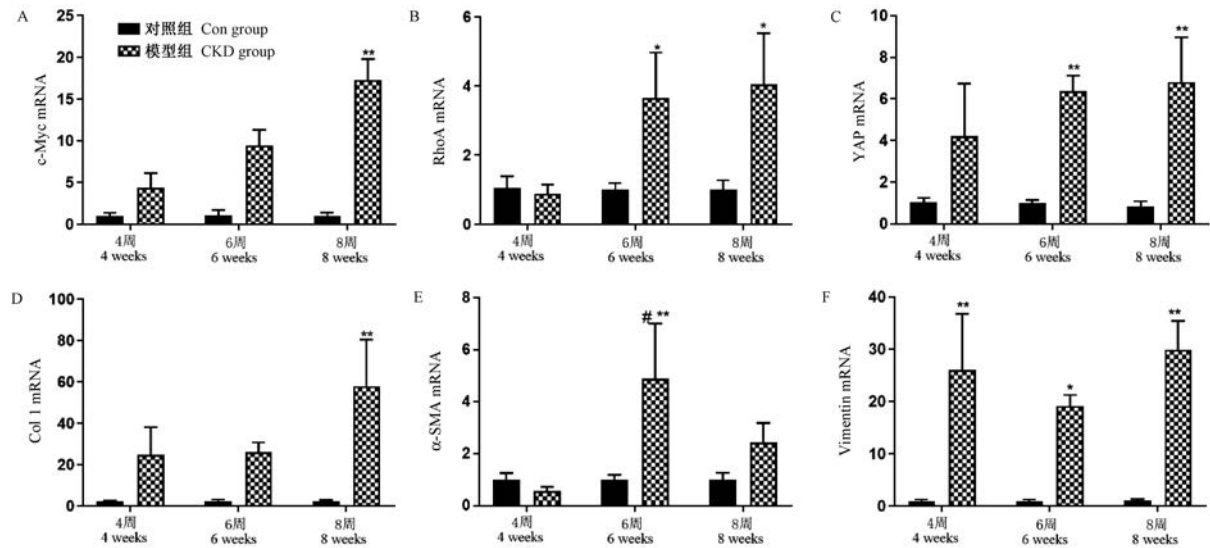
明他们可能参与肾纤维化进程,但关于这三者在慢性肾病肾小管的表达情况及其与肾间质纤维化之间的关系尚未开展研究。肾纤维化动物模型造模方法众多,包括药物或毒物诱导、手术以及基因敲除等^[13]。在本研究中,我们选用腺嘌呤诱发的大鼠慢性肾病肾纤维化模型,通过检测尿素氮、肌酐、胱抑素 C 和 24 h 尿蛋白定量等肾损伤的指标,再结合肾组织 HE 染色结果等证实 CKD 动物造模成功;天狼星红染色显示模型大鼠肾间质出现明显淡红色胶原纤维沉积,α-SMA、Col1 和 Vimentin 纤维化相关标志物的 mRNA 水平较对照组明显增加,证实腺嘌呤诱发慢性肾病的大鼠出现了肾小管间质的纤维化,且随时间延长逐渐加重。肾纤维化的分子机制较为复杂,其中肾小管上皮细胞的损伤、修复功能障碍是导致肾纤维化的重要机制之一^[14]。因此,本研究的研究重点主要是在肾小管间质部分。

c-Myc 是 Myc 家族中最重要的成员,作为一种原癌基因,它可以刺激细胞过度生长和增加新陈代谢^[15-16]。Kim 等^[17]发现在肿瘤细胞中,c-Myc 的表达激活可导致 RhoA 表达增加,而 c-Myc 的缺失可导致 RhoA 的缺失。在我们的研究中,c-Myc 在腺嘌呤诱发慢性肾病大鼠的肾小管细胞胞核中高表达,其 mRNA 相对表达量与纤维化相关因子呈明显正相关,且 c-Myc 和 RhoA mRNA 之间也存在着明显的正相关关系,提示肾间质纤维化进程中也可能存在 c-Myc-RhoA 信号轴的激活,该过程可能还伴有 TGF-β 信号通路的活化^[18],但具体机制还有待进一步的研究。

RhoA 是 RhoA-GTP 酶家族成员之一,它的表达受 c-Myc、HIF-1α/2α、Stat 6 和 NF-κB 等几种



注:←代表目标蛋白;与 Con 组同一时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
图 6 免疫组化结果
Note. ←representing target protein. Compared with the same time point of Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
Figure 6 Immunohistochemical results



注:与 CKD 组前一时间点比较, # $P<0.05$;与 Con 组同一时间点比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 7 mRNA 相对表达量

Note. Compared with the previous time point of CKD group, # $P<0.05$. Compared with the same time point of Con group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 7 Relative mRNA expression

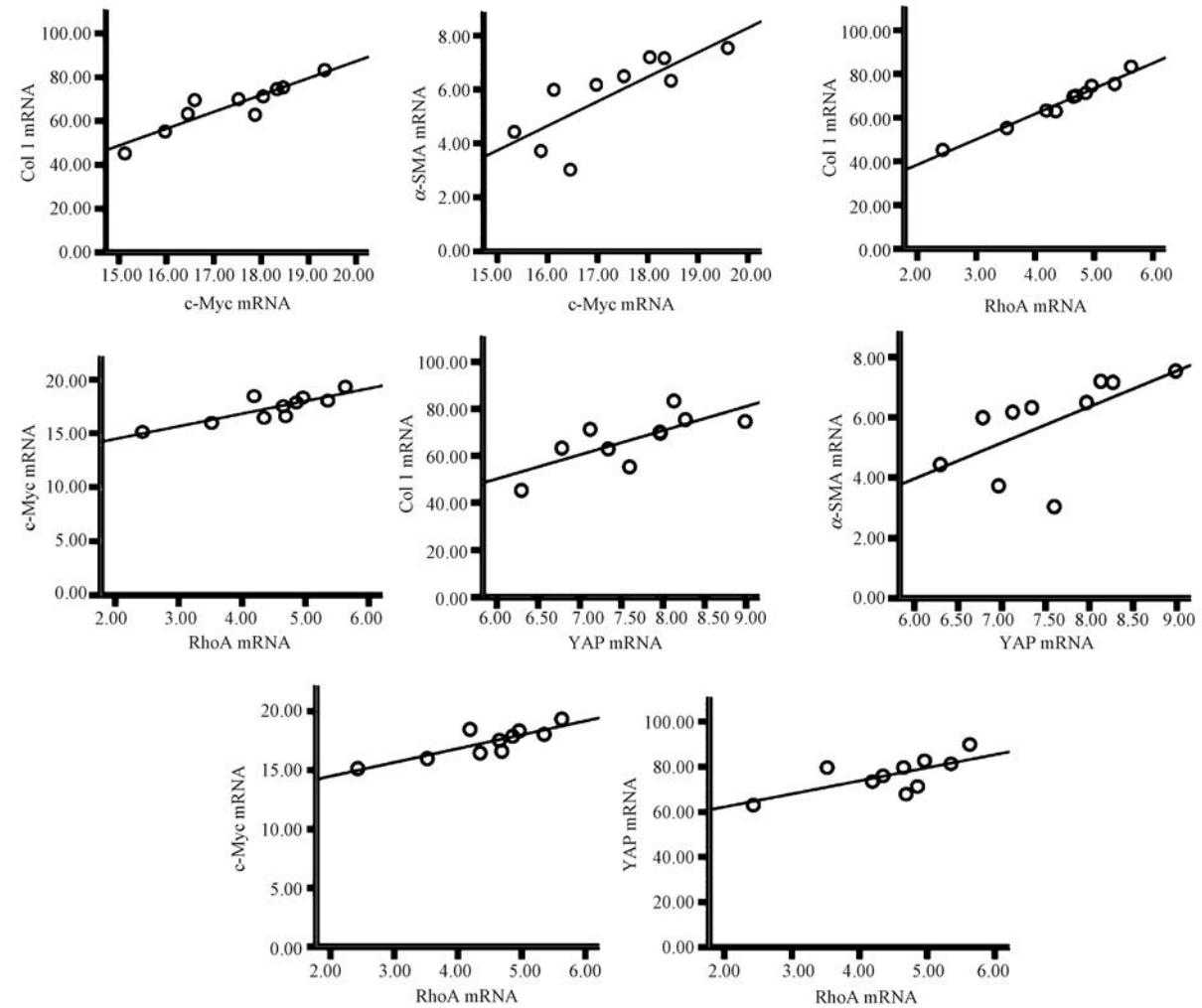


图 8 相关性分析

Figure 8 Correlation analysis

microRNA 的调控^[19],又可调控 YAP 活性,但 YAP 的激活又可诱导 ARHGAP29 转录从而抑制 RhoA 活性^[20]。在我们的研究中,RhoA 和 YAP 在腺嘌呤诱发 CKD 大鼠肾小管细胞胞核中均高表达,且 mRNA 相对表达量与 α -SMA、Col1mRNA 的相对表达量均呈明显正相关关系,表明二者可能参与了肾小管间质纤维化进程,且可能是通过 RhoA 转录调控 YAP 活性而实现的。

目前针对 YAP 在肾损伤中所扮演的角色尚无统一论。Leach 等^[21]认为,在缺血损伤的心肌细胞中抑制 YAP 活性,可以促使心肌细胞再生并改善心功能,并认为这可能同样适用于肾损伤及其修复。但也有人认为,心脏特异 YAP 的表达缺失会阻碍心肌再生,导致心肌纤维化^[22]。我们的研究结果显示,在腺嘌呤诱发的 CKD 大鼠模型中,YAP 在肾小管细胞胞核中的表达量是明显增加的,YAP mRNA 表达量较对照组也明显增加,8 周末达到最高。将 8 周末 YAP mRNA 表达水平与纤维化标志物 α -SMA 和 Col1mRNA 的表达水平进行相关性分析,结果显示 YAP mRNA 表达量与纤维化标志物 mRNA 呈明显正相关关系,表明在慢性肾病中 YAP 的表达活化可能促进肾间质纤维化。但需要注意的是,YAP 在肾小管上皮细胞中的早期表达可能是帮助 AKI 所致肾小管损伤修复的^[23],但当其表达超过某一界限值则可导致肾间质纤维化的发生,因此如何界定其界限范围尚有待更进一步的研究。

综上所述,c-Myc、RhoA、YAP 在腺嘌呤诱发 CKD 大鼠的表达可能促进了肾小管间质纤维化过程。此外,RhoA 和 c-Myc、YAP 之间也存在正相关关系,推测 RhoA 可能是联系 c-Myc 和 YAP 的桥梁,调控 c-Myc-RhoA-YAP 信号轴的活化可能延缓肾间质纤维化进程,但具体的机制有待进一步深入研究证实。

参考文献:

- [1] Tan HL, Yap JQ, Qian Q. Acute kidney injury: Tubular markers and risk for chronic kidney disease and end-stage kidney failure [J]. Blood Purif, 2016, 41(1-3): 144-150.
- [2] Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies [J]. Kidney Int, 2002, 62(1): 137-146.
- [3] Lan HY. Tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(1): 25-29.
- [4] 孙伟,曾安平,王钢,等. 肾小管间质病变与进行性肾小球损害 [J]. 医学综述, 1998, 4(10): 532-535.
- [5] 崔静,马晓燕. TGF- β 1/Smad 信号通路在腺嘌呤导致的肾纤维化大鼠肾脏组织中的作用与意义 [J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(4): 158-160.
- [6] 彭国璇,蔡颜嵘,李名浩,等. 肾间质纤维化相关信号通路的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 24(15): 4794-4796.
- [7] Nevzorova YA, Hu W, Cubero FJ, et al. Overexpression of c-myc in hepatocytes promotes activation of hepatic stellate cells and facilitates the onset of liver fibrosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(10): 1765-1775.
- [8] Shen Y, Miao N, Wang B, et al. c-Myc promotes renal fibrosis by inducing integrin α v-mediated transforming growth factor- β signaling [J]. Kidney Int, 2017, 92(4): 888-899.
- [9] Chen X, Gu W, Wang Q, et al. C-MYC and BCL-2 mediate YAP-regulated tumorigenesis in OSCC [J]. Oncotarget, 2017, 9(1): 668-679.
- [10] Meliambro K, Campbell KN. Hippo pathway deficiency and recovery from heart failure after myocardial infarction: potential implications for kidney disease [J]. Kidney Int, 2018, 93(2): 290-292.
- [11] Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(2): 199-207.
- [12] 徐小龙. 血浆 microRNA-29c 在单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化模型中的表达及意义 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [13] 马园园,刘成海,陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 398-403.
- [14] 肖程程,张杰. 肾纤维化的细胞和分子基础 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(7): 45-48.
- [15] Kelly K, Siebenlist U. The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells [J]. Annu Rev Immunol, 1986, 4: 317-338.
- [16] Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: More than just a matter of life and death [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10): 764-776.
- [17] Kim HJ, Choi HS, Park JH, et al. Regulation of RhoA activity by the cellular prion protein [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2668.
- [18] Chen J, Chen JK, Nagai K, et al. EGFR signaling promotes TGF- β -dependent renal fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(2): 215-224.
- [19] Kim JG, Islam R, Cho JY, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [20] Qiao Y, Chen J, Lim YB, et al. YAP regulates actin dynamics through ARHGAP29 and promotes metastasis [J]. Cell Rep, 2017, 19(8): 1495-1502.
- [21] Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction [J]. Nature, 2017, 550(7675): 260-264.
- [22] Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(34): 13839-13844.
- [23] Meliambro K, Campbell KN. Hippo pathway deficiency and recovery from heart failure after myocardial infarction: potential implications for kidney disease [J]. Kidney Int, 2018, 93(2): 290-292.

刘洁,温学娜,冯英,等. miR-335-5P 调控的 TGF- β 通路介导妊娠糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 85-91.

Liu J, Wen XN, Feng Y, et al. Insulin resistance and islet β cell secretion mediated by the miR-335-5P-regulated TGF- β pathway in gestational diabetes mellitus mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 85-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.013

miR-335-5P 调控的 TGF- β 通路介导妊娠糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的实验研究

刘洁^{1*}, 温学娜², 冯英¹, 李元元¹, 刘永莉¹

(1. 石家庄市第四医院产科, 石家庄 050011; 2. 辛集市第一医院产科, 河北 辛集 052360)

【摘要】 目的 使用 miR-335-5P 和转化因子- β (TGF- β) 处理妊娠期糖尿病 (GDM) 小鼠, 明确 miR-335-5P 调控 TGF- β 通路参与促进胰岛 β 细胞分泌和增强胰岛素抵抗机制, 为治疗 GDM 患者开辟新道路。**方法** SPF 级 Balb/c 小鼠以雌性和雄性小鼠 2:1 合笼饲养, 10 只正常妊娠小鼠作为空白组, 48 只成功构建 GDM 模型的小鼠作为 GDM 组并随机分成 A、B、C、D、E、F 组, 每组各 8 只小鼠。A 组 (模型组)、B 组 (模型组+溶媒)、C 组 (模型组+miR-335-5P 模拟物)、D 组 (模型组+miR-335-5P 抑制剂)、E 组 (模型组+si-TGF- β)、F 组 (模型组+miR-335-5P 抑制剂+si-TGF- β)。药物处理后行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 检测空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FIRI), 计算稳态模型胰岛素抵抗指数 (IRI); 进行高血糖钳夹试验测定葡萄糖输注速率 (GIR), 估计胰岛 β 细胞功能; 采用 RT-qPCR、蛋白质印迹分析和 ELISA 胰岛素释放测定胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 通路关键因子 mRNA 水平。**结果** D、F 组 FBG、FIRI、IRI 低于给药前低于 C、E 组 ($P<0.05$); D、F 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素高于给药前高于 C、E 组 ($P<0.05$); D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 C、E 组低于 A、B 组 ($P<0.05$); 在胰岛 β 细胞中检测到 miR-335-5P 表达时, TGF- β 、c-Myc 均有不同程度的表达; TGF- β 在胰岛 β 细胞胞质内表达, 且 D、F 组 TGF- β 表达高于 C、E 组高于 A、B 组 ($P<0.05$)。**结论** miR-335-5P 可上调 GDM 小鼠 c-Myc 表达, 进一步激活 TGF- β 通路, 增强胰岛素抵抗并抑制胰岛 β 细胞分泌。

【关键词】 miR-335-5P; TGF- β 通路; 妊娠糖尿病; 胰岛素抵抗; 胰岛 β 细胞分泌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0085-07

Insulin resistance and islet β cell secretion mediated by the miR-335-5P-regulated TGF- β pathway in gestational diabetes mellitus mice

LIU Jie^{1*}, WEN Xuena², FENG Ying¹, LI Yuanyuan¹, LIU Yongli¹

(1. Department of Obstetrics, Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China.

2. Department of Obstetrics, Xinji First Hospital, Xinji 052360)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism by which miR-335-5P regulates the transforming factor- β (TGF- β) pathway in promoting islet β cell secretion and enhancing insulin resistance in gestational diabetes mellitus (GDM) mice. **Methods** Specific pathogen free grade Balb/c mice were reared in cages at a female to male ratio of 2:1.

[基金项目] 河北省卫生和计划生育委员会项目 (20181064)。
[作者简介] 刘洁 (1981—) 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 妇产科。E-mail: liuliuhuaha@126.com

Ten normal pregnant mice were assigned to the blank group, and 48 mice were prepared as GDM model mice and divided into six groups for different drug treatments—groups A, B, C, D, E and F—with eight mice in each group. After drug treatment, fasting glucose (FBG) and fasting insulin (FIRI) were detected by the oral glucose tolerance test (OGTT), and the insulin resistance index (IRI) was calculated. The hyperinsulinemic-euglycemic clamp was used to determine the glucose infusion rate (GIR) and to estimate pancreatic islet β cell function. The levels of miR-335-5P and key islet β cell TGF- β pathway factor mRNAs and proteins were determined by RT-qPCR, western blot and ELISA analysis. **Results** After drug treatment, FBG, FIRI and IRI in groups D and F were decreased and were lower than respective values of groups C and E ($P<0.05$). GIR, first-phase insulin and maximum insulin in groups D and F were increased and were higher than respective values of groups C and E ($P<0.05$). The levels of miR-335-5P, TGF- β and c-Myc in groups D and F were lower than those of groups A, B, C and E ($P<0.05$). When miR-335-5P expression was detected in islet β cells, TGF- β and c-Myc were expressed at different levels. TGF- β was expressed in the cytoplasm of islet β cells, and the expression of TGF- β in groups D and F was higher than that in groups A, B, C and E ($P<0.05$). **Conclusions** miR-335-5P can up-regulate c-Myc expression in GDM mice, activate the TGF- β pathway, enhance insulin resistance and inhibit islet β -cell secretion.

[Keywords] miR-335-5P; TGF- β pathway; diabetes mellitus diabetes; insulin resistance; islet β cell secretion

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 指妊娠期首次发现的胰岛素相对、绝对缺乏或胰岛素抵抗引起的高血糖临床综合征, 我国发病率约 1%~5% 且呈逐年上升趋势^[1]。多数学者认为 GDM 与胰岛素抵抗有密切关系, 因妊娠期妇女本身存在葡萄糖相对不耐受。随着孕期增加、机体对胰岛素敏感性增强, 孕妇机体不能分泌足够胰岛素来满足机体需求而引起 GDM^[2-3]。GDM 患者体内异常的胰岛素抵抗作用可导致体内代谢和生理指标异常, 且对促进胰岛 β 细胞分泌具有显著作用。增强胰岛素抵抗作用、促进胰岛 β 细胞分泌是治疗 GDM 重要方向^[4]。miR-335-5P 抑制剂静脉给药可增强 GDM 胰岛抵抗作用, 可防止胰岛 β 细胞过度分泌^[5]。miR 作为小型非编码 RNA, 涉及转录抑制、靶向降解和基因沉默等生物过程^[6]。miR-335-5P 早被证实与人体胰岛素分泌指数呈显著负相关关系^[7]; 且有文献显示在 GDM 小鼠体内 miR-335-5P 呈高表达, 转化因子- β (transforming factor- β , TGF- β) 也呈高表达, 考虑两者具有协同促进作用^[8]。综合可得, miR-335-5P、TGF- β 可能与 GDM 发生和发展有关, 但目前对 TGF- β 增强机制及对 GDM 的影响尚存在争议。因此本研究就此展开报道, 以期探讨 miR-335-5P、TGF- β 与 GDM 胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的关系, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠 105 只, 雌性小鼠 70 只, 雄

性小鼠 35 只; 体重 20~25 g, 平均 (23.56 $\pm$ 2.54) kg, 6~8 周, 购于河北省中西医结合医药研究院 [SYXK (冀) 2020-006]。动物使用和处理符合中华人民共和国国家卫生研究院实验动物保护法和使用指导要求, 且通过河北省石家庄市医学动物伦理委员会批准 (IACUC20180105), 于河北医科大学 (实验动物公共服务平台) [SYXK (冀) 2020-002] 完成实验, 提供实验环境: 室温 18 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C、湿度 45%~50%、12 h 明/12 h 暗、动物自由摄食饮水。以雌性和雄性小鼠以 2:1 于 18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 温度、40%~70% 湿度系统中合笼饲养; 每天早晨 7 点对雌性小鼠进行阴栓检查, 发现阴栓即行阴超检查, 于光镜下观察精子, 精子和阴栓同时可见记为妊娠第 1 天; 持续观察 7 d, 7 d 内妊娠雌性小鼠 ($n=60$) 列为研究对象。实验过程中掌握熟练轻柔的操作技巧、经常观察小鼠状态、对废弃小鼠实施安乐死等, 严格遵守动物实验过程中的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 (湖南汇百特生物科技有限公司, 国药准字 H20020475); 无义序列 NC (北京百奥莱博科技有限公司); miR-335-5P 模拟物、miR-335-5P 抑制剂、si-TGF- β 均购自上海科敏生物科技有限公司; 酶联免疫试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 注射用异戊巴比妥钠 (上海上药新亚药业有限公司, 国药准字 H31021725); 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer solution, PBS) 购于南京科佰生物科技有限公司; 饱和碳酸锂 (上海恒远生物科技有限公司); 4% 多聚甲醛 (上海立瑶生物有限公司); 二甲苯 (北京百奥莱博科技有限公司); 75% 乙醇、

80%乙醇、95%乙醇、100%乙醇购于上海恒远生物科技有限公司;苏木素-伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色液试剂盒购于迈瑞生物科技有限公司;中性树胶(南京科佰生物科技有限公司);鼠抗人TGF- β 多克隆抗体(上海田源生物技术有限公司);DAB显色试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司);羊抗鼠IgG(上海立瑶生物有限公司);柠檬酸钠缓冲液(长沙达尔锋生物科技有限公司);总RNA提取试剂盒(上海硕嘉生物科技有限公司);异丙醇(苏州骏宇化工有限公司);反转录试剂盒(山东佰仟化工有限公司);miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc引物均购自上海康润生物科技有限公司;琼脂糖(四川科伦药业有限公司);PCR反应液(北京索莱宝科技有限公司);RT-PCR扩增试剂盒购于Sigma;TRIzol裂解液购于迈瑞生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 建模及干预方法

①将60只妊娠小鼠分开喂养,随机分为空白组($n=10$)和GDM组($n=50$),禁食12 h后GDM组腹腔注射50 mg/kg链脲佐菌素(必要时用0.1 mol/L柠檬酸溶液稀释,15 min内完成),空白组注射等量柠檬酸溶液;4 h后投喂普通饲料,自由饮水;于妊娠18 d采用口服葡萄糖耐量试验(OGTT)测量空腹血糖(fasting blood sugar, FBG)、空腹胰岛素(FIRI)和胰岛素抵抗指数(IRI)。GDM组共得GDM模型小鼠48只,构建GDM小鼠成功标准:妊娠第18天妊娠小鼠FBG <5.1 mmol/L,且FIRI、IRI均升高;②将48只成功构建GDM模型的小鼠随机分成A、B、C、D、E、F组,每组各8只小鼠,A组(模型组)、B组(模型组+无义序列NC溶媒)、C组(模型组+miR-335-5P模拟物)、D组(模型组+miR-335-5P抑制剂)、E组(模型组+si-TGF- β)、F组(模型组+miR-335-5P抑制剂+si-TGF- β),均经尾静脉注射,注射后可正常饮食和饮水。

1.3.2 OGTT实验

妊娠第17天晚上禁食禁水8~10 h,次日晨抽取空腹尾静脉血后灌喂2.0 g/kg葡萄糖水溶液,并于服糖后0.5 h、1 h、2 h同法抽取尾静脉血,1000 r/min离心20 min进行血清分离并贮存于-80℃冰箱中;采用血糖仪和血糖试纸条测量血糖浓度,图谱记录口服葡萄糖耐量;放射免疫法测定FINS,仪器为I2000sk化学发光免疫分析仪(美国雅培生物有限公司);根据公式 $IRI = -\ln(1/FINS \times FPG)$ 计算

IRI,IRI越大,表明机体对胰岛素敏感度越低,胰岛素抵抗力越强。

1.3.3 高葡萄糖钳夹技术

妊娠第19天从GDM组中各选择4只小鼠共24只、空白组中选择5只小鼠进行高血糖钳夹技术:禁食4 h,经腹腔麻醉注射剂量为50 mg/kg戊巴比妥钠,固定和颈静脉插管;待小鼠状态稳定后通过尾尖收集血样50 μ L用于测定FBG和FINS;通过颈静脉插管注射初始剂量葡萄糖100 mg/kg后,连续注射20%葡萄糖溶液,每5 min监测血糖;调节葡萄糖输注速率(glucose infusion rate, GIR)使血糖维持于(14.0 $\pm$ 0.5) mmol/L;在血糖稳定后5个时间点获得平均GIR作为稳态GIR;收集初始剂量葡萄糖负荷后1~15 min内处于稳定状态的血液样品,确定第一时相胰岛素和最大胰岛素分泌;根据GIR值观察 β 细胞功能。

1.3.4 HE染色

妊娠第19天选择未经高血糖钳夹技术小鼠(GDM组中各4只小鼠共24只、空白组中5只小鼠)进行空气栓塞法处死,取小鼠胰岛组织用10%甲醛溶液固定,修剪,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋成块,切成5 μ m连续切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素染色,流水冲洗,1%盐酸溶液分化数秒,流水冲洗,伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察HE染色结果。

1.3.5 免疫组织化学法

取得“1.3.4”中样品于10%甲醛溶液中进行固定,脱水,用石蜡包埋,切成4 μ m连续切片,依次脱蜡、修复、梯度乙醇水化、PBS漂洗、内源性过氧化物酶活性消除;滴加小鼠抗人TGF- β 多克隆抗体(浓度1:100)4℃孵育过夜,PBS漂洗;滴加即用型生物素化二抗37℃孵育30 min,PBS漂洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育20 min,PBS漂洗,经DAB显色、苏木素复染、脱水、透明、封片,用于观察TGF- β 表达。判定标准:由两名具有执业资格的病理科医生采用双盲法对结果进行判断和分析,染色强度:0分为不着色,1分为淡黄色,2分为深黄色,3分为棕黄色;阳性细胞百分率:0分为阳性细胞百分率0%~5%,1分为阳性细胞率5%~25%,2分为阳性细胞率26%~50%,3分为阳性细胞率51%~75%,4分为阳性细胞百分率>75%;两项之和进行综合判定: ≤ 3 分为阴性, >3 分为阳性。

1.3.6 RT-PCR 法

采用总 RNA 提取试剂盒提取血液总 RNA,总 RNA 逆转录成 cDNA,以此 cDNA 为模板参照引物和探针序列进行扩增,反应条件为:95℃ 预变性 120 s,95℃ 变性 30 s,72℃ 退火延伸 15 s,35 次循环。根据扩增曲线读取循环数(Ct),基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,以 β -actin 和 GAPDH 为内参照,计算 GDM 小鼠血清中 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Snk-*q* 检验;采用非参数检验 Mann-Whitney 法检验分级资料;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 OGTT 实验指标比较

空白组给药前后 FBG、FIRI、IRI 均低于 GDM 组 (*P*<0.05);给药前,GDM 各组 FBG、FIRI、IRI 比较 *P*>0.05;给药后,A、B 组 FBG、FIRI、IRI 与给药前比较 *P*>0.05,D、F 组 FBG、FIRI、IRI 低于给药前低于 C、E 组 (*P*<0.05);见表 1。

2.2 各组胰岛 β 细胞功能比较

空白组给药前后 GIR、第一时相胰岛素、最大胰

岛素均高于 GDM 组 (*P*<0.05);给药前,GDM 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素比较 *P*>0.05;给药后,A、B 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素与给药前比较 *P*>0.05,D、F 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素高于给药前高于 C、E 组 (*P*<0.05),C、E 组 GIR、第一时相胰岛素、最大胰岛素低于给药前 (*P*<0.05);见表 2。

2.3 各组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 通路关键因子表达水平

空白组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 GDM 组 (*P*<0.05);C、E 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达升高,D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达下降;且 D、F 组 miR-335-5P、TGF- β 、c-Myc 表达低于 C、E 组低于 A、B 组 (*P*<0.05);见图 1。

2.4 miR-335-5P 与 TGF- β 、c-Myc 关系

TGF- β 在胰岛 β 细胞胞质内表达、为棕黄色,c-Myc 在胰岛 β 细胞胞质或细胞膜内表达、可显示为黑色颗粒,在胰岛 β 细胞中检测到 miR-335-5P 表达时,TGF- β 、c-Myc 均有不同程度表达,见图 2。D、F 组 TGF- β 表达高于 C、E 组高于 A、B 组 (*P*<0.05),见图 3、图 4。

表 1 各组 OGTT 实验指标比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of OGTT experimental indexes among groups

组别 Groups	例数 <i>n</i>	空腹血糖 (mmol/L)		空腹胰岛素 (mIU/L)		胰岛素抵抗指数	
		FBG		FIRI		IRI	
		给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After
空白组 Blank group	10	2.63±0.41	2.58±0.36	19.11±6.63	18.44±5.21	2.43±0.65	2.41±0.74
A 组 Group A	8	5.43±1.54	5.51±1.69	26.68±8.46	27.32±7.54	6.21±2.30	6.30±2.18
B 组 Group B	8	5.55±1.62	5.49±1.73	25.71±9.97	26.01±8.66	6.18±2.26	6.28±2.24
C 组 Group C	8	5.34±1.60	8.21±2.65 ^{①②④}	24.88±9.63	40.52±12.67 ^{①②④}	6.24±2.34	4.15±1.41 ^{①②④}
D 组 Group D	8	5.60±1.46	3.11±0.42 ^{①②③⑤}	25.93±9.89	20.20±4.33 ^{①②③⑤}	6.30±2.18	3.05±0.06 ^{①②③⑤}
E 组 Group E	8	5.62±1.55	8.33±2.53 ^{①②④}	26.35±8.57	41.36±13.68 ^{①②④}	6.23±2.41	4.22±1.23 ^{①②④}
F 组 Group F	8	5.51±1.44	5.36±1.01 ^{①②③④⑤}	26.42±8.84	25.16±7.60 ^{①②③④⑤}	6.34±2.27	3.66±0.68 ^{①②③④⑤}

注:给药后,与 A 组比较,^①*P*<0.05;与 B 组比较,^②*P*<0.05;与 C 组比较,^③*P*<0.05;与 D 组比较,^④*P*<0.05;与 E 组比较,^⑤*P*<0.05。
Note. After administration, Compared with group A, ^①*P*<0.05. Compared with group B, ^②*P*<0.05. Compared with group C, ^③*P*<0.05. Compared with group D, ^④*P*<0.05. Compared with group E, ^⑤*P*<0.05.

表 2 各组胰岛 β 细胞功能比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of islet β cell function in each group

组别 Groups	例数 <i>n</i>	葡萄糖输注速率 mg/(kg·min)		第一时相胰岛素 (ng/mL)		最大胰岛素 (ng/mL)	
		GIR		First-phase insulin		Maximum insulin	
		给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After	给药前 Before	给药后 After
空白组 Blank group	5	30.54±12.36	30.10±15.45	18.26±5.64	18.51±5.14	202.43±50.65	203.61±49.87
A 组 Group A	4	20.11±13.02	19.89±12.04	11.13±3.21	10.65±3.36	126.32±32.30	128.32±32.61
B 组 Group B	4	20.43±12.65	20.14±11.58	10.79±3.55	11.06±3.43	128.63±30.54	126.74±30.87
C 组 Group C	4	19.86±12.87	13.02±8.54 ^{①②④}	11.26±3.31	6.24±2.16 ^{①②④}	126.51±29.87	100.30±12.35 ^{①②④}
D 组 Group D	4	20.33±13.13	28.63±14.21 ^{①②③⑤}	11.22±3.54	17.68±4.21 ^{①②③⑤}	126.74±30.51	193.54±35.30 ^{①②③⑤}
E 组 Group E	4	20.14±12.25	13.32±8.36 ^{①②④}	10.87±3.20	6.13±2.30 ^{①②④}	127.69±32.13	104.15±11.36 ^{①②④}
F 组 Group F	4	19.87±12.36	21.49±10.72 ^{①②③④⑤}	11.16±3.18	15.09±3.54 ^{①②③④⑤}	126.59±33.06	178.62±15.78 ^{①②③④⑤}

注:给药后,与 A 组比较,^①*P*<0.05;与 B 组比较,^②*P*<0.05;与 C 组比较,^③*P*<0.05;与 D 组比较,^④*P*<0.05;与 E 组比较,^⑤*P*<0.05。
Note. After administration, Compared with group A, ^①*P*<0.05. Compared with group B, ^②*P*<0.05. Compared with group C, ^③*P*<0.05. Compared with group D, ^④*P*<0.05. Compared with group E, ^⑤*P*<0.05.

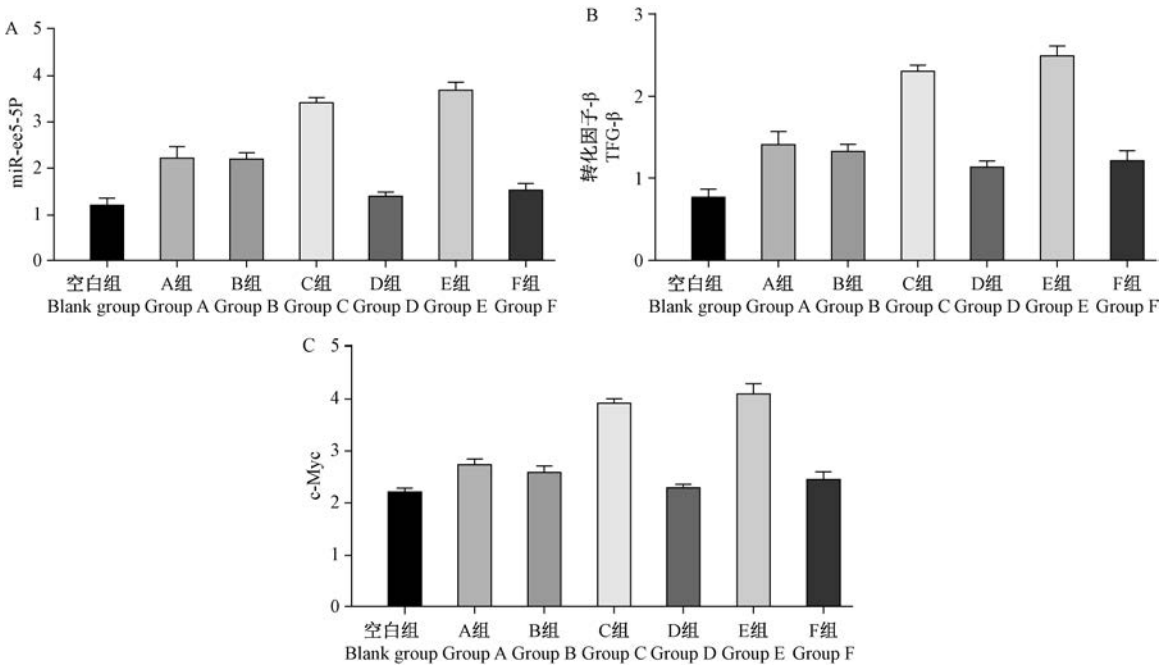


图 1 各组胰岛 β 细胞中 miR-335-5P、TGF-β 通路关键因子表达水平
Figure 1 Expression level of miR-335-5P and TGF - β key factors in islet β cells of each group

3 讨论

目前,关于 GDM 发病机制主要归纳为:孕妇妊娠期间分泌孕激素、糖皮质激素、胎盘生乳素等具有胰岛素抵抗作用的激素;且随着孕周增加含量随之升高,造成体内肝、肌肉等组织对胰岛素敏感性下降,若无法补偿胰岛素抵抗的增加,可引起体内

高胰岛素和高血糖,进而发展为 GDM^[9]。GDM 可导致孕妇血糖、脂肪、蛋白质代谢功能紊乱,发生巨大儿、羊水过多、自然流产、胎儿畸形、死胎、死产、新生儿低血糖、高胆红素血症、孕妇酮症酸中毒等,对母婴危害较大^[10]。基于 GDM 发病机制,最新研究认为胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌与该病发生和发展关系密切。

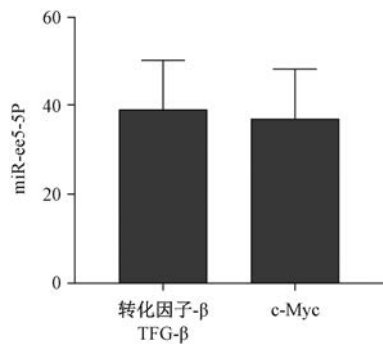


图 2 miR-335-5P 与 TGF-β、c-Myc 关系
Figure 2 Relationship between miR-335-5P, TGF-β and c-Mycall

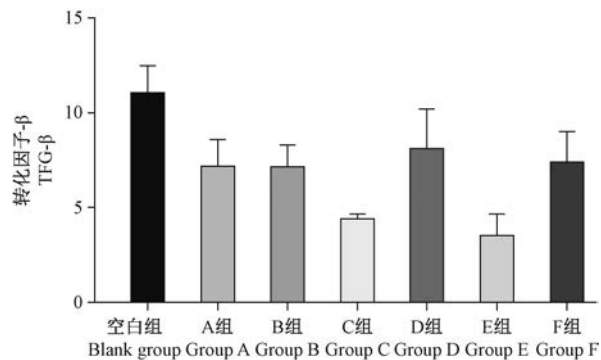
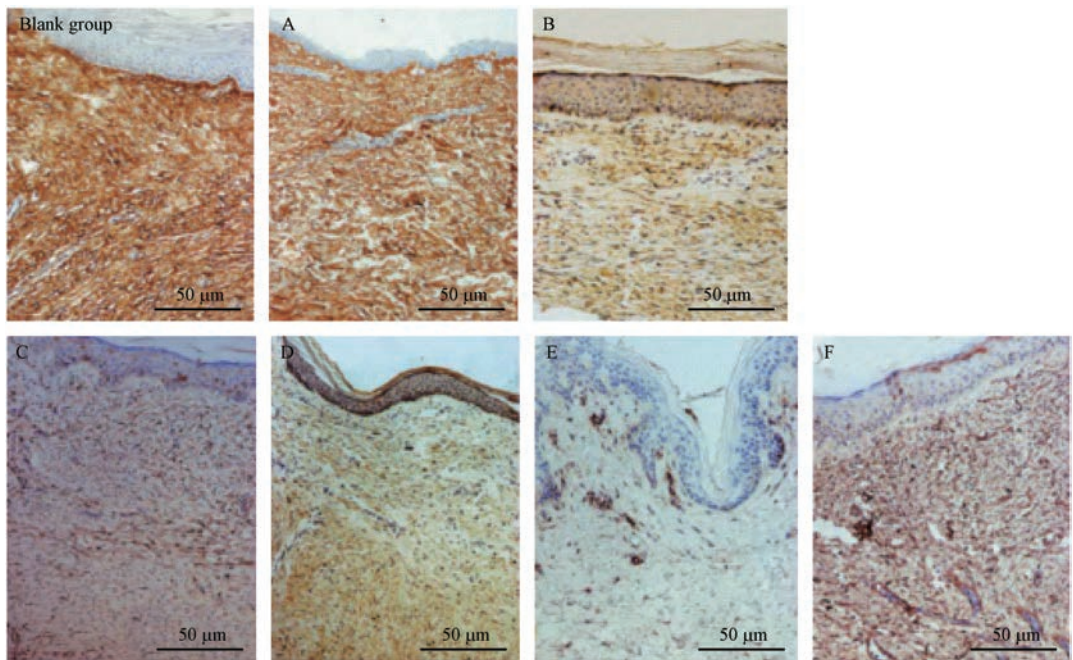


图 3 TGF-β 阳性表达图
Figure 3 TGF - β positive expression



注：A、B、C、D、E、F 分别表示为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组、F 组。
图 4 免疫组织化学染色图
Note. A, B, C, D, E and F were expressed as group A, B, C, D, E and F, respectively.
Figure 4 Immunohistochemical staining

早有研究证实,TGF-β 信号可调控细胞增殖、分化、凋亡及胚胎发育等,而 TGF-β 信号通路的精准调控对疾病治疗具有积极意义^[11]。有研究指出在胰岛细胞损伤应答过程中,miR-335-5P 与 TGF-β 信号通路间存在一定交叉对话,提示 miR-335-5P 可能对调控 TGF-β 有一定价值^[12]。张琳^[13]的研究指出,miR-335-5P 通过与胰岛表皮因子竞争结合位点抑制胰岛 α 细胞糖化,由此激活各种细胞因子引起的 TGF-β 信号通路,从而阻断其分泌胰高血糖素。miR-335-5P 现已广泛应用于各种疾病治疗,且在肝

癌、乳腺癌等多种肿瘤疾病中均有应用。本研究结果显示,miR-335-5P 上调,可提高 FBG、FIRI、IRI 水平,进一步减少胰岛素分泌,这与赵茜等^[14]的研究结果较为一致。探讨 miR-335-5P 作用机制,考虑其临床有效性与激活 TGF-β 信号转导通路,提高 c-Myc 表达有关。c-Myc 是近年来发现的一个新的 TGF-β 信号调控因子;且在多篇研究中已指出 c-Myc 可提高 TGF-β 稳定性,促进其信号传递和靶基因转录^[15-16];石永英等^[17]文献指出 c-Myc 可提高 TGF-β 对癌细胞增殖、分化抑制作用。综合文献可

得,探讨 c-Myc、TGF-β 表达水平可提高对机体分化和死亡情况预测价值。另 Tagoma 等^[18]在研究中已表明,miR-335-5P 对减少胰岛素信号传导及脂质代谢相关基因有重要价值;Wang 等^[19]发现 miR-335-5P 表达较高组,胰岛素表达下降;Osorio-Yanez 等^[20]将 miR-335-5P 作用于人胰岛细胞,发现其能特异性阻断炎症因子介导的信号转导通路,而激活 TGF-β 通路信号。这些发现与本研究结果一致,提示 miR-335-5P 可提高 TGF-β 表达。为进一步证实 miR-335-5P 与 TGF-β 之间的关系,本文对其相对表达量进行探讨分析,得在胰岛 β 细胞中 miR-335-5P 表达时,TGF-β、c-Myc 均有不同程度表达,且 miR-335-5P 上调时 TGF-β、c-Myc 表达也升高。而当 TGF-β、c-Myc 和 miR-335-5P 均呈高表达时,发现胰岛 β 细胞中液泡和有序细胞减少,提示 TGF-β、miR-335-5P 对 GDM 小鼠葡萄糖耐量和胰岛素抵抗改善具有促进作用。

综上,miR-335-5P 通过激活 TGF-β 信号通路对 GDM 胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌产生积极作用,可为 GDM 治疗提供临床依据。但由于本实验受时间限制,且实验主要涉及动物有待探索更多研究对象作进一步研究。

参考文献:

[1] Erath H, Herath R, Wickremasinghe R. Gestational diabetes mellitus and risk of type 2 diabetes 10 years after the index pregnancy in Sri Lankan women—A community based retrospective cohort study [J]. PLoS One, 2017, 12 (6): e0179647.

[2] 张宁娟,李华萍. 妊娠期糖尿病胰岛素分泌模式与胰岛功能评估的探讨 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018, 34 (11): 1261-1266.

[3] 吴莲,张婷. 胰岛素对不同孕周妊娠期糖尿病患者血糖水平及妊娠结局的影响 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2017, 9 (8): 39-41,46.

[4] 刘丽丽. 妊娠糖尿病患者胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能状态变化 [J]. 中国实用医刊, 2017, 44 (2): 30-33.

[5] Pheiffer C, Dias S, Rheeder P, et al. Decreased expression of circulating miR-20a-5p in south african women with gestational diabetes mellitus [J]. Mol Diagn Ther, 2018, 22 (3): 345-352.

[6] 孙晓兰,陈敏. 2 型糖尿病不同尿白蛋白排泄率患者血清中 miR-342-5p、miR-423-5p 的表达量及临床意义 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23 (1): 62-65.

[7] Sebastiani G, Guarino E, Grieco GE, et al. Circulating

microRNA (miRNA) expression profiling in plasma of patients with gestational diabetes mellitus reveals upregulation of miRNA miR-330-3p [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 13 (8): 345-348.

[8] 彭麒麟,耿建国,邹大威,等. 糖肾宁对高糖培养的小鼠系膜细胞 TGF-β1 和 P38MAPK 表达的影响 [J]. 环球中医药, 2017, 10 (3): 265-269.

[9] 侯艳萍,王丽. 妊娠期糖尿病患者孕期体质指数、血清游离脂肪酸与胰岛素抵抗之间的关系 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33 (3): 518-520.

[10] 李小勤,钱增堃,朱文娟,等. 胰岛素和胰岛素样生长因子与肿瘤的相关性研究进展 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34 (1): 77-79.

[11] Tang XW, Qin QX. miR-335-5P induces insulin resistance and pancreatic islet β-cell secretion in gestational diabetes mellitus mice through VASH1-mediated TGF-β signaling pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (5): 6654-6666.

[12] 梁师钢,姚丽君,王玉梅. TRB3 在糖尿病肾病中的表达及调控 Notch 信号通路对人肾小管上皮细胞增殖凋亡的实验研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2018, 19 (4): 292-295,378.

[13] 张琳. TGF-β1/Smad 信号通路在糖尿病大鼠心肌组织中的表达变化及干预研究 [D]. 天津:天津医科大学, 2012.

[14] 赵茜,张巧. 新诊断 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗指数、空腹甘油三酯及葡萄糖简易指数、空腹血糖/空腹胰岛素与正常血糖高胰岛素钳夹试验的一致性分析 [J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25 (12): 1083-1085.

[15] 王宁,朴成哲,孟晓娜. Runx3 和 c-Myc 蛋白在 TGF-β 抑制 MG-63 细胞增殖中作用 [J]. 解剖科学进展, 2018, 24 (1): 65-68.

[16] Lekva T, Michelsen AE, Aukrust P, et al. Leptin and adiponectin as predictors of cardiovascular risk after gestational diabetes mellitus [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16 (1): 5.

[17] 石永英,卢俊江,陈广原,等. p15 与 c-Myc 在 TGF-β1 诱导的大鼠心肌细胞肥大中的表达及与 TGF/Smad 信号通路的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26 (3): 245-252.

[18] Tagoma A, Alnek K, Kirss A, et al. MicroRNA profiling of second trimester maternal plasma shows upregulation of miR-195-5p in patients with gestational diabetes [J]. Gene, 2018, 672: 137-142.

[19] Wang Y, Yang T, Zhang Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes migration and invasion by acting as a ceRNA of miR-335-5P in osteosarcoma cells [J]. Cancer Sci, 2017, 108 (5): 859-867.

[20] Osorio-Yanez C, Qiu C, Gelaye B. Risk of gestational diabetes mellitus in relation to maternal dietary calcium intake [J]. Public Health Nutr, 2017, 20 (6): 1082-1089.

刘帅,宋佳阳,吕赛,等. 环境丰容对 SD 大鼠行为和肾上腺皮质激素的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 92-97.

Liu S, Song JY, Lyu S, et al. Effect of environmental enrichment on behavior and cortin levels in SD rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 92-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.014

环境丰容对 SD 大鼠行为和肾上腺皮质激素的影响研究

刘 帅,宋佳阳,吕 赛,李军延*

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所,北京 100050)

【摘要】 目的 研究评价不同的环境丰容方案对大鼠行为和肾上腺皮质激素的影响。**方法** 45 只 6 周龄雄性 SD 大鼠,随机分为 4 组,单笼组 9 只,单笼饲养。新奇组、丰容组和对照组各 12 只,3 只/笼饲养。新奇组提供由筑巢材料、遮蔽物、磨牙棒 3 种丰容材料组成的复合丰容方案,并每周更换不同的组合方案。丰容组只提供 1 种丰容材料,丰容材料在更换垫料时根据损耗情况及时更新。对照组和单笼组不提供丰容材料。连续丰容 9 周,采用瞬时扫描法记录大鼠行为时间分配,利用 ELISA 试剂盒检测血清和尿中促肾上腺皮质激素 (ACTH) 及皮质酮 (CORT) 浓度。**结果** 新奇组探究行为显著高于其他组,单笼组不活跃行为增加,单纯性活动行为极显著增加,丰容组和对照组无显著差异。血清中 ACTH 和 CORT 的浓度各组间无显著性差异。尿液中 ACTH 和 CORT 浓度呈现新奇组>单笼组>对照组>丰容组的趋势,但除新奇组 ACTH 极显著高于其他三组,其他差异不显著。**结论** 单笼饲养抑制 SD 大鼠行为表达,是对动物福利的损害,而复合新奇的丰容方案虽增加大鼠探究行为等积极行为,但同时肾上腺皮质激素也有影响,实际应用时应根据具体饲养条件选择简单实用的环境丰容材料和方案。

【关键词】 SD 大鼠;环境丰容;行为时间分配;促肾上腺皮质激素;皮质酮

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0092-06

Effect of environmental enrichment on behavior and cortin levels in SD rats

LIU Shuai, SONG Jiayang, LYU Sai, LI Junyan*

(National Institute of Occupational Health and Poison Control, China CDC, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective This study focused on the effects of different enrichment designs on behavior and cortin levels in male SD rats. **Methods** Forty-five 6-week-old male specific pathogen free SD rats were randomly divided into four groups. The single cage group had nine rats and the other three groups each had 12 rats. The novelty group was housed in a composite environmental enrichment scheme composed of nesting material, shelter, grinding rods, and a new scheme was provided every week. The environmental enrichment group provided one kind of material every week. The control group and the single cage group did not receive enrichment. The experiment lasted 9 weeks. Behavior was sampled using instantaneous scanning sampling method. Serum and urine adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) levels were measured. **Results** Novelty group rats exhibited more exploring behaviors than rats in the other groups. Rats of the single cage group increased their inactive behavior. No significant differences were found among groups in the serum levels of ACTH or CORT. However, in urine, the concentration of ACTH and CORT showed the following trend: novel group>single cage group>control group> environmental enrichment group. **Conclusions** Single cage housing inhibits the expression of

[基金项目] 职业卫生与中毒控制所青年科技基金项目 (DW201502)。

[作者简介] 刘帅 (1985—),男,助理研究员,硕士,主要从事实验动物学研究。E-mail: cauvet@126.com

[通信作者] 李军延 (1963—),女,研究员,本科,主要从事实验动物及管理研究。E-mail: lijy1@chinacdc.cn

behaviors in SD rats, which is detrimental to their welfare. However, the complex novel enrichment program increased positive behaviors, such as exploration behavior and also has an effect on adrenocortical hormones. In practice, simple and practical environmental enrichment materials and schemes should be selected according to specific housing conditions.

[Keywords] SD rats; environmental enrichment; behavioral time budget; ACTH; CORT

环境丰容(environmental enrichment)又称为环境丰富,作为提高实验动物福利的有效手段,近年来在行业内逐渐受到重视,应用也逐渐广泛^[1]。国外对此进行了大量的研究,从动物行为和生理指标两方面对环境丰容的作用进行了评估。但不同的研究结论常常不一致^[2],给我们的参考应用带来困惑。统计发现约有 70% 的文献报道环境丰容提高了动物福利,10% 左右的文献报道环境丰容并未达到预期效果。差异的研究结果表明环境丰容的作用与采用的环境丰容的方式、作用时间,应用动物的品系、性别有关^[3]。而目前我国实验动物环境丰容的研究较少,行业内还没有关于环境丰富应用的行业指南或是标准,各单位都是根据自己需要进行丰富,丰富的方式和选择的材料都不统一,其实施过程多种多样,而我们对于这些应用对实验动物福利的提升及生物学指标的影响知之甚少。因此本研究选择了市售的 3 类功能 8 种材料组成了不同的环境丰容方案,从行为及生理角度评价不同环境丰容的效果及对 SD 大鼠的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

45 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体重 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。饲养于中国疾病预防控制中心动物实验室屏障环境[SYXK(京)2019-

0050],饲喂⁶⁰Co 灭菌大小鼠维持饲料。饮水经反渗透紫外杀菌处理。本研究通过了中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所实验动物管理与福利伦理审查委员会审查(EAWE-2015-007)。

1.2 主要试剂与仪器

大鼠皮质酮(CORT)酶联免疫分析试剂盒、大鼠促肾上腺皮质激素(ACTH)酶联免疫分析试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司;5417R 低温离心机购自 Eppendorf 公司;MultiskanMK3 型酶标仪购自 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

大鼠随机分为 4 组,其中单笼组 9 只,单笼饲养于白色不透明笼盒内。新奇组、丰容组、对照组各 12 只,3 只/笼饲养于透明笼盒内。所有笼盒尺寸都为:47 cm×31.5 cm×20 cm。盒内添加杨木刨花和玉米芯颗粒为基础垫料。

1.3.2 环境丰容方案

丰容材料购自益新(中国)有限公司和北京美绿洲生物科技有限公司,包括 3 种功能的 8 种材料,详见表 1。

新奇组由表 1 中的 3 种功能的丰容材料各取一种构成 8 种丰容组合,每周提供一种组合,连续丰容 8 周,期间丰容材料有损坏会及时更换。新奇组具体丰容方案见表 2。

表 1 环境丰容材料
Table 1 Environmental enrichment items

功能 Function	品种 Items
筑巢材料 Nesting material	纸屑 Shredded paper、棉棒 Cotton
遮蔽物 Shelter	纸筒 Paper tube、纸屋 Rodent retreat、爬上球 Crawl ball、管道 Nylon tube
磨牙棒 Grinding rods	木棒 Woodenrods、尼龙棒 Nylonrods

表 2 新奇组丰容方案
Table 2 Enrichment program of novelty group

组合 1 NO.1	组合 2 NO.2	组合 3 NO.3	组合 4 NO.4	组合 5 NO.5	组合 6 NO.6	组合 7 NO.7	组合 8 NO.8
纸屑 Shredded paper	纸屑 Shredded paper	棉棒 Cotton	棉棒 Cotton	纸屑 Shredded paper	纸屑 Shredded paper	棉棒 Cotton	棉棒 Cotton
纸屋 Rodent retreat	纸筒 Paper tube	管道 Nylon tube	爬上球 Crawl ball	管道 Nylon tube	爬上球 Crawl ball	纸屋 Rodent retreat	纸筒 Paper tube
尼龙棒 Nylon rods	木棒 Wooden rods	尼龙棒 Nylon rods	木棒 Wooden rods	尼龙棒 Nylon rods	木棒 Wooden rods	尼龙棒 Nylon rods	木棒 Wooden rods

丰容组动物只提供 3 种功能丰容材料中的一类,同样是每周更换,期间有损坏会及时更换。对照组和单笼组不添加丰容材料。丰容组具体丰容方案见表 3。

1.3.3 检测指标

(1)大鼠行为观察

实验第 9 周,采用瞬时扫描法记录大鼠行为^[4]。行为观察记录由同一个观察者完成,观察者提前 10 min 进入动物饲养室,让动物熟悉一下后再进行观察记录。每日观察时间为上午 10~11 点,下午 4~5 点,连续观察 7 d,共 14 h。

采用瞬时扫描法顺序观察笼盒内的每一只动物,扫描间隔为 10 s(即每只动物观察 10 s),则 1 h

的观察时段内每只动物可记录 8 个行为频次,连续 7 d 的观察后,每只动物可以记录 112 个行为频次。

结合对大鼠行为的观察和文献描述制定大鼠行为谱^[4],详见表 4。

(2)大鼠促肾上腺皮质激素和皮质酮的测定

试验第 7 周时抓取大鼠按摩腹部促进排尿,每只取尿样 50 μL,-20℃ 冻存。9 周后解剖时取腹主动脉血,分离血清-20℃ 冻存。用购自上海江莱生物科技有限公司的 ELISA 检测试剂盒检测尿液和血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)浓度。

表 3 丰容组丰容方案
Table 3 Enrichment program of environmental enrichment group

大鼠编号 Number of rats	第 1 周 First week	第 2 周 Second week	第 3 周 Third week	第 4 周 Forth week	第 5 周 Fifth week	第 6 周 Sixth week	第 7 周 Seventh week	第 8 周 Eighth week
1~3	纸屑 Shredded paper	纸屑 Shredded paper	棉棒 Cotton	棉棒 Cotton	纸屑 Shredded paper	纸屑 Shredded paper	棉棒 Cotton	棉棒 Cotton
4~9	纸屋 Rodent retreat	纸筒 Paper tube	管道 Nylon tube	爬上球 Crawl ball	管道 Nylon tube	爬上球 Crawl ball	纸屋 Rodent retreat	纸筒 Paper tube
10~12	尼龙棒 Nylonrods	木棒 Woodenrods	尼龙棒 Nylonrods	木棒 Woodenrods	尼龙棒 Nylonrods	木棒 Woodenrods	尼龙棒 Nylonrods	木棒 Woodenrods

表 4 大鼠行为谱
Table 4 Ethogram for behavioural elements recorded

行为类别 Category	行为 Behavior	描述 Description
(A)一般行为 General activities	(1)采食 Feeding	从料盒内啃食饲料 Eating food from food hopper
	(2)饮水 Drinking	从水嘴处饮水 Drinking water from waterspouts
	(3)梳理哈欠 Non-intake maintenance	梳理自己的毛发,伸体哈欠 Self-grooming and pandiculation, stretching and yawning
(B)活跃行为 Movement activities	(1)活动 Movement activities	在笼盒内运动 Movement and/or climbing the cage lid
	(2)探究 Exploratory behaviour	嗅探笼盒壁、笼盒盖及嗅探笼盒外的空气 Sniffing cage wall, cage top and sniffing air outside the cage
	(3)控制垫料 Bedding-directed behaviour	嗅探垫料、吃垫料,挖掘操纵垫料 Sniffing bedding, eating bedding, bedding manipulation and burrowing
(C)不活跃行为 Static behavior	(1)清醒不动 Awake non-active	静止不动的躺、坐、站立,不伴有四肢或头部的活动 Alert, eyes opened but with no directed attention while sitting, standing or leaning against a cage side, mate, food pot or a cage structure
	(2)睡觉 Sleep	静止不动的躺着同时两眼闭合 Lying unalert with both eyes closed-apparently asleep
(D)社会行为 Social interaction	(1)非攻社交 Non-aggressive social interaction	互相梳理毛发,打闹嬉戏 Allogrooming given and Allogrooming received
	(2)攻击 Agonism	攻击、逃避、姑息、防御等敌对行为 Aggression/Defence

1.4 统计学方法

所有统计分析应用 SPSS 19.0 软件进行处理, 方差齐性的数据应用单因素方差分析比较差异, 方差不齐的数据应用非参检验比较差异, $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。

2 结果

2.1 雄性大鼠的行为时间分配规律

经对雄性大鼠行为频次的统计分析, 发现在上午 10:00–11:00 及下午 16:00–17:00 两个时间段内, 大鼠表现最多的是不活跃行为, 即睡觉(平均发生 32.5 次, 占 29%)和清醒不动(平均发生 28.2 次, 占 25.2%)。其次为活动性行为, 例如: 梳理哈欠(平均发生 13.5 次, 占 12%), 探究(平均发生 12.6 次, 占 11%), 运动活动(平均发生 8.3 次, 占 7%), 控制垫料(平均发生 7.1 次, 占 6%)。采食和饮水各平均发生 5.2 和 2 次, 占 5%和 2%。发生频率最少的是社交行为, 非攻击性社交平均发生 1.9

次, 占 2%, 而攻击行为发生 0.7 次, 占 1%。

如表 5 所示, 丰容组 and 对照组两组间除对照组采食行为增加外, 其他各行为都无显著差异。单笼组动物不活跃行为增加, 如清醒不动显著高于新奇组和对照组, 探究性行为减少, 控制垫料的行为显著低于对照组 ($P=0.02$), 单纯性活动行为极显著高于其他组 ($P<0.01$)。而新奇组探究性行为极显著高于其他三组 ($P<0.01$)。

2.2 雄性大鼠尿液和血液中 ACTH 和 CORT 的浓度

利用 ELISA 试剂盒检测大鼠尿液中和血清中的促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质酮 (CORT) 的浓度。检测结果显示, 血清中各组间 ACTH 和 CORT 的浓度无显著性差异。尿液中 ACTH 和 CORT 浓度呈现新奇组>单笼组>对照组>丰容组的趋势, 但除新奇组 ACTH 极显著高于其他三组, 其他差异不显著。另外, CORT 在尿液中浓度要高于血清中的。详见表 6。

表 5 雄性 SD 大鼠行为频次
Table 5 Behavioural performance of SD rats

行为 Behavior	新奇组 Novelty group	丰容组 EE group	对照组 Control group	单笼组 Single cage group
采食 Feeding	4.5±1.9	4.9±2.1	7.3±3.2*	3.8±1.8
饮水 Drinking	2.0±1.6	2.4±1.6	2.3±1.3	0.6±1.1
梳理哈欠 Non-intake maintenance	13.7±3.7	13.8±4.5	14.7±6.3	11.0±4.7
活动 Movement activities	6.6±2.0	7.9±4.4	7.1±2.4	13.3±2.7**
探究 Exploratory behaviour	19.6±6.7**	10.3±5.0	11.2±4.5	7.9±4.2
控制垫料 Bedding-directed behaviour	6.8±2.9	7.5±2.9	8.8±3.9	4.4±1.8*
睡觉 Sleep	31.6±7.5	32.8±7.8	30.9±6.4	36.1±7.6
非攻击社交 Non-aggressive social interaction	2.7±1.7	1.3±1.3	3.1±1.6	/
攻击 Agonism	0.0±0.0	0.7±0.9	1.8±1.5	/
清醒不动 Awake non-active	24.6±6.1	30.4±7.2	25.0±5.0	35.0±7.7*

注: 各组间比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; EE: 环境丰容。
Note. Compared among 4 groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. EE, Environmental enrichment.

表 6 雄性 SD 大鼠 ACTH 和 CORT 的浓度
Table 6 Concentration of ACTH and CORT

组别 Groups	ACTH (ng/L)		CORT (ng/L)	
	尿液 Urine	血清 Serum	尿液 Urine	血清 Serum
新奇组 Novelty group	47.7±11.4**	36.4±4.0	277.2±84.9	193.6±25.0
丰容组 EE group	35.7±11.3	37.8±6.2	229.7±67.6	193.5±30.4
对照组 Control group	37.2±7.6	39.9±4.5	239.6±92.1	183.7±30.5
单笼组 Single cage group	40.3±7.7	37.8±7.4	248.2±64.6	192.4±35.5

注: 各组间比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 环境丰容。
Note. Compared among 4 groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. EE, Environmental enrichment.

3 讨论

环境丰容的实施目的是让动物表达天性行为,改善动物福利^[5]。丰容材料的选取应考虑动物的行为需求,确保动物能够使用这些材料,对这些材料感兴趣^[6]。在给予动物丰容材料时可进行动物对材料的偏爱性观察,如直接观察动物对丰容材料的反应,也可间接通过痕迹来判定动物是否对丰容材料有反应,还可以与预期目标进行对比来初步判定丰容效果^[7]。在本实验中根据文献^[8]及啮齿类动物的天性,选取了 3 种功能的丰容材料:筑巢材料、遮蔽物、磨牙棒。实验过程中发现雄性大鼠对于筑巢材料未达到预期效果,纸屑筑巢材料基本平铺在笼盒中,未有筑巢行为发生,棉棒被大鼠撕咬打开,但同样未有明显的筑巢行为发生。这可能是由于本实验的大鼠都为雄性,筑巢行为不是其特殊需求^[9]。对于两种材质(纸质和尼龙)的 4 种遮蔽物,都有观察到大鼠对其反应,使用情况良好,尼龙材质比较耐用,实验期间未有损坏,而纸质遮蔽物一般一周就需更换。观察到与大鼠互动最多的丰容材料为磨牙棒,但在实验中也发现不同动物对不同的丰容材料有明显的偏爱。两种材质的磨牙棒:木质和尼龙材质。有的大鼠偏爱木质磨牙棒,对尼龙磨牙棒不理睬,而有的大鼠刚好相反。因此在制定与实施丰容方案前应根据大鼠对丰容材料的偏爱对其进行筛选。

量化分析动物行为的改变是评价环境丰容效果的有效方法。其中扫描法获得动物行为时间分配是比较容易操作的一种。本实验中在进行大鼠行为时间分布观察前,先进行了大鼠 12 h(动物照明时间)行为观察,选取大鼠行为最丰富或者最活跃的时间段(上下午各 1 h)进行后续观察。即使是在此时间段内,大鼠最主要的行为也是清醒不动或睡觉(占比超过 50%)。实验动物因为标准化圈养的关系,食物饮水提供充足,觅食行为减少,笼盒大小无法充分满足它们的活动需要,限制了它们的活动量,导致其行为发生适应性变化^[10],动态和积极行为减少,而动态和积极行为是动物的自然行为,是表现生命活力的行为^[11]。因此有必要根据实验动物的需求设置一定的环境丰容材料,以改善实验动物的行为。

本实验中,单笼组大鼠的不活跃行为(睡觉和清醒不动)增加,探究性活动减少,而单纯性活动极

显著增加。笼养大鼠典型的刻板行为之一即为在笼盒内不停转圈,此种行为可由单纯性活动增加逐渐演变而来^[12]。本实验中单笼组大鼠虽还未观察到明显的刻板行为,但是已经有显著的单纯性活动增加。大鼠作为群居动物,单笼饲养阻碍了大鼠间的相互交流,是对动物福利的损害^[13]。环境丰容后,新奇组探究行为极显著高于其他三组,由此可见环境丰容能够明显改善 SD 大鼠的行为,使其不活跃行为减少,促进并展示出了更多的积极行为。放置环境丰容材料后,大鼠有了新的乐趣,而且躲藏在遮蔽物中以及磨牙与其生活习性相适应。前人的研究也表明,环境丰容能够增加动物的活动性行为^[14],减少异常行为及不活跃行为,说明环境丰容对动物行为具有积极影响^[15]。

肾上腺皮质激素是动物应激反应的重要标志物,文献中也常用皮质激素来反映动物的福利水平^[16-17]。在大鼠中主要的皮质激素为皮质酮(CORT)。血清中为蛋白结合的皮质酮,尿液中为游离皮质酮,即有活性的皮质酮^[18]。同时因为尿液采集对动物无损伤,所以逐渐被人们所提倡。本实验的检测结果显示,尿液中皮质酮的浓度是显著高于血清中的,说明尿液完全可以取代血清,而且可能比血清更为灵敏。

本实验中,新奇组尿液中 ACTH 与 COAT 都是最高的,且 ACTH 极显著高于其他三组,说明新奇组的丰容方案可能给动物带来了一定程度的应激。一种可能是新奇组给动物提供 3 种丰容材料,且每周更换不同的组合,这对动物来说是一种明显的刺激,导致应激的产生。此外,丰容材料越多,相应的动物需要的饲养空间也越多,但是笼盒面积是固定的。增加的丰容材料侵占了大鼠的饲养空间,对其造成了压力,引起了应激^[19]。由此可知,实验动物环境丰容并不是丰容材料越多越好,丰容方案越新奇越好,要根据饲养条件选择合适的丰容材料和方案^[20]。

尿液中 ACTH 与 COAT 浓度呈现出单笼组、对照组、丰容组递减的趋势,但差异不显著。提示本试验采取的单一材料环境丰容方案确实可能提高了动物的福利水平,降低了 SD 大鼠的皮质激素的水平。但由于一是本实验中即使是对照和单笼饲养也都给予了杨木刨花和玉米芯颗粒的垫料,二是实验持续时间还不够久,带来的激素改变还没达到统计学显著水平^[21]。

综上所述,作为群居动物,单笼饲养 SD 大鼠会减少其探究行为,增加其不活跃行为及单纯性活动行为,极易导致产生刻板行为,是对大鼠福利的损害。而环境丰容有助于改善 SD 大鼠的行为,提高动物福利,但过于复杂新奇的环境丰容也可能对动物带来压力,产生应激。因此应在基于动物需求的基础上,根据动物实际饲养条件,选择简单实用的环境丰容材料和方案,既确保丰容措施能够改善动物福利水平,又能确定环境丰容措施的使用不给动物带来新的刺激和压力。

参考文献:

- [1] 梁磊, 恽时锋. 丰富环境在啮齿类实验动物中的应用及研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 71-78.
- [2] Toth LA, Kregel K, Leon L, et al. Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question [J]. Comp Med, 2011, 61(4): 314-321.
- [3] Spangenberg EM, Augustsson H, Dahlborn K, et al. Housing-related activity in rats: effects on body weight, urinary corticosterone levels, muscle properties and performance [J]. Lab Anim, 2005, 39(1): 45-57.
- [4] Abou-Ismaïl UA, Burman OH, Nicol CJ, et al. The effects of enhancing cage complexity on the behaviour and welfare of laboratory rats [J]. Behav Processes, 2010, 85(2): 172-180.
- [5] 李军延, 刘帅. 实验动物环境丰富化 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(3): 327-330.
- [6] Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents [J]. ILAR J, 2005, 46(2): 148-161.
- [7] 田秀华, 张丽烟, 王晨. 动物园环境丰容技术及其效果评估方法 [J]. 野生动物杂志, 2007, 28(3): 64-68.
- [8] 郎雪楠, 陈雪婷, 李兆阳, 等. 磨牙石在大、小鼠饲养中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(4): 308-310.
- [9] 张孟蕾, 牛屹东. 筑巢材料在实验大、小鼠环境丰容中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 93-98.
- [10] Mkwanzai MV, Ncobela CN, Kanengoni AT, et al. Effects of environmental enrichment on behaviour, physiology and performance of pigs - A review [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2019, 32(1): 1-13.
- [11] 渠畅, 赵丽娜, 程鲲, 等. 圈养环境下黑帽悬猴行为时间分配和活动节律 [J]. 野生动物学报, 2019, 40(2): 279-284.
- [12] 刘群秀, 涂荣秀, 马珺, 等. 应用环境丰容消除圈养动物的刻板行为 [J]. 野生动物学报, 2014, 35(2): 220-223.
- [13] Cloutier S, Baker C, Wahl K, et al. Playful handling as social enrichment for individually- and group-housed laboratory rats [J]. Appl Anim Behav Sci, 2013, 143(2-4): 85-95.
- [14] Tomiga Y, Ito A, Sudo M, et al. Effects of environmental enrichment in aged mice on anxiety-like behaviors and neuronal nitric oxide synthase expression in the brain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4): 635-640.
- [15] 田立立, 魏晓峰, 高诚. 实验动物行为与环境质量研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(3): 237-242.
- [16] 胡新波, 何鑫, 黄淑芳, 等. 食物丰容对笼养黑猩猩行为和粪便皮质醇的影响研究 [J]. 野生动物学报, 2014, 35(3): 282-288.
- [17] Casal N, Manteca X, Escribano D, et al. Effect of environmental enrichment and herbal compound supplementation on physiological stress indicators (chromogranin A, cortisol and tumour necrosis factor- α) in growing pigs [J]. Animal, 2017, 11(7): 1228-1236.
- [18] 梁磊, 董敏, 尤金炜, 等. 心理应激大鼠部分福利相关指标测评 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(3): 207-211.
- [19] Garrido P, De Blas M, Ronzoni G, et al. Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: Relationship to working and emotional memories [J]. J Neural Transm (Vienna), 2013, 120(5): 829-843.
- [20] André V, Gau C, Scheideler A, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data [J]. PLoS Biol, 2018, 16(4): e2005019.
- [21] Scarola SJ, Perdomo Trejo JR, Granger ME, et al. Immunomodulatory effects of stress and environmental enrichment in long-evans rats (rattus norvegicus) [J]. Comp Med, 2019, 69(1): 35-47.

[收稿日期] 2020-06-03

杜国慧, 刘博伟, 尹福在, 等. 利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达影响及机制探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 98-102.

Du GH, Liu BW, Ying FZ, et al. Mechanistic analysis of liraglutide effects on the expression levels of PEPCK and G6pase in the diabetic mouse liver [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 98-102.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.015

利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达影响及机制探讨

杜国慧¹, 刘博伟^{1,2*}, 尹福在², 齐曦明³, 范冬梅²

(1.承德医学院, 河北 承德 067000; 2.河北省秦皇岛市第一医院内分泌二科, 河北 秦皇岛 066000;
3.河北省秦皇岛市第一医院中心实验室, 河北 秦皇岛 066000)

【摘要】 目的 观察利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝糖异生关键酶葡萄糖-6-磷酸(G-6-Pase)及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)的表达影响及机制探讨。**方法** 动物实验设计分3组:正常对照组(雄性C57小鼠, $n=5$),腹腔注射生理盐水;模型对照组(雄性KK-Ay糖尿病小鼠, $n=5$),腹腔注射生理盐水;利拉鲁肽干预组(雄性KK-Ay糖尿病+药物干预小鼠, $n=5$),腹腔注射利拉鲁肽。3组小鼠均在在相同的饲养环境下饲养。干预8周,检测小鼠的血糖,采用Western blot方法检测FOXO1,隐花色素1(cryptochrome 1, CRY1),E3泛素蛋白酶DDB1,糖异生关键酶葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)的表达情况。**结果** 与模型对照组相比,利拉鲁肽干预组血糖显著下降;利拉鲁肽干预后糖尿病小鼠肝DDB1,FOXO1,G6Pase与PEPCK的表达减少,而隐花色素1(cryptochrome 1, CRY1)的表达增加。**结论** 利拉鲁肽可以下调糖尿病小鼠肝糖异生关键酶G6Pase及PEPCK的表达,其作用可能与下调E3泛素蛋白酶DDB1有关。

【关键词】 利拉鲁肽;E3泛素蛋白酶DDB1;FOXO1;葡萄糖-6-磷酸酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0098-05

Mechanistic analysis of liraglutide effects on the expression levels of PEPCK and G6pase in the diabetic mouse liver

DU Guohui¹, LIU Bowei^{1,2*}, YING Fuzai², QI Ximing³, FAN Dongmei²

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China. 2. Second Department of Endocrinology, the First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000. 3. First Hospital Central Laboratory of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000)

【Abstract】 Objective To observe the effect of liraglutide on the expression of glucose-6-phosphatase (G6pase) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) in the diabetic mouse liver and explore the underlying mechanisms of these effects. **Methods** Mice were divided into three groups: the normal control group (male C57 mice, $n=5$) received intraperitoneal injection of normal saline, the model control group (male KK-Ay mice, $n=5$) received intraperitoneal injection of normal saline, and the Liraglutide group (male KK-Ay mice+ drug intervention, $n=5$) received intraperitoneal injection of liraglutide. All three groups of mice were raised in the same feeding environment. After 8 weeks of intervention,

[作者简介] 杜国慧(1987—),女,硕士,住院医师,研究方向:内分泌代谢性疾病。E-mail:duguohui2018@163.com

[通信作者] 刘博伟(1974—),女,硕士,主任医师,研究方向:内分泌代谢性疾病。E-mail:liubo_wei@126.com

the blood glucose of mice was detected; the expression levels of the FOXO1, cryptochrome 1, the E3 ubiquitin ligase DDB1, G6pase, and PEPCK in the liver were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model control group, blood glucose was significantly reduced in the intervention group. The expression levels of DDB1, FOXO1, G6Pase and PEPCK decreased in the intervention group, while the expression level of Cryptochrome 1 (CRY1) increased. **Conclusions** Liraglutide can downregulate the expression of G6Pase and PEPCK, key gluconeogenesis enzymes, in the diabetic mouse liver; this may be related to downregulation of the E3 ubiquitin ligase DDB1.

【Keywords】 Liraglutide; E3 ubiquitin ligase DDB1; FOXO1; glucose-6-phosphatase (G-6-Pase); phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK).

糖尿病作为慢性代谢性疾病,随其发病率的飙升^[1],已越来越受人们的关注,其发病病理生理机制主要表现在胰岛素的缺乏和胰岛素抵抗两个方面。其中肝的胰岛素抵抗与 2 型糖尿病的发生发展息息相关,肝糖代谢的紊乱主要通过肝糖原合成及糖异生来影响葡萄糖代谢。CUL4a—DDB1 连接酶复合物是一类 E3 泛素连接酶复合物,可以通过对底物进行泛素化修饰,从而改变蛋白功能或促进被修饰蛋白的降解,DNA 损伤结合蛋白 1 (DDB1) 是 DDB1—cul4a 连接酶复合物的支架组分^[2-4]。

本课题旨在探讨 GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝 E3 泛素蛋白酶 DDB1 及肝糖异生的影响及可能的机制,为 GLP-1 受体激动剂在 T2DM 等代谢性疾病治疗中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级,雄性 KK-Ay 糖尿病小鼠 10 只,11~12 周,体重为 33~35 g;SPF 级,雄性 C57 小鼠 5 只 11~12 周,体重为 26~28 g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008],实验在天津南开大学医学部免疫实验组[SYXK(津)2017-00005]进行。实验经天津南开大学伦理管理委员会审核(201907-001),对实验小鼠在实验过程中的所有处置均按国家《实验动物管理条例》的规定执行,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

利拉鲁肽注射液购自诺和诺德制药有限公司;RIPA 裂解液、PMSF、SDS-PAGE 制胶盒、TBS (20X)、TRIS Base、Glycine、SDS(十二烷基磺酸钠)、Tween20、脱脂奶粉(Skim Milk)均购自索莱宝科技(Solarbio);BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自中国 Beyotime Biotechnology 公司;ECL 显影液、PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;Anti-mouse IgG-HRP antibody、Anti-Rabbit IgG-HRP antibody 购自北京中

杉金桥生物技术有限公司;Anti-IgG-DDB1 antibody 购自 Abcam;Anti-IgG-G6pase antibody、Anti-IgG-PEPCK antibody 购自博奥森(Bioss);Anti-Cryptochrome 1/CRY1 Antibody、Anti-FoxO1a Rabbit Monoclonal Antibody 购自博士德;SDS-Loading Buffer (5×)购自北京康润科技(Genstar);葡萄糖氧化酶试剂盒购自上海荣盛。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

取 11~12 周雄性 KK-Ay 糖尿病小鼠 10 只,单笼饲养于屏障环境,温度:20℃~22℃,湿度:45%~55%,光照:12 h/12 h 明暗循环,所有小鼠均予以常规饮食。小鼠适应环境 1 周后测量体重(35.04 ± 0.92)g,血糖 >13.9 mmol/L 的 KK-Ay 小鼠随机分为 2 组,即利拉鲁肽干预组和模型对照组,每组 5 只。另取同周龄体重(28.02 ± 2.04)的雄性 C57 小鼠 5 只作为正常对照,利拉鲁肽干预组每日腹腔注射 250 μ g/kg 利拉鲁肽,模型对照组和正常对照组每日腹腔注射等量生理盐水,给药时间每日 16:00~17:00,连续干预 8 周。

1.3.2 动物处理与取样

在处死小鼠前,禁食 12 h,对小鼠进行眼眶取血;取出眼眶血放于 EP 管中,然后将 EP 管置于 37℃ 水浴锅孵育 30 min;3000 r/min 离心 10 min;取上清液(即血清)转移到对应标记新的 1.5 mL 离心管中;采用葡萄糖氧化酶法测定血糖。同时处死小鼠剖腹取小鼠肝组织分装置于-80℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 Western blot 检测

取 0.2 g 肝组织,加入提前配好的 RIPA 裂解液 800 μ L (RIPA 裂解液+蛋白酶抑制剂 2%+磷酸酶抑制剂 1%+PMSF 1%),超声波裂解肝组织,冰上静置 30 min,12000 r/min 离心 30 min,取上清。应用 BCA 法创建蛋白定量标准曲线,依据定量,计算各肝标本中的总蛋白和蛋白浓度。应用 10% SDS-PAGE 分离胶对蛋白电泳分离约 1.0~1.5 h,在

冰浴条件下转膜(湿转)约 120 min。用 5%脱脂奶粉溶液室温下封闭 2 h。一抗(依据抗体说明书及摸索的具体情况确定稀释比例,用 1×TBST 稀释)4℃条件下摇床孵育过夜。第 2 天将 PVDF 膜用 1×TBST 洗涤 5 次,每次 6 min,二抗(依据说明书要求的稀释比例,应用 1×TBST 稀释)室温孵育 2 h,洗涤后在多功能成像仪暗室中曝光、成像、记录图像。

1.4 统计学方法

用 Image J 软件测定每个目标条带的灰度值,使用 Graphpad 5.0 进行统计学分析和作图。实验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对随机血糖的影响

三组小鼠血糖值差异具有统计学意义,模型对照组血糖值(30.84±1.29)mmol/L 较正常对照组血糖值(8.88±0.47)mmol/L 明显升高,差异有统计学意义(*P*<0.01);利拉鲁肽干预组血糖值(23.74±2.74)mmol/L 较模型对照组明显下降,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。

2.2 对肝组织 E3 泛素蛋白酶 DDB1 表达的影响

Western blot 结果显示糖尿病小鼠肝内 E3 泛素蛋白酶 DDB1 蛋白水平明显高于正常对照组(*P*<0.05),经利拉鲁肽干预处理后,糖尿病小鼠肝内 DDB1、CRY1 的表达均低于糖尿病对照组(*P*<0.05),见图 1、表 1。

2.3 对小鼠肝组织 CRY1、FOXO1,及糖异生关键酶 PEPCK、G6pase 表达的影响

Western blot 结果显示糖尿病小鼠肝内 FOXO1、PEPCK 及 G6pase 蛋白水平明显高于正常对照组(*P*<0.05),经利拉鲁肽干预后,糖尿病小鼠肝内 FOXO1、PEPCK 及 G6pase 的表达均明显低于模型对照组(*P*<0.05),见图 2,表 2。糖尿病小鼠内 CRY1 蛋白表达水平明显低于正常对照组(*P*<

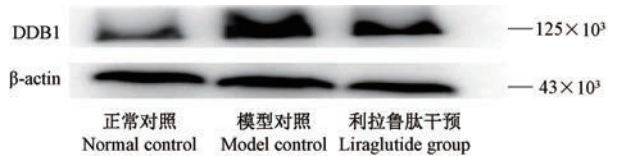


图 1 利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝 E3 泛素蛋白酶 DDB1 蛋白表达水平的比较

Figure 1 Comparison of the expression level of E3 ubiquitin protease DDB1 in liver of diabetic mice with Liraglutide

0.05),利拉鲁肽干预处理后,表达量却明显上调(*P*<0.05),见图 2、表 2。

3 讨论

胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1)主要由末端空肠、回肠和结肠中的 L 细胞受到食物刺激后分泌^[5],是一种肠内分泌源性肽,通过刺激胰岛素分泌、抑制胰高血糖素释放、促进 β 细胞增殖、减少食物摄入等途径,起到抑制糖尿病的作用^[6],现已广泛应用于临床,主要用于改善 2 型糖尿病患者的胰岛素敏感性。各项临床研究及 meta 分析都指出:GLP-1 及其类似物能够显著降低 2 型糖尿病患者的血糖及体重,改善胰岛素的敏感性,可以改善心衰大鼠左心室的收缩和舒张功能减轻心肌细胞的损伤,且独立于降糖机制^[7]。其中利拉鲁肽(liraglutide)属于长效的 GLP-1 类似物,与人体天然的 GLP-1 氨基酸序列具有 97%的同源性,于 2010 年由美国 FDA 批准用于临床,而目前主要用于改善成人 2 型糖尿病患者的血糖控制^[8],本次实验结果提示模型对照组较正常对照组血糖明显升高,而利拉鲁肽干预后,血糖明显下降,并具有统计学意义。

表 1 5 组小鼠肝组织 E3 泛素蛋白酶 DDB1 蛋白表达水平的比较

Table 1 Comparison of the expression level of E3 ubiquitin protease DDB1 in liver tissues of five groups	
组别 Groups	DDB1
正常对照(n=5) Normol control	1.052±0.228
模型对照(n=5) Model control	1.712±0.109**
利拉鲁肽干预(n=5) Liraglutide group	0.950±0.110

注:与正常对照组比较,**P*<0.05;与模型对照组比较,***P*<0.05。
Note. Compared with the normal control group, **P*<0.05. Compared with model control group, ***P*<0.05.

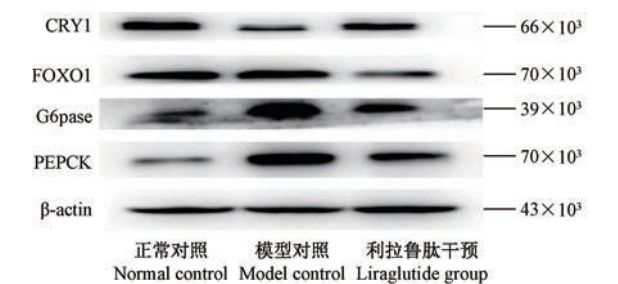


图 2 利拉鲁肽对小鼠肝 CRY1、FOXO1 及 PEPCK、G6pase 蛋白表达水平的影响

Figure 2 Effect of Lilarutin on CRY1、FOXO1 and PEPCK、G6pase expression in mouse liver

表 2 5 组小鼠肝组织 CRY1、FOXO1、G6pase、PEPCK 蛋白表达水平的比较

组别 Groups	CRY1	FOXO1	G6pase	PEPCK
正常对照 (n=5) Normol control	2. 091±0. 274	0. 672±0. 126	0. 811±0. 094	0. 883±0. 128
模型对照 (n=5) Model control	0. 793±0. 180 * #	1. 838±0. 385 * #	2. 151±0. 267 * #	2. 909±0. 605 * #
利拉鲁肽干预 (n=5) Liraglutide group	2. 132±0. 489	0. 742±0. 129	0. 838±0. 068	1. 284±0. 178

注:与正常对照组比较,**P*<0. 05;与利拉鲁肽干预组比较,#*P*<0. 05。
Note. Compared with the normal control, **P*<0. 05.Compared with model control group, #*P*<0. 05.

泛素-蛋白酶体途径(UPS)是存在于真核细胞中精确调控细胞质和细胞核内蛋白质有序降解的途径,由泛素(Ub)、泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)、26S 蛋白酶体和去泛素化酶(DUBs)组成^[9]。越来越多的研究证据表明 E3 泛素蛋白酶通过调节胰岛素信号传导中的关键分子在胰岛素抵抗的发展中起着关键作用^[10];MG53 的过度表达可以触发肌肉胰岛素抵抗和代谢综合征^[11-12];膜相关环-CH-1(MARCH1)可以通过泛素化负调节胰岛素受体的细胞表面水平^[13];也有报道称脂肪组织 E3 泛素蛋白酶 Pellino3 对胰岛素抵抗却表现出保护作用^[14]。Xin 等人的研究表明,E3 泛素蛋白连接酶 DDB1 可能是一种新型的糖原异生监管因素,它主要通过介导 CRY1 蛋白的降解,进而推动 FOXO1 介导的糖异生作用,同时也证实肝细胞 DDB1 缺乏不仅抑制空腹时糖原异生,并且可以保护小鼠免受禁食高脂肪饮食引起的高血糖^[15-16]。本研究结果显示利拉鲁肽在肝内可作用于 E3 泛素蛋白酶 DDB1,并下调它的表达,提示 GLP-1 及其类似物在肝内可能通过下调 E3 泛素蛋白酶,进而发挥抑制肝糖异生的作用,而其中的具体作用机制尚有待进一步实验研究。

肝是糖脂代谢的重要器官,在糖尿病的发生发展中起着至关重要的作用^[17]。在糖尿病患者中,肝糖异生增加导致大量内源性葡萄糖产生,特别是增加了空腹高血糖的发生^[18],其中糖异生限速酶葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPCK)编码基因的多少是决定糖异生启动的关键环节^[19],故通过干预肝糖异生,减少肝葡萄糖生成,将为改善肝胰岛素抵抗提供一个广阔前景。而肝糖异生还受很多转录因子的调控,包括叉头盒转录因子 O1(FoxO1)、CREB、PGC-1α 等等,其中 FOXO1 被证实是肝用来监测脂质和葡萄糖代谢与循环胰岛素水平的传感器,是肝糖异生关键酶调控

的上游靶点,主要促进空腹时肝糖异生,增加肝糖输出^[20-21]。Fan 等人^[22]发现 exendin-4 可增加幼鼠肝 AKT 和 FOXO1 磷酸化,抑制葡萄糖-6-磷酸酶(G6pase)和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)的表达。在本次研究中同样证实利拉鲁肽下调了肝糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达,糖异生的上游靶点 FOXO1 的表达也同样被下调,推测利拉鲁肽抑制肝糖异生可能与部分下调 E3 泛素蛋白酶进而抑制 FOXO1 有关,而其中的具体机制需要进一步去验证。

隐花色素 1(cryptochrome 1,CRY1)表达蛋白是生物钟的组成部分,经体液和神经途径送达效应器,调节生理、生化和节律行为,肝糖异生也受昼夜节律的调控,昼夜节律是协调葡萄糖代谢与外部环境变化,研究发现 CRY1 可以通过作用于糖皮质激素受体和胰高血糖素信号通路负调控 FOXO1 的表达,抑制肝糖异生^[23-25],Stojkovic 等^[26]人提出泛素化是一个时钟蛋白修饰编码的关键因素,本研究发

现肝中 CRY1 的表达与 DDB1 呈负相关,这之前研究结果是相符的,故推测 CRY1 在肝可能是通过泛素蛋白的泛素化来降解的,进而抑制肝糖异生,但其中的具体机制仍需要进一步研究证实。

总之,利拉鲁肽降低糖尿病小鼠糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达,抑制了肝的糖异生,有效控制糖尿病小鼠血糖。同时利拉鲁肽可显著下调糖尿病小鼠肝内 E3 泛素蛋白酶 DDB1 的表达水平,揭示了利拉鲁肽调节肝糖异生可能存在的一种新的通路,这同时也揭示了 E3 泛素蛋白酶可能成为一种新的肝糖异生的负调控因子,有望成为治疗 2 型糖尿病的新的靶点。

参考文献:

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(1): 4-67.
[2] Angers S, Li T, Yi X, et al. Molecular architecture and assembly

- of the DDB1 - CUL4A ubiquitin ligase machinery [J]. *Nature*, 2006, 443(7111): 590-593.
- [3] He YJ, McCall CM, Hu J, et al. DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligase s [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(21): 2949-2954.
- [4] Iovine B, Iannella ML, Bevilacqua MA. Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(12): 1664-1667.
- [5] Gastaldelli A, Gaggini M, DeFronzo R. Glucose kinetics: an update and novel insights into its regulation by glucagon and GLP-1 [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2017, 20(4): 300-309.
- [6] Wu F, Yang L, Hang K, et al. Full-length human GLP-1 receptor structure without orthosteric ligands [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1272.
- [7] 王晨阳, 曹海涛, 张志华, 等. 利拉鲁肽对大鼠压力负荷型慢性心衰的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(9): 64-68.
- [8] Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(9): 774-777.
- [9] Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination [J]. *AnnuRev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
- [10] Yang XD, Xiang DX, Yang YY. Role of E3 ubiquitin ligases in insulin resistance [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(8): 747-754.
- [11] Song R, Peng W, Zhang Y, et al. Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders [J]. *Nature*, 2013, 494(7437): 375-379.
- [12] Yi JS, Park JS, Ham YM, et al. MG53-induced IRS-1 ubiquitination negatively regulates skeletal myogenesis and insulin signalling [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2354.
- [13] Bhagwandin C, Ashbeck EL, Whalen M, et al. The E3 ubiquitin ligase MARCH1 regulates glucose-tolerance and lipid storage in a sex-specific manner [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0204898.
- [14] Yang S, Wang B, Humphries F, et al. The E3 ubiquitin ligase Pellino3 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance [J]. *Immunity*, 2014, 41(6): 973-987.
- [15] Tong X, Zhang D, Guha A, et al. CUL4-DDB1-CDT2 E3 ligase regulates the molecular clock activity by promoting ubiquitination-dependent degradation of the mammalian CRY1 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139725.
- [16] Tong X, Zhang D, Charney N, et al. DDB1-mediated CRY1 degradation promotes FOXO1-driven gluconeogenesis in liver [J]. *Diabetes*, 2017, 66(10): 2571-2582.
- [17] 刘栩晗, 李国生, 朱华, 等. 小檗碱对 2 型糖尿病中国地鼠肝脏葡萄糖激酶、葡萄糖-6-磷酸酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 mRNA 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(4): 9-13.
- [18] Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 821-827.
- [19] Sheahan KH, Wahlberg EA, Gilbert MP. An overview of GLP-1 agonists and recent cardiovascular outcomes trials [J]. *Postgrad Med J*, 2020, 96(1133): 156-161.
- [20] Lu M, Wan M, Leavens KF, et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1 [J]. *Nat Med*, 2012, 18(30): 388-395.
- [21] Dong XC, Copps KD, Guo S, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(1): 65-76.
- [22] Fan R, Kang Z, He L, et al. Exendin-4 improves blood glucose control in both young and aging normal non-diabetic mice, possible contribution of beta cell independent effects [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20443.
- [23] Zhang EE, Liu Y, Dentin R, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis [J]. *Nat Med*, 2010, 16(10): 1152-1156.
- [24] Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, et al. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor [J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 552-556.
- [25] Jang H, Lee GY, Selby CP, et al. SREBP1c-CRY1 signalling represses hepatic glucose production by promoting FOXO1 degradation during refeeding [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12180.
- [26] Stojkovic K, Wing SS, Cermakian N. A central role for ubiquitination within a circadian clock protein modification code [J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 69.

[收稿日期] 2020-08-28

高歌,孟凤珍,姚艳丰. 一种快速定量检测猴组织中 SIV/SHIV 的方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 103-108.
Gao G, Meng FZ, Yao YF. Quantitative detection of SIV/SHIV in Chinese rhesus macaque tissues by TaqMan real-time FQ-PCR [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 103-108.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.016

一种快速定量检测猴组织中 SIV/SHIV 的方法

高歌¹,孟凤珍²,姚艳丰^{1*}

(1.中国科学院武汉病毒研究所,武汉国家生物安全实验室,武汉 430071;
2.武汉大学基础医学院,武汉大学动物实验中心,武汉 430071)

【摘要】 目的 以猴-人免疫缺陷病毒(simian-human immunodeficiency virus,SHIV) *gag* 基因为特异性扩增靶标,建立一种快速、灵敏、特异的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法检测猴血浆、外周血单核细胞和淋巴结中的猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus,SIV)和 SHIV。**方法** 以 SHIV_{SF162p3n} *gag* 基因为模板,用普通 PCR 方法扩增出 109 bp DNA 片段用于克隆构建标准品质粒 pGEM® -T-SHIV *gag*。通过对 SHIV 标准品质粒定量分析,优化反应体系,检测 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度、特异度和重复性。**结果** TaqMan 实时荧光定量 PCR 法能有效地检测出 10²~10⁷ copies/μL SIV/SHIV *gag* 基因 mRNA,线性系数为 R²=0.998,slop=-3.304。方法重复性检测显示 CV%在 0.6%~1.1%之间。**结论** 该 TaqMan 实时荧光定量 PCR 法具有快速、灵敏和特异性高的优点,适用于 SIV/SHIV 感染猴动物模型的研究工作。

【关键词】 猴免疫缺陷病毒;猴-人免疫缺陷病毒;TaqMan 实时荧光定量 PCR;灵敏度

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0103-06

Quantitative detection of SIV/SHIV in Chinese rhesus macaque tissues by TaqMan real-time FQ-PCR

GAO Ge¹, MENG Fengzhen², YAO Yanfeng^{1*}

(1. Wuhan Institute of Virology, CAS, National Bio-Safety Lab of Wuhan, Wuhan 430071, China. 2. Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Animal Biosafety Level III Laboratory at Center for Animal Experiment, Wuhan 430071)

【Abstract】 Objective To develop a rapid, high-sensitivity, and high-specificity assay based on TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR (TaqMan real-time FQ-PCR) targeting the *gag* gene of simian-human immunodeficiency virus (SHIV) for quantitative measurement of simian immunodeficiency virus (SIV) and SHIV in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and lymph nodes from rhesus macaques. **Methods** A 109-bp fragment of the SHIV_{SF162p3n} *gag* gene was amplified using reverse-transcription PCR and cloned into the pGEM® -T vector to construct the pGEM® -T-SHIV *gag* plasmid, which was used as a standard for the assay. **Results** TaqMan real-time FQ-PCR efficiently detected 10² - 10⁷ copies/μL SIV/SHIV *gag* mRNA with a correlation coefficient (R²) of 0.998 and slope of -3.304. The coefficient of variability was 0.6% - 1.1%. **Conclusions** This rapid assay exhibited both high sensitivity and high specificity. Thus, this method is suitable for studies involving SIV/SHIV infection macaque models.

【Keywords】 simian immunodeficiency virus (SIV); simian-human immunodeficiency virus (SHIV); TaqMan real-time FQ-PCR; sensitivity

[作者简介]高歌(1988—),男,助理实验师,本科,研究方向:病毒感染与实验动物。E-mail: gaoge@wh.iov.cn
[通信作者]姚艳丰(1981—),男,高级实验师,博士,研究方向:新发再发传染病动物感染模型。E-mail: yaoyf@wh.iov.cn

艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是全球三大传染病之一,自发现以来在全球迅速蔓延,对人类的生命健康造成严重威胁。世界卫生组织(World Health Organization, WHO)2020 年统计的数据显示,全球已有 3800 万人感染了艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV),2019 年新增 170 万病例,AIDS 导致的死亡人数高达 69 万^[1]。在众多 HIV 相关研究的动物模型中,非人灵长类动物如恒河猴感染 SIV 后出现的临床症状和发病机制与人类感染 HIV 相似^[2-3]。因此,SIV 感染非人灵长类动物模型被广泛应用于 HIV/AIDS 的研究,并为 WHO 所推荐^[4]。抗 HIV/AIDS 的逆转录治疗的主要靶点是 HIV 的逆转录酶。为了建立逆转录酶抑制剂治疗的动物模型,研究人员将 SIV 的逆转录酶基因改造为 HIV 的逆转录酶基因,形成基于 SIV 骨架,含有 HIV 逆转录酶的 SIV-HIV 杂交病毒,即 SHIV^[5]。SHIV 感染猴主要用于抗逆转录病毒药物耐药性的研究^[5]。近年来,越来越多的研究人员将 SHIV 感染猴模型用于抗 HIV 新药的研究^[6-8]。检测感染猴体内 SIV/SHIV 载量的变化是评价和分析疾病发展的重要指标^[9-11]。因此,建立一种快速、敏感和特异的实验方法监测 SIV/SHIV 载量十分必要。基于 SIV/SHIV 骨架中重要且高度保守的 *gag* 基因作为目标检测对象,本研究利用 TaqMan 探针技术建立了检测 SIV/SHIV 病毒核酸的实时荧光定量法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

普通级雄性中国恒河猴 17 只,体重 6~8 kg,5 岁。均购于中国科学院昆明动物研究所[SCXK(滇)K2017-0003]。无菌手术在武汉大学动物实验中心生物安全三级实验室进行[SYXK(鄂)2019-0013]。这些动物是按照国际实验动物护理评估和认证协会的规定进行护理。该研究方案和程序经武汉大学医学院动物管理与使用委员会批准(2015024)。所有的动物组织样本均保存于武汉大学动物实验中心动物生物安全三级实验室。

1.1.2 毒株

R5 SHIV_{SF162p3n}(由美国 Aaron Diamond 艾滋病研究中心 Cecilia Cheng-Mayer 博士惠赠);SHIVKU-1、SIVmac239、SIVmac251、HCV JFH-1(由美国 NIH

艾滋病研究项目提供);pCMV ayw HBV(由吉林大学吕铭宇博士惠赠);EBV(B95-8 毒株)、HSV-1 17syn+以及 HSV-2 G 毒株(由中国科学院武汉病毒研究所胡勤学博士惠赠)。

1.2 主要试剂与仪器

TIANprep Mini Plasmid Kit 购自北京天根生化科技有限公司;E.Z.N.ATM Gel Extraction Kit 购自美国 Omega Bio-Tek 公司;pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems 购自美国 PROMEGA 公司;JM109 购自美国 BioVector NTCC 公司;Taq DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司;Ficoll-PaqueTMPREMIUM 购自美国 GE Healthcare 公司;Tri Reagent-LS 购自美国 MRC 公司;AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit (50)购自美国 Qiagen 公司;M-MLV RT 5X Buffer、M-MLV Reverse Transcriptase、Random Hexamer primer、RiboLock RNase inhibitor 购自美国 Thermo 公司;REGULAR AGAROSEG-10 购自西班牙 Biowest 公司。Real-Time PCR Bio-Rad MyIQTM 2 和 PCR Bio-Rad MyCyclerTM thermal cycler 购自美国 Bio-Rad 公司;NANODROP 2000 spectrophotometer 购自美国 Thermo 公司。

引物和探针的设计合成:扩增 *gag* 基因的引物和探针是参考文献^[12](Forward primer *gag*: 5'-TGGAGAACAAAGAAGGATGTCAAA-3', Reverse primer *gag*: 5'-CACCAGATGACGCAGACAGTATTA T-3'; *Gag*-Probe: FAM-5'-TTGGCACTAATGGAGCT AAGACCGAAAGTATT-3'-BHQ1)由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成

按照 RNA 提取试剂 Tri Reagent-LS 操作步骤从病毒液中提取 SHIV_{SF162p3n} 病毒的 RNA,加入 20 μ L 无 RNA 酶的水溶解,56 $^{\circ}$ C 助溶 15 min,然后用 NanoDrop 2000 检测 RNA 的浓度。将得到的 RNA 进行逆转录得到 cDNA,逆转录反应总体积为 20 μ L,分别加入 4 μ L M-MLV RT 5X Buffer,1 μ L dNTPs (5 μ mol/L),1 μ L Random Hexamer primer (5 μ mol/L),0.5 μ L RiboLock RNase inhibitor (1 U),0.5 μ L M-MLV Reverse Transcriptase (10 U),10 μ L RNA(1 μ g)模板,剩余体积用 Rnase free water 补足到 20 μ L。逆转录的反应程序为 37 $^{\circ}$ C,60 min;95 $^{\circ}$ C,5 min。

1.3.2 SHIV gag 质粒标准品的构建

以 1.3.1 中得到的病毒 cDNA 为模板,使用 gag 引物,通过普通 PCR 进行扩增。扩增得到的产物进行 DNA 凝胶电泳之后用 E.Z.N.A™ Gel Extraction Kit 进行纯化和回收,然后利用 pGEM® -T and pGEM® -T Easy Vector Systems 进行片段连接和质粒转染。利用蓝白斑筛选白色单克隆菌落加入到含有氨苄青霉素的 LB 培养液中,在 37℃ 恒温培养振荡仪中 180 r/min 培养过夜。过夜培养得到的菌液用 TIANprep Mini Plasmid Kit 提取质粒 DNA,然后测序鉴定。

将测序鉴定正确的质粒 DNA 用 NanoDrop 2000 测定浓度,然后用公式计算出 DNA 模板浓度:DNA 模板浓度 (copies/μL) = [质粒浓度 (ng/μL) × 10⁻⁹ × 6.02 × 10²³] / [660 g/mol × 碱基对数目]。

1.3.3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应体系的建立和优化

以 pGEM® -T-SHIV gag 质粒作为反应模板,同时设 End1/E6E7 细胞 DNA 为阴性对照,无 RNA 酶水为空白对照。通过对 PCR 反应体系中各种成分 (Taq 酶,引物和探针浓度) 以及反应程序中的相关条件 (退火温度,循环数) 进行一系列的优化实验,通过比较检测结果的各相关系数 (CT 值,标准曲线的 R² 等),最终得到该法的最佳检测条件。

1.3.4 检测灵敏度的分析及标准曲线的绘制

取 10⁷ ~ 10¹ copies/μL 浓度的 pGEM® -T-SHIV gag 质粒标准品作为 TaqMan 实时荧光定量 PCR 的标准样品进行扩增,每个浓度做 3 个平行,同时设

End1/E6E7 细胞 DNA 阴性对照,无 RNA 酶的水空白对照,由定量 PCR 仪自动绘制出线性标准曲线。

1.3.5 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性分析

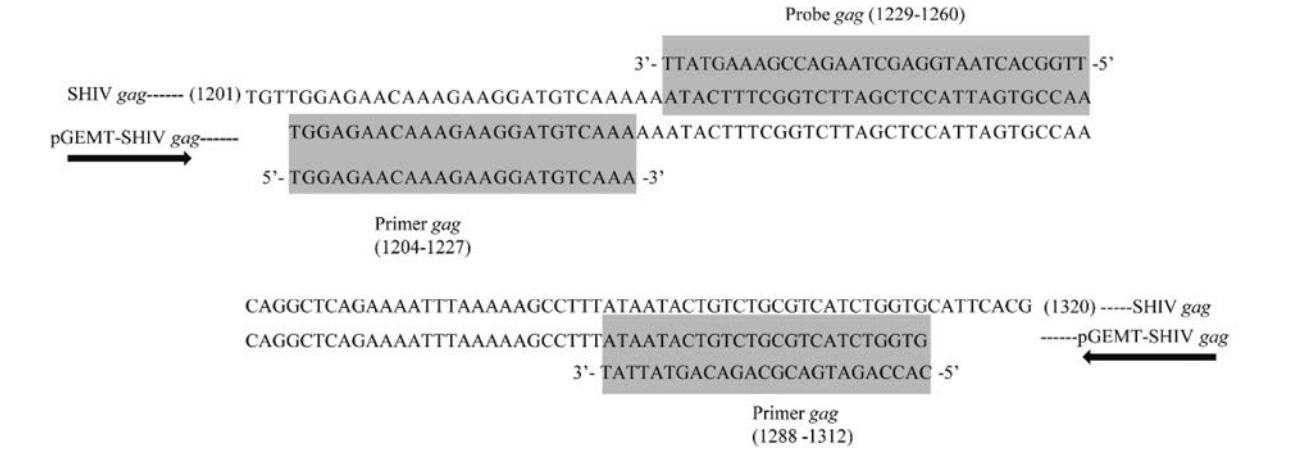
选择 R² 在 0.997 ~ 1.000 之间的 pGEM® -T-SHIV gag 质粒标准品浓度样本作为检测模板,每个浓度做 5 个平行检测样本,通过计算 Ct 值的变异系数 CV 来评价检测方法的重复性。

1.3.6 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性分析

除了检测 SHIV_{SF162p3n}, SHIVKU-1, SIVmac239, SIVmac251 的 cDNA 外,还同时检测了 HCV, EBV, HBV, HSV-1 以及 HSV-2 的 DNA。人原代巨噬细胞 DNA 为阴性对照,无 RNA 酶水作为空白对照。

1.3.7 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的应用

本研究中使用的动物组织样本包括 SIV 或 SHIV 感染猴和健康猴的血浆 (plasma)、外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear, PBMC)、淋巴结 (lymph node)^[13-14]。血浆为猴静脉全血经过 EDTA 抗凝处理后所得, PBMC 为猴静脉全血经过 Ficoll-PaqueTMPREMIUM 处理分离所得。淋巴结组织样本为猴安乐死后,直接解剖取材所得。SIV 感染猴 (n = 3) 肠系膜 LN, SHIV 感染猴 (n = 7) Plasma、PBMC、腋下 LN、腹股沟 LN、肠系膜 LN 和结肠 LN, 健康猴 (n = 7) Plasma、PBMC、腋下 LN、腹股沟 LN、肠系膜 LN 和结肠 LN。使用 AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit (美国 Qiagen) 提取标本的 DNA



注:图中阴影部分为引物和探针结合目的片段部位。

图 1 重组质粒 pGEM® -T-SHIV gag 测序鉴定结果

Note. The part of primers and probe combined with targeted fragment was indicated.

Figure 1 Identification results of recombinant plasmid pGEM® -T-SHIV gag sequencing

和 RNA, RNA 按照 1.3.1 的操作步骤获得 cDNA。将 cDNA 和 DNA 按照 1.3.3 中优化好的方法进行检测,同时设人原代巨噬细胞作为阴性对照和无 RNA 酶水空白对照。

2 结果

2.1 质粒标准品的构建

普通 PCR 扩增 SHIV cDNA 的片段大小为 109 bp,克隆到载体中制备质粒标准品,经过氨苄青霉素筛选的阳性单克隆菌株经测序鉴定与 GeneBank (AY033146.2)中记录的 SHIV gag 片段序列一致(图 1)。

2.2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 反应体系的建立

反应结束后,通过 Bio-Rad 软件系统分析 PCR 的结果。得出最佳反应体系见表 1,最佳反应程序为:95℃,10 min;95℃,15 s,60℃,1 min,55 个循环。

2.3 灵敏度及定量标准曲线

将 pGEM® -T-SHIV gag 质粒标准品进行 10 倍倍比稀释,以 $10^7 \sim 10^1$ copies/ μ L 稀释度作为 PCR 扩增的模板,如图 2 所示,SHIV gag 质粒标准品在 $10^7 \sim 10^2$ copies/ μ L 浓度间标准曲线定量线性关系很好。 $R^2 = 0.998$, slope = -3.304。因此,我们把该法的检测灵敏度定为 10^2 copies/ μ L。

2.4 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法重复性分析

以 R^2 在 0.997~1.000 的 $10^7 \sim 10^2$ copies/ μ L 的质粒标准品为模板重复测定 5 次,然后计算 Ct 值的平均值、标准差 s 以及变异系数(表 2)。结果表明,该检测方法具有可重复性。

2.5 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性分析

为了确定该方法的特异性,我们检测了多个 SHIV 和 SIV 株以及其它无关病毒。如图 3 所示,该法只能扩增 SHIV_{SF162p3n}、SHIVKU-1、SIVmac239、SIVmac251 的 cDNA,而对其它病毒(HCVJFH-1、EBV、HBV、HSV-1 17syn+和 HSV-2 G)无扩增作用。人原代巨噬细胞 DNA 阴性对照和无 RNA 酶的水空白对照均为阴性。

2.6 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的临床应用

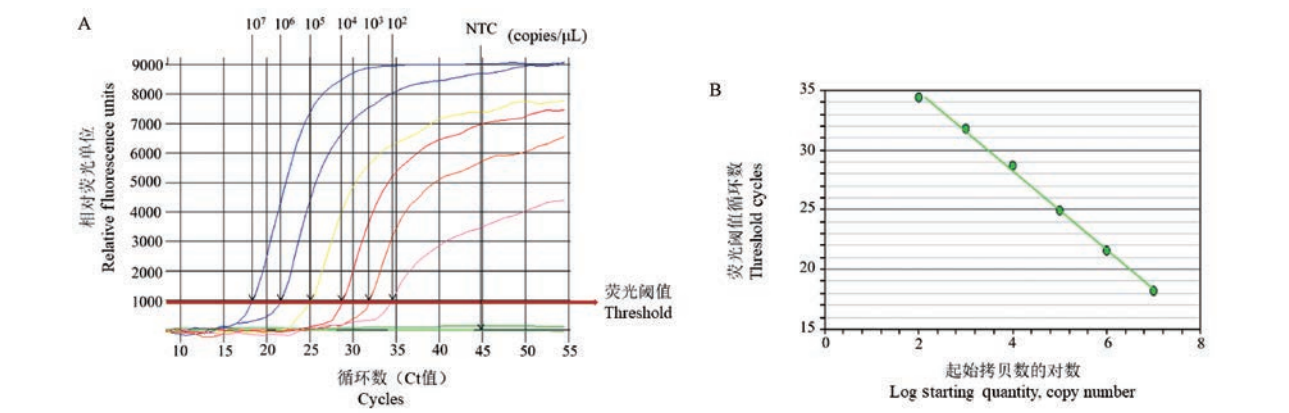
TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测健康猴和感染 SIV/SHIV 猴的 Plasma、PBMC、LN,结果见表 3。结果显示,TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测 SIV/SHIV 感染猴样本均能检测到 SIV/SHIV 的 RNA 和前病毒 DNA;检测健康猴样本时,所有样本的检测结果都为阴性。

表 1 TaqMan 实时荧光定量 PCR 的反应体系
Table 1 Reaction systems of TaqMan real-time FQ-PCR

变量 Variable	TaqMan 实时荧光定量 PCR TaqMan real-time FQ-PCR	普通 PCR Conventional PCR
Buffer for Taq DNA polymerase($Mg^{2+} 10\times$)	5.0 μ L	2.0 μ L
dNTPs(10 mmol/L)	1.0 μ L	1.0 μ L
Taq DNA polymerase(5 U/ μ L)	0.5 μ L	0.2 μ L
Primers(10 μ mol/L)	3.0 μ L	1.0 μ L
Probe(10 μ mol/L)	1.0 μ L	—
Template(DNA)	10 μ L	2.0 μ L
Nuclease-free H ₂ O	27.5 μ L	13 μ L
Total volume	50 μ L	20 μ L

表 2 TaqMan 实时荧光定量 PCR 的重复性实验
Table 2 Repeatability evaluation of TaqMan real-time FQ-PCR

样本浓度 Concentration(copies/ μ L)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 平均值 Ct mean value	标准差 s	变异系数 CV
10^7	18.64	18.22	18.73	18.66	18.82	18.61	0.19	1.0
10^6	21.67	21.64	21.65	21.67	22.04	21.73	0.14	0.6
10^5	24.74	24.97	25.20	25.20	25.38	25.10	0.20	0.8
10^4	28.78	28.74	28.95	28.01	28.97	28.69	0.32	1.1
10^3	32.40	32.54	32.43	32.67	32.03	32.41	0.20	0.6
10^2	35.44	35.69	35.30	35.80	35.20	35.52	0.22	0.63



注:A:质粒标准品扩增曲线;B:将 10^7-10^2 copies/ μ L 10 倍倍比稀释的 pGEM® -T-SHIV *gag* 质粒标准品的标准曲线;标准曲线定量线性方程为 $Y = -3.304x + 41.556$, $R^2 = 0.998$, slope = -3.304 。

图 2 pGEM® -T-SHIV *gag* 质粒标准品标准曲线及扩增曲线

Note. A, Fluorescence quantitative amplification plot of 10-fold serial dilutions standard plasmids. B, Standard curve obtained with 10-fold serial dilutions of the pGEM® -T-SHIV *gag* plasmids from 10^7-10^2 copies/ μ L, the quantitative equation was $Y = -3.304x + 41.556$, $R^2 = 0.998$, $slop = -3.304$.

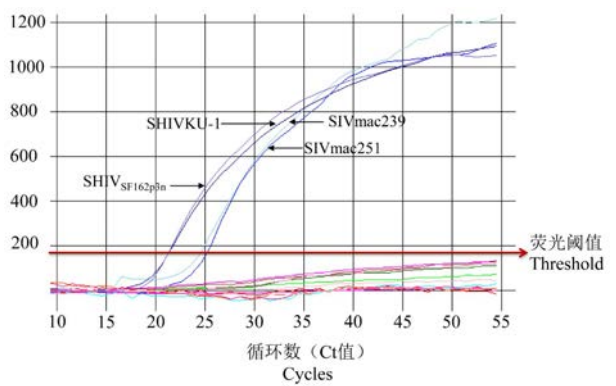
Figure 2 TaqMan real-time FQ-PCR quantitative fluorescence amplification plot and standard curve of pGEM® -T-SHIV *gag*

表 3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测猴样本的结果
Table 3 Results of samples from monkeys detected by TaqMan real-time FQ-PCR

样本来源 Sample origin	样本类型 Sample type	SIV/SHIV 感染猴 SHIV/SIV infected rhesus monkey		健康猴 Healthy rhesus	
		阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive
PBMC	RNA	0	7	7	0
	DNA	0	7	7	0
LN	RNA	0	31	28	0
	DNA	0	31	28	0
Plasma	RNA	0	7	7	0

3 讨论

SIV 感染猕猴是目前研究 HIV/AIDS 的最佳动物模型^[15]。为了获得更接近 HIV 感染人类的猴动物模型,研究人员构建了由 HIV 和 SIV 嵌合的病毒,被称为 SHIV 病毒,SHIV 能有效地感染猕猴^[16],已被广泛地用于 HIV/AIDS 的研究工作。由于 SHIV 的遗传基因包括了 HIV 的逆转录酶基因序列,SHIV 感染的非人灵长类动物模型成为评估抗 HIV 药物和疫苗的重要工具^[5]。SHIV 感染后期,由于病毒繁殖受到免疫抑制,血中病毒量下降。但仍有部分病毒以前病毒(provirus)DNA 或 RNA 分子形式潜伏在感染细胞中^[17-18]。在 SHIV 感染的潜伏期和平台期,血浆病毒载量降低或消失的情况下,前病毒 DNA 载量更能反映感染的状态,与疾病的发展密切相关。



注:SHIV 和 SIV 有特异性扩增,HCV JFH-1、EBV、HBV、HSV-1 17syn+以及 HSV-2 G Strain 以及人原代巨噬细胞、无 RNA 酶水扩增结果都为阴性。

图 3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性分析
Note. To analyze the specificity of TaqMan real-time FQ-PCR for detecting SHIV or SIV *gag*mRNA. Except for the strains of SHIV and SIV, the method could not amplify cDNA or DNA of other viruses.

Figure 3 Specific amplification tests of TaqMan real-time FQ-PCR

在本研究中我们发现 TaqMan 实时荧光定量 PCR 能够检测出 SHIV/SIV,而对其它几种病毒(HCV JFH-1、EBV、HBV、HSV-1 17syn+和 HSV-2 G)的扩增结果都为阴性(图 3),说明该方法检测 SHIV/SIV 具有高特异性。此外,为了能够定量检测病毒,我们还构建了 pGEM® -T-SHIV *gag* 质粒标准品,图 2 的结果显示,构建的质粒标准品 R^2 在 0.997-1.000 之间,说明该标准品所绘制的标准曲

线性关系良好。由表 2 中所显示的各个浓度梯度的标准品经过 5 次独立重复实验扩增得到的 CT 值的变异系数在 0.6%~1.1% 之间,说明该方法具有较好的可重复性。为了进一步评价该方法的特异性和灵敏度,我们使用该方法检测了 SHIV 和 SIV 感染恒河猴的血浆,外周血单核细胞以及淋巴结中病毒 RNA 以及前病毒 DNA 的水平。如图 4 所示,所有 SIV 或 SHIV 感染猴样本的结果都为阳性,而健康猴样本的结果均为阴性,说明该方法能够特异性检测出 SHIV/SIV 感染猴不同组织中的病毒 RNA 以及前病毒 DNA。

传统的荧光定量 PCR 检测方法是利用荧光染料与双链 DNA 结合之后发出荧光信号,通过检测该荧光信号进行定量检测。而本研究采用的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测的是积累荧光,由于增加了探针的识别步骤,PCR 检测的特异性比传统的荧光定量 PCR 更高^[19]。虽然已有研究运用 TaqMan 探针的方法检测猴艾滋病毒^[20],但本研究构建的检测方法灵敏度更高,并同时检测了 SHIV 和 SIV 不同毒株的病毒核酸,在特异性评价实验中同时检测了多种 RNA 病毒和 DNA 病毒核酸,且在实际应用评价中检测了多种猴组织样本(血浆, PBMC 以及淋巴结)中的病毒 RNA 和前病毒 DNA。

本研究构建的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测法的灵敏度为 10^2 copies/ μ L(图 2)。如果样本的病毒量少于 10^2 copies/ μ L,需重复检测避免漏诊,必要时还应动态地检测动物血浆病毒载量的变化。本法特异性高,除了能特异性地诊断是否有 SIV/SHIV 感染外,还能定量检测 SIV/SHIV 的 RNA 和前病毒 DNA 的水平。因此,该法具有特异、敏感和快速的优点,适用于 SIV/SHIV 感染猴模型的动物研究。

参考文献:

- [1] World Health Organization. HIV/AIDS, Key facts, 2020 [EB/OL]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
- [2] Gardner MB. The history of simian AIDS [J]. J Med Primatol, 1996, 25(3): 148-157.
- [3] Letvin NL, Daniel MD, Sehgal PK, et al. Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III [J]. Science, 1985, 230(4721): 71-73.
- [4] Letvin NL. Animal models for AIDS [J]. Immunol Today, 1990, 11(9): 322-326.
- [5] Uberla K, Stahl-Hennig C, Böttiger D, et al. Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(18): 8210-8214.
- [6] Rosenberg YJ, Montefiori DC, Labranche CC, et al. Protection against SHIV Challenge by Subcutaneous Administration of the Plant-Derived PGT121 Broadly Neutralizing Antibody in Macaques [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0152760.
- [7] Hessel AJ, Jaworski JP, Epton E. Early short-term treatment with neutralizing human monoclonal antibodies halts SHIV infection in infant macaques [J]. 2016, 22(4): 362-368.
- [8] Gautam R, Nishimura Y, Pegu A, et al. A single injection of anti-HIV-1 antibodies protects against repeated SHIV challenges [J]. Nature, 2016, 533(7601): 105-109.
- [9] Bolton DL, Pegu A, Wang K, et al. Human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies suppress acute simian-human immunodeficiency virus viremia and limit seeding of cell-associated viral reservoirs [J]. J Virol, 2016, 90(3): 1321-1332.
- [10] Kearney MF, Anderson EM, Coomer C, et al. Well-mixed plasma and tissue viral populations in RT-SHIV-infected macaques implies a lack of viral replication in the tissues during antiretroviral therapy [J]. Retrovirology, 2015, 12: 93.
- [11] Byraredddy SN, Arthos J, Cicala C, et al. Sustained virologic control in SIV + macaques after antiretroviral and alpha4beta7 antibody therapy [J]. Science, 2016, 354(6309): 197-202.
- [12] Andrews CD, Spreen WR, Mohri H, et al. Long-acting integrase inhibitor protects macaques from intrarectal simian/human immunodeficiency virus [J]. Science, 2014, 343(6175): 1151-1154.
- [13] Liu J, Xiao Q, Zhou R, et al. Comparative analysis of immune activation markers of cd8(+) t cells in lymph nodes of different origins in siv-infected chinese rhesus macaques [J]. Front Immunol, 2016, 7: 371.
- [14] Xiao Q, Li J, Yu Q, et al. Distinct compartmentalization in the CNS of SHIVKU-1-infected chinese rhesus macaque is associated with severe neuropathology [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2015, 70(5): e168-e171.
- [15] Hu SL. Non-human primate models for AIDS vaccine research [J]. Curr Drug Targets Infect Disord, 2005, 5(2): 193-201.
- [16] Jiang Y, Tian B, Saifuddin M, et al. RT-SHIV, an infectious CCR5-tropic chimeric virus suitable for evaluating HIV reverse transcriptase inhibitors in macaque models [J]. AIDS Res Ther, 2009, 6: 23.
- [17] Wang W, Cong Z, Jiang H, et al. Comparison of viral burden and disease progression in Chinese-origin rhesus macaques infected with common experimentally applied chimeric virus: SHIV-1157ipd3N4, SHIV-162P3, or SHIV-KB9 [J]. J Med Primatol, 2014, 43(4): 247-257.
- [18] Pal R, Galmin L, Pereira LE, et al. Virological and molecular characterization of a simian human immunodeficiency virus (SHIV) encoding the envelope and reverse transcriptase genes from HIV-1 [J]. Virology, 2012, 432(1): 173-183.
- [19] Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, et al. Real-time PCR detection chemistry [J]. Clin Chim Acta, 2015, 439: 231-250.
- [20] 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9): 68-72.

吴伟鑫,刘慧聪,曲胜华,等. 动物医学专业“实验动物学”课程线上教学的思考[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 109-112.

Wu WX, Liu HC, Qu SH, et al. Survey analysis of an online laboratory animal science course in a veterinary medicine training program [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 109-112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.017

动物医学专业“实验动物学”课程线上教学的思考

吴伟鑫,刘慧聪,曲胜华,张 冰*

(中国农业大学动物医学院,北京 100193)

【摘要】 目的 调查“实验动物学”线上教学的效果,以期为今后的教学活动提供参考。方法 本研究采用问卷形式,以北京某高校动物医学院“实验动物学”的线上教学活动为基础,调查该课程线上教学情况,及学生关于教学的意见与建议。结果 动物医学专业“实验动物学”课程线上教学能基本满足教学的目标和效果,但单纯线上教学缺乏实践教学环节,将线上与线下教学相结合,能达到更好的教学效果。结论 本研究为今后“实验动物学”教学活动的开展提供了一定的参考和建议,但仍需不断对课程的教学进行思考总结,探索多元化的教学方式,提高课程的教学质量。

【关键词】 动物医学专业;实验动物学;线上教学

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2020)12-0109-04

Survey analysis of an online laboratory animal science course in a veterinary medicine training program

WU Weixin, LIU Huicong, QU Shenghua, ZHANG Bing*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of online teaching in a laboratory animal science course and provide guidance for future teaching activities. **Methods** A questionnaire survey was conducted among students at a College of Veterinary Medicine in Beijing, China, who had completed an online laboratory animal science course. **Results**

The online laboratory animal science course met the basic teaching objective established by the College of Veterinary Medicine. However, online teaching alone lacks a practical component; a combined approach using both online and on-site teaching method can provide more robust result. **Conclusions** These result provide some guidance for the future development of laboratory animal science courses. However, further efforts are needed to more comprehensively establish the teaching model of the course, explore additional teaching method, and improve the quality of instruction.

【Keywords】 veterinary medicine; laboratory animal science; online teaching

实验动物是现代生命科学研究中必备的四个基础研究条件之一,生命科学领域的发展离不开实验动物和动物实验的帮助。自诺贝尔生理医学奖

设立以来,83.8%的获奖项目涉及到动物实验的研究,一直以来,实验动物作为人类的“替难者”,已经并将继续为保障人类健康做出了巨大的牺牲和

【作者简介】吴伟鑫(1998—),男,本科,动物医学专业。E-mail:werson@cau.edu.cn

【通信作者】张冰(1966—),男,副教授,主要从事实验动物研究。E-mail:zhangdb@cau.edu.cn

贡献^[1-2]。

随着我国科研水平的不断提高,对实验动物专业人才的需求量也逐渐增大,动物医学专业培养的兽医人才在实验动物的饲养管理和使用过程中扮演着重要的角色,在保障实验动物的健康,维护动物的福利等各方面起到重要的作用。在动物医学教育体系中,“实验动物学”是教授未来的兽医有关实验动物和动物试验相关知识的重要课程,在动物医学教育体系中提升、充实受教育者的理论知识,在提高其动手能力、培养其团队合作精神等方面具有重要作用,对提高我国科研水平具有重大意义^[3-4]。

“新冠肺炎”疫情期间,教育部发布“停课不停教、停课不停学”、利用网络平台坚持开展教学活动的通知,各地高校纷纷开启线上教学模式。有研究^[5-6]通过调查我国高校物理类课程在疫情期间的线上教学情况,发现教师和学生都能较好地适应线上教学模式,且线上教学形式丰富,效果较好,但也存在教学强度大、学生和教师交流方式单一、缺乏有效监督等缺点。北京某高校动物医学院的“实验动物学”也以线上教学的方式完成了授课,我们在课程结束后通过问卷的方式对本次线上教学的效果进行了调查,围绕该课程的教学模式(线上、线下)进行了探讨。

1 实验方法

1.1 调查对象

本研究调查对象为在 2019–2020 学年春季学期,通过线上教学的方式完成“实验动物学”课程学习的北京某高校动物医学院的部分学生,共计 45 人。该课程为该高校动物医学专业学生的必修课,共 32 学时,选用“雨课堂”作为教学平台。通过课前发放预习课件、线上直播、弹幕互动、及微信群答疑等方式开展本次教学活动。

1.2 调查方法

本研究采用问卷调查方法,用“问卷星”制备调查问卷,将问卷发放到课程微信群,采取不记名方式,让学生在在规定时间内,根据自己的情况自主完成问卷。

1.3 调查内容

本次问卷对此次线上教学情况,选课学生的线上教学平台使用情况,“实验动物学”课程的主观感知,线上线下教学方式的对比,课后学习时间等进

行了调查,共 12 题,包括 6 道单选题,4 道多选题,2 道填空题。

1.4 问卷回收情况

本研究共调查选课学生 45 人,发放问卷 45 份,回收有效问卷 42 份(93.33%)。

2 结果

2.1 线上教学反馈

本研究调研的“实验动物学”课程使用“雨课堂”平台进行教学,调查结果显示,83.33%的学生认为该平台适合进行“实验动物学”的线上教学,4.76%的学生表示不太适应该平台的使用操作。有 50%的学生认为以直播形式进行“实验动物学”的线上教学比较合适,47.62%的学生认为直播和录播结合的方式更为适合(表 1)。

此外,学生们对线上教学过程中需要增强和提高的环节(直播、录播、在线研讨、资料自学、答疑等)看法各不相同。

2.2 课后投入时间

在线上教学的过程中,64.29%的学生课后投入预习、复习和作业中的时间为 0~2 h(表 2)。30.95%的学生认为线上教学的课后投入的时间比线下教学更多,38.1%的学生认为线上、线下教学的课后投入时间没有差异。

2.3 线上与线下教学形式比较

对线上、线下教学的优势和局限性进行比较,76.19%的学生认为线上教学的学习时间与线下教学相比更自由,47.62%的学生认为线上教学可供使用的学习工具更多,线上教学的课程回放功能能够更有助于同学们的学习和复习。

42.86%的学生认为自己的学习效率不高,缺少与其他同学的交流。38.1%的学生认为线上教学的学习空间与环境比线下教学更适宜,42.86%的学生

表 1 “实验动物学”最合适的线上教学方式($n=42$)

Table 1 Most suitable online teaching method of laboratory animal science		
选项 Option	频次 Frequency	比例(%) Ratio
直播 Live	21	50
录播 Recorded	0	0
直播与录播结合 Combination of live and recorded	20	47.62
均可 Either live or recorded	1	2.38

认为线上课程缺少合适的学习环境。

针对教学方式进行的调查发现,64.29%的学生认为线上、线下结合的方式更适合“实验动物学”的教学(表3)。

此外,由于线上教学无法让学生走进实验动物设施现场参观学习,针对这个问题进行了调查,88.1%的学生认为线上教学同样需要添加教学实践、参观等环节,从而加深对课程内容的理解和认识。

3 讨论

3.1 动物医学专业开展“实验动物学”课程的必要性

兽医工作者在实验动物的各个领域扮演着重要的角色,如实验动物的健康与福利管理、实验动物的生产与使用、实验动物的生物安全管理、实验动物的种群管理以及兽医专业技术化的服务等;同样,兽医的科研工作也离不开实验动物。因此,动物医学专业开展“实验动物学”课程对整个兽医领域的各方面都十分重要。

表 2 学生课后投入“实验动物学”学习的时间(n=42)
Table 2 The time students spend on learning Laboratory Animal Science after class

选项 Option	频次 Frequency	比例(%) Ratio
0~2 h 0~2 h	27	64.29
2~4 h 2~4 h	11	26.19
4~6 h 4~6 h	1	2.38
6 h 以上 Over 6 h	3	7.14

表 3 “实验动物学”最适合的教学方式(n=42)
Table 3 The most suitable teaching method of Laboratory Animal Science

选项 Option	频次 Frequency	比例(%) Ratio
线上教学 Online teaching	5	11.9
线下教学 Onsite teaching	5	11.9
线上、线下结合 Combination of online and onsite teaching	27	64.29
不确定 Unsure	5	11.9

3.2 “实验动物学”课程线上教学效果及与线下教学的比较

“实验动物学”是研究实验动物和动物实验的一门综合性学科,也是我国多所高校动物医学专业的必修课程之一。受新冠肺炎疫情的影响,高校许多课程从线下转入线上教学,“实验动物学”课程也做出了相应的改变。为增强“实验动物学”的教学效果,进一步提高教学水平,本研究以北京某高校动物医学院“实验动物学”的线上教学活动为基础,以问卷形式调查学生关于该课程线上教学效果的意见与建议,与以往课程线下教学的效果进行对比,进行归纳总结,并围绕如何加强教学效果进行了探讨。

调查结果显示,本研究涉及的“实验动物学”课程线上的教学效果较好。大部分学生在课程结束后对实验动物的法律法规、福利和伦理审查、基本用途、环境与设施控制、遗传与质量控制、微生物与寄生虫控制、营养与饲料控制有了基本的概念,对常见的实验动物特征和用途、科学的实验技术和方法、实验动物的重要性、动物实验的严谨性有了一定的认识,也对实验动物科学有了全面的了解。

线上教学平台的信息通知、签到、直播、课程回放和“弹幕”等功能基本满足“实验动物学”的教学需要,但学生们认为线上教学过程中需要增强和提高的环节各不相同,说明该课程在线上教学模式中仍有上升空间。仅30.95%的学生认为线上教学与线下教学相比,在课后投入的时间更多,这表明线上教学方式并没有明显增加学生课后学习的负担。42.86%的学生认为线上教学缺少合适学习环境,38.1%的学生认为线上教学学习环境更适宜,从相对数上讲,二者相差不大,这表明线上教学同样适应于“实验动物学”。

通过网络软件统计,在线上教学活动期间,学生与教师的互动“弹幕”达1480人次,由此可见,线上直播教学的方式也可实现师生间的良好互动。

本次调查研究表明,在教学实践活动中,使用录播课程、直播答疑的方式,让学生自主选择适合的学习时间,或许可以满足学生在线上教学过程中对学习时间和环境的需求,但也可能会降低学习效率和与教师之间的沟通。

3.3 教学方法的改进

选择合适的教学平台对线上教学的成功开展至关重要,许多网络教学平台可以回放教学视频,

且能做到良好的互动^[7]。本次调查的课程使用的“雨课堂”教学平台具有直播、回放、互动的基本功能,基本可以满足教学要求,但与多名学生进行语音、视频的实时交流时会出现网络卡顿,有待改进。

实践教学是“实验动物学”课程不可或缺的一环^[8-10],应考虑在线上通过线上录像讲解、视频直播等方式进行开展,或者在线上进行理论教学,在线下开展实践活动。中国教育可能会迎来 OMO (Online-Merge-Offline,线上与线下融合)时代,通过线上和线下教学活动的有机结合,开展混合式教学,可能会达到更好的教学效果^[11]。

有研究^[12]表明“实验动物学”采用“微视频”融入课堂的方式,不仅能够实现语音和图像真实、有效地结合、突出和强调重要事项,也能解决文字和图像授课脱离实际操作的问题。“微视频”能够在一定程度上丰富教学手段,提高教学效果。此外,研讨课(seminar)教学模式在研究生“医学实验动物学”教学中的应用能显著提高研究生课程知识的深度和广度^[13],这一教学方法对于动物医学专业的“实验动物学”课程教学而言同样具有参考意义。

3.4 思考与总结

对“实验动物从业人员岗位证书”的培训方面而言,基于“实验动物学”线上教学的研究表明,“上岗证”培训单位采用线上教学的方式,开展全国或区域性的线上培训、考试等活动,即使在特定的时期,也可以保障实验动物领域的人才培养和科研活动的有序开展。

综上所述,动物医学专业“实验动物学”课程线上教学能基本满足教学的目标和效果,但单纯的线上教学活动仍缺乏现场观摩学习、动物实验操作等实践教学环节,将线上与线下教学相结合,如线上开展录播课程和直播答疑,线下开展实践教学等,或许能达到更好的教学效果^[14]。

本研究为今后“实验动物学”课程教学活动的开展提供了一定的参考和建议,但仍需不断进行思考总结,探索多元化的教学方式,提高课程的线上教学质量,实现理论与实践的有机统一。

参考文献:

- [1] 吴艳玲,张先,崔振宇,等.“双一流”模式下高校研究生实验动物学课程教学模式探索[J].中国比较医学杂志,2018,28(11):111-114.
- [2] 田枫,康爱君,郑振辉.不同层次需求的实验动物学教学特点[J].中国比较医学杂志,2014,24(9):78-82.
- [3] 谭冬梅,谭毅,韩志刚.医药院校实验教学中存在的动物福利问题及对策[J].中国比较医学杂志,2016,26(12):91-94.
- [4] 韩喜彬.动物医学专业实验动物学教学改革初探[J].中国兽医杂志,2014,50(5):98-99.
- [5] 教育部高等学校大学物理课程教学指导委员会,教育部高等学校物理类专业教学指导委员会,教育部高等学校天文学类专业教学指导委员会,等.关于新冠肺炎疫情防控期间物理类课程线上教学的调查报告[J].物理与工程,2020,30(2):14-24.
- [6] 黄振,刘艳丽,杨军,等.信息化背景下护理专业临床护理课程同步实践教学模式的研究[J].中国医药导报,2019,16(4):79-82.
- [7] 张双双,杨洪涛,张义龙.疫情期间高校线上网络教学模式探讨[J].中国现代教育装备,2020,11:11-13.
- [8] 肖春兰,盛雅洁,王禹斌,等.医学院校实验动物学课程改革的几点建议[J].实验动物与比较医学,2019,39(6):496-498,504.
- [9] 刘焕,王爽,郭玉芳,等.基于雨课堂的混合式教学在病理生理学教学中的应用[J].中国医药导报,2019,16(31):60-63.
- [10] 刘建卫,章明星,潘建明,等.中医院校本科生阶段开设“实验动物学”选修课的探索[J].中国比较医学杂志,2018,28(11):123-125.
- [11] 陈钰.疫情背景下高校线上教学管理工作的实践与思考[J].中国多媒体与网络教学学报(上旬刊),2020,7:78-80.
- [12] 杨丽,楚元奎,杨文,等.微视频在医学实验动物学教学中的应用优势[J].教育教学论坛,2020,7:251-252.
- [13] 冯雪萍,王德才,李津.Seminar 教学模式在研究生“医学实验动物学”教学中的应用研究[J].右江医学,2020,48(4):318-320.
- [14] 王芳,刘小花,马圆.强化线上教学与科研创新能力培养的实验动物学教学改革[J].实验室研究与探索,2019,38(10):195-197.

[收稿日期]2020-07-06

杨仁从,杨丰华,李小辉,等. 静脉旁路移植疾病动物模型的建立及应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 113-119.

Yang RC, Yang FH, Li XH, et al. Establishment and application of animal models of venous bridge disease after coronary artery bypass grafting [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 113-119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.018

静脉旁路移植疾病动物模型的建立及应用进展

杨仁从¹, 杨丰华², 李小辉¹, 李相念¹, 李文华¹, 廖胜杰¹, 张晓慎^{1*}

(1.暨南大学附属第一医院心血管外科,广州 510630; 2.广东省实验动物监测所/广东省实验动物重点实验室, 广州 510633)

【摘要】 心血管疾病是全球疾病负担之首,其中缺血性心脏病严重危害着人们身心健康,且发病率和死亡率仍在增加。冠状动脉旁路移植术是治疗缺血性心脏病的方法之一,它有效得重建了心脏血运,但是面临着静脉移植血管远期通畅率不足的问题。因此,稳定的动物模型能够为研究解决静脉旁路移植疾病提供工具。本文总结了静脉旁路移植病动物模型的建立及应用,为建立疾病动物模型研究提供新思路。

【关键词】 冠状动脉旁路移植术;静脉移植术;再狭窄;动物模型;基因治疗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0113-07

Establishment and application of animal models of venous bridge disease after coronary artery bypass grafting

YANG Rencong¹, YANG Fenghua², LI Xiaohui¹, LI Xiangnian¹, LI Wenhua¹, LIAO Shengjie¹, ZHANG Xiaoshen^{1*}

(1. Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China.

2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510633)

【Abstract】 Cardiovascular diseases constitute the largest burden to health worldwide. Ischemic heart disease seriously harms the physical and mental health of sufferers and its morbidity and mortality continue to increase. Coronary artery bypass grafting is a treatment for ischemic heart disease that can effectively rebuild the blood flow of the heart, but it has the problem of an insufficient long-term patency rate for venous grafts. Stable animal models can provide tools to investigate venous bypass graft diseases. This article summarizes the establishment and application of animal models of venous bypass graft disease to stimulate new ideas for research.

【Keywords】 CABG; vein graft; restenosis; animal models; gene therapy

心血管疾病是世界上发病率、致死率最高的疾病。数据显示,我国心血管疾病的发病率和致死率仍处于上升阶段,其死亡占居民疾病死亡构成 40% 以上,居于首位,高于肿瘤及其他疾病,其中冠心病的死亡率占到心血管疾病的 24.1%,且一直呈现上升态势^[1]。因此,冠心病的防治工作负担严重,面临着巨大挑战。冠心病的最主要原因是心肌缺血,治疗缺血性心脏病的主要方式有药物治疗、经皮冠

[基金项目] 广东省科技计划项目 (2017A020215076)。

[作者简介] 杨仁从 (1995—),女,硕士研究生,主要从事心血管外科基础应用研究。E-mail: 1961263359@qq.com

[通信作者] 张晓慎,男,博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事微创技术在心血管外科中的应用研究。

E-mail: xshchang@outlook.com

状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)和冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)^[2],虽然药物治疗像他汀类药物的应用大大降低了心脏的不良反应,PCI手术可治疗大部分急性心肌梗死,但是CABG仍然是治疗冠脉多支病变患者的优先选择,并且在长期生存率和缓解心绞痛方面具有显著优势^[2-3]。自从1964年,Vasilii Kolesov完成了第一例使用自体乳内动脉的冠脉旁路移植术^[2],1967年Favalovo完成第一例使用自体大隐静脉的冠脉旁路移植术以来,冠状动脉旁路移植手术在临床上得以广泛应用,大隐静脉和乳内动脉也是至今为止最常用的桥血管^[2]。提高静脉桥血管的通畅率和医师微创手术技术培训是目前CABG发展存在的问题,这需要建立稳定可重复的实验动物模型,为评估手术效果、防治冠脉静脉旁路移植病、外科医师培训提供一个可靠的工具。

1 静脉旁路移植疾病实验动物模型概况

1.1 建立静脉旁路移植疾病模型实验动物种类特征

国内外为研究旁路移植疾病建立了各种各样的实验动物模型,从动物种类的选择上来看,有小鼠、大鼠、家兔等小动物和犬、羊、猪等大动物,在小动物和大动物在建立模型上各有利弊。小动物具有来源方便、价格便宜、容易饲养和获得大量样本数据的优点,但是小动物的心血管和人类心血管系统差异大,不能完全模拟人心血管疾病病变,具有明显的局限性,尽管大动物比小动物更加昂贵、需要较多的药物、外科手术成本以及饲养成本更高,也不容易获得大量的样本数据,但大动物心血管在生理解剖结构与生理指标上,较小动物更接近于人类的心血管系统。目前,在小鼠、大鼠和家兔等小动物上建立的模型有颈静脉-颈总动脉移植血管病变模型,颈动脉-股动脉移植模型,下腔静脉-颈动脉移植血管病变模型等;使用犬、羊和猪等大动物上建立的模型主要有大隐静脉-冠状动脉移植血管病变模型,乳内动脉-冠状动脉移植血管病变模型,股静脉-股动脉桥血管模型等。

1.2 静脉旁路移植病动物模型建立方法

1.2.1 小动物模型建立方法

为与大动物静脉旁路移植病模型进行类比研究,我们总结了小动物模型建立的现状,在小动物上其他部位手术可以在一定程度模拟病变的发生

与进展,造模方式按照缝合方式来划分,主要分为直接缝合和Cuff套管技术辅助缝合。小鼠、大鼠和家兔都常用直接缝合法,取下腔静脉、颈静脉或者腹壁静脉缝合至颈总动脉或股动脉上,通常用8/0或10/0无损伤缝线进行缝合,缝合法操作直接,易于掌握,但增加了实验误差^[4-7]。Cuff套管技术主要应用在小鼠模型的建立上,简单来讲就是采集移植静脉如下腔静脉缝合到左侧或右侧颈总动脉上,将静脉留置针剪成适宜长度的套管,在套管一端做一小柄,游离颈总动脉,在近心端阻断,在分叉处结扎、切断,然后从做好的套管内穿出,血管内膜外翻至套管上固定,再将取下的桥血管在翻折边缘处与动脉缝合,放开血管夹使下腔静脉充盈,血流恢复。因为小鼠血管很细,若直接缝合容易发生吻合口处狭窄,所得静脉旁路移植病模型不能排除手术技术带来的实验误差,Cuff套管技术使得吻合口处不易狭窄,操作简便迅速,内膜光滑不易发生血栓,因此小鼠模型的建立上具有显著优势^[8-10]。

造模方式若按照搭桥方法来划分则分为端侧吻合、端端吻合以及血管壁补丁三种。大小鼠体型较小,通常进行端侧吻合,颈静脉或下腔静脉可以游离一端缝合至动脉管壁上;家兔则进行端端吻合,将家兔颈内静脉或颈外静脉整段游离,并将颈总动脉阻断,两端进行吻合,桥血管全段灌注动脉血流,使内膜增生的病变更加明显^[6,8];此外,小鼠可做另一种特殊的吻合方式即血管壁补丁,只取小面积颈总静脉血管壁缝合至颈总动脉上也能观察到内膜变化^[11]。小鼠、大鼠和家兔的静脉旁路移植疾病病理学改变呈现递进的变化,动物体型越大,则病变越呈现一定的层次,观察越清晰。因此,家兔在术后2d即可发现炎症细胞粘附于内皮细胞,术后7~10d观察到静脉桥出现阻塞,术后2周内膜、中膜增厚,胶原纤维和弹力纤维增生,术后4周则显示内膜破裂,中膜显著增厚,弹力纤维断裂^[12-13]。

1.2.2 小型猪模型建立方法

大动物的静脉旁路移植病模型相比小动物要少,但是大动物在建立模型上具有巨大的潜力。上世纪七十年代,研究者们开始将猪用于心血管疾病的研究当中,发现猪的心血管系统比其他动物和人具有更高的相似性。用于实验的小型猪(25~30公斤)的心、体比率与人相同,在解剖上,猪的冠状动脉分布与人相似,都几乎完全缺乏先天性的侧枝和

吻合,而且猪的心脏代谢和动脉粥样硬化的过程也和人类相似^[14]。有研究显示,通过给猪喂食高胆固醇饮食,猪发展了冠脉粥样硬化病变且能发生心肌梗死,这与人类冠心病发生发展类似,测定冠心病猪模型和人的血清蛋白组,发现二者在疾病相关的 8 个功能组上存在相似性^[15-16],猪在心血管疾病研究的应用价值得到人们重视。在猪身上通常取乳内动脉与左前降支进行搭桥或是建立双侧、Y 型乳内动脉桥^[17-18],但是静脉搭桥作为传统方法有静脉桥血管来源丰富,获取技术简单,实验人员也容易掌握的优势,具有建模的潜力。有研究用长白猪作为实验动物,用 no touch 技术剥取大隐静脉与颈总动脉进行端端吻合^[19]。猪不仅可用于静脉旁路移植病研究,还适用于麻醉技术、体外循环和外科手术培训的创新与改造。然而目前对于猪静脉桥狭窄模型还没有统一的标准,这是猪作为实验动物疾病模型需要深入研究的一个方向,该模型将会是一个非常有用的工具。

1.2.3 其它大动物模型建立方法

犬的心脏很大,占其体重的 0.72%~0.96%,血液循环系统发达,适于做心脏手术及慢性实验,比格犬是常用的实验犬类品种。在犬身上通常建立的是动脉桥血管模型有颈总动脉-左旋支模型、股动脉-左旋支模型和乳内动脉-左前降支模型^[20-21]。有文献报道在杂种犬上通过静脉移植物将停搏液注入升主动脉来检测一种自动吻合装置,但并未观察静脉移植物狭窄病变^[22];也有研究采集比格犬的双侧股静脉,吻合至股动脉,采用端端吻合方法建立了股静脉-股动脉移植模型来模拟 CABG 手术吻合口病变^[23]。但还未见到静脉旁路移植病实验犬模型,这也有待建立。

用羊建立心脏疾病模型的研究很少,有研究者采取成年绵羊的大隐静脉,每只羊接受两次静脉移植,一段静脉吻合至左前降支,另一段吻合至钝缘支,成功建立了静脉旁路移植病模型^[24]。

非人灵长类动物主要指猿猴类如恒河猴、红面断尾猴等,它们在种属上和人类最为接近,所建立的非人灵长类动物疾病模型具有更高的相似性和可类比性。它们容易诱发动脉粥样硬化,是较理想的模型。但它不能完全模拟人类粥样硬化的病变,猴的病变部位经常在小动脉,人则在大动脉,猴的病变即使出现在大动脉也与人类分布不同。此外,非人灵长类动物价格昂贵,饲养成本高且不易获取

大样本,这也是它们作为实验动物的局限性。目前,尚未在灵长类动物上建立静脉旁路移植病模型。

通常来说,大动物模型在术后 4~12 周都可观察到静脉桥内膜增生、中膜平滑肌增厚、管腔狭窄甚至闭塞,它们病变过程长,有利于做慢性实验。

1.3 常用取材桥血管

乳内动脉是临床上最常用的桥血管,术后患者的随访中也证明了乳内动脉桥具有良好的长期通畅性。但是,当患者需要紧急血运重建时,乳内动脉的使用率占 61.5%,在非紧急情况下,其使用率占 92.5%,也即血流动力学不稳定时会有相当一部分患者取静脉作为桥血管,因为在这种情况下,只有静脉血管才能绕过所有重要的冠状动脉狭窄病变,利于快速取材^[25]。此外,近年来桡动脉也逐渐成为继乳内动脉后第二常规使用的动脉桥血管,它长度足够,血管壁宽厚,对吻合技术的要求较低,且早期效果很好,相对静脉桥也可以改善中远期预后;但是桡动脉的缺点也非常明显,由于它管壁中层有大量平滑肌细胞,对手术过程中的外界刺激非常敏感,容易发生痉挛,这可能是远期血管狭窄的原因。另一项研究表明桡动脉远期死亡率为 24.5%(平均随访 6.6 年),因此,桡动脉的采集有赖于无接触技术,它与乳内动脉早中期效果相当,远期效果尚不确定^[26-27]。胃网膜动脉是另一种可用导管,虽然使用较少,但有研究证实它能够长期通畅,患者也有良好的术后生活质量^[28]。这是三种人类常用的动脉搭桥血管,通常在动物上使用的是乳内动脉桥和股动脉桥。

人类动脉血管桥存在长度不足的问题,而这正是静脉血管桥的优势所在。CABG 手术最常用的静脉是大隐静脉,也是大动物模型常用的静脉桥。但是大隐静脉较高的远期闭塞率,成为它使用的一个局限。血管造影显示,大隐静脉在术后平均 7.6 年的闭塞率是桡动脉的 2 倍,接受大隐静脉移植的患者在平均 7.6 年内的死亡风险比桡动脉移植患者高了 44%^[27]。乳内静脉也逐渐开始作为动物模型的取材血管,尤其在猪的身上,由于其大隐静脉不像人的那样长,且管径小不易进行手术操作,而乳内静脉可以方便得与冠状动脉吻合并且距离足够。虽然乳内静脉在临床上并不常用,但是有患者由于右乳内动脉远端的内膜质量和口径不理想,不得不缩短乳内动脉的获取长度,这也导致到右冠脉的长度不够,于是医生用 2~3 cm 的右乳内静脉与右乳

内动脉吻合,延长了桥血管长度,且在六个月内通畅率良好。除此之外就没有其它类似病历了,使用猪作乳内静脉搭桥的研究也只有一项,且成功建立了其内膜增生的模型^[29-30]。这两项研究为建立乳内静脉桥动物模型提供了可能性。不同动物模型种类及桥血管取材总结如表 1。

1.4 模型评价指标

在模型整体上超声检测是一种判断血管是否狭窄,血流是否通畅的比较直观的方法,超声血流检测仪可以测量不同狭窄程度时桥血管的即时血流,也可以观察到静脉桥内膜是否有斑块形成、增厚和管腔是否狭窄^[17, 21]。血管造影也可以准确得反映桥血管的病变部位和程度^[21, 31]。在组织水平上,病理学改变是模型建立是否成功的金标准,大多数研究都能够在术后 4 周观察到典型静脉旁路移植病变,即内膜增生、中膜平滑肌细胞增殖与迁移、管壁增厚和管腔狭窄,长时间的病理观察则需要进一步验证。在细胞水平上,通常培养大隐静脉细胞来观察不同扩张液等对细胞形态及活力的影响^[32-33],也有用 Ang II 诱导人脐静脉细胞模拟建立静脉桥内皮细胞损伤模型,MTT 法检测细胞活力表明 1 μmol/L 浓度诱导 24 h 为最佳,此时细胞活力

下降率最大,适宜进行各种基因或药物研究^[34]。在分子水平上,主要探索 CABG 术后桥血管狭窄的体外诊断指标,如在非人灵长类动物术后测定血浆 IL-6 水平、内皮素等^[32, 35]。

2 静脉旁路移植病动物模型存在的问题

静脉旁路移植病模型也存在各自的问题。大小鼠的血管重建也只能诱导最小程度的炎症和血栓形成,大多数野生型小鼠仅发育有限的肌内膜,仅由几个细胞层组成,因此小鼠模型易出现 II 型错误,很难进行早期评估,可用于后续分析的样本量也较少;家兔同样如此。犬模型中未见明显的狭窄病变;羊和猪的麻醉成本太高,且样本量太少不足以证明有临床意义。所有的动物模型都有药物疗效等测试时间的有限性,血管重构不能长期维持,也没有理想的模型可以完全概括人类血管损伤后的多变量反应,外推不能有最大意义^[36]。

3 静脉旁路移植病动物模型的应用

3.1 基因治疗的应用

CABG 术后静脉桥血管狭窄或闭塞是需要解决的一个问题,大隐静脉取材方便,长度足够,且采集

表 1 实验动物种类、桥血管模型种类与人的比较				
Table 1 Comparison of experimental animal species, bridge vascular model and human				
分类 Sort	取材血管 Graft vessels	模型 Model	建立方法 Method	病理学改变 Pathological changes
家兔 Rabbit	颈总静脉 Jugular vein 颈内静脉 Internal jugular vein 颈外静脉 External jugular vein	颈总静脉-颈总动脉 Jugular vein-Carotid artery	端端吻合 End to end anastomosis	4 周后内膜显著增生 ^[12-13] After 4 weeks, intima hyperplasia was significant
		颈内静脉-颈总动脉 Internal jugular vein-Carotid artery	端端吻合,单侧或双侧 End to end anastomosis, unilateral or bilateral	同上
		颈外静脉-颈总动脉 External jugular vein-Carotid artery	同上	The same as above
				同上
			The same as above	The same as above
猪 Pig	乳内动脉 Internal mammary artery 大隐静脉 Saphenous vein	Y 型乳内动脉模型 Y type Internal mammary artery model	左右交叉缝合 Left and right cross suture	动脉桥血流通畅 ^[18] The blood flow of arterial bridge was unobstructed
		大隐静脉-颈总动脉 Saphenous vein-Carotid artery	端端吻合 End to end anastomosis	4 周后血管狭窄 ^[19] Four weeks later, the vessel became narrow
犬 Dog	双侧股静脉 Bilateral femoral veins	股静脉-股动脉 Femoral vein-Femoral artery	端端吻合 End to end anastomosis	未见静脉桥狭窄 ^[22] No vein bridge stenosis was found
羊 Sheep	大隐静脉 Saphenous vein	大隐静脉-左前降支 Saphenous vein-Left anterior descent branch	端侧吻合 End to side anastomosis	术后 12 周血管狭窄 ^[24] Vascular stenosis was found at 12 weeks after operation
		大隐静脉-钝缘支 Saphenous vein-Ramus marginata	同上	
			The same as above	

后对下肢供血影响不大,是临床上最常用的移植静脉,研究发现,大隐静脉作为桥血管术后 10 年中有超过 60% 出现了再狭窄^[36]。静脉桥再狭窄由多种因素导致:早期(术后 1 月内)的狭窄多与血栓形成有关,血栓的形成可与手术操作技术不当、血液的高凝性等有关;中期(术后 1 个月~1 年)狭窄多与桥血管内膜增厚、中膜平滑肌细胞增殖有关;晚期(术后 1 年以上)狭窄主要是由于动脉粥样硬化血管疾病所致^[37-38]。其中中晚期狭窄是需要预防治疗的阶段。

了解移植静脉桥血管狭窄的病理机制有助于我们寻找多种多样的预防方法,预防静脉桥血管狭窄的方法如药物治疗等虽然取得了一定的效果,但是都未从根本上改变静脉桥血管远期通畅率低的问题,研究者们希望从静脉移植病的病理生理机制上寻找新的基因靶点来进行干预。用于治疗基因靶点研究有 eNOS 基因(一氧化氮合酶基因)转染防治静脉桥狭窄、CaT 基因(组织蛋白酶 S 基因)敲除后观察内膜增生等等,它们可能通过释放 NO 或者减少 MMP-9 酶的含量来抑制狭窄^[8, 39];用于诊断靶点的有 VEGFR-3(血管内皮生长因子受体)和 CAV3(钙通道蛋白),它们的表达增高或是 C-Myc 蛋白增多可作为反映早期血管损伤后内膜扩张、预测早期狭窄的指标,这些指标有利于患者及时得到筛查与干预^[12, 40];在药效毒理及安全性评价方面,雪绒花中木酚素成分、白藜芦醇联合应用山楂总黄酮都可有效抑制血管平滑肌细胞的增殖,对 endothelial 细胞具有保护作用,可以作为候选药物和疗法^[7, 41];模型还可用于器械仪器的创新及评价,如新型桥血管外支撑装置、新型血流分析仪器、新型自动吻合装置的研发等等^[22, 24, 42]。除了寻找相关基因进行治疗以外,基因治疗本身的技术难题也需要解决,比如在目的基因传递载体的表达持续性问题上有待研究,从而获得远期的临床反应。

3.2 微创外科技术的医师培训

开胸手术对患者手术创伤大,严重并发症多,恢复慢,增加了住院负担,微创手术很好地改善了这些不足。20 世纪 90 年代胸腔镜技术应用于心脏外科,微创心脏外科由此诞生并迅速发展,现今微创心血管外科技术主要包括小切口技术、胸腔镜技术、复合技术和机器人应用等^[43-44]。但是,这些微创技术手术难度增大,医生要适应窄小的术野与加长的手术器械,成员配合困难,外科医生需要通过

反复模拟练习与实践才能掌握并精通。外科医师技术成长不仅需要器械模型或数字虚拟模型的创新,更需要建立疾病动物模型来给医生提供更加真实的技术实践,这是我们研究静脉旁路移植疾病动物模型一个非常重要的应用目的。

分析外科医生学习 CABG 手术的学习曲线显示,随着外科医生经验的增加,术中体外循环和动脉阻断的时间得到了改善,并且在术前可以提高这段时间的预测性与计划性,其他技能如主动脉瓣置换、二尖瓣置换等也得到了提高,但是 CABG 手术的效率并没有随外科医生经验丰富而提高^[45]。CABG 手术技术朝着微创的方向发展,技术难度增加,延长了医生学习周期。此外 CABG 大多用于有复杂病变的患者,手术风险大、状况复杂,这更加需要构建动物模型为外科医生提供实践操作的机会。研究显示,一些外科手术的学习曲线会呈现典型的特征,即在刚开始接触一项新的手术时,不同医生的熟练程度表现出差异性,随后是一个快速提升的阶段,最后进入平稳期。CABG 手术的熟练程度随着练习时间的增加呈线性上升,在大概完成 30 例手术后,手术效率提升显著,足够数目的操作练习对医生熟练掌握这项手术十分重要^[46-47]。因此,动物模型模拟训练会对外科医生的成长有很大的帮助。

4 总结与展望

实验动物模型的建立是医学研究的重要方法,有助于我们在体外模拟疾病的发生发展过程,研究新的预防与治疗方法。静脉旁路移植疾病动物模型有助于我们了解其病理生理机制,为预防治疗奠定基础,也为外科医生手术技术培训提供更多的机会。考虑到小动物经济实用的因素,目前用小动物建立模型的研究居多,但大动物如犬、猪具有造模的良好前景,找到最合适的建模方法制定标准是研究者努力的方向。

参考文献:

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.

[2] Head SJ, Kieser TM, Falk V, et al. Coronary artery bypass grafting: Part 1-the evolution over the first 50 years [J]. Eur Heart J, 2013, 34(37): 2862-2872.

[3] Head SJ, Börgermann J, Osnabrugge RL, et al. Coronary artery bypass grafting: Part 2-optimizing outcomes and future prospects [J]. Eur Heart J, 2013, 34(37): 2873-2886.

[4] 张毅,古君,刘林波,等. 表没食子儿茶素-3-没食子酸

- (EGCG)对大鼠自体移植静脉桥狭窄的抑制作用及其机制研究 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2017, 24(10): 791-796.
- [5] Liu K, Zhou W, Chen H, et al. Autologous vein graft stenosis inhibited by orphan nuclear receptorNur77-targeted siRNA [J]. Vascu Pharmacol, 2015, 73: 64-70.
 - [6] Faries PL, Marin ML, Veith FJ, et al. Immunolocalization and temporal distribution of cytokine expression during the development of vein graft intimal hyperplasia in an experimental model [J]. J Vas Surg, 1996, 24(3): 463-471.
 - [7] Zhu Y, Feng B, He S, et al. Resveratrol combined with total flavones of hawthorn alleviate the endothelial cells injury after coronary bypass graft surgery [J]. Phytomedicine, 2018, 40: 20-26.
 - [8] 张华锋, 赵龙, 任杰, 等. 组织蛋白酶 S 基因敲除在小鼠 CABG 后静脉桥再狭窄作用机制的研究 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2018, 40(1): 31-35, 39.
 - [9] 赵豫波, 石炳毅, 侯瑞鹏. 套管法小鼠颈部异位心脏移植模型的建立 [J]. 转化医学杂志, 2007, 20(4): 196-198.
 - [10] Zou Y, Hu Y, Mayr M, et al. Reduced neointima hyperplasia of vein bypass grafts in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. [J]. Circ Res, 2000, 86(4): 434-440.
 - [11] Shi C, Patel A, Zhang D, et al. Plasminogen is not required for neointima formation in a mouse model of vein graft stenosis [J]. Circ Res, 1999, 84(8): 883-890.
 - [12] Tu QM, Wang ZW. Study on mechanism of c-Myc in restenosis after coronary artery bypass grafting [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(11): 2363-2367.
 - [13] 唐秀杰, 景小勇, 王春燕, 等. 静脉桥狭窄家兔动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 53-55, 82.
 - [14] Hughes Howard C, 祝俊杰. 猪在心血管研究中的应用 [J]. 实验动物科学, 1987, 4(3): 36-38.
 - [15] Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, et al. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease [J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(1): 29-38.
 - [16] 苗兰, 孙明谦, 林成仁, 等. 猪冠心病模型与临床病人血清白蛋白相似性比较初探 [J]. 中国药事, 2013, 27(8): 822-827.
 - [17] 于建民, 毕研文, 张希全, 等. 冠状动脉旁路移植术后乳内动脉桥竞争血流动物模型的建立 [J]. 山东大学学报(医学版), 2006, 44(6): 580-582.
 - [18] 王晟, 郑少忆, 黄劲松, 等. “Y”型乳内动脉冠状动脉旁路移植术动物模型的建立 [J]. 广东医学, 2011, 32(17): 2225-2228.
 - [19] 潘文标, 郑家豪, 连峰, 等. 静脉桥狭窄实验动物模型的建立 [J]. 现代医学, 2006, 34(1): 6-8.
 - [20] 许永华, 赵瑞新, 马茂儒. 颈总动脉向冠脉搭桥动物模型建立和应用 [J]. 地方病通报, 1996, 11(1): 30-31.
 - [21] Koenig SC, VanHimbergen DJ, Jaber SF, et al. Spectral analysis of graft flow for anastomotic error detection in off-pump CABG [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1999, 16(1): S83-S87.
 - [22] Recanati MA, White JK, Titus J, et al. Endoscopic multivessel coronary artery bypass grafting using automated device for proximal anastomosis [J]. Heart Surg Forum, 2003, 6(6): E80-E84.
 - [23] Saito T, Iguchi A, Tabayashi K. Irradiation inhibits vascular anastomotic stenosis in a canine model [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 57(8): 406-412.
 - [24] Ben-Gal Y, Taggart DP, Williams MR, et al. Expandable external support device to improve Saphenous Vein Graft Patency after CABG [J]. J Cardiothorac Surg, 2013, 8(1): 122-131.
 - [25] Sher-I-Murtaza M, Baig M A R. On pump harvesting of Left Internal Mammary Artery (LIMA) in unstable patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) is a safe operative strategy: Apilot study [J]. Pak J Med Sci, 2019, 35(3): 605-608.
 - [26] Bhan A, Gupta V, Choudhary SK, et al. Radial artery in CABG: could the early results be comparable to internal mammary artery graft? [J]. Ann Thorac Surg, 1999, 67(6): 1631-1636.
 - [27] Gaudino M, Rahouma M, Abouarab A, et al. Radial artery versus saphenous vein as the second conduit for coronary artery bypass surgery: A meta-analysis [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 157(5): 1819-1825.
 - [28] Vaidya Y, Ludhwani D. Coronary Artery Bypass Graft Of The Gastroepiploic Artery [Z]. 2019.
 - [29] Roubelakis A, Karangelis D, Ohri SK. Internal thoracic vein: friend or foe? [J]. Heart Lung Vessel, 2014, 6(3): 210-212.
 - [30] Popov AF, Dorge H, Hinz J, et al. Accelerated intimal hyperplasia in aortocoronary internal mammary vein grafts in minipigs. [J]. J Cardiothorac Surg, 2008, 3(1): 20-26.
 - [31] Hasegawa T, Okada K, Takano Y, et al. Hybrid small-caliber vascular prosthesis for coronary artery bypass grafting: a preliminary study of plasmin-treated fibrin-coated vascular prosthesis [J]. ASAIO J, 2005, 51(6): 725-729.
 - [32] Kelberman D, Fife M, Rockman MV, et al. Analysis of common IL-6 promoter SNP variants and the AnTn tract in humans and primates and effects on plasma IL-6 levels following coronary artery bypass graft surgery [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1688(2): 160-167.
 - [33] 刘培生, 陈鑫, 徐明, 等. 不同扩张液在冠状动脉旁路移植术中对大隐静脉内皮细胞保护的对比研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2004, 24(2): 140-143.
 - [34] Dang H, Song B, Dong R, et al. Atorvastatin reverses the dysfunction of human umbilical vein endothelial cells induced by angiotensin II [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 5286-5297.
 - [35] Kusch B, Waldhans S, Sattler A, et al. Inhibition of carotis venous bypass graft disease by intraoperative nucleic acid-based therapy in rabbits [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 54(6): 388-392.
 - [36] de Vries MR, Simons KH, Jukema JW, et al. Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes [J]. Nat Rev Cardiol, 2016, 13(8): 451-470.
 - [37] 戴龙圣, 顾承雄, 于洋. 冠状动脉旁路移植术后静脉桥血管通畅率的研究进展 [J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(3):

453-455.

[38]

Gaudio M, Antoniadis C, Benedetto U, et al. Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure [J]. Circulation, 2017, 136(18): 1749-1764.

[39]

陶登顺. 内皮型一氧化氮合酶基因转染防治静脉血管桥再狭窄的实验研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2005.

[40]

Podemska-Jedrzejczak Z, Malinska A, Sujka-Kordowska P, et al. Vascular restenosis in coronary artery bypass grafting might be associated with VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway [J]. Heart Vessels, 2018, 33(9): 1106-1120.

[41]

Reisinger U, Schwaiger S, Zeller I, et al. Leoligin, the major lignan from Edelweiss, inhibits intimal hyperplasia of venousbypass grafts [J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(3): 542-549.

[42]

Nakata K, Orime Y, Akiyama K, et al. Novel device accurately measures graft resistance and compliance to ensure quality of coronary artery bypass [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 18(5): 438-443.

[43]

Zenati MA, Nichols L, Bonanomi G, et al. Experimental off-pump coronary bypass using a robotic telemanipulation system [J]. Comput Aided Surg, 2002, 7(4): 248-253.

[44]

Kiaii B, Kodera K, Abu-Khudair W, et al. An alternative arterial conduit for totally endoscopic multivessel coronary artery bypass [J]. Heart Surg Forum, 2001, 4(4): 315-318.

[45]

Burt BM, ElBardissi AW, Huckman RS, et al. Influence of experience and the surgical learning curve on long-term patientoutcomes in cardiac surgery. [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015, 150(5): 1061-1068.

[46]

Maruthappu M, Duclos A, Lipsitz S R, et al. Surgical learning curves and operative efficiency: a cross-specialtyobservational study [J]. BMJ open, 2015, 5(3): e6679.

[47]

Yount KW, Yarboro LT, Narahari AK, et al. Outcomes of trainees performing coronary artery bypass grafting: does resident experience matter? [J]. Ann Thorac Surg, 2017, 103(3): 975-981.

[收稿日期]

2020-02-04

(上接第 22 页)

[10]

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[11]

Wang D, Wang X, Liu X, et al. Inhibition of mir-219 alleviates arsenic-induced learning and memory impairments and synaptic damage through up-regulating camkii in the hippocampus [J]. Neurochem Res, 2018, 43(4): 948-958.

[12]

喻韬, 罗蓉, 毛萌. 婴儿早期脑损伤后神经学评估与后遗症风险研究进展 [J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2009, 5(5): 538-541.

[13]

Cohen-Cory S. The developing synapse: Construction and modulation of synaptic structures and circuits [J]. Science, 2002, 298(5594): 770-776.

[14]

胡剑芸, 黎俊. 脑组织 s100b 蛋白、bdnf、nse 对胎鼠宫内脑损伤的预测意义 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(12): 1247-1250.

[15]

王宏燕, 韩宝杰, 双梅, 等. 伊潘立酮与利培酮治疗精神分裂症的安全性评价 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(24): 2402-2404,2407.

[16]

Paz-Tal O, Canfi A, Marko R, et al. Effect of changes in food groups intake on magnesium, zinc, copper, and selenium serum levels during 2 years of dietary intervention [J]. J Am Coll Nutr, 2015, 34(1): 1-14.

[17]

Vasconcelos AR, Dos Santos NB, Scavone C, et al. Nrf2/ARE pathway modulation by dietary energy regulation in neurological disorders [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 33.

[18]

Ding Y, Chen M, Wang M, et al. Neuroprotection by acetyl-11-keto- β -Boswellic acid, in ischemic brain injury involves the Nrf2/HO-1defense pathway [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7002.

[收稿日期]

2020-05-07

黄清梅,白发明,朱云蕾,等. 宫内感染动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 120-124.
Huang QM, Bai FM, Zhu YL, et al. Progress in understanding intrauterine infection in animal models [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 120-124.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.019

宫内感染动物模型的研究进展

黄清梅,白发明,朱云蕾,韦冰梅,陈玉君*

(广西医科大学第二附属医院儿科,南宁 530007)

【摘要】 宫内感染可由多种病原体侵入妊娠子宫腔内,引起异常妊娠及新生儿疾病等母婴不良结局,但由于发病机制尚未明确,治疗效果欠佳,预后差。因此,建立稳定、可靠的宫内感染动物模型有助于对其发病机制、药物作用机制及预防等方面进行更深入的研究,对降低母婴不良结局及改善预后有重要的意义。目前国内外建立宫内感染的动物模型主要有:大肠杆菌或脂多糖诱导的宫内感染模型、解脲支原体宫内感染动物模型、念珠菌宫内感染动物模型、巨细胞病毒宫内感染动物模型等,本文主要从实验动物的选择、不同造模方法的实验设计及其优缺点等方面进行综述。

【关键词】 宫内感染;动物模型;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0120-05

Progress in understanding intrauterine infection in animal models

HUANG Qingmei, BAI Faming, ZHU Yunlei, WEI Bingmei, CHEN Yujun*
(the Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China)

【Abstract】 Intrauterine infection can be caused by a variety of pathogens invading into the uterine cavity during pregnancy and can cause abnormal pregnancy, neonatal diseases and other adverse outcomes for mothers and infants. However, its pathogenesis is not yet clear, the effects of treatments are poor, and the prognosis is not good. Therefore, establishment of a stable and reliable animal model of intrauterine infection will facilitate further research into its pathogenesis, mechanisms of drug action, and prevention, which is of great significance for reducing adverse outcomes of mothers and infants and to improve the prognosis. At present, the animal models of intrauterine infection established in China and elsewhere mainly include *Escherichia coli* or lipopolysaccharide-induced intrauterine infection, *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection, *Candida* intrauterine infection, and cytomegalovirus intrauterine infection. This article mainly reviews the selection of experimental animals, the experimental design of different modeling method and their advantages and disadvantages.

【Keywords】 Intrauterine infection; animal models; research progress

宫内感染是指病原微生物侵入羊膜腔引起的羊水、胎盘(蜕膜、绒毛膜和羊膜)及胎儿的感染。宫内感染是引起早产的主要原因,约占早产原因的50%^[1-4]。宫内感染引起的早产可增加新生儿败血症、新生儿呼吸窘迫综合征、新生儿坏死性小肠结肠炎、支气管肺发育不良、动脉导管未闭、脑出血、

【基金项目】 广西自然科学基金资助项目(2017GXNSFAA198165)。
【作者简介】 黄清梅(1987—),女,主治医师、硕士研究生,主要从事新生儿疾病相关研究。E-mail: huangqing418@163.com
【通信作者】 陈玉君(1964—),女,博士,教授,硕士生导师,主要从事新生儿疾病研究。E-mail: chenyujuan1006@163.com

听力障碍、脑性瘫痪等疾病的发生风险^[5-7]。然而,关于宫内感染的发病机制及其引起的早产儿多脏器损伤的机制目前尚未明确。因此,建立重复性高、稳定性好的宫内感染动物模型对深入研究宫内感染的发病机制、发生发展及早期干预,预防或减轻宫内感染分娩母婴不良结局具有重要的意义。本文就目前宫内感染动物模型建立的研究进展进行综述。

1 动物模型的选择

研究宫内感染的动物模型主要包括啮齿类动物、羊、猪及灵长类动物。羊是较早用来研究分娩机制的动物。羊的妊娠期较长(约 147 d)、单胎,有利于纵向标本收集及研究宫内感染致病菌长期暴露或药物干预对胎儿的影响,且羊的体积庞大,母羊和胎儿在妊娠期间均能接受长期置管及手术干预研究。但羊的价格昂贵、性成熟和繁殖慢,且基因组和免疫学尚未完全明确^[8],使其在实际实验研究的应用上受到限制。灵长类动物在子宫解剖结构、妊娠期长短、分娩过程及产仔数等方面与人类极为相似,但灵长类动物价格相对昂贵、伦理要求高,且是人畜共患疾病的潜在来源,因此较少用于宫内感染动物模型的研究。啮齿类动物中的大鼠和小鼠因相对经济、易于饲养、妊娠期短(大鼠约为 22 d,小鼠约为 20 d)、能够快速达到性成熟、繁殖快、易于管理及实验操作等特点,因此大鼠、小鼠最常用于宫内感染动物模型的研究。大鼠分娩时在调节子宫收缩的分子途径方面与人类有相似之处,比如催产素受体(oxytocin receptors, OTR)和缝隙连接蛋白 connexin 43 等分子的上调、参与 cAMP-PKA 信号通路的分子和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等分子的下调^[9-10]。然而,使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或者大肠杆菌建立大鼠宫内感染模型引起早产儿分娩的实验方法较有限,需要连续注入 LPS 才能成功诱导早产儿分娩^[11];也有研究报道^[12],使用大肠杆菌建立宫内感染大鼠模型并不能引起早产儿分娩,而大鼠对宫内感染刺激不敏感的原因目前尚未明确。相比较而言,使用 LPS 或大肠杆菌等通过腹腔注射或羊膜腔内给药途径建立宫内感染模型在小鼠中成功率较高^[11],且小鼠的基因组与人类较相似,具有较好的免疫系统特征,并受益于大量的商用抗体、小干扰 RNA(siRNA)和微阵列平台的可用性,故得

到广泛使用。

2 宫内感染造模的相关病原体

2.1 大肠杆菌或 LPS 诱导的宫内感染模型

大肠杆菌是泌尿生殖道的条件致病菌,在一般情况下不会致病;但在胎膜早破或机体免疫力下降时,泌尿生殖道细菌上行性感染可引起宫内感染。研究表明^[13-15],大肠杆菌是引起宫内细菌感染的最常见病原菌之一。因此,大肠杆菌或者来源于大肠杆菌的 LPS 最常用于宫内感染模型的建立。2004 年,袁天明等^[16]选择对孕 15 d 的大鼠麻醉后于下腹作 1.5 cm 正中切口,找到左右子宫角并分别于两个胎囊之间每毫升接种 $1.5 \times 10^8 \sim 2.0 \times 10^8$ 个的大肠杆菌悬浮液 0.2 mL,以子宫壁及胎盘内血管充血、水肿,并见大量中性粒细胞浸润表明造模成功。该法建模后母鼠无明显临床症状,但子宫及胎盘病理变化明显,早产率为 70%,由于该方法接种的是活菌,其造模后引起的宫内感染过程与人类自然感染的亚临床型宫内感染过程较接近,可用于宫内感染对早产儿相关疾病影响的研究。但该造模方法手术操作难度大、对孕鼠创伤大、大肠杆菌用药剂量较难把控,且有创操作中术后潜在的外界污染可能加重宫内感染的过程。因此,采用该造模方法进行宫内感染的研究受到一定的限制。

针对上述造模方法的缺点,经过研究者不断的改进,有些缺点已逐渐得到改善。如:Burda 等^[17]和 Elovitz 等^[18]将 LPS 替代大肠杆菌注射于孕鼠两个胎囊之间成功复制了小鼠宫内感染模型,用于研究宫内感染对胎儿脑损伤的影响。该造模方法能成功诱导宫内感染局部炎症反应过程,且能够根据实验需要精确计算 LPS 的剂量,但该模型仍存在实验操作复杂、创伤大、术口易污染等缺点,且麻醉过程中由于孕鼠呼吸循环的波动可能对胎鼠脏器损伤有一定的影响,因此,不适用于模拟临床上宫内感染对胎儿脏器损伤的研究。Rinaldi 等^[19]针对上述缺点进行了改进,对孕鼠麻醉后采用超声引导下经腹部注射 LPS 于两胎囊之间,成功模拟了宫内感染局部炎症反应及免疫反应过程,该造模方法具有创伤小、手术操作相对简单等优点,且早产率及子宫胎盘炎症反应与上述侵入性剖腹胎囊注药造模方法相似,缺点是要求具有对孕鼠超声的设备及技术,因此无法广泛应用。卢刻羽等^[20]通过对孕 18 d 的大鼠腹腔注射不同剂量的 LPS 研究宫内感染致

新生鼠肺损伤模型的构建方法,该研究发现,腹腔注射 0.7 mg/kg LPS 构建宫内感染模型较成功,孕鼠死亡率和流产率较低,孕鼠胎盘和新生鼠肺组织损伤改变较明显,该造模方法具有操作简单、创伤小、成功率高等优点,因此被广泛应用。Dell'Ovo 等^[21]在大鼠孕 20 d 时腹腔注射不同剂量的 LPS 建立宫内感染模型进行研究发现,腹腔注射 640 $\mu\text{g/kg}$ 的 LPS 时能最大程度诱导胎儿脑损伤而不引起孕鼠死亡。Fricke 等^[22]在 C57BL 小鼠孕 15.5 d 时进行腹腔注射 100 $\mu\text{g/kg}$ 成功建立了宫内感染致胎儿肠损伤模型。可见,不同的 LPS 剂量均能引起与临床相类似的宫内感染表现,且其对胎儿的影响在不同的器官间是不同的。

2.2 解脲支原体宫内感染动物模型

解脲支原体是介于细菌与病毒之间无细胞壁、具有自我复制能力的最小病原体,寄生于人体泌尿生殖道^[23],是引起宫内感染和早产的主要致病菌^[1]。因此,解脲支原体也是常用于建立宫内感染动物模型的常见病原体。Normann 等^[24]在小鼠孕 13.5 d 时麻醉后切开下腹部暴露子宫,将解脲支原体血清 3 型悬浮液羊膜腔内注射 5000 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)每个胎囊,在孕 17.5 d 时剖腹产分娩,此方法成功建立了解脲支原体感染宫内感染模型。建模后发现,模型组新生小鼠大脑皮层神经元钙结合蛋白阳性细胞数和钙网膜蛋白阳性细胞数显著低于对照组,其建模后新生小鼠脑损伤的病理变化及大脑发育异常的临床表现较典型,更接近宫内感染致早产儿脑损伤的发病表现。但该造模方法操作复杂,对孕鼠创伤大,整个实验过程死亡率较高,不适于推广。Van 等^[25]在母羊孕 127 d 时采用超声引导下羊膜腔内注射解脲支原体 10^7 CCUs 成功建立了解脲支原体宫内感染致胎儿肠损伤模型,该方法造模胎儿暴露于解脲支原体 6 d,与对照组相比,造模组新生小羊肠粘膜组织损伤改变较明显。Collins 等^[26]分别在母羊孕 110、117、121 d 时采用超声引导下羊膜腔内注射解脲支原体 2×10^7 CFU 诱导宫内感染模型,三组在母羊孕 124 d 时剖腹产分娩,该方法造模能引起肺组织炎症反应及结构改变,且产前暴露于解脲支原体的时间越长肺组织损伤改变越明显。该造模方法操作简单可行,成功率高,且羊的妊娠周期长,多为单胎妊娠,更能形象地模拟人类怀孕晚期宫内感染炎症反应过程。缺点是羊的价格昂贵,繁殖周期长,且需要

有相应超声设备及实验技术。

2.3 念珠菌宫内感染动物模型

念珠菌也是孕妇生殖道感染的常见病原菌。研究报道^[27],高达 40% 的妊娠妇女阴道中存在念珠菌感染,检出率是非妊娠妇女的两倍。尽管在临床上,母亲念珠菌宫内感染通过垂直传播引起新生儿先天性念珠菌感染的病例报道较少。但随着科学技术的发展,已有研究发现^[28-30],在自发早产的妊娠妇女羊水中检测出念珠菌感染。念珠菌宫内感染可引起胎儿死亡、胎儿念珠菌感染及神经系统发育障碍^[31-32]。研究发现^[33-34],对妊娠期无症状念珠菌感染的妇女予根除念珠菌治疗可降低发生流产和早产的风险。但关于妊娠期念珠菌宫内感染引起胎儿损伤的机制目前尚未明确,目前关于念珠菌宫内感染的动物模型研究报道也较少。Payne 等^[35]选择绵羊为研究对象,通过超声引导下羊膜腔内注射白色念珠菌 10^7 CFU 建立宫内感染模型,注射白色念珠菌后 1~2 d 剖宫产分娩的胎羊皮肤、肺组织及羊水中均有明显的炎症改变。Nikiforou 等^[36]用同样的方法造模后发现,注射后 3~5 d 剖宫产分娩的胎羊肠组织及外周血中均检测到白色念珠菌的侵入性生长,引起胎羊肠损伤及真菌血症。可见,该造模方法稳定可靠,且绵羊多为单胎妊娠、体积大、孕期长,妊娠过程与人类较相似,可用于念珠菌宫内感染与母婴不良结局的相关研究。

2.4 巨细胞病毒宫内感染动物模型

巨细胞病毒也是引起宫内感染最常见的病原体之一,可引起胎儿发育畸形,对社会造成巨大的危害。据报道^[37],巨细胞病毒宫内感染是发达国家新生儿感觉神经性听力损失和神经发育异常的主要原因。因此,建立稳定、可靠的巨细胞病毒宫内感染模型具有重要的意义。Juanjuan 等^[38]通过对孕 12.5 d 的小鼠胎盘接种 1×10^6 PFU/mL 的小鼠巨细胞病毒成功建立了巨细胞病毒宫内感染致听力损伤模型。刘海智等^[39]通过对孕龄 10~11 d 的 BALB/C 小鼠经胎盘分别接种感染性滴度不同的巨细胞病毒成功建立了宫内感染模型。建模后孕鼠出现不同程度的病毒血症现象,与模型对照组相比,不同病毒滴度组孕鼠流产或死胎的发生率显著升高,仔鼠小头畸形及低出生体重的发生率显著升高,其临床表现更接近人类巨细胞病毒宫内感染的发病表现。此外,经胎盘接种巨细胞病毒,使孕鼠及胎盘成功感染病毒,并经胎盘传播给胎仔的垂直

传播模式与人类巨细胞病毒宫内感染的疾病传播模式及发病机制较相似。但陈莉等^[40]研究发现,胎盘接种巨细胞病毒的方法建立巨细胞病毒宫内感染模型成功率较低。可能由于该方法属于有创操作,手术难度大,操作过程对实验技术人员要求较高,因此,较难开展实施。

2.5 其他病原体宫内感染动物模型

乙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、人类获得性免疫缺陷病(HIV)等病原体引起的宫内感染均可通过母体血液垂直感染胎儿,引起严重不良后果,但目前尚未见有相对应的宫内感染动物模型的研究报道。因此,仍需大量的动物实验和临床研究来探索与人类妊娠过程接近,能够形象逼真地模拟临床上真实宫内感染机制的动物模型,推动基础实验研究和临床试验的进展。

综上所述,引起宫内感染的病原体多种多样,发病机制复杂,且应用不同的动物针对不同的研究目标使用的造模方法各不同。因此,在以后的研究中应根据不同的研究目的结合不同造模方法的优缺点选择合适的造模方法,使所建立的动物模型尽可能模拟疾病的发生发展及演变过程,为进一步研究宫内感染的发病机制、药物作用机制及预防保健等方面提供基础研究平台,以降低母婴不良结局、改善预后、减轻社会负担。

参考文献:

- [1] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery [J]. N Engl J Med, 2000, 342(20): 1500-1507.
- [2] Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, et al. The preterm parturition syndrome [J]. BJOG, 2006, 113(3): 17-42.
- [3] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth [J]. Lancet, 2008, 371(9606): 75-84.
- [4] Malloy MH. Chorioamnionitis: epidemiology of newborn management and outcome United States 2008 [J]. J Perinatol, 2014, 34(8): 611-615.
- [5] Lau J, Magee F, Qiu Z, et al. Chorioamnionitis with a fetal inflammatory response is associated with higher neonatal mortality, morbidity, and resource use than chorioamnionitis displaying a maternal inflammatory response only [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 193(3): 708-713.
- [6] Aziz N, Cheng YW, Caughey AB. Neonatal outcomes in the setting of preterm premature rupture of membranes complicated by chorioamnionitis [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2009, 22(9): 780-784.
- [7] Wu YW. Systematic review of chorioamnionitis and cerebral palsy [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1): 25-29.

- [8] Kemp MW, Saito M, Newnham JP, et al. Preterm birth, infection, and inflammation advances from the study of animal models [J]. Reprod Sci, 2010, 17(7): 619-628.
- [9] Arthur P, Taggart MJ, Zielenk B, et al. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour [J]. J Physiol, 2008, 586(24): 6063-6076.
- [10] Fang X, Wong S, Mitchell BF. Effects of RU486 on estrogen, progesterone, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation [J]. Endocrinology, 1997, 138(7): 2763-2768.
- [11] Nielsen BW, Bonney EA, Pearce BD, et al. A cross-species analysis of animal models for the investigation of preterm birth mechanisms [J]. Reprod Sci, 2016, 23(4): 482-491.
- [12] Hirsch E, Filipovich Y, Romero R. Failure of *E.coli* bacteria to induce preterm delivery in the rat [J]. J Negat Results Biomed, 2009, 8: 1.
- [13] 邓兰英. 新生儿宫内感染的产前因素与细菌病原体的临床研究 [J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(6): 88-91.
- [14] 应海琼, 徐道芬, 单晓雪, 等. 晚期妊娠宫内感染对母婴的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(4): 614-616, 620.
- [15] Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity [J]. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2002, 8(1): 3-13.
- [16] 袁天明, 俞惠民, 李建平. 细菌性宫内感染致早产大鼠模型的建立 [J]. 浙江医学, 2004, 26(4): 33-34, 50.
- [17] Burd I, Brown A, Gonzalez JM, et al. A mouse model of term chorioamnionitis: unraveling causes of adverse neurological outcomes [J]. Reprod Sci, 2011, 18(9): 900-907.
- [18] Elovitz MA, Brown AG, Breen K, et al. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury [J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(6): 663-671.
- [19] Rinaldi SF, Makieva S, Frew L, et al. Ultrasound-guided intrauterine injection of lipopolysaccharide as a novel model of preterm birth in the mouse [J]. Am J Pathol, 2015, 185(5): 1201-1206.
- [20] 卢羽翔, 朱伟伟, 梁宏露, 等. 孕鼠腹腔注射脂多糖致新生鼠脑损伤模型的构建 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2014, 34(6): 727-733.
- [21] Dell'Ovo V, Rosenzweig J, Burd I, et al. An animal model for chorioamnionitis at term [J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 213(3): 387.
- [22] Fricke EM, Elgin TG, Gong H, et al. Lipopolysaccharide-induced maternal inflammation induces direct placental injury without alteration in placental blood flow and induces a secondary fetal intestinal injury that persists into adulthood [J]. Am J Reprod Immunol, 2018, 79(5): e12816.
- [23] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 757-789.

- [24] Normann E, Lacaze-Masmonteil T, Eaton F, et al. A novel mouse model of Ureaplasma-induced perinatal inflammation; effects on lung and brain injury [J]. *Pediatr Res*, 2009, 65 (4): 430-436.
- [25] van Gorp C, de Lange IH, Spiller OB, et al. Protection of the ovine fetal gut against ureaplasma-induced chorioamnionitis; a potential role for plant sterols [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (5): 968.
- [26] Collins JJ, Kallapur SG, Knox CL, et al. Inflammation in fetal sheep from intra-amniotic injection of Ureaplasma parvum [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299 (6): L852-L860.
- [27] Hay P, Czeizel AE. Asymptomatic trichomonas and candida colonization and pregnancy outcome [J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2007, 21(3): 403-409.
- [28] Chaim W, Mazor M, Wiznitzer A. The prevalence and clinical significance of intraamniotic infection with Candida species in women with preterm labor [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 1992, 251 (1): 9-15.
- [29] DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): e3056.
- [30] Combs CA, Gravett M, Garite TJ, et al. Amniotic fluid infection, inflammation, and colonization in preterm labor with intact membranes [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2014, 210(2): e1-e15.
- [31] Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Fanaroff AA, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(1): 84-92.
- [32] Darmstadt GL, Dinulos JG, Miller Z. Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines [J]. *Pediatrics*, 2000, 105(2): 438-444.
- [33] Roberts CL, Rickard K, Kotsiou G, et al. Treatment of asymptomatic vaginal candidiasis in pregnancy to prevent preterm birth; an open-label pilot randomized controlled trial [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2011, 11: 18.
- [34] Roberts CL, Algert CS, Rickard KL, et al. Treatment of vaginal candidiasis for the prevention of preterm birth: a systematic review and meta-analysis [J]. *Syst Rev*, 2015, 4: 31.
- [35] Payne MS, Kemp MW, Kallapur SG, et al. Intrauterine Candida albicans infection elicits severe inflammation in fetal sheep [J]. *Pediatr Res*, 2014, 75(6): 716-722.
- [36] Nikiforou M, Jacobs EM, Kemp MW, et al. Intra-amniotic Candida albicans infection induces mucosal injury and inflammation in the ovine fetal intestine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29806.
- [37] Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(4): 253-276.
- [38] Juanjuan C, Yan F, Li C, et al. Murine model for congenital CMV infection and hearing impairment [J]. *Virol J*, 2011, 8: 70.
- [39] 刘海智. 小鼠巨细胞病毒宫内感染实验模型研究 [D]. 武汉: 华中科技大学; 2006.
- [40] 陈莉, 陈素华, 刘海智, 等. 经胎盘接种小鼠巨细胞病毒宫内感染模型建立 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14(3): 55-56, 63.

[收稿日期]2020-06-19

杨霞, 宁宗. 铁死亡在呼吸系统疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 125-129.
Yang X, Ning Z. Advances in ferroptosis in respiratory diseases [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 125-129.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.020

铁死亡在呼吸系统疾病中的研究进展

杨霞, 宁宗*

(广西医科大学第一附属医院急诊科, 南宁 530021)

【摘要】 作为一种新的程序性细胞死亡方式,越来越多的证据表明铁死亡(ferroptosis)借助于铁代谢紊乱、脂质代谢异常等多种作用机制在呼吸系统疾病发生发展过程中发挥重要作用,其作用不容忽视。本文总结了目前铁死亡的作用机制及在呼吸系统疾病发生发展过程中的作用研究概况,以期为进一步研究提供理论基础。

【关键词】 铁死亡;铁;脂质;呼吸系统疾病;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 12-0125-05

Advances in ferroptosis in respiratory diseases

YANG Xia, NING Zong*

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Ferroptosis is a recently discovered type of programmed cell death and accumulating evidence suggests that it plays an important role in respiratory diseases through a variety of mechanisms, such as iron-dependent lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) production; its role in the occurrence and development of respiratory diseases cannot be ignored. This review summarizes current knowledge of the role and mechanism of ferroptosis in the development and progression of respiratory diseases, and provides a theoretical basis for further research.

【Keywords】 ferroptosis; iron; lipid; respiratory diseases; research progress

作为细胞的一种基本生物学现象,细胞死亡在机体的生存、发展中发挥重要作用。随着研究的进展,坏死和凋亡并不能完全解释细胞死亡所发生的全部现象。铁死亡(ferroptosis)是近年来被定义的一种新型的以铁依赖性脂质过氧化和脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积为特点的非细胞凋亡性的细胞死亡方式^[1]。与常见的细胞死亡形式,如自噬性细胞死亡和坏死性细胞凋亡等相比,铁死亡在形态学特征、生物化学指标及基因水平等方面均存在显著差异。细胞焦亡(pyroptosis)作为一种保守性的机体天然免疫机制,是一种依赖于caspase-1介导,并以伴有早期质膜的破裂及大量促炎症因子的释放为特点的

细胞程序性死亡方式^[2]。自噬性细胞死亡,简称自噬(autophag)是一种由溶酶体介导的细胞程序性死亡方式,其主要的形态学改变为蛋白质的降解和细胞器的隔离与分解^[3]。而铁死亡的则主要表现为线粒体体积变小、密度增加、线粒体嵴消失、细胞质和胞质中脂质活性氧增多等^[4]。作为一种新的程序性细胞死亡方式,铁死亡被证实与肿瘤、神经系统疾病、动脉粥样硬化等多种疾病密切相关,最新研究亦显示铁死亡在呼吸系统疾病中亦发挥至关重要的作用。本文就铁死亡的作用机制及在呼吸系统疾病发生发展过程中的作用研究概况,以期对呼吸系统相关疾病的进一步研究提供新思路。

【基金项目】 2019 年度广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0146);2019 年广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2019098)。

【作者简介】 杨霞(1983—),女,主治医师,博士,主要从事中毒的基础研究。E-mail:358080924@qq.com

【通信作者】 宁宗,男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事中毒、肺损伤的基础与临床研究。E-mail:gxningzong68@163.com

1 概述

1.1 铁死亡的定义

作为细胞生命的终结,细胞死亡在哺乳动物的生长发育及疾病的发生发展过程中、在维持内环境稳态的过程中均发挥重要的作用。细胞意外死亡和调节性细胞死亡是细胞死亡命名委员会认定的细胞死亡的两种方式,其中,凋亡和坏死是经典的两种细胞死亡形式^[5]。随着研究的进展,上述形式并不能囊括所有的细胞死亡模式。由此,按照细胞死亡的特点细胞焦亡、自噬性细胞死亡、铁死亡等新的死亡模式被接踵提出。其中,作为一种新型的细胞死亡方式,铁死亡被逐步认识。2003 年 Dolma 等^[6]采用高通量筛选技术发现了铁死亡的诱导剂,即 erastin(爱拉斯汀),此化合物有别于凋亡的死亡方式而成为一种新的细胞死亡形式。随着研究的进一步进展,2008 年 Yang 等^[7]发现了与 erastin 所致细胞死亡方式及其相似的两种化合物,即 ras 选择性致死化合物(ras-selective-lethal compound, RSL3)和 RSL5。研究发现细胞焦亡、自噬性细胞死亡等抑制剂并不能抑制上述化合物所诱导的细胞死亡,但铁螯合剂及抗氧化剂却能抑制这种死亡方式,提示上述这种细胞死亡模式与铁及 ROS 密切相关。2012 年 Dixon 等^[8]研究发现 erastin 可以抑制胱氨酸向胞内转入,引起细胞内合成谷胱甘肽(glutathione, GSH)的原料减少以及磷脂过氧化物酶谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活,从而导致一种新的细胞死亡模式,并最终根据细胞死亡的特点将这种死亡模式命名为铁死亡,即一种以铁依赖性脂质过氧化和脂质活性氧堆积为特点的非细胞凋亡性的细胞死亡方式。2018 年,细胞死亡委员会建议将铁死亡定义为调节性细胞死亡(regulated cell death, RCD)模式中的一种^[9]。

1.2 铁死亡的结构与功能

研究发现与目前已知的其他的细胞死亡模式相比,铁死亡在形态学特征、生物化学指标及遗传学等方面均存在显著不同。首先,形态学特征方面,与凋亡、坏死、自噬等不同,铁死亡时细胞膜是完整的,细胞核的形态不发生任何改变,但胞内线粒体功能明显受损,主要表现为线粒体皱缩,体积变小、膜密度增加、线粒体嵴消失、线粒体外膜破裂等^[1,10];其次,生物化学方面,细胞内合成 GSH 原料

减少、GPX4 失活、细胞质及胞质中脂质 ROS 增多等^[11];再者,遗传学方面,铁死亡的具体作用机制尚不明确,涉及铁代谢、氧化应激、脂质代谢异常等方面,与多基因的异常表达密切相关。其中抑制铁死亡的基因常见的有 SLC7A11,即溶质转运蛋白第 7 家族 11 成员基因(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11,简称 xCT)、GPX4 基因、CISD1 基因,即 CDGSH 铁硫域 1(CDGSH, iron sulfur domain 1)、NFS1 基因,即半胱氨酸脱硫酶(cysteine desulfurase)、NRF2 基因,即核转录因子(nuclear factor erythroid 2-related factor)、HSPB1 基因,即热休克蛋白(heat shock protein 1)等;促进铁死亡的基因有 p53 基因、VDACs 基因,即电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel)、ACSL4 基因,即长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(Acyl-CoA synthetase 4)、NCOA4 基因,即核受体共激活因子 4(nuclear receptor coactivator 4)等,在铁死亡过程中发挥重要的作用。

2 铁死亡的作用机制

铁死亡的作用机制目前尚未明确,仍在不断探索中,最新的研究证据提示铁代谢紊乱、脂质代谢异常等因素与铁死亡的发生发展过程密切相关。

2.1 铁代谢紊乱

相关研究显示,铁代谢紊乱是铁死亡的中心环节^[12]。作为机体必需的微量元素之一,铁主要以二价和三价铁离子的形式存在于机体内参与细胞的运输、机体的代谢等活动。正常情况下借助于铜蓝蛋白,体内二价铁离子(Fe^{2+})被氧化为三价铁离子(Fe^{3+}), Fe^{3+} 与细胞外转铁蛋白形成复合物被转运至胞内,继而在铁还原酶前列腺六次跨膜蛋白 3 作用下还原为 Fe^{2+} ,而后存储于胞质内铁蛋白中或借助于膜上铁转运蛋白泵出,参与机体内铁再循环,维持铁稳态。当机体内铁稳态被打破时,细胞内铁储存减少,过量 Fe^{2+} 则通过芬顿化学反应及 Haber-Weiss 反应催化 ROS 生成,引起胞质内 ROS 聚集,从而诱导铁死亡的发生^[13]。苏欣等^[14]通过制备铁缺乏的大鼠动物模型来研究铁缺乏所致氧化应激与铁死亡的关系,结果发现在生命早期有效控制铁的摄入量造成铁缺乏,从而引起大鼠成年期铁负荷,导致铁死亡的发生。

2.2 脂质代谢异常

氧化应激是指各种有害因素所致机体处于过

氧化状态,出现氧化与抗氧化系统的失衡。研究发现诱发铁死亡的直接原因之一是脂质 ROS 形成与堆积^[15]。首先,脂质膜上的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids,PUFAs)在酶促或非酶促的氧化反应作用下形成脂质 ROS。当机体出现铁负荷过多,此时过剩的游离 Fe2⁺可以作为机体有效的催化剂引发氧化应激反应,导致线粒体、DNA 等损伤^[16]。其次,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 依赖的脂质过氧化及谷胱甘肽 (GSH) 耗竭所致 ROS 在铁死亡发生发展过程中同样起着至关重要的作用^[17]。研究发现作为发现最早的铁死亡抑制剂, Ferrostatin-1 借助于特异性抑制脂质 ROS 的聚集而特异性阻断铁死亡的发生^[8]。陈芳等^[18]采用线粒体细胞色素 bcl 抑制剂阿霉素 A 来干预肾小管上皮细胞的氧化磷酸化过程,发现铁死亡参与急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的过程,予以铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 等干预后,细胞内 ROS 水平显著下降,线粒体损伤明显减轻,结果提示抑制

铁死亡可以有效缓解 AKI 的进程,为 AKI 的治疗提供新的靶点与方向。再者,细胞膜谷氨酸/胱氨酸转运体 (glutamate/cystine antiporter), 即 system Xc- 系统与铁死亡过程中脂质代谢作用密切相关。作为 Xc- 系统抑制剂, 柳氮磺吡啶 (Sulfasalazine, SAS) 不仅可以抑制胱氨酸/谷氨酸反向转运体, 而且还会影响胱氨酸依赖的 GSH 的合成, 从而导致铁死亡的发生, 这与高玮男等^[19] 研究报道相一致。细胞模型中, 宣文婷等采用凋亡诱导因子 p53 干预小鼠海马神经元细胞来探讨铁死亡过程中谷氨酸兴奋性毒性作用, 结果发现通过调节 Xc- 系统的表达, p53 可以显著抑制铁死亡的过程^[20]。

3 铁死亡的调控

铁死亡主要是细胞内脂质活性氧生成与降解的平衡失调所致, 研究发现铁死亡可以被多种化合物所诱导和抑制, 具体见表 1。

表 1 铁死亡诱导剂及抑制剂分类
Table 1 Classification of inducer and inhibitor of ferroptosis

分类 Classification	作用机制 Mechanisms	代表分子及药物 Representative molecules and drugs
铁死亡诱导剂 Ferroptosis inducer	1. 抑制 XC ⁻ 系统 Inhibition of sytem XC ⁻	爱拉斯汀及其类似物 ^[8] 、抗炎药物柳氮磺胺吡啶 ^[21] 、 肿瘤靶向治疗药物索拉非尼 ^[22] 、p53 ^[23] 、谷氨酸盐 ^[24] 等 Erastin and its analogues ^[8] , Sulfasslazine ^[21] , Sorafenib ^[22] , p53 ^[23] and Glutamate ^[24] , et al
	2. 抑制 GPX4 Inhibition of GPX4	Erastin, RSL3 和功能相关的化合物 ^[25] 、 ML162, altretamine ^[26] 等 Erastin, RSL3 and functional related compounds ^[25] , ML162 and altretamine ^[26] , et al
	3. 甲羟戊酸途径 Mevalonate pathway	FIN56 ^[27] 、他汀类 ^[28] 等 FIN56 ^[27] , Statins ^[28] , et al
	4. GSH 耗竭剂 Glutathione's inhibitor	γ-GCS ^[11] 等, γ-GCS ^[11] et al
	5. 提高 ROS 水平致脂质过氧化剂 Lipid peroxidants induced by increasing ROS level	青蒿素及其衍生物、茛菪酰胺 ^[29] 等 Artemisinin and its derivatives, Piperlongumine ^[29] , et al
铁死亡抑制剂 Ferroptosis inhibitor	1. 抑制铁离子捐赠电子到 O ₂ 形成 ROS Inhibition of iron ion donating electrons to O ₂ to form ROS	铁螯合剂, 如细菌代谢产物去铁胺 (DFO) 等 ^[30] Iron chelating agent such as DFO ^[30] , et al
	2. 脂质 ROS 抑制剂 Lipid ROS inhibitors	抗氧化剂如维生素 E 家族、黄芩素 ^[31] 、 胰岛素增敏剂罗格列酮和吡格列酮 ^[10, 27] 等 Antioxidants such as Vitamin E, Baicaleim ^[31] , Insulin sensitizers such as Rosiglitazone and pioglitazone ^[10, 27] , et al
	3. 抑制 GSH 或 GPX4 降解阻断铁死亡 Inhibition of GSH or GPx4 degradation to block iron death	环己酰亚胺 ^[32] 、糙米提取物 ^[33] 等 Cycloheximide ^[32] , Extraction from brown rice ^[33] , et al
	4. 减少细胞内铁离子及抑制脂质 ROS 来阻断铁死亡 Iron death was blocked by reducing intracellular iron and inhibiting lipid ROS	热休克蛋白 β-1 ^[34] Heat shock protein β-1 ^[34]

4 铁死亡在呼吸系统疾病中的作用

最新研究显示铁代谢紊乱、脂质代谢异常等因素与铁死亡的发生发展过程密切相关,而脂质 ROS 形成与堆积在肺部疾病发病机制中占据重要地位,提示铁死亡可能参与呼吸系统疾病的发生发展过程。因此,调控铁死亡过程将有可能为呼吸系统疾病的临床防治提供新的作用靶点。

4.1 铁死亡与支气管哮喘 (Asthma)

ROS 是氧化应激的主要参与者,而氧化应激是形成哮喘的大多数分子途径和机制的最终结果。Frossi 等^[35]研究发现氧化应激上调 Th2 介导炎症反应,增加哮喘严重程度;此外,哮喘患者外周血嗜酸性粒细胞中 ROS 产生显著高于健康人,且激发后 ROS 生成进一步明显增多。因此,氧化应激与哮喘的发病密切相关。另一方面,诱发铁死亡的直接原因之一是脂质 ROS 形成与堆积,这可能与经典损伤相关分子模式 (DAMP) 有关。Shah 等^[36]研究发现在铁死亡组织中,借助于 F4/80 免疫荧光染色提示可以显著激活巨噬细胞,从而释放促炎物质,引发一系列炎症反应。此外,铁死亡组织中存在过氧化物及花生四烯酸代谢所产生的炎性介质。作为花生四烯酸代谢中关键的脂质过氧化物酶,脂氧合酶 (LOX) 不仅参与机体的炎症和免疫反应,而且还是铁死亡的必备条件,主要是因为 LOX 不仅可以催化 PUFA 氧化成脂质氢过氧化物,脂质氢过氧化物再形成有毒的脂质自由基,继而引起细胞损伤,而且脂质自由基还可以转移 PUFA 附近的质子,引发新一轮的脂质氧化反应并导致更严重的氧化性损害^[37]。而 LOX 亦与哮喘气道炎症和气道重塑密切相关。鉴于此,提示铁死亡可能在哮喘的发病机制中占据重要地位。

4.2 铁死亡与急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)

作为一种临床常见的呼吸系统危重症,ALI 的主要临床特点为呼吸窘迫和进行性低氧血症,其严重阶段表现为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)。主要作用机制为肺泡上皮细胞和肺微血管内皮细胞的凋亡以及肺泡巨噬细胞极化,从而产生大量的活性氧,引发氧化与抗氧化系统的失衡,释放大量炎症因子,致使肺局部的炎症微环境失衡,诱导“炎症因子风暴”,产生一系列炎症反应^[38]。最新研究发现^[39]采用小鼠尾静脉注射油酸的方法制备 ALI 动物模型,结果发现 ALI 组小鼠肺细胞出现线粒体皱缩、变小,

线粒体外膜破裂等病理变化,肺组织可见明显的铁过载、GSH 含量减少、铁蛋白表达水平显著降低等改变,上述结果提示铁死亡参与肺损伤的致病过程,这将为 ALI 的临床治疗提供新的理论依据。

4.3 铁死亡与肺癌

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一,严重影响人类的健康与生命。研究发现与正常细胞相比,肺癌细胞内 ROS 水平和脂质氧化标志物水平普遍较高,且与机体的免疫功能有关。如前所述,诱发铁死亡的直接原因之一是脂质 ROS 形成与堆积,NADPH 依赖的脂质过氧化及 GSH 耗竭所致 ROS 与铁死亡发生发展过程密切相关。此外,T 淋巴细胞作为一种获得性免疫细胞在肿瘤相关免疫中起着至关重要的作用,谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 可以通过防止过氧化及细胞铁死亡在活化 T 淋巴细胞生存和扩张中扮演重要角色。因此,ROS 代谢通路中相关基因的检测在铁死亡作用机制研究中尤为重要。相关文献报道指出隐丹参酮可以不同程度抑制肿瘤细胞的增殖,影响肿瘤细胞 ROS 代谢通路,但具体作用机制不详。谭国耀等^[40]以体外培养人肺癌 A549 细胞和顺铂耐药株 A549/DDP 细胞为研究对象,给予不同浓度隐丹参酮进行干预,结果发现隐丹参酮可以抑制上述两种细胞的增值,其作用机制与影响细胞铁死亡相关基因的表达密切相关。

5 结语

综上所述,作为一把“双刃剑”,铁死亡在不同的疾病状态下发挥不同的作用。铁死亡在肺部疾病中的作用机制目前仍未阐明,深入研究其发生机制及相关信号通路,努力寻找有效的阻断剂,为肺部疾病的治疗提供新的靶点和方向。

参考文献:

- [1] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-285.
- [2] Yuan J, Najafov A, Py BF. Roles of caspases in necrotic cell death [J]. 2016, 167(7): 1693-1704.
- [3] Yu L. Recent progress in autophagy [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 1-2.
- [4] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379.
- [5] Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(5): 348-366.
- [6] Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, et al. Identification of

- genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(3): 285–296.
- [7] Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-ras-harboring cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3): 234–245.
- [8] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [9] Galluzzi L, Vitale L, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486–541.
- [10] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91–98.
- [11] Friedmann AJP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180–1191.
- [12] Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(1): 9–17.
- [13] Gao M, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298–308.
- [14] 苏欣, 梁健, 邱智枫, 等. 生命早期铁缺乏诱发大鼠成年期氧化应激致铁死亡的相关性研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(22): 2693–2697.
- [15] Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(34): E4966–E4975.
- [16] Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(35): 27986–28006.
- [17] Ingold I, Berndt C, Schmitt S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 409–422.
- [18] 陈芳, 胡韬韬, 陈丹, 等. 抗霉素诱导肾小管上皮细胞铁死亡的实验研究 [J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24(4): 320–323.
- [19] 高玮男, 张雪双, 孙连坤, 等. SAS 诱导氧化应激时人卵巢癌顺铂敏感细胞与耐药细胞死亡方式的差异 [J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(4): 690–694.
- [20] 宣文婷, 杨泽勇, 季雅茹, 等. p53 抑制铁死亡抵抗 HT22 细胞谷氨酸神经毒性 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(5): 654–660.
- [21] Sleire L, Skeie BS, Netland IA, et al. Drug repurposing: sulfasalazine sensitizes gliomas to gamma knife radiosurgery by blocking cystine uptake through system Xc⁻, leading to glutathione depletion [J]. 2015, 34(49): 5951–5959.
- [22] Louandre C, Marq I, Bouhlal H, et al. The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 971–977.
- [23] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 520(7545): 57–62.
- [24] Jiang YN, Yang SW, Zhang X, et al. Mechanism of ferroptosis and its role in neurological diseases [J]. *Chinese Pharmacol Bulletin*, 2018, 34(2): 166–169.
- [25] Yang WS, Sriramaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156(1–2): 317–331.
- [26] Weiwer M, Bittker JA, Lewis TA, et al. Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS [J]. 2012, 22(4): 1822–1826.
- [27] Shimada K, Skouta R, Kaplan A, et al. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis [J]. *Nat Chem Bio*, 2016, 12(7): 497–503.
- [28] Warner GJ, Berry MJ, Moustafa ME, et al. Inhibition of Selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA super[Ser] Sec lacking isopentenyladenosine [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 28110–28119.
- [29] 张学松, 宋毓飞, 康锦钰, 等. 草茛酰胺导致胃癌细胞铁死亡的作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(10): 1280–1283.
- [30] Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 274–286.
- [31] Xie Y, Song X, Sun X, et al. Identification of baicalein as a ferroptosis inhibitor by natural product library screening [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(4): 775–780.
- [32] Eling N, Reuter L, Hazin J, et al. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Oncoscience*, 2015, 2(5): 517–532.
- [33] 徐文慧, 李沧海, 姜廷良, 等. 铁死亡通路中药干预机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(20): 4019–4026.
- [34] Sun X, Ou Z, Xie M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death [J]. *Oncogene*, 2015, 34(45): 5617–5625.
- [35] Frossi B, De Carli M, Piemonte M, et al. Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells [J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(1): 58–64.
- [36] Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the role of lipoxygenases in the initiation and execution of ferroptosis [J]. *Pratt ACS Cent Sci*, 2018, 28, 4(3): 387–396.
- [37] Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies [J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 73: 28–45.
- [38] 种朋贵, 丁瑜, 高鸿. 七氟醚对单肺通气致肺损伤保护作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 82–87.
- [39] Zhou H, Li F, Niu JY, et al. Ferroptosis was involved in the oleic acid-induced acute lung injury in mice [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2019, 71(5): 689–697.
- [40] 谭国耀, 蔡佩衡, 曹霖, 等. 隐丹参酮对肺癌细胞铁死亡相关基因表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(12): 1654–1659.

中国比较医学杂志目次索引

2020 年第 30 卷 1~12 期

第 1 期

研究报告

TETs 蛋白在乌拉坦诱导小鼠肺癌模型中的表达模式 *	韩靓,刘殿峰,祁明辉,高伟,王玲,任文陟,俞先峰,王东旭,林超(1)
帕金森病小鼠 CatWalk 行为学研究 *	张子龙,刘思含,姚继红,周俊俊(7)
二乙基亚硝胺联合四氯化碳诱发 C57BL/6 小鼠肝癌模型 *	仲鑫汝,许龙,田睿,苏静,张勇(12)
烟碱对心肌梗死大鼠痛阈可塑性变化的影响及心脏保护作用 *	薛晴,于海波,李晶,于海涛(17)
人参多糖对乙醇诱导的行为敏化小鼠行为学及前额叶皮层 ERK/c-fos 通路的影响	卢梦,王鑫,王慧玲,魏琳,周东月,马林锋,卞男,李雪婷,宋伍,郭焱(21)
姜黄素联合有氧运动对糖尿病肝病变和肝中脂肪酸 β 氧化的影响	刘晓晨,张社峰,王改凤(29)
醒脑静注射液对 Beagle 犬脑外伤昏迷治疗的量效关系	陈瑞奇,曾贵荣,石镇港,戚麟,张妙红,袁湘中,徐永兴,王平,张乐君,洪剑(36)
白消安对 2 型糖尿病 KKA ^y 小鼠外周血细胞及骨髓细胞的影响	党女,卢延华,管博文,孟爱民(45)
经肋间肌穿刺法测定肺动脉高压小鼠模型右心室压力	魏瑞奇,朴春梅,张文美,朱光发(51)
小鼠侧脑室下区基因表达的增龄性变化研究	黄艺滢,石桂英,吕颖,李珂雅,白琳(57)
恒河猴肺中阴沟肠杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析	李艳艳,禹文海,杨凤梅,刘权,陈丽雄,王俊斌,马进,徐鸿界,杨亚平,赵远,和占龙(68)
急、慢性高尿酸血症模型的建立	冯学轩,刘月姝,饶子亮,黎耀俊,潘晓慧,姚嘉琪,郭起岳,王诺,邝少松(74)
先天性晚发白内障 FVB 小鼠突变基因定位及筛选	庞铂实,钱强,徐园,肖君华,周宇荀,李凯(81)
SOX6 基因对 H ₂ O ₂ 诱导的星形胶质细胞损伤的机制	巨虎,肖宗宇,张广华,许常林(88)

调查报告

实验动物平台基地科技创新能力建设情况研究	柏雨岑,王卫,郑筱光,胡小鹿,贾敬敦(94)
----------------------	------------------------

技术方法

hTIM4-EGFP 小鼠血液生理生化指标测定	魏杰,王洪,刘甦苏,贾松华,熊芮,王辰飞,范昌发,岳秉飞(99)
大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的改良方法	王平安,杨珂伟,王静,焦成(104)

设施设备

热管式空气换热器在实验动物设施建设上的应用	张大维,徐彩云,李晓慧,王彦,甘振威(109)
-----------------------	-------------------------

教学管理

转化医学理念下开放式动物实验学习效果探讨 *	郭萌颖,董芷函,张娜娜,陈博学,夏雪怡,鲁进,王英诺,曲萌,于春艳(113)
------------------------	--

研究进展

可溶性识别分子 PTX3 的研究进展	彭婉君,赵彬彬,武婧,陈鑫,牛栋,刘江宁(115)
Animal Models and Experimental Medicine 稿约	(122)

* “东北三省高校学生优秀实验动物论文评选活动”专题

第 2 期

研究报告

5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 引发 I 型超敏反应毒性评价与机制初探*	李恩灿,范潇予,林琳,郝瑞瑞,林生,贺玖明,靳洪涛(1)
东莨菪内酯在大鼠肝微粒体孵育体系中的代谢产物分析及其含药血清对大鼠肝星状细胞的影响*	杨增艳,张颖,李嘉,陈少锋,黄鑫,靳洪涛(9)
复方一枝蒿颗粒离乳前 SD 大鼠非临床安全性评价研究*	田义超,周莉,庞聪,毛闪闪,崇立明,李俊,李艳,冷英莉,孙祖越(15)
雌性大鼠生育力与早期胚胎发育毒性阳性模型建立及比较*	王蓉,王永,骆永伟,许丽,周莉,孙祖越(21)
流式细胞仪在 GLP 体系下性能验证方法的建立*	牟文波,李慧,安会革,程红旭,王凤华,靳洪涛,魏金锋(27)
复方蒲公英制剂幼龄大鼠重复给药毒性研究*	张城达,宋翼升,扈荣,白海波,谢锋,黄敏聪,陈云祥,郑高利,张立将(33)
人脐带动脉旁、静脉旁与华通氏胶间充质干细胞的血管生成能力比较及移植安全性评价	杨嫣君,余飞,丁利军,盛小强,孙海翔(43)
GFP 标记脐带间充质干细胞治疗 mdx 小鼠的药代动力学研究	庞荣清,朱慧,鄢东海,王强,李自安,王金祥,于倩倩,阮光萍,朱向情,潘兴华(54)
稳定高表达人 GPC3 的 SK-Hep-1 细胞系的构建	何琦琳,郎巧利,余琳,黄楠,杨希,葛良鹏(59)
老年和青年 SD 大鼠外周血及免疫细胞分型测定分析	管博文,卢延华,石桂英,苏路路,王玉全,王卫,魏强,白琳,孟爱民(64)
兔源多杀巴斯德杆菌基因分型研究	黄树武,王静,潘金春,陈梅玲,张钰,闵凡贵(71)
白藜芦醇通过靶向 SIRT1 激活 Keap1-Nrf2-HO-1 途径发挥对草酸钙肾结石形成的调控作用	田河,王志龙,张智慧,宋静,高强,吴影,南锡浩,郭振海,邸彦橙(77)
莪术二酮对脑缺血再灌注损伤小鼠认知功能及神经功能的保护作用研究	李佳娜,郭苏兰,肖水秀(84)
分化抑制因子 1 在乙型肝炎病毒复制、肝癌细胞增殖和凋亡中的作用及机制研究	陆小琴,杜锐,赵玉强,牛司强(90)
不同运动方式干预对攻击行为大鼠情绪行为的影响	张换鸽,党延红,胡柏平(97)
探讨活化蛋白 C 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制的影响	童晓红,查锦芬,丁家望,李松,李稳慧,吴辉,陈勇(103)

研究进展

宫内发育迟缓对胰腺发育的影响	汤琦,李睿,张然,陈小川(108)
布鲁氏菌及其疫苗的相关研究	韩文东,瞿涤(114)
早发性卵巢功能不全相关信号通路研究进展	李德保,周莉,孙祖越(121)
过敏性疾病小鼠动物模型建立及表型变化的研究进展	白梦天,胡竹林(128)
多囊卵巢综合征动物模型数据挖掘及分析	苗晋鑫,李秀敏,苗明三(135)
野生型 p53 诱导的磷酸酶 1 在细胞稳态调节中作用的研究进展	闫峰,罗玉敏,朱玲玲,范明(141)

* “药物安全性评价”专题

第 3 期

五宝胶囊对哮喘小鼠肺泡灌洗液中 Th1/Th2、Th17/Treg 失衡及趋化因子的影响 傅榕冰,魏义杰,虎春艳,伍林泽,童晓云,张雅琼,黄丰(1)

新鲜山药提取物对小鼠胃溃疡的预防作用研究 金佳熹,周冰玉,李柳蓉,冯青秀,柯春娇,覃海音,农雪娟,赵爽(8)

小鼠非开胸式主动脉弓狭窄心衰模型的构建及评价 方明笋,金炉帅,张利棕,马全鑫,金璐,郎佳丽,傅惠英,寿旗扬(14)

ATG5/7 参与 METH 和 HIV-1Tat 蛋白协同诱导的树鼩中脑神经元自噬 李娟,晏和熙,李红梅,吕丽琼,曾晓锋,代解杰(20)

实时荧光定量 RT-PCR 方法在登革热小鼠模型中的评估及应用 陈倩,李丹,佟巍,蔡方舟,郭智,鲍琳琳,王卫(25)

两种方法构建自发转移且便于观察的裸鼠原位肝癌模型 郭平,许敏华,张晶晶,金小宝,李小波,马艳(32)

马鹿茸组合物缓解大小鼠体力疲劳的作用研究 梁志健,陈桂煌,龙淑娴,黎丽斯,黎耀俊,白建瑜,饶子亮(39)

高通量氙光传递窗与紫外传递窗灭菌效果观察 许琦,赵月,黄伟健,宋琳亮,康生,刘毅,和君,傅江南(45)

D-半乳糖增加树鼩肠道 IL-18 的表达及肠道菌群失调 郭玉倩,陆姜利,角建林,曾跃勤,梁张,郑红(50)

脐带间充质干细胞对卵巢早衰家兔性激素、CYR61 和 CTGF 表达的影响 张娟,王晶,周丽,庾平,王刚,朱楚超(56)

基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 牛欢,陈曼丽,杨波,何智余(63)

银杏提取物 50 通过调节自噬降低 ROS 水平保护高糖对血管内皮细胞的损伤作用 姚媛(71)

免疫力低下小鼠动物模型建立及快速检测研究 田嘉军,黄聘和,岳茜岚,何其励(77)

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱检测实验动物病原菌效果初探 邢进,刘娜,冯育芳,张雪青,崔生辉,贺争鸣,赵德明,岳秉飞(83)

基于数据挖掘的哮喘动物模型应用分析 吴瑞,李秀敏,苗明三(89)

教学管理

动物生物安全实验室管理和技术要点 魏强(94)

研究进展

Graves 病细胞免疫学机制的研究进展 周芳宇,王欣,谭贵琴,杜娟,梁钟智,魏文文,于红松(98)

Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 杨根梦,洪仕君,王一航,沈宝玉,于浩,曾晓锋,李利华(103)

慢性阻塞性肺疾病动物模型的造模方法 刘迪,张洪春(108)

磷酸二酯酶在心力衰竭治疗中的研究进展 孙欢,于明,赵绮旎,杨萍(115)

冻结肩动物模型的建立及研究进展 罗板鑫,朱文科,周中(121)

第 4 期

研究报告

黄芪甲苷对脑缺血再灌注大鼠炎症因子及超微结构的影响 靳晓飞,张丕宁,周晓红,高维娟(1)

四物饮抑制食管癌细胞侵袭及迁移的研究 史会娟,孔令玉,吴忠冰,赵杨,石冬璇,李晶(7)

大鼠胚胎内注射 hUCMSCs 在肝内存活和肝分化研究	鄢东海, 向雪萍, 逢永成, 谭显庆, 郑开恢, 田川, 李自安, 王强, 庞荣清(14)
非洲绿猴 <i>IFITM3</i> 基因的克隆及其组织特异性表达差异	邢焕微, 叶莉, 李昌, 张素花, 白杰英(19)
基于 NF- κ B/JNK 信号通路研究他克莫司对脊髓损伤模型大鼠的调节作用	张七妹, 柴芳, 麦宜准, 郭仁芬, 王光(27)
细颗粒物 PM2.5 对 <i>ApoE</i> 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制	赵培, 谭鹤, 彭克楠, 李新新, 马倩, 霍丽静, 张明明, 路永刚, 帖彦清(33)
雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的作用及机制研究	邓宇, 李丽娜, 王鹏帆, 张营帅, 曹福源, 张伟(40)
野生树鼩与人工饲养树鼩消化道不同部位微生物组成的比较研究	李艳艳, 杨凤梅, 王俊斌, 陈丽雄, 段素琴, 杨亚平, 刘雨, 和占龙, 马进, 赵远(46)
熊果酸通过抑制自噬对血清剥夺诱导的 H9c2 细胞起抗凋亡作用	何明静, 黄世杰, 孙祥琳, 韦俊, 周茜, 陈力嘉(56)
小鼠急性肝损伤对棕色脂肪组织功能的影响及机制研究	冯妙, 卜浩林, 李丽红, 郭林芝, 苗宇船, 郭建红(63)
血管内皮生长因子失衡及补体沉积与先兆子痫的相关性研究	于颖, 路鸿艳(70)
基于 CXCR4-FAK 信号通路观察鞘内注射右美托咪定改善大鼠脊髓缺血再灌注损伤后神经运动功能	秦燕, 杨光(77)
沉默 miRNA-16 对肺结核模型小鼠免疫功能的调控作用及其机制研究	王琴, 付宇, 王平(86)
设施设备	
一种开源的多功能动物行为学实验系统	巩臣, 张炎杰, 张檬, 石峙岳, 刘湘, 柳攀, 廖晓玲, 周艺, 刘雪(92)
独立通风笼具(IVC)的日常维护和清洁消毒	钱丹萍, 李东明, 马靖, 邵奇鸣(99)
独立通风笼具(IVC)技术指标检测及参数稳定性评价	闵凡贵, 王静, 潘金春, 黄树武, 龚宝勇, 张钰(106)
某 GLP 实验动物设施空调及通风系统设计研究	欧少华, 周斌, 刘吉宏(110)
经验交流	
大小鼠模型命名方法与规则简介	曹愿, 岳秉飞, 柳全明, 范昌发(117)
研究进展	
降脂模型研究进展	王成, 胡乃华, 余琳媛, 龚莉虹, 代旭阳, 李芸霞(121)
清道夫受体与脑卒中的研究进展	甘艳艳, 刘静, 关富仁, 周哲屹, 卢昌均(131)
不同原发性胆汁性胆管炎小鼠模型的优缺点	杜思颖, 杨晋辉(137)
葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展	陈素傲, 金世柱(142)
第 5 期	
研究报告	
汉防己甲素联合化疗药物在斑马鱼体内逆转多药耐药的研究	向文碧, 李志操, 周栋珍, 周艳华, 吴西军, 何志旭, 舒莉萍(1)
α -突触核蛋白 A53T 突变损伤小鼠认知功能	王嫚诗, 张玲, 秦川, 丛斌(7)
野生瑶山亚种树鼩粪便潜在病原细菌的调查及耐药性分析	梁亮, 贾蒙纲, 金伟, 曹颖颖, 唐海波, 冷静(14)
HAART 治疗 SIVmac239 感染恒河猴血浆细胞因子与疾病指征的相关性分析	田龙, 童玲, 丛喆, 陈霆, 薛婧, 魏强(21)

艾滋病模型中关键指标 SIV DNA 绝对定量微滴式数字 PCR 技术的创新应用 张丽丽, 陆佳涵, 薛婧, 丛喆, 魏强 (27)

利用 *Pdl1* 敲除的巨噬细胞转录谱分析结核感染中 PD-L1 作用相关的候选基因 石亚男, 唐军, 李军丽, 王杰, 占玲俊 (31)

液质饲料喂养制备酒精性心肌病小鼠模型 廉虹, 刘立会, 聂宇 (40)

基于网络药理学的栀子-川芎药对抗抑郁实验研究 李筱楠, 雍洪文, 张铭, 姚文静, 王佳豪, 冯强, 王娜, 王俊霞, 崔力剑 (47)

SMA 小鼠中相关剪接因子表达与 *SMN2* 外显子 7 列入比率关系研究 杜利莉, 马钰, 柏文清, 吴刘成, 邵义祥 (54)

初次交配日龄对 NIH 小鼠繁殖性能的影响 李楠, 王从武, 王天奇, 何嘉玲, 暴国, 张长勇, 孙德明 (64)

麻醉对建立大鼠重度创伤失血性休克模型的保护性作用 向成芳, 骆立晖, 赵会民, 陆勇, 杨康, 曾欢, 韦婷洁 (68)

四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响 邱亚男, 朱丽英, 沈婕, 钱雯, 潘卫 (75)

miRNA-144 基因过表达对肝癌小鼠的抑瘤作用及对肠道菌群的影响 王雨, 许达峰, 周开伦, 武金才, 丁驿超, 古海强, 谢明微, 刘向梅 (81)

间充质干细胞来源的外泌体通过 microRNA-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌缺血大鼠的心脏功能 孙理华, 王娟, 张岳, 张颖, 幸世峰 (88)

姜黄素纳米乳的制备及对大鼠心肌缺血再灌注的保护作用 李迪, 李杨, 吴迪 (97)

3R

关于实验动物福利伦理审查的几点建议 苏美洋伊, 邓巍 (104)

研究进展

钠钾 ATP 酶活性与癫痫发作的研究进展 杜孙兵, 杨文秋, 吴倩, 韩雁冰 (108)

母婴分离模型的常见行为范式评价及研究进展 张献强, 孙浩然, 孙延超, 高卫星, 张希妹, 李长江 (114)

中药调节肠道菌群降低血糖的作用及机制研究进展 唐明甜, 肖百全, 刘忠华, 饶军华 (120)

ANXA1 的肿瘤特性研究 胡荣华, 朱莉, 李诗, 张莉, 胡琛琛 (127)

疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究 崔雨沙, 路欣, 李 峰 (132)

第 6 期

研究报告

miR-124-3p 靶向调控 MAPK 14 对子痫前期大鼠胎盘滋养层细胞增殖及侵袭的影响 周俏苗, 汪洪林, 黄海燕, 许晶, 肖美芳, 龚护民, 吴栋才 (1)

G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤 章林明, 许珍珍, 常越辰, 司军强, 马克涛, 李丽, 王勤章, 李应龙 (10)

猪圆环病毒 2 型感染人源细胞的转录组分析 刘小花, 徐鹏, 张昕薇, 欧阳婷, 吉卫龙, 刘晓慧, 任林柱 (17)

异甘草素通过 Smad3/Arid2-IR/NF-κB 轴改善顺铂诱导的急性肾损伤小鼠炎症反应 文丹, 廖媛, 李健春, 张宇韦, 樊均明 (25)

贞芪扶正颗粒通过 miR-200c/ZEB 通路抑制肝癌模型大鼠血管形成 贾鹏, 杨志宏, 马俊利 (31)

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 Bpi 基因敲除小鼠 张雨, 郭中坤, 付彬, 雷战, 聂爱蕊, 庄峰锋, 王可洲 (39)

基于 Caco3 细胞单层模型对盐酸氨溴索吸收机制的研究 梁秋玲, 朱叶萌, 麦子盈, 王凤姬, 龙淑娴, 王弋, 饶子亮, 邝少松 (47)

白桦脂醇对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响	傅增辉, 姜岩, 刘晶, 林再红, 杜姝, 张广萍, 陈团团 (54)
基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用	王敏, 李作孝 (62)
Tet1 蛋白对 HEK293T 细胞增殖、周期及凋亡的影响	莫晶, 杨红兰, 刘含, 金皎, 范安然, 张鹏, 周艳华, 舒莉萍 (69)
MD1 的缺失通过激活 TLR4/MyD88 信号通路增加肥胖小鼠室性心律失常的易感性	胥良, 牛思泉, 袁义强, 杨少华, 赵育洁 (76)
降压物质检查试验中家猫对组胺灵敏度分析	黄甘泉, 吴贤生, 王凤姬, 姚嘉琪, 黄锐, 梁冠泽, 严家荣, 邝少松 (83)
食蟹猴奇异变形杆菌的分离鉴定及药敏试验	刘权, 刘雨, 李艳艳, 杨凤梅, 马进, 和占龙, 禹文海, 赵远 (88)
油茶对高脂饮食大鼠血脂升高的抑制作用	唐洁霞, 蔡建升, 陈全晖, 陈世艺, 龙冰霜, 魏怡, 雷明智, 喻国旗, 于冬梅, 覃健, 王剑, 张志勇 (93)
透明细胞肾癌裸鼠模型构建及靶向药物敏感性研究	魏永, 李晓娟, 姜棋予, 张鹏, 冯帆, 李瑞生, 王科 (98)
黄芪甲苷介导 TLR4-p38 MAPK 信号通路在幼鼠急性肺损伤中的研究	王茜, 万静, 谭扬茗, 罗丹丹, 熊海英, 姜红 (106)
技术方法	
一种改良的大鼠颈静脉自主给药插管及其应用	李贝贝, 张欢, 陆思远, 刘小珍, 王舒哲, 刘永涛, 邱云良 (113)
设施设备	
斑马鱼鱼房和养殖系统建设标准	李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华 (121)
研究进展	
区域麻醉动物模型的探索和展望	胡建, 许敏, 曾燕, 张俊涛, 王娇, 杨静 (128)
实验鱼生物饵料的质量控制	李建军, 蔡磊, 余露军, 黄韧 (135)
内皮型一氧化氮合酶与血栓性疾病的研究进展	蒋庆娟, 应燕萍 (140)

第 7 期

研究报告	
神经营养因子-3 基因修饰的骨髓间充质干细胞和水凝胶联合应用对脊髓损伤模型大鼠的治疗作用研究	赵宣淇, 张钰, 秦川, 张玲 (1)
不同抗性小鼠 ECTV 感染前后重要模式识别受体的组织表达差异分析	何小兵, 王聪, 成温玉, 贾怀杰, 陈国华, 房永祥, 刘翔中, 景志忠 (13)
血液分析仪与手工计数法在实验树鼯红细胞生理指标检测中的效果评价	冯清源, 冯一唯, 夏巍, 戴克铜, 陈泓霖, 赖永静, 唐安洲 (23)
脂肪干细胞及其外泌体减轻肝细胞凋亡改善大鼠肝纤维化	游茂春, 刘广益, 程俊, 李雅娟, 余鸿, 王巧稚 (30)
慢病毒介导 Fg12 基因沉默技术对自身免疫性心肌炎大鼠 Th1/Th2 漂移及 Th17/Treg 平衡的影响	张晶晶, 刘婕, 杨占峰, 孙岩, 岳丽晓, 何群力 (38)
免疫性血小板减少症气不摄血证小鼠外周血小板活化功能的研究	王攀, 简亚东, 武曲星, 侯敏, 高文静, 刘建勋, 任钧国 (45)

参附注射液对大鼠心肌缺血再灌注期间的心电图演变过程的影响及作用机制研究 邓凤珠,冯冲,李春富,符海燕,李天发(51)

基于网络药理学和分子对接探讨血必净注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制 郑雅,刘志强,朱晓芹,王博龙(57)

窒息法致大鼠心脏骤停-心肺复苏模型造模成功率与生存率影响因素的探讨 曾瑞峰,钟悦嘉,赖成志,赖芳,刘相圻,段云彪,李尊江,吴炎华,李俊,丁邦晗(65)

阿司匹林通过调节 CTRP6 抑制糖尿病大鼠心肌纤维化和炎症反应 厉歆然,刘建军,蒋磊(72)

基于对调控机体氧化应激的中药的数据挖掘对新冠肺炎中用药的特点分析 惠香香,苗明三(78)

BALB/c 突变卷毛小鼠肝癌移植模型对比分析 李晓娟,李兴杰,冯帆,孙慧伟,柴燕涛,高蓉,李润,李瑞生(85)

bFGF 及 PDGF 联合应用对大鼠胫骨骨折愈合的影响 童九辉,王斌,袁鹤,张华,宋永周,马维(89)

c-Jun 氨基末端激酶信号通路在血管紧张素 II 诱导腹主动脉瘤小鼠模型中的作用机制研究 李会朋,肖影,王国华,陈智年(96)

α_2 肾上腺素能受体激动剂对缺血再灌注大鼠脑组织 NF- κ B 及炎症因子表达的影响 邱永升,魏巍,宗小川,周锐,陈夜茜,王帅,姚东东,贾英萍(104)

研究进展

猪作为人类疾病模型的研究进展 陈雨荣,安星兰,汪正铸,张胜,翟岩辉,代相鹏,李子义(110)

COVID-19 动物模型研究进展 苗晋鑫,宋韶鹤,王峥,苗明三(120)

代谢组学在胃癌研究中的应用进展 陶柱萍,李灿委,王雪雪,厉颖,张成桂,刘卫红,白丽,高鹏飞(127)

教学中动物实验替代方法应用进展 蒋亚君,荣蓉,刘晓宇,卢选成(133)

酒精性股骨头坏死动物模型的研究进展 谢程欣,王维,余城墙,安杨,金鑫,尹东(139)

动物分子影像技术在心肌梗死研究中的应用 涂清强(145)

第 8 期

研究报告

不可预期应激刺激对大鼠消化道免疫和微生物菌群的影响 王晓宇,马富强,张晓宁,何伟,宿杨帅,万红叶,胡玲,景向红(1)

TRIM26 在人和小鼠主要组织器官中的表达谱 廉梅,林晓琳,贾俊双,肖胜军,肖东(10)

P21 抑制剂 UC2288 诱导鼻咽癌放射抗拒细胞 CNE-2R 凋亡的研究 梁仁拔,李欣晓,朱小东(16)

性别对慢性交感应激导致心脏重塑的差异研究 李文奇,冯磊(23)

加味宫外孕 II 号方对人滋养叶细胞 Caspase-12 通路影响的研究 范敏,郑文兰,文晓敏(29)

斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作 何嘉玲,暴国,王天奇,张长勇,李楠,孙德明(35)

实验小鼠感染诺如病毒后组织病理变化及病毒含量分析 李晓波,付瑞,王吉,王淑菁,王莎莎,李威,秦晓,黄宗文,贺争鸣,岳秉飞(42)

真武汤对心肾阳虚型心力衰竭大鼠心肌细胞保护的自噬机制研究* 黄剑,马晓彤,张亚杰,李丽静,韩冬,刘佳(49)

MPTP 诱导 C57BL/6 小鼠帕金森模型的制备和评估* 林臻,陈洪志,赵航,刘辉,许妍妍,刘海岩,张浩(57)

C57BL/6J、BALB/c、ICR 品系小鼠学习记忆能力的行为学差异 李祥磊,孙秀萍(63)

基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析 武晏屹,田硕,苗明三(70)

miR-181b 调控 Mex3B 蛋白对动脉粥样硬化斑块形成及分子机制研究 张诗渊(76)

小鼠模型中神经酰胺对血小板介导的输血相关急性肺损伤的作用 李应明,陈华,伍燕(86)

海马和前脑皮层 BDNF 和 VEGF 表达与慢性应激所致小鼠抑郁的相关性 孙孟军,董泽飞,王宏(92)

教学管理

新冠疫情下的实验动物学线上教学体会 张彩勤,白冰,赵勇,师长宏(98)

研究进展

心肌肥厚动物模型及代偿机制研究进展 刘梦迪,张连峰,吕丹(102)

斑马鱼模型在纳米毒理学中的研究应用与进展* 钟健,朱佳瑞,何欣宇,马婧怡,李睿祺,张金波(107)

人与动物的共同健康:One Health——浅谈从动物实验室安全管理到全民健康*
..... 孙洪宇,原丹妮,周昊函,孙连坤,张大维(114)

小鼠植入后胚胎体外延时培养体系的应用进展 邵红莲,谭韬(119)

人脐带间充质干细胞治疗不同疾病的研究进展 巫丹,尹宇(125)

* “东北三省高校学生优秀实验动物论文评选活动”专题

第 9 期

研究报告

芦荟苷对糖尿病肾病大鼠 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响
..... 马冰沁,钱唯韵,罗振国,汪良芝(1)

姜黄素对肝癌模型小鼠 Keap1/ARE 信号通路及胆汁酸肝肠循环的影响
..... 牟海军,金海,陈幸幸,肖宏,刘黔,朱蓉(8)

硼替佐米调节 NF-κB 途径对 IL-1β 诱导的 ATDC5 细胞炎症性损伤的影响研究
..... 莫湘涛,张依山,李勇军,肖永杰(15)

实验动物中新型冠状病毒的感染情况调查
..... 李晓波,王吉,付瑞,王莎莎,王淑菁,李威,秦骁,黄宗文,贺争鸣,岳秉飞,林更涛(21)

miR-186 通过负调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化的影响
..... 刘艳,许路,邵阿末,曾金艳,杨国青(25)

酸枣仁皂苷缓解阿尔茨海默病模型小鼠的机制研究 范军朝,宋俊杰,陈勇(32)

体外培养 GFP 裸小鼠颅骨细胞的表形分析
..... 闫可,吴从严,戴纯刚,赵海峰,王为华,赵耀东,朱文昱,黄强(38)

miR-424-5P 对结肠癌细胞增殖的影响及机制探讨 刘友强,胡冀陶,李保坤,席金川,王贵英(43)

雷公藤甲素负载外泌体抗小鼠前列腺癌作用分析 曾灿,王可兵,曹石金(49)

技术方法

先端可吸收半倒刺线装置用于肺穿刺定位的实验研究 李凤卫,辛兴,边建伟,吴迅,李昊,陈应泰(54)

小鼠不同组织冰冻切片技术探讨 王园园,王涛,李新,王斌,江魁(59)

经验交流

实验动物标准化文件编写中常见问题分析 董蕴涵,孔琪,刘江宁(64)

教育与科普

国内外实验动物法制化管理现状比较 巩和凌子,孔琪,刘江宁(71)

管理科学

动物生物安全三级实验室应急管理经验交流 林凯丽,刘梅轩,麻昊然,潘思丹,乔红伟,高虹(76)

设施设备

国家级病原微生物菌(毒)种保藏中心的建设初探 刘梅轩,林凯丽,张丽芳,佟巍,高虹(80)

研究进展

- 精氨酸酶 II:一种“不同寻常”的酶 刘畅,罗蓉,杜吉佩,李秀(85)
- 骨髓潜伏态巨细胞病毒痕量反复激活诱导免疫衰老的单细胞 RNA 测序技术研究进展 刘普恒,韩辉,王宇虹(91)
- 干细胞治疗 2 型糖尿病及其并发症的研究进展 李欣悦,李倩,石桂英,黄艺滢,雷雪裴,白琳(96)
- 核纤层蛋白病小鼠模型的研究进展 周玲,范润哥,李东明,刘恒,舒伟(103)
- 新型冠状病毒肺炎动物模型的研究进展 杨钧婷,王晓堂,续国强,宋国华(111)

第 10 期

研究报告

- 卵清蛋白(OVA)致敏联合烟熏法建立咳嗽变异型哮喘豚鼠模型 吕天宜,李得民,杨道文,程思益(1)
- SD 大鼠血清 TF、TM、vWF 的含量与 CRT 形成的关系 韦艳,应燕萍,凌琰,赵慧函,蒋庆娟,甘晓,文萃(8)
- 三种术式大鼠肝外型胆汁淤积模型的对比研究 王思宇,张迎红,刘林秀,鲁仁财,何宏,王绍波(14)
- 骨肉瘤干细胞来源外泌体对 T 细胞增殖及分化的影响 陈思历,杨洪彬(21)
- 转录因子 YY1 上调 PD-L1 表达促进胆囊癌免疫逃逸的作用研究 周杰,李敬东,权刚,孙骥(30)
- 毛蕊异黄酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 H₂O₂ 导致的 SH-SY5Y 细胞损伤 白振军,张慧宇,郭敏芳(37)
- LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化 刘远光,刘怀海(44)
- 腔内分流栓在大鼠腹腔异位心脏移植中的应用 郑伟锋,米睿,郭书栋,罗志强,王成蕊,李彤(56)
- miR-199a 在 LPS 诱导的大鼠原代心肌细胞中通过激活 NF- κ B 信号通路加重心肌细胞损伤 王可,董平栓,和素娜,陈士芳,赵希坤,张恒亮,王腾飞(63)
- 基于网络药理学探讨土茯苓治疗发热的作用机制 徐炎,韩晶,任晓婷,王雷,王钊杰,刘良,姚博,王中天,孙丽平(70)
- 低分子肝素对实验兔 PICC 相关性血栓抑制作用的研究 黄利全,梁淑霞,陈黎,陈桂园,胡波,褚晓峰(78)
- 头针疗法联合重复经颅磁刺激对脑卒中大鼠神经功能的改善作用及对 PKA/CREB 信号通路的影响 戈蕾,邹玉安,王晓娜(85)
- 抗痫增智颗粒调控 TLR4/HMGB1/p-I κ B- α 信号通路保护癫痫幼鼠海马神经元的分析 张英英,单海军,娄元俊,郭鑫(92)

设施设备

- 动态工况下 SPF 级实验兔饲养微环境模拟分析 龚光彩,陈盟君,安珂慧,刘激扬,石星(99)
- IVC 换笼标准操作程序与小鼠病毒病原的传播风险 佟巍,郭智,刘子洋,潘思丹,高虹,向志光(107)

研究进展

- 关于建立子痫前期大鼠小鼠模型的研究进展 何岑盈,谢莹莹,徐梦婷(110)
- 睾丸发育相关基因 1 在肿瘤中的效应和机制 赵俞乔,关沧海,吴昊天,胡增涛,姜兴明(117)
- 线粒体自噬及功能障碍与帕金森病 甘雪,刘书一,王正波(121)
- 肺癌骨转移动物模型研究进展 张娜,刘学芳,冯素香,董浩然(128)
- 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型在干细胞质量控制中的应用 石桂英,白琳(132)
- 贲门失弛缓症发病机制的研究进展 刘瑛,金世柱,徐婉莹(138)

第 11 期

研究报告	
营养性肥胖大鼠模型肠道菌群的微生物多样性分析	
..... 李宏睿,张德琴,金晓蕾,唐骁,王大文,高雪,辛鹏飞,何进程,麻富斌,周彩云,孙晓玮,张建刚(1)	
血常规和血生化指标在患强直性脊柱炎食蟹猴中的临床价值	
..... 李玉莹,麦冬梅,贾欢欢,吴志恒,何刚华,唐爽捷,马承红,卢丽(10)	
小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较	杨骁,陈冲(16)
五种植物粗多糖诱导小鼠骨髓来源树突状细胞成熟的体外筛选	
..... 董晓筱,李博野,张季瑶,陈颖,胡秦,彭博(23)	
姜黄素增强 PTEN 野生型三阴性乳腺癌细胞对 PARP1 抑制剂敏感性的研究	
..... 孙偲丰,王莹,杨彦琴,玄基泽,张斌,秦元华,茅卫锋(28)	
缬草酸对癫痫小鼠神经元保护及 P-糖蛋白表达的影响	于忠娟,柴峰,时宝林,张跃其,吴春丽(34)
DIS3 对人骨髓瘤细胞周期及肿瘤相关蛋白表达的影响研究	
..... 邹亮,程辉,张婷,周英,关军,程平,王兰兰(40)	
青蒿琥酯对阿霉素致大鼠肾损伤的保护作用	陶磊,李婷婷,马旖旎,陈仁兵,李雪芹,王金娜(47)
远志皂苷元对脂多糖诱发神经细胞炎症损伤的保护作用	
..... 皮婷,梁月琴,欧雯励蓉,朱晗,陶彦林,金醒昉(52)	
磷酸鞘胺醇参与 KkAy 2 型糖尿病小鼠胰腺纤维化发病机制探讨	修磊,常娜,姜涛(59)
跑台运动对糖尿病大鼠学习记忆及海马炎症因子和 NGF 表达的影响	赵军,褚亚君,梁晋裕,付芳(65)
高强度聚焦超声对宫颈癌大鼠免疫功能及生存时间的影响	黄敏,彭月享,高卫元,黄红丽(72)
辛伐他汀纳米粒的构建及对动脉粥样硬化模型大鼠作用的研究	
..... 韩金霞,朱亚南,王金文,王吉佳,李迪,杨静波(78)	
七氟醚预处理对老年大鼠认知功能障碍的影响及海马区自噬在其中的作用研究	谢翼,王凯,牛敏(84)
咪唑安定通过上调 miR-290-5p 调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导心肌细胞损伤的机制研究	
..... 江婷婷,马兴华(91)	

研究进展	
常用哮喘动物模型的建立	李泳兴,钟鸣,王勇,马武华(97)
类器官模型在前列腺癌异质性研究中的应用	周丽桂,张永斌,师长宏(102)
类风湿关节炎动物模型研究进展	夏晴,纪羽婷,刘海亮,宋武琦(107)
铁死亡的发生机制及其在血液系统肿瘤中的研究进展	殷贤青,刘容容(114)
Rab7 介导线粒体和溶酶体互作机制新进展	陈研色,潘庆军,刘华锋,王淑君(120)
炎症反应在心肌再生中的作用	谈勇,占贞贞(128)
钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展	宗永辉,刘新灿(133)
间充质干细胞治疗的生物安全研究进展	曾贵荣,杨柳,罗桂芳,姜德建(140)
防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展	刘正泉,赵自刚(146)

第 12 期

研究报告	
Sirt3 基因 RNA 干扰慢病毒载体及稳定表达的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞株的构建	
..... 张静怡,邓永宁,张萌,屈秋民(1)	

下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响	黄钟,孙洁,姚振滨,李桂花,许晓刚(9)
胍基丁胺通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻丙泊酚诱导的新生大鼠的神经毒性	张少华,张彦芳,曹萌,李燕,廖立夏,王贝贝(17)
利用 CRISPR/Cas9 系统构建 HMGA2 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定	徐涛,顾鹏,陈傍柱,叶行,梁春锦,张映辉,顾为望(23)
姜黄素通过下调 microRNA-125b 保护人视网膜色素上皮细胞免受高糖诱导的细胞损伤	苏军华,焦永伟,魏宏莲(30)
VPS4B 调控 Notch 通路对促进牙髓干细胞成牙本质分化的机制研究	李坤阳,陈栋,左春然,刘爱群,朱兰省,牛兵(36)
应用微卫星技术比较两个实验小鼠群体遗传结构的差异 ...	光姣娜,左琴,魏杰,周佳琪,王洪,岳秉飞(42)
石榴补血糖浆对 Wistar 大鼠贫血症影响的探究	莫国艳,韩祥志,穆丹丹,董雨薇,韩林涛,黄芳,尹强(50)
SD 大鼠老龄化过程中外周血及免疫细胞表型的性别差异研究	管博文,卢延华,白琳,石柱英,苏路路,王玉全,魏强,王卫,孟爱民(57)
能力验证计划中酯酶-1 血清样本稳定性研究	王洪,魏杰,光姣娜,周佳琪,肖镜,岳秉飞(64)
异氟醚麻醉前应用咪达唑仑与布托啡诺对小鼠麻醉效果影响评价	韦雪梅,冯海妹,徐志新(70)
c-Myc、RhoA、YAP 在腺嘌呤诱发慢性肾病中的表达意义	文莉,何涛,康婷,熊琳,朱婷婷,欧三桃(76)
miR-335-5P 调控的 TGF-β 通路介导妊娠糖尿病小鼠胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌的实验研究	刘洁,温学娜,冯英,李元元,刘永莉(85)
环境丰容对 SD 大鼠行为和肾上腺皮质激素的影响研究	刘帅,宋佳阳,吕赛,李军延(92)
利拉鲁肽对糖尿病小鼠肝糖异生关键酶 PEPCK 及 G6pase 的表达影响及机制探讨	杜国慧,刘博伟,尹福在,齐曦明,范冬梅(98)
技术方法	
一种快速定量检测猴组织中 SIV/SHIV 的方法	高歌,孟凤珍,姚艳丰(103)
教学管理	
动物医学专业"实验动物学"课程线上教学的思考	吴伟鑫,刘慧聪,曲胜华,张冰(109)
研究进展	
静脉旁路移植疾病动物模型的建立及应用进展	杨仁从,杨丰华,李小辉,李相念,李文华,廖胜杰,张晓慎(113)
宫内感染动物模型的研究进展	黄清梅,白发明,朱云蕾,韦冰梅,陈玉君(120)
铁死亡在呼吸系统疾病中的研究进展	杨霞,宁宗(125)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE
INDEX OF CONTENTS
Vol.30 No.1 ~ 12, 2020

Issue 1

Analysis of the expression pattern of TET proteins in lung cancer mouse model induced by urethane HAN Liang,
LIU Dianfeng, QI Minghui, GAO Wei, WANG Ling, REN Wenzhi, YU Xianfeng, WANG Dongxu, LIN Chao(1)

Behavior of CatWalk in mice with Parkinson's disease ZHANG Zilong, LIU Sihan, YAO Jihong, ZHOU Junjun(7)

C57BL/6 mouse liver cancer model induced by diethylnitrosamine combined with carbon tetrachloride ZHONG Xinru, XU Long, TIAN Rui, SU Jing, ZHANG Yong(12)

Effects of nicotine on pain threshold plastic changes and cardiac protection in myocardial infarction rats XUE Qing, YU Haibo, LI Jing, YU Haitao(17)

Effect of ginseng polysaccharides on behavior and ERK/c-fos pathway in ethanol-induced behavioral sensitized mice LU Meng, WANG Xin,
WANG Huiling, WEI Lin, ZHOU Dongyue, MA Linfeng, BIAN Nan, LI Xueting, SONG Wu, GUO Yan(21)

Effects of aerobic exercise combined with curcumin on diabetic liver lesions and fatty acid β -oxidation in liver ... LIU Xiaochen, ZHANG Shefeng, WANG Gaifeng(29)

Dose-effect relationship of xingnaojing injection on beagle dog coma treatment CHEN Ruiqi, ZENG Guirong, SHI Zhengang,
QI Lin, ZHANG Miaohong, YUAN Xiangzhong, XU Yongxing, WANG Ping, ZHANG Lejun, HONG Jian(36)

Effects of busulfan on the hematopoietic system of KKA^y mice with type 2 diabetes mellitus DANG Nv, LU Yanhua, GUAN Bowen, MENG Aimin(45)

Measurement of the right ventricular pressure of pulmonary hypertension mouse model by intercostal muscle puncture WEI Ruiqi, PIAO Chunmei, ZHANG Wenmei, ZHU Guangfa(51)

Age-related changes in gene expression of the subventricular zone of mice HUANG Yiyi, SHI Guiying, LYU Ying, LI Keya, BAI Lin(57)

Isolation, identification, and drug sensitivity analysis of *Enterobacter cloacae* from rhesus monkey lung LI Yanyan, YU Wenhai, YANG Fengmei,
LIU Quan, CHEN Lixiong, WANG Junbin, MA Jin, XU Hongjie, YANG Yaping, ZHAO Yuan, HE Zhanlong(68)

Establishment of mouse and rat models of acute and chronic experimental hyperuricemia FENG Xuexuan,
LIU Yueshu, RAO Ziliang, LI Yaojun, PAN Xiaohui, YAO Jiaqi, GUO Qiyue, WANG Nuo, KUANG Shaosong(74)

The localization and screening of mutant gene in late-onset congenital cataract FVB mouse PANG Boshi, QIAN Qiang, XU Yuan, XIAO Junhua, ZHOU Yuxun, LI Kai(81)

Mechanism of action of SOX6 gene on astrocyte injury induced by H₂O₂ JU Hu, XIAO Zongyu, ZHANG Guanghua, XU Changlin(88)

Research on the innovation ability of platform and base of laboratory animal science and technology BAI Yucen, WANG Wei, ZHENG Xiaoguang, HU Xiaolu, JIA Jingdun(94)

Evaluation of blood physiological and serum biochemical values of hTIM4-EGFP mice WEI Jie, WANG Hong, LIU Susu, JIA Songhua, XIONG Rui, WANG Chenfei, FAN Changfa, YUE Bingfei(99)

An improved method for establishing a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury WANG Ping'an, YANG Kewei, WANG Jing, JIAO Cheng(104)

Application of heat pipe air heat exchanger in the construction of experimental animal facilities ZHANG Dawei, XU Caiyun, LI Xiaohui, WANG Yan, GAN Zhenwei(109)

Discussion on the study effect of open animal experiment under the concept of transformational medicine GUO Mengying, DONG Zhihan, ZHANG Nana, CHEN Boxue, XIA Xueyi, LU Jin, WANG Yingnuo, QU Meng, YU Chunyan(113)

Research progress on soluble recognition molecule PTX3 PENG Wanjun, ZHAO Binbin, WU Jing, CHEN Xin, NIU Dong, LIU Jiangning(115)

Issue 2

Toxicity evaluation and mechanism of type I hypersensitivity induced by 5-hydroxymethylfurfural and its dimer OMBF LI Encan, FAN Xiaoyu, LIN Lin, HAO Ruirui, LIN Sheng, HE Jiuming, JIN Hongtao(1)

Metabolites of scopoletin in rat and the effects of drug-containing serum on rat hepatic stellate cells YANG Zengyan, ZHANG Ying, LI Jia, CHEN Shaofeng, HUANG Xin, JIN Hongtao(9)

Study on non-clinical safety evaluation of compound Yizhihao particles in pre-weaning Sprague Dawley rats TIAN Yichao, ZHOU Li, PANG Cong, MAO Shanshan, CHONG Liming, LI Jun, LI Yan, LENG Yingli, SUN Zuyue(15)

Establishment and comparison of a positive model for fertility and early embryonic developmental toxicity in female rats WANG Rong, WANG Yong, LUO Yongwei, XU Li, ZHOU Li, SUN Zuyue(21)

Establishment of a performance verification method for flow cytometer under GLP conditions MU Wenbo, LI Hui, AN Huiping, CHENG Hongxu, WANG Fenghua, JIN Hongtao, WEI Jinfeng(27)

Repeated dose toxicity of compound *Taraxacum mongolicum* extract in juvenile rats ZHANG Chengda, SONG Yisheng, HU Rong, BAI Haibo, XIE Feng, HUANG Mincong, CHEN Yunxiang, ZHENG Gaoli, ZHANG Lijiang(33)

Comparison of angiogenesis ability and transplantation safety among mesenchymal stem cells derived from umbilical artery, umbilical vein and Wharton's jelly YANG Yanjun, YU Fei, DING Lijun, SHENG Xiaoqiang, SUN Haixiang(43)

Pharmacokinetics study of GFP-labeled mouse umbilical cord mesenchymal stem cells in mdx mice PANG Rongqing, ZHU hui, YAN Donghai, WANG Qiang, LI Zian, WANG Jinxiang, YU Qianqian, RUAN Guangping, ZHU Xiangqing, PAN Xinghua(54)

The generation of a SK-Hep-1 cell line stably expressing human GPC3 HE Qilin, LANG Qiaoli, YU Lin, HUANG Nan, YANG Xi, GE Liangpeng(59)

Differences in peripheral blood and immune cell phenotypes between aged and young Sprague-Dawley rats GUAN Bowen, LU Yanhua, SHI Guiying, SU Lulu, WANG Yuquan, WANG Wei, WEI Qiang, BAI Lin, MENG Aimin(64)

Genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from laboratory rabbits HUANG Shuwu, WANG Jing, PAN Jinchun, CHEN Meiling, ZHANG Yu, MIN Fangui(71)

Resveratrol plays a regulatory role in the formation of calcium oxalate kidney stones by targeting SIRT1 to activate the Keap1-Nrf2-HO-1 pathway TIAN He, WANG Zhilong, ZHANG Zhihui, SONG Jing, GAO Qiang, WU Ying, NAN Xihao, GUO Zhenhai, DI Yancheng(77)

Protective effects of curdione on cognitive and neurological function in mice with cerebral ischemia-reperfusion injury LI Jiana, GUO Sulan, XIAO Shuixiu(84)

Role and mechanism of inhibitor of differentiation 1 on the replication of hepatitis B virus, and proliferation and apoptosis of hepatoma cells LU Xiaoqin, DU Rui, ZHAO Yuqiang, NIU Siqiang(90)

Effects of different types of exercise on emotion and behavior in aggressive rats ZHANG Huange, DANG Yanhong, HU Boping(97)

Investigation of the protective effect and mechanism of activated protein C on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats TONG Xiaohong, ZHA Jinfen, DING Jiawang, LI Song, LI Wenhui, WU Hui, CHEN Yong(103)

Effect of intrauterine growth retardation on pancreas development TANG Qi, LI Rui, ZHANG Ran, CHEN Xiaochuan(108)

A review on *Brucella* and its vaccine studies HAN WenDong, QU Di(114)

Research advances of premature ovarian insufficiency-related signaling pathways LI Debao, ZHOU Li, SUN Zuyue(121)

Studies of mouse models of allergic disease BAI Mengtian, HU Zhulin(128)

Data mining and analysis of an animal model of polycystic ovary syndrome MIAO Jinxin, LI Xiumin, MIAO Mingsan(135)

The role of Wip1 in cell homeostasis regulation YAN Feng, LUO Yumin, ZHU Lingling, FAN Ming(141)

Issue 3

Effects of Wubao capsule on imbalance of Th1/Th2, Th17/Treg, and chemokines in alveolar lavage fluid of asthmatic mice FU Rongbing, WEI Yijie, HU Chunyan, WU Linze, TONG Xiaoyun, ZHANG Yaqiong, HUANG Feng(1)

Effects of an extract from fresh yam tuber on mouse gastric ulcers JIN Jiayi, ZHOU Bingyu, LI Liurong, FENG Qingxiu, KE Chunjiao, QIN Haiyin, NONG Xuejuan, ZHAO Shuang(8)

Construction and evaluation of a model of heart failure in mice with non-thoracic aortic arch stenosis FANG Minsun, JIN Lushuai, ZHANG Lizong, MA Quanxin, JIN Lu, LANG Jiali, FU Huiying, SHOU Qiyang(14)

METH and HIV-1Tat protein co-induced autophagy via ATG5/7 pathway in primary midbrain neuronal cells LI Juan, YAN Hexi, LI Hongmei, LYU liqiong, ZENG Xiaofeng, DAI Jiejie(20)

Evaluation of a real-time fluorescence quantitative PCR in the dengue mouse model CHEN Qian, LI Dan, TONG Wei, CAI Fangzhou, GUO Zhi, BAO Linlin, WANG Wei(25)

Establishing a spontaneous metastasis and conveniently monitored orthotopic model of hepatocellular carcinoma through two methods in nude mice GUO Ping, XU Minhua, ZHANG Jingjing, JIN Xiaobao, LI Xiaobo, MA Yan(32)

Anti-fatigue effect of hairy antler composition on mice and rats LIANG Zhijian, CHEN Guihuang, LONG Shuxian, LI Lisi, LI Yaojun, BAI Jianyu, RAO Ziliang(39)

Comparison of sterilization effect between High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box XU Qi, ZHAO Yue, HUANG Weijian, SONG Linliang, KANG Sheng, LIU Yi, HE Jun, FU Jiangnan(44)

D-Galactose increases the expression of IL-18 in the gut of tree shrews and deregulates intestinal flora GUO Yuqian, LU Jiangli, JIAO Jianlin, ZENG Yueqin, LIANG Zhang, ZHENG Hong(50)

Effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the expression of sex hormones CYR61 and CTGF in rabbits with premature ovarian failure ZHANG Juan, WANG Jing, ZHOU Li, TUO Ping, WANG Gang, ZHU Chuchao(56)

Effects of thrombopoietin on adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure based on the TGF- β 1/ Smad3 signaling pathway NIU Huan, CHEN Manli, YANG Bo, HE Zhiyu(63)

Ginkgo biloba extract 50 protects vascular endothelial cells from hyperglycemia by lowering the ROS level via regulating autophagy Yao Yuan (71)

Establishment of immunosuppressive animal models in mice and their rapid detection TIAN Jiajun, HUANG Pinghe, YUE Qianlan, HE Qili (77)

Evaluation of the biotyper MALDI-TOF MS system for identification of pathogenic bacteria in laboratory animals XING Jin, LIU Na, FENG yufang, ZHANG xueqing, CUI shenghui, He zhengming, Zhao deming, YUE Bingfei (83)

Application analysis of an asthma animal model based on data mining WU Rui, LI Xiumin, MIAO Mingsan (89)

Issues of animal experiments in biosafety laboratories WEI Qiang (94)

Advances in research on cellular immunological mechanism of Graves' disease ... ZHOU Fangyu, WANG Xin, TAN Guiqin, DU Juan, LIANG Zhongzhi, WEI Wenwen, YU Hongsong (98)

Progress of research in the regulation of Keap1/Nrf2/p62, NLRP3 Inflammasome and autophagy ... YANG Genmeng, HONG Shijun, WANG Yihang, SHEN Baoyu, YU Hao, ZENG Xiaofeng, LI Lihua (103)

Methods for animal models of chronic obstructive pulmonary disease LIU Di, ZHANG Hongchun (108)

Progress of cyclic nucleotide phosphodiesterases for heart failure treatment SUN Huan, YU Ming, ZHAO Qimi, YANG Ping (115)

Establishment and research progress of a frozen shoulder animal model LUO Banxin, ZHU Wenke, ZHOU Zhong (121)

Issue 4

Effects of astragaloside IV on inflammatory factors and ultrastructure in rats with cerebral ischemia reperfusion ... JIN Xiaofei, ZHANG Xuening, ZHOU Xiaohong, GAO Weijuan (1)

The inhibitory effect of Siwuyin on the invasion and migration of esophageal cancer cells SHI Huijuan, KONG Lingyu, WU Zhongbing, ZHAO Yang, SHI Dongxuan, LI Jing (7)

Intrahepatic survival and hepatic differentiation in rat embryos injected with hUCMSCs YAN Donghai, XIANG Xueping, PANG Yongcheng, TAN Xianqing, ZHENG Kaihui, TIAN Chuan, LI Zian, WANG Qiang, PANG Rongqing (14)

Cloning and expression characteristics of IFITM3 in African green monkeys XING Huanwei, YE Li, LI Chang, ZHANG Suhua, BAI Jieying (19)

Regulation of tacrolimus in spinal cord injury model rats based on the NF- κ B/JNK signaling pathway ZHANG Qimei, CHAI Fang, MAI Yizhun, GUO Renfen, WANG Guang (27)

Influence and mechanisms of fine particulates (PM_{2.5}) on atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice ... ZHAO Pei, TAN He, PENG Kenan, LI Xinxin, MA Qian, HUO Lijing, ZHANG Mingming, LU Yonggang, TIE Yanqing (33)

Effects and mechanism of rapamycin on cardiac injury after renal ischemia reperfusion in rats DENG Yu, LI Lina, WANG Pengfan, ZHANG Yingshuai, CAO Fuyuan, ZHANG Wei (40)

A comparative study of the microbial composition of different segments of the gastrointestinal tract in wild and captive tree shrews LI Yanyan, YANG Fengmei, WANG Junbin, CHEN Lixiong, DUAN Suqing, YANG Yaping, LIU Yu, HE Zhanlong, MA Jin, ZHAO Yuan (46)

Anti-apoptotic effect of ursolic acid by inhibiting serum deprivation-induced autophagy in H9c2 cells HE Mingjing, HUANG Shijie, SUN Xianglin, WEI Jun, ZHOU Qian, CHEN Lijia (56)

Effects of acute liver injury on brown adipose tissue function and associated mechanisms in mice	
..... <i>FENG Miao, BU Haolin, LI Lihong, GUO Linzhi, MIAO Yuchuan, GUO Jianhong</i> (63)	
Research on the relationship between vascular endothelial growth factor imbalance and complement deposition in preeclampsia	
..... <i>YU Ying, LU Hongyan</i> (70)	
Intrathecal injection of dexmedetomidine improves neuromotor function in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury based on the CXCR4-FAK signaling pathway	
..... <i>QIN Yan, YANG Guang</i> (77)	
Regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis	
..... <i>WANG Qin, FU Yu, WANG Ping</i> (86)	
An open-source multifunctional animal behavior experimental system	
..... <i>GONG Chen, ZHANG Yanjie, ZHANG Meng, SHI Zhiyue, LIU Xiang, LIU Pan, LIAO Xiaoling, ZHOU Yi, LIU Xue</i> (92)	
Daily maintenance, cleaning and disinfection of independent ventilation cage (IVC)	
..... <i>QIAN Danping, LI Dongming, MA Jing, SHAO Qiming</i> (99)	
Detection and stability evaluation of technical parameters of individually ventilated cages	
..... <i>MIN Fangui, WANG Jing, PAN Jinchun, HUANG Shuwu, GONG Baoyong, ZHANG Yu</i> (106)	
Discussion of an HVAC system design for a good laboratory practice lab animal vivarium	
..... <i>OU Shaohua, ZHOU Bin, LIU Jihong</i> (110)	
The introduction of nomenclature and rules for rat and mouse models	
..... <i>CAO Yuan, YUE Bingfei, LIU Quanming, FAN Changfa</i> (117)	
Progress in lipid-lowering model research	
..... <i>WANG Cheng, HU Naihua, YU Linyuan, GONG Lihong, DAI Xuyang, LI Yunxia</i> (121)	
Research progress of scavenger receptors and cerebral stroke	
..... <i>GAN Yanyan, LIU Jing, GUAN Furen, ZHOU Zheyi, LU Changjun</i> (131)	
Advantages and disadvantages of different primary biliary cholangitis mouse models	
..... <i>DU Siying, YANG Jinhui</i> (137)	
Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis	
..... <i>CHEN Suao, JIN Shizhu</i> (142)	

Issue 5

Tetrandrine combined with chemotherapeutic drugs induces reversal of multidrug resistance in zebrafish	
..... <i>XIANG Wenbi, LI Zhicao, ZHOU Dongzhe, ZHOU Yanhua, WU Xijun, HE Zhixu, SHU Liping</i> (1)	
α -synuclein A53T mutation impairs cognitive function in mice	
..... <i>WANG Manshi, ZHANG Ling, QIN Chuan, CONG Bin</i> (7)	
Investigation and drug resistance analysis of potentially pathogenic bacteria in the feces of wild tree shrews (<i>T.b. yaoshanensis</i>)	
..... <i>LIANG Liang, JIA Menggan, JIN Wei, CAO Yingying, TANG Haibo, LENG Jing</i> (14)	
Plasma cytokine levels in SIVmac239-infected rhesus monkeys following HAART treatment and correlation with disease characteristics ...	
..... <i>TIAN Long, TONG Ling, CONG Zhe, CHEN Ting, XUE Jing, WEI Qiang</i> (21)	
The establishment and application of an absolute quantitative method for analyzing SIV DNA via droplet digital PCR	
..... <i>ZHANG Lili, LU Jiahua, XUE Jing, CONG Zhe, WEI Qiang</i> (27)	
Screening of PD-L1 related specific candidate genes in tuberculosis by transcriptome sequencing and analysis in mycobacterium tuberculosis infected Pdl1 knockout macrophages	
..... <i>SHI Yanan, TANG Jun, LI Junli, WANG Jie, ZHAN Lingjun</i> (31)	
Establishment of a mouse model of alcoholic cardiomyopathy with liquid feed	
..... <i>LIAN Hong, LIU Lihui, NIE Yu</i> (40)	

Experimental Research on the Antidepressant Activity of *Gardenia jasminoides* Ellis-processed *Ligusticum* Based on Network Pharmacology LI Xiaonan, YONG Qiwen, ZHANG Ming, YAO Wenjing, WANG Jiahao, FENG Qiang, WANG Na, WANG Junxia, Cui Lijian(47)

Expression and relationship between splicing factors and the full-length ratio of *SMN2* in SMA mice DU Lili, MA Yu, BAI Wenqing, WU Liucheng, SHAO Yixiang(54)

Effect of initial mating age on reproductive performance in NIH mice LI Nan, WANG Congwu, WANG Tianqi, HEJialing, BAO Guo, ZHANG Changyong, SUN Deming(64)

Protective effect of anesthesia on the development of severe traumatic hemorrhagic shock in a rat model XIANG Chengfang, LUO Lihui, ZHAO Huimin, LU Yong, YANG Kang, ZENG Huan, WEI Tingjie(68)

Effects of four carrier solvents on eye development in zebrafish embryos DI Yanan, ZHU Liying, SHEN Jie, QIAN Wen, PAN Wei(75)

Antitumor effect of miRNA-144 gene overexpression and modulation of intestinal flora in a mouse model of liver cancer WANG Yu, XU Dafeng, ZHOU Kailun, WU Jincai, DING Yichao, GU Haiqiang, XIE Mingwei, LIN Xiangmei(81)

Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate cardiomyocyte autophagy and cardiac function via microRNA-21-5p in rats with myocardial ischemia SUN Lihua, WANG Juan, ZHANG Yu, ZHANG Ying, XING Shifeng(88)

Preparation of curcumin nanoemulsion and its protective effect on myocardial ischemia-reperfusion in rats LI Di, LI Yang, WU Di(97)

Suggestions on the welfare ethical review of laboratory animal care and use SU Meiyangyi, DENG Wei(104)

Research progress regarding Na⁺/K⁺-ATPase activity in individuals with epilepsy DU Sunbing, YANG Wenqiu, WU Qian, HAN Yanbing(108)

Evaluation and research progress for a common behavioral paradigm of maternal separation ZHANG Xianqiang, SUN Haoran, SUN Yanchao, GAO Weixing, ZHANG Ximei, LI Changjiang (114)

Progress in the understanding of the roles and mechanisms of Traditional Chinese Medicine in lowering blood glucose by regulating gut microbiota TANG Mingtian, XIAO Baiquan, LIU Zhonghua, RAO Junhua(120)

The Tumor Characteristics of ANXA1 HU Ronghua, ZHU Li, LI Shi, ZHANG Li, HU Chenchen(127)

The role of disease-associated microglia in the pathogenesis of Alzheimer's disease CUI Yusha, LU Xin, LI Feng(132)

Issue 6

miR-124-3p affects proliferation and migration in preeclampsia pathogenesis by targeting MAPK 14 ZHOU Qiaomiao, WANG Honglin, HUANG Haiyan, XU Jing, XIAO Meifang, GONG Humin, WU Dongcai(1)

G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress ZHANG Linming, XU Zhenzhen, CHANG Yuechen, SI Junqiang, MA Ketao, LI Li, WANG Qinzhang, LI Yinglong(10)

Transcriptome analysis of human cells infected with porcine circovirus type 2 LIU Xiaohua, XU Peng, ZHANG Xinwei, OUYANG Ting, JI Weilong, LIU Xiaohui, REN Linzhu(17)

Effect of isoliquiritigenin on cisplatin-induced acute kidney injury in mice with inflammation through the Smad3/Arid2-IR/NF-κB axis WEN Dan, LIAO Yuan, LI Jianchun, ZHANG Yuwei, FAN Junming(25)

Zhenqi Fuzheng granules inhibit angiogenesis in rats with hepatocellular carcinoma via the miR-200c/ZEB pathway JIA Li, YANG Zhihong, MA Junli(31)

Construction of <i>Bpi</i> gene-knockout mice using CRISPR/Cas9	
..... ZHANG Yu, GUO Zhongkun, FU Bin, LEI Zhan, NIE Airui, ZHUANG Fengfeng, WANG Kezhou(39)	
Absorption mechanism of ambroxol hydrochloride in the Caco-2 cell monolayer model	LIANG Qiuling,
ZHU Yemeng, MAI Ziyang, WANG Fengji, LONG Shuxian, WANG Yi, RAO Ziliang, KUANG Shaosong(47)	
Effects of Betula alcohol on oxidative stress and apoptosis induced by A β ₂₅₋₃₅ in PC12 cells	
... FU Zenghui, JIANG Yan, LIU Jing, LIN Zaihong, DU Shu, ZHANG Guangping, CHEN Tuantuan(54)	
Intraperitoneal injection of compound glycyrrhizin exerts preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis via the JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway	
..... WANG Min, LI Zuoxiao(62)	
Effect of Tet1 protein on HEK293T cell proliferation, cell cycle and apoptosis	
MO Jing, YANG Honglan, LIU Han, Jin Jiao, FAN Anran, ZHANG Peng, ZHOU Yanhua, SHU Liping(69)	
MD1 deficiency increases the susceptibility to ventricular arrhythmia in obese mice by activating the TLR4/MyD88 signaling pathway	XU Liang, NIU Siqian, YUAN Yiqiang, YANG Shaohua, ZHAO Yujie(76)
Histamine sensitivity analysis of domestic cats for the examination of depressor substances ... HUANG Ganquan,	
WU Xiansheng, WANG Fengji, YAO Jiaqi, HUANG Rui, LIANG Guanze, YAN Jiarong, KUANG Shaosong(83)	
Isolation, identification, and drug susceptibility testing of <i>Proteus mirabilis</i> from cynomolgus monkeys	
... LIU Quan, LIU Yu, LI Yanyan, YANG Fengmei, MA Jin, HE Zhanlong, YU Wenhui, ZHAO Yuan(88)	
Inhibitory effect of Youcha on blood lipid elevation in high-fat diet-fed rats	
..... TANG Jiexia, CAI Jiansheng, CHEN Quanhui, CHEN Shiyi,	
LONG Bingshuang, WEI Yi, LEI Mingzhi, YU Guoqi, YU Dongmei, QIN Jian, WANG Jian, ZHANG Zhiyong(93)	
Establishment of a clear-cell renal cancer cell tumor xenograft model using patient-derived cells to examine cell sensitivity to molecular-targeting agents	
..... WEI Yong, LI Xiaojuan, JIANG Qiyu, ZHANG Peng, FENG Fan, LI Ruisheng, WANG Ke(98)	
Astragaloside inhibits the TLR4-p38 MAPK signaling pathway in acute lung injury in newborn mice	
..... WANG Qian, WAN Jing, TAN Yangming, LUO Dandan, XIONG Haiying, JIANG Hong(106)	
Improved intubation of rat jugular veins for self-administering drugs	
... LI Beibei, ZHANG Huan, LU Siyuan, LIU Xiaozhen, WANG Shuzhe, LIU Yongtao, QIU Yunliang(113)	
Standards for constructing zebrafish houses and breeding systems	
..... LI Kuoyu, PAN Luyuan, SUN Yonghua(121)	
Exploration and prospects of regional anesthesia animal models	
..... HU Jian, XU Min, ZENG Yan, ZHANG Juntao, WANG Jiao, YANG Jing(128)	
Quality control of live food for laboratory fish	LI Jianjun, CAI Lei, YU Lujun, HUANG Ren(135)
Research progress on endothelial nitric oxide synthetase and thrombotic diseases	
..... JIANG Qingjuan, YING Yanping(140)	

Issue 7

Bone marrow mesenchymal stem cells modified with the neurotrophic factor-3 gene combined with hydrogels for the treatment of spinal cord injury in rats	ZHAO Xuanqi, ZHANG Yu, QIN Chuan, ZHANG Ling(1)
Tissue expression analysis of important pattern recognition receptors before and after ECTV infection in mice with different levels of resistance	HE Xiaobing, WANG Cong,
CHENG Wenyu, JIA Huaijie, CHEN Guohua, FANG Yongxiang, LIU Yizhong, JING Zhizhong(13)	
Evaluation of the effect of a hematology analyzer and manual counting method on the physiological indexes of tree	

- shrew erythrocytes
FENG Qingyuan, FENG Yiwei, XIA Wei, JI Ketong, CHEN Honglin, LAI Yongjing, TANG Anzhou (23)
- Adipose stem cells and their derived exosomes alleviate liver fibrosis in rats by reducing apoptosis
 *YOU Maochun, LIU Guangyi, CHENG Jun, LI Yajuan, YU Hong, WANG Qiaozhi* (30)
- Effect of lentivirus-mediated *Fg12* gene silencing on Th1/Th2 drift and the Th17/Treg balance in rats with autoimmune myocarditis
 *ZHANG Jingjing, LIU Jie, YANG Zhanfeng, SUN Yan, YUE LiXiao, HE Qunli* (38)
- Activation of peripheral blood platelets in a mouse model of immune thrombocytopenia with qi failing to control blood syndrome
 ... *WANG Pan, LIN Yadong, WU Quxing, HOU Min, GAO Wenjing, LIU Jianxun, REN Junguo* (45)
- Effects of Shenfu injection on ECG evolution and its mechanism during myocardial ischemia-reperfusion in rats
 *DENG Fengzhu, FENG Chong, LI Chunfu, FU Haiyan, LI Tianfa* (51)
- Investigation of the mechanism of Xuebijing injection in COVID-19 treatment based on network pharmacology and molecular docking *ZHENG Ya, LIU Zhiqiang, ZHU Xiaoqin, WANG Bolong* (57)
- Factors associated with the return of spontaneous circulation and increased survival in a rat model of cardiac arrest-cardiopulmonary resuscitation induced by asphyxia *ZENG Ruifeng, ZHONG Yuejia, LAI Chengzhi, LAI Fang, LIU Xiangqi, DUAN Yunbiao, LI Zunjiang, WU Yanhua, LI Jun, DING Banghan* (65)
- Aspirin inhibits myocardial fibrosis and inflammation by modulating CTRP6 in diabetic rats
 *LI Xinran, LIU Jianjun, JIANG Lei* (72)
- COVID-19-based data mining for Chinese medicine that regulates oxidative stress in the body
 *HUI Xiangxiang, MIAO MingSan* (78)
- Comparative analysis of liver cancer transplantation model in BALB/c mutant curly mice
 ... *LI Xiaojuan, LI Xingjie, FENG Fan, SUN Huiwei, CHAI Yantao, GAO Rong, LI Run, LI Ruisheng* (85)
- Effects of the combined application of bFGF and PDGF on tibia fracture healing in rats
 *TONG Jiuhui, WANG Bin, YUAN He, ZHANG Hua, SONG Yongzhou, MA Wei* (89)
- Mechanism of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in the angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm mouse model *LI Huipeng, XIAO Ying, WANG Guohua, CHEN Zhinian* (96)
- Activation of the α_2 adrenoceptor inhibits the expression of NF- κ B and inflammatory cytokines in the rat brain after ischemia-reperfusion *QIU Yongsheng, WEI Wei, ZONG Xiaochuan, ZHOU Rui, CHEN Yexi, WANG Shuai, YAO Dongdong, JIA Yingping* (104)
- Research progress on pigs as human disease models
CHEN Yurong, AN Xinglan, WANG Zhengzhu, ZHANG Sheng, ZHAI Yanhui, DAI Xiangpeng, LI Ziyi (110)
- Research progress of COVID-19 animal model
 *MIAO Jinxin, SONG Shaohe, WANG Zheng, MIAO Mingsan* (120)
- Application progress of metabolomics in gastric cancer research
TAO Zhuping, LI Canwei, WANG Xuexue, LI Ying, ZHANG Chenggui, LIU Weihong, BAI Li, GAO Pengfei (127)
- Alternatives to the use of experimental animals in education
 *JIANG Yajun, RONG Rong, LIU Xiaoyu, LU Xuancheng* (133)
- Research progress in animal models of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head
 *XIE Chengxin, WANG Wei, YU Chengqiang, AN Yang, JIN Xin, YIN Dong* (139)
- Application of animal molecular imaging in myocardial infarction *TU Qingqiang* (145)

Issue 8

Effects of chronic heterotypic intermittent stress stimulation on gastrointestinal immunity and microflora in rats	WANG Xiaoyu, MA Fuqiang, ZHANG Xiaoning, HE Wei, SU Yangshuai, WAN Hongye, HU Lin, JING Xianghong(1)
TRIM26 expression profile in multiple human and mouse tissues and organs	LIAN Mei, LIN Xiaolin, JIA Junshuang, XIAO Shengjun, XIAO Dong(10)
Apoptosis of nasopharyngeal carcinoma radioresistant cell line CNE-2R induced by p21 inhibitor UC2288	LIANG Renba, LI Xinxiao, ZHU Xiaodong(16)
Gender differences in cardiac remodeling induced by chronic sympathetic activation	LI Wenqi, FENG Lei(23)
Effect of modified ectopic pregnancy formula II on the Caspase-12 pathway in human trophoblasts	FAN Min, ZHENG Wenlan, WEN Xiaomin(29)
Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva	HE Jialing, BAO Guo, WANG Tianqi, ZHANG Changyong, LI Nan, SUN Deming(35)
Analysis of pathological changes and nucleic acid content in tissues of common laboratory mice infected with murine norovirus	LI Xiaobo, FU Rui, WANG Ji, WANG Shujing, WANG Shasha, LI Wei, QIN Xiao, HUANG Zongwen, HE Zhengming, YUE Bingfei(42)
Autophagy mechanism of Zhenwu decoction in myocardial cell protection of rats with heart-kidney and yang deficiency	HUANG Jian, MA Xiaotong, ZHANG Yajie, LI Lijing, HAN Dong, LIU Jia(49)
Preparation and assessment of a C57BL/6 mouse Parkinson's model induced by MPTP	LIN Zhen, CHEN Hongzhi, ZHAO Hang, LIU Hui, XU Yanyan, LIU Haiyan, ZHANG Hao(57)
Evaluation of learning-memory ability in C57BL/6J, BALB/c, and ICR mice	LI Xianglei, SUN Xiuping(63)
Analysis of the use of animal models of chloasma based on data mining	WU Yanyi, TIAN Shuo, MIAO Mingsan(70)
miR-181b regulates atherosclerotic plaque formation by targeting Mex3B expression	ZHANG Shiyuan(76)
Effect of ceramide on platelet-mediated transfusion-related acute lung injury in mice	LI Yingming, CHEN Hua, WU Yan(86)
Relationship between chronic stress-induced depression and BDNF/VEGF expression in the mouse hippocampus and forebrain cortex	SUN Mengjun, DONG Zefei, WANG Hong(92)
Experience of online teaching for laboratory animal science during the COVID-19 epidemic situation	ZHANG Caiqin, BAI Bing, ZHAO Yong, SHI Changhong(98)
Research progress on animal models of cardiac hypertrophy and compensation mechanisms	LIU Mengdi, ZHANG Lianfeng, LYU Dan(102)
Application of zebrafish models for nanotoxicology	ZHONG Jian, ZHU Jiarui, HE Xinyu, MA Jingyi, LI Ruiqi, ZHANG Jinbo(107)
Common health of humans and animals: One Health- a brief discussion on the management of experimental animal safety and national health	SUN Hongyu, YUAN Danni, ZHOU Haohan, SUN Liankun, ZHANG Dawei(114)
Advances in the application of an <i>in vitro</i> culture system of mouse post-implantation embryos	SHAO Honglian, TAN Tao(119)

Research progress of human umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of various diseases
..... WU Dan, YIN Yu(125)

Issue 9

Effect of barbaloin on the NOX4/ROS/p38 MAPK signaling pathway and podocyte function in rats with diabetic
nephropathy MA Bingqin, QIAN Weiyun, LUO Zhenguo, WANG Liangzhi(1)

Effects of curcumin on the Keap1/ARE signaling pathway and bile acid hepatointestinal circulation in hepatoma
model mice MOU Haijun, JIN Hai, CHEN Xingxing, XIAO Hong, LIU Qian, ZHU Rong(8)

Effect of bortezomib on the NF- κ B pathway and IL-1 β induced inflammatory damage in ATDC5 cells
..... MO Xiangtao, ZHANG Yishan, LI Yongjun, XIAO Yongjie(15)

Investigation on the infection of SARS-CoV-2 in laboratory animals
..... LI Xiaobo, WANG Ji, FU Rui, WANG Shasha,
WANG Shujing, LI Wei, QIN Xiao, HUANG Zongwen, HE Zhengming, YUE Bingfei, LIN Gengtao(21)

miR-186 inhibits the migration and epithelial-mesenchymal transition of human glioma cell lines by targeting Smad6
..... LIU Yan, XU Lu, SHAO Amo, ZENG Jinyan, YANG Guoqing(25)

Polygonum perfoliatum L. extract mechanisms in relieving an Alzheimer's disease model in mice
..... FAN Junchao, SONG Junjie, CHEN Yong(32)

Morphological analysis of GFP nude mice skull cells cultured *in vitro* YAN Ke,
WU Congyan, DAI Chungang, ZHAO Haifeng, WANG Weihua, ZHAO Yaodong, ZHU Wenyu, HUANG Qiang(38)

Effect of miR-424-5P on colon cancer cell proliferation and its mechanism of action
..... LIU Youqiang, HU Jitao, LI Baokun, XI Jinchuan, WANG Guiying(43)

Effect of triptolide-loaded exosomes on prostate cancer model mice
..... ZENG Can, WANG Keping, CAO Shijin(49)

An apex semi-barbed absorbable suture localization device for small pulmonary nodules in pig lung
..... LI Fengwei, XIN Xing, BIAN Jianwei, WU Xun, LI Hao, CHEN Yingtai(54)

Discussion of frozen section techniques with different tissues in mice
..... WANG Yuanyuan, WANG Tao, LI Xin, WANG Bin, JIANG Kui(59)

Analysis of common problems in standardizing documents of laboratory animals
..... DONG Yunhan, KONG Qi, LIU Jiangning(64)

Comparison of legal systems in China and abroad for improved management of laboratory animals
..... GONG Helingzi, KONG Qi, LIU Jiangning(71)

The emergency management experience of animal biosafety level 3 laboratory
..... LIN Kaili, LIU Meixuan, MA Haoran, PAN Sidan, QIAO Hongwei, GAO Hong(76)

A preliminary study on the construction of a national pathogenic microorganism preservation center
..... LIU Meixuan, LIN Kaili, ZHANG Lifang, TONG Wei, GAO Hong(80)

Arginase II: An extraordinary enzyme LIU Chang, LUO Rong, DU Jipei, LI Xiu(85)

Advances in single-cell RNA sequencing of latent cytomegalovirus in bone marrow to investigate reactivation
inducing immunosenescence LIU Puheng, HAN Hui, WANG Yuhong(91)

Research progress on stem cell therapy for type 2 diabetes mellitus and associated complications
..... LI Xinyue, LI Qian, SHI Guiying, HUANG Yiyi, LEI Xuepei, BAI Lin(96)

Advances in Laminopathy-related mouse models	
.....	ZHOU Ling, FAN Runge, LI Dongming, LIU Heng, SHU Wei(103)
Research and progress in animal models of coronavirus disease 2019	
.....	YANG Junting, WANG Xiaotang, XU Guoqiang, SONG Guohua(111)

Issue 10

Establishment of a cough variant asthma guinea pig model induced by cigarette smoke exposure and OVA sensitization	LYU Tianyi, LI Demin, YANG Daowen, CHENG Siyi(1)
Correlation between serum TF, TM, and vWF contents and CRT formation in SD rats	
.....	WEI Yan, YING Yanping, LING Ying, ZHAO Huihan, JIANG Qingjuan, GAN Xiao, WEN Cui(8)
Comparison of three surgical models of extrahepatic cholestasis in rats	
.....	WANG Siyu, ZHANG Yinghong, LIU Linxiu, LU Rencai, HE Hong, WANG Shaobo(14)
Effect of exosomes derived from osteosarcoma stem cells on proliferation and differentiation of T cells	
.....	CHEN Sili, YANG Hongbin(21)
Role of transcription factor YY1 upregulating the expression of PD-L1 in promoting immune escape of gallbladder cancer	ZHOU Jie, LI Jingdong, QUAN Gang, SUN Ji(30)
Calycosin attenuates damage induced by H ₂ O ₂ in SH-SY5Y cells by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway	BAI Zhenjun, ZHANG Huiyu, GUO Minfang(37)
LncRNA HULC regulates proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via the miR-372/CXCR4 axis	LIU Yuanguang, LIU Huaihai(44)
Application of an intraluminal shunt to abdominal heterotopic heart transplantation in rats	
.....	ZHENG Weifeng, MI Rui, GUO Shudong, LUO Zhiqiang, WANG Chengrui, LI Tong(56)
MiR-199a increases myocardial injury in a mouse model with myocarditis by activating the NF- κ B signaling pathway	
WANG Ke, DONG Pingshuan, HE Suna, CHEN Shifang, ZHAO Xikun, ZHANG Hengliang, WANG Tengfei(63)	
Study on the mechanism of glabrous greenbrier rhizome treatment action for fever based on network pharmacology	XU Yan,
HAN Jing, REN Xiaoting, WANG Lei, WANG Yijie, LIU Liang, YAO Bo, WANG Zhongtian, SUN Liping(70)	
Inhibitory effect of low molecular weight heparin on catheter-related thrombosis with a peripherally inserted central catheter in rabbits	
.....	HUANG Liquan, LIANG Shuxia, CHEN Li, CHEN Guiyuan, HU Bo, CHU Xiaofeng(78)
Effect of scalp acupuncture combined with repeated transcranial magnetic stimulation on neurological function in rats with stroke and its effect on the PKA/CREB signaling pathway	
.....	GE Lei, ZOU Yu'an, WANG Xiaona(85)
Kangxianzengzhi granules regulate the TLR4/HMGB1/p-I κ B- α signaling pathway to protect hippocampal neurons in juvenile epileptic rats	ZHANG Yingying, SHAN Haijun, LOU Yuanjun, GUO Xin(92)
Simulation analysis of feeding microenvironment of specific pathogen free experimental rabbits under dynamic operation	GONG Guangcai, CHEN Mengjun, AN Kehui, LIU Jiyang, SHI Xing(99)
Individual ventilated cage changing standard operating procedure and viral pathogen control in laboratory mice	
.....	TONG Wei, GUO Zhi, LIU Ziyang, PAN Sidan, GAO Hong, XIANG Zhiguang(107)
Research progress on the establishment of rat and mouse models for preeclampsia	
.....	HE Cenying, XIE Yingying, XU Mengting(110)

Effects of the lncRNA *TDRG1* and their underlying mechanisms in tumors
..... ZHAO Yuqiao, GUAN Canghai, WU Haotian, HU Zengtao, JIANG Xingming(117)

Mitochondrial autophagy and dysfunction in Parkinson's disease
..... GAN Xue, LIU Shuyi, WANG Zhengbo(121)

Advanced research on animal models of lung cancer bone metastasis
..... ZHANG Na, LIU Xuefang, FENG Suxiang, DONG Haoran(128)

Applications of immunodeficient and humanized mice in stem cell quality control
..... SHI Guiying, BAI Lin(132)

Recent progress in the pathogenesis of achalasia LIU Ying, JIN Shizhu, XU Wanying(138)

Issue 11

Analysis of intestinal microbiota diversity in nutritional obesity rats
..... LI Hongrui, ZHANG Deqin, JIN Xiaolei, TANG Xiao, WANG Dawen,
GAO Xue, XIN Pengfei, HE Jincheng, MA Fubin, ZHOU Caiyun, SUN Xiaowei, ZHANG Jiangang(1)

Clinical value of routine blood test and biochemical indexes in cynomolgus monkeys with ankylosing spondylitis
..... LI Yuying,
MAI Dongmei, JIA Huanhuan, WU Zhiheng, HE Ganghua, TANG Shuangjie, MA Chenghong, LU Li(10)

Comparison of immune responses induced by poly(I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets
..... YANG Xiao, CHEN Chong(16)

In vitro screening of mouse bone marrow-derived dendritic cells induced by five plant polysaccharides
..... DONG Xiaoxiao, LI Boye, ZHANG Jiyao, CHEN Yin, HU Qin, PENG Bo(23)

Curcumin sensitizes wild-type PTEN breast cancer cells to PARP1 inhibitors
... SUN Caifeng, WANG Ying, YANG Yanqin, XUAN Jize, ZHANG Bin, QING Yuanhua, MAO Weifeng(28)

Effect of valeric acid on neuronal protection and P-glycoprotein expression in epileptic mice
..... YU Zhongjuan, CHAI Feng, SHI Baolin, ZHANG Yueqi, WU Chunli(34)

Effects of DIS3 overexpression or interference on cell cycle and tumor-associated protein expression of three types of
human myeloma cells
ZOU Liang, CHENG Hui, ZHANG Ting, ZHOU Ying, GUAN Jun, CHENG Ping, WANG Lanlan(40)

Protective effect and mechanisms of artesunate on adriamycin-induced kidney injury in rats
..... TAO Lei, LI Tingting, MA Yini, CHEN Renbing, LI Xueqin, WANG Jinna(47)

Senegenin protects against lipopolysaccharide-induced neurite toxicity in a nerve cell model
..... PI Ting, LIANG Yueqin, OU Wenlirong, ZHU Han, TAO Yanlin, JIN Xingfang(52)

Sphingosine phosphate participates in the pathogenesis of pancreatic fibrosis in KkAy type 2 diabetic mice
..... XIU Lei, CHANG Na, JIANG Tao(59)

Effects of treadmill exercise on learning, memory, inflammation, and NGF expression in the hippocampus of
diabetic rats ZHAO Jun, CHU Yajun, LIANG Jinyu, FU Fang(65)

Effects of high-intensity focused ultrasound on immune function and survival time in rats with cervical cancer ...
..... HUANG Min, PENG Yuexiang, GAO Weiyuan, HUANG Hongli(72)

Construction of simvastatin nanoparticles and their effect in atherosclerosis model rats
..... HAN Jinxia, ZHU Yanan, WANG Jinwen, WANG Jijia, LI Di, YANG Jingbo(78)

Effects of sevoflurane preconditioning on cognitive dysfunction in aged rats and the role of autophagy in the

hippocampus	XIE Yi, WANG Kai, NIU Min(84)
Midazolam inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte damage by up-regulating miR-290-5p to regulate the PI3K/AKT signaling pathway	JIANG Tingting, MA Xinghua(91)
Establishment of common animal models of asthma	LI Yongxing, ZHONG Ming, WANG Yong, MA Wuhua(97)
Application of an organoid model for prostate cancer heterogeneity research	ZHOU Ligui, ZHANG Yongbin, SHI Changhong(102)
Research progress on animal models of rheumatoid arthritis	XIA Qing, JI Yuting, LIU Hailiang, SONG Wuqi(107)
The mechanism of ferroptosis and research progress on its involvement in hematological malignant tumors	YIN Xianqing, LIU Rongrong(114)
Research progress on mechanisms of Rab7-mediated mitochondria-lysosome crosstalk	CHEN Yanse, PAN Qingjun, LIU Huaifeng, WANG Shujun(120)
The roles of inflammation in myocardial regeneration	TAN Yong, ZHAN Zhenzhen(128)
Comparison and applications of mouse models in research on calcific aortic valve disease	ZONG Yonghui, LIU Xincan(133)
Research progress on the biosafety of mesenchymal stem cells	ZENG Guirong, YANG Liu, LUO Guifang, JIANG Dejian(140)
Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock	LIU Zhengquan, ZHAO Zigang(146)

Issue 12

RNA interference of <i>Sirt3</i> in human neuroblastoma SH-SY5Y cell	ZHANG Jingyi, DENG Yongning, ZHANG Meng, QU Qiumin(1)
Alleviation of the inflammatory response induced by acute lung injury in sepsis rats by miR-128-3p down-regulation and effects on lung tissue morphology	HUANG Zhong, SUN Jie, YAO Zhenbin, LI Guihua, XU Xiaogang(9)
Agmatine attenuates propofol-induced neurotoxicity in newborn rats by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway	ZHANG Shaohua, ZHANG Yanfang, CAO meng, LI Yan, LIAO Lixia, WANG Beibei(17)
Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of <i>HMGA2</i> knockout hepatoma carcinoma cell line	XU Tao, GU Peng, CHEN Bangzhu, YE Xing, LIANG Chunjin, ZHANG Yinghui, GU Weiwang(23)
Curcumin protects human retinal pigment epithelial cells from damage induced by high glucose by down-regulating microRNA-125b	SU Junhua, JIAO Yongwei, WEI Honglian(30)
Effects of VPS4B on the Notch pathway and odontogenic differentiation in dental pulp stem cells	LI Kunyang, CHEN Dong, ZUO Chunran, LIU Aiqun, ZHU Lansheng, NIU Bing(36)
Genetic structure differences in different laboratory mouse populations analyzed by microsatellites	GUANG Jiaona, ZUO Qin, WEI Jie, ZHOU Jiaqi, WANG Hong, YUE Bingfei(42)
Effect of pomegranate blood-enriching syrup on anemia in Wistar rats	MO Guoyan, HAN Xiangzhi, MU Dandan, DONG Yuwei, HAN Lintao, HUANG Fang, YIN Qiang(50)

Gender differences in peripheral blood and immune cell phenotypes in aging Sprague-Dawley rats *GUAN Bowen, LU Yanhua, BAI Lin, SHI Guiying, SU Lulu, WANG Yuquan, WEI Qiang, WANG Wei, MENG Aimin*(57)

Stability of esterase-1 serum samples in proficiency testing *WANG Hong, WEI Jie, GUANG Jiaona, ZHOU Jiaqi, XIAO Jing, YUE Bingfei*(64)

Anesthetic effects of premedication midazolam combined with butorphanol on isoflurane-anesthetized mice *WEI Xuemei, FENG Haimei, XU Zhixin*(70)

Expression and significance of c-Myc, RhoA and YAP in adenine-induced chronic kidney disease *WEN Li, HE Tao, KANG Ting, XIONG Lin, ZHU Tingting, OU Santao*(76)

Insulin resistance and islet β cell secretion mediated by the miR-335-5P-regulated TGF- β pathway in gestational diabetes mellitus mice *LIU Jie, WEN Xuena, FENG Ying, LI Yuanyuan, LIU Yongli*(85)

Effect of environmental enrichment on behavior and corticosterone levels in SD rats *LIU Shuai, SONG Jiayang, LYU Sai, LI Junyan*(92)

Mechanistic analysis of liraglutide effects on the expression levels of PEPCK and G6pase in the diabetic mouse liver *DU Guohui, LIU Bowei, YING Fuzai, QI Ximing, FAN Dongmei*(98)

Quantitative detection of SIV/SHIV in Chinese rhesus macaque tissues by TaqMan real-time FQ-PCR *GAO Ge, MENG Fengzhen, YAO Yanfeng*(103)

Survey analysis of an online laboratory animal science course in a veterinary medicine training program *WU Weixin, LIU Huicong, QU Shenghua, ZHANG Bing*(109)

Establishment and application of animal models of venous bridge disease after coronary artery bypass grafting ... *YANG Rencong, YANG Fenghua, LI Xiaohui, LI Xiangnian, LI Wenhua, LIAO Shengjie, ZHANG Xiaoshen*(113)

Progress in understanding intrauterine infection in animal models *HUANG Qingmei, BAI Faming, ZHU Yunlei, WEI Bingmei, CHEN Yujun*(120)

Advances in ferroptosis in respiratory diseases *YANG Xia, NING Zong*(125)