

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993 年 6 月创刊

第 29 卷 第 5 期 2021 年 10 月 30 日出版

目次

研究报告

- 自身免疫型卵巢早衰模型的研究 王海丹, 郭红玉, 马蔚蓉, 王琮, 严士海, 符蕊 (563)
- 贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究
..... 刘朝阳, 吴琳琳, 田茂生, 张明全, 赵娜, 高记华 (570)
- 脊髓 A1 型星形胶质细胞在外周炎性痛中的动态变化 李倩, 李玲玲, 李爽, 黄楚天, 周君梅 (578)
- 奥替普拉改善急性痛风性关节炎小鼠模型疼痛和炎症的效应及机制研究
曾丹怡, 尹诚语, 刘伯宇, 聂慧敏, 李晓洁, 陈瑞香, 王洁, 李园园, 徐若瑶, 位会娜, 台燕, 邵晓梅, 王萍, 刘伯一 (585)
- 背根神经节 P2X3 受体表达上调在糖尿病神经痛中的作用
..... 陈卢杭, 费雪瑜, 康玉蓉, 王涵芝, 瞿思颖, 李想, 何晓芬, 方剑乔, 蒋永亮 (593)
- 壳聚糖对 PM_{2.5} 所致小鼠急性肺损伤的干预作用 熊程, 赵英政, 陶映君, 徐光翠 (600)
- 环境空气暴露对猪粪悬液中菌群及代谢物的影响 孙静, 陈奕龄, 丁玉春, 葛良鹏 (606)
- 规律性有氧运动对脑缺血大鼠的脑保护作用及机制探讨 汪君民, 陆海林, 龚腾云 (618)
- 顺铂连续和间隔造模诱发的药源性虚证小鼠类固醇激素合成能力的比较研究
..... 农溜心, 邓琳, 张超峰, 贺健祥, 谢海纳, 潘志强 (626)
- 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症及运动能力的影响 罗勇, 黄金玲 (637)
- 两种肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的构建及评价
..... 徐海燕, 杜青, 徐琳本, 黄建华, 王红梅, 丁正香 (644)
- 人脑胶质瘤小型猪原位移植模型的建立及评估 赵勇, 武文卿, 谭邓旭, 丁桂荣, 师长宏 (651)
- 新西兰兔全膝关节置换术后假体周围感染模型的建立
..... 王勇平, 张怀斌, 谢瑞敏, 陶贵彦, 侯卫华, 刘小荣 (657)
- 姜黄素对非酒精性脂肪肝大鼠肝 11 β -HSD1 表达及胰岛素抵抗的影响
..... 孙红爽, 李鹏霖, 刘永双, 也春城, 高玲娜 (664)

研究进展

传染性海绵状脑病果蝇模型研究进展	王冬冬,杨利峰,赵德明,周向梅(670)
窖蛋白-1 在衰老中的作用和信号通路	侯丽雅,李欣悦,白琳(675)
糖尿病视网膜病变动物模型研究进展	王娇娇,李苗,史平玲,张贝贝,魏圆梦,王艳歌,宋宗明(681)
裸鼯鼠脑形态研究进展及应用展望	杨文静,崔淑芳(689)
中国小型猪在生物医药领域的研究进展	陈雨荣,安星兰,张胜,翟岩辉,于浩,代相鹏,李子义(695)
广告	(封二,封三,内插)

主 管
中国科学技术协会

主 办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主 编
秦川

编辑部主任
董令赢

编 辑
《中国实验动物学报》编辑部

出 版
《中国实验动物学报》编辑部

发 行
《中国实验动物学报》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话:010-67779337
传真:010-67770690
E-mail:bjb@cnilas.org
<http://zgsydw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

本期执行主编 赵德明

本期责任编辑 陈 慧 董令赢

照 排
同方知网(北京)技术有限公司

印 刷
北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号
2-748

广告发布登记
京朝工商广登字 20170142 号

定 价
每期 50.00 元,全年 300.00 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

2021 年版权归中国实验动物学会所有

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

本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 29, Number 5, October, 2021

CONTENTS

Study of a model of autoimmune premature ovarian failure	
.....	<i>WANG Haidan, GUO Hongyu, MA Weirong, WANG Qiong, YAN Shihai, FU Rui</i> (563)
Experimental study on the adhesion and antioxidant effect of MAP on ulcerative colitis in rats	
.....	<i>LIU Zhaoyang, WU Linlin, TIAN Maosheng, ZHANG Mingquan, ZHAO Na, GAO Jihua</i> (570)
Changes in spinal A1 astrocyte polarization during peripheral inflammatory pain	
.....	<i>LI Qian, LI Lingling, LI Shuang, HUANG Chutian, ZHOU Junmei</i> (578)
Therapeutic effects of oltipraz on the pain and inflammation responses of a mouse model of acute gouty arthritis and related mechanisms	
.....	<i>ZENG Danyi, YIN Chengyu, LIU Boyu, NIE Huimin, LI Xiaojie, CHEN Ruixiang, WANG Jie, LI Yuanyuan, XU Ruoyao, WEI Huina, TAI Yan, SHAO Xiaomei, WANG Ping, LIU Boyi</i> (585)
Role of upregulated P2X3 expression in dorsal root ganglia during diabetic neuropathic pain	
.....	<i>CHEN Luhang, FEI Xueyu, KANG Yurong, WANG Hanzhi, QU Siying, LI Xiang, HE Xiaofen, FANG Jianqiao, JIANG Yongliang</i> (593)
Intervention effect of chitosan on acute lung injury induced by PM _{2.5} in mice	
.....	<i>XIONG Cheng, ZHAO Yingzheng, TAO Yingjun, XU Guangcui</i> (600)
Effects of aerobic and anaerobic FMT preparation on fecal microbiota and metabolite profiles in swine	
.....	<i>SUN Jing, CHEN Yiling, DING Yuchun, GE Liangpeng</i> (606)
Protective effect and mechanism of regular aerobic exercise on cerebral ischemia in rats	
.....	<i>WANG Junmin, LU Hailin, GONG Tengyun</i> (618)
Comparative study of steroid hormone synthesis in a drug-induced deficiency syndrome by continuous and interval administration of cisplatin in mice	
.....	<i>NONG Zixin, DENG Lin, ZHANG Chaofeng, HE Jianxiang, XIE Haina, PAN Zhiqiang</i> (626)

Effects of 8 weeks' aerobic exercise on the skeletal muscle inflammation and exercise ability of obese mice	 LUO Yong, HUANG Jinling(637)
Construction and evaluation of two obese rat models of polycystic ovary syndrome with insulin resistance	 XU Haiyan, DU Qing, XU Linben, HUANG Jianhua, WANG Hongmei, DING Zhengxiang(644)
Establishment and evaluation of orthotopic transplantation model of human glioma in miniature pigs	 ZHAO Yong, WU Wenqing, TAN Dengxu, DING Guirong, SHI Changhong(651)
Establishment of a peri-prosthetic infection model after total knee arthroplasty in New Zealand rabbits	 WANG Yongping, ZHANG Huaibin, XIE Ruimin, TAO Guiyan, HOU Weihua, LIU Xiaorong(657)
Effect of curcumin on hepatic 11 β -HSD1 expression and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver disease	 SUN Hongshuang, LI Penglin, LIU Yongshuang, NIE Chunheng, GAO Lingna(664)
Progress in research into transmissible spongiform encephalopathies using <i>Drosophila</i> models	 WANG Dongdong, YANG Lifeng, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei(670)
Role and signaling pathway of Caveolin-1 in aging	 HOU Liya, LI Xinyue, BAI Lin(675)
Research progress of animal model of diabetic retinopathy	 WANG Jiaojiao, LI Miao, SHI Pingling, ZHANG Beibei, WEI Yuanmeng, WANG Yange, SONG Zongming(681)
Research progress of brain morphology and function in naked mole-rats and application prospects	 YANG Wenjing, CUI Shufang(689)
Progress in the use of Chinese miniature pigs in biomedical research	 CHEN Yurong, AN Xinglan, ZHANG Sheng, ZHAI Yanhui, YU Hao, DAI Xiangpeng, LI Ziyi(695)

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Managing Editor

DONG Lingying(董令赢)

Editing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Publishing

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

Distributor

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: 010-67779337
Fax: 010-67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgzydw.cnjournals.com/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

CSSN

ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

Copyright 2021 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

王海丹,郭红玉,马蔚蓉,等. 自身免疫型卵巢早衰模型的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 563-569.

Wang HD, Guo HY, Ma WR, et al. Study of a model of autoimmune premature ovarian failure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 563-569.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.001

自身免疫型卵巢早衰模型的研究

王海丹*, 郭红玉, 马蔚蓉, 王琼, 严士海, 符蕊

(南京中医药大学附属医院江苏省中医院, 南京 210029)

【摘要】 目的 为了更好地建立自身型卵巢早衰模型,采用不同的造模时间和佐剂观察 ZP₃ 诱导的免疫型卵巢早衰模型建立的相关因素。**方法** 将动情周期正常的 B6AF1 小鼠,随机分为正常组、模型 A 组、模型 B 组、模型 C 组、模型 D 组。造模结束后取小鼠血清检测性激素,取卵巢观察病理改变、透明带的变化、颗粒细胞的凋亡。**结果** 除模型 A 组外,其余 3 组均表现出动情周期紊乱、高促性腺激素低雌激素、闭锁卵泡增多、透明带明显、卵巢凋亡细胞增多的现象,与各组相比模型 C 组和 D 组在闭锁卵泡数量、卵巢凋亡细胞和透明带的变化上更加明显。**结论** ZP₃ 诱导可造成免疫型卵巢早衰,其中 3 次免疫的两组成模效果更好,成模率在 80%,可作为今后建模的参考。

【关键词】 免疫型卵巢早衰;模型建立;透明带抗原;B6AF1 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0563-07

Study of a model of autoimmune premature ovarian failure

WANG Haidan*, GUO Hongyu, MA Weirong, WANG Qiong, YAN Shihai, FU Rui

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Corresponding author: WANG Haidan. E-mail: danielwhd1984@sina.com

【Abstract】 Objective To improve a mouse model of autoimmune premature ovarian failure, different modeling times and adjuvant were used to determine factors related to induction of premature ovarian failure by zona pellucida glycoprotein 3 (ZP₃). **Methods** B6AF1 mice with regular estrous cycles were randomly divided into five groups: normal, model A, model B, model C and model D groups. At the end of the experiment, serum was collected to detect sex hormones, and ovaries were collected to observe pathological changes, including effects on the zona pellucida and apoptosis of ovarian cells. **Results** Compared with the normal group, the model B, C and D groups showed estrous cycle disorders, including high gonadotropin and low estrogen levels, increased follicle atresia, obvious zona pellucida and increased apoptosis of ovarian apoptotic cells. The model C and model D groups had more obvious changes in the number of atretic follicles, ovarian apoptotic cells and zona pellucida. **Conclusions** In ZP₃ induced autoimmune premature ovarian failure, the two-component model with three times immunization produced a stronger effect, and the modeling rate was 80%, which can be used as a reference for future modeling.

【Keywords】 autoimmune premature ovarian failure; model; zona pellucida antigen; B6AF1 mice

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

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81804131)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81804131)。

[作者简介] 王海丹(1984—),女,副主任药师,硕士,研究方向:妇科药理学。Email:danielwhd1984@sina.com

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是一种常见的妇科疾病,其特征是 40 岁以前出现卵巢功能衰退,伴随着闭经、血清高促性腺激素和低雌激素的症状^[1]。它是早发性卵巢功能不全 (premature ovarian insufficiency, POI) 的终末阶段^[2],对育龄妇女来说从身体和精神上都是伤害,不仅有围绝经期带来的痛苦,还会导致生育力下降或丧失,认知力下降,缺血性心脏病、骨质疏松、自身免疫性疾病^[3-4],身体和精神上的改变严重影响妇女及其家人的身心健康和生活质量。卵巢功能不全的原因很多,比如:自身免疫因素、遗传基因、环境和生活方式、心理压力、药物化学因素等^[5-6]。自身免疫异常是比较重要的因素之一,约 5% ~ 30% 的 POF 病例有自身免疫病因^[7-8]。40 多年前,卵巢组织就被证实是免疫系统的一个靶向器官^[9]。但目前免疫性卵巢早衰的发病机制、有效的检测及治疗方法还在进一步探索之中。本文通过比较采用不同的造模时间和不同佐剂观察小鼠透明带多肽抗原诱导的免疫性卵巢早衰模型建立的相关因素,为高效高质量地建立免疫性卵巢早衰模型提供了一定的参考,为研究药物对免疫性卵巢早衰的作用机制提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 8 周龄 SPF 级健康雄性 A/J 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购于江苏集萃药康生物科技有限公司【SCXK(苏)2019-0009】。24 只 8 周龄 SPF 级健康雌性 C57BL/6 小鼠,体重 18 ~ 22 g,购于斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。将 A/J 雄鼠和 C57BL/6 雌鼠进行交配,繁育出 B6AF1 小鼠,7 周龄时将所繁育的雌性小鼠查 1 周动情周期变化,筛选出具有正常动情周期的 B6AF1 小鼠 50 只,体重 18 ~ 22 g。饲养于江苏省中医院实验动物中心【SYXK(苏)2017-0069】。实验小鼠在 SPF 级环境分笼饲养,温度为 (20 ± 2)℃,相对湿度维持在 45% ~ 65%,照明 12 h 更替,自由饮水饮食。所有操作均符合南京中医药大学附属医院实验动物伦理要求(审批号:2019DW-09-02)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠透明带多肽粉末:小鼠透明带 3(ZP₃) 的第 330 ~ 342 个氨基酸序列(NSSSQFQIHGPR),分析纯度 96.91% (由上海吉尔生化有限公司生产,

Catalog:271036);弗氏完全佐剂 a (每毫升含有 1 mg 结核分枝杆菌 TB) (sigma 公司, Lot#SLBT1714);弗氏不完全佐剂 a (sigma 公司,批号:SLBT0114);弗氏完全佐剂 b (每毫升含有 5 mg 结核分枝杆菌 TB) (美国 Chondrex 公司, LOT:200010);弗氏不完全佐剂 b (美国 Chondrex 公司, LOT:200079);E₂ 试剂盒 (北京华英生物技术研究,批号:20201015);FSH 试剂盒 (北京华英生物技术研究,批号:20201016);Tunel 试剂盒 (Servicebio 公司,批号:G1501);Donkel 试剂盒 (Servicebio 公司,批号:SA00013-5);DAPI (Servicebio 公司,批号:G1012);全自动放免计数仪 (西安核仪器厂);NIKON ECLIPSE C1 正置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司);Nikon DS-U3 成像系统 (日本 Nikon 公司);离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型建立

将动情周期正常的 B6AF1 小鼠随机分为 5 组:正常组、模型 A 组、模型 B 组、模型 C 组、模型 D 组。将浓度为 1 mmol/L 的 ZP₃ 溶液与弗氏完全佐剂 a 和弗氏不完全佐剂 a 分别按 1:1 体积比例配制成免疫试剂 a 和免疫强化试剂 a,与弗氏完全佐剂 b 和弗氏不完全佐剂 b 分别按 1:1 体积比例配制成免疫试剂 b 和免疫强化试剂 b。造模均为尾根部皮下多点注射。正常组小鼠每次免疫时每只给予 0.15 mL 生理盐水。模型 A 组和模型 B 组分别单次注射 0.15 mL 免疫试剂 a 和免疫试剂 b,2 周后取材。模型 C 组和模型 D 组小鼠首次免疫时每只分别给予 0.15 mL 免疫试剂 a 和免疫试剂 b,14 d 后每只鼠分别给予 0.15 mL 免疫强化试剂 a 和免疫强化试剂 b 进行第 2 次免疫,28 d 后进行第 3 次免疫,操作同第 2 次。第 3 次免疫后 1 周取材^[10]。

1.2.2 取材及检测

每天定时用预吸有生理盐水的吸管轻轻插入小鼠阴道,取分泌物细胞,将有阴道分泌物细胞的液体滴入细胞板,在显微镜下观察细胞形态,记录小鼠动情周期变化^[11]。实验末各组小鼠取血清,按试剂盒说明采用全自动放免计数仪检测小鼠血清 E₂、FSH 水平。取单侧卵巢组织,HE 染色观察卵巢各级卵泡、闭锁卵泡、黄体的变化。荧光 tunel 法检测卵巢细胞凋亡情况,按照以下步骤进行:石蜡切片脱蜡至水、蛋白酶 K 修复、破膜、室温平衡、加反应液 TDT 酶, dUTP、DAPI 复染细胞核、封片、镜检拍照。荧光显微镜下观察 DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,试剂盒为 FITC 荧光素标记,阳性

凋亡细胞核为绿色。免疫荧光法检测卵巢透明带的变化,按照以下步骤进行:石蜡切片脱蜡至水、抗原修复、画圈血清封闭、加一抗 Donkel、DAPI 复染细胞核、淬灭组织自发荧光、封片、镜检拍照。荧光显微镜下观察 DAPI 染出来的细胞核在紫外光的激发下为蓝色,阳性表达为 Donkel 荧光素标记的绿色。

1.2.3 造模成功判定指标和鉴定方法

从动情周期变化、性激素水平、卵巢组织病理变化、卵巢颗粒细胞凋亡以及透明带变化来判定造模成功与否。如果同时出现动情周期紊乱;低雌激素高促卵泡刺激素水平;卵巢病理呈现初级、次级、成熟卵泡率变少,闭锁卵泡率上升;卵巢颗粒细胞凋亡率上升;透明带呈现亮色荧光圈;并且以上各项指标与正常组比较差异具有显著性的组别就判定为造模成功。

1.3 统计学分析

所有统计计算均用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析,所有数据皆以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。凋亡率统计采用 Image J 软件分析。

2 结果

2.1 小鼠动情周期变化

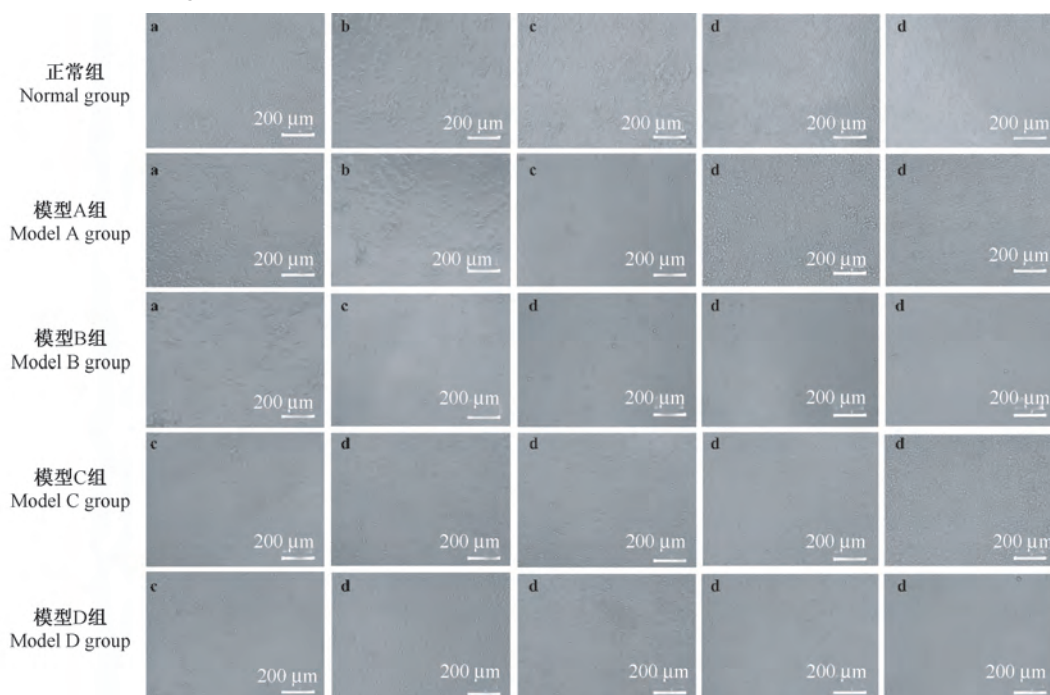
正常组和模型 A 组小鼠以动情前期、动情期、动情后期、动情间期的规律呈现 5 ~ 6 d 的 1 个循环。模型 B 组小鼠造模 1 周后呈现动情周期紊乱,但是各期还是呈现 5 ~ 6 d 的规律,只是动情后期和动情间期延长。模型 C 组和模型 D 组均在第 3 次免疫后呈现出明显的动情周期紊乱,80% 的小鼠一直处于动情后期和动情间期,模型 C 组和模型 D 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$) (见图 1)。

2.2 血清 E_2 、FSH 水平变化

与正常组相比,模型 B 组小鼠 E_2 水平明显降低,FSH 水平明显增加,与正常组比,差异具有显著性 ($P < 0.05$)。模型 C 组和模型 D 组小鼠 E_2 水平显著降低,FSH 水平显著增加,与正常组比,差异具有显著性 ($P < 0.01$)。模型 A 组小鼠血清 E_2 、FSH 水平与正常组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),模型 C 组和模型 D 组小鼠血清差异无显著性 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.3 小鼠卵巢组织形态学的变化

正常组卵巢皮质区各级卵泡、黄体相间分布,



注:a;动情前期:大部分是有核上皮细胞,也有少许角化上皮细胞,无白细胞;b;动情期:全部是角化细胞或偶有少许上皮细胞;c;动情后期:有核上皮细胞、白细胞、角化细胞均有;d;动情间期:大部分是白细胞及少许上皮细胞和粘液。

图 1 小鼠动情周期细胞变化

Note. a. Pre-estrus. Most of them are nucleated epithelial cells, but there are a few keratinized epithelial cells, no white blood cells. b. Estrous phase. All keratinocytes or a few epithelial cells occasionally. c. Late estrus. Nucleated epithelial cells, white blood cells and keratinocytes. d. Interestrus phase. Mostly white blood cells and a few epithelial cells and mucus.

Figure 1 Changes of estrous cycle cells in mice

比例正常。模型 A 组和 B 组初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡的比例有所下降,闭锁卵泡有上升趋势,但与正常组比较,初次级卵泡率、成熟卵泡率、闭锁卵泡率差异无显著性($P > 0.05$)。模型 C 组和 D 组卵巢皮质多见黄体 and 闭锁卵泡,少见初级和次级卵泡,成熟卵泡基本未见或个别偶见,与正常组比较,模型 C 组和 D 组初次级卵泡率、成熟卵泡率、闭锁卵泡率差异有显著性($P < 0.01, P < 0.05$),模型 C 组和 D 组之间比较差异无显著性($P > 0.05$) (见图 2,表 2)。

2.4 小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化

正常组、模型 A、B、C、D 组卵巢颗粒细胞凋亡率分别为 8.15%、10.21%、11.18%、35.49%、36.89%。模型组 C 组、D 组颗粒细胞凋亡率明显高于正常组,差异具有显著性($P < 0.05$)。模型 A 组、B 组颗粒细胞凋亡率有升高趋势,但是与正常组比较,差异无显著性($P > 0.05$) (见图 3,表 3)。

2.5 小鼠卵巢透明带的变化

正常组卵巢未见透明带呈现很亮的绿光圈,模型各组卵巢可见明显的透明带绿色荧光,其中模型 C 组、D 组透明带荧光更明显,颜色更亮 (见图 4)。

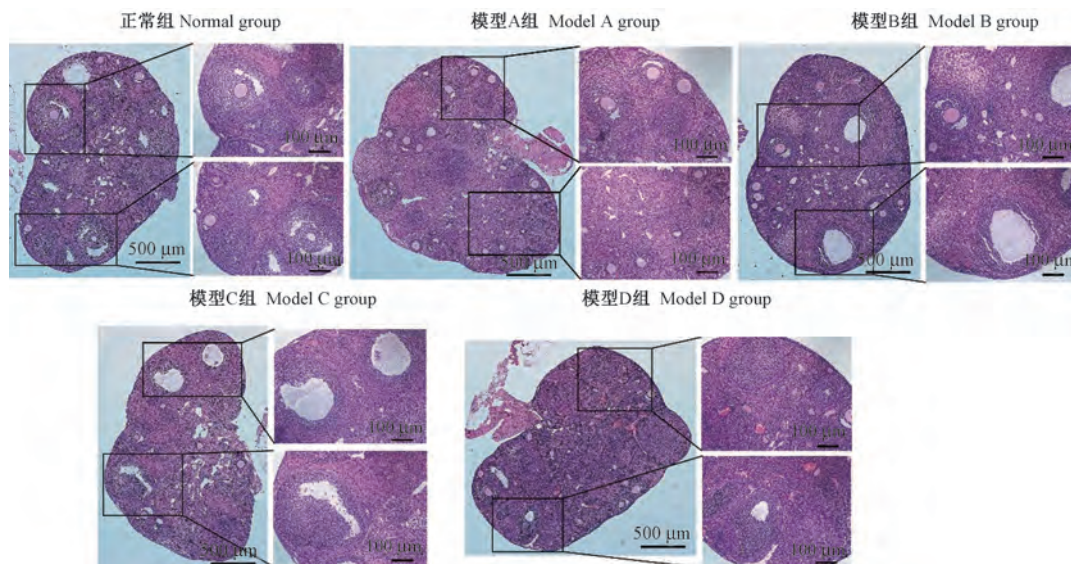
表 1 ZP₃ 致卵巢早衰小鼠血清 E₂、FSH 水平变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Changes of serum E₂ and FSH levels in mice with premature ovarian failure induced by ZP₃ ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	E ₂ (pg/mL)	FSH (mIU/mL)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	33.31 ± 5.21	8.80 ± 1.48
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1 mg/mL TB Primary immunization + 1 mg/mL TB	31.45 ± 10.95	10.27 ± 2.10
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5 mg/mL TB Primary immunization + 5 mg/mL TB	27.63 ± 4.17 *	13.29 ± 4.51 *
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1 mg/mL TB Tertiary immunization + 1 mg/mL TB	23.88 ± 3.68 **	15.31 ± 4.28 **
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5 mg/mL TB Tertiary immunization + 5 mg/mL TB	23.43 ± 5.36 **	12.68 ± 2.13 **

注:与正常组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following tables)



注:卵巢完整组织学结构;卵巢局部组织学结构。

图 2 小鼠卵巢组织形态学的变化

Note. Complete histological structure of ovary. Local histological structure of ovary.

Figure 2 Morphological changes of ovarian tissue in mice

表 2 ZP₃ 致卵巢早衰小鼠卵巢组织形态学变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Morphological changes of ovarian tissue in mice with premature ovarian failure induced by ZP₃($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	初次级卵泡率(%) Primary and secondary follicles rate(%)	成熟卵泡率(%) Mature follicles rate(%)	闭锁卵泡率(%) Occluded follicles rate(%)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	56.24 ± 20.91	5.17 ± 2.95	38.59 ± 18.94
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1 mg/mL TB Primary immunization + 1 mg/mL TB	40.10 ± 19.26	3.48 ± 6.48	56.42 ± 21.99
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5 mg/mL TB Primary immunization + 5 mg/mL TB	36.36 ± 14.28	4.53 ± 4.52	59.11 ± 16.64
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1 mg/mL TB Tertiary immunization + 1 mg/mL TB	28.42 ± 16.10 *	1.39 ± 2.50 *	70.20 ± 15.25 **
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5 mg/mL TB Tertiary immunization + 5 mg/mL TB	32.20 ± 10.11 *	1.39 ± 2.38 *	66.40 ± 10.58 **

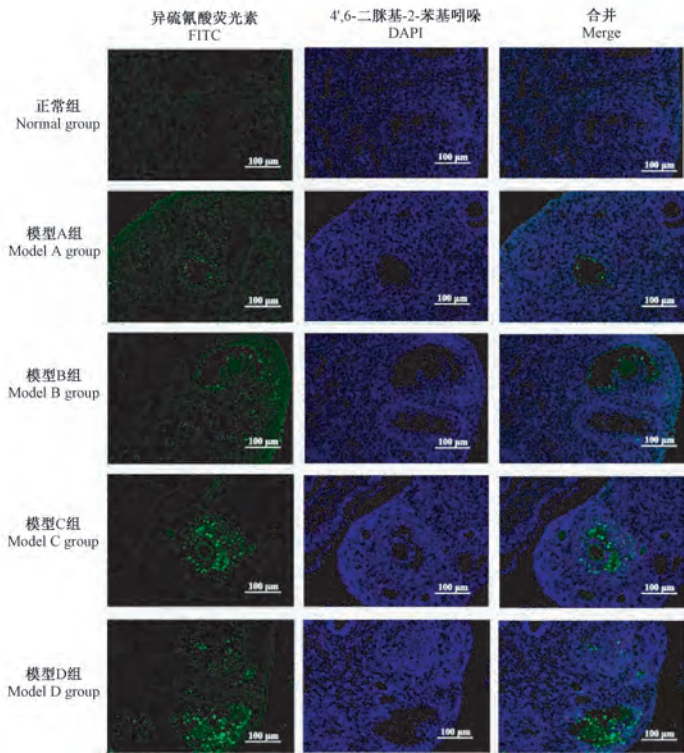
表 3 ZP₃ 致卵巢早衰小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Changes of apoptosis of ovarian granulosa cells in mice with premature ovarian failure induced by ZP₃($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别 Groups	造模方式 Modeling method	凋亡率(%) Apoptosis rate(%)
正常组 Normal group	等量生理盐水 NS	8.15 ± 0.99
模型 A 组 Model A group	1 次免疫 + 1mg/mL TB Primary immunization + 1mg/mL TB	10.21 ± 1.08
模型 B 组 Model B group	1 次免疫 + 5mg/mL TB Primary immunization + 5mg/mL TB	11.18 ± 2.15
模型 C 组 Model C group	3 次免疫 + 1mg/mL TB Tertiary immunization + 1mg/mL TB	35.49 ± 1.93 **
模型 D 组 Model D group	3 次免疫 + 5mg/mL TB Tertiary immunization + 5mg/mL TB	36.89 ± 2.71 **

注:与正常组比, ** $P < 0.01$ 。

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

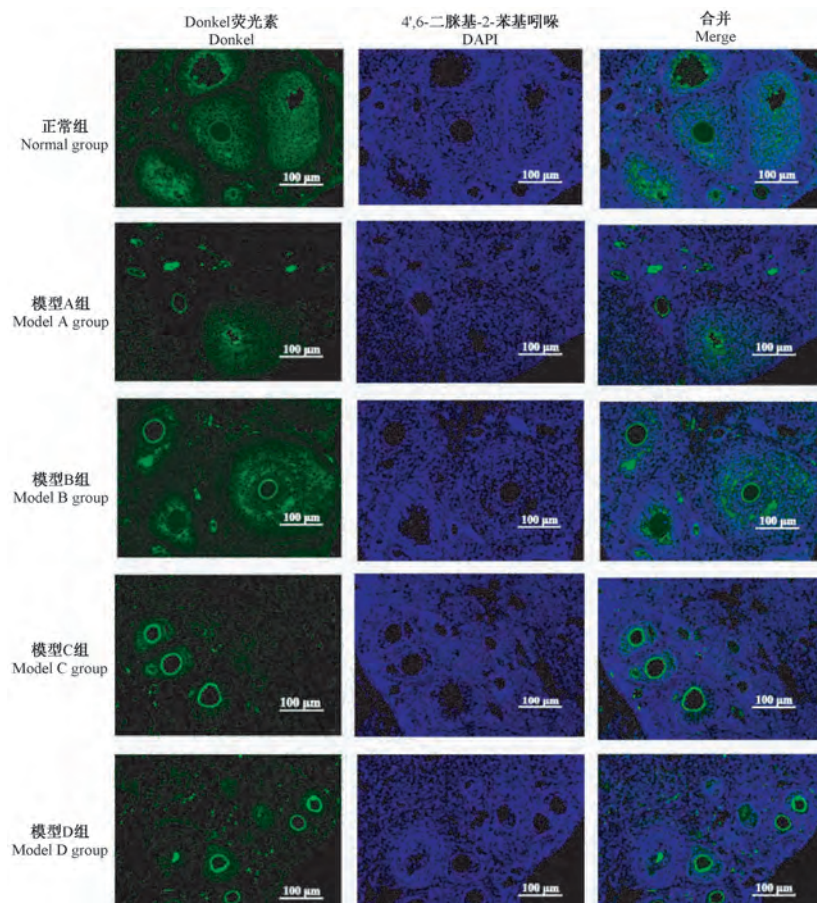


注:荧光 TUNEL 检测卵巢颗粒细胞凋亡;DAPI 染出来的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性凋亡细胞核为绿色。

图 3 小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的变化

Note. Apoptosis of ovarian granulosa cells was detected by fluorescence TUNEL. Under UV excitation, the DAPI-stained nuclei were blue, while the apoptotic nuclei were green.

Figure 3 Changes in apoptosis of mouse ovarian granulosa cells



注:免疫荧光法检测小鼠卵巢组织透明带变化;DAPI 染出来的细胞核在紫外光的激发下为蓝色,阳性表达为 Donkel 荧光素标记的绿光。

图 4 小鼠卵巢组织透明带的变化

Note. The zona pellucida of mice ovary was detected by immunofluorescence assay. The DAPI-stained nuclei were blue under UV excitation and the positive expression was green light labeled with Donkel luciferin.

Figure 4 Changes of zona pellucida in mouse ovarian tissue

3 讨论

随着 POF 临床发病率的上升,寻求有效的 POF 治疗方案,尤其是针对其发病机制的靶向治疗,最终改善其卵巢功能,已成为亟待解决的难题^[12-13]。而对于 POF 基础研究来说,建立一个有效的 POF 动物模型尤为重要。POF 动物模型根据不同的因素有几种不同的造模方式^[14-15],比如直接基因敲除,但是这类动物成本和饲养标准较高。胸腺切除也可导致卵巢早衰,但是手术复杂,在上个世纪有报道,但是近年来不常采用^[16]。半乳糖造模周期很长^[17],雷公藤和环磷酰胺等其他化疗药物造模虽耗时较短^[18],造模药物易获,费用低但同时会带来早衰外的不良反应。

透明带蛋白 ZP₃ 被称作是初级精子受体,它是哺乳动物环绕在卵母细胞的外衣,能够影响卵泡各个发育阶段的透明带的合成,与卵母细胞成熟有直

线相关的关系。用 ZP₃ 蛋白建立的 POF 动物模型与人类卵巢早衰具有相似的生殖内分泌和组织学变化,因此已成为近年来 POF 造模最重要及可靠的方法^[19-20]。通过给予透明带多肽抗原,使动物体内产生抗透明带的抗体,从而建立免疫性卵巢早衰的模型。在建立的过程中,为了加强抗原的免疫效果会用弗氏完全佐剂进行免疫,采用 ZP₃ 多肽抗原作为造模剂是学者的共识,但在弗氏完全佐剂(结核分枝杆菌浓度不同)的选择和免疫干预时间上还不明确,所以本研究组针对不同的造模时间和不同佐剂进行了深入研究。研究发现单次以低浓度结核分枝杆菌的弗氏完全佐剂免疫动物,从血清性激素水平,卵巢病理改变、颗粒细胞的凋亡和透明带抗体变化这几个方面分析,检测结果不符合 POF 模型动物的特点。单次免疫高浓度弗氏完全佐剂后动物血清呈现低雌激素和高促性腺激素的变化,透明带抗体荧光也有出现,但是在卵巢组织病理学和颗粒细胞

凋亡方面与正常组相比变化不明显。高浓度的佐剂虽然增强了免疫的反应,但是免疫细胞并未继续浸润和破坏颗粒细胞,使颗粒细胞层并未继续逐渐减少,所以未见组织病理学和颗粒细胞的改变。因此表明单次免疫不能完全达到 POF 动物模型的要求。由结果可见,在第 1 次 ZP₃ 免疫后继续加强免疫 2 次后,小鼠出现动情周期紊乱、高促性腺激素低雌激素、闭锁卵泡增多、透明带荧光显著、卵巢凋亡细胞增多的现象,这些结果完全符合 POF 模型动物的特征。在同样 3 次免疫的情况下,弗氏完全佐剂里结核分枝杆菌浓度的高低未见显著性的差异。

综上所述,ZP₃ 诱导可以成功建立免疫型卵巢早衰模型,其中以 3 次免疫的成模效果更佳,为今后的研究者构建卵巢早衰模型提供一定的基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Jankowska K. Premature ovarian failure [J]. Menopause Rev, 2017, 16(2): 51-56.
- [2] European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency [J]. Hum Reprod, 2016, 31(5): 926-937.
- [3] 张秀, 鲁雅, 王佩娟. 卵巢早衰的病因研究进展 [J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(1): 118-120.
Zhang X, Lu Y, Wang PJ. Progress of study on pathogenesis of premature ovarian failure [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2017, 19(1): 118-120.
- [4] Słopeń R, Wareńik SA. Premature ovarian failure: diagnosis and treatment [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41(6): 659-661.
- [5] Wang XF, Zhang L, Wu QH, et al. Biological mechanisms of premature ovarian failure caused by psychological stress based on support vector regression [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 21393-21399.
- [6] Yang Y, Huang W, Yuan L. Effects of environment and lifestyle factors on premature ovarian failure [J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1300: 63-111.
- [7] Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, et al. Autoimmune primary ovarian insufficiency [J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4-5): 427-430.
- [8] Ebrahimi M, Akbari AF. The role of autoimmunity in premature ovarian failure [J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(8): 461-472.
- [9] Coulam CB, Ryan RJ. Premature menopause. I. Etiology [J]. Am J Obstet Gynecol, 1979, 133(6): 639-643.
- [10] 朱玲, 罗颂平, 许丽绵, 等. 左归丸对免疫性卵巢早衰小鼠抗卵巢抗体的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(4): 435-438.
Zhu L, Luo SP, Xu LM, et al. Influence of Zuogui pill on antiovarian antibodies in immune premature ovarian failure rats [J]. Modern J Integr Tradit Chin West Med, 2006, 15(4): 435-438.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2006.
Chen Q. Research methodology of pharmacology of traditional Chinese medicine [M]. Beijing: People's Health Publishing House; 2006.
- [12] Dang J, Jin Z, Liu X, et al. Human cord blood mononuclear cell transplantation for the treatment of premature ovarian failure in nude mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 4122-4127.
- [13] Barros F, Carvalho F, Barros A, et al. Premature ovarian insufficiency: clinical orientations for genetic testing and genetic counseling [J]. Porto Biomed J, 2020, 5(3): e62.
- [14] 付莉, 赵怡璇, 李守柔. 卵巢早衰实验动物模型的建立 [J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(3): 179-183.
Fu L, Zhao YX, Li SR. The establishment of the animal model of premature ovarian failure [J]. J Reprod Med, 2006, 15(3): 179-183.
- [15] 苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 等. 三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 725-732.
Su XZ, Liu YF, Kong WJ, et al. Comparison of three methods for the establishment of mouse models of premature ovarian insufficiency [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 725-732.
- [16] Tong ZB, Nelson LM. A mouse gene encoding an oocyte antigen associated with autoimmune premature ovarian failure [J]. Endocrinology, 1999, 140(8): 3720-3726.
- [17] 李洁, 杨菁, 陈媛, 等. D(+) 半乳糖对小鼠卵巢功能影响的实验性研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(12): 98-100.
Li J, Yang J, Chen Y, et al. An experiment study: the effects of ovarian function in mice by D(+) galactose [J]. Chin J Birth Health Hered, 2006, 14(12): 98-100.
- [18] 奚美丽, 鹿欣. 化疗对卵巢功能及生育功能影响研究进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43(4): 412-415.
Xi ML, Lu X. Ovarian dysfunction and fertility preservation in female cancer survivors after chemotherapy: a review [J]. J Int Obstet Gynecol, 2016, 43(4): 412-415.
- [19] Zhang X, Zhang L, Li Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) promotes the recovery of ovarian function in a rat model of premature ovarian failure (POF) [J]. Gynecol Endocrinol, 2021, 37(4): 353-357.
- [20] 张于念, 田海清, 腊晓琳. 免疫性卵巢早衰小鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞及其相关因子变化与 Tim-3 的关系 [J]. 山东医药, 2020, 60(2): 35-38.
Zhang YN, Tian HQ, La XL. Relationships between Tim-3 and CD4⁺ CD25⁺ Treg cells and its related factors in immune premature ovarian failure mice [J]. Shandong Med J, 2020, 60(2): 35-38.

[收稿日期] 2021-03-17

刘朝阳,吴琳琳,田茂生,等. 贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 570-577.

Liu ZY, Wu LL, Tian MS, et al. Experimental study on the adhesion and antioxidant effect of MAP on ulcerative colitis in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 570-577.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.002

贻贝粘蛋白粘附性及抗氧化作用对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究

刘朝阳¹, 吴琳琳¹, 田茂生¹, 张明全¹, 赵娜¹, 高记华^{1,2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 河北中医学院第一附属医院, 石家庄 050011)

【摘要】 目的 观察贻贝粘蛋白(MAP)对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜的影响,从粘附性及抗氧化角度探讨其作用机制。方法 将32只SPF级SD大鼠随机分为正常组、模型组、美沙拉嗪组、贻贝粘蛋白组(0.6 mg/kg),每组8只。正常组予普通饮用水,其余各组以5%葡聚糖硫酸钠(DSS)自由饮水7d制备溃疡性结肠炎模型,造模后24h分别每日给药,观察记录各组大鼠每日疾病活动指数(DAI)、体重变化,给药7d后解剖取材,记录各组大鼠结肠长度、重量、肠重比,行结肠黏膜大体形态(CMDI)与病理组织学观察。取大鼠肠黏膜行体外试验,采取氯化硝基四氮唑蓝(NBT)染色法观察MAP对大鼠肠黏膜粘附性及抗氧化作用的影响。结果 与正常组相比,模型组从实验第5天开始DAI评分明显升高($P < 0.05$),体重下降($P < 0.05$),可见肠黏膜充血、水肿和溃疡形成,以及结肠隐窝肿胀变形,黏膜下组织大量炎细胞浸润;与模型组相比,美沙拉嗪组和贻贝粘蛋白组大鼠体重、结肠长度均增加($P < 0.05$),DAI评分、肠重比、CMDI评分及病理组织学评分均降低($P < 0.05$)。NBT实验中可见大鼠直肠黏膜出现染蓝现象,且随时间延长,染蓝程度进一步加深。结论 MAP通过对肠黏膜良好的粘附及抗氧化作用,能明显改善溃疡性结肠炎模型大鼠症状,修护肠黏膜屏障损伤,可为MAP治疗溃疡性结肠炎提供可靠的实验依据。

【关键词】 贻贝粘蛋白;溃疡性结肠炎;大鼠;粘附性;抗氧化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0570-08

Experimental study on the adhesion and antioxidant effect of MAP on ulcerative colitis in rats

LIU Zhaoyang¹, WU Linlin¹, TIAN Maosheng¹, ZHANG Mingquan¹, ZHAO Na¹, GAO Jihua^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China.

2. the First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011)

Corresponding author: GAO Jihua. E-mail: gaojihua2005@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of mussel adhesive protein(MAP) on the intestinal mucosa of rats with ulcerative colitis, and to explore potential mechanisms from the perspectives of adhesion and antioxidant actions. **Methods** A total of 32 specific pathogen-free grade SD rats were randomly divided into four groups: a normal group, model group, mesalazine group and MAP group (0.6 mg/kg body weight), with eight rats in each group. The normal group was provided ordinary drinking water, whereas the other groups were given 5% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days to induce ulcerative colitis, and daily dosing was started during the 24 h after molding. The disease activity index (DAI)

【基金项目】 国家自然科学基金(82174381),河北省中医药管理局资助项目(2020108),河北中医学院研究生创新能力培养资助项目(XCXZZBS2021019)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82174381), Hebei Province Administration of Traditional Chinese Medicine(2020108), Project of Postgraduate Creativity Training Foundation of Hebei University of Chinese Medicine(XCXZZBS2021019).

【作者简介】 刘朝阳(1993—),女,硕士研究生,研究方向:中医药治疗肛门直肠盆底疾病。Email:419739806@qq.com

【通信作者】 高记华(1964—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药治疗肛门直肠盆底疾病。Email:gaojihua2005@163.com

scores and body weights of the rats in each group were observed and recorded. After 7 days of DSS administration, samples were collected to determine the colorectal length and intestine:body weight ratio for each group, and the histology and gross morphology of the colorectal mucosa were examined. The adhesion and antioxidant effects of MAP on the intestinal mucosa of rats was investigated in vitro by nitro blue tetrazolium chloride (NBT) staining. **Results** Compared with the normal group, the model group showed significantly higher DAI scores ($P < 0.05$) and a decreased body weight ($P < 0.05$) from day 5 onwards, and shorter colorectal length and lower intestinal weight ratio ($P < 0.05$), as well as higher colon mucosal damage index (CMDI) ($P < 0.05$) and pathohistological ($P < 0.05$) scores. Congestion, edema, and ulceration were observed in the colorectal mucosa, as well as swelling and distortion of the colonic crypts and extensive infiltration of inflammatory cells in submucosal tissue. These findings showed that the ulcerative colitis model was successfully established in rats. Compared with the model group, the body weight and colorectal length of rats in the mesalazine and MAP groups were increased ($P < 0.05$), whereas DAI scores, intestinal weight ratio, and CMDI and histopathological scores were decreased ($P < 0.05$). In comparison with the mesalazine group, rats in the MAP group showed similar body weight growth trends and DAI scores, as well as similar levels of intestinal mucosal edema, congestion and inflammatory cell infiltration, indicating that MAP had potentially similar therapeutic effects to those of mesalazine in ulcerative colitis. The NBT staining produced blue histology in the rectal mucosa of rats, and the degree of blue staining increased with time. **Conclusions** Through adhesion and antioxidant effects on intestinal mucosa, MAP can significantly improve the symptoms of dilute stool, blood in stool and weight loss in rats with ulcerative colitis, and repair a damaged intestinal mucosal barrier. Additionally, MAP reduced the congestion and edema of rat rectal mucosa, as well as effectively reduced the infiltration of inflammatory cells, suggesting therapeutic potential for the treatment of ulcerative colitis by MAP.

【Keywords】 MAP; ulcerative colitis; rat; adhesion; antioxidant

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

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性炎症性肠病, 临床表现为持续或反复发作的腹泻、黏液脓血便等症状, 具有病程长、易反复发作的特点^[1-4]。UC 的黏膜炎症从直肠开始, 并以连续的方式向结肠近端延伸, 且炎症通常局限于黏膜层^[1]。研究显示, UC 是一种肠道屏障疾病, 其肠道屏障的功能障碍主要体现在紧密连接的表达变化, 以及在炎症状态下, 黏膜的黏附性下降^[5]。且高浓度自由基水平和抗氧化能力低下为 UC 的主要病因之一, 所以清除氧自由基、抑制过氧化可以预防并治疗溃疡性结肠炎^[6]。目前临床多采用口服药物治疗 UC, 由于 UC 直肠炎症反应致大量肠液分泌及腹泻, 一般外用药难以维持直肠给药的药物治疗浓度, 且以局部治疗为主的直肠给药制剂匮乏, 所以寻找一种粘附性高、具有良好抗氧化作用的直肠给药制剂是解决问题的有效途径。

贻贝粘蛋白 (mussel adhesive protein, MAP) 是海洋贻贝的足丝腺分泌并纯化的大分子蛋白, 该蛋白与高等植物细胞壁中的伸展蛋白相似, 是一种属于糖蛋白类型的粘液蛋白, 具有超强的黏着性能^[7]。MAP 具有搭载高载量正电荷、多巴基团可氧化成膜以及良好疏水性等结构特点, 可形成具有抗氧化能力的纳米级网状微观支架, 从而抑制炎症,

并促进多种细胞贴壁和爬行替代^[8-9]。贻贝足丝蛋白中含有大量的 L-3,4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA), 该基团在碱性和过量甘氨酸作为还原剂的条件下, 可参与发生氧化还原反应。研究显示, 活性氧的代谢产物在 UC 的炎症发生发展过程中具有重要的作用^[10], 超氧阴离子自由基 (O_2^-) 是分子氧的单电子还原产物, 具有较高的反应活性, 极易衰变成活性氧单元^[11]。氯化硝基四氮唑蓝 (nitroretetrazolium blue chloride, NBT) 还原反应常被用于清除 O_2^- 能力大小的检测, 故 NBT 染色法可提示抗氧化作用。本研究旨在探讨 MAP 对溃疡性结肠炎模型大鼠肠黏膜的作用效果, 从粘附性和抗氧化抗炎角度探究其相关的作用机制, 从而为临床治疗 UC 提供科学依据和治疗新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

32 只 8 周龄健康 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 180 ~ 190 g, 来自浙江维通利华实验动物技术有限公司【SCXK (浙) 2020-0002】, 质量合格证号: 20200730Aazz06190009。动物饲养于菲诺克生物科技(上海)有限公司实验动物中心 SPF 级屏障环境

【SYXK(沪)2018-0023】，单笼饲养。饲养室温度(22 ± 3)℃，湿度 40% ~ 70%，灯光 12 h 明暗交替。所有大鼠标准鼠食饲养，自由饮水。所有操作均符合菲诺克生物科技(上海)有限公司实验动物伦理学要求(伦理审批号:phenotek-sh012)。

1.1.2 主要试剂与仪器

葡聚糖硫酸钠(MP Biomedicals, SR01606);美沙拉秦栓(Dr. Falk Pharma GmbH, 190329A);天然贻贝黏蛋白高聚物肛肠敷料(江阴贝瑞森制药有限公司, 20200707-5);空白凝胶基质(江阴贝瑞森制药有限公司, 20200707-1);硝酸纤维素转印膜(Pall Corporation, T70720);固体氢氧化钾(上海麦克林生化科技有限公司, C10285994);甘氨酸(Sigma-Aldrich, SLBR4281V);贻贝粘蛋白(江阴贝瑞森生化技术有限公司, 20012001-R);氯化硝基四氮唑蓝(上海前进试剂厂, 190327);10%福尔马林中性固定液(南昌雨露实验器材有限公司, 190803)

5% DSS 溶液:称取葡聚糖硫酸钠(纯度:100%)80 g,加入 1600 mL 饮用水,搅拌至溶液澄清,常温贮存,每日配置。美沙拉秦:美沙拉秦栓 45℃ 水浴溶化,现用现配;甘氨酸-钾缓冲液(pH=10):称取 75 g 甘氨酸溶解于 400 mL 水中,用固体氢氧化钾(KOH)调节 pH=10,加水定容至 500 mL,配好后 4℃ 保存;NBT 染色液:称取 9 mg NBT 加 15 mL 甘氨酸-钾缓冲液溶解,混匀,临用现配;贻贝粘蛋白溶液:称取 10 mg 贻贝粘蛋白加 10 mL 生理盐水溶解,现用现配。

LeicaASP200 型全自动脱水机(LEICA 公司,德国);Leica RM2245 型半自动切片机(LEICA 公司,德国);Leica ST4040 型全自动染色机(LEICA 公司,德国);Olympus BX53 型光学显微镜(Olympus, 日本);SC180 型图像分析系统(Olympus, 日本);分析天平(常州奥豪斯仪器制造有限公司,中国);HH-1 型数显恒温水浴锅(常州智博瑞仪器制造有限公司,中国);烘箱(上海跃进医疗器械有限公司,中国);D610 型数码相机(尼康映像仪器销售有限公司,日本);培养皿;灌胃针;外科手术器械;1 mL 注射器、2 mL 注射器;比例尺;滤纸。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

根据体重将 32 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组分别为正常组、模型组、美沙拉秦组、贻贝粘蛋白组,每组 8 只。单笼饲养,每只动物在尾部标记

单独的动物号,且每只笼具有笼具标签。

1.2.2 造模

模型组、美沙拉秦组、贻贝粘蛋白组的动物连续 7 d 自由饮用 5%(w/v) DSS 溶液,制备 UC 模型。正常组动物同时予以普通饮用水作为对照。每日通过观测各组大鼠 DAI 评分、体重,监测模型进展情况。

1.2.3 给药

造模 24 h 大鼠经直肠途径局部治疗给药,模型组给予空白凝胶基质,美沙拉秦组予美沙拉秦,贻贝粘蛋白组给予天然贻贝黏蛋白高聚物肛肠敷料,正常组不做任何操作。给药前所有动物麻醉成功后,挤出直肠末端内大便,取仰卧位,以 1 mL 注射器连接灌胃针吸药物,每只大鼠给药 300 μ L,缓慢注入直肠肠腔,灌胃针插入深度约 8 cm,给药时左手捏紧肛门,给药完毕采取头低臀高位放回饲养笼,保持尾部朝上避免药物流出,早晚各 1 次,连续 7 d。

1.2.4 取材

于实验第 8 天各组动物行 CO₂ 安乐处死后,沿大鼠肛周皮毛边缘起 0.5 cm 环形分离肛门,剥离肠管至盲肠根部,测量自然伸展状态下盲肠根部到肛门的结直肠长度,剥离多余的肌肉、脂肪、肠系膜等组织,纵剖全段结直肠,平铺肠管进行结直肠黏膜大体观察评分并拍照记录,生理盐水冲洗干净并用吸水纸拭干,分析天平称重,结肠组织以肛门为中心卷成“瑞士卷”形状,然后浸泡在 10%福尔马林中性固定液中,以供病理组织学观察。

1.2.5 观察指标

(1)体重:实验期间每日同一时间称量所有动物体重并记录。

(2)疾病活动指数(DAI)评分:计算公式:DAI=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3,将每只动物置于无垫料的干净笼内自由排便,待粪便数目 ≥ 5 ,按照表 1 中标准^[12-13],根据所有粪便颗粒硬度和颜色,综合评价大便性状和便血情况。

(3)结直肠长度:测量各组大鼠取材后自然伸展状态下结直肠的长度。

(4)结直肠黏膜大体形态(CMDI)评分:将所有标本进行纵剖,平铺肠管,按表 2 标准^[14-15]进行 CMDI 评分并拍照记录。

(5)结直肠重量与肠重比:所有标本称量湿重,计算肠重比:肠重比=肠重量/肠长度

(6)病理组织学观察:各组标本固定后,逐级乙

醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,常规 HE 染色,光镜下观察组织病理学改变并按表 3 标准^[16]进行评分记录。

(7)体外实验:NBT 法检测 MAP 粘附性及抗氧化作用

取长度 1 cm 的大鼠直肠组织 4 段,纵剖铺平,

黏膜面朝上用大头钉固定于滤纸片上,其中 1 段作为空白对照,其余 3 段分别浸泡于贻贝粘蛋白溶液(1 mg/mL)不同时间(10 s,1 min,10 min),取出后使用生理盐水冲洗表面 3 次,置于生理盐水湿盒,生理盐水湿润滤纸,将湿盒盖好后置于 37℃ 烘箱中烘干 15 h。取出后将滤纸更换成醋酸纤维素膜,将肠

表 1 DAI 评分表

Table 1 DAI Scores

体重下降 Loss of weight	大便性状 Stool consistency	大便隐血/肉眼血便 Bleeding	评分 Score
≤ 1%	正常 Normal	正常(-) Normal	0
5%	非常软但成形 Soft but still formed	隐血(+) Negative hemocult	1
5% ~ 10%	半稀便 Soft	肉眼血便(++) Positive hemocult	2
10% ~ 15%	稀便 Very soft and wet	肉眼血便(+++) Blood traces in stool visible	3
>15%	较重稀便 Watery diarrhea	肉眼血便(>+++) Gross bleeding	4

表 2 CMDI 评分表

Table 2 CMDI scores

结直肠黏膜大体形态表现 Gross morphological manifestations of the colorectal mucosa	评分 Score
正常,无损伤 Normal, no damage	0
轻度充血,水肿,表面光滑,无糜烂损伤 Mild hyperemia, edema, smooth surface, no erosion damage	1
中度充血,水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠粘连 Moderate hyperemia, oedema, coarse granular mucosa, erosion or intestinal adhesions	2
高度充血水肿,黏膜表面有坏死、溃疡形成,溃疡最大纵径< 1 cm,肠壁增厚或表面有坏死及炎症 Highly congested and edematous, with necrosis and ulcer formation on the mucosal surface, maximum longitudinal diameter of ulcer < 1 cm, thickening of the intestinal wall or necrosis and inflammation on the surface	3
在 3 分基础上溃疡最大纵径> 1 cm 或全肠壁坏死 Maximum longitudinal diameter of ulcer >1 cm on a 3-point basis or total bowel wall necrosis	4

表 3 病理组织学评分标准

Table 3 Pathological histology scoring criteria

结直肠组织病理表现 Histopathological manifestations of the colorectum	评分 Score
正常且无炎症细胞浸润 The tissue is normal and not infiltrated by inflammatory cells	0
轻微炎症细胞浸润,黏膜下组织无损伤 Slight inflammatory cell infiltration, no damage to submucosal tissue	1
中度炎症细胞浸润和黏膜下组织被破坏(损伤范围在 10% ~ 25%) Moderate inflammatory cell infiltration and destruction of submucosal tissue(damage ranges from 10% to 25%)	2
明显的炎症细胞浸润,黏膜下组织被破坏,结肠壁增厚(损伤范围在 25% ~ 50%) Significant inflammatory cell infiltration, destruction of submucosal tissue and thickening of the colonic wall(damage ranges from 25% to 50%)	3
严重的炎症细胞浸润,大规模结肠组织损伤(损伤范围 > 50%)和结肠壁增厚 Severe inflammatory cell infiltration, massive colonic tissue damage (>50% damage) with thickening of the colonic wall	4

黏膜面朝下置于培养皿中,加入 NBT 染色液 15 mL,使组织被 NBT 染色液均匀浸没,避光染色 15 min 观察各段组织染色情况并拍照记录。同法,空白组织浸泡生理盐水 15 min。

1.3 统计学分析

各组数据采用 SPSS 25.0 与 GraphPad Prism 8.0 进行数据统计,所有数值采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,符合正态分布采用单因素方差分析,非正态分布采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

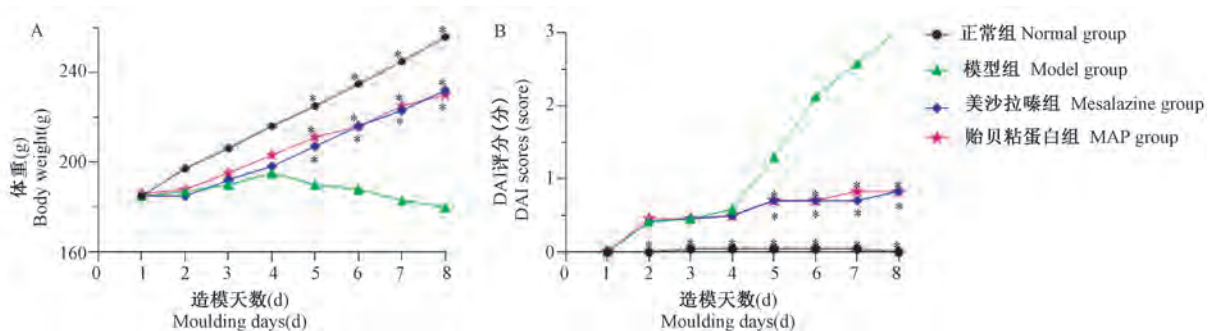
2 结果

2.1 体重与 DAI 评分

正常组大鼠体重呈平稳上升趋势,模型组与正

常组相比,于实验第 5 天出现体重明显下降,差异具有显著性 ($P < 0.05$);与模型组相比,美沙拉嗪组和胎贝粘蛋白组自第 5 天起可见体重呈上升趋势,且差异具有显著性 ($P < 0.05$,图 1A)。

模型组第 3 天可见 5 只大鼠出现稀便;第 4 天所有动物均有稀便且活动减少;部分动物肉眼血便于第 5 天出现,个别反应迟钝;第 6 天部分大鼠出现皮毛不洁,体重下降;第 7 天模型组所有动物出现肉眼血便,个别出现精神萎靡、体重明显下降,模型组与正常组 DAI 评分差异具有显著性 ($P < 0.05$);与模型组相比,美沙拉嗪组和胎贝粘蛋白组各项体征均减轻,DAI 评分明显下降,差异具有显著性 ($P < 0.05$);正常组大鼠无明显变化(图 1B)。



注:A:体重比较;B:DAI 评分比较,与模型组相比,* $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 体重与 DAI 评分

Note. A. Comparison of body weight. B. Comparison of DAI scores. Compared with the model group, * $P < 0.05$. (The same in the following figure)

Figure 1 Body weight and DAI scores

2.2 结直肠解剖数据与黏膜大体形态观察

与正常组相比,模型组结直肠长度缩短、肠重比增加,差异具有显著性 ($P < 0.05$);与模型组相比较,美沙拉嗪组和胎贝粘蛋白组结直肠长度增加、肠重比降低,差异具有显著性 ($P < 0.05$,见图 2A, 2B)。

模型组结直肠黏膜形态观察见肠黏膜高度水肿、充血,部分黏膜粗糙、糜烂,可见多个大小不等溃疡形成,肠壁增厚(图 2D),CMDI 评分高于正常组 ($P < 0.05$,图 2C);与模型组相比,美沙拉嗪组和胎贝粘蛋白组可见结直肠黏膜水肿、充血减轻,偶见黏膜粗糙(图 2D),CMDI 评分均低于模型组,差异具有显著性 ($P < 0.05$,图 2C)。

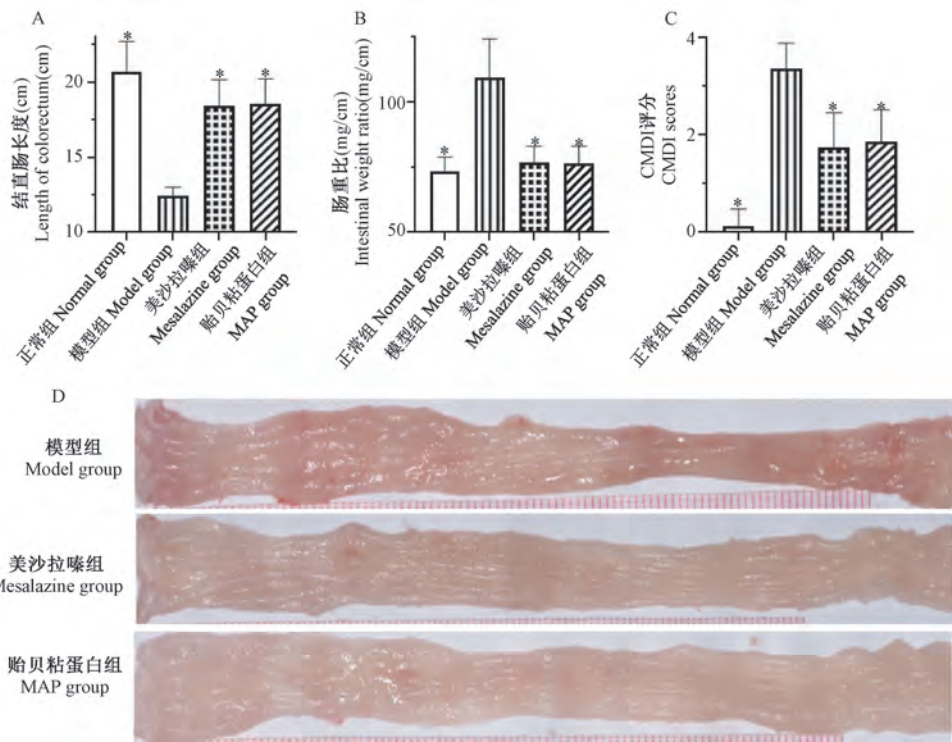
2.3 病理组织学观察

正常组大鼠结直肠黏膜上皮完整,隐窝结构清晰,腺体排列规则,未见炎症细胞浸润,病理组织学评

分为(0.13 ± 0.35)分;模型组大鼠可见结直肠黏膜腺体结构被破坏,结肠隐窝肿胀变形,黏膜下组织大量炎细胞浸润,病理组织学评分为(3.38 ± 0.74)分高于正常组,差异具有显著性 ($P < 0.05$);美沙拉嗪组、胎贝粘蛋白组可见与模型组相似的病理变化,但病变程度较模型组减轻,病理组织学评分为美沙拉嗪组(2.38 ± 0.74)分、胎贝粘蛋白组(2.13 ± 0.64)分,均低于模型组 ($P < 0.05$),且胎贝粘蛋白组可见黏膜上皮轻微至轻度再生(见图 3)。

2.4 体外实验:NBT 法检测 MAP 粘附性及抗氧化作用结果

实验可见空白对照组织无染色;与空白对照组织相比,浸泡 10 s 组织出现染蓝;与浸泡 10 s 组织相比,浸泡 1 min 组织可见染蓝加深;浸泡 10 min 组织可见较浸泡 1 min 组织更加明显的深蓝色(见图 4)。



注：A：结直肠长度比较；B：肠重比较；C：CMDI 评分比较；D：结直肠黏膜大体形态观察。

图 2 结直肠解剖数据与黏膜大体形态观察

Note. A. Comparison of length of colorectum. B. Comparison of intestinal weight ratio. C. Comparison of CMDI scores. D. Observation of gross morphology of colorectal mucosa.

Figure 2 Colorectal anatomical datas and observation of gross morphology of colorectal mucosa

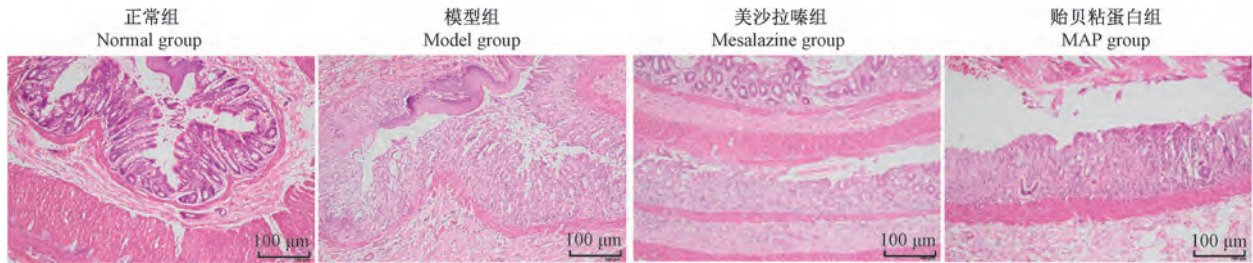


图 3 病理组织学观察

Figure 3 Observation of pathological histological

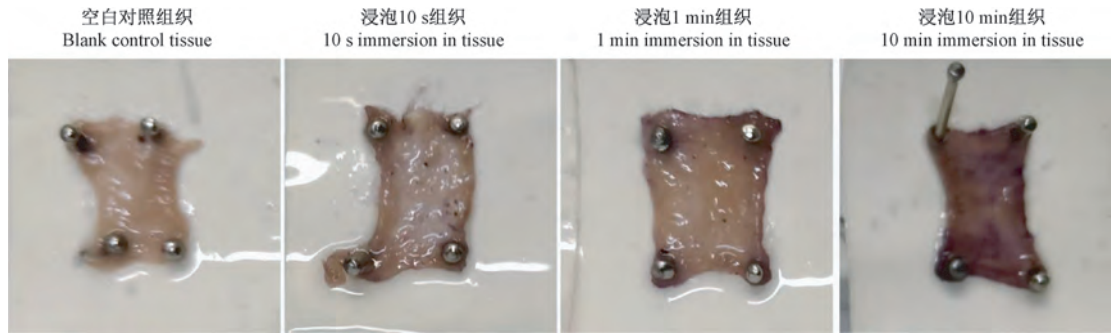


图 4 MAP 对直肠黏膜粘附及抗氧化作用观察

Figure 4 Observations on the adhesion and antioxidant effects of MAP on rectal mucosa

3 讨论

据统计,我国 UC 的发病率呈逐年上升趋势,且多发于青壮年,并存在一定癌变的危险性^[17-18]。在 UC 的发病过程中,氧化应激可导致肠道黏膜生物屏障被破坏,造成机体炎症性损伤^[1,19]。MAP 良好的粘附性可利于肠黏膜黏液层的重建、修护黏膜屏障,还能减少持续的炎性刺激黏膜上皮细胞、使屏障功能得以恢复^[6,20-22],故在本研究与模型组相比,贻贝粘蛋白组大鼠可见体重明显增加、稀便和便血症状明显改善,肠黏膜水肿及充血明显减轻。

生物体系中具有抗氧化能力的物质能有效抵御氧化应激的有害损伤,从而发挥抗炎作用^[23]。在前期评价 MAP 抗氧化及清除自由基能力的研究显示^[24],MAP 对于 DPPH·自由基的清除范围为 4.59% ~ 91.06%;MAP 对 ABTS·+ 的清除率为 13.26% ~ 93.77%;FRAP 法中随着 MAP 浓度的变化其还原能力值范围为 0.153FRAP 值到 1.825FRAP 值。贻贝足丝蛋白中 DOPA 基团在碱性和过量甘氨酸作为还原剂的条件下,与 NBT 可氧化还原生成不溶性的蓝紫色结晶甲臌,于本研究体外实验中可见肠黏膜染色为不同程度蓝紫色,表明 MAP 粘附于大鼠肠黏膜可发生氧化还原反应,且呈现一定的时间相关性,由此可见,MAP 能够有效清除超氧阴离子、抑制过氧化,具有良好的抗炎作用,故本研究病理组织学观察中可见贻贝粘蛋白组大鼠炎细胞浸润程度较模型组明显减轻,与前期研究所得 MAP 具有良好抗氧化活性能力的结论相符。

美沙拉嗪属氨基水杨酸类药物,作为一种非甾体类抗炎药,可通过抑制前列腺素的合成以及炎症介质白三烯的形成,产生抑制肠黏膜炎性反应的作用^[25]。与美沙拉嗪组相比,贻贝粘蛋白组大鼠可见与其相似的体重增长趋势和 DAI 评分,且肠黏膜水肿、充血及炎细胞浸润程度均十分相近,可见 MAP 具有与美沙拉嗪对 UC 所相近的治疗作用。MAP 良好的粘附性使其在直肠可维持药物的治疗浓度,且直肠黏膜为相当稳定的物理化学和酶环境,可避免部分肝首过效应,以直肠给药方式还可避免口服治疗的不良反应^[26]。MAP 具有粘附范围广、对粘附面的要求低等特点,临床中对促进慢性溃疡愈合及促进细胞的粘附等均具有良好效果^[27-29],已被广泛应用于医学领域。

本研究通过建立 UC 大鼠模型,观察 MAP 对溃

瘍性结肠炎模型大鼠症状的改善作用,并取得了确切疗效,其作用机制为 MAP 具有良好粘附性和抗氧化能力,在直肠局部可维持药物的治疗浓度,不仅能修护肠黏膜屏障功能,还可以清除自由基减轻炎症,从而减轻肠黏膜屏障损伤,发挥修复肠黏膜的作用,为临床开发局部治疗的直肠给药制剂治疗 UC 提供新思路。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6(1): 74.
- [2] 吴开春, 梁洁, 冉志华, 等. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2018 年·北京) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 796-813.
Wu KC, Liang J, Ran ZH, et al. Chinese consensus on diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease (Beijing·2018) [J]. Chin J Practical Int Med, 2018, 38(9): 796-813.
- [3] Miyamoto S, Naruse H, Sakamoto N. Budesonide foam for prevention of rectal stricture following endoscopic submucosal dissection [J]. Digest Endo, 2019, 31(5): 588.
- [4] Beasley R, Holliday M, Reddel HK, et al. Controlled trial of budesonide-formoterol as needed for mild asthma [J]. N Engl J Med, 2019, 380(21): 2020-2030.
- [5] Spalinger MR, Atrott K, Baebler K, et al. Administration of the hyper-immune bovine colostrum extract IMM-124E ameliorates experimental murine colitis [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(6): 785-797.
- [6] Tahan G, Gramignoli R, Marongiu F, et al. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats [J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(3): 715-720.
- [7] 高敏, 张长虹, 周俊, 等. 贻贝粘蛋白综述 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 19860-19862.
Gao M, Zhang CH, Zhou J, et al. A review of mussel mucin [J]. J Anhui Agri Sci, 2011, 39(32): 19860-19862.
- [8] Waite JH, Tanzer ML. Polyphenolic substance of mytilus edulis: novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline [J]. Sci, 1981, 212(4498): 1038-1040.
- [9] Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, et al. Mussel-inspired adhesives and coatings [J]. Annu Rev Mater Res, 2011, 41(1): 99-132.
- [10] Jubeht TT, Nadler MM, Barenholz Y, et al. Local treatment of experimental colitis in the rat by negatively charged liposomes of catalase, TMN and SOD [J]. J Drug Target, 2006, 14(3): 155-163.
- [11] 刘瑞恒, 付时雨, 詹怀宇. 氯化硝基四氮唑蓝显色检测超氧阴离子自由基的研究 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(4): 355-359.
Liu RH, Fu SY, Zhan HY. Spectrophotometric determination of superoxide anion radical with nitroblue tetrazolium [J]. J Instr Anal, 2008, 27(4): 355-359.

- [12] Liu XW, He HY, Huang TT, et al. Tanshinone IIA Protects against dextran sulfate sodium- (DSS-) induced colitis in mice by modulation of neutrophil infiltration and activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 7916763.
- [13] Fu JX, Wei B, Wen T, et al. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(4): 1657-1666.
- [14] Ekström GM. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1998, 33(2): 174-179.
- [15] 李茹柳, 迟莉, 郭文峰, 等. 白术黄芪汤单药提取部位组方对不同病变阶段大鼠溃疡性结肠炎的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(2): 209-212.
- Li RL, Chi L, Guo WF, et al. Effects of a single extracted part of Bai Zhu Huang Qi Tang on ulcerative colitis in rats at different stages of lesions [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2008, 33(2): 209-212.
- [16] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(2): 423-433.
- He YP, Du ZC, Hou XT, et al. Advances in the study of animal models of ulcerative colitis [J]. *Modernization Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2020, 22(2): 423-433.
- [17] Zhai H, Liu A, Huang W, et al. Increasing rate of inflammatory bowel disease: a 12-year retrospective study in NingXia, China [J]. *BMC Gastroenterol*, 2016, 16: 2.
- [18] Yu Q, Mao R, Lian L, et al. Surgical management of inflammatory bowel disease in China: a systematic review of two decades [J]. *Intest Res*, 2016, 14(4): 322-332.
- [19] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142-146.
- Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142-146.
- [20] Shah SC, Colombel JF, Sands BE, et al. Mucosal healing is associated with improved long-term outcomes of patients with ulcerative colitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 14(9): 1245-1255.
- [21] Liu ZQ, Jiang M, Zhao JM, et al. Efficacy of a wound-dressing biomaterial on prevention of postinflammatory hyperpigmentation after suction blister epidermal grafting in stable vitiligo patients: a controlled assessor-blinded clinical study with *in vitro* bioactivity investigation [J]. *Arch Dermat Res*, 2020, 312(9): 635-645.
- [22] Zhang F, Xie GX, Pan JS. Tunable adsorption and film formation of mussel adhesive protein by potential control [J]. *Langmuir*, 2017, 33(35): 8749-8756.
- [23] 马小媛, 钱卫平. 抗氧化能力评价方法 [J]. *化学进展*, 2011, 23(8): 1737-1746.
- Ma XT, Qian WP. Methods to determine antioxidant capacity [J]. *Pro Chem*, 2011, 23(8): 1737-1746.
- [24] 闭静秀, 何利中, 高敏. 贻贝粘蛋白氧化交联特性研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(55): 66-67, 69.
- Bi JX, He LZ, Gao M. Oxidative cross-linking properties of mussel adhesive protein [J]. *World Latest Med Inform*, 2018, 18(55): 66-67, 69.
- [25] 王丽梅, 相祎, 吴颖, 等. 甘露聚糖肽联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的临床效果 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(33): 89-92, 97.
- Wang LM, Xiang W, Wu Y, et al. Clinical efficacy of Mannatide combined with Mesalazine in the treatment of ulcerative colitis [J]. *Chin Med Herald*, 2018, 15(33): 89-92, 97.
- [26] Mélanie M, Rute N, Bruno S, et al. Rectal administration of nanosystems: from drug delivery to diagnostics [J]. *Mater Today Chem*, 2018, 10: 128-141.
- [27] 殷雨林, 邓建华, 王小磊. 贻贝粘蛋白纤维素敷料用于慢性溃疡临床观察 [J]. *智慧健康*, 2017, 3(10): 79-80, 89.
- Yin YL, Deng JH, Wang XL. The clinical observation of mussel adhesive protein cellulose dressing for chronic ulcer [J]. *Smart Healthcare*, 2017, 3(10): 79-80, 89.
- [28] Kang TY, Lee JH, Kim BJ, et al. *In vivo* endothelialization of tubular vascular grafts through in situ recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins [J]. *Biofabrication*, 2015, 7(1): 015007.
- [29] Wang Y, Lan HL, Yin TY, et al. Covalent immobilization of biomolecules on stent materials through mussel adhesive protein coating to form biofunctional films [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 106: 110187.

[收稿日期] 2021-03-09

李倩,李玲玲,李爽,等. 脊髓 A1 型星形胶质细胞在外周炎性痛中的动态变化 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 578-584.

Li Q, Li LL, Li S, et al. Changes in spinal A1 astrocyte polarization during peripheral inflammatory pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 578-584.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.003

脊髓 A1 型星形胶质细胞在外周炎性痛中的动态变化

李倩,李玲玲,李爽,黄楚天,周君梅*

(上海市儿童医院,上海交通大学附属儿童医院中心实验室,上海 200040)

【摘要】 目的 研究外周炎性痛小鼠痛行为以及脊髓 A1 型星形胶质细胞的动态变化,为阐明炎性痛的病理机制提供实验基础及理论依据。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠 16 只,分为对照组 8 只和炎性痛组 8 只。小鼠右侧足底注射完全弗氏佐剂(CFA)建立外周炎性痛模型,对照组右侧足底注射相同体积生理盐水。在造模前以及造模后第 1、3、5、7 天检测小鼠机械刺激缩足阈值(MWT)和辐射热刺激缩爪潜伏期(PWL)的变化。以逆转录聚合酶链反应检测 A1、A2 型星形胶质细胞标志物在炎性痛不同时程脊髓内的动态表达变化。用免疫荧光法检测小鼠脊髓背角 GFAP 形态以明确星形胶质细胞激活,同时统计脊髓背角 A1 型星形胶质细胞标志物 C3 与 GFAP 共定位水平。**结果** 炎性痛小鼠造模后患侧 MWT、PWL 均明显下降,小鼠出现机械性痛觉超敏与热痛觉过敏;且在造模后第 3 天,脊髓背角 GFAP 表达开始升高,表达量为 1.84 ± 0.10 vs 1.08 ± 0.22 ($P < 0.05$);炎性痛第 7 天,A1 型星形胶质细胞标志物 Serpin1、H2-T23 的 mRNA 水平均显著升高 ($P < 0.05$),A2 型星形胶质细胞标志物 S100a10、Ptx3 的 mRNA 水平降低 ($P < 0.05$);炎性痛组小鼠脊髓背角星形胶质细胞内 C3 的表达增加 ($P < 0.05$)。**结论** 炎性痛小鼠脊髓反应性星形胶质细胞向 A1 型极化增加,提示 A1 型星形胶质细胞可能参与了炎性痛的发生发展。

【关键词】 炎性痛;A1 型星形胶质细胞;反应性星形胶质细胞;脊髓;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0578-07

Changes in spinal A1 astrocyte polarization during peripheral inflammatory pain

LI Qian, LI Lingling, LI Shuang, HUANG Chutian, ZHOU Junmei*

(Department of Central Laboratory, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

Corresponding author: ZHOU Junmei. E-mail: zhoujm@shchildren.com.cn

【Abstract】 Objective Chronic inflammatory pain is a common disease that severely disrupts the quality of life of patients. The latest research shows that reactive astrocytes can be polarized to two different phenotypes, A1 and A2 astrocytes. Type A1 astrocytes can secrete pro-inflammatory cytokines and promote neuroinflammation, and type A2 astrocytes can secrete neurotrophic factors and promote tissue repair. This paper aimed to study pain behavior and changes to A1 astrocytes in the spinal cord of mice with peripheral inflammatory pain, to elucidate the pathological mechanisms of peripheral inflammatory pain. **Methods** A total of 16 male C57BL/6 mice were divided into the control group and inflammatory pain group (eight mice per group). The inflammatory pain model was established by injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the plantar surface of the right hind paw. The control group were injected with an equivalent volume of saline. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and the radiant heat stimulating paw withdrawal latency

【基金项目】 国家自然科学基金(81500946)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81500946).

【作者简介】 李倩(1985—),女,副研究员,博士,研究方向:神经生物学。Email:liq2024@shchildren.com.cn

【通信作者】 周君梅(1972—),女,研究员,博士,研究方向:生物学。Email:zhoujm@shchildren.com.cn

(PWL) of mice were measured before and 1, 3, 5 and 7 days after the CFA injection. Reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the expression of A1 and A2 astrocyte markers. Immunohistochemistry was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the spinal dorsal horn to identify the process of astrocyte activation. Finally, the co-localization of A1 astrocyte marker C3 and GFAP in the spinal dorsal horn was detected. **Results** The ipsilateral MWT and PWL had both significantly decreased after CFA injection, indicating that the mice developed mechanical hyperalgesia and thermal hyperalgesia. At the third day after CFA injection, the expression levels of spinal GFAP were significantly increased compared to the day 0 (D0) group (1.84 ± 0.10 vs. 1.08 ± 0.22 , respectively, $P < 0.05$). On the 7th day after CFA injection, the mRNA levels of A1 astrocyte markers *Serp1* and *Lcn2* were increased vs. the D0 group ($P < 0.05$), and mRNA levels of A2 astrocyte markers *S100a10* and *Ptx3* were decreased vs. the D0 group ($P < 0.05$). The co-expression of C3 and GFAP in the spinal dorsal horn was increased in the CFA vs. D0 group ($P < 0.05$). **Conclusions** The reactive astrocytes in the spinal dorsal horn of mice with inflammatory pain were polarized to type A1, suggesting that A1 astrocytes may be involved in the development of inflammatory pain.

【Keywords】 inflammatory pain; A1 astrocyte; reactive astrocyte; spinal cord; mice

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

外周炎性痛是外周局部组织炎性病变或损伤时引起的疼痛不适^[1]。长期的炎性痛限制肢体活动、干扰患者情绪,严重影响患者生活质量。

炎性痛的神经机制复杂,外周伤害性信号沿感觉传入神经持续传入中枢,可使脊髓内产生以胶质细胞激活、促炎性细胞因子升高为特征的神经炎症反应,引起神经元敏化,疼痛信号级联放大,导致感觉超敏与痛觉过敏等异常^[2]。星形胶质细胞作为中枢神经系统内数量最多的一类细胞,对神经炎症的发生发展至关重要。当外周受到伤害性刺激时,脊髓星形胶质细胞可被激活,数量增生、形态肥大,称为反应性星形胶质细胞^[3]。最新研究表明反应性星形胶质细胞可向 A1 和 A2 两种不同的表型极化,A1 型星形胶质细胞可分泌促炎性细胞因子,诱导神经炎症以及神经元功能损害,具有神经毒性;A2 星形胶质细胞可分泌神经营养因子,促进神经元和组织修复,具有神经保护性^[4]。但在外周炎症导致的炎性痛过程中,脊髓 A1、A2 两种反应性星形胶质细胞的动态变化,尚不清楚。本研究旨在探讨脊髓 A1、A2 型星形胶质细胞在炎性痛小鼠脊髓中的动态变化,为进一步阐明外周炎性痛的机制提供可能线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

34 只 6 ~ 8 周龄成年雄性清洁级 C57BL/6 小鼠,体重 25 ~ 30 g,由上海灵畅生物科技有限公司提供【SCXK(沪)2018-0003】。实验动物由上海交通大学实验动物科学部饲养【SCXK(沪)2018-0021】,昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃。

所有操作均符合上海交通大学附属儿童医院实验动物管理及伦理委员会要求(审批号:LLSC2020074)。

1.1.2 主要试剂与仪器

CFA (F5881-10 mL, Sigma); GFAP 抗体 (MAB360, MERCK); C3 抗体 (ab200999, Abcam); FITC-donkey anti mouse 抗体 (715-095-150, Jackson); Cy3-donkey anti rabbit 抗体 (711-165-152, Jackson)。von Frey 弗莱毛 (Stoelting, 美国); IITC 热辐射痛觉测量仪 (Life Science Instruments, 美国); ND2000 自动分光光度计 (Thermo, 美国); 荧光实时定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 激光共聚焦显微镜 (Leica, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立

外周炎性痛小鼠模型制备:抓取小鼠右后爪,足底注射完全弗氏佐剂 20 μ L。对照组小鼠足底注射相同体积的生理盐水。

1.2.2 动物分组与给药方法

将 16 只小鼠随机分为足底炎性痛组 (CFA 组) 和对照组 (Saline 组),每组 8 只。

1.2.3 行为学实验

分别在造模前 1 d、造模后第 1、3、5、7 天测定小鼠的机械刺激缩足阈值 (mechanical withdraw threshold, MWT) 和辐射热刺激缩爪潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL)。MWT 具体方法如下:将动物放在铺有铁丝网的塑料笼中,并在测试前连续 2 ~ 3 d 使其适应。在测试日,将小鼠置于笼中适应至少 30 min。然后,在测试过程中使用 von Frey 弗莱毛 (0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0 和 1.4 g) 垂直刺激后爪的足底正中。采用 Dixon 介绍的 Up-and-Down 法计算小鼠的 50% MWT^[5]。PWL 具

体方法如下:将小鼠分别放置在铺有玻璃板的透明塑料笼中,连续 2 ~ 3 d 的适应期。在测试前 1 d 禁水,测试当天适应至少 30 min 后,将辐射热隔玻璃板施加到后爪足底表面,直到小鼠将其爪子从玻璃板上抬起。缩爪潜伏期为从施加辐射热开始到小鼠缩爪的时间,截止时间设置为 20 s^[6]。

1.2.4 用免疫荧光法测定脊髓 GFAP、C3 表达

分别在造模前以及造模后第 7 天各取材 3 只小鼠,采用 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后灌流固定取材,取脊髓腰膨大段组织,经 20% 及 30%蔗糖梯度脱水沉底后,进行冰冻切片。脊髓切片采用漂片法进行免疫荧光染色,依次进行封闭、一抗孵育 4℃ 过夜(抗 GFAP 一抗 1:800,抗 C3 一抗 1:200)、漂洗、荧光二抗 37℃ 孵育 1 h(FITC 或 Cy3 标记的二抗 1:300)、封片,激光共聚焦显微镜观察采集结果。

1.2.5 用 RT-PCR 法检测星形胶质细胞标志物表达

分别在造模前以及造模后第 1、3、7 天,每个时间点取材 3 只小鼠,采用 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后新鲜取材脊髓腰膨大段组织,采用 RNA 提取试剂盒提取脊髓组织的总 RNA。用分光光度计检测 RNA 浓度,取 RNA 1 μg 采用逆转录实验将 RNA 逆转录成 cDNA。

PCR 引物: GFAP 上游引物 5'-CACCTACAGGAAATTGCTGGAGG-3',下游引物 5'-CCACGATGTTCTCTTGAGGTG-3'; Lcn2 上游引物 5'-ATGTCACCTCCATCCTGGTCAG-3',下游引物 5'-GCCACTTGACATTTGTAGCTCTG-3'; Serping1 上游引物 5'-TTGCCTGTGTCCACCAAGCACT-3',下游引物 5'-GCTGCTTCATACAGGCTCTGA-3'; H2-T23 上游引物 5'-GTGGCTCCATAGATACCTACGG-3',下游引物 5'-GGTGATGTCAGCAGGGTAGAAG-3'; S100a10 上游引物 5'-GACAAAGGAGGACCTGAGAGTG-3',下游引物 5'-CTCTGGAAGCCCACTTTGCCAT-3'; Ptx3 上游引物 5'-CGAAATAGACAATGGACTTCATCC-3',下游引物 5'-CATCTGCGAGTTCTCCAGCATG-3'。按照说明书,PCR 反应体系中加入上下游引物,逆转录产物 cDNA,以 SYBR Green 作为荧光标记物,进行实时定量 PCR 反应。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示靶基因的表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量资料以平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,行为学数据分析采用双因素方差分析,分子实验数据采用 *t* 检验或

单因素方差分析,组间多重比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 CFA 炎性痛小鼠行为学变化

使用雄性 C57BL/6 小鼠成功建立了 CFA 炎性痛小鼠模型。造模前 CFA 组与对照组小鼠 MWT 分别为(0.78 ± 0.06),(0.76 ± 0.04),二者无统计学差异($P > 0.05$)。造模后第 7 天,CFA 组与对照组小鼠 MWT 分别为(0.24 ± 0.06),(0.74 ± 0.07)。与对照组相比,CFA 组 MWT 在造模后第 1、3、5、7 天均具有显著性差异($P < 0.05$)。而对照组造模前以及造模后各时间点均无显著性差异($P > 0.05$)(见图 1A)。

造模前 CFA 组与对照组 PWL 分别为(10.16 ± 0.58),(10.33 ± 1.01),二者无统计学差异($P > 0.05$)。造模后第 1 天 CFA 组小鼠造模侧 PWL 显著下降,造模后第 7 天,CFA 组与对照组 PWL 分别为(3.59 ± 0.58),(10.36 ± 0.81)。与对照组相比,CFA 组 PWL 在造模后第 1、3、5、7 天均具有显著性差异($P < 0.05$)。而对照组各时间点均无显著性差异($P > 0.05$)(见图 1B)。

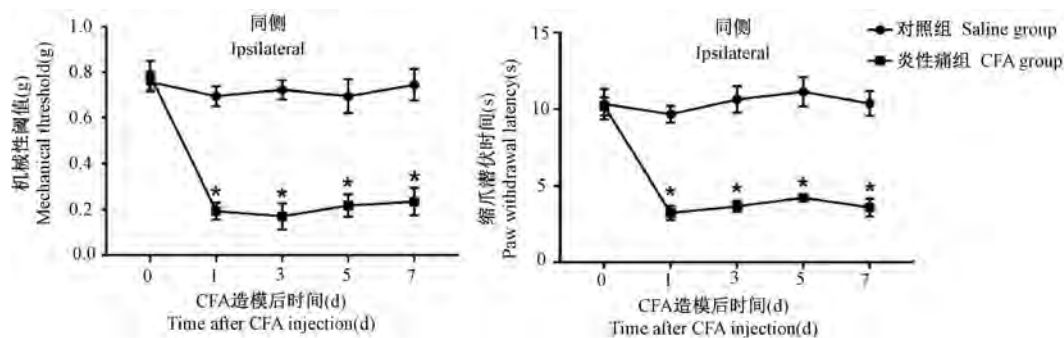
2.2 CFA 炎性痛小鼠脊髓星形胶质细胞激活过程

RT-PCR 实验发现,与造模前相比,CFA 炎性痛造模后第 3 天脊髓内反应性星形胶质细胞标志物 GFAP、Lcn2 的 mRNA 相对表达水平分别为(1.84 ± 0.10),(4.64 ± 0.61),较造模前升高($P < 0.05$),造模后第 7 天,GFAP、Lcn2 的 mRNA 相对表达水平分别为(2.05 ± 0.20),(5.43 ± 0.34),与造模前相比具有显著性差异($P < 0.05$)(见图 2)。表明 CFA 炎性痛小鼠脊髓星形胶质细胞激活。

免疫荧光实验发现,与造模前相比,CFA 组造模后第 7 天脊髓背角 GFAP 信号水平显著升高,可以看到星形胶质细胞数量增多、形态肥大(见图 3)。

2.3 CFA 炎性痛小鼠脊髓 A1、A2 型星形胶质细胞标志物表达变化

RT-PCR 实验发现,CFA 组造模后第 7 天脊髓内 A1 型星形胶质细胞标志物 Serping1、H2-T23 的 mRNA 相对表达水平分别为(2.54 ± 0.12),(2.31 ± 0.12),与造模前 D_0 相比有显著升高($P < 0.05$,见图 4A,4B)。A2 型星形胶质细胞极化标志物 S100a10、Ptx3 的 mRNA 相对表达水平明显下降,且在造模后第 7 天分别为(0.57 ± 0.15),(0.40 ± 0.04),较造模前均有显著差异($P < 0.05$,见图 4C,4D),提示 CFA 炎性痛小鼠脊髓反应性星形胶质细胞向 A1 亚型极化。

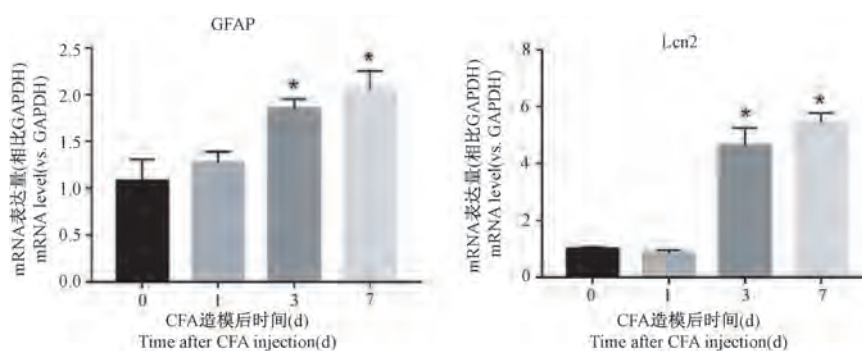


注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图1 CFA 炎性痛小鼠机械刺激缩足阈值(MWT)和辐射热刺激缩爪潜伏期(PWL)变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. Compared with Saline group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Time course of the mechanical withdraw threshold(MWT)and the paw withdrawal latency(PWL)in mice treated with CFA or saline($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

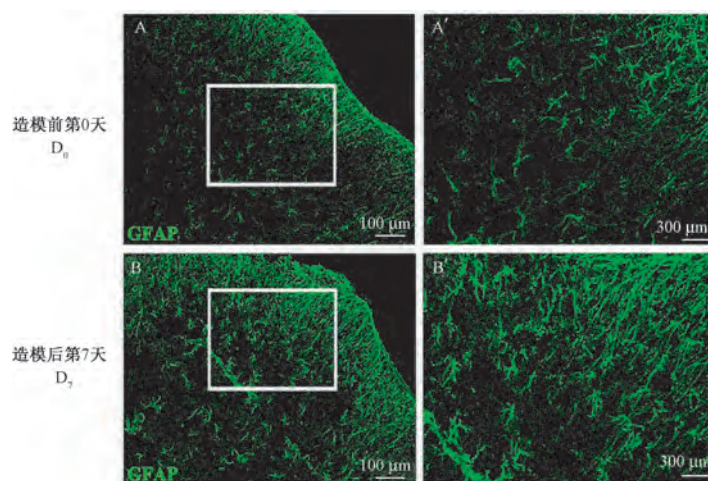


注:与造模前相比, * $P < 0.05$ 。(下图同)

图2 CFA 炎性痛小鼠脊髓反应性星形胶质细胞标志物 GFAP、Lcn2 表达变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Note. Compared with D_0 , * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 2 RT-PCR analysis showing the time courses in expression changes of the GFAP and Lcn2 in the spinal cord of CFA-treated mice($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注:A', B': A、B 框内局部放大图片。

图3 CFA 炎性痛小鼠造模前及造模后第7天脊髓背角 GFAP 表达($n=3$)

Note. A', B'. Partially enlarged picture of A and B.

Figure 3 Confocal images show the GFAP immunoreactivity in the ipsilateral spinal dorsal horn of CFA-treated mice before and 7 days after CFA injection($n=3$)

2.4 A1 型星形胶质细胞标志物 C3 的表达

免疫荧光实验发现,CFA 组在造模后第 7 天脊髓背角内 A1 型星形胶质细胞标志物 C3 相对荧光

强度为(1.74 ± 0.08),C3 与 GFAP 的共定位信号相对荧光强度为(4.46 ± 0.38),水平较造模前显著升高($P < 0.05$,见图 5)。

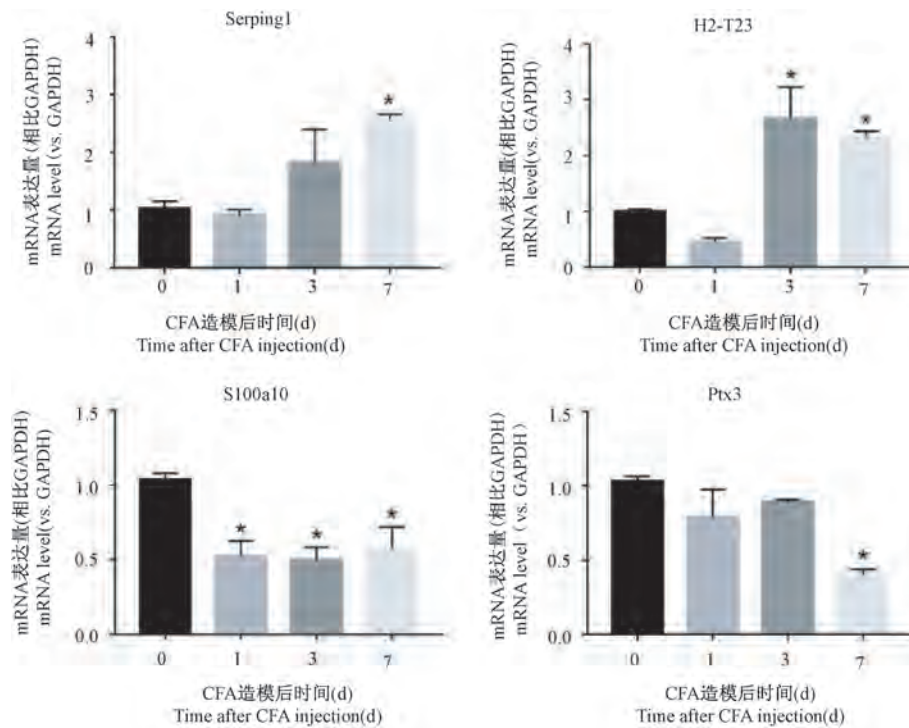
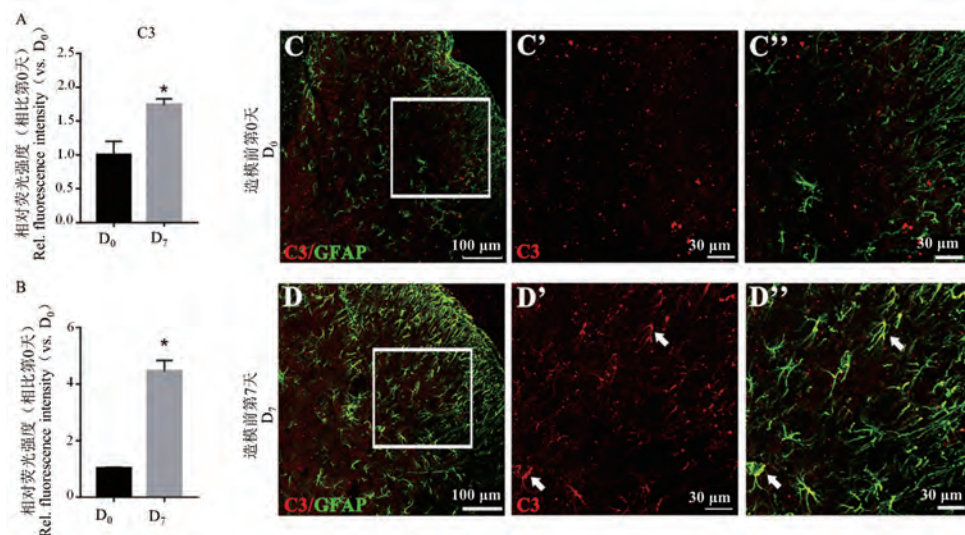


图 4 CFA 炎性痛小鼠脊髓 A1 型星形胶质细胞标志物 Serping1、H2-T23 以及 A2 型星形胶质细胞标志物 S100a10、Ptx3 表达变化($\bar{x} \pm s \bar{x}$, $n=3$)

Figure 4 RT-PCR analysis showing the time courses in expression changes of the A1 astrocyte maker Serping1, H2-T23 and the A2 astrocyte maker S100a10, Ptx3 in the spinal cord of CFA-treated mice($\bar{x} \pm s \bar{x}$, $n=3$)



注:C', D':C, D框内局部放大 C3 信号;C', D':C, D框内局部放大图片。

图 5 CFA 炎性痛小鼠造模前与造模后第 7 天脊髓背角 A1 型星形胶质细胞标志物 C3 表达以及 GFAP 共标变化($\bar{x} \pm s \bar{x}$, $n=3$)

Note. C', D'. Locally amplified C3 signal in frame C and D. C', D'. Locally enlarged picture in frame C and D.

Figure 5 Confocal images show the GFAP immunoreactivity (green) and C3 (red) in the ipsilateral spinal cord dorsal horn of CFA-treated mice at D0 and D7 after injection($\bar{x} \pm s \bar{x}$, $n=3$)

3 讨论

外周炎性痛是最常见的临床症状之一,常伴发于局部损伤以及关节肌肉炎症等病理过程,持续存在的炎性痛,可干扰患者情绪,继发新的精神疾病^[7]。CFA 诱导的足底炎性痛具有造模简单、行为学稳定等优点,且疼痛持续时间可长达 2 月,是被广泛使用的炎性痛模型^[8]。本研究发现,小鼠 CFA 注射后 1 d,注射区域即出现明显充血、肿胀,在造模后第 1、3、5、7 天,造模侧 PWL 及 MWT 均显著降低,与对照组相比具有统计学差异,此结果与以往研究结果相一致^[9]。

在慢性痛的发生发展中,脊髓内神经炎症是公认的病理机制之一^[10]。星形胶质细胞与小胶质细胞激活生成的细胞因子、趋化因子可作用于神经元表面受体,使神经元兴奋性增高,促进痛行为维持^[11]。有研究表明,炎性痛患者脑脊液中促炎性细胞因子水平升高,关节炎模型小鼠脊髓内胶质细胞激活^[12-13]。在本研究中,CFA 炎性痛小鼠在造模后第 3 天,脊髓内反应性星形胶质细胞标志物表达升高,而形态学结果显示背角星形胶质细胞增生肥大,进一步证实脊髓内存在星形胶质细胞激活。

在炎症等刺激下,反应性星形胶质细胞可向 A1 和 A2 两种不同的表型极化。A1 型星形胶质细胞可释放伤害性信号分子,同时因其正常的吞噬、营养等功能降低,进而加剧了神经元的功能损害^[14-15]。目前,关于 A1 型星形胶质细胞在神经退行性疾病中的报道最多,如阿尔茨海默病、帕金森病^[16-17],而其在慢性痛中的相关报道比较有限。有研究发现,神经病理性疼痛模型大鼠脊髓背角中,A1 型反应性星形胶质细胞明显增加^[18]。本研究通过 RT-PCR、免疫荧光等方法发现 CFA 小鼠脊髓内 A1 型星形胶质细胞标志物表达升高,表明炎性痛小鼠脊髓存在 A1 型星形胶质细胞极化。

关于诱导 A1 型星形胶质细胞极化的分子机制,目前有研究证实小胶质细胞激活后释放的 IL-1 α 、TNF 和 C1q 可在直接体外诱导星形胶质细胞激活并向 A1 表型极化^[19]。除此以外,有研究在术后痛大鼠模型上证实,小胶质细胞可通过下调 CXCR7/PI3K/Akt 信号通路诱导脊髓反应性星形胶质细胞向 A1 表型极化^[20]。而在本研究中所使用的 CFA 炎性痛小鼠模型,大量文献证实其在造模后早期即存在脊髓小胶质细胞激活^[21]。炎性痛早期脊髓背角小胶质细胞被激活,促使星形胶质细胞激活并向 A1 型反应性星形胶质细胞极化,进而参与脊

髓神经炎症反应,促进炎性痛的发生发展。提示,A1 型星形胶质细胞可能成为外周炎性痛治疗的干预靶点。

参 考 文 献(References)

- [1] Ronchetti S, Migliorati G, Delfino DV. Association of inflammatory mediators with pain perception [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1445-1452.
- [2] Matsuda M, Huh Y, Ji RR. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain [J]. *J Anesth*, 2019, 33(1): 131-139.
- [3] Li Q, Liu S, Li L, et al. Spinal IL-36 γ /IL-36R participates in the maintenance of chronic inflammatory pain through astroglial JNK pathway [J]. *Glia*, 2019, 67(3): 438-451.
- [4] Li T, Chen X, Zhang C, et al. An update on reactive astrocytes in chronic pain [J]. *J Neuroinflamm*, 2019, 16(1): 140.
- [5] Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations [J]. *Annu Rev Pharmacol*, 1980, 20: 441-462.
- [6] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.
- [7] 邵芳冰, 房军帆, 王思思, 等. 慢性炎性痛模型大鼠诱发焦虑抑郁样情绪行为观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 167-174.
- [8] Shao FB, Fang JF, Wang SS, et al. Observation of the anxiety and depression-like behavior induced by chronic inflammatory pain in rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(2): 167-174.
- [9] Abboud C, Duveau A, Bouali BR, et al. Animal models of pain: diversity and benefits [J]. *J Neurosci Methods*, 2021, 348: 108997.
- [10] Han K, Zhang A, Mo Y, et al. Islet-cell autoantigen 69 mediates the antihyperalgesic effects of electroacupuncture on inflammatory pain by regulating spinal glutamate receptor subunit 2 phosphorylation through protein interacting with C-kinase 1 in mice [J]. *Pain*, 2019, 160(3): 712-723.
- [11] Ji RR, Nackley A, Huh Y, et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain [J]. *Anesthesiology*, 2018, 129(2): 343-366.
- [12] Gajtkó A, Bakk E, Hegedüs K, et al. IL-1 β Induced cytokine expression by spinal astrocytes can play a role in the maintenance of chronic inflammatory pain [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 543331.
- [13] Bas DB, Su J, Sandor K, et al. Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(12): 3886-3896.
- [14] Bjurström MF, Giron SE, Griffis CA. Cerebrospinal fluid cytokines and neurotrophic factors in human chronic pain populations: a comprehensive review [J]. *Pain Pract*, 2016, 16(2): 183-203.
- [15] 虞子宁, 张丽梅, 黄志华, 等. A1/A2 反应性星形胶质细胞在缺血性脑卒中的作用 [J]. *赣南医学院学报*, 2020, 40(5): 445-450.

- Yu ZN, Zhang LM, Huang ZH, et al. The role of A1/A2 reactive astrocyte in ischemic stroke [J]. J Gannan Med Univ, 2020, 40(5): 445–450.
- [15] Li X, Li M, Tian L, et al. Reactive astrogliosis; implications in spinal cord injury progression and therapy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9494352.
- [16] King A, Szekely B, Calapkulu E, et al. The increased densities, but different distributions, of both C3 and S100A10 immunopositive astrocyte-like cells in Alzheimer's disease brains suggest possible roles for both A1 and A2 astrocytes in the disease pathogenesis [J]. Brain Sci, 2020, 10(8): 503–519.
- [17] Hinkle JT, Dawson VL, Dawson TM. The A1 astrocyte paradigm; new avenues for pharmacological intervention in neurodegeneration [J]. Mov Disord, 2019, 34(7): 959–969.
- [18] 李立, 姚文龙, 张传汉. A1 型星形胶质细胞在神经病理性疼痛大鼠脊髓的表达特点 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(8): 579–583.
- Li L, Yao WL, Zhang CH. The expression of A1 reactive astrocytes in spinal cord in rats with neuropathic pain [J]. Chin J Pain Med, 2020, 26(8): 579–583.
- [19] Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. Nature, 2017, 541(7638): 481–487.
- [20] Li T, Liu T, Chen X, et al. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain [J]. J Neuroinflamm, 2020, 17(1): 211.
- [21] Lu Y, Cao DL, Ma LJ, et al. TRAF6 contributes to CFA-induced spinal microglial activation and chronic inflammatory pain in mice [EB/OL]. [2021-03-10]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10571-021-01045-y.pdf>

[收稿日期] 2021-03-31

曾丹怡,尹诚语,刘伯宇,等. 奥替普拉改善急性痛风性关节炎小鼠模型疼痛和炎症的效应及机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 585-592.

Zeng DY, Yin CY, Liu BY, et al. Therapeutic effects of oltipraz on the pain and inflammation responses of a mouse model of acute gouty arthritis and related mechanisms [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 585-592.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.004

奥替普拉改善急性痛风性关节炎小鼠模型疼痛和炎症的效应及机制研究

曾丹怡^{1,2}, 尹诚语¹, 刘伯宇¹, 聂慧敏¹, 李晓洁¹, 陈瑞香¹, 王洁¹, 李园园¹,
徐若瑶¹, 位会娜¹, 台燕³, 邵晓梅¹, 王萍^{2*}, 刘伯一^{1*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院, 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学中医药科学研究院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 建立急性痛风性关节炎(AGA)小鼠模型, 观察并研究奥替普拉(Oltipraz)能否改善模型小鼠出现的关节炎和疼痛。**方法** 把健康 C57/BL6 雄性小鼠随机分为对照组(Control)、模型+溶剂组(MSU+Veh)、模型+奥替普拉高剂量组(MSU+100 mg/kg Oltipraz)、模型+奥替普拉低剂量组(MSU+30 mg/kg Oltipraz)以及模型+吲哚美辛组(MSU+10 mg/kg Indo)。除对照组注射磷酸盐缓冲液以外, 其余各组小鼠右踝关节注射尿酸钠(MSU), 制备 AGA 小鼠模型。模型制备成功前后, 模型+奥替普拉组小鼠腹腔注射奥替普拉, 模型+吲哚美辛组同一时间点腹腔注射吲哚美辛, 其余组腹腔注射等量溶剂。采用游标卡尺对五组小鼠造模前后踝关节肿胀程度进行测量; 用 von Frey 丝检测小鼠 50% 机械缩足反应阈值(50% PWT); 病理学分析踝关节滑膜组织切片; DigiGait 成像系统检测小鼠步态, 并分析造模前后步态行为学变化; 氧化分子检测试剂盒检测小鼠踝关节氧化应激反应; qPCR 技术检测踝关节组织炎症因子表达。**结果** 与对照组相比, 模型组小鼠踝关节明显肿胀, 50% PWT 显著降低($P < 0.01$)。病理学显示模型组小鼠踝关节滑膜组织相较于对照组出现明显炎性细胞浸润($P < 0.05$)。步态分析显示模型组小鼠相较对照组小鼠步幅长度显著缩短, 脚爪触地面积显著减小($P < 0.01$)。与模型+溶剂组相比, 模型+100 mg/kg 奥替普拉组小鼠患侧 50% PWT 显著上升($P < 0.01$); 踝关节肿胀程度显著减轻; 步态相关参数出现显著改善($P < 0.05$); 踝关节组织中氧化应激水平出现显著下降($P < 0.05$); 炎性因子 IL-1 β 、TNF- α 表达水平也显著下降($P < 0.01$), 其效果和吲哚美辛类似, 而 30 mg/kg 无明显效果。**结论** 奥替普拉可缓解 AGA 模型小鼠踝关节肿胀和关节疼痛, 这一治疗作用很可能与其降低 AGA 小鼠踝关节组织中氧化应激水平, 增加抗氧化物质表达并减少炎症因子表达有关。

【关键词】 急性痛风性关节炎; 氧化应激; 疼痛; 奥替普拉; 步态

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0585-08

Therapeutic effects of oltipraz on the pain and inflammation responses of a mouse model of acute gouty arthritis and related mechanisms

ZENG Danyi^{1,2}, YIN Chengyu¹, LIU Boyu¹, NIE Huimin¹, LI Xiaojie¹, CHEN Ruixiang¹, WANG Jie¹,
LI Yuanyuan¹, XU Ruoyao¹, WEI Huina¹, TAI Yan³, SHAO Xiaomei¹, WANG Ping^{2*}, LIU Boyi^{1*}

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81873365, 81603676), 浙江省自然科学基金“杰出青年基金”项目(LR17H270001), 浙江省自然科学基金(LQ21H270004), 浙江中医药大学“杰出青年”培育项目(Q2019J01), 浙江中医药大学中青年科研创新基金(KC201943)。Funded by the National Natural Science Foundation of China(81873365, 81603676), Zhejiang Provincial Natural Science Funds for Distinguished Young Scholars(LR17H270001), Zhejiang Provincial Natural Science Funds(LQ21H270004), Zhejiang Chinese Medical University(Q2019J01, KC201943)。

【作者简介】 曾丹怡(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经病理痛机制研究。Email: 2572875759@qq.com

【通信作者】 刘伯一(1981—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 针刺镇痛机制研究。Email: boyi.liu@foxmail.com;

王萍(1966—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤机制研究。Email: wangping897@163.com。

* 共同通信作者

(1. Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory of Acupuncture and Neurology, Hangzhou 310053, China. 2. Basic Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053. 3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

Corresponding author: LIU Boyi. E-mail: boyi.liu@foxmail.com; WANG Ping. E-mail: wangping897@163.com

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of acute gouty arthritis (AGA), and to study whether oltipraz can improve the joint inflammation and pain in this model. **Methods** Healthy male C57/BL6 mice were randomly divided into control, MSU+Vehicle (MSU+Veh), MSU+Oltipraz high-dose (MSU+100 mg/kg oltipraz), MSU+Oltipraz low-dose (MSU+30 mg/kg oltipraz), and MSU+Indomethacin (MSU+Indo) groups. Mice of the control group were injected with phosphate buffered saline, whereas the other groups were injected with monosodium urate (MSU) in the right ankle to establish AGA. After the establishment of AGA, the MSU+Oltipraz group was intraperitoneally injected with oltipraz, the MSU+Indo group was intraperitoneally injected with indomethacin at the same time point, and mice in the other groups were intraperitoneally injected with the same volume of vehicle. Calipers were used to measure ankle joint swelling before and after model establishment and treatments. The 50% mechanical paw withdrawal threshold (50% PWT) of mice was measured by the *von Frey* method. Pathological changes of ankle synovial tissues were evaluated. The DigiGait imaging system was used to measure the gait of mice and changes of gait behavior before and after model establishment. An oxidative molecular detection kit was used to detect the oxidative stress-related molecules in mouse ankle joints. The expression levels of inflammatory factors in ankle joints were examined by qPCR. **Results** Compared with the control group, the MSU group had obvious ankle joint swelling and the 50% PWT was significantly reduced ($P<0.01$). Pathological analysis indicated that the synovial tissues of the ankle joint showed extensive inflammatory cell infiltration in the MSU group compared with the control group ($P<0.05$). Gait analysis showed that the stride length of hind limb was significantly shortened, and the paw area was significantly reduced ($P<0.01$) in the MSU group compared with the control group. Compared with the MSU+Veh group, the 50% PWT of the ipsilateral side of mice in the MSU+100 mg/kg oltipraz group was significantly increased ($P<0.01$), the ankle joint swelling was greatly reduced and gait parameters were markedly improved ($P<0.05$), the level of oxidative stress in ankle joints was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α mRNAs were dramatically decreased in the MSU+100 mg/kg oltipraz group compared with the MSU+Veh group ($P<0.01$), an effect similar to that of indomethacin, whereas 30 mg/kg oltipraz had no significant effect. **Conclusions** Oltipraz can alleviate ankle joint swelling and mechanical hyperalgesia in the AGA mouse model. This therapeutic effect is probably related to reduced oxidative stress and inflammatory cytokine levels, and the increased expression of antioxidant substances in the ankle tissue of AGA mice by oltipraz treatment.

【Keywords】 acute gouty arthritis; oxidative stress; pain; oltipraz; gait

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

急性痛风性关节炎 (AGA) 是一种由单钠尿酸盐结晶 (MSU) 在关节组织处沉积而造成的急性炎症性关节疾病, 其与体内嘌呤代谢系统紊乱相关^[1]。AGA 作为老年人最常见的炎症性关节病之一^[2], 同时也是全球公认的最能影响人类的急性痛症之一^[3], 可使患者生活质量显著下降。AGA 属于全球性疾病, 目前全球范围患病率约为 1% ~ 4%, 其中以老年男性多见, 但近年来逐步趋于年轻化^[4]。我国 AGA 患病率为 1% ~ 3%, 并呈逐年上升趋势。AGA 起病急骤, 可导致关节红、肿、热、痛和运动功能障碍, 历时数天或数周缓解。患者关节部位出现刀割、咬噬样剧痛, 严重影响生活质量^[5]。

目前临床针对 AGA 治疗主要为秋水仙碱、非甾体抗炎药和糖皮质激素, 而长期使用这些药物往往导致诸多不良反应, 包括胃肠道不适、溃疡、肝肾损害、神经毒性和免疫抑制等^[6]。近期临床新推出的选择性环氧酶-2 抑制剂, 如依托考昔等, 虽深受痛风患者喜爱, 然而有研究表明, 长期服用此类药物可能对心脏产生严重毒副作用, 从而使得此类药物应用受限^[7]。因此针对 AGA 治疗药物的研究具有重要临床意义。

氧化应激反应广泛参与了炎症和疼痛的发生机制。AGA 发病时局部关节组织中巨噬细胞对 MSU 晶体的识别与反应是其中的主要环节。在此

过程中,巨噬细胞被募集到炎症部位,吞噬 MSU,并释放大量氧化应激产物(ROS)。这些 ROS 物质的释放可进一步加剧脂质过氧化反应,导致一系列脂质过氧化产物生成,激活痛敏感 TRPA1 通道,产生关节疼痛,并诱发关节炎症反应^[8-9]。此外,关节炎症过程中所释放的一些炎症因子,如 IL-1 β 、TNF- α 等,也参与了痛觉敏化的发生机制^[10-12]。

奥替普拉最初是一种临床用于治疗血吸虫的药物,它是一种 Nrf2 特异性激动剂。前期研究已经发现 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中 Nrf2 表达含量显著减少,而某些抗氧化剂和镇痛剂能提高其在踝关节组织中的表达含量。且有研究发现,在不同动物模型和临床试验中,奥替普拉可发挥抗氧化、抗癌、镇痛和抗炎等功效^[13]。它可通过激活抗氧化信号通路,抑制高糖诱导的细胞氧化应激和凋亡^[14]。它还可以上调 Nrf2 内源性抗氧化机制,防止小鼠高脂饮食引起的胰岛素抵抗和肥胖^[15]。近期还有研究显示,奥替普拉能通过激活脊髓 Nrf2/HO-1 信号通路改善化疗药物紫杉醇诱发的外周神经病理痛^[16]。然而目前关于奥替普拉能否对 AGA 发挥治疗作用还未见报道。因此在本研究中,拟制备 MSU 诱发的 AGA 小鼠模型,观察并研究 Nrf2 特异性激动剂奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节炎症和疼痛的治疗作用及可能机制,从而为研究有效治疗 AGA 的药物提供方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 100 余只 8 周龄 SPF 级健康雄性 C57/BL6 小鼠,体重 22 ~ 28 g,购自中国上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2019-0016】,并在浙江中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2019-0008】饲养。室温维持在 22 ~ 25℃,湿度 40% ~ 60%,小鼠自由饮食和饮水,灯光 12 h 循环。本实验所有操作已通过浙江中医药大学动物伦理委员会的批准(审批号:ZSLL-2017-183)。

1.1.2 主要试剂与仪器

von Frey 纤维丝(Stoelting 公司);全能台式高速冷冻离心机(Thermo Scientific 公司);M4 多功能酶标仪(SoftMax 公司);奈特数码游标卡尺(上海美奈特实业有限公司);奥替普拉(B5958, APEX BIO);二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司);磷酸盐缓冲液(凯基

生物公司);尿酸钠(Sigma 公司);微量还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成,货号:A006-2-1);SOD 检测试剂盒(南京建成,货号:A001-3-2);MDA 测定试剂盒(南京建成,货号:A003-1-2);过氧化氢(H₂O₂)检测试剂盒(碧云天,货号:S0038);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组与造模

C57/BL6 小鼠,随机分为 5 组,即对照组,模型+溶剂组,模型+奥替普拉高剂量组(MSU+100 mg/kg Oltipraz)、模型+奥替普拉低剂量组(MSU+30 mg/kg Oltipraz)以及模型+吲哚美辛组(MSU+10 mg/kg Indo)。除对照组注射磷酸盐缓冲液外,其余各组小鼠右踝关节注射 1 mg/20 μ L 尿酸钠,制备急性痛风性关节炎小鼠模型。模型+奥替普拉组:在造模前及模后 5、23、47 h 腹腔注射奥替普拉。模型+吲哚美辛组:在同一时间点腹腔注射吲哚美辛。其余组腹腔注射相应溶剂或药物。

1.2.2 踝关节肿胀程度测定

采用数码游标卡尺检测造模前后不同时间点小鼠内踝和外踝之间的距离,连续测 3 次后取均值。踝关节肿胀程度=当前测量关节直径-初始测量直径。

1.2.3 行为学检测与 50%机械缩足反应阈值(50% PWT)测定

在造模前和造模后的 2、6、8、24、48 h,用 von-Frey 纤维丝(力量分别是 0.02、0.04、0.07、0.16、0.40、0.60、1.00、1.40、2.00 g),采用经典 Up-Down 方法检测小鼠机械痛阈^[17]。检测时,把小鼠放在高架铁丝网上的透明塑料盒内,盖上透明有机玻璃罩,让小鼠适应 30 min,等其完全安静(停止整理毛发和探索走动),用 von-Frey 纤维丝刺激小鼠右后肢足底中部,刺激时避开足垫,直到 von-Frey 丝弯成 S 形,接着持续进行刺激 5 s,观察小鼠是否出现缩足反应。假如小鼠在刺激时间段内出现缩足或舔足反应,就记为阳性反应(记为 X),不能出现缩足或舔足反应,就记为阴性反应(记为 0)。测定首先从 0.4 g 开始,假如该力度 von-Frey 丝刺激不能引起阳性反应(小鼠足爪出现躲避)时,就用相邻大一级力度纤维丝刺激;当出现阳性反应,就给予相邻小一级力度纤维丝刺激,参照此法连续检测,直到出现第 1 次阳性和阴性(或阴性和阳性)反应的骑跨,继续检测 4 次。当第 1 次 OX 或 XO 出现时,再检测 4

次即得到一串序列。两次检测之间至少间隔 1 min, 从而消除上一次刺激的影响。把第 1 次出现“X”的前一次“O”作为起点, 把该起点连续 6 次检测结果作为计算 50% PWT 的关键序列。计算公式为 $50\% \text{ PWT}(g) = 10^{(xf+k \cdot \delta-4)}$ 。 δ 在此约为 0.231, Xf 是序列中最后一根 *von-Frey* 丝的对数值, k 为根据检测所得“X”“O”序列查表所得。

1.2.4 踝关节滑膜组织切片病理学观察

模后 24 h, 异氟烷麻醉处理, 快速取下患侧踝关节, 无菌磷酸盐缓冲液冲洗后, 固定于 4% 多聚甲醛中。室温下固定 1 d, 随后 PBS 冲洗 3 次, 蒸馏水冲洗 3 次。组织转移至 20 倍体积 EDTA 脱钙液中, 室温下行脱钙处理 2 周。石蜡包埋, 沿矢状面进行切片, 再用苏木素-伊红 (HE) 染色。光学显微镜下观察各组小鼠踝关节滑膜组织病变及炎性细胞浸润。

1.2.5 小鼠步态分析

模后 24 h 用 DigiGait 成像系统对小鼠进行步态行为学检测, 包括多种步态力学和姿势指数, 如脚爪面积 (paw area)、步幅长度 (stride length) 等。

1.2.6 抗氧化能力与氧化应激相关分子检测组织提取

模后 24 h, 小鼠异氟烷麻醉处理, 快速取下患侧踝关节, 用于生化分析, 按照试剂商制定的标准进行测定。准确称取组织重量, 按照重量: 体积 = 1:9 的比例加入生理盐水及 2 mm 直径钢珠, 放入组织破碎仪中, 在 4℃ 环境下, 匀浆粉碎制备组织匀浆。4℃, 3000 rpm, 15 min 离心, 吸取上清液, 分装部分上清进行 BCA 法蛋白浓度测定, 剩余上清用于下列试剂盒检验。

(1) 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测: 根据试剂盒说明书, 每孔加入 20 μL 待测样本及 20 μL 酶工作液, 充分混匀, 每孔加 200 μL 底物应用液, 置于 37℃ 恒温箱孵育 20 min 后, 450 nm 处酶标仪读数, 根据公式计算样本中 SOD 酶活性, 报告结果是每毫克蛋白质 SOD 的活力, 单位为 U/mg protein。

(2) 还原型谷胱甘肽 (GSH) 活性检测: 配制不同浓度标准品, 每孔加 100 μL 标准品或待测样本及 125 μL 工作液, GSH 与二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 反应, 生成黄色化合物, 在 405 nm 波长下读取数值, 绘制标准曲线, 计算每样本中 GSH 酶活性, 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 。

(3) 丙二醛 (MDA) 含量检测: 配制不同浓度标准品, 每管加 100 μL 标准品或待测样本及

200 μL 工作液, 混匀 100℃ 加热 15 min, 水浴冷却至室温, 室温 1000 rpm 离心 10 min。移取 200 μL 上清液加入 96 孔板中, MDA 与硫代巴比妥酸反应产生红色化合物, 在 562 nm 波长下酶标仪读数, 绘制标准曲线, 计算各样本中 MDA 含量。报告的结果是每毫克蛋白质的 MDA 含量, 单位为 $\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 。

1.3 统计学分析

实验数据均采用平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 展示, 采用 Graphpad Prism 8.0 进行数据绘图及统计分析。两组间数据分析用 Student's *t* test, 多组间 (≥ 3) 用 One-或 Two-way ANOVA, 事后分析用 Tukey 法检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

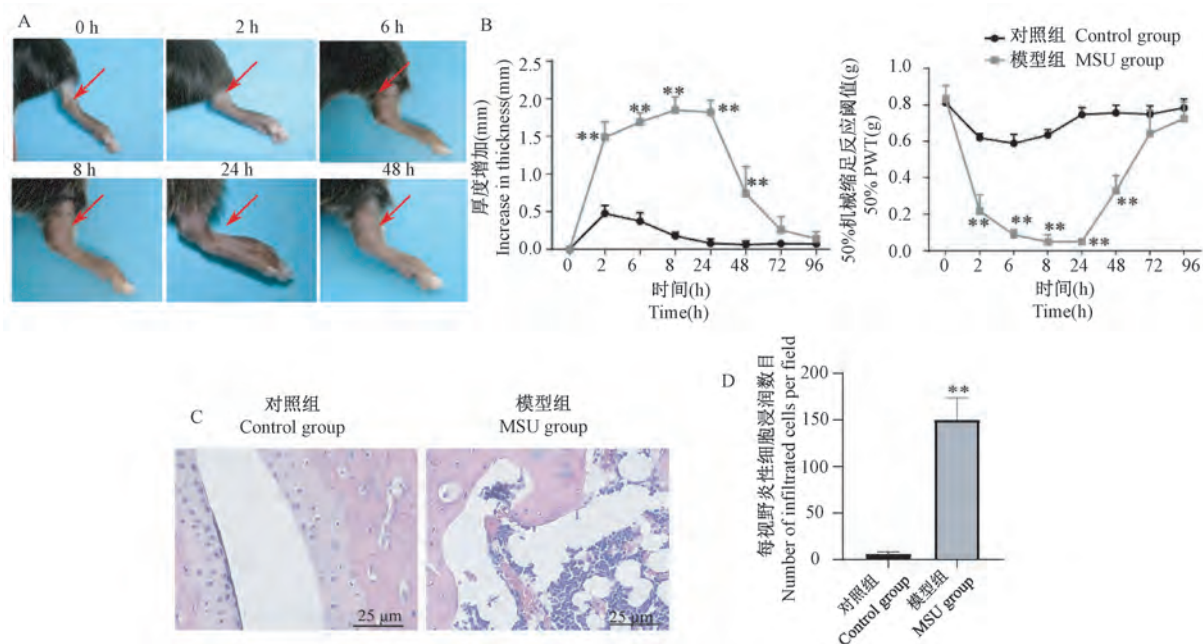
2 结果

2.1 AGA 小鼠模型建立及踝关节滑膜组织病理学观察

注射 MSU 后, 模型小鼠右踝关节部位明显肿胀, 且一直持续到 48 h (图 1A, 1B)。模型小鼠患侧踝关节 50% PWT 明显降低, 提示有机机械痛超敏发生 ($P < 0.01$)。机械痛超敏反应在造模后 24 h 达到高峰, 且一直持续到 48 h (图 1C)。上述现象与以往报道一致, 提示造模成功^[18-19]。对造模后 24 h 小鼠踝关节进行病理学切片和 HE 染色。HE 染色结果显示模后 24 h (图 1D), AGA 模型组小鼠患侧踝关节滑膜组织出现广泛炎性细胞浸润和增生 ($P < 0.01$)。

2.2 奥替普拉对 AGA 小鼠踝关节肿胀和疼痛的疗效观察

分别设立对照组、模型+溶剂组 (MSU+Veh) 和模型+奥替普拉组 (MSU+Oltipraz)。模型+奥替普拉组: 在造模前及模后 5、23、47 h 腹腔注射奥替普拉 (30 mg/kg 或 100 mg/kg, 40 μL 注射体积)。模型+溶剂组: 同一时间点腹腔注射相应溶剂。模型+吡哆美辛组: 同一时间点腹腔注射吡哆美辛 (10 mg/kg)。图 2A 为奥替普拉给药及机械痛测定时间点示意图。用 *von-Frey* 丝检测 0、2、6、8、24、48 h 时间点各组小鼠患侧机械痛阈。腹腔注射奥替普拉后, 相较于模型+溶剂组小鼠, 模型+奥替普拉组小鼠 50% PWT 在各个时间点均出现显著上升, 且踝关节肿胀程度出现显著降低 (图 2B) ($P < 0.01$)。上述结果提示, 奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节肿胀和疼痛具有明显治疗作用。



注:A:造模前后各时间点小鼠患侧踝关节肿胀情况的代表图;B:对照组和模型组小鼠患侧踝关节肿胀程度时程变化图;C:对照组和模型组小鼠患侧踝关节机械痛阈变化时程图;D:造模后 24 h 小鼠患侧踝关节滑膜组织病理学观察。与对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 1 小鼠造模后踝关节肿胀及机械缩足反应阈值变化情况 ($n=6$)

Note. A. Representative pictures showing the swelling of the affected ankle joint at each time point before and after AGA model establishment. B. Time course indicating the changes of ankle joint swelling of control and MSU group. C. Time course showing the changes of 50% PWT of control and MSU group. D. Histopathological analysis of synovium of ankle joint 24 h after AGA model establishment. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Changes of paw withdrawal threshold and ankle joint swelling before and after AGA model establishment in mice ($n=6$)

2.3 奥替普拉对 AGA 模型小鼠步态行为学治疗作用

利用步态仪对模后 24 h 小鼠步态行为学进行研究。如图 3A 所示,发现与对照组相比,模型组小鼠步态行为学出现显著改变,即患侧足底相较于健侧足爪面积 (paw area) 显著减少。进一步分析发现,模型组小鼠步幅长度 (stride length) 也显著减少 ($P < 0.01$)。这一结果提示,AGA 模型小鼠表现出明显的步态行为学改变。但相较于模型+溶剂组小鼠,模型+100 mg/kg 奥替普拉组小鼠在步态仪上所表现的脚爪触地面积以及步幅长度指标均出现显著改善 ($P < 0.05$)。图 3B 显示的是上述参数的统计结果。这一结果提示,奥替普拉可显著改善 AGA 模型小鼠步态行为学的改变。

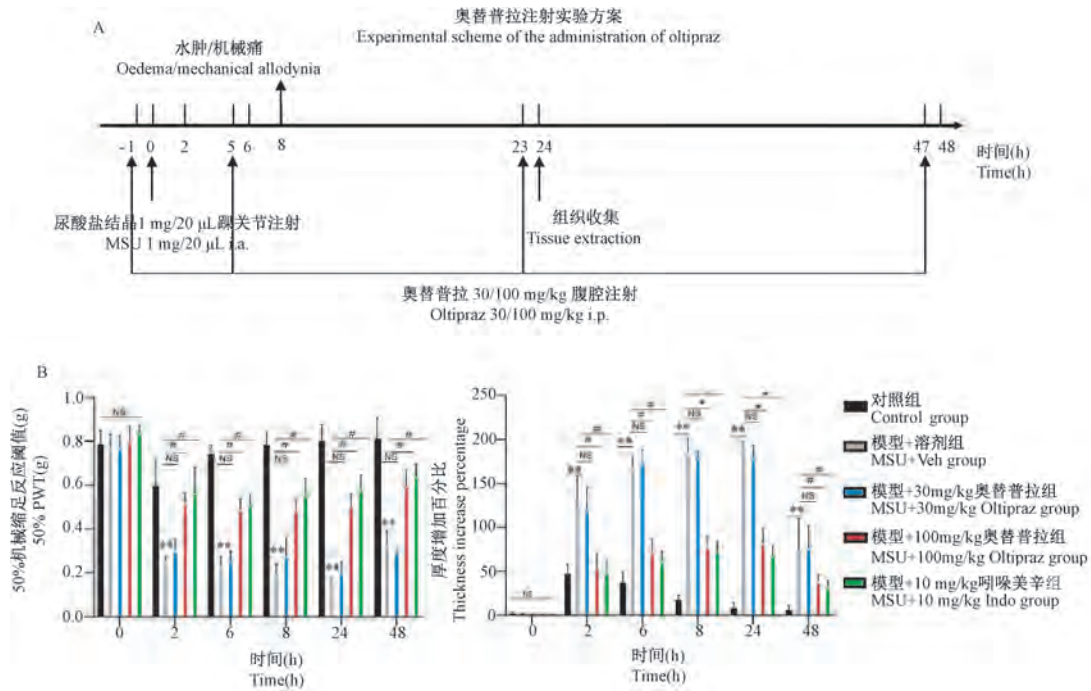
2.4 奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节氧化应激反应的干预作用

氧化应激反应在介导 AGA 炎症与疼痛中具有重要作用^[9,18-19]。因此,为了探讨奥替普拉对 AGA 模型小鼠患侧踝关节疼痛和炎症作用的治疗机制,我们进一步研究了奥替普拉对模型小鼠患侧踝关节氧化应激反应的干预作用。提取模后 24 h 小鼠

患侧踝关节组织进行氧化应激分子检测。如表 1 所示,与对照组相比,模型+溶剂组小鼠踝关节组织中 SOD 和 GSH 含量均显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而氧化应激产物 MDA 的含量明显上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示模型+溶剂组小鼠患侧踝关节组织中出现明显氧化应激反应。与模型+溶剂组相比,模型+100 mg/kg 奥替普拉组小鼠患侧踝关节组织中 SOD 和 GSH 含量出现显著恢复 ($P < 0.01$),且 MDA 水平显著下降 ($P < 0.05$)。以上结果表明奥替普拉可有效降低 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中氧化应激反应水平。

2.5 奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节组织中炎症因子表达的干预作用

如图 4A,4B 所示,模后 24 h,相比对照组,模型+溶剂组小鼠患侧踝关节组织中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达出现显著升高 ($P < 0.05$)。经奥替普拉治疗后,相较模型+溶剂组,模型+100 mg/kg 奥替普拉组小鼠患侧踝关节组织中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$)。上述结果提示奥替普拉可有效减少 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中炎症因子过表达。

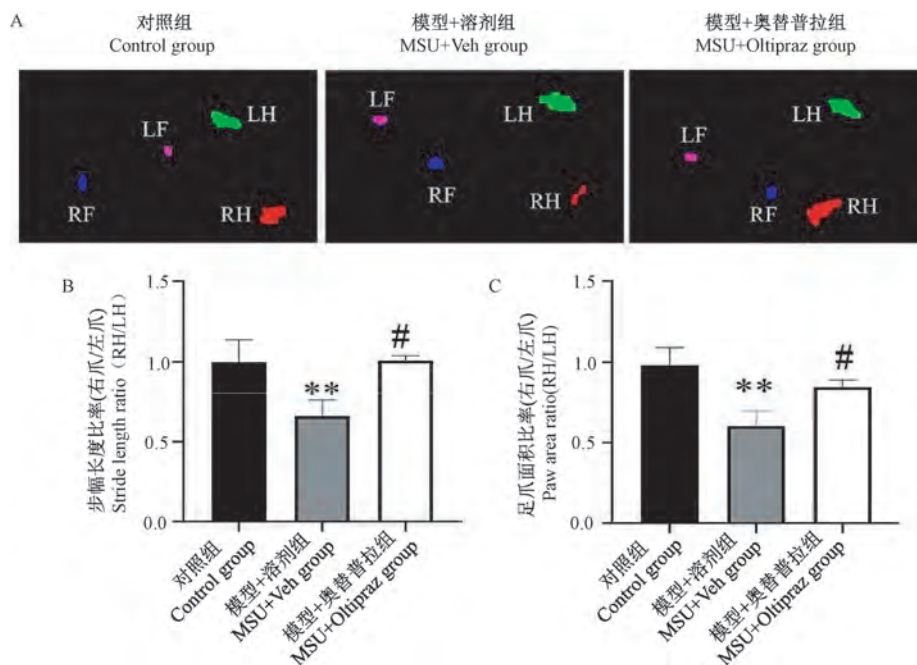


注: A: 奥替普拉给药方案示意图; B: 对照组、模型+溶剂组、模型+30/100 mg/kg 奥替普拉组、模型+10 mg/kg 吲哚美辛组小鼠不同时间点患侧踝关节机械痛阈和踝关节肿胀变化情况; 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型+溶剂组相比, # $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 2 奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节肿胀和机械痛阈的治疗作用 ($n=6$)

Note. A. Experimental scheme of the administration of oltipraz. B. Time course showing the effect of oltipraz on 50% PWT and ankle joint swelling of control, MSU+Veh, MSU+30/100 mg/kg Oltipraz and MSU+10 mg/kg Indo group. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with MSU+Veh group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures and table)

Figure 2 Therapeutic effects of oltipraz on ankle joint swelling and mechanical pain threshold of AGA model mice ($n=6$)



注: A: 造模 24 h 后, 对照组、模型+溶剂组、模型+100 mg/kg 奥替普拉组小鼠足底步态成像图; B: 3 组小鼠步态参数变化统计图。

图 3 奥替普拉对痛风小鼠步态行为学的干预作用 ($n=6$)

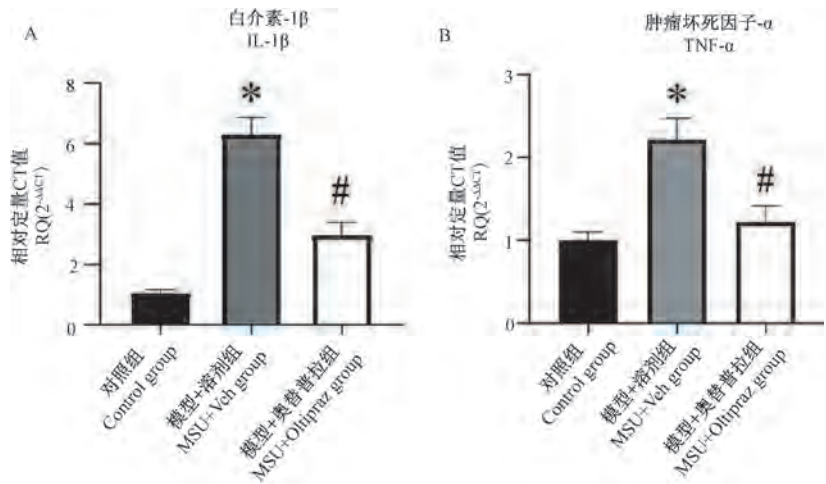
Note. A. Gait imaging of control, MSU+Veh and MSU+100 mg/kg Oltipraz group mice 24 h after the model. B. Summary of the gait parameters.

Figure 3 Therapeutic effects of oltipraz on gait behavior of AGA model mice ($n=6$)

表 1 各组小鼠患侧踝关节组织中氧化应激相关分子水平的变化(n=6)

Table 1 Changes of the levels of oxidative stress-related molecules in ipsilateral ankle joint tissues of mice in each group(n=6)

组别 Groups	SOD(U/mg protein)	GSH(μ mol/mg protein)	MDA(μ mol/mg protein)
对照组 Control group	4. 71 $\pm$ 0. 92	27. 53 $\pm$ 1. 48	17. 31 $\pm$ 0. 42
模型+溶剂组 MSU+Veh group	1. 96 $\pm$ 0. 09 *	14. 64 $\pm$ 0. 38 **	33. 42 $\pm$ 1. 24 *
模型+奥替普拉组 MSU+Oltipraz group	3. 92 $\pm$ 0. 23 ##	22. 31 $\pm$ 1. 86 ##	25. 05 $\pm$ 1. 96 #



注:显示 3 组小鼠患侧踝关节组织中炎症因子 mRNA 表达情况。

图 4 奥替普拉对 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中炎症因子表达的干预作用(n=6)

Note. Indicated the expression of inflammatory cytokines in ankle joint tissues of 3 groups of mice.

Figure 4 Therapeutic effects of oltipraz on the expression of inflammatory cytokines in ankle joint tissues of AGA model mice(n=6)

3 讨论

AGA 起病急骤,可导致患者关节部位出现红、肿、热、痛和运动功能障碍,往往历时数天或数周才逐渐缓解。患者关节部位往往出现似刀割、咬噬样剧痛,严重影响生活质量。目前临床针对 AGA 治疗的主要药物为秋水仙碱、非甾体抗炎药和糖皮质激素。但长期服用这些药物往往导致诸多不良反应,包括胃肠道不适、溃疡、肝肾损害、神经毒性和免疫抑制等。因此,寻找对 AGA 有效的治疗药物具有十分重要的临床意义。

在本研究中,首先利用向踝关节注射 MSU 的方法制备了小鼠 AGA 模型。发现 AGA 模型小鼠患侧肢体表现出明显且持续的机械痛超敏症状及踝关节肿胀。这些现象与以往报道及我们近期的研究结果相一致^[12,20-21],提示造模成功。众所周知,AGA 患者由于关节肿胀和疼痛,往往表现出步态行为改变。因此,继续利用 DigiGait 步态观测系统对模型小鼠进行步态检测。通过在透明跑步带下方对动物步态行为进行实时录像,并进行量化和分析后^[22],发现,相较于对照组小鼠,AGA 模型组小鼠在

步态行为学上表现出明显的步态摆动时间延长,脚爪触地面积和步幅长度减小的现象^[23]。这一结果提示 AGA 模型小鼠表现出显著的步态行为学变化。

接下来,研究了 Nrf2 特异性激动剂奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节抗炎和镇痛效应。近年来有研究显示,奥替普拉可通过激活体内 Nrf2/HO-1 抗氧化系统,缓解动物模型炎性痛和神经病理痛^[16,24]。但奥替普拉能否对 AGA 发挥治疗作用还有待探索。在本实验中,发现 100 mg/kg 奥替普拉能有效缓解 AGA 模型小鼠踝关节疼痛症状且减少患侧踝关节肿胀程度,并显著改善模型小鼠步态行为学相关参数改变。

近期研究结果发现氧化应激反应在介导 AGA 炎症与疼痛中具有重要作用^[18-19]。因此,继续探讨了奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节氧化应激反应是否发挥干预作用。发现 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中抗氧化物质 SOD 和 GSH 水平下降,而氧化应激反应产物 MDA 的含量显著升高,提示 AGA 模型小鼠踝关节局部出现显著氧化应激反应。而给予奥替普拉后,可显著提高 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中 SOD 和 GSH 水平,并减少 MDA 含量,

从而降低氧化应激反应水平。此外,还进一步发现奥替普拉可显著降低 AGA 模型小鼠患侧踝关节组织中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 过表达。因此推断,奥替普拉改善 AGA 模型小鼠踝关节炎症和疼痛症状的效应,很可能是通过抑制踝关节部位氧化应激反应水平和炎症因子过表达来实现的。

综上所述,本研究发现奥替普拉对 AGA 模型小鼠踝关节炎症和疼痛症状有治疗效果。奥替普拉的治疗效果很可能与其抑制踝关节部位氧化应激反应水平和炎症因子的过表达有关。但奥替普拉在 AGA 情况下所发挥的抗氧化应激活性和抗炎活性的详细机制还有待进一步研究。奥替普拉作为治疗 AGA 的崭新药物值得进一步进行相关的基础和临床研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Wilson L, Saseen JJ. Gouty arthritis: a review of acute management and prevention [J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(8): 906-922.
- [2] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(7): 380-390.
- [3] Richette P, Doherty M, Pascual E, et al. 2018 updated european league against rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(1): 31-38.
- [4] Singh JA, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(3): 11-16.
- [5] Luk AJ, Simkin PA. Epidemiology of hyperuricemia and gout [J]. *Am J Manag Care*, 2005, 11(15): 435-442.
- [6] Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2039-2052.
- [7] Stamp LK, Dalbeth N. Prevention and treatment of gout [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(2): 68-70.
- [8] Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, et al. Trpa1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 72: 200-209.
- [9] Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger pain during monosodium urate-induced inflammation in rodents [J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 65(11): 2984-2995.
- [10] Chen Z, Zhong H, Wei J, et al. Inhibition of nrf2/ho-1 signaling leads to increased activation of the nlrp3 inflammasome in osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 300.
- [11] 欧阳香, 丁婷, 杨海艳, 等. 痛风性关节炎发病机制相关信号通路的研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 3(8): 1-14.
- Ouyang X, Ding T, Yang HY, et al. Research progress of pathogenesis-related signaling pathways in gouty arthritis [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2021, 3(8): 1-14.
- [12] 柴文新, 施合欢, 金雯丽, 等. 一种改良方法制备大鼠痛风模型及其炎症和疼痛效应评价 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(10): 730-736.
- Chai WX, Shi HH, Jin WL, et al. A modified method for preparing rat gout model and evaluating its inflammatory and pain effects [J]. *Chin J Pain Med*, 2017, 23(10): 730-736.
- [13] Zhou YQ, Liu DQ, Chen SP, et al. Ppar γ activation mitigates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain via induction of nrf2/ho-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110356.
- [14] Rooney JP, Chorley B, Hiemstra S, et al. Mining a human transcriptome database for chemical modulators of nrf2 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0239367.
- [15] Yagishita Y, Gathbonton-Schwager TN, McCallum ML, et al. Current landscape of nrf2 biomarkers in clinical trials [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(8): 716.
- [16] Zhou YQ, Liu DQ, Chen SP, et al. Nrf2 activation ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(8): 1041-1048.
- [17] Massie JB, Schimizzi AL, Huang B, et al. Topical high molecular weight hyaluronan reduces radicular pain post laminectomy in a rat model [J]. *Spine J*, 2005, 5(5): 494-502.
- [18] Yin C, Liu B, Li Y, et al. Il-33/st2 induces neutrophil-dependent reactive oxygen species production and mediates gout pain [J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12189-12203.
- [19] Yin C, Liu B, Wang P, et al. Eucalyptol alleviates inflammation and pain responses in a mouse model of gout arthritis [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(9): 2042-2057.
- [20] Atilano RA, Wen X, Aleksunes LM, et al. Nrf2 activators as potential modulators of injury in human kidney cells [J]. *Toxicol Rep*, 2016, 3: 153-159.
- [21] Torres R, Macdonald L, Croll SD, et al. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2009, 68(10): 1602-1608.
- [22] Otter S, Payne C, Jones AM, et al. Differences in achilles tendon stiffness in people with gout: A pilot study [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2020, 21(1): 658.
- [23] Bernal JA, García-Campos J, Marco-Lledó J, et al. Gouty involvement of foot and ankle: Beyond flares [J]. *Reumatol Clin (Engl Ed)*, 2021, 17(2): 106-112.
- [24] Yu W, Cheng JD. Uric acid and cardiovascular disease: an update from molecular mechanism to clinical perspective [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 582680.

[收稿日期] 2021-03-23

陈卢杭,费雪瑜,康玉蓉,等. 背根神经节 P2X3 受体表达上调在糖尿病神经痛中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 593-599.

Chen LH, Fei XY, Kang YR, et al. Role of upregulated P2X3 expression in dorsal root ganglia during diabetic neuropathic pain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 593-599.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.005

背根神经节 P2X3 受体表达上调在糖尿病神经痛中的作用

陈卢杭^{1,2,3}, 费雪瑜^{1,2,3}, 康玉蓉^{1,2,3}, 王涵芝^{1,2,3}, 瞿思颖^{1,2,3}, 李想^{1,2,3},
何晓芬^{1,2,3}, 方剑乔^{1,2,3*}, 蒋永亮^{1,2,3*}

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院康复医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省针灸神经病学研究重点实验室, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学针灸研究所, 杭州 310053)

【摘要】 目的 本研究拟观察注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 后大鼠不同时期背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 上嘌呤受体 (purinergic receptor subtype, P2X3) 的表达情况及 P2X3 受体拮抗剂 TNP-ATP 对糖尿病神经痛 (diabetic neuropathic pain, DNP) 大鼠的干预作用。**方法** (1) 20 只健康雄性 SD 大鼠随机选取 6 只选取作为正常组, 其余 14 只大鼠予以腹腔注射 STZ, 剔除未成模的 2 只大鼠, 分别观察造模前 (Base), 造模后 7、14、21 d 的机械缩爪阈值 (paw withdrawal threshold, PWT) 变化情况; 并在上述各时间点取大鼠 L4-L6 DRG, 采用免疫荧光法检测 L4-L6 DRG 上 P2X3 阳性细胞表达情况。(2) 将 25 只健康雄性 SD 大鼠随机选取 6 只作为正常 + 生理盐水 (Control + NS) 组, 其余 19 只予以 STZ 注射, 剔除未成模大鼠 1 只, 成功建立 DNP 的大鼠随机分为模型 + 生理盐水 (DNP + NS) 组, 模型 + 50 nmol P2X3 抑制剂 TNP-ATP 组 (DNP + 50 nmol TNP-ATP), 模型 + 100 nmol P2X3 抑制剂 TNP-ATP 组 (DNP + 100 nmol TNP-ATP), 每组 6 只; STZ 注射 14 d 后, DNP + TNP-ATP 组分别按照上述剂量予以足背注射 TNP-ATP 溶液, 其余两组分别予以注射等量 NS, 观察注射后 0.5、1、1.5 h 大鼠 PWT 变化。同时观察连续注射 7 d 药物对大鼠 PWT 的影响。**结果** (1) 与正常组比较, 模型组大鼠第 7 天、第 14 天及第 21 天空腹血糖显著升高; 与正常组比较, 模型组大鼠 Day 7 PWT 无明显改变, 第 14 天、第 21 天 PWT 显著降低。免疫荧光结果显示, 与正常组相比, STZ 注射 7、14、21 d 后, DNP 大鼠 L4、L5 DRG 上 P2X3 的阳性细胞的表达显著升高, STZ 注射 14、21 d 后, DNP 大鼠 L6 DRG 上 P2X3 的阳性细胞的表达显著升高。(2) TNP-ATP 干预前, DNP + NS 组与 DNP + 50 nmol TNP-ATP 组、DNP + 100 nmol TNP-ATP 组 PWT 无显著差异; 干预 0.5 h 后, 与 DNP + NS 组、DNP + 50 nmol TNP-ATP 组相比, DNP + 100 nmol TNP-ATP 组 PWT 明显升高, 效果持续至 1 h。(3) 连续注射 7 d TNP-ATP 后, DNP + 100 nmol TNP-ATP 组 PWT 较 DNP + NS 组与 DNP + 50 nmol TNP-ATP 组明显升高。**结论** 腹腔注射 STZ 可成功建立 DNP 大鼠模型, 背根神经节 P2X3 表达上调参与糖尿病神经痛的调节。

【关键词】 糖尿病神经痛; 背根神经节; P2X3 受体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0593-07

【基金项目】 国家自然科学基金 (81774389, 81804181), 国家级大学生创新创业训练计划 (202010344015, 202010344017), 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划 (2020R410012)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81774389, 81804181), National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (202010344015, 202010344017), Science and Technology Innovation Activity Plan and New Seedling Talent Plan for College Students in Zhejiang Province (2020R410012)。

【作者简介】 陈卢杭 (1996—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 针刺镇痛研究。Email: chong199666@gmail.com

【通信作者】 蒋永亮 (1981—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 针刺镇痛研究。Email: jyl2182@126.com;

方剑乔 (1961—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 针刺镇痛研究。Email: fangjianqiao7532@163.com。

* 共同通信作者

Role of upregulated P2X3 expression in dorsal root ganglia during diabetic neuropathic pain

CHEN Luhang^{1,2,3}, FEI Xueyu^{1,2,3}, KANG Yurong^{1,2,3}, WANG Hanzhi^{1,2,3}, QU Siying^{1,2,3}, LI Xiang^{1,2,3}, HE Xiaofen^{1,2,3},
FANG Jianqiao^{1,2,3*}, JIANG Yongliang^{1,2,3*}

(1. Third Clinical Medical College and Rehabilitation Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053. 3. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053)
Corresponding author: FANG Jianqiao. E-mail: fangjiaoqiao7532@163.com; JIANG Yongliang. E-mail: jyl2182@126.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of purinergic receptor subtype P2X3 (P2X3) in dorsal root ganglion (DRG) of rats at different stages after injection of streptozotocin (STZ), and the intervention effect of P2X3 receptor antagonist TNP-ATP in diabetic neuralgia (DNP) rats. **Methods** (1) Six of 20 healthy male SD rats were randomly selected as the normal group, and the other 14 rats were intraperitoneally injected with STZ. Two STZ treated rats without modeling were excluded. The paw withdrawal threshold (PWT) was observed before and 7, 14 and 21 days after modeling. The L4-L6 DRG of rats were collected at the above time points, and the expression of P2X3 positive cells was detected by immunofluorescence. (2) Six of 25 healthy male SD rats were randomly selected as the normal + normal saline (Control + NS) group, and the remaining 19 rats were injected with STZ. One STZ injected rat was excluded. The rats with successfully established DNP were randomly divided into a model + normal saline (DNP + NS) group, model + 50 nmol P2X3 inhibitor TNP-ATP (DNP + 50 nmol TNP-ATP) group, and model + 100 nmol P2X3 inhibitor TNP-ATP (DNP + 100 nmol TNP-ATP) group, with six rats in each group. Fourteen days after STZ injection, the DNP + TNP-ATP group was injected with 100 nmol TNP-ATP solution in the dorsum of the foot, whereas the other two groups were injected with the same volume of NS, and the PWT was observed at 0.5, 1 and 1.5 h after injection. The effect of drug injection on PWT was also observed after 7 days. **Results** (1) Compared with the normal group, fasting blood glucose was significantly increased in rats of the model group on Day 7, Day 14 and Day 21. Compared with the normal group, there was no significant change in the PWT of the model group at Day 7, but there was a significant decrease in PWT at Day 14 and Day 21. Immunofluorescence showed that the expression of P2X3 positive cells on L4 and L5 DRG from the DNP group was significantly increased 7, 14 and 21 days after STZ injection compared with the normal group. (2) Before TNP-ATP intervention, there were no significant differences in the PWT between the DNP + NS, DNP + 50 nmol TNP-ATP and DNP + 100 nmol TNP-ATP groups. Compared with DNP + NS and DNP + 50 nmol TNP-ATP groups, the PWT in the DNP + 100 nmol TNP-ATP group was significantly increased after 0.5 h intervention, and the effect lasted for 1 h. (3) After continuous injection of TNP-ATP for 7 days, the PWT in the DNP + 100 nmol TNP-ATP group was significantly higher than that in DNP + NS and DNP + 50 nmol TNP-ATP groups. **Conclusions** The DNP rat model was successfully established by intraperitoneal injection of STZ, and up-regulation of P2X3 expression in the DRG may be involved in the regulation of diabetic neuralgia.

【Keywords】 diabetic neuropathic pain; dorsal root ganglion; P2X3

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

糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)是糖尿病患者最常见的慢性并发症之一,以刺激诱发性疼痛和自发性疼痛为主要表现,发作时疼痛剧烈,严重影响患者生存质量^[1]。DNP 临床多见于糖尿病发展晚期,约 10% ~ 26%的糖尿病患者深受该并发症的困扰^[2]。DNP 患者的临床治疗往往采用普瑞巴林、杜洛西汀和阿片类药物等,但此类药物作用有限,且长期服用往往伴随着严重的副作用

用^[3],因此更好地阐明 DNP 的基本机制是目前亟待解决的问题。

P2X3 属于嘌呤信号受体家族成员之一,在最近几年的报道中,炎症及神经损伤后体内 P2X3 表达上调^[4],阻断 P2X3 或敲低 P2X3 可逆转异常性疼痛^[5]。P2X3 在外周背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元中往往表达于中小直径神经元上^[6]。已有研究表明,糖尿病神经痛敏化的发生

和维持与 DRG 神经元兴奋性增强密切相关^[7]。P2X3 可能是神经性疼痛新型的潜在治疗靶标,但在糖尿病神经痛中的作用还鲜见报道。

链脲佐菌素(STZ)是一种可以选择性破坏胰岛 β 细胞的抗生素。STZ 被广泛用于建立 I 型糖尿病动物模型^[8]。相对于通过其他方式,如遗传诱导 1 的自发性糖尿病或高脂饮食(HFD)结合低剂量 STZ 创建的糖尿病动物模型,STZ 诱导的糖尿病动物模型由于其便利性和较低的成本,得到了广泛的应用^[9-11]。因此,为了进一步探究背根神经节 P2X3 在 DNP 模型中的作用,本实验通过单次大剂量腹腔注射 STZ(65 mg/kg)建立糖尿病神经痛大鼠模型,在 STZ 注射后 7、14、21 d 采用免疫荧光技术检测 P2X3 的表达,并观察其拮抗剂 TNP-ATP 对糖尿病神经痛大鼠的干预效应,以期临床 DNP 患者的治疗提供新的思路与靶标。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

45 只 6 周龄清洁级雄性 SD 大鼠,体重(190 $\pm$ 15)g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2017-0005】,由浙江中医药大学实验动物中心【SYXK(浙)2018-0012】饲养。饲养环境:昼夜周期 12 h/12 h,温度恒定,湿度恒定。所有实验均符合浙江中医药大学实验动物伦理学要求(伦理审批号:IACUC-20180723-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

链脲佐菌素 STZ(S0130,美国 Sigma);P2X3 抑制剂 TNP-ATP(2464,美国 Tocris);兔抗 P2X3(APR-002,以色列 Alomone);Alexa Fluor 488 驴抗兔 IgG H&L(ab150065,美国 Abcam);动态足底测痛仪(意大利 UGO BASILE,37450);冷冻切片机(NX50,德国 Thermo);罗氏卓越型血糖仪(Roche ACCU-CHEK Performa);A1R 共聚焦显微镜(A1R,日本 Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型大鼠造模

禁食 16 h 后,对模型组大鼠予以一次性腹腔注射 STZ 溶液,按照 65 mg/kg 的剂量进行注射,于 0.1 mmol/L 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液中溶解 STZ,并将溶液的 PH 值调整为 4.5,所有溶液当天使用。在 STZ 注射后第 7 天,禁食 8 h,对大鼠进行尾静脉

采血从而测定其血糖水平,糖尿病模型建立成功的纳入标准为空腹血糖水平大于 16.7 mmol/L。

1.2.2 实验分组与实验干预

本实验主要分两部分进行:(1)在 20 只实验大鼠中选取 14 只作为实验组,对其进行禁食 16 h 后腹腔注射 STZ,剩余大鼠注射柠檬酸钠/柠檬酸缓冲液进行对照。观察大鼠 STZ 注射前(Base)、注射后 7、14、21 d PWT 情况,并取大鼠 L4-L6 DRG 进行免疫荧光法测试,检测其各时间点 P2X3 受体阳性细胞表达率。(2)取 25 只健康雄性 SD 大鼠,随机分为正常 + 生理盐水(Control + NS, $n=6$)组和 STZ 腹腔注射组($n=19$),剔除 1 只未成模大鼠后,将 18 只造模成功的 DNP 大鼠随机分为模型 + 生理盐水(DNP + NS, $n=6$)组、模型 + 50 nmol P2X3 抑制剂 TNP-ATP 组(DNP + 50 nmol TNP-ATP, $n=6$)和模型 + 100 nmol P2X3 抑制剂 TNP-ATP 组(DNP + 100 nmol TNP-ATP, $n=6$)。观察 50 nmol 与 100 nmol TNP-ATP 或 NS 干预前和干预后 0.5、1、1.5 h PWT,同时观察 50 nmol 与 100 nmol TNP-ATP 连续注射 7 d 后 PWT 变化情况。

1.2.3 机械痛阈检测

检测方法:将大鼠于测量前置于塑料盒进行适应,待到大鼠安静后进行测量。取大鼠左侧后足进行机械痛觉刺激。对准大鼠左后足中央启动仪器,金属针以恒定速度上行,刺激力度逐渐递增直至大鼠缩足。检测每隔 5 min 进行 1 次,每只大鼠进行 5 次测试,去掉最大值与最小值后计算平均数。

1.2.4 免疫荧光法检测 DRG 神经元上 P2X3 受体阳性细胞表达

使用戊巴比妥(80 mg/kg)麻醉大鼠,使用生理盐水对大鼠主动脉进行灌注至肝变白,再使用 4% 多聚甲醛进行灌注,取出 L4-L6 DRG 后使用蔗糖溶液梯度脱水,液氮冷冻后置于 -80℃ 冰箱保存。使用 OCT 包埋,行 10 μ m 厚度的冰冻切片。使用 TBST 漂洗 3 次,将样本放置于含兔抗 P2X3(1:800)的 TBST 溶液中进行孵育,次日复温。加入驴抗兔 IgG H&L(1:800)进行孵育后漂洗,后转移至载玻片封片。每组选择 3 只大鼠,每只大鼠 L4-L6 DRG 每个节段取 3 ~ 5 张切片,使用激光共聚焦显微镜取得图像,使用 Image J 图像软件进行分析,并计算阳性细胞个数。

1.2.5 药物干预

将 TNP-ATP 溶于生理盐水中,干预方式参照文

献的方法^[11-12],在大鼠左后足足背行药物注射,DNP + 50 nmol TNP-ATP 大鼠注射量为 50 nmol,DNP + 100 nmol TNP-ATP 大鼠注射量为 100 nmol,注射体积为 50 μ L;连续 7 d 注射药物量同上。Control + NS 组和 DNP+NS 组大鼠注射等体积生理盐水。

1.3 统计学分析

结果用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。所有数据均用 GraphPad Prism 5 和 SPSS 19.0 软件处理,多组间使用单因素 ANOVA 分析,两组间使用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病模型的建立

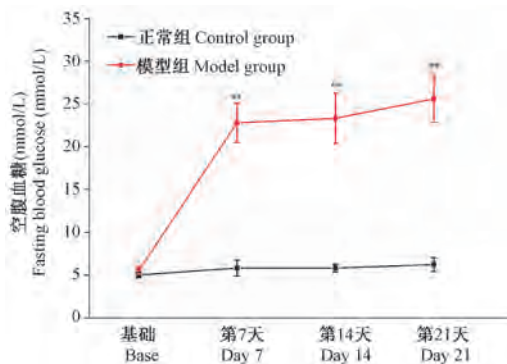
使用 STZ 腹腔注射建立糖尿病大鼠模型,模型组大鼠在 STZ 注射 7 d 后较正常组空腹血糖显著升高($P < 0.01$),并维持到第 21 天(见图 1)。

2.2 各时间点机械痛阈变化情况

模型组与正常组比较,PWT 在 STZ 注射前无显著性差异($P > 0.05$);同时,两组在 STZ 注射后第 7 天 PWT 仍无明显差异($P < 0.05$);STZ 注射后第 14 天和第 21 天模型组 PWT 较正常组大鼠降低($P < 0.01$)(见图 2)。

2.3 各时间点不同大鼠 P2X3 阳性细胞表达情况

与正常组比,STZ 注射第 7、14、21 天后大鼠 L4、L5 DRG 上 P2X3 阳性细胞数明显增多($P < 0.01$),STZ 注射第 14、21 天后大鼠 L6 DRG 上 P2X3 阳性神经元数目明显增多($P < 0.01$)(见图 3)。



注:与正常组相比,** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 模型组与正常组大鼠不同时间点空腹血糖($n=6$)

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

(The same in the following figures)

Figure 1 Fasting blood glucose at different time points in model and control rats($n=6$)

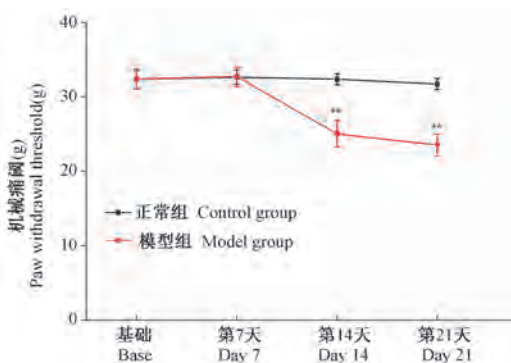


图 2 模型组与正常组大鼠不同时间点机械痛阈变化情况($n=6$)

Figure 2 Changes of PWT in model group and control group rats at different time points($n=6$)

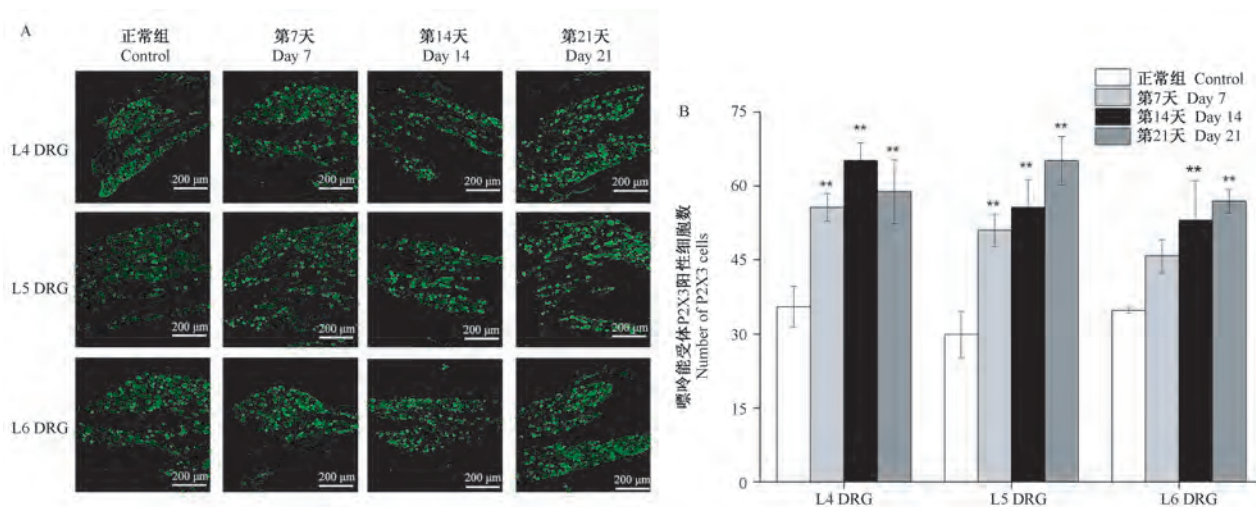


图 3 模型组大鼠 L4-L6 DRG 上 P2X3 表达情况和阳性细胞数统计结果($n=3$)

Figure 3 P2X3 expression on L4-L6 DRG and statistical results of positive cells in model group rats($n=3$)

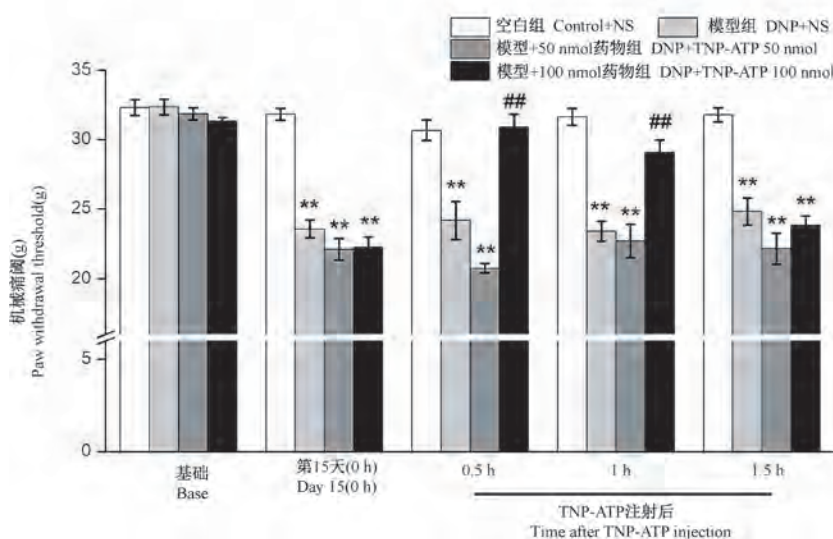
2.4 单次注射 TNP-ATP 对 DNP 大鼠模型的镇痛作用

为了探究 TNP-ATP 是否可以有效缓解糖尿病神经痛,在第 15 天给予单次 TNP-ATP (50、100 nmol)。在 TNP-ATP 注射前(0 h)、注射后 0.5、1、1.5 h 进行机械痛阈测试(见图 4)。与溶剂对照组相比,以 50 nmol 的剂量注射 TNP-ATP 对 PWT 无明显改善。但是,以 100 nmol 的剂量注射 TNP-ATP 可以显著增加大鼠 PWT,表明了 TNP-ATP 对 DNP 大鼠糖尿病神经痛有作用。PWT 的上调在

0.5 h 开始且达到峰值,并持续至少 1 h。

2.5 多次注射 TNP-ATP 对 DNP 大鼠模型的镇痛作用

为了确定 TNP-ATP 重复治疗是否对 DNP 大鼠具有镇痛作用,从第 14 天到第 21 天每天给予 TNP-ATP (50、100 nmol),连续 7 d。如图 5 所示,每日 1 次,重复注射 7 次 TNP-ATP (100 nmol) 可明显提高 DNP 大鼠的 PWT。同时,与溶剂对照组处理的 DNP 大鼠相比,重复给予低剂量的 TNP-ATP (50 nmol) 的 DNP 大鼠 PWT 无明显变化。



注:与正常+生理盐水组相比, ** $P < 0.01$; 与模型+生理盐水组相比, ## $P < 0.01$ 。(下同)

图 4 单次注射 TNP-ATP 对 DNP 大鼠机械痛阈的影响 ($n=6$)

Note. Compared with the control + NS group, ** $P < 0.01$. Compared with the DNP + NS group, ## $P < 0.01$. (The same in the following figure)

Figure 4 Effect of TNP-ATP Single injection on PWT in DNP rats ($n=6$)

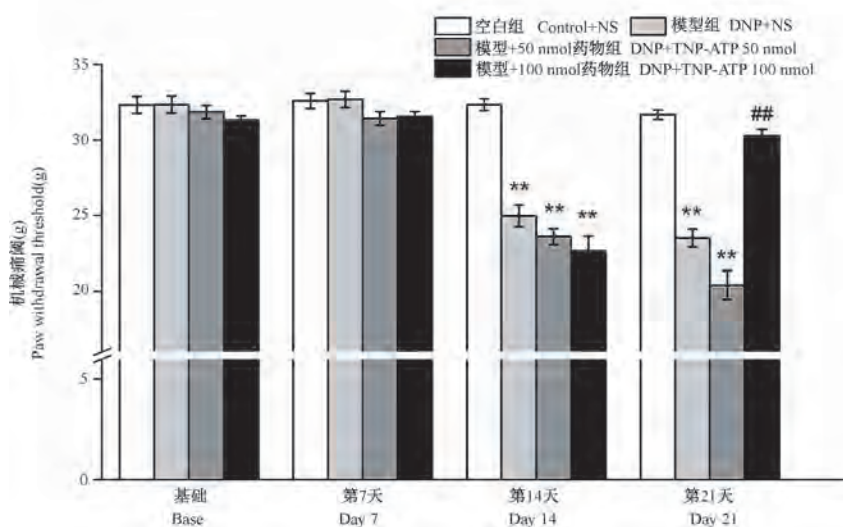


图 5 单次注射 TNP-ATP 对 DNP 大鼠机械痛阈的影响 ($n=6$)

Figure 5 Effect of TNP-ATP Multiple injection on PWT in DNP rats ($n=6$)

3 讨论

高血糖所引发的糖尿病周围神经病变发病中的细胞和分子机制仍未完全阐明,但大量文献证实,高血糖会导致周围神经末梢受损,导致糖尿病患者的长期疼痛。在这项研究中,以大鼠作为模型动物研究了 P2X3 的表达对糖尿病神经病理痛各个阶段的影响。结果显示,单次大剂量的 STZ 注射可诱导大鼠出现 1 型糖尿病症状。大鼠在 STZ 注射后 14 d,出现明显的 DNP 症状,即疼痛的超敏行为,如机械性异常性疼痛^[13-15],同时伴有 DRG 中 P2X3 表达升高。我们发现 P2X3 非特异性拮抗剂 TNP-ATP 可抑制 DNP 机械痛觉超敏反应。综上所述,这些发现表明 DNP 可能是由背根神经节 P2X3 表达升高所介导的。

目前人们已使用了多种不同的方法建立 DNP 动物模型。例如,自发性糖尿病动物,如 WBN/Kob 大鼠和 Ins2 Akita 小鼠^[16-17];或遗传缺陷导致的糖尿病模型,如 C57BL/Ks (db/db) 小鼠模型^[18];以及高脂高糖饮食或药物(四氧嘧啶或 STZ)诱导的糖尿病动物^[19-21]。然而,STZ 诱发的糖尿病操作简单,价格低廉,所以被广泛用于糖尿病模型建立。小鼠,大鼠和猴子等动物体内胰腺 β 细胞对 STZ 刺激相当敏感,无论是腹腔内(I.P.)或静脉内(I.V.)注射 STZ 均可对胰腺 β 细胞具有直接的细胞毒性,因此它们是诱导 1 型糖尿病的首选^[22-23]。因此,通过单次腹腔注射大剂量 STZ(65 mg/kg)建立了 1 型糖尿病大鼠模型。STZ 注射后,大鼠空腹血糖升高和 PWT 降低表明成功建立了 DNP 大鼠模型。

之前已有多项研究表明 P2X3 活化参与了神经病理痛^[24-25],P2X3 受体高选择性大量地表达于处理痛觉信息的 DRG 中小直径神经元上,激活后可使 Ca^{2+} 、 Na^{+} 内流, K^{+} 外流,广泛参与痛信号产生、传导和痛敏化调制,在多种神经痛敏化中起着重要作用^[26]。由于 P2X3 对极低浓度的 ATP 敏感,因此可以使用不同的 ATP 浓度来调节嘌呤能信号转导^[27]。ATP 通过改变感觉神经元电压门控离子通道活性(包括 CaV 和 NaV)来调节疼痛敏感性^[28-29],TNP-ATP 是 ATP 的结构类似物,其重要作用位点广泛分布于 P2X1 ~ P2X4 受体^[30],可竞争性结合于 P2X3 受体细胞外 ATP 结合位点,其抑制作用起效快、可逆,且不表现出使用依赖性,是理想的 P2X3 受体抑制剂^[31]。

在本研究中,发现模后 7 d 时,DRG 中 P2X3 表达有一定程度增多,而此时大鼠痛阈并未出现明显变化;而模后 14 ~ 21 d,随着 P2X3 表达逐渐增加,外周敏化逐渐形成,大鼠 PWT 明显下降。同时,发现较低剂量的 TNP-ATP 无法缓解 STZ 诱导的糖尿病大鼠的机械痛觉超敏反应,而当施用高剂量 TNP-ATP 时,却可有效的缓解疼痛,说明 P2X3 可能参与了大鼠糖尿病神经病理痛。

综上所述,腹腔注射 STZ 可成功诱导 DNP 大鼠模型,背根神经节 P2X3 表达上调可能参与糖尿病神经痛形成,为 DNP 的临床治疗提供了崭新的策略与思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Davies M, Brophy S, Williams R, et al. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(7): 1518-1522.
- [2] Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128: 40-50.
- [3] Callaghan BC, Feldman EL. Painful diabetic neuropathy: many similarly effective therapies with widely dissimilar costs [J]. *Ann Intern Med*, 2014, 161(9): 674-675.
- [4] 蔡杨乾, 施任怡, 周游, 等. 外周 P2X3 受体介导不同类型疼痛的作用差异探析 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26(5): 372-375.
Cai YQ, Shi RY, Zhou Y, et al. Analysis on the difference of peripheral P2X3 receptor mediating different types of pain [J]. *Chin J Pain Med*, 2020, 26(5): 372-375.
- [5] Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, et al. Ca^{2+} waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation [J]. *Biochem J*, 2004, 380(2): 329-338.
- [6] Burnstock G. Introduction to purinergic signalling [J]. *Methods Molecular Biol*, 2020, 2041: 1-15.
- [7] Ataei N, Sabzghabae AM, Movahedian A. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is a ubiquitous molecule in human long-term memory synaptic plasticity: A systematic review [J]. *Int J Prev Med*, 2015, 6: 88.
- [8] Pasqualetto G, Brancale A, Young MT. The molecular determinants of small-molecule ligand binding at P2X receptors [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 58.
- [9] Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells [J]. *Pharmacol Rev*, 1970, 22(4): 185-518.
- [10] Wang FY, Garyantes T. Improving the reliability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8054073.
- [11] Nath S, Ghosh SK, Choudhury Y. A murine model of type 2

- diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 84: 20–30.
- [12] Zhou YF, Ying XM, He XF, et al. Suppressing PKC-dependent membrane P2X3 receptor upregulation in dorsal root ganglia mediated electroacupuncture analgesia in rat painful diabetic neuropathy [J]. *Purinergic Signal*, 2018, 14(4): 359–369.
- [13] Cui YY, Xu H, Wu HH, et al. Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102052.
- [14] Ali G, Subhan F, Abbas M, et al. A streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain model for static or dynamic mechanical allodynia and vulvodinia: validation using topical and systemic gabapentin [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015, 388(11): 1129–1140.
- [15] Gris G, Portillo-Salido E, Aubel B, et al. The selective sigma-1 receptor antagonist E-52862 attenuates neuropathic pain of different aetiology in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24591.
- [16] Ueno Y, Koike H, Annoh S, et al. Effects of beraprost sodium, a prostacyclin analogue, on tail flick response in two models of diabetic-neuropathy in rats and its mechanism [J]. *Life Sci*, 1996, 59(9): 105–110.
- [17] Vastani N, Guenther F, Gentry C, et al. Impaired nociception in the diabetic $Ins^{2+}/Akita$ mouse [J]. *Diabetes*, 2018, 67(8): 1650–1662.
- [18] Hinder LM, Vincent AM, Hayes JM, et al. Apolipoprotein E knockout as the basis for mouse models of dyslipidemia-induced neuropathy [J]. *Exp Neurol*, 2013, 239: 102–110.
- [19] Alles SRA, Smith PA. Etiology and pharmacology of neuropathic pain [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(2): 315–347.
- [20] Abdullah KM, Alam MM, Iqbal Z, et al. Therapeutic effect of vitamin B3 on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced diabetic rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 1223–1231.
- [21] Saika F, Kiguchi N, Matsuzaki S, et al. Inflammatory macrophages in the sciatic nerves facilitate neuropathic pain associated with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 368(3): 535–544.
- [22] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015, 70: 5.47. 1–5.47. 20.
- [23] Lazar M, Golden P, Furman M, et al. Resistance of the rabbit to streptozotocin [J]. *Lancet*, 1968, 2(7574): 919.
- [24] Peng H, Zou L, Xie J, et al. lncRNA NONRATT021972 siRNA decreases diabetic neuropathic pain mediated by the P2X3 receptor in dorsal root ganglia [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 511–523.
- [25] Li L, Sheng X, Zhao S, et al. Nanoparticle-encapsulated emodin decreases diabetic neuropathic pain probably via a mechanism involving P2X3 receptor in the dorsal root ganglia [J]. *Purinergic Signal*, 2017, 13(4): 559–568.
- [26] Migita K, Moriyama T, Koguchi M, et al. Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 452(2): 200–203.
- [27] de Melo Aquino B, da Silva dos Santos DF, Jorge CO, et al. P2X3 receptors contribute to muscle pain induced by static contraction by a mechanism dependent on neutrophil migration [J]. *Purinergic Signal*, 2019, 15(2): 167–175.
- [28] McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception [J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61(1): 835–856.
- [29] Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, et al. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II: P2X3 in sensory neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 1998, 10(11): 3470–3478.
- [30] Jarvis MF, Wismer CT, Schweitzer E, et al. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibaaron blue [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 132(1): 259–269.
- [31] Burgard EC, Niforatos W, van Biesen T, et al. Competitive antagonism of recombinant P2X2/3 receptors by 2,3-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5-triphosphate (TNP-ATP) [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(6): 1502–1510.

[收稿日期] 2021-03-03

熊程,赵英政,陶映君,等.壳聚糖对PM_{2.5}所致小鼠急性肺损伤的干预作用[J].中国实验动物学报,2021,29(5):600-605.
Xiong C, Zhao YZ, Tao YJ, et al. Intervention effect of chitosan on acute lung injury induced by PM_{2.5} in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 600-605.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.006

壳聚糖对 PM_{2.5} 所致小鼠急性肺损伤的干预作用

熊程,赵英政,陶映君,徐光翠*

(新乡医学院公共卫生学院,河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 探讨壳聚糖对 PM_{2.5}所致小鼠急性肺损伤的干预作用。**方法** 将 44 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组,即对照组、PM_{2.5}组、壳聚糖组及壳聚糖+PM_{2.5}组。壳聚糖+PM_{2.5}、壳聚糖组提前 2 周灌胃壳聚糖,对照组和 PM_{2.5}组灌胃蒸馏水,每天 1 次。2 周后 PM_{2.5}暴露组气管滴注 PM_{2.5},对照组和壳聚糖组滴注生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。末次染毒 24 h 后处死动物。HE 染色形态学观察,分光光度法测定肝丙二醛(MDA)、肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白(TP)和乳酸脱氢酶(LDH)水平;ELISA 法测定 BALF 和血清中白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-8(IL-8)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达。**结果** PM_{2.5}组肺泡间隔显著增宽,其内有明显的淋巴、浆细胞浸润;相对于 PM_{2.5}组,壳聚糖+PM_{2.5}组肺泡间隔明显变窄,其内淋巴、浆细胞浸润明显减少。与对照组比较,PM_{2.5}组 MDA、TP、LDH、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 明显升高($P < 0.05$);与 PM_{2.5}组比较,提前补充壳聚糖,MDA、TP、LDH、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 明显降低($P < 0.05$)。**结论** 提前摄入一定剂量的壳聚糖,对 PM_{2.5}所致肺损伤有一定的干预作用。

【关键词】 PM_{2.5};壳聚糖;肺损伤;氧化应激;炎症反应;干预作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0600-06

Intervention effect of chitosan on acute lung injury induced by PM_{2.5} in mice

XIONG Cheng, ZHAO Yingzheng, TAO Yingjun, XU Guangcui*

(Department of Public Health Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Corresponding author: XU Guangcui. E-mail: xugc166@163.com

【Abstract】 Objective To explore the intervention effect of chitosan on acute lung injury induced by particulate matter with a diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ (PM_{2.5}) in mice. **Methods** Forty-four specific pathogen-free male C57BL/6J mice were randomly divided into four groups; control, PM_{2.5}, chitosan and chitosan+PM_{2.5} groups. Animals from the chitosan+PM_{2.5} and chitosan groups were intragastrically administered chitosan daily for 2 weeks, and animals from the control and PM_{2.5} exposure groups were intragastrically administered distilled water once a day. After 2 weeks, the PM_{2.5} group was exposed to PM_{2.5} (4 mg/kg BW) via intratracheal instillation, whereas the control and chitosan groups were exposed to tracheal inhalation of normal saline, daily for 1 week. Animals were examined 24 h after the last exposure. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for morphological observation. The levels of malondialdehyde (MDA), total protein (TP) and lactate dehydrogenase (LDH) in alveolar lavage fluid (BALF) and liver samples were determined by spectrophotometry. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in BALF and serum were determined by ELISA. **Results** HE staining showed that the alveolar septum was significantly widened in PM_{2.5} group, and there was obvious infiltration of lymphoid and plasma cells. The lung septum was markedly narrowed in the chitosan+PM_{2.5} group compared with the PM_{2.5} group, and infiltration of lymph and plasma cells was

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81703183),河南省科技厅科技攻关项目(182102310078),研究生科研创新支持计划项目(YJSCX201949Y)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81703183), Scientific and Technological Research Project of Henan Provincial Science and Technology Department(182102310078), Research and Innovation Support Program for Graduate Students(YJSCX201949Y).

【作者简介】熊程(1991—),男,硕士,研究方向:环境污染与健康研究。Email: 821925014@qq.com

【通信作者】徐光翠(1977—),女,副教授,硕士,研究方向:环境污染与健康研究。Email: xugc166@163.com

significantly decreased in the chitosan+PM_{2.5} group versus the PM_{2.5} group. Compared with the control group, LDH, MDA, TP, TNF- α , IL-1 β and IL-8 were significantly increased in the PM_{2.5} group ($P < 0.05$). Compared with the PM_{2.5} group, the levels of LDH, MDA, TP, TNF- α , IL-1 β and IL-8 were significantly decreased in the chitosan+PM_{2.5} group ($P < 0.05$). **Conclusions** The intake of a certain dose of chitosan had a positive intervention effect on lung injury caused by PM_{2.5}.

【Keywords】 PM_{2.5}; chitosan; lung injury; oxidative stress; inflammatory response; intervention effect

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

近年来,以 PM_{2.5} 浓度严重超标为特征的雾霾污染仍是空气污染的主要原因。PM_{2.5} 是空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的悬浮细颗粒物,高浓度 PM_{2.5} 是雾霾的主要成因。我国 PM_{2.5} 的高排放与我国经济的快速发展、产业和能源结构的不合理、城市化进程的加速以及汽车保有量的快速上升等因素有关。因此,治理 PM_{2.5} 污染将是一项长期而又困难的工作,这就意味着我国大多数城市居民在未来相当长的时间内都将生活在 PM_{2.5} 超标的环境中。据估计,在全世界范围内,每年空气污染暴露造成约 700 万人过早死亡,3% 的伤残调整生命年减少^[1]。PM_{2.5} 由于其形状不规则、粒径小,可以直接进入肺部,并在大气中悬浮时间较长,能够吸附大量毒性化合物等诸多特点,会对人体造成严重危害。空气中 PM_{2.5} 的浓度与呼吸系统疾病、哮喘等的发病率、死亡率有紧密的联系^[2-3]。PM_{2.5} 容易滞留在终末细支气管和肺泡中,从而刺激机体肺部或全身发生炎症和氧化应激,造成肺部损伤^[4]。

虽然我国颁布了一系列控制空气污染的法规,这势必会导致 PM_{2.5} 水平在今后急剧减少。但目前人们仍然暴露于较高的空气污染水平,而且比目前环保部门规定的标准要高许多倍。如果膳食补充剂或药物制剂可以减轻空气污染对健康的不利影响,那么居住生活在空气高污染地区的民众其健康可能会得到一定程度的保护。壳聚糖(chitosan, CTS)是甲壳素脱乙酰基后的降解产物,是自然界中唯一大量存在的碱性氨基多糖。研究表明,壳聚糖具有清除自由基、保护机体免受过氧化损伤、调节血脂、保护肝、进行免疫调节等功能^[5-6]。本研究采用动物试验,小鼠提前 2 周摄入一定剂量壳聚糖,之后气管滴注 PM_{2.5},评估短期 PM_{2.5} 重复暴露对成年小鼠的肺健康效应,探讨小鼠补充壳聚糖后是否可以减轻 PM_{2.5} 暴露所致急性肺损伤的影响。这一研究结果将为减轻空气污染对大众健康的一种保护机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

44 只 8 周龄健康 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 19 ~ 26 g,从北京维通利华有限公司购买【SCXK(京)2016-0002】,饲养于新乡医学院公共卫生学院具有独立通风笼盒(IVC)的实验动物房【SYXK(豫)2016-0006】。1 周适应期后,随机分为 4 组,即对照组、PM_{2.5} 组、壳聚糖组及壳聚糖+PM_{2.5} 组,每组 11 只。壳聚糖组及壳聚糖+PM_{2.5} 组动物提前 2 周灌胃壳聚糖,剂量为 200 mg/kg,采用等容量灌胃法(0.2 mL/10 g BW),对照组和 PM_{2.5} 组灌胃相同剂量蒸馏水,每天 1 次,持续 2 周。PM_{2.5} 后,PM_{2.5} 组、壳聚糖+PM_{2.5} 组小鼠气管滴注 PM_{2.5} (4 mg/kg),对照组和壳聚糖组气管滴注 0.9% 生理盐水(saline),每天 1 次,连续 7 d。动物自由摄食(上海斯莱康 SPF 级小鼠专用饲料)、饮水,室温 20℃ ~ 25℃,相对湿度 60% ~ 70%,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。所有操作均符合新乡医学院伦理委员会伦理学要求(审批号:XYLL-2017086)。

1.1.2 主要试剂与仪器

水溶性壳聚糖购自上海源叶生物科技有限公司;总蛋白(total protein, TP)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)等检测试剂购自南京建成生物技术有限公司(批号分别为 A045-3-2、A020-1-2、A003-1-2);白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等试剂盒均由北京索莱宝科技有限公司提供(批号分别为 SEKM-0002、SEKM-0046、SEKM-0034);TE-6070 PM_{2.5} 大流量采样器(美国 TISCH 公司),酶标仪(美国 Thermo 公司),电子精密天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司),超声波清洗机(郑州生元仪器有限公司),冷冻干燥器(北京亚星仪科有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 PM_{2.5}采样

选取新乡医学院科技楼七楼楼顶(北纬 N35°17'11.17"、东经 E113°55'59.12")作为采样点。将石英膜置于 TISCH 大流量颗粒物采样器进行采样。将采样膜剪成约 4 cm × 4 cm 的正方形置于培养皿,加入适量的超纯水。利用 KQ-500E 型超声波震荡仪震荡培养皿,冷冻干燥法采集培养皿内的 PM_{2.5}。

1.2.2 动物处理与样本采集

末次染毒 24 h 后,称重,用 4% 异氟烷麻醉动物,股动脉取血。处死动物,分离肾及肝并称重,计算脏器系数:脏器质量(g)/体重(100 g),分离血清。结扎右肺,取右肺下叶,多聚甲醛固定,苏木精-伊红(HE)染色。用预冷的 PBS 灌洗左肺,收集 BALF。采用 Bradford 法测定 TP 和 MDA 含量;利用分光光度法测定 LDH 活性;ELISA 法测定 TNF-α、IL-1β 和 IL-8 等炎症因子水平。

1.3 统计学分析

计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 21.0 统计软件分析,对正态分布资料,多组间均数比较采用单因素方差分析;若方差齐,两两比较采用 LSD 检验;若方差不齐,采用 Dunnett T3 检验。对非正态分布资料,多组间均数比较采用非参数检验——秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。用 GraphPad Prism 8.0 绘制统计分析图。

2 结果

2.1 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠体重、脏器质量及其脏器系数的影响

以体重、肝重、肾重及其脏器系数作为测量指标进行单因素方差分析。与对照组比,PM_{2.5}

组小鼠体重、肝重、肾重及其脏器系数明显降低,具有统计学意义($P < 0.05$);壳聚糖组体重、肝重、肾重及其脏器系数与对照组比无明显差异($P > 0.05$)。当小鼠提前摄入一定剂量的壳聚糖,2 周后暴露 PM_{2.5},与不摄入壳聚糖的 PM_{2.5} 组比,壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠体重、肝重和肝脏器系数均有所升高,具有统计学意义($P < 0.05$),但肾及其脏器系数无明显差异($P > 0.05$);与壳聚糖组比,壳聚糖+PM_{2.5}组肝重降低,具有统计学意义($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠肺 HE 染色结果比较

对照组和壳聚糖组小鼠肺组织未见明显异常。与对照组比较,PM_{2.5}组肺泡间隔显著增宽,出现炎症,其内有明显的淋巴细胞、浆细胞浸润;与 PM_{2.5} 组比较,壳聚糖+PM_{2.5}组肺间隔明显变窄,其内淋巴细胞、浆细胞浸润明显减少(见图 1)。

2.3 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 的影响

以 TP 和 LDH 作为测量指标进行单因素方差分析。与对照组比较,PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 的含量明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);壳聚糖组小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 含量与对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。当小鼠提前摄入一定剂量的壳聚糖,2 周后暴露 PM_{2.5},与没有摄入壳聚糖的 PM_{2.5}组小鼠比较,壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 的含量明显下降,具有统计学意义($P < 0.05$);与壳聚糖组比较,壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 的含量有所升高,具有统计学意义($P < 0.05$)(见图 2)。

2.4 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠肝 MDA 的影响

以 MDA 作为测量指标进行单因素方差分析。

表 1 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠体重、脏器质量及其脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 1 Effects of chitosan on body weight, organ mass and organ coefficient of mice exposed to PM_{2.5}($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别 Groups	体重(g) Weight(g)	肝重(g) Liver weight(g)	肝系数(g/100 g) Liver coefficient(g/100 g)	肾重(g) Kidney weight(g)	肾系数 Kidney coefficient(g/100 g)
对照组 Control group	22.88 ± 2.24	1.20 ± 0.18	5.88 ± 0.85	0.27 ± 0.04	1.28 ± 0.11
PM _{2.5} 组 PM _{2.5} group	19.07 ± 1.58 [#]	0.83 ± 0.11 [#]	4.33 ± 0.31 [#]	0.23 ± 0.03 [#]	1.12 ± 0.07 [#]
壳聚糖组 Chitosan group	22.85 ± 2.05	1.17 ± 0.14	5.89 ± 0.93	0.27 ± 0.02	1.24 ± 0.06
壳聚糖+PM _{2.5} 组 Chitosan+PM _{2.5} group	21.18 ± 1.28 [*]	1.06 ± 0.12 ^{*△}	5.03 ± 0.67 [*]	0.25 ± 0.02	1.18 ± 0.07

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$;与 PM_{2.5}组比较,^{*} $P < 0.05$;与壳聚糖组比较,[△] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, [#] $P < 0.05$. Compared with PM_{2.5} group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with chitosan group, [△] $P < 0.05$.

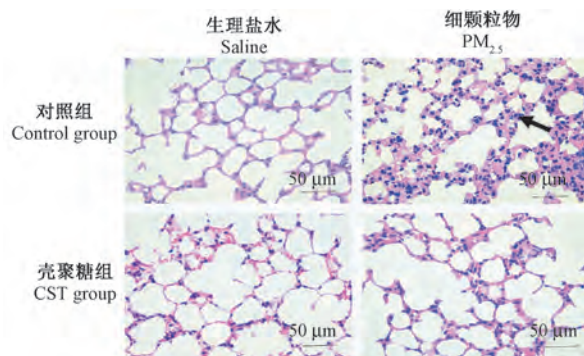


图 1 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠肺 HE 染色比较

Figure 1 Comparison of HE staining of PM_{2.5} exposed mice lung with chitosan

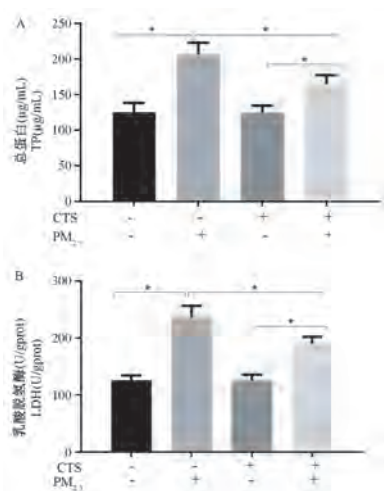


图 2 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠 BALF 中 TP 和 LDH 的影响

Figure 2 Effect of chitosan on TP and LDH in BALF of mice exposed to PM_{2.5}

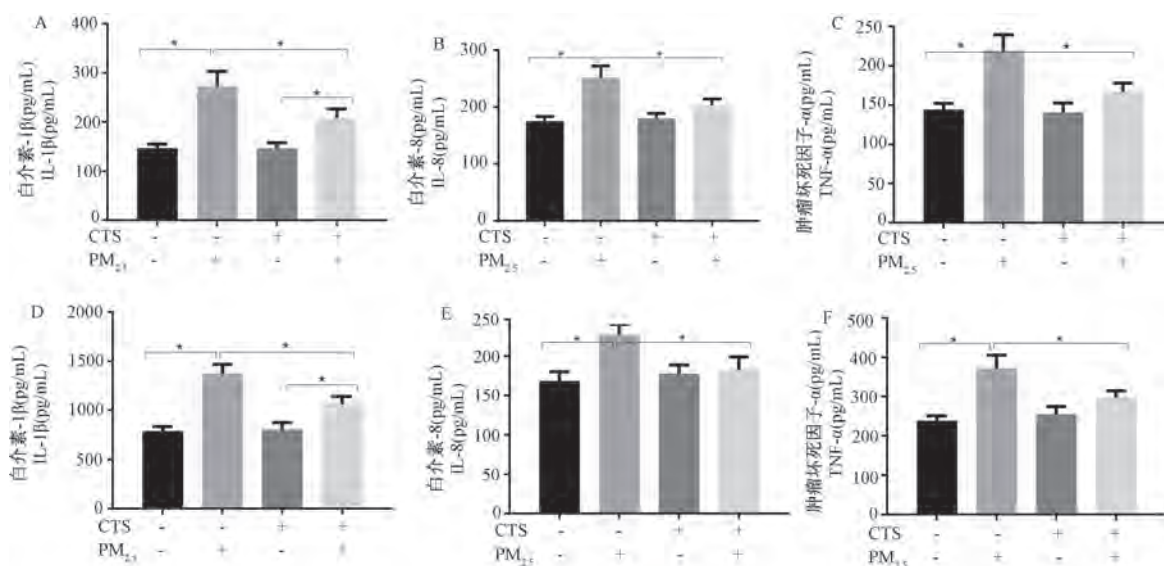


图 4 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠 BALF 和血清炎症因子的影响

Figure 4 Effects of chitosan on BALF and serum inflammatory factors in mice exposed to PM_{2.5}

与对照组比较, PM_{2.5}组小鼠肝中 MDA 含量明显升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 壳聚糖组小鼠肝中 MDA 含量与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。与 PM_{2.5}组比较, 壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠肝 MDA 含量明显下降, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与壳聚糖组比较, 壳聚糖+PM_{2.5}组肝中 MDA 含量有所升高 ($P < 0.05$) (见图 3)。

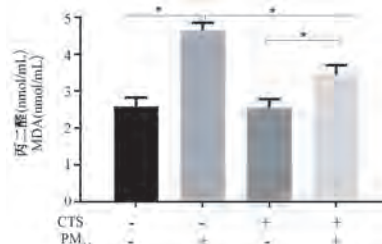


图 3 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠肝 MDA 的影响

Figure 3 Effect of chitosan on MDA in liver of mice exposed to PM_{2.5}

2.5 壳聚糖对 PM_{2.5}暴露小鼠 BALF 及血清中炎症因子的影响

以 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 作为测量指标进行单因素方差分析。从图 4 可见知, 与对照组比较, PM_{2.5}组小鼠 BALF (图 4A, 4B, 4C) 和血清中 (图 4D, 4E, 4F) 炎症因子 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 水平明显升高, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 壳聚糖组小鼠 BALF 和血清中 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 表达水平与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。与 PM_{2.5}组比较, 壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠 BALF 和血清中 IL-1β、IL-8 和 TNF-α 明显减少, 具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与

壳聚糖组比较,壳聚糖+PM_{2.5}组 BALF 及血清中 IL-1 β 水平有所升高($P < 0.05$),但 IL-8 和 TNF- α 均无显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

PM_{2.5}暴露对小鼠有肺损伤,影响小鼠 BALF 中 TP 和 LDH,肝 MDA, BALF 及血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 水平。提前摄入一定剂量的壳聚糖对 PM_{2.5}所致肺损伤有一定的干预作用,主要从抑制氧化应激和改善肺部炎症反应等方面促进损伤修复。

本研究采用动物实验,通过气管滴注法使小鼠暴露 PM_{2.5},评估 PM_{2.5}短期重复剂量暴露是否对小鼠造成急性肺损伤,并给动物提前补充壳聚糖,观察壳聚糖是否可以减轻 PM_{2.5}暴露所致的毒效应。结果显示,与对照组比较,小鼠暴露 PM_{2.5}后,小鼠体重、肝重、肾重以及脏器系数明显下降,这与李星辉等^[7]研究结果一致。提示短期重复剂量 PM_{2.5}暴露对机体有一定的毒效应。当小鼠提前摄入一定剂量的壳聚糖,2 周后暴露 PM_{2.5},与没有摄入壳聚糖的 PM_{2.5}组小鼠比较,壳聚糖+PM_{2.5}组小鼠体重、肝重和脏器系数均有所升高。提示动物提前补充壳聚糖对 PM_{2.5}所致的损伤有一定的缓解作用。可能与 PM_{2.5}激发的氧化应激有关,壳聚糖具有清除自由基、保护机体免受过氧化损伤等作用^[5],动物提前摄入壳聚糖可能保护线粒体免受氧化应激,从而维系了相对正常三羧酸循环和代谢水平。

小鼠肺切片显示,PM_{2.5}染毒后肺泡间隔显著增宽,出现明显的炎症改变,而壳聚糖在一定程度上能抑制肺部的炎症作用;与 PM_{2.5}组比较,壳聚糖+PM_{2.5}组肺泡间隔明显变窄,其内淋巴细胞、浆细胞浸润明显减少。上述结果与文献报道的其它抗氧化剂的干预效果一致^[8-9]。

PM_{2.5}诱导的氧化应激在颗粒污染物所致呼吸系统急性效应中发挥重要作用^[10-11]。MDA 是脂质过氧化作用的最终产物,也是机体氧化损伤的主要标志物。MDA 含量的测定可以直接反映机体受到氧化损伤的程度^[12-13],其容易引起细胞膜发生脂质过氧化损伤,导致膜的功能损伤或丧失,进而使得细胞内 LDH 和 TP 漏出^[14]。LDH 是反映细胞膜损伤的早期敏感指标,是细胞毒性的标志物;TP 是反应肺部血管通透性的指标,TP 水平可反映肺泡上皮-毛细血管屏障损伤程度^[15]。本研究发现,染毒后肺泡灌洗液中的 LDH、TP 和肝中 MDA 明显升高,

而提前摄入一定剂量的壳聚糖后,以上指标不同程度降低,由此可推测 PM_{2.5}可使机体产生氧化应激,导致细胞膜的完整性发生改变,影响肺部血管通透性;而壳聚糖具有的抗氧化功效可减轻由 PM_{2.5}造成的氧化损伤,这与其它文献的研究结果基本一致^[5]。

PM_{2.5}能够诱发肺部炎症,促进呼吸道细胞释放炎症介质如 IL-8 及 TNF- α 等^[16-17]。TNF- α 是生物体内主要的促炎因子和免疫调节因子,主要由单核巨噬细胞产生,参与机体的急、慢性炎症过程^[18]。研究发现壳聚糖能增强静息中性粒细胞的活性,抑制中性粒细胞的过度活化、细胞中 IL-8 和 TNF- α 的分泌^[19-21]。本研究发现小鼠暴露 PM_{2.5},其 BALF 及血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 水平明显升高,提前摄入一定剂量的壳聚糖能降低其表达,对 TNF- α 和 IL-8 的抑制作用尤为明显,因此提示壳聚糖通过对促炎因子表达的抑制作用可缓解 PM_{2.5}诱发的肺部炎症反应,改善炎症反应所致肺损伤^[22-23]。

参 考 文 献(References)

- [1] Rider CF, Carlsten C. Air pollution and DNA methylation: effects of exposure in humans [J]. Clin Epigenetics, 2019, 11 (1): 131-145.
- [2] Lu Xi, Li RQ, Yan XX. Airway hyperresponsiveness development and the toxicity of PM_{2.5} [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(6): 6374-6391.
- [3] Wang Y, Zhong Y, Hou T, et al. PM_{2.5} induces EMT and promotes CSC properties by activating Notch pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 178: 159-167.
- [4] Xing YF, Xu YH, Shi MH, et al. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system [J]. J Thorac Dis, 2016, 8(1): 69-74.
- [5] 徐光翠, 高启禹, 赵英政, 等. 壳聚糖对镉致大鼠肝损伤的拮抗作用 [J]. 工业卫生与职业病, 2012, 38(5): 273-276. Xu GC, Gao QY, Zhao YZ, et al. Antagonistic effect of chitosan on cadmium induced liver injury in rats [J]. Ind Hyg Occup Dis, 2012, 38(5): 273-276.
- [6] Park Y, Kang E, Kwon OJ, et al. Ionically crosslinked Ad/chitosan nanocomplexes processed by electrospinning for targeted cancer gene therapy [J]. J Control Release, 2010, 148(1): 75-82.
- [7] 李星辉, 雷林峰, 乔燕, 等. 沙尘暴 PM_{2.5} 颗粒致大鼠炎症反应和心脏损伤的研究 [J]. 心电与循环, 2019, 38(6): 463-466, 470. Li XH, Lei LF, Qiao Y, et al. Study on inflammatory response and cardiac injury induced by dust storm PM_{2.5} particles in rats [J]. J Electrocardiol Circ, 2019, 38(6): 463-466, 470.
- [8] 别心坦. 麻杏石甘汤联合抗生素治疗伴心肌损害肺炎支原体肺炎疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(17):

- 1876–1879.
- Bie XT. The therapeutic effect of Maxingshigan decoction combined with antibiotics on *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with myocardial damage [J]. *Modern J Integr Tradit Chin Western Med*, 2016, 25(17): 1876–1879
- [9] Yan XD, Wang QM, Tie C, et al. Polydatin protects the respiratory system from PM exposure [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40030.
- [10] Jiang M, Li D, Piao J, et al. Nrf2 modulated the restriction of lung function via impairment of intrinsic autophagy upon real-ambient PM_{2.5} exposure [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 408: 124903.
- [11] 邓元荣, 李泳宁, 黄晓敏, 等. 大气细颗粒物吸入动物模型建立及适用性评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(9): 42–49.
- Deng YR, Li YN, Huang XM, et al. Animal model establishment and applicability evaluation of atmospheric fine particle intake [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(9): 42–49.
- [12] 赵云, 尤会会, 沈世萍, 等. 甲醛经口染毒致小鼠脏器损伤和炎症反应的研究 [J]. *中国环境科学*, 2016, 36(3): 935–942.
- Zhao Y, You HH, Shen SP, et al. Study on the viscera injury and inflammatory response of mice induced by oral exposure of formaldehyde [J]. *Chin Environ Sci*, 2016, 36(3): 935–942.
- [13] He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells [J]. *Appl Toxicol*, 2017, 37(10): 1203–1218.
- [14] Jin X, Su H, Ding G, et al. Exposure to ambient fine particles causes abnormal energy metabolism and ATP decrease in lung tissues [J]. *Chemosphere*, 2019, 224: 29–38.
- [15] Xu X, Xu H, Qimuge A, et al. MAPK/AP-1 pathway activation mediates AT1R upregulation and vascular endothelial cells dysfunction under PM_{2.5} exposure [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 188–194.
- [16] Yang J, Huo TT, Zhang X, et al. Oxidative stress and cell cycle arrest induced by short-term exposure to dustfall PM_{2.5} in A549 cells [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(23): 22408–22419.
- [17] Fu H, Liu X, Li W, et al. PM_{2.5} exposure induces inflammatory response in macrophages via the TLR4/COX-2/NF-κB pathway [J]. *Inflammation*, 2020, 43(5): 1948–1958.
- [18] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM_{2.5} 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 33–39.
- Zhao P, Tan H, Peng KN, et al. Effects of fine particulate matter PM_{2.5} on atherosclerosis in ApoE gene knockout mice and its mechanism [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 33–39.
- [19] Tillie LI, Guery BP, Janin A, et al. Chronic bronchial allergic inflammation increases alveolar liquid clearance by TNF-α-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(6): 1303–1309.
- [20] He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. PM_{2.5}-induced lung inflammation in mice: differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells [J]. *Appl Toxicol*, 2017, 37(10): 1203–1218.
- [21] 路雨, 李瑶, 胡赢丹, 等. 邻苯二甲酸二异癸酯对小鼠学习记忆的影响 [J]. *中国环境科学*, 2018, 38(1): 361–368.
- Lu Y, Li Y, Hu YD, et al. Effects of diisononyl phthalate on learning and memory in mice [J]. *Chin Environ Sci*, 2018, 38(1): 361–368.
- [22] Nie JY, Xie HB, Zhang MY, et al. Effective and facile fabrication of MOFs/cellulose composite paper for air hazards removal by virtue of in situ synthesis of MOFs/chitosan hydrogel [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 250: 116955.
- [23] Zhang B, Zhang ZG, Yan X, et al. Chitosan nanostructures by in situ electrospinning for high-efficiency PM_{2.5} capture [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(12): 4154–4161.

[收稿日期] 2021-01-22

孙静,陈奕龄,丁玉春,等. 环境空气暴露对猪粪悬液中菌群及代谢物的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 606-617.
Sun J, Chen YL, Ding YC, et al. Effects of aerobic and anaerobic FMT preparation on fecal microbiota and metabolite profiles in swine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 606-617.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.007

环境空气暴露对猪粪悬液中菌群及代谢物的影响

孙静^{1,2,3,4}, 陈奕龄^{1,2,3,4}, 丁玉春^{1,2,3,4}, 葛良鹏^{1,2,3,4*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460;
3. 重庆市养猪科学重点实验室, 重庆 402460; 4. 重庆市医用动物资源开发与利用工程技术研究中心, 重庆 402460)

【摘要】 目的 研究环境空气暴露对制备的粪悬液中微生物及代谢物的影响。方法 收集无特定病原体级巴马小型猪粪便;(1)未处理组(C组);(2)有氧暴露处理组(T1组);(3)厌氧暴露处理组(T2组)。利用扩增子测序技术和非靶向代谢组比较各组粪样的微生物群落组成及代谢产物。结果 (1)T1和T2组粪悬液制备操作均保存了新鲜粪便中(C组)的全部细菌门,仍以厚壁菌门和拟杆菌门细菌为主,但显著降低了密螺旋体属细菌的丰度;(2)猪粪便中以子囊菌门、担子菌门真菌为主,粪悬液制备显著提高了猪粪便中子囊菌门真菌的丰度;有氧暴露处理去除了猪粪便中节单菌属真菌。(3)LC-MS结果显示:正负离子模式下各识别出402、195种代谢物,其中T1:C代谢集、T2:C代谢集的差异代谢物分别为155和201个。结论 猪粪悬液制备时间虽然不长,但有氧暴露对样本中真菌群落丰度的影响高于厌氧暴露,都显著地降低 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 等有害菌群和相关代谢产物的丰度,提高了FMT的安全性。

【关键词】 有氧暴露;厌氧暴露;粪悬液制备;SPF猪;粪便菌群;代谢物图谱

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0606-12

Effects of aerobic and anaerobic FMT preparation on fecal microbiota and metabolite profiles in swine

SUN Jing^{1,2,3,4}, CHEN Yiling^{1,2,3,4}, DING Yuchun^{1,2,3,4}, GE Liangpeng^{1,2,3,4*}

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China. 2. Key Laboratory of Pig Industry Science, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460. 3. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing 402460.
4. Technical Engineering Center for the Development and Utilization of Medical Animal Resources, Chongqing 402460)

Corresponding author: GE Liangpeng. E-mail: geliangpeng1982@163.com

【Abstract】 Objective Fecal microbiota transplantation (FMT) is a promising, but immature intervention in the current pig production. The aim of this study was to investigate the effects of aerobic and anaerobic FMT preparation (T1 group and T2 group, respectively) on fecal microbiota and metabolite profiles of SPF Bama mini pigs. **Methods** Amplicon sequencing and untargeted metabolomics method were used to reveal the effects of aerobic and anaerobic FMT preparation (T1 group and T2 group, respectively) on fecal microbiota and metabolite profiles of SPF Bama mini pigs. **Results** (1) The two FMT preparation method preserved all the bacterial phyla in untreated pig slurries (C group). *Firmicutes* and *Bacteroidetes* constituted the top two phyla in the gut microbiota in all groups, and FMT preparation resulted in a significant decrease of *Treponema* bacteria. (2) In untreated pig slurries, the two most abundant fungal phyla were *Ascomycota* and *Basidiomycota*. FMT preparation significantly increased the relative abundance of *Ascomycota*, and aerobic FMT preparation removed the *Wallemia* genus. These changes in microbial community did not affect the functional contributions.

【基金项目】 重庆市科研机构绩效激励引导专项(19238,20524),重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0413)。

Funded by Performance Incentive Guidance for Scientific Research Institution of Chongqing Science & Technology Commission(19238,20524), the National Natural Science Foundation for Surface Project of Chongqing(cstc2020jcyj-msxmX0413)。

【作者简介】 孙静(1985—),女,副研究员,博士,研究方向:无菌动物的培育与应用。Email:sunjing85026@163.com

【通信作者】 葛良鹏(1982—),男,研究员,博士,研究方向:动物资源的创新化利用。Email:geliangpeng1982@163.com

(3) A total of 402 and 195 characteristic metabolites were respectively detected by positive and negative mode liquid chromatography-mass spectrometry, including Lipids and lipid molecules, and Organoheterocyclic compounds. Disturbance of amino acid metabolism, and lipid metabolism were the most significant in T1 versus C comparison, and T2 versus C comparison, 155 and 201 confirmed differential metabolites using reference compounds were identified, respectively. Highly positive correlated metabolites with Spearman correlation coefficient $r > 0.6$ are connected with *Treponema_2* in T1 versus C and T2 versus C comparisons, and highly negative correlated metabolites with $r < -0.4$ are connected with *Ruminococcaceae_NK4A214* group in T1 versus C and T2 versus C comparisons. **Conclusions** Although the FMT preparation time is short, the effect of short aerobic exposure on the abundance of fungal communities in the samples was higher than that of short anaerobic exposure, and the relative abundance of harmful bacteria such as *Treponema* and *Spirochaetes* and related metabolites were effectively reduced, which could improve the safety of FMT.

【Keywords】 aerobic exposure; anaerobic exposure; FMT preparation; SPF pigs; fecal microbiota; metabolite profile

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

目前,粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)已成为干预微生物组的主要手段之一。微生物组的可变性为 FMT 等治疗性干预措施提供了希望,但也可能引起了严重的安全隐患。由于肠道微生物生态系统的复杂性高,无目的地干预措施可能会将微生物组转移为不期望的状态,反而给健康带来更意想不到的后果。比如,抗性基因的传播^[1-2]、产气荚膜梭菌感染^[3]等不良事件的发生。供体的选择、供体粪便的处理方式、受试者的准备、移植方式和次数等都可能影响 FMT 的疗效。目前,用于复发性 CDI 治疗的 FMT 并无统一的标准和监管,不同国家的政策差别较大^[4]。在丹麦, Jørgensen 等^[5]采取了比较严格的供体筛选方法,包括病史、体格检查、血液、粪便以及尿液检查,仅约 20% 的参与者符合捐赠粪便资格。Ramai 等^[6]根据 PubMed、MEDLINE、Google Scholar 和 Cochrane 数据库上 FMT 相关研究,推论证实 FMT 的成功并不取决于供体-患者的关系; Allegretti 等^[7]对 1924 例 FMT 治疗艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)的数据进行分析,发现粪便运输时间和粪便冻存时间对 FMT 疗效的影响差异不明显:粪便处理时长超过 150 min,并未显著降低 FMT 的疗效;当粪便冻存时长超过 1 年甚至 3 年时, FMT 的疗效与冻存 30 d 内的效果相似。

同样是杂食动物,猪与人在消化道解剖学和生理学特征方面具有相似性。最近多项研究还利用无菌猪模型实现了动物肠道菌群“拟人化”的能力。比如, Zhang 等^[8]对无菌仔猪接种成人和婴儿的粪便悬液,成功模拟了成人和婴儿的肠道微生物群落结构;接种患有严重急性营养不良和轻度急性营养不良的儿童粪便悬液构建悉生猪模型,揭示了共生

肠道菌群与宿主健康生长存在因果关系,阐明了治疗儿童营养不良的方法^[9]。此外,肠道微生物组与宿主动物的共同进化,它在营养消化与利用、抵御病原体、调节免疫和内分泌等方面发挥的微生物作用,促使养猪生产对 FMT 这一策略的应用也产生了兴趣。比如,通过比较常规饲养猪和悉生猪或无菌猪的生理和代谢参数等来研究肠道微生物的作用^[10];或使用 FMT 作为提高生猪饲料利用率的可能策略等^[11]。Hu 等^[12]以金华猪为例,尝试利用 FMT 方式调节杂种新生仔猪肠道菌群结构,来改善肠道屏障和免疫功能。这些研究提示 FMT 在构建悉生猪模型上的应用广泛,那么,对影响 FMT 的相关因素开展研究就十分必要。供体选择、粪便样本的处理、粪菌移植方式、粪菌库建立以及安全性保障等是影响 FMT 实施和效果的几个关键因素。本研究以 SPF 猪作为供体,在有氧或厌氧下处理并制备得到粪便悬液,比较环境空气暴露对粪便悬液中微生物组和代谢产物的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

供体猪由重庆市畜牧科学院双河实验猪基地自繁获得【SCXK(渝)2018-0002】。在符合现行国标(GB 14925-2010)规定的屏障环境内饲养,自由采食和饮水【SCXK(渝)2018-0002】。参考 GB/T22914-2008《SPF 猪病原的控制与监测》标准,选择健康的 5 头成年雌性无特定病原级别(specific pathogen free, SPF)巴马小型猪(耳号分别为 13, 14, 69, 77, 78),体重约 50 kg,包括非洲猪瘟病毒、猪瘟病毒、口蹄疫病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、乙型脑炎病毒、猪圆环

病毒 2 型、猪细小病毒、布鲁氏菌、猪肺炎支原体、猪流感病毒、猪弓形虫、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、轮状病毒在内的 13 种病原均为阴性。经重庆市畜牧科学院伦理委员会的许可(XKY-20150113),所有实验均在重庆市畜牧科学院重庆国家现代畜牧业示范区实验用猪工程中心完成(重庆荣昌)【SYXK(渝)2018-0002】。

1.1.2 供体猪粪便的收集

供体猪选定后,单栏饲养。采样当天清晨,打扫其圈舍至无明显残留粪污。采用无菌密封采样袋分别收集上述 5 头供体猪的新鲜粪便,每头各收集 3 份。其中 1 份直接放入液氮保存(未处理对照组,或称 C 组),1 份直接保存在低温运输箱(4℃)(有氧暴露组,或称 T1 组),剩余 1 份转入厌氧采样盒(由密封培养罐和厌氧培养应用袋制造厌氧环境,广东环凯微生物科技有限公司,中国),再保存于低温运输箱(4℃)(厌氧暴露组,或称 T2 组),在 30 min 内运回实验室进一步处理。

1.1.3 主要试剂与仪器

QIAamp DNA stool Mini Kit(QIAGEN 公司);AxyPreDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司);TruSeq™ DNA Sample Prep Kit;色谱柱为 BEH C18 柱(100mm×2.1mm i.d., 1.7μm; Waters, Milford, USA)。厌氧工作站(英国 DWS 公司,型号 DG250);洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司,型号 DL-CJ-2ND1);QuantiFlour™-ST 蓝色荧光定量系统(美国 Promega 公司);PCR 仪(美国 ABI, GeneAmp9700 型);高分辨液质联用仪 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统(赛默飞公司)。

1.2 方法

1.2.1 供体猪粪悬液的制备

猪供体粪便的处理上参考 Pang 等^[13]描述的方法。T1 组在超净台内(氮气约占 78%,氧气约为 21%)完成粪悬液的制备,T2 组在厌氧工作站内(纯氮气和无氧混合气体供应,氮气 > 80%,其余气体为氢气和二氧化碳)完成粪悬液的制备。制备过程在样品采集后 2 h 内完成。粪悬液的制备操作为:无菌密封匀浆袋内,新鲜粪便和灭菌水按照 1:5 的比例混合均匀,再通过 4 层灭菌医用纱布过滤,收集获得粪悬液。每头供体猪的新鲜粪便样品(约 2 g),各个粪悬液样品抽取 4 mL,用于细菌基因组的提取和非靶向代谢组分析;剩余粪悬液和灭菌甘油按照体积比 9:1 混合,分装成每管 1 mL,-80℃保存。

1.2.2 测序与分析

(1)扩增子测序:采用 CTAB/SDS 方法提取各

粪便样品的总基因组 DNA,然后用 338F/806R 引物扩增 16S rRNA 的 V3-V4 区域,ITS1F/ITS2R 引物对扩增真菌 ITS 区域。利用 Illumina Miseq 测序平台完成扩增子测序,微生物多样性和组成的确定参考之前的分析方法^[14]。

(2)非靶向代谢组:采用 LC-MS 分析平台(赛默飞公司,超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统)对 15 个猪粪便样品进行代谢组学分析。样品经过前处理去除杂质、提取代谢物,然后 LC-MS 正、负模式下分别上级检测采集信息,得到代谢物的 MS 和 MS/MS 信息,采用 Progenesis QI(Waters Corporation, Milford, USA)软件进行搜库鉴定,将 MS 和 MS/MS 质谱信息与代谢数据库(<http://www.hmdb.ca/>; <http://metlin.scripps.edu/>)进行匹配,最终得到代谢物列表及数据矩阵。

1.2.3 数据分析

细菌和真菌功能预测分析:利用 Tax4Fun 对 16S RNA 基因序列进行 COG 和 KEGG 功能注释,获得 OTU 在 COG 和 KEGG 各功能水平的注释信息及各功能在不同样本中的丰度信息。FUNGuild 用于真菌功能分类分析。

1.3 统计学分析

Student's *t* 检验用于比较 α 多样性(Shannon 指数和 Chao 指数)的组间差异;单因素方差分析用于比较组间微生物丰度差异;Heatmap 分析展示不同分组/样品在各分类学水平上的群落组成的相似性和差异性;组间差异检验采用 ANOSIM 分析方法;基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 分析展示各组样品之间的微生物总体分布和离散程度;PCA 用于观察各组样品之间的代谢物的总体分布和离散程度;PLS-DA 用于区分组间差异,变量重要性(variable importance, VIP) > 1 用于筛选出对模型贡献较大的变量。本研究以 VIP > 1 的变量作为差异代谢物或潜在标志物。采用 Student's *t* 检验结合 OPLS-DA 方法,筛选出组间差异代谢物(同时满足 VIP > 1, *P* < 0.05)。Spearman 相关系数 *r* 展示菌群组成与差异代谢物丰度上的相关关系。

2 结果

2.1 细菌组成与丰度比较

利用 338F/806R 引物对,对 C、T1 和 T2 这三组共 15 个样品中微生物群落测序,共获得 raw reads 645275×2,总碱基数目为 388 455 550;优化后有效序列数目为 645 275,有效碱基数目为 266 910 646;序列平均长度为 413.64 bp(见表 1)。

对 97% 相似水平下的细菌 OTUs 进行统计分析,15 个样品中共检出 1020 个 OTUs。C 组、T1 组和 T2 组检出的 OTUs 数目分别为 915、982 以及 968,其中 856 个 OTUs 在三组间共享。此外,FMT 制备操作(T1 或 T2 组)与 C 组在 Shannon 指数和 Chao 指数上组间差异显著($P < 0.05$,图 1A,1B),提示需氧或厌氧下供体猪粪便的 FMT 制备操作均提高了样品中菌群多样性。相似性分析(ANOSIM 检验)显示 R 值为 0.314($P=0.005$),表明组间差异大于组内差异,提示实验分组成立。PCoA 分析显示 T1 与 T2 组在猪粪便菌群结构上组间差异小,而与 C 组间差异明显(图 1C)。

FMT 制备操作保存了新鲜供体粪样中的全部细菌门,组间共享 18 种细菌门(图 2A)。其中,厚壁菌门(*Firmicutes*)的相对平均丰度在 C、T1 和 T2 组中分别为 65.07%、62.39% 和 61.90%,其次为拟杆菌门

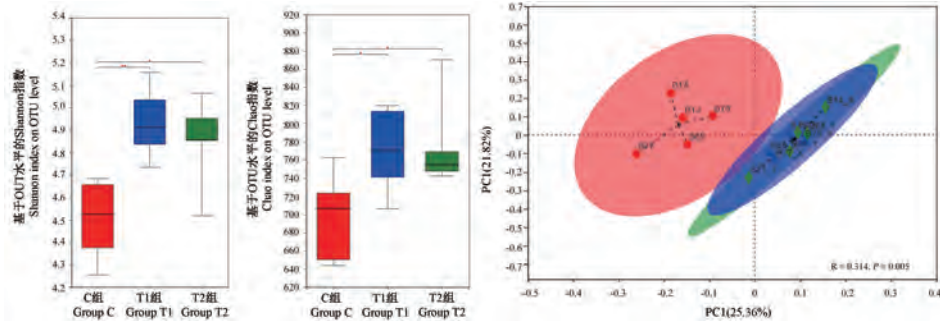
(*Bacteroidetes*),它在 C、T1 和 T2 组中相对平均丰度分别为 23.98%、32.72% 和 33.06%。FMT 制备操作后,大部分细菌门的丰度组间差异不明显($P > 0.05$),仅显著改变了黏胶球形菌门(*Lentisphaerae*)和互养菌门(*Synergistetes*)丰度($P = 0.035$ 和 $P = 0.002$)。两者在 C 组中的相对丰度极低,在 T1 组的相对平均丰度分别为 0.109% 和 0.037%,T2 组中分别为 0.019% 和 0.040%。值得注意的是,尽管螺旋体门(*Spirochaetes*)的丰度在组间差异不显著($P > 0.05$),但需氧下 FMT 制备操作后丰度从 8.34% 降低到 1.28%,厌氧下降低为 1.13%。该菌在 C 组各样本中丰度变化较大,从 2.18% ~ 13.28%。这提示,FMT 制备操作对猪粪便中的 *Spirochaetes* 丰度影响较大。Heatmap 分析显示 T1 和 T2 组菌落先聚类,再和 C 组聚类(图 2B)。

T1 和 T2 组间细菌属组成上无明显差异,但丰

表 1 基于 Illumina Miseq 测序平台的 16S rRNA V3-V4 测序结果

Table 1 Illumina Miseq sequencing of the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene

分组 Groups	样品号 Sample No.	序列数 Sequences	碱基数 (bp) Bases (bp)	平均长度 (bp) Average length (bp)
未处理对照组 (C 组) Untreated group (Group C)	B13	45 602	18 874 989	413.91
	B14	41 847	17 268 438	412.66
	B69	41 204	16 999 023	412.56
	B77	35 100	14 567 778	415.04
	B78	50 429	20 791 028	412.28
有氧暴露组 (T1 组) Aerobic FMT preparation (Group T1)	B13_X	43 238	17 857 477	413.00
	B14_X	35 740	14 829 723	414.93
	B69_X	47 934	19 896 852	415.09
	B77_X	47 291	19 421 394	410.68
	B78_X	38 284	15 884 911	414.92
厌氧暴露组 (T2 组) Anaerobic FMT preparation (Group T2)	B13_Y	41 589	17 189 225	413.31
	B14_Y	44 156	18 303 192	414.51
	B69_Y	39 474	16 367 520	414.64
	B77_Y	46 067	19 066 976	413.90
	B78_Y	47 320	19 592 120	414.03



注:A:基于 OTU 水平的 Shannon 指数组间差异检验结果;B:基于 OTU 水平的 Chao 指数组间差异检验结果;C:基于细菌属的 PCoA 分析结果; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 FMT 制备处理对 SPF 级猪粪便样品中细菌群落多样性的影响

Note. A. Student's *t* test for Shannon index of OTU level. B. Student's *t* test for Chao index of OTU level. C. PCoA analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

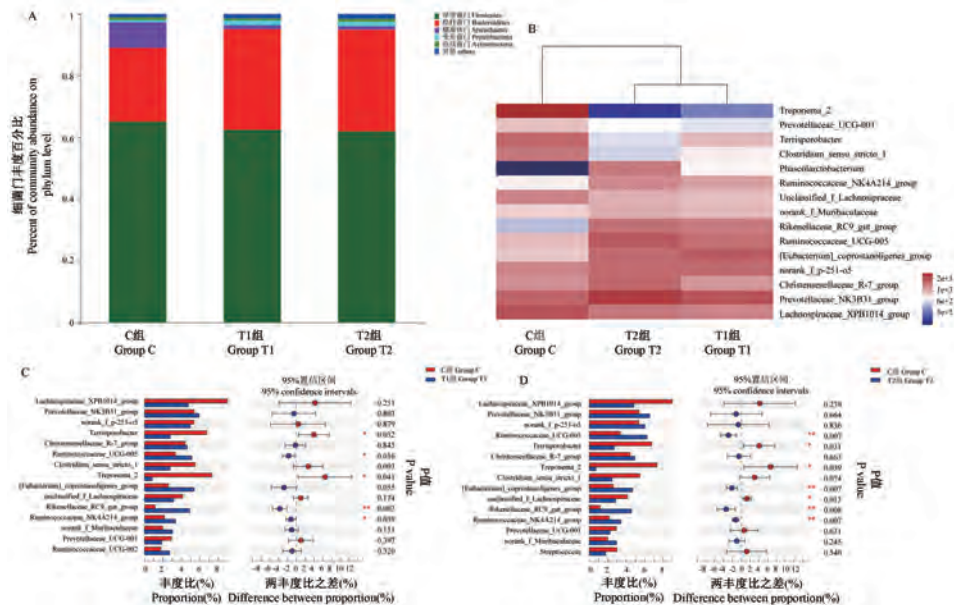
Figure 1 Influence of FMT preparation on bacterial community diversity in SPF pigs' fecal samples

度上差异明显。相对丰度较高的细菌属主要集中在 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes*, 比如 *Lchnospiraceae* _ *XPB1014* group, *Prevotellaceae* _ *NK3B31* group, *Ruminococcaceae* _ *UGC_005*。和 C 组相比, T1 和 T2 组的 *Terrisporobacter*, *Treponema_2* 的丰度显著低于 C 组 ($P < 0.05$), 而 *Ruminococcaceae* _ *UGC_005*, *Rikenellaceae* _ *RC9_gut* group 以及 *Ruminococcaceae* _

NK4A214 group 的丰度显著高于 C 组 ($P < 0.05$) (图 2C, 2D)。

2.2 真菌组成和丰度比较

利用 ITS1F-ITS2R 引物对, 对各样品中真菌群落组成情况进行测序。结果显示 raw reads 数为 898449×2 , 总碱基数目为 540 866 298, 有效碱基数目为 245 604 522, 具体测序信息见表 2。



注: A: 细菌门的丰度柱状图; B: 细菌属上的聚类热图; C: 未处理组 (C 组) 与有氧暴露组 (T1 组) 在细菌属的丰度差异条形图; D: 未处理组 (C 组) 与厌氧暴露组 (T2 组) 在细菌属分类上的丰度差异条形图; Student's *t* 检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 FMT 制备处理对供体猪粪便细菌群落组成的影响

Note. A. Barplot results of community abundance on bacterial phylum level. B. Heatmap results on bacterial genus level. C. Student's *t*-test barplot on bacterial genus level between C and T1 groups. D. Student's *t*-test barplot on bacterial genus level between group C and T2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Influence of FMT preparation on bacterial community of SPF pigs' feces

表 2 基于 Illumina Miseq sequencing 平台的真菌 ITS1-ITS2 区域的测序结果

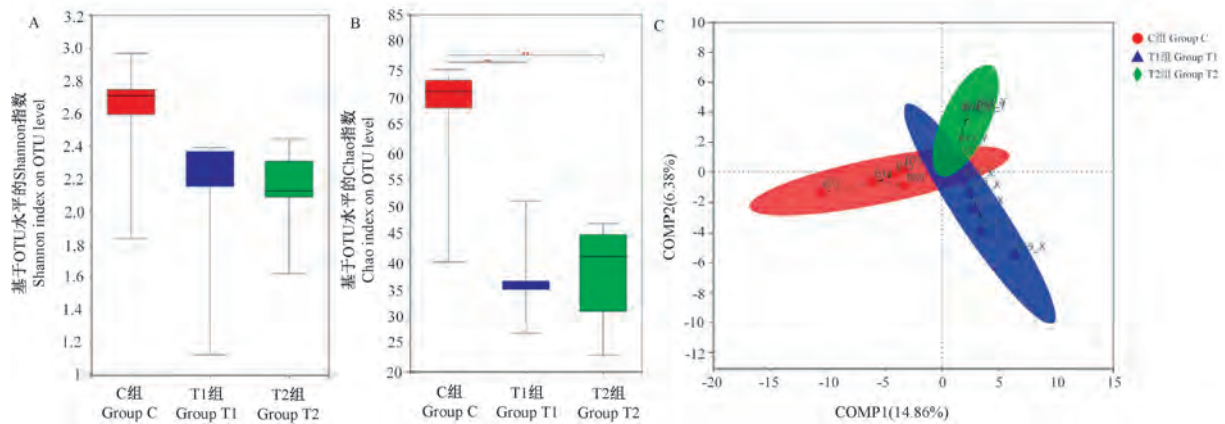
Table 2 Illumina Miseq sequencing of ribosomal RNA ITS1-ITS2 genomic region in fecal mycobiota

分组 Groups	样本编号 Sample No.	序列数 Sequences	碱基数 (bp) Bases (bp)	平均长度 (bp) Average length (bp)
未处理对照组 (C 组) Untreated group (Group C)	B13	38 056	10 755 161	282. 61
	B14	53 456	13 858 394	259. 25
	B69	58 798	15 600 278	265. 32
	B77	70 776	19 348 726	273. 38
	B78	74 110	17 371 675	234. 40
需氧暴露组 (T1 组) Aerobic FMT preparation (Group T1)	B13_X	55 139	15 055 302	273. 04
	B14_X	47 996	17 422 611	363. 00
	B69_X	72 876	19 364 345	265. 72
	B77_X	70 514	19 198 171	272. 26
	B78_X	69 328	17 552 576	253. 18
厌氧暴露组 (T2 组) Anaerobic FMT preparation (Group T2)	B13_Y	31 017	9 553 379	308. 00
	B14_Y	43 031	12 351 827	287. 04
	B69_Y	71 811	23 539 325	327. 80
	B77_Y	70 761	15 173 799	214. 44
	B78_Y	70 780	19 458 953	274. 92

对 97% 相似水平下的真菌 OTUs 进行统计分析, 15 个样品中共检出 158 个 OTUs。C 组、T1 组和 T2 组各检出的 OTUs 数目分别为 128、85 和 77 个, 其中 3 组间共享 48 个 OTUs。Shannon 指数组间差异不显著 ($P > 0.05$); C 组与 T1 组、T2 组之间在 Chao 指数上差异显著 ($P < 0.01$)。ANOSIM 检验显示 $R = -0.068$, $P > 0.05$, 提示猪粪便中真菌组成, 组间差异不明显, 与 PLS-DA 分析结果相同 (见图 3)。

C 组共识别出 128 个真菌 OTU, T1 组识别出 85 个, T2 组识别出 77 个 OTU。群落组成分析结果显示, C 组以子囊菌门 (*Ascomycota*) 为主, 相对平均丰度为 63.26%; 其次为担子菌门 (*Basidionmycota*) 和 *Neocallimastigomycota*, 分别占 27.13% 和 9.17%。当粪便经过 FMT 制备操作处理后, 无论是在需氧或厌氧条件下 *Ascomycota* 相对丰度大幅度提升, 在 T1 组

平均丰度达到 87.65%, 在 T2 组达到 85.15%; 而 *Neocallimastigomycota* 丰度降低到 1% 以下 (T1 组为 0.25%, T2 组为 0.44%)。基于样本中群落丰度数据, 结果显示在真菌门上组间差异均不显著 ($P > 0.05$); 节担菌科 (*Wallemiaceae*)、*Sporidiobolaceae* 和 *Bulleribasidiaceae* 组间存在显著差异 ($P < 0.05$), 这三种真菌科在 C 组的丰度很低, 少于 1%。*Wallemiaceae* 在 C 组的平均丰度为 $0.999\% \pm 1.049\%$, 在 T2 组中丰度为 $0.476\% \pm 1.065\%$, 但在 T1 组未检出。在真菌属上, 节单菌属 (*Wallemia*) 的丰度在组间存在差异, 但它在 C 组和 T2 组中丰度也低于 1%, 在 T1 组中未检出 (图 4)。这提示这类真菌在需氧下 FMT 制备操作时, 可能因为其含量过低而未被保存下来, 而厌氧暴露似乎部分保存了这类真菌。

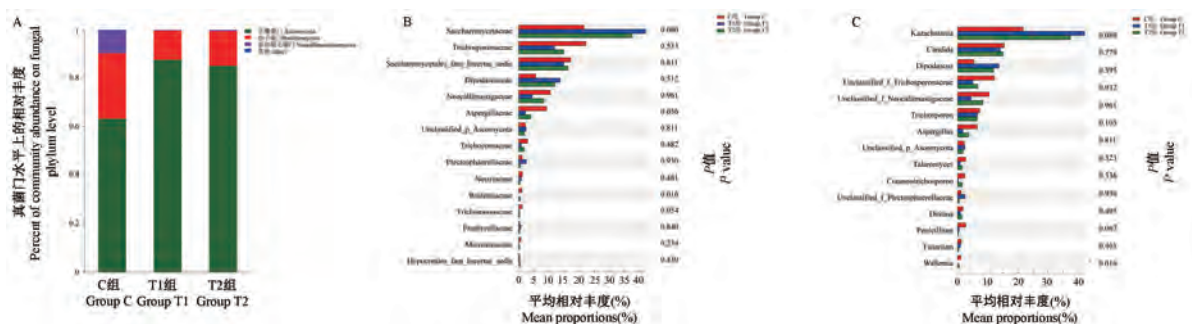


注: A: 基于 OTU 水平的 Shannon 指数; B: 基于 OTU 水平的 Chao 指数; C: 基于 OTU 水平的 PLS-DA 分析。* $P < 0.01$ 。

图 3 FMT 制备操作对供体猪粪便样品中真菌群落多样性的影响

Note. A. Student's *t*-test for Shannon index of OTU level. B. Student's *t*-test for Chao index of OTU level. C. PLS-DA analysis. * $P < 0.01$.

Figure 3 Influence of FMT preparation on the fungal community diversity in SPF pigs' fecal samples



注: A: 真菌门水平的组成柱状图; B: 真菌科水平上的组间丰度差异比较条形图; C: 真菌属水平上的组间丰度差异比较条形图。* $P < 0.05$ 。

图 4 FMT 制备处理对供体猪粪便真菌群落组成的影响

Note. A. Barplot results of community abundance on fungal phylum level. B. One-way ANOVA barplot results of community abundance on fungal family level. C. One-way ANOVA barplot results of community abundance on fungal genus level. * $P < 0.05$.

Figure 4 Influence of FMT preparation on fungal community of SPF pigs' fecal samples

2.3 菌群功能预测

利用 Tax4Fun 对样品中细菌进行 COG 和 KEGG pathway 功能注释和丰度比较,结果显示共注释到 24 个 COG 功能分类,组间丰度相似。其中, Carbohydrate transport and metabolism 和 Amino acid transport and metabolism 丰度最高,相对丰度均超过 8.0% ($P > 0.05$,图 5A)。KEGG pathway level1 水平上共注释到 cellular processes, environmental information processing, genetic information processing, human diseases, metabolism 以及 Organismal systems 这 6 个 KEGG 通路,组间差异小 ($P > 0.05$)。其中,注释到 metabolism 的通路达到 137 个,但各相对丰度在组间差异不明显 ($P > 0.05$)。

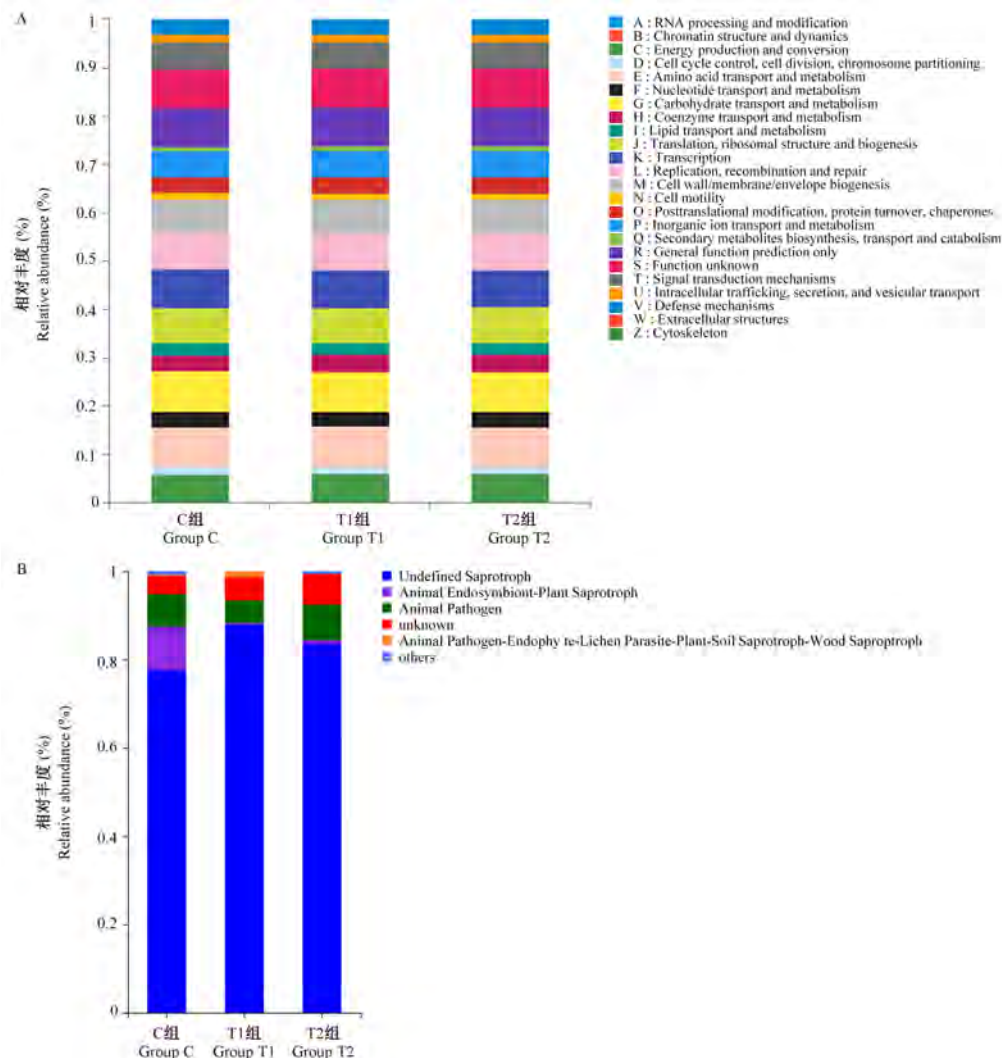
FUNGuild 通过微生物 guild 对真菌群落进行分

类分析。由图 5B 发现,粪便中真菌的主要功能为腐生营养型,其中未定义腐生真菌 (undefined Saprotroph) 平均相对丰度在 C 组高达 77.56%, T1 组为 87.92%, T2 组为 83.53%。C 组中, Animal Endosymbiont-Plant Saprotroph 平均相对丰度达到 9.89%,略高于 Animal Pathogen 的平均相对丰度 (7.35%)。相比之下,粪便经过过滤处理后, Animal Endosymbiont-Plant Saprotroph 丰度急剧减少,在 T1 组仅为 0.34%, T2 组为 0.85%;其他功能分类,如 Animal Pathogen,组间丰度差异不明显 ($P > 0.05$)。

2.4 代谢组分析

2.4.1 数据质控

利用 LC-MS 分析平台测定 15 个猪粪便样品中代谢物组成和丰度情况,并采用 PCA 对数据结



注:A:供体猪粪样中细菌 COG 功能注释结果;B:FUNGuild 对供体猪粪便中真菌功能注释结果。

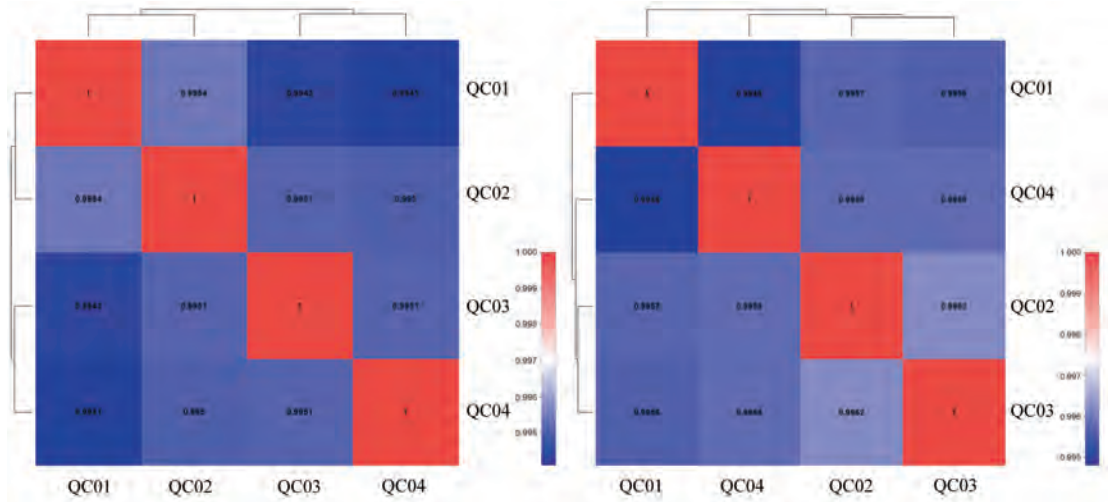
图 5 T1、T2 和 C 组中粪菌功能预测结果

Note. A. The result of COG function classification of fecal bacterial community from donor pigs. B. The result of fungal functional annotation from donor pigs inferred by FUNGuild.

Figure 5 Bacterial and fungal function classification in groups C, T1 and T2

果进行质控分析。质控样本 (Quality Control, QC) 用于评价在上级过程中分析系统的稳定性。QC 样本相关性越高 (越接近于 1) 表明测试方法稳定性越好, 数据质量越高。在正负离子 2 个模式下, QC 样本相关性最小值为 0.994, 表明此次检测方法稳定, 数据可信 (见图 6)。通过 PLS-DA 得到模型评价参数 (R^2 , Q^2), R^2 和 Q^2 值越接近 1, 表明模型越稳定可靠; 如果 R^2 和 $Q^2 < 0.5$, 则模型可

靠性较差。相关评价参数结果: C 组与 T2 组比较时 (即 T2: C 代谢集): $R^2X = 0.513$, $R^2Y = 0.935$, $Q^2 = 0.897$; C 组与 T1 组比较时 (即 T1: C 代谢集): $R^2X = 0.521$, $R^2Y = 0.614$, $Q^2 = 0.451$; 说明模型构建稳定, 数据可靠; T1 与 T2 比较时 (即 T2: T1 代谢集): $R^2X = 0.326$, $R^2Y = 0.41$, $Q^2 = -0.709$, 提示 T1 和 T2 模型效果不好, 这两组间得到的差异物质不可信。



注: A: 阳离子模式; B: 阴离子模式。

图 6 QC 样本相关性分析结果

Note. A. Positive ion mode. B. Negative ion mode.

Figure 6 Results of QC sample correlation analysis

2.4.2 代谢物分类统计

利用代谢组数据库 (HMDB, www.hmdb.ca) 对猪粪便中代谢物进行注释。正、负离子模式下, 402 和 195 种代谢物被分类为 14 个超类别 (superclass) 和 21 个子类别 (subclass)。其中, 有 243 种代谢物注释到“脂类和类脂分子” (lipids and lipid-like molecules), 有 54 种代谢物注释到“有机杂环化合物” (organoheterocyclic compounds), 50 种代谢物注释到“有机酸和杂环化合物” (organic acid and derivatives)。子类别中, 注释到“氨基酸、肽和类似物” (amino acids, peptides and analogues), “脂肪酸和偶联物” (fatty acids and conjugates) 以及“胆汁酸、醇类和衍生物” (bile acids, alcohols and derivatives) 的代谢物数量分别为 41、26 和 25 个。

2.4.3 差异代谢产物的筛选与鉴定

采用 Student's *t* 检验结合 OPLS-DA, 筛选出组间差异代谢物。同时满足变量重要性 $VIP > 1$, $P < 0.05$, 差异倍数 $FC > 1$ 或 $FC < 1$ 。阳离子模式下

T1-C 代谢集筛选出差异代谢物数量为 90 个, T2-C 代谢集筛选出差异代谢物数量 122 个, T2-T1 代谢集筛选出差异代谢物 3 个。阴离子模式下 T1-C 代谢集筛选出差异代谢物 65 个, T2-C 代谢集筛选出差异代谢物 79 个, T2-T1 代谢集筛选出差异代谢物 1 个 (见表 3)。因此, T1: C 代谢集筛选出的差异代谢物共有 155 个, T2: C 代谢集筛选出的差异代谢物共有 201 个, 它们之间共享的差异代谢物达 142 种。

表 3 差异代谢物分析结果

Table 3 Results of metabolite differential analysis

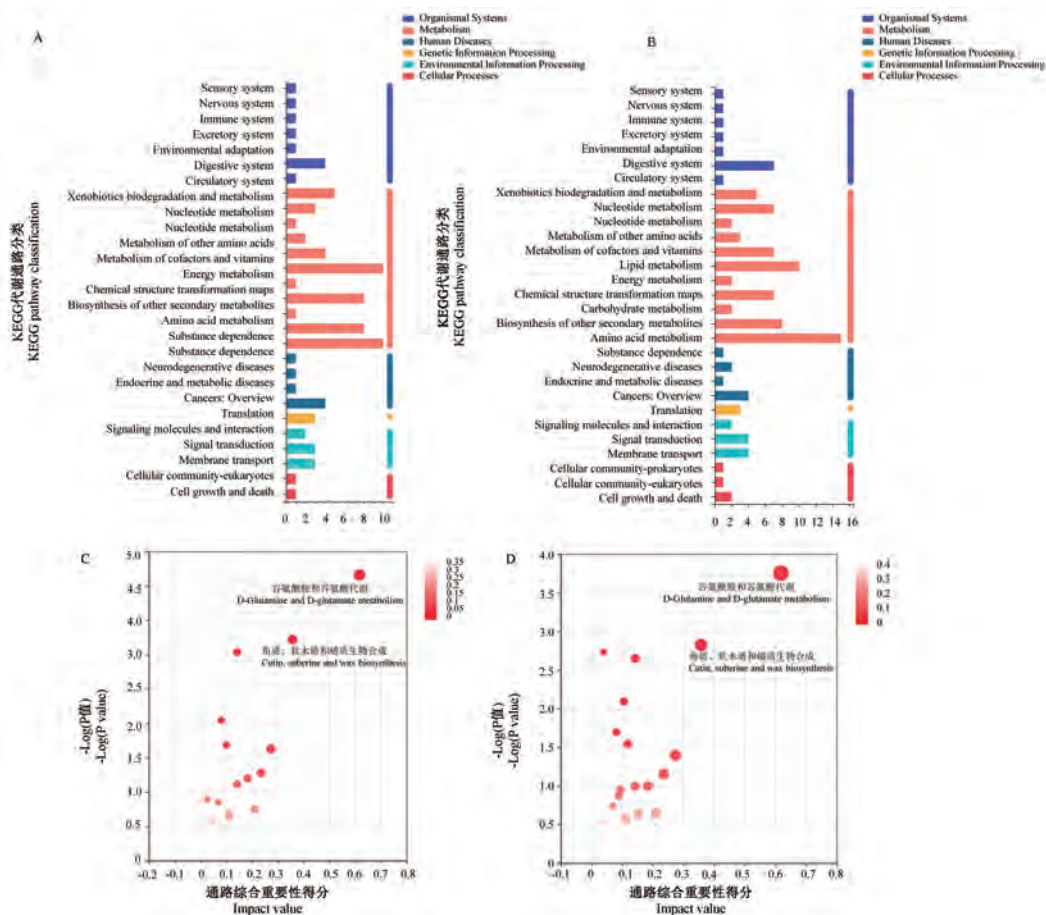
代谢集 Metabolite comparison	阳离子模式 Positive ion mode		阴离子模式 Negative ion mode	
	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
T1: C 代谢集 T1: C metabolite comparison	9	81	0	65
T2: C 代谢集 T2: C metabolite comparison	5	117	0	79
T2: T1 代谢集 T2: T1 metabolite comparison	1	2	0	1

由于 T2:T1 代谢集模型拟合不可信,因此,本研究仅对 T1:C 和 T2:C 两代谢集进行 KEGG 功能注释与富集分析。T2:C 代谢集注释到“代谢”(metabolism)一级分类的代谢物最多。其中,“氨基酸代谢”(amino acid metabolism)二级分类通路下的代谢物个数达到为 15 个;其次为“脂质代谢”(lipid metabolism)有 10 个。类似的,T1:C 代谢集注释到“代谢”一级分类下代谢物最多。其中,amino acid metabolism 二级分类下代谢物为 10 个,和 lipid metabolism 分类下数目相同(图 7A,7B)。此外,对代谢集内各代谢物在 KEGG 通路中进行通路富集和通路拓扑学分析。其中,代谢途径 D-Glutamine and D-glutamate metabolism (pathway ID:map00471; $P < 0.01$) 的相对重要性最大,其次为 Cutin, suberine

and wax biosynthesis (pathway ID: map00073, $P < 0.01$),它们在 T1:C 和 T2:C 代谢集中的重要性得分均高于 3.0(图 7C,7D)。

2.4.4 样本中代谢物组成与微生物群落组成相关性分析

图 8A,8B 可知,T1:C 代谢集丰度前 10 的差异代谢物为 2-Amino-2-methylbutanoate, (-)-Stercobilin、2,4-Dimethylpimelic acid、L-Proline、3'-Deaminofusarochromanone、Gingerglycolipid B、Prednisolone、Spirolide D、Polysorbate 20 以及 PS (16:0/18:02(9Z,12Z)),它们与 *Spirochaetes* 的相对丰度均呈正相关。除(-)-Stercobilin 外,其余差异代谢物与 *Spirochaetes* 呈显著正相关($r > 0.60$, $P < 0.05$);T2:C 代谢集丰度前 10 的差异代谢物为 PE



注:A:T1:C 代谢集;B:T2:C 代谢集;C:T1:C 代谢集拓扑学分析结果;D:T2:C 代谢集拓扑学分析结果。

图 7 KEGG 代谢通路富集和注释结果

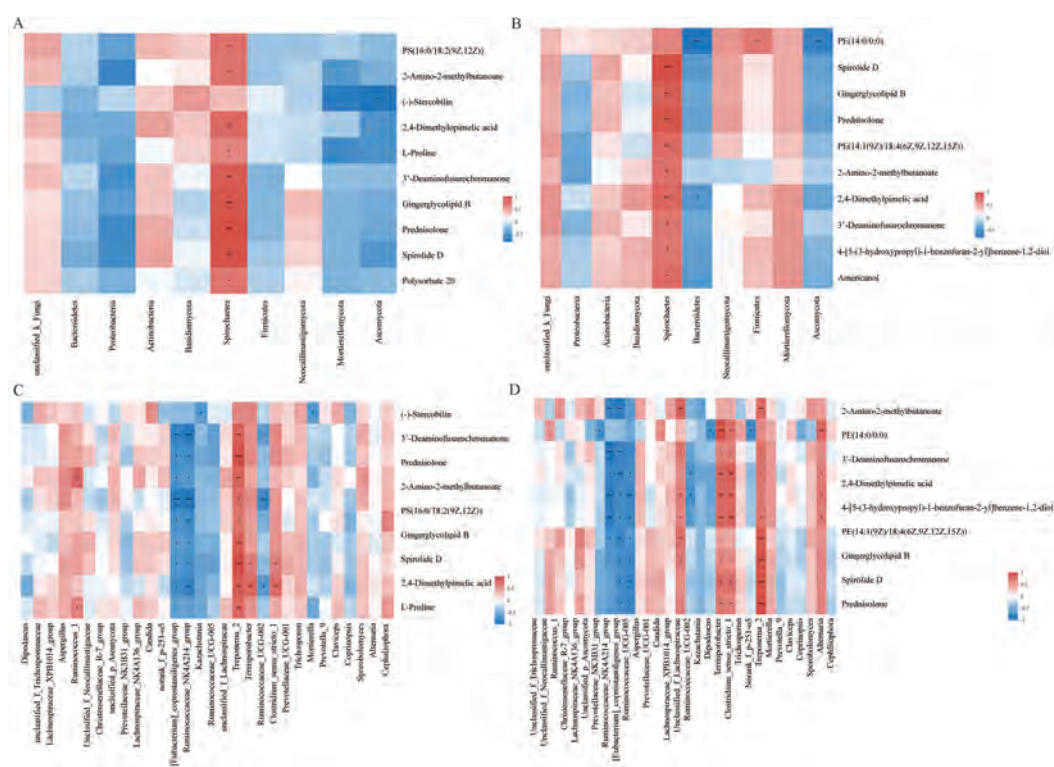
Note. A. T1:C metabolite comparison. B. T2:C metabolite comparison. C. KEGG Topology analysis for T1:C metabolite comparison. D. KEGG Topology analysis for T2:C metabolite comparison.

Figure 7 KEGG pathway classification.

(14 : 0/0 : 0)、Spirolide D、Gingerglycolipid B、Prednisolone、PE (14 : 1 (9Z)/18 : 4 (6Z, 9Z, 12Z, 15Z))、2-Amino-2-methylbutanoate、2,4-Dimethylpimelic acid、3'-Deaminofusarochromanone、4-[5-(3-hydroxypropyl)-1-benzofuran-2-yl] benzene-1,2-diol 和 Americanol, 它们也与 *Spirochaetes* 的相对丰度呈正相关 ($r > 0.60, P < 0.05$)。

将样品中丰度前 10 的菌属与上述差异代谢物进行相关性分析 (图 8C, 8D)。结果显示, T1:C 和 T2:C 代谢集中丰度前 10 的差异代谢物与 *Treponema_2* 呈正相关 ($r > 0.6, P < 0.05$), 而与 *Ruminococcaceae NK4A214 group* 和 [*Eubacterium*] *coprostanoligenes group* 呈负相关 ($r < -0.4, P < 0.05$)。提示粪便中这些特定菌属的丰度与差异代谢物的产生密切相关。*Spirochaetes* 在 C 组平均相对

丰度为 8.34%。有氧暴露下 FMT 制备操作后丰度降低为 1.28%, 厌氧下丰度降低到 1.13%, 降低倍数超过 6.5 倍。*Treponema_2* 属于 *Spirochaetes* 细菌, 在 C, T2 和 T1 组中的相对丰度分别为 ($7.31\% \pm 4.90\%$)、($0.69\% \pm 0.37\%$) 和 ($0.81\% \pm 0.51\%$)。*Ruminococcaceae NK4A214 group* 属于 *Firmicutes* 细菌, 在 C, T1 和 T2 组中的相对丰度分别为 ($2.16\% \pm 0.25\%$)、($3.36\% \pm 0.91\%$) 和 ($3.42\% \pm 0.62\%$)。[*Eubacterium*] *coprostanoligenes group* 属于 *Firmicutes* 细菌, 在 C, T1 和 T2 组的相对丰度分别为 ($2.58\% \pm 0.37\%$)、($5.37\% \pm 2.33\%$) 和 ($4.69\% \pm 1.01\%$)。这些菌群丰度受 FMT 制备操作而改变, 并显著影响包括 2-Amino-2-methylbutanoate、2,4-Dimethylpimelic acid、Prednisolone、Spirolide D 等在内的多种代谢物的产生。



Note: A: T1:C 代谢集与菌门; B: T2:C 代谢集与菌门; C: T1:C 代谢集与菌属; D: T2:C 代谢集与菌属。* 代表相关性显著; 红色: 正相关; 蓝色: 负相关。

图 8 粪便细菌和真菌群落组成与代谢物水平的相关性分析

Note. A. Correlation between metabolite and phylum-level microbial composition in T1:C metabolite comparison. B. Correlation between metabolite and phylum-level microbial composition in T2:C metabolite comparison. C. Correlation between metabolite and genus-level microbial composition in T1:C metabolite comparison. D. Correlation between metabolite and genus-level microbial composition in T2:C metabolite comparison. * Significant correlation. Red color. Positive correlation. Blue color. Negative correlation.

Figure 8 Correlation analysis between microbial composition and metabolites in SPF pigs' fecal samples

3 讨论

在以前的研究中,供体的作用已被证明是重要的^[15]。SPF 猪是在屏障或隔离环境下饲养,排除了特定的病原微生物和寄生虫的猪群,是优良的动物实验、生物制剂及生命科学研究用猪。因此,选择 SPF 猪的粪便作为 FMT 的供体具备合理性。此外,多捐赠者方法已被证实可以提高供体微生物群落多样性,有助于 FMT 后取得一个良好的结果^[16]。因此,参照现行国家标准 GB/T22914-2008,本研究最终选择了 5 头 SPF 巴马小型猪作为 FMT 供体动物。

供体猪粪悬液的制备方法影响了样品中菌群组成结构,这是影响 FMT 效果的又一重要因素。过去研究发现益生菌的活力对其发挥重用具有重要影响。然而,Andresen 等^[17]研究发现死菌也能对肠易激综合征发挥益处;冷冻和新鲜粪便制剂对 CDI 具有相似的治疗功效^[18-20],提示粪便制剂中活菌数可能并不制约 FMT 的使用。制备 FMT 用的粪悬液时,短暂的有氧暴露和厌氧暴露均未显著改变样品中细菌和真菌组成,但影响了菌群的丰度。和未处理粪便样品相比,有氧和厌氧操作都完整地保留了全部的细菌门分类,猪 FMT 用粪悬液中仍然是以 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 为主,和健康猪群的直肠微生物研究结果一致^[21]。然而,有氧和厌氧下 FMT 制备操作导致了 *Spirochaetes* 细菌的丰度减少约 8 倍, *Terrisporobacter* 的丰度减少 3 倍, *Treponema_2* 丰度减少 9 倍以上。此外,结果显示 SPF 巴马小型猪粪便中真菌群落以 *Ascomycota*, *Basidionmycota* 和 *Neocallimastigomycota* 为主, FMT 制备操作导致了粪便中真菌群落丰度的降低。比如,有氧处理组降低了粪便中 *Neocallimastigomycota* 的丰度超过 36 倍,厌氧处理组降低该菌的丰度也达到 20 倍。值得注意的,有氧或厌氧下 FMT 制备操作也造成 *Wallemmina* 等低丰度菌群丰度的降低,甚至无法通过扩增子测序手段检出。当然, FMT 制备操作也提高了某些菌群的丰度,包括 *Ruminococcaceae* *UGC-005*, *Rikenellaceae* *RC9 gut group* 以及 *Ruminococcaceae* *NK4A214 group* 的丰度都显著高于未处理的粪样 ($P < 0.05$)。值得注意的是, *Spirochaetes* 含有猪肠道内与猪痢疾有关的主要病原,尤其是密螺旋体属 (*Treponema*) 细菌^[22]。本研究中,5 头供体猪粪便样本按照 NY/T545 的方法完成了猪痢疾密螺旋体病原检测,结果为阴性。

Treponema_2 在 15 个样本中均被检出,并随 FMT 制备操作丰度显著降低 ($P < 0.05$)。其中,它在未处理组的平均丰度为 ($7.31\% \pm 4.90\%$),在有氧暴露组为 ($0.81\% \pm 0.51\%$),在厌氧暴露组为 ($0.69\% \pm 0.37\%$)。此外,研究显示对供体猪粪便样品实施处理后,样品中代谢物含量也发生改变,且厌氧下处理对供体猪粪便悬液中的代谢产物更具影响,毕竟与未处理组相比,厌氧暴露组中检出了 201 种差异代谢物,而有氧暴露组中检出 155 种差异代谢物。相关性分析结果揭示粪便中 *Treponema_2* 与多种代谢物的产生密切相关。值得注意的是,经 FMT 制备操作后 *Spirochaetes* 丰度降低,更导致了 Prednisolone 和 Spirolide D 两种代谢产物的减少。Spirolide D 是一种脂溶性贝毒素, Prednisolone (中文名:波尼松龙)是常用的抗炎肾上腺皮质激素类药物,具有抗炎作用,这些结果提示本研究采用的粪便 FMT 制备操作方法可有效降低猪粪便中 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 菌群的丰度,一定程度上提高了 FMT 的安全性。

目前, FMT 不仅作为治疗复发性 CDI,恢复患者肠道多样性的一种技术^[23-24],还广泛用于悉生动物模型的构建,在宿主代谢、营养、免疫力以及药物发现中肠道生态学的研究上发挥着重要作用。仅从这一出发点而言,没有必要采用标准化的制备方法,但应尽可能地保证移植的粪悬液反映的是供体原始的粪便微生物组。除制备时环境空气暴露的差异外,研究使用的供体猪数量、动物个体差异以及新鲜粪便采集量、实验操作时间、以及每份测序样本中所含细菌、真菌以及代谢物含量的差异等都可能成为潜在影响因素。当然,在今后实际使用上可通过扩大供体猪数量和粪便采集量、自动化粪悬液制备、增加测序样本重复数等操作来降低这些潜在问题。

4 结论

SPF 巴马小型猪粪便样品中主要的细菌群落为 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes*,主要的真菌群落为 *Ascomycota*, *Basidionmycota* 和 *Neocallimastigomycota*。尽管处理时间短暂,粪悬液的制备操作仍强烈地降低了包括 *Spirochaetes*, *Terrisporobacter* 和 *Treponema_2* 在内的细菌群落以及 *Neocallimastigomycota* 真菌群落的丰度,提高了 *Ascomycota* 的相对平均丰度,并显著影响猪粪悬液中包括 Prednisolone, Spirolide D

等在内的多种代谢物的产生。值得注意的是,有氧暴露对猪粪悬液中真菌群落丰度的影响高于厌氧暴露处理。结果提示,粪悬液的 FMT 制备操作有效地降低 *Treponema* 和 *Spirochaetes* 等有害菌群和相关代谢产物的丰度,提高了 FMT 的安全性。

参 考 文 献(References)

- [1] Leung V, Vincent C, Edens TJ, et al. Antimicrobial resistance gene acquisition and depletion following fecal microbiota transplantation for recurrent clostridium difficile infection [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(3): 456-457.
- [2] DeFilipp Z, Bloom PP, Torres Soto M, et al. Drug-resistant *E.coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant [J]. N Engl J Med, 2019, 381(21): 2043-2050.
- [3] Azimirad M, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Enterotoxigenic clostridium perfringens infection as an adverse event after faecal microbiota transplantation in two patients with ulcerative colitis and recurrent clostridium difficile infection: a neglected agent in donor screening [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(7): 960-961.
- [4] Verbeke F, Janssens Y, Wynendaele E, et al. Faecal microbiota transplantation: a regulatory hurdle? [J]. BMC Gastroenterol, 2017, 17(1): 128.
- [5] Jørgensen SMD, Erikstrup C, Dinh KM, et al. Recruitment of feces donors among blood donors: Results from an observational cohort study [J]. Gut Microbes, 2018, 9(6): 540-550.
- [6] Ramai D, Zakhia K, Ofosu A, et al. Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness [J]. Ann Gastroenterol, 2019, 32(1): 30-38.
- [7] Allegretti JR, Elliott RJ, Ladha A, et al. Stool processing speed and storage duration do not impact the clinical effectiveness of fecal microbiota transplantation [J]. Gut Microbes, 2020, 11(6): 1806-1808.
- [8] Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract [J]. Gut Microbes, 2013, 4(3): 193-200.
- [9] Gehrig JL, Venkatesh S, Chang HW, et al. Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children [J]. Science, 2019, 365(6449): eaau4732.
- [10] 李梦颖,周华,丁玉春,等. 肠道微生物对仔猪胆汁酸谱及胆汁酸代谢的影响 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 49-61.
- [11] Li MY, Zhou H, Ding YU, et al. Effects of gut microbiota on bile acid profile and bile acid metabolism in piglets [J]. Biotechnol Bull, 2020, 36(10): 49-61.
- [12] Zhou H, Sun J, Ge L, et al. Exogenous infusion of short-chain fatty acids can improve intestinal functions independently of the gut microbiota [J]. J Anim Sci, 2020, 98(12): skaa371.
- [13] Pang X, Hua X, Yang Q, et al. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs [J]. ISME J, 2007, 1(2): 156-162.
- [14] Sun J, Du L, Li X, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18675.
- [15] Moayyedi P, Surette MG, Kim PT, et al. Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial [J]. Gastroenterology, 2015, 149(1): 102-109.
- [16] Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, et al. Donor species richness determines faecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease [J]. J Crohns Colitis, 2016, 10(4): 387-394.
- [17] Andresen V, Gschossmann J, Leyer P. Heat-inactivated *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (SYN-HI-001) in the treatment of irritable bowel syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(7): 658-666.
- [18] Satokari R, Mattila E, Kainulainen V, et al. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection-an observational cohort study [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(1): 46-53.
- [19] Lee CH, Steiner T, Petrof EO, et al. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent clostridium difficile infection: a randomized clinical trial [J]. JAMA, 2016, 315(2): 142-149.
- [20] Tang G, Yin W, Liu W. Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection: A meta-analysis? [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 88(4): 322-329.
- [21] Sun J, Du L, Li X, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18675.
- [22] Lee JJ, Hampson DJ, Lymbery AJ, et al. The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups [J]. Vet Microbiol, 1993, 34(3): 273-285.
- [23] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile* [J]. N Engl J Med, 2013, 368(5): 407-415.
- [24] Mullish BH, Ghani R, McDonald JAK, et al. Faecal microbiota transplant for eradication of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a lesson in applying best practice? Re: 'A five-day course of oral antibiotics followed by faecal transplantation to eradicate carriage of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: A Randomized Clinical Trial' [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(7): 912-913.

[收稿日期] 2020-09-21

汪君民, 陆海林, 龚腾云. 规律性有氧运动对脑缺血大鼠的脑保护作用及机制探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 618-625.

Wang JM, Lu HL, Gong TY. Protective effect and mechanism of regular aerobic exercise on cerebral ischemia in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 618-625.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.008

规律性有氧运动对脑缺血大鼠的脑保护作用及机制探讨

汪君民¹, 陆海林^{2*}, 龚腾云³

(1. 淮安市淮阴师范学院体育学院理论教研室, 江苏 淮安 223300; 2. 南通大学体育科学学院体操教研室, 江苏 南通 226019; 3. 江苏省淮安市淮阴师范学院科研部, 江苏 淮安 223300)

【摘要】 目的 研究规律性的有氧运动对脑缺血大鼠的脑组织的保护机制。**方法** 按照随机数字表法将 40 只 SPF 级 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、实验组、对照组, 模型组、实验组、对照组大鼠采用线栓法制备大鼠脑中动脉脑缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物模型, 假手术组大鼠只进行穿线, 不结扎; 实验组大鼠每日进行有规律的有氧运动(跑台跑步); 运动强度为 20 m/min, 每日 3 次, 每次 20 min, 每次间隔 2 h, 对照组大鼠每日给以 1.08 mg/mL 的尼莫地平灌胃给药。激光散斑成像观察大鼠大脑皮层血流变化; 脑电图检测大鼠大脑皮层总功率的变化; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色检测大鼠的脑梗死面积; 蛋白免疫印迹检测各组大鼠脑组织中脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、生长相关蛋白(growth-associated protein 43, GAP43)的表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组、实验组、对照组大鼠大脑皮层血流灌注量、大脑皮层总功率、BDNF、GAP43 的表达明显下降($P < 0.05$), 梗死面积明显升高($P < 0.05$), 与模型组相比, 实验组、对照组大鼠大脑皮层血流灌注量、大脑皮层总功率、BDNF、GAP43 的表达明显升高($P < 0.05$), 梗死面积明显下降($P < 0.05$)。**结论** 规律性的有氧运动明显改善脑缺血大鼠的血流灌注和脑部微血管循环障碍, 降低其脑组织的梗死面积, 抑制炎性的级联放大, 可能与激活 BDNF/GAP43 通路有关。

【关键词】 有氧运动; 脑缺血; 保护机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0618-08

Protective effect and mechanism of regular aerobic exercise on cerebral ischemia in rats

WANG Junmin¹, LU Hailin^{2*}, GONG Tengyun³

(1. Department of Physical Education Theory, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China.
2. Gymnastics Teaching and Research Department, School of Sports Science, Nantong University, Nantong 226019.
3. Department of Scientific Research, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300)

Corresponding author: LU Hailin. E-mail: 47819997@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of regular aerobic exercise on cerebral ischemia in rats. **Methods** According to the random number table method, 40 specific pathogen-free male SD rats were randomly divided into sham operation, model, experimental, and control groups. The middle cerebral artery occlusion

[基金项目] 江苏省社会科学基金(19TYB006)。

Funded by Jiangsu Social Science Foundation(19TYB006)。

[作者简介] 汪君民(1975—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 身体活动与健康促进、减肥与体重控制。Email: tiger817w@163.com

[通信作者] 陆海林(1982—), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 身体活动与健康促进。Email: 47819997@qq.com

(MCAO) rat model was constructed by the thread plug method. Rats in the sham operation group were threaded without ligation. Rats in the experimental group performed regular aerobic exercise (running on a treadmill) every day with an exercise intensity of 20 m/min, three times a day, 20 min each time, and 2 h apart each time. Rats in the control group were given 1.08 mg/mL nimodipine by gavage daily. Laser speckle imaging was used to observe changes in blood flow in the cerebral cortex. Electroencephalograms were used to detect changes in total power in the cerebral cortex. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining was used to detect cerebral infarct areas. Western Blot was used to detect the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and growth-associated protein 43 (GAP43) in brain tissue.

Results Compared with the sham group, the cerebral cortex blood perfusion, total cerebral cortex power, and expression of BDNF and GAP43 in the model, experimental, and control groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and infarct area was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the cerebral cortex blood perfusion, total cerebral cortex power, and expression of BDNF and GAP43 in the experimental and control groups were significantly increased ($P < 0.05$), and the infarct area was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Regular aerobic exercise can significantly improve blood perfusion and cerebral microvascular circulatory disorders in cerebral ischemic rats, reduce infarct size in brain tissue, and inhibit the inflammatory cascade, which may be related to activation of the BDNF/GAP43 pathway.

【Keywords】 aerobic exercise; cerebral ischemia; protective mechanism

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

缺血性脑血管疾病严重威胁人类的健康,该病具有发病率高、致残率高及死亡率高特点,给患者的家庭带来沉重的精神和经济负担。作为新陈代谢最为旺盛的器官,人体的大脑的最为关键的能量来源即是血糖中的葡萄糖进行有氧分解,因而脑组织对缺血、缺氧最为敏感。研究显示^[1]脑缺血发生后,脑部神经元细胞处于缺血、缺氧的病理状态,会诱导一系列的神经炎症、氧化应激反应、细胞凋亡、离子泵功能失衡、神经生物电信号传导受阻等相关病理过程的发生,致使患者出现脑部灌注不足,缺血区域微血管以及大血管在神经变性过程中随之发生改变,脑组织结构损伤进一步恶化,使患者出现相应的神经功能障碍。因此在脑缺血发生后,尽快恢复脑部血灌注,增强神经生物电信号传导,有助于改善患者对肢体协调控制、语言感知等的自主性。大量的临床事实显示^[2]康复性的运动有助于改善患者的肢体运动和神经功能障碍。研究显示^[3]有氧运动可明显增强缺血性动物模型大脑皮质、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、生长相关蛋白 (growth-associated protein 43, GAP43) 和纹状体的表达,改善动物的运动功能。国内外的研究大多集中在有氧运动作为一种辅助方式,对脑栓塞患者的运动功能的探讨上,而有关运动对神经功能和脑血流、脑微血管的影响的报道较少^[4]。本研究将规律性的有氧运动作为一种治疗干预方式,从 BDNF/GAP43 信号角度入手,探讨有氧运动对脑中动脉脑缺血

(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 动物模型脑组织的保护作用,希望为疾病的临床治疗提供新的角度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40 只 6 ~ 9 周雄性 SD 大鼠 SPF 级, 250 ~ 320 g, 采购自中国医学科学院医学实验动物研究所【SCXK(京)2019-0013】, 在南通大学的基础动物实验室完成实验【SYXK(苏)2020-0029】。本研究已获得医院实验动物伦理委员会的批准(伦理审批号: IACUC-202012035), 并在实验过程中遵循相关规定, 尽最大努力减少动物的疼痛与伤亡。所有大鼠在本院 SPF 级动物房中 (22 ± 3) °C, 湿度 (45 ± 5) %, 12 h 光暗交替, 自由摄食与饮水等条件下进行适应性喂养 7 d 后开始实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

尼莫地平 (20 mg × 50 片, 广东华南药业集团有限公司, 国药准字: H44025019)。戊巴比妥钠 (2019-5V40)、组织裂解液 (2020-72B3)、化学增强显色剂 (2020-90M1) (南京建成生物科技有限公司), 蛋白浓度检测试剂 (HJ4F73)、Western Blot 试剂盒 (HJ6VD3)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC, HJ43NR) 染色试剂盒、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO, HJ2C4L) 免疫试剂盒、尼式染色试剂盒 (HJ3C5G) 购自上海

碧云天生物科技有限公司, 兔抗 GAPDH 抗体 (ab8245) 购自美国 abcam 公司。

光学显微镜 (型号: X71, 日本 Olympus 公司), 凝胶成像处理系统 (型号: Universal Hood II, 美国 Bio-rad 公司), 激光散斑成像仪 (型号: PeriScan PSI System, 瑞典 PERIMED 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MCAO 模型的构建和分组处理

(1) MCAO 大鼠模型的构建: 参照 Franke 等^[5]介绍的方法, 将大鼠诱导麻醉后, 消毒, 备皮, 切开颈部皮肤, 充分暴露大鼠的左侧颈总动脉、颈外动脉, 使用动脉夹夹闭颈内动脉远心端, 采用 6 号尼龙线结扎大鼠的颈内动脉的近心端, 形成脑缺血状态, 2 h 后, 拔出线栓, 实现脑部血流再灌注。术中需要维持大鼠肛温在 37℃, 为减少操作的误差, 所有动物手术均有同一研究人员完成。术后 2 h, 进行神经功能评价: 无神经功能缺失症状, 能够正常活动记为 0 分; 大鼠出现左侧前爪不能完全伸展的情况记为 1 分; 大鼠爬行时出现转圈走的现象记为 2 分; 大鼠行走时身体向一侧侧倾倒的现象记为 3 分; 大鼠出现意识丧失, 不能自主行走的现象记为 4 分, 其中获得 1 ~ 3 分的大鼠表示造模成功。

(2) 实验的分组处理: 实验中同批次造模成功 30 只大鼠, 按照随机数字表法分为模型组, 实验组, 对照组, 每组 10 只, 另取 10 只大鼠作为假手术组, 假手术组大鼠在造模术中只进行穿线, 不结扎。造模成功后, 实验组大鼠每日进行有规律的有氧运动 (跑台跑步): 运动强度为 20 m/min, 每日 3 次, 每次 20 min, 每次间隔 2 h; 对照组大鼠每日给以 1.08 mg/mL 的尼莫地平灌胃给药, 模型组和假手术组大鼠以等剂量的生理盐水进行灌胃处理, 所有大鼠均以单笼, 基础饲料喂养。

1.2.2 激光散斑成像观察各组大鼠大脑皮层血流变化

连续处理 14 d 后, 再次对动物进行神经功能评价后, 以 35 mg/kg 的巴比妥钠将大鼠麻醉, 背卧位固定在手术台上, 头顶纵切, 分离鼓膜, 以暴露大鼠的大脑皮层, 激光散斑成像仪检测各组大鼠大脑皮层的血流变化情况。

1.2.3 脑电图检测各组大鼠大脑皮层总功率的变化

激光散斑成像检测后, 按照脑立体定位仪仪器要求进行操作, 植入记录电极、参比电极, 连接引导

线, 开启 LQWY-N 脑电生物信号系统检测各组大鼠大脑皮层生物电信号的变化, 同时 LQWY-N 脑电信号系统分析各组大鼠大脑皮层的总功率。

1.2.4 各组大鼠脑梗死面积的比较

大鼠处死后, 取出各组大鼠的脑组织, 注意保持动物脑组织的完整性, 取大鼠的脑组织标本, 制成厚度约为 2 mm 的冠状切片, TTC 工作液避光染色, 正常脑组织中因含与 TTC 发生特异性反应的酶而呈红色, 缺血区域因酶活下降不能与 TTC 发生特异性的结合而呈现苍白色^[6], 图像分析测量系统统计分析大鼠脑组织的脑梗死面积比例大小。

1.2.5 各组大鼠脑组织内微血管形态的比较

取大鼠的脑组织, 按要求制成药 150 μm 的冠状切片, 激光扫描共聚焦显微镜进行检测, 并将所得图像进行三维重建, 观察大鼠脑组织中血管直径 < 8 μm 的血管的形态。

1.2.6 尼式染色

取大鼠的脑组织, 按照尼式染色试剂盒要求进行脱蜡, 水化, 切片, 染色, 脱水, 透明, 封片后, 上镜检测, 观察各组大鼠脑组织中的尼式小体的变化情况。

1.2.7 各组大鼠脑组织中 MPO 的表达情况

取大鼠的脑组织, 石蜡切片, 抗原修复后, 加入一抗 (1:100), 维持 4℃ 避光过夜, 次日加入二抗, 孵育后, 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察, 以胞质或胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性染色^[7], Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件统计分析阳性细胞率。

1.2.8 蛋白免疫印迹检测各组大鼠脑组织中 BDNF、GAP43 蛋白的表达

取各组大鼠的脑组织, 在 4℃ 裂解液中放置 30 min, 离心, 并将上清液稀释, 常规方法提取样本中的总蛋白, 以 50 μg 样品进行上样, 电泳后, 转膜, 封闭, 加入一抗 (BDNF、GAP43、GAPDH) (1:1 500), 孕育 1 h, 以 (1:10 000) 的二抗稀释, 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 以 GAPDH 作为内参分析各条带的灰度值。

1.3 统计学分析

数据分析采用软件 SPSS 16.0, 脑梗死面积、MPO 阳性表达情况等符合正态分布的计量资料采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两间比较采用独立 *t* 检验, *P* < 0.05 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的一般状态以及神经功能评分的比较

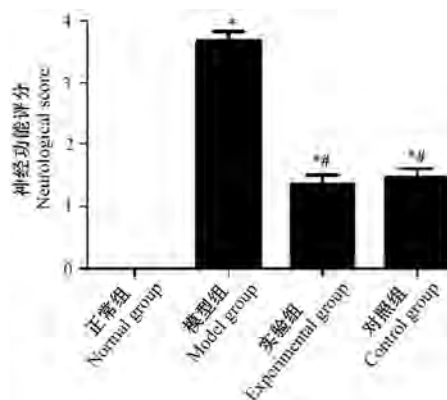
假手术组大鼠的反应敏捷,活泼好动,皮毛光亮,饮食与进水未见明显异常,体重增加较为明显;模型组大鼠皮毛杂乱,暗淡无光,活动量明显减少,反应迟钝,大鼠经常以鼠尾为中心转圈,四肢协调性不高,弓背明显,食欲不良,体重增加不明显;与模型组相比,实验组以及对照组大鼠的症状明显改善,大鼠的四肢协调趋于正常,饮水与进食量明显增加,体重较模型组增加较为明显。大鼠的神经功能评价结果显示,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠的神经功能评分明显升高($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠的神经功能评分明显下降($P < 0.05$),对照组和实验组大鼠的神经功能差异不明显,不具有统计意义($P > 0.05$)(见图 1)。

2.2 激光散斑成像检测各组大鼠大脑皮层血流变化

激光散斑成像结果显示,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠大脑皮层血流灌注量明显减少($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠大脑皮层血流灌注量明显减少($P < 0.05$),对照组和实验组大鼠的神经功能差异不明显,不具有统计意义($P > 0.05$)(见图 2)。

2.3 脑电图检测各组大鼠大脑皮层总功率的变化

脑电图检测结果显示,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠大脑皮层总功率明显下降($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠大



注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠的神经功能

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

Figure 1 Neural function of rats in each group

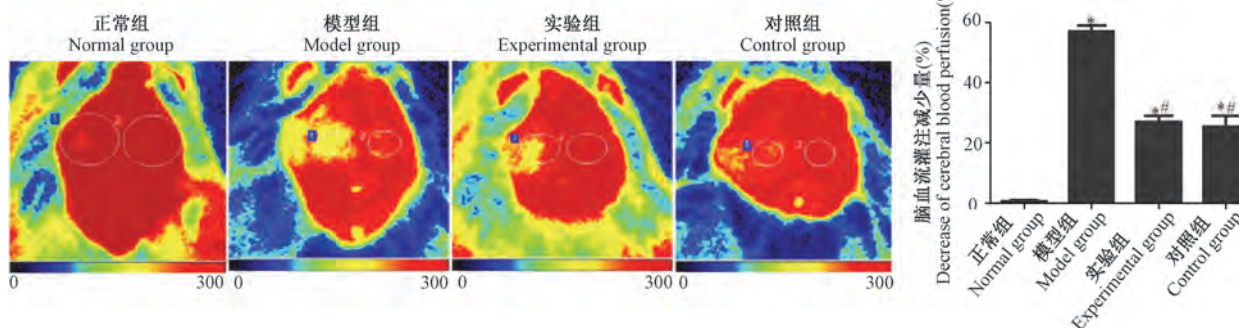
脑皮层总功率明显增强($P < 0.05$)。对照组和实验组大鼠的大脑皮层总功率相差无明显,无统计学意义($P > 0.05$)(见图 3)。

2.4 TTC 检测各组大鼠脑梗死体积

TTC 染色结果显示,假手术组大鼠基本无脑梗死现象,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠脑梗死面积明显增大($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠脑梗死面积明显减小($P < 0.05$),对照组和实验组大鼠的脑梗死体积相差不明显,无统计学意义($P > 0.05$)(见图 4)。

2.5 各组大鼠脑组织内微血管的形态

激光扫描共聚焦显微镜下,假手术组大鼠的大脑皮层的微血管排列规则,血流灌注量正常,与假手术组相比,模型组动物的大脑皮层微血管排列紊乱,走形不规则,微血管之间彼此相连的较少;与模型组相比,实验组和对照组大鼠的大脑皮层的微血



注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠大脑皮层血流灌注量

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

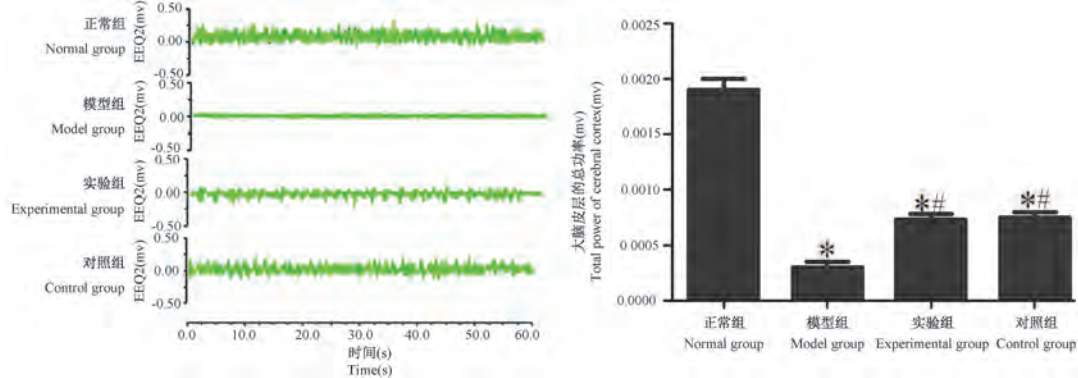
Figure 2 Cerebral cortex blood flow perfusion of rats in each group

管分支数量明显增多,微血管虽然排列迂曲,但血管之间靠拢趋势明显,形成连接(见图5)。

2.6 尼式染色

尼式染色结果显示,假手术组大鼠的神经元细

胞结构清晰、完整,胞体以及突起结构未见异常,尼式小体数量丰富,呈现深蓝色,胞核染色均匀,呈现淡蓝色;模型组大鼠的大脑皮层中神经元细胞胞体皱缩严重,细胞排列失去规则,胞浆中空泡样变性

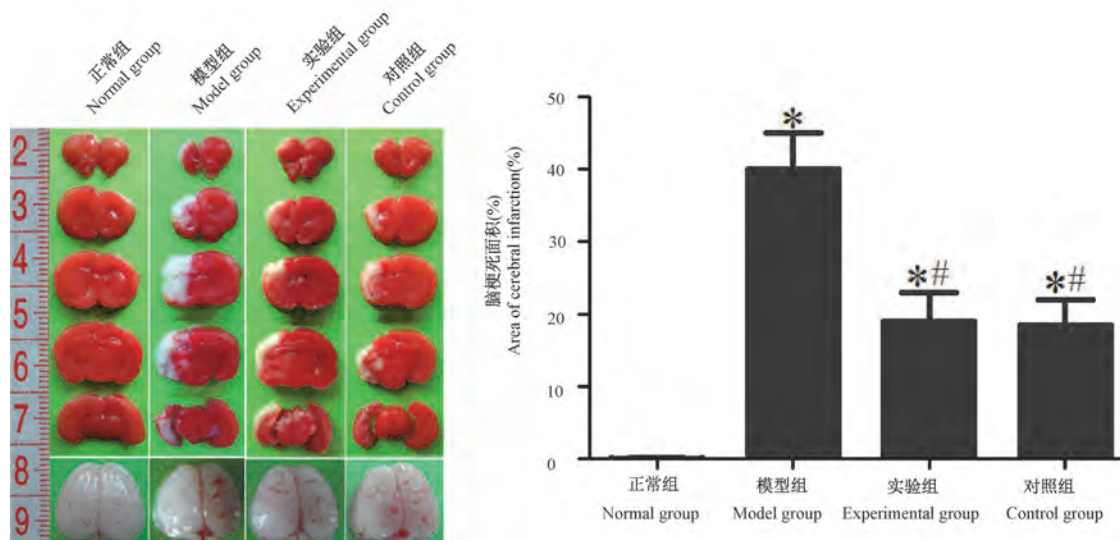


注:与正常组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠的大脑皮层生物电

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

Figure 3 Bioelectricity of cerebral cortex of rats in each group



注:与正常组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图4 TTC 染色

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

Figure 4 TTC staining

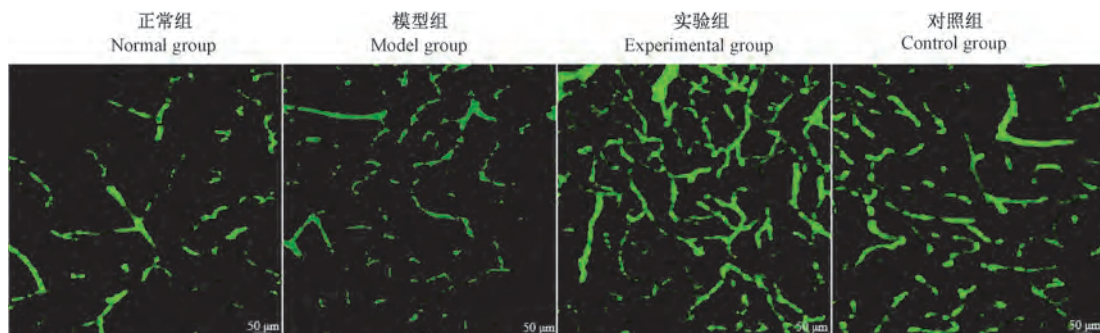


图5 大鼠的大脑皮层的微血管形态

Figure 5 Microvascular morphology of cerebral cortex in rats

明显,尼式小体数量锐减,着色变浅;实验组和对照组大鼠的大脑皮层中神经元细胞尼式小体数量明显回升,染色较重(见图6)。

2.7 各组大鼠脑组织中 MPO 的表达情况

免疫组化结果显示,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠脑组织中 MPO 阳性细胞的比例明显增大($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠脑组织中 MPO 阳性细胞的比例明显降低($P < 0.05$),对照组和实验组大鼠的脑组织中 MPO 阳性细胞的比例相差明显,不具有统计意义

($P > 0.05$)(见图7)。

2.8 各组大鼠脑组织中 BDNF、GAP43 蛋白的表达

Western Blot 结果显示,与假手术组相比,模型组、实验组、对照组大鼠脑组织中 BDNF、GAP43 的表达明显下降($P < 0.05$),与模型组相比,实验组、对照组大鼠脑组织中 BDNF、GAP43 的表达明显增强($P < 0.05$),对照组和实验组大鼠的脑组织中 BDNF、GAP43 的表达相差明显,不具有统计意义($P > 0.05$)(见图8)。

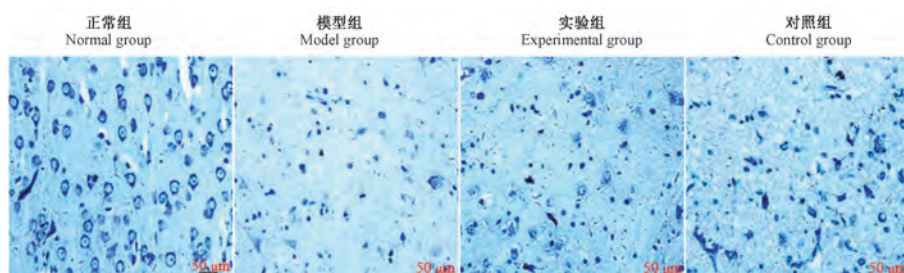
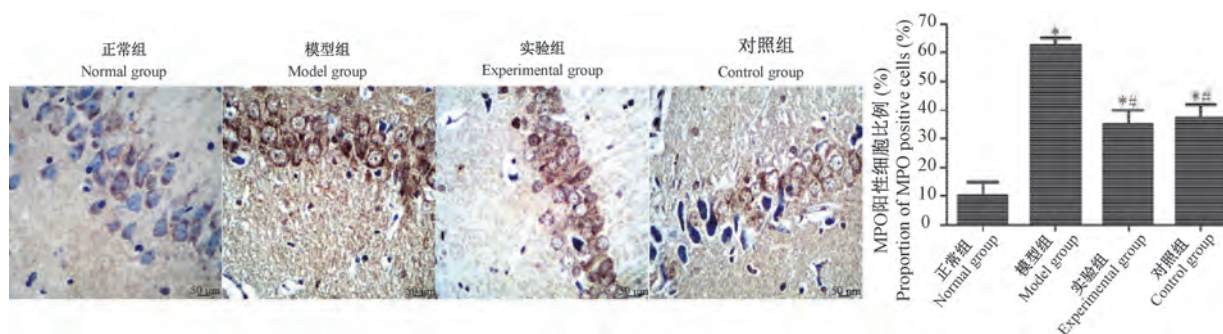


图6 尼式染色

Figure 6 Nissl staining

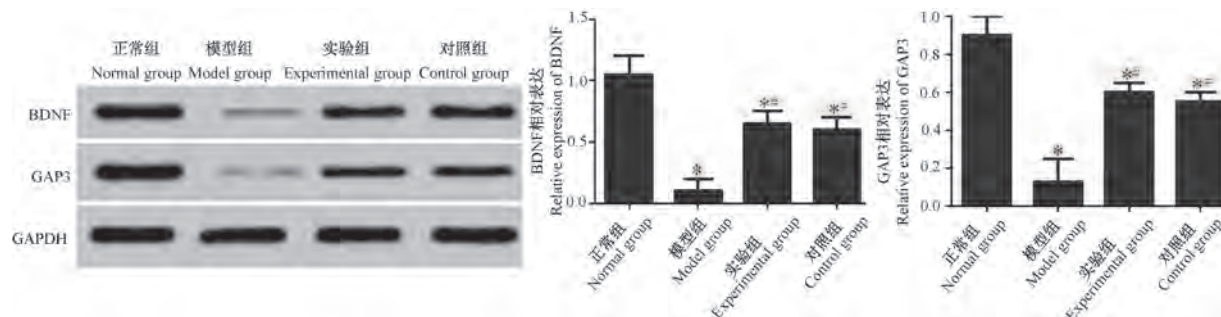


注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图7 大鼠脑组织中 MPO 的表达

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

Figure 7 Expression of MPO in rat brain



注:与正常组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图8 脑组织中 BDNF、GAP43 的表达

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

Figure 8 Expression of BDNF and GAP43 in brain tissue

3 讨论

缺血性脑血管疾病或缺血性中风是世界范围内中老年人致残的主要原因之一,该病是一种脑部血管闭塞导致的血液循环障碍引发的患者脑部组织呈现局灶性坏死的现象进而导致患者的神经功能缺失的危重病。患者出现脑缺血后会出现不同程度的心理、感知、言语、运动以及吞咽等日常生活障碍,给患者的家庭以及社会带来沉重的负担。目前该病的病理机制尚在实验研究阶段,临床上主要采用早期溶栓,辅以神经保护和康复训练来帮助患者改善生活质量,尚无根治性的治疗方案使所有脑缺血患者摆脱疾病困扰^[8]。因此,减轻患者脑缺血后的血液循环障碍,减小患者的脑梗死比例,缓解患者的脑损伤程度,有助于改善患者预后,提高患者的生命质量,这些成为脑卒中治疗领域的研究热点和急需解决的问题。

国内外的大量临床数据显示^[9]有氧运动在脑卒中的康复治疗中能明显改善患者的机能,提高患者的运动功能、认知能力和自主性的生活质量,但是其分子机制尚未完全阐明。胥兴淳等^[10]研究显示有氧运动能明显增强血管内皮生长因子的表达,促进急性脑缺血大鼠脑组织的血管新生,从而降低实验动物的脑梗死的比例,改善其四肢机能。Jing 等^[11]研究显示有氧运动能明显增强神经突触素等相关蛋白的表达,缓解脑缺血大鼠脑组织的神经损伤。Wang 等^[12]研究报道规律性的有氧运动能明显减轻短暂性大脑中动脉闭塞大鼠的脑水肿状态,将造模对实验动物血脑屏障的损伤降低,下调实验动物脑组织的神经元的异常凋亡,改善动物的神经功能障碍。本研究中,结果显示与模型组相比,实验组大鼠的神经功能评分明显升高,动物脑血流的灌注量明显回升,神经元传导生物电的功率明显升高,脑部微血管形态明显转好,脑组织梗死面积明显下降,脑组织神经元细胞中的尼式小体损伤明显缓解,这些结果均证实了规律性的有氧运动,作为治疗手段对疾病的有效干预。

BDNF 是机体脑组织神经营养素家族的重要成员之一。GAP43 是神经特异性的轴突蛋白。研究显示^[13]BDNF 能增强神经突触的可塑性,参与调控中枢神经系统中神经元细胞的生长、发育、再生、分化、凋亡等生理过程;GAP43 可抑制脑损伤后炎症的级联放大,增强脑缺血后神经元相关受体的转

运,阻止损伤加剧。Hu 等^[14]研究表明为期两周的日常跑台训练,能明显增强脑中风大鼠脑组织的 BDNF/GAP43 通路的表达,改善缺血区域的神经突触传递,促进实验动物运动功能的恢复。本研究中结果显示,实验组大鼠脑组织中炎性代表因子 MPO 的表达明显降低,BDNF、GAP43 的表达明显升高,证实了干预措施对信号通路的激活作用。

综上所述,规律性的有氧运动能明显改善脑缺血大鼠的血流灌注和脑部微血管循环障碍,降低其脑组织的梗死面积,抑制炎性的级联放大,这可能与激活 BDNF/GAP43 通路有关。但是就能否将该治疗方式在脑缺血的临床治疗进行全面的推广,仍需结合患者的疾病的进展以及体质的特异性进行综合判断。

参 考 文 献 (References)

- [1] 齐磊, 欧阳欣, 于明帅, 等. 丙泊酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型神经功能改善及 PKA-CREB 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 30-36.
Qi L, Ouyang X, Yu MS, et al. Effects of propofol on the PKA-CREB pathway and improvement of neurological function in focal cerebral ischemia-reperfusion model rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(2): 30-36.
- [2] Shu Y, He Q, Xie Y, et al. Cognitive gains of aerobic exercise in patients with ischemic cerebrovascular disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(12): 582380.
- [3] 焦健华, 高珊珊. 跑台运动对脑卒中后抑郁大鼠抑郁样行为、海马氧化应激及海马 CA1 区 BDNF 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 61-66.
Jiao JH, Gao SS. Effects of treadmill exercise on depressive behavior, and hippocampal oxidative stress and CA1 BDNF expression, in post-stroke depression rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 61-66.
- [4] Wang Q, Wills M, Han Z, et al. Mini review (part I): an experimental concept on exercise and ischemic conditioning in stroke rehabilitation [J]. Brain Circ, 2020, 6(4): 242-247.
- [5] Franke M, Bieber M, Kraft P, et al. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice [J]. Brain Behav Immun, 2021, 92: 223-233.
- [6] Fu K, Chen M, Zheng H, et al. Pelargonidin ameliorates MCAO-induced cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by the action on the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Transl Neurosci, 2021, 12(1): 20-31.
- [7] Liang J, Cui R, Wang J, et al. Intracarotid transplantation of skin-derived precursor schwann cells promotes functional recovery after acute ischemic stroke in rats [J]. Front Neurol, 2021, 12(2): 613547.

- [8] 邓莉, 赵延礼, 何宗钊, 等. 基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 73-78.
- Deng L, Zhao YL, He ZZ, et al. Effect of propofol on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through the Rho/Rho kinase signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 73-78.
- [9] Cheng J, Shen W, Jin L, et al. Treadmill exercise promotes neurogenesis and myelin repair via upregulating Wnt/ β -catenin signaling pathways in the juvenile brain following focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. Int J Mol Med, 2020, 45(5): 1447-1463.
- [10] 笄兴淳, 唐巍, 李斯亮, 等. 电针联合康复训练对脑缺血大鼠血管新生相关因子的影响 [J]. 针刺研究, 2019, 44(8): 547-553.
- Zan XC, Tang W, Li SL, et al. Electroacupuncture combined with rehabilitation training improves regional cerebral blood flow and reduces infarct volume by promoting expression of angiogenesis-related factors in acute cerebral ischemia rats [J]. Acupunct Res, 2019, 44(8): 547-553.
- [11] Jing M, Yi Y, Zhang N, et al. Rehabilitation training improves nerve injuries by affecting Notch1 and SYN [J]. Open Med (Wars), 2020, 5(1): 387-395.
- [12] Wang YL, Lin CH, Chen CC, et al. Exercise preconditioning attenuates neurological injury by preserving old and newly formed HSP72-containing neurons in focal brain ischemia rats [J]. Int J Med Sci, 2019, 16(5): 675-685.
- [13] 李又佳, 韩小妍, 黄燕, 等. 血清 MMP-9 和 BDNF 在急性脑梗死患者中的表达水平变化及预后临床研究 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(5): 69-72.
- Li YJ, Han XY, Huang Y, et al. Clinical study on the changes of serum MMP-9 and BDNF expression levels and prognosis in patients with acute cerebral infarction [J]. Chin Med Herald, 2021, 18(5): 69-72.
- [14] Hu J, Liu PL, Hua Y, et al. Constraint-induced movement therapy enhances AMPA receptor-dependent synaptic plasticity in the ipsilateral hemisphere following ischemic stroke [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(2): 319-324.

[收稿日期] 2021-04-12

农淄心,邓琳,张超峰,等. 顺铂连续和间隔造模诱发的药源性虚证小鼠类固醇激素合成能力的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 626-636.

Nong ZX, Deng L, Zhang CF, et al. Comparative study of steroid hormone synthesis in a drug-induced deficiency syndrome by continuous and interval administration of cisplatin in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 626-636.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.009

顺铂连续和间隔造模诱发的药源性虚证小鼠 类固醇激素合成能力的比较研究

农淄心¹, 邓琳², 张超峰², 贺健祥², 谢海纳¹, 潘志强^{1*}

(1. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

【摘要】 目的 研究顺铂不同给药方案对小鼠类固醇激素合成及储备功能的影响。**方法** 40 只雌性 ICR 小鼠分为 4 组, 顺铂连续和间隔造模组以及两个对照组。顺铂连续造模组给药 7 d, 每天注射 3 mg/kg 顺铂; 间隔造模组每周注射 1 次 10 mg/kg 顺铂, 共 4 次。末次造模前进行旷场实验、转棒疲劳实验、抓力测试; 次日处死前称体重, 摘取小鼠心脏、脾、胸腺和双侧肾并称重; RT-qPCR 检测下丘脑 *GnRH* 和 *CRH*、垂体 *Pomc*、*Fshb*、*Lhb*、*Pou1f1* 基因表达, 以及肾上腺和卵巢类固醇合成酶 (*StAR*、*Cyp11a1*、*Cyp21a1*、*Cyp17a1*、*Cyp11b1*、*Hsd3b2*、*Cyp19a1*、*Hsd17b1*) 及受体 (*Esr1*、*Esr2* 和 *Gper1*) 基因表达; Western Blot 检测肾上腺和卵巢 *StAR*、*CYP11A1*、*CYP21A2* 和 *CYP11B1* 蛋白表达。**结果** 与对照组比较: (1) 不同频次顺铂造模均可抑制小鼠体重增长, 顺铂累积后可以诱导小鼠气虚证表现, 并抑制脏器质量。(2) 不同频次顺铂造模均能加速激活原始卵泡分化, 产生大量闭锁卵泡, 诱导膜细胞及颗粒细胞凋亡, 健康的成熟卵泡减少; 但对肾上腺组织和细胞形态影响不大。(3) 连续造模后肾上腺 *StAR* 蛋白表达下调; 间隔造模后 *StAR* 升高, 但下调 *CYP11B1* 蛋白表达。(4) 连续造模后, 卵巢 *Cyp11a1*、*Hsd3b2*、*Esr1* 和 *Gper1* 基因表达上调, *Star* 和 *Cyp17a1* 基因表达下调; 间隔造模后 *StAR* 蛋白表达和 *Hsd3b2* 基因表达下调。(5) 顺铂连续造模后下丘脑 *GnRH* 和 *CRH* 基因表达明显下调。(6) 顺铂连续造模后垂体 *Pomc*、*Fshb*、*Pou1f1* 基因表达升高, 而间隔造模组 *Lhb* 表达下降。**结论** 顺铂能够诱发小鼠气虚、精气不足证的相关表现; 合成类固醇激素的卵巢受到选择性损伤大于肾上腺, 短期连续给药也进一步抑制 HPA 轴和 HPG 轴的高级中枢下丘脑和垂体功能。

【关键词】 顺铂; 证候; 药源性证候; 卵巢; 肾上腺; 类固醇激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0626-11

Comparative study of steroid hormone synthesis in a drug-induced deficiency syndrome by continuous and interval administration of cisplatin in mice

NONG Zixin¹, DENG Lin², ZHANG Chaofeng², HE Jianxiang², XIE Haina¹, PAN Zhiqiang^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.

2. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Corresponding author: PAN Zhiqiang. Email: pzq527@163.com

【Abstract】 Objective To research the effect of different administration protocols of cisplatin on the biosynthesis and reserve of steroids in mice. **Methods** Forty female ICR mice were randomly divided into four groups: a cisplatin continuous administration group (CA-group), a cisplatin interval administration group (IA-group), and two corresponding control groups. The CA-group was injected with 3 mg/kg cisplatin for 7 consecutive days. The IA-group was injected with 10 mg/kg cisplatin once per week, for 4 weeks. Rotating-stick, holding power, movements and axillary temperature were

[基金项目] 上海市科委实验动物专项 (19140905000)。

Funded by the Experimental Animal Research for Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (19140905000)。

[作者简介] 农淄心 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医证候实验。Email: jasonnong@outlook.com

[通信作者] 潘志强 (1977—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 实验医学教学与中医基础实验。Email: pzq527@163.com

examined before the last injection, also the end of laboratory animal model making. The day after, the mice were killed, the visceral organs were separated weighed, included the kidney, heart, thymus and spleen. Relative mRNA expression levels in the hypothalamus (*GnRH* and *CRH*), pituitary (*Pomc*, *Fshb*, *Lhb*, and *Pou1f1*), adrenal and ovary (*StAR*, *Cyp11a1*, *Cyp21a1*, *Cyp17a1*, *Cyp11b1*, *Hsd3b2*, *Cyp19a1*, *Hsd17b1*, *Esr1*, *Esr2*, and *Gper1*) tissue were examined by RT-qPCR. Protein expression levels (*StAR*, *CYP11A1*, *CYP21A2* and *CYP11B1*) in adrenal and ovary tissues were examined.

Results Compared with the control group, body weight was reduced by cisplatin in two different mouse models. Visceral organs were inhibited and the Qi deficiency syndrome was induced by cisplatin administration. In two different cisplatin models, murine primordial follicles showed accelerated activation and differentiation, and many atretic follicles were produced containing apoptotic granulosa and theca cells. Healthy mature follicle numbers were reduced significantly. There were no detectable changes in adrenal histology. In adrenal tissue, *StAR* expression was inhibited in the CA-group and upregulated in the IA-group, which also exhibited reduced *CYP11B1* protein expression. In the ovary, the expression levels of *Cyp11a1*, *Hsd3b2*, *Esr1*, and *Gper1* mRNAs were upregulated and *Star* and *Cyp17a1* mRNA expression was reduced in the CA-group. The expression levels of *StAR* protein and *Hsd3b2* mRNA were decreased in the IA-group. In the hypothalamus, the expression levels of *GnRH* and *CRH* mRNAs were reduced in the CA-group. In the pituitary, the expression levels of *Pomc*, *Fshb* and *Pou1f1* mRNAs were increased in the CA-group, and level of *Lhb* mRNA was reduced in the IA-group. **Conclusions** Qi deficiency syndrome and vital essence deficiency syndrome in mice can be induced by cisplatin. The ovary was damaged more significantly and selectivity than the adrenal gland. The functions of the hypothalamus and pituitary were further inhibited by continuous cisplatin injection in the short-term.

【Keywords】 cisplatin; syndrome; drug-induced syndromes; ovary; adrenal cortex; steroid hormone

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

顺铂(Cisplatin, CDDP)是临床常用的抗肿瘤药物,针对女性常见恶性肿瘤诸如乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌,顺铂是常选的化疗药物之一。由于卵巢对化疗极为敏感,常导致卵巢早衰,可能与顺铂促使原始卵泡死亡、减少原始卵泡储备、导致卵泡闭锁、降低雌二醇等有关,因此,基础研究常将顺铂作为动物卵巢早衰模型的药物^[1]。卵巢是女性重要的类固醇激素合成组织,受下丘脑-垂体高级中枢的调控,同时与肾上腺皮质轴存在相互影响。而发育和生殖的功能在中医学属“肾藏精”的功能,肾精不足的虚证常与生殖系统损伤相联系。在顺铂治疗过程中,类固醇激素合成相关的下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)和下丘脑-垂体-性腺轴(HPG轴)受顺铂影响是否与虚证发生有关^[2-4]。对此,本文采用雌性小鼠为对象,同步比较顺铂短时间连续给药与长时程间断给药的方案,发现两种造模方式均可以导致小鼠药源性虚证,对性腺轴的损害较严重,而肾上腺皮质轴呈现较强的代偿性,短期连续给药对下丘脑、垂体功能的损害更明显。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

40只SPF级4~5周龄ICR雌性小鼠,体重20

~25g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCSK(沪)2017-0005】。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级饲养室【SYXK(沪)2020-0009】,室温22~25℃,湿度50%~60%,12h明暗交替,自由饮水,予以普通饲料喂养。本实验方案符合上海中医药大学实验动物伦理委员会要求(PZSHUTCM200904017)。

1.1.2 主要试剂与仪器

注射用顺铂(冻干型)(齐鲁制药有限公司);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔/小鼠IgG(H+L)、封闭液、一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司);RNAiso Plus、PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) II(宝生物工程(大连)有限公司);A5441抗体β-actin抗体(Sigma-Aldrich,美国);ab96637-StAR抗体、ab175408-Cyp11A1抗体、ab232701-Cyp21A2抗体、ab2298821-Cyp11B1抗体(Abcam,美国)。CP225D型电子天平(赛多利斯,德国),7500 Fast型实时荧光定量PCR仪(ABI,美国),Elx800型酶标仪(Biotek,美国),alpha化学发光型凝胶成像系统(Protein-Simple,美国),YLS-4C型转棒式疲劳仪、YLS-13A小鼠抓力测试仪(山东省医学科学院设备站),Tissuelyser-64L多样品组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与药物干预

小鼠适应性饲养 1 周后开始实验,随机分为连续对照组、连续造模组、间隔对照组和间隔造模组,每组 10 只。连续造模组将顺铂用生理盐水稀释到 0.3 mg/mL,按照 3 mg/kg 顺铂腹腔注射,每天 1 次,连续 7 d^[5]。间隔造模组将顺铂用生理盐水稀释至浓度为 1 mg/mL,按照 10 mg/kg 顺铂腹腔注射,每周 1 次,共 4 次(D₁、D₇、D₁₄、D₂₁)^[6]。对照组注射等量生理盐水。

1.2.2 小鼠体重检测

每日上午 8:30 记录连续造模组小鼠体重,每周 2 次记录间隔造模组小鼠体重。

1.2.3 小鼠气虚疲乏指标检测

(1)旷场实验:将小鼠分别置于铺设有 4 cm × 4 cm 方块的透明塑料板的旷场笼中,录像并统计小鼠 1 min 内水平和垂直运动的次数。其后肢移动的格子数记为水平运动,前肢离地的次数记为垂直运动,以分析小鼠自主活动度。

(2)抓力测试:同一人使用小鼠抓力仪进行测试,每只小鼠记录 3 次,取平均值分析小鼠气力。

(3)转棒疲劳试验:设定转速为 30 r/min,每次实验前将每只小鼠在机器上进行 3 次适应训练。最大转棒时间设置为 10 min,超过记为 10 min,以分析小鼠疲劳度。

(4)小鼠脏器:处死小鼠前记录小鼠体重,称取小鼠脾、心脏、双侧肾和胸腺质量。

1.2.4 小鼠肾上腺与卵巢组织切片及 HE 染色

将肾上腺与卵巢组织用 10% 甲醛溶液固定后,常规石蜡包埋与切片;HE 染色,将切片浸泡于苏木素溶液中染色,取出冲洗后放入伊红染液复染并冲洗;进行脱水,透明,封片,晾干。并置于 10 × 10、10 × 20 和 10 × 40 显微镜下,观察分析肾上腺和卵巢的组织结构和细胞形态并采集图像^[7]。

1.2.5 RT-qPCR 检测相关基因表达

取小鼠肾上腺、卵巢、下丘脑和垂体组织,分别加入 TRIzol 试剂抽提总 RNA。采用 Primer3 (v. 0.4.0) 在线软件设计引物并委托 Life Technologies 公司合成(见表 1)。应用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录反应制备 cDNA,反应体系为 40 μL,反应条件为 37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 终止;PCR 扩增反应体系为 20 μL,反应程序为 95℃ 变性 3 min,95℃ 退火 30 s,60℃ 延伸 30 s,40 个循环。每组 3 个复

孔,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primers

基因名称 Gene name	引物序列 Primers	引物长度(bp) Length (bp)
<i>β-actin</i>	Forward: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3' Reverse: 5'-GGGGTGTTCGAAGCTCTCAAA-3'	165
<i>Star</i>	Forward: 5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3' Reverse: 5'-GAAACACCTTGCCACATCT-3'	103
<i>Cyp11a1</i>	Forward: 5'-ACTTCGGTACTTGGGCTTT-3' Reverse: 5'-GCTTGAGAGGCTGGAAGTTG-3'	201
<i>Cyp11b1</i>	Forward: 5'-GTATCGAGAGCTGGCAGAGG-3' Reverse: 5'-GGGTTGATGTCGTCTCAGTG-3'	140
<i>Cyp21a1</i>	Forward: 5'-CTCCGGCTATGACATCCCTA-3' Reverse: 5'-ACAGCCAAAGGATGCTGTTTC-3'	151
<i>Cyp17a1</i>	Forward: 5'-TGTCATATGCATGCCAACT-3' Reverse: 5'-CCCTTCTTACGAGCACTTC-3'	132
<i>Hsd3b2</i>	Forward: 5'-TCCAGCTCAGTTGATGTTGC-3' Reverse: 5'-TGCCTTCTCAGCCATCTTTT-3'	129
<i>Cyp19a1</i>	Forward: 5'-CTTTCAGCCTTTTGGCTTTG-3' Reverse: 5'-ATTTCCACAAGGTGCCTGTC-3'	192
<i>Hsd17b1</i>	Forward: 5'-GTTATGAGCAAGCCCTGAGC-3' Reverse: 5'-AAGCGTTCGTGAGAGAAGTA-3'	112
<i>Esr1</i>	Forward: 5'-TTACGAAGTGGGCATGATGA-3' Reverse: 5'-CCTGAAGCACCATTTCATT-3'	117
<i>Esr2</i>	Forward: 5'-GAAGCTGGCTGACAAGGAAC-3' Reverse: 5'-AACGAGGTCTGGAGCAAAGA-3'	187
<i>Gper1</i>	Forward: 5'-GTCAACCTTGCAGCCTTCTC-3' Reverse: 5'-AGCACTGCTGAACCTGACCT-3'	198
<i>Pomc</i>	Forward: 5'-CATTAGGCTTGGAGCAGGTC-3' Reverse: 5'-CTTCTCGGAGGTCTGAAGC-3'	128
<i>Fshb</i>	Forward: 5'-TCAGCTTTCCCCAGAAGAGA-3' Reverse: 5'-CCGAGCTGGGTCTTATACA-3'	249
<i>Lhb</i>	Forward: 5'-CTCAGCCAGTGTGCACCTAC-3' Reverse: 5'-GACCCACACAGTCAGAGCTA-3'	150
<i>Pou1f1</i>	Forward: 5'-CACGGCTCAGAATTCAGTCA-3' Reverse: 5'-CTGATGTTTGTCTCCGTTT-3'	185
<i>GnRH</i>	Forward: 5'-AGCACTGGTCTATGGGTTG-3' Reverse: 5'-GGGCCAGTGCATCTACATCT-3'	221
<i>CRH</i>	Forward: 5'-TCTCACCTTCCACCTTCTGC-3' Reverse: 5'-AAGCGCAACATTTTCATTCC-3'	118

1.2.6 Western Blot 检测相关蛋白表达

取小鼠肾上腺、卵巢分别置于含有 0.5 mL 或 1 mL RIPA 裂解液的 EP 管中,研磨后,4℃ 条件下 14 000 r/min 离心 15 min,取上清液。BCA 法测定总蛋白浓度。各孔取 20 μg 蛋白上样,于 10% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白分离(浓缩胶电压 80 V,30 min;分离胶电压 120 V,90 min)。将分离后的蛋白电转移(恒流 250 mA,150 min),加入封闭液封闭 1.5 h。加入 TBST 溶液,置于摇床上振荡洗膜,清洗 3 次,每次 10 min,分别加入一抗抗体(β-actin 抗体的体积稀释比例为 1:50 000,其他抗体的体积稀释比例

均为 1 : 2000), 4℃ 孵育过夜。次日洗膜(同上), 加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG (体积稀释比例为 1 : 2000), 室温孵育 1.5 h。洗膜后依据说明书滴加显色剂进行显影, 采用 Image J 图像分析管理系统对蛋白条带灰度值进行分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析和作图。采用非配对 *t* 检验或 Mann-Whitney test 分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

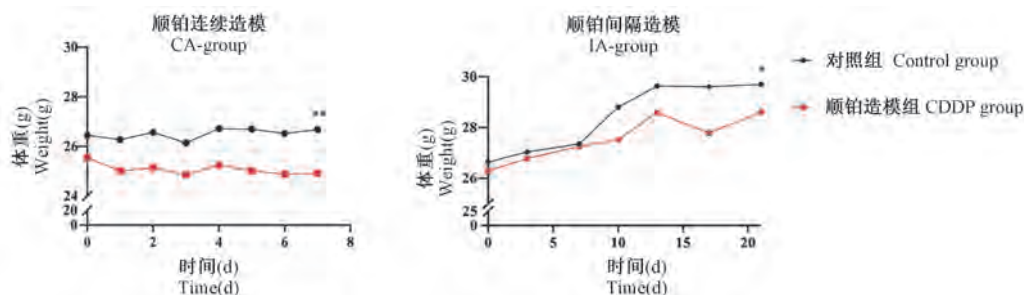
2.1 顺铂对小鼠体质量的影响

与对照组比较, 顺铂连续腹腔注射造模后, 小

鼠体重下降 ($P < 0.01$); 顺铂间隔造模组小鼠体重增长速度显著低于对照组 ($P < 0.05$) (见图 1)。提示不同频次顺铂造模均可抑制小鼠体重增长。

2.2 顺铂对小鼠气虚疲乏指标的影响

与对照组比较, 顺铂连续造模或间隔造模对小鼠转棒运动与小鼠四肢抓力均无明显影响; 然而, 顺铂连续造模后小鼠水平移动跨格子数明显下降 ($P < 0.01$), 顺铂间隔造模组第 20 天后小鼠水平移动跨格子数及垂直运动的自主活动度均显著降低 ($P < 0.05$) (见图 2)。由于疲劳转棒运动与四肢抓力反映了小鼠被动行为, 旷场活动度反映了小鼠自主行为, 综合这三项指标, 提示连续造模或间隔造模致顺铂累积后可以诱导小鼠气虚证特征。



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 顺铂对小鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Influence of mice body weight by the cisplatin

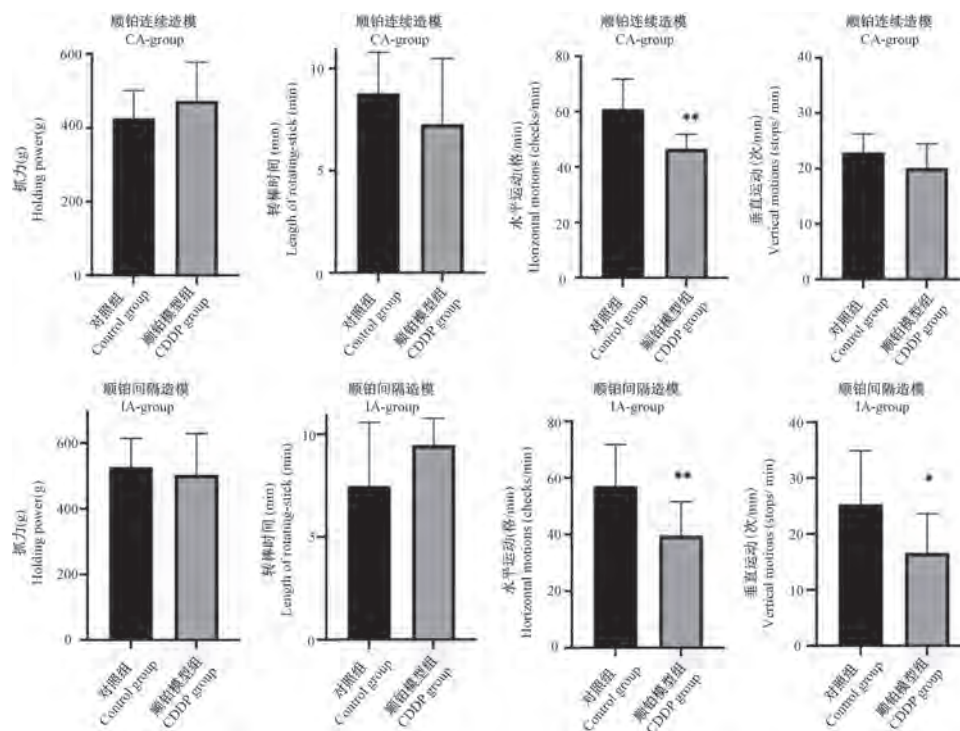


图 2 顺铂对小鼠气虚疲乏指标的影响

Figure 2 Influence of mice index of deficiency of vital energy and fatigue by the cisplatin

2.3 顺铂对小鼠脏器的影响

与对照组比较,顺铂连续造模后显著抑制小鼠心脏与胸腺($P < 0.01$);顺铂间隔造模后小鼠脾、双肾和胸腺质量下降($P < 0.05$)(见图 3)。提示顺铂累积效应对小鼠免疫器官影响更显著。

2.4 顺铂对小鼠类固醇激素合成组织形态的影响

2.4.1 顺铂对小鼠肾上腺皮质形态的影响

与对照组比较,顺铂连续造模和间隔造模后均无明显改变(见图 4),提示顺铂对雌性小鼠肾上腺损伤不明显。

2.4.2 顺铂对小鼠卵巢形态的影响

与对照组比较,顺铂连续造模和间隔造模后均出现小鼠卵巢大量原始卵泡被激活,分化出大量初级和次级卵泡,闭锁卵泡增多,原始卵泡和成熟卵泡减少,卵泡膜变薄,卵泡膜细胞减少,卵泡颗粒细胞减少,黄体和白体增多,卵泡膜细胞分布紊乱。其中顺铂连续造模后出现大量闭锁卵泡,卵泡膜变薄明显;顺铂间隔造模后则出现更多的黄体和白体,卵泡上的膜细胞和颗粒细胞分布紊乱明显(见图 4)。提示顺铂能加速激活原始卵泡分化,产生大量闭锁卵泡,诱导膜细胞及颗粒细胞凋亡,健康的成熟卵泡减少。

2.5 顺铂对小鼠肾上腺皮质类固醇激素合成酶的影响

与对照组比较,顺铂连续造模后 *Cyp21a1* 明显下降($P < 0.05$),但顺铂对雌性小鼠肾上腺 *Star*、*Cyp11a1* 与 *Cyp11b1* 的 mRNA 表达无明显影响(见图 5)。StAR 蛋白表达量在顺铂连续造模后明显下降($P < 0.05$),在顺铂间隔造模后明显上升($P < 0.05$),但顺铂间隔造模后抑制 CYP11B1 的蛋白表达,雌性小鼠肾上腺 CYP11A1 和 CYP21A2 蛋白表达变化不明显(见图 6)。

提示顺铂短期连续造模会抑制肾上腺 StAR 蛋白表达,对雌性小鼠肾上腺类固醇合成酶的表达以抑制效应为主。长期间隔给药则导致 StAR 代偿性升高,与肾上腺皮质激素应激过程有关,而长期间隔造模可能会抑制肾上腺皮质酮合成能力,但总体上对雌性小鼠肾上腺类固醇合成酶影响较小,可能与肾上腺皮质参与应激的自我代偿性反应有关。

2.6 顺铂对小鼠卵巢雌二醇合成的影响

2.6.1 顺铂对小鼠卵巢类固醇合成酶的影响

与对照组比较,顺铂连续造模后,小鼠卵巢 *Cyp11a1* 的 mRNA 表达量明显上调($P < 0.05$), *Cyp17a1* 表达明显下调,而 *Hsd3b2* 明显上调($P <$

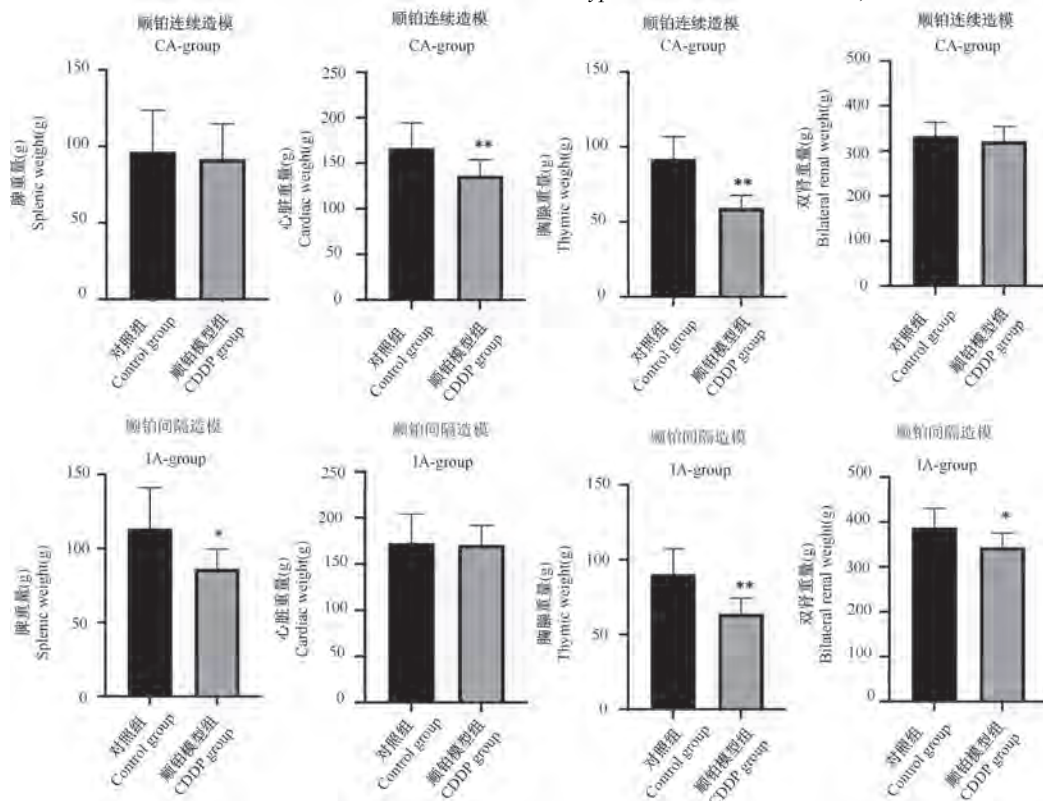
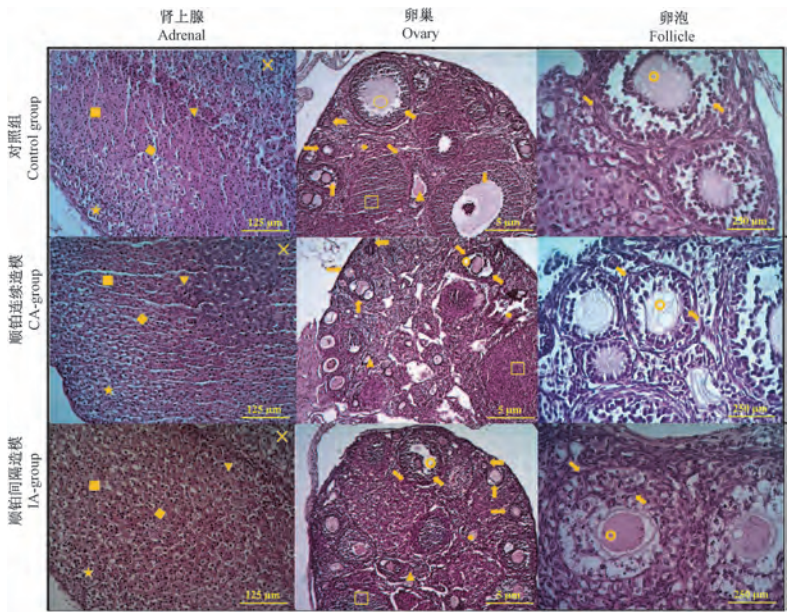


图 3 顺铂对小鼠脏器的影响

Figure 3 Influence of mice visceral organ weight influence by the cisplatin



注: ■: 肾上腺皮质; ×: 肾上腺髓质; ★: 球状带; ◆: 束状带; ▼: 网状带; ○: 卵泡腔; □: 黄体; ▲: 闭锁卵泡; ●: 白体; ←: 原始卵泡; →: 初级卵泡; ↑: 次级卵泡; ↓: 成熟卵泡; ↘: 卵泡膜; ↙: 颗粒细胞。

图 4 顺铂对小鼠肾上腺皮质与卵巢形态的改变

Note. ■. Adrenal cortex. ×. Adrenal medulla. ★. Globular zone. ◆. Fascicular zone. ▼. Reticular zone. ○. Follicular cavity. □. Corpus luteum. ▲. Atresic follicle. ●. Corpus albicans. ←. Primordial follicle. →. Primary follicle. ↑. Secondary follicle. ↓. Mature follicle. ↘. Theca follicularis. ↙. Granulosa cells.

Figure 4 Histological changes of adrenal and ovary by the cisplatin of the mice

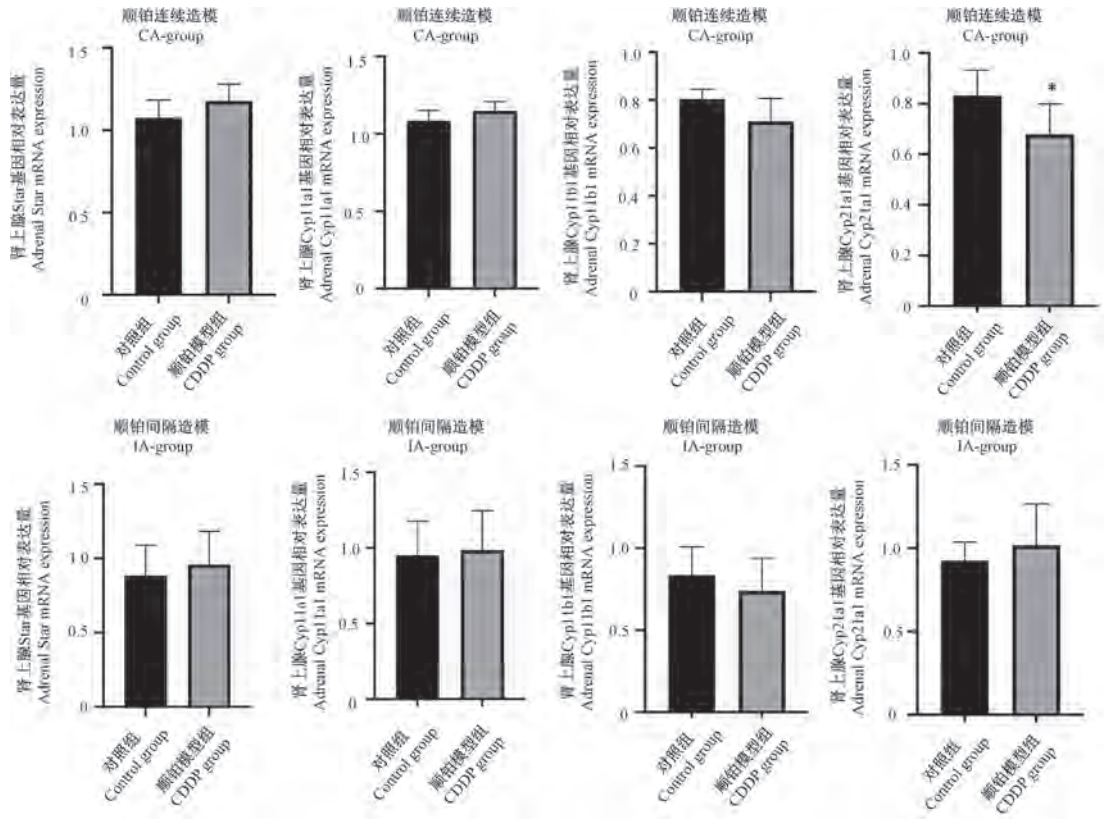


图 5 顺铂对小鼠肾上腺皮质类固醇激素合成酶的影响

Figure 5 Influence of the steroid hormone synthetase mRNA expression in adrenal cortex by the cisplatin of the mice

0.01); 而间隔造模后小鼠卵巢 StAR 蛋白表达量明显下调 ($P < 0.01$), *Hsd3b2* 的 mRNA 表达量明显下调 ($P < 0.01$) (见图 6)。由于 P450c17 酶催化 17α 羟基孕烯醇酮合成 DHEA, 而 DHEA 是雄激素合成的前体物质; 3β HSD2 酶是催化雄烯二酮和睾酮合成酶, 结果 *Cyp17a1* 和 *Hsd3b2* 表达相反模式, 提示顺铂对卵巢雄激素的合成存在替代途径。

与对照组比较, 顺铂连续造模后, 小鼠卵巢 *Cyp19a1* 和 *Hsd17b1* 的 mRNA 表达量无明显影响 (见图 7)。由于 *Cyp19a1* 和 *Hsd17b1* 是合成雌二醇 2 条途径的重要酶, 结果 *Cyp19a1* 和 *Hsd17b1* 表达相反模式, 提示顺铂对卵巢雌二醇的合成也存在替代途径。

2.6.2 顺铂对小鼠卵巢雌激素受体 *Esr1* ($ER\alpha$)、*Esr2* ($ER\beta$) 和 *Gper1* 的影响

与对照组比较, 顺铂连续造模后, 小鼠卵巢 *Esr1* 和 *Gper1* 的 mRNA 表达量明显上调 ($P < 0.01$), 见

图 8, 提示顺铂连续造模后, 小鼠卵巢内雌激素受体表达增强。

综上, 短期顺铂连续造模后, 小鼠卵巢类固醇激素合成酶可能受应激部分上调, 雌激素受体表达也增强, 但间隔造模后类固醇激素合成酶以表达下调为主。雄激素的合成会受 *Cyp17a1* 和 *Hsd3b2* 的下调而明显减少, 虽然顺铂对雌激素合成必要的 *Cyp19a1* 和 *Hsd17b1* 无明显影响, 对雄激素向雌激素的转化功能可能影响较小, 但雄激素作为雌激素的前体, 其产量减少也可能影响雌激素的总量。

2.7 顺铂对小鼠下丘脑的影响

与对照组比较, 顺铂连续造模后下丘脑 GnRH 和 CRH 的表达明显下调 ($P < 0.05$); 而间隔造模组无明显差异, 见图 9, 提示短期顺铂连续造模抑制下丘脑功能, 促性腺激素释放素 (GnRH) 和促肾上腺素释放激素 (CRH) 水平下降。

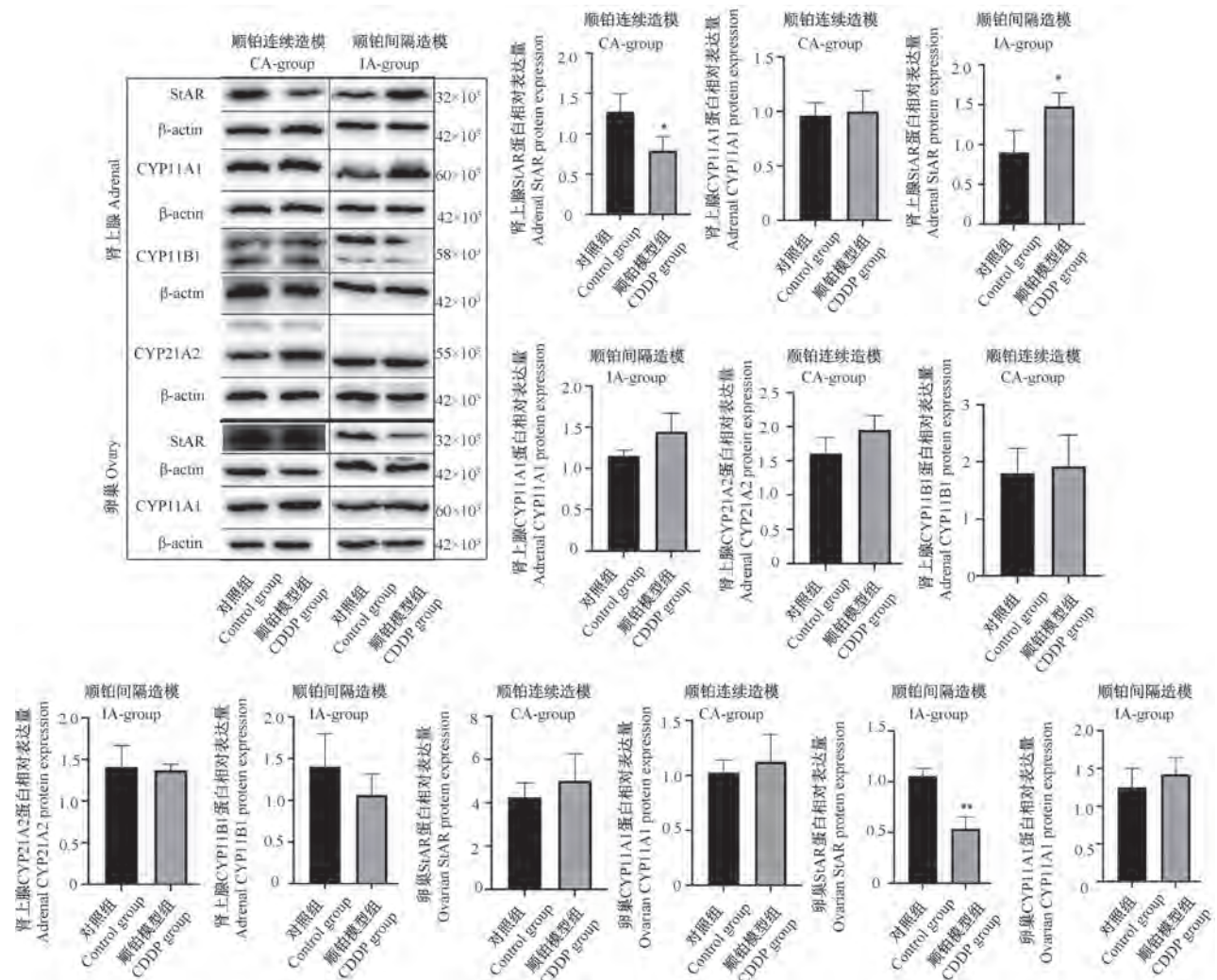


图 6 顺铂对小鼠肾上腺和卵巢类固醇激素合成酶蛋白表达的影响

Figure 6 Influence of the steroid hormone synthetase protein expression in adrenal cortex and ovary by the cisplatin of the mice

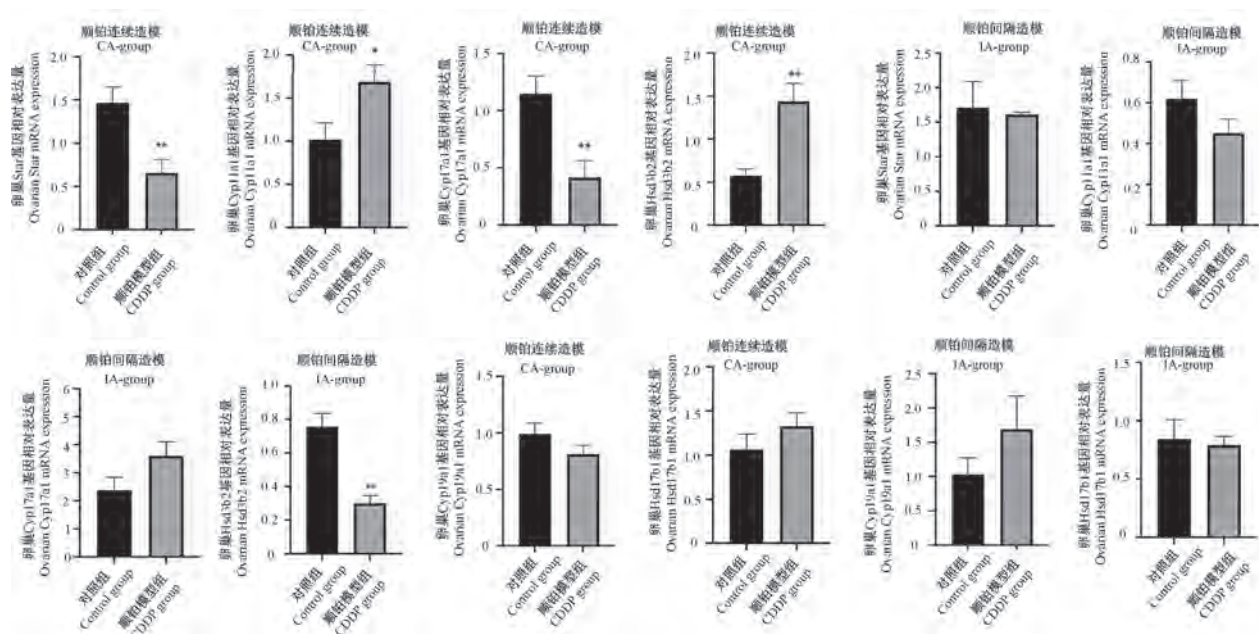


图7 顺铂对小鼠卵巢类固醇激素合成酶 mRNA 表达的影响

Figure 7 Influence of the steroid hormone synthetase mRNA expression in ovary by the cisplatin of the mice

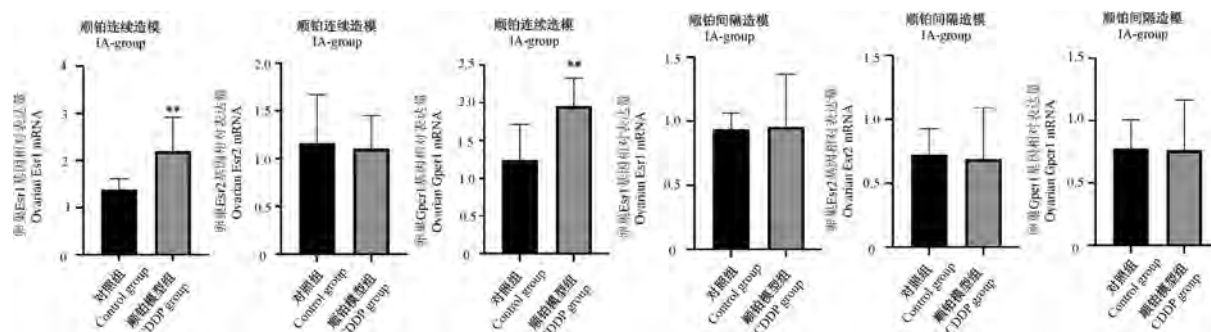
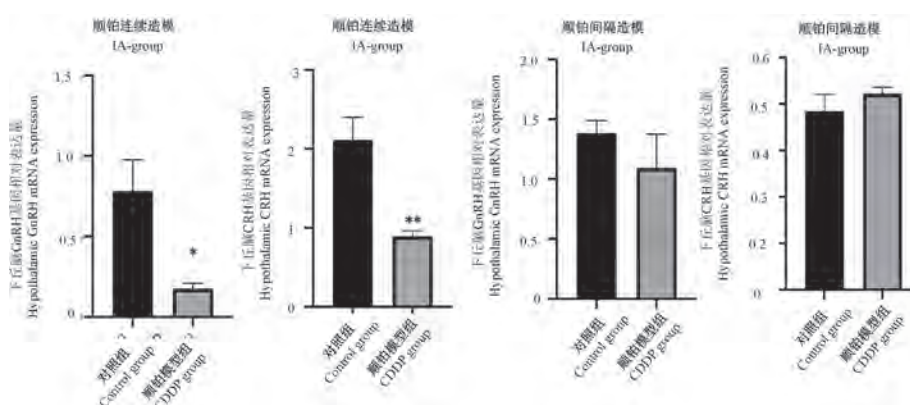
图8 顺铂对小鼠卵巢雌激素受体的影响 *Esr1*、*Esr2* 和 *Gper1*Figure 8 Influence of the estrogen receptor *Esr1*, *Esr2* and *Gper1* by the cisplatin

图9 顺铂对小鼠下丘脑的影响

Figure 9 Influence of the hypothalamus by the cisplatin

2.8 顺铂对小鼠垂体的影响

与对照组比较,顺铂连续造模垂体 *Pomc*、*Fshb*、*Pou1f1* 表达明显升高 ($P < 0.01$);而间隔造模组

Lhb 表达显著下降 ($P < 0.01$),见图 10,提示短期顺铂连续造模抑制下丘脑功能后导致垂体功能代偿性升高;而长期间断给药对垂体功能影响较弱。

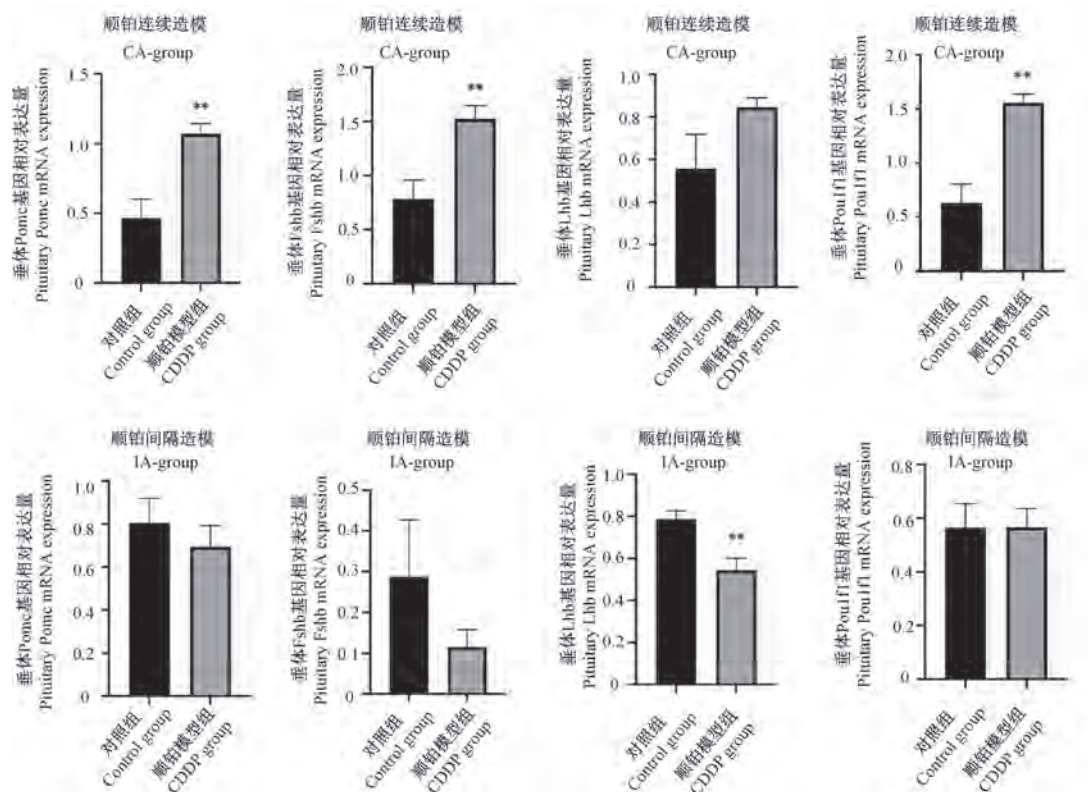


图 10 顺铂对小鼠垂体的影响

Figure 10 Influence of the pituitary by the cisplatin of the mice

3 讨论

顺铂抗肿瘤药效是确切的,但是其毒性作用限制了其药效的最大化,寻找降低顺铂毒性作用又能确保其药理作用的用药方案是临床与基础研究不断探索的课题。由于顺铂存在生殖毒性^[8]以及卵巢对顺铂的敏感性,顺铂连续给药造模的卵巢早衰模型^[9]已被学术界广泛采用。但临床治疗中,短期的连续给药会使顺铂大量沉积,产生较多强烈的毒副作用^[10],而长期的间隔给药可能更为贴近临床上顺铂的实际使用情况,间隔期间有助于机体细胞对顺铂毒性的修复,能减少其他器官受顺铂沉积的影响。此外卵巢早衰在中医治疗上多以补益气血、温肾填精为主,肾虚是主要病因之一^[11]。因此,本研究主要从肾虚相关的 HPA 轴和 HPG 轴改变^[3-4],采用顺铂短期连续给药与长期间断给药的方案,比较评价两种造模对雌性小鼠卵巢、肾上腺类固醇激素合成能力的影响。

采用顺铂短时间连续给药与长时程间断给药的方案,比较 2 种造模对雌性小鼠卵巢、肾上腺类固醇激素合成的影响,结果发现,顺铂连续造模和间隔造模完成后小鼠的体重、自主活动度均明显下

降,顺铂连续造模显著抑制小鼠心脏与胸腺,顺铂间隔造模小鼠脾、双肾和胸腺质量均下降。提示顺铂即使间隔给药,因药物在体内的累计效应,仍然对小鼠自主活动能力及体重与脏器有明显的抑制作用,呈现类似中医气虚证、精气不足的特征。进一步从类固醇激素合成组织的形态学变化看,发现顺铂连续造模和间隔造模后,两组小鼠卵巢均可见大量的闭锁卵泡形成,健康的成熟卵泡减少,卵泡膜细胞和颗粒细胞明显减少,两种造模后卵巢损伤均很明显。而肾上腺皮质球状带、束状带与网状带细胞未见明显的变化,可能与雌激素对于 HPA 轴的增益作用^[12]以及肾上腺皮质参与体内应激过程的代偿性自我保护有关。因此,同为类固醇激素合成的组织,卵巢更容易受到顺铂的损伤。

在此基础上,检测顺铂对类固醇激素合成与储备功能的影响。由于肾上腺皮质激素与卵巢雌激素合成的起始过程相同,均以胆固醇为原料,通过细胞内类固醇急性调节蛋白 (StAR) 与胆固醇侧链裂解酶 (P450_{scc}, 由 CYP11A1 基因编码) 合成孕烯醇酮作为重要的前体物质。结果发现,StAR 蛋白在肾上腺组织连续造模后明显下降、间隔造模后明显上升,推测顺铂短时间大量沉积后对肾上腺皮质线

粒体上与胆固醇转运相关的 StAR 受氧化应激损伤有关^[1,13],而间隔造模受这种氧化应激的损伤相对较弱。而卵巢 StAR 蛋白表达在间隔造模后显著下降,提示顺铂累积性损伤卵巢雌激素合成过程。而线粒体内 Cyp11a1 作为类固醇激素合成的限速酶,肾上腺组织 Cyp11a1 基因与蛋白表达均未出现明显的变化,顺铂连续造模后,小鼠卵巢 Cyp11a1 基因表达明显上调,但是其蛋白表达也无明显变化。在 LH 峰出现,卵泡膜细胞和颗粒细胞黄体化的过程中,StAR、P450_{scc} 和 3 β -HSD 的酶活性及表达量会随着黄体的发育以及卵巢孕酮合成量的增加,在顺铂诱发小鼠卵巢早衰的过程中,黄体化也会影响这些酶的表达^[14]。出现卵巢和肾上腺同种类固醇合成酶表达趋势的不同。

进一步检测肾上腺皮质激素合成的重要酶,发现仅在连续给药后抑制肾上腺 Cyp21a1 基因表达,对 Cyp11b1 表达无明显的影响。提示顺铂连续给药可能抑制孕烯醇酮向皮质激素转化过程,但是最终不影响皮质酮的合成,提示肾上腺具有较强的自我代偿性保护生理作用。然而,顺铂对卵巢的作用不同,发现卵巢雄激素合成过程的重要酶 Cyp17a1 与 Hsd3b2 基因表达显著被顺铂抑制。由于卵巢的雄激素主要在卵泡膜细胞合成分泌,而雌激素的芳香化酶主要存在于颗粒细胞,雄激素在膜细胞形成后在颗粒细胞催化成雌激素,顺铂造模后卵巢形态学上的改变是卵巢早衰的主要原因。卵巢膜细胞是卵巢内雄激素合成的主要场所^[1],本研究中卵巢膜细胞的改变明显,卵巢膜变薄、膜细胞数量减少可能是雄激素合成酶表达量降低的原因之一。此外,雄激素合成的关键步骤,即主要存在于内质网的细胞色素 P450c17a(CYP17A1)编码的 17 α -羟化酶将孕烯醇酮催化为孕酮或 17 α -羟基孕烯醇酮,再由 CYP17A1 同步编码的 17,20-裂解酶转化为脱氢表雄酮或雄烯二酮,其中 HSD3B2 在催化生成雄烯二酮的过程中也发挥了作用^[15-16]。顺铂造成的内质网应激可能是连续造模后 Cyp17a1 表达下调和间隔造模后 Hsd3b2 表达下调的主要原因^[15]。本研究中卵巢的形态学改变明显,卵泡的颗粒细胞明显减少,但卵巢的雌激素合成需要的芳香化酶和羟类固醇脱氢酶并没有明显改变,考虑与卵巢内卵泡活化过度,致黄体的形成增多有关。

针对类固醇激素分泌调节的上级中枢功能,检测发现顺铂连续造模后下丘脑促性腺激素释放素

(GnRH)和促肾上腺素释放激素(CRH)的表达明显下调,垂体 Pomc、Fshb、Pou1f1 表达明显升高;而间隔造模垂体 Lhb 表达显著下降。提示顺铂连续造模抑制下丘脑功能后导致垂体功能代偿性升高;而长期间断给药对垂体功能影响较弱。雌二醇下调和 FSH 的升高是卵巢早衰的两大指标,但间隔造模组垂体促性腺激素 Fshb 和 Lhb 的表达未见上调,因此顺铂间隔造模可能并不能形成典型的卵巢早衰模型。而连续造模后 HPG 轴的顶端激素 GnRH 抑制明显,而垂体促性腺激素的 mRNA 水平上调显著,呈现出典型的卵巢早衰特点。

有研究表明,性腺类固醇激素能影响 HPA 轴应激。与雄性相比,雌性能表现出更强的 HPA 轴反馈,血液雌二醇升高能通过雌激素受体调节 CRH 神经元影响上调应激相关激素的水平^[17],LH 通过作用于卵泡膜细胞和颗粒细胞来控制类固醇生成。LH 作用于皮层细胞以增加参与雄激素,雄烯二酮生产的酶的合成。雄烯二酮从卵泡膜细胞中释放出来,并被邻近的颗粒细胞吸收,通过芳香酶的作用转化为雌酮,再通过 HSD17B1 的作用转化为雌二醇。Lhb 的 mRNA 表达未见升高甚至在间隔造模组下调,可能是卵巢类固醇激素合成酶,尤其是催化雄激素转化为雌激素的两种酶未见下调的另一个原因。

下丘脑及边缘系统的雌激素受体对 HPA 活性可能具有相反的影响,即 ER β (Esr2)抑制,而 ER α (Esr1)促进 HPA 轴^[14]。此外,雌激素受体在卵巢对于卵泡和各细胞分化有重要的调节作用,雌二醇能通过 ER α 和 GPER1 刺激卵巢的细胞增殖^[18],本研究发现顺铂连续造模后卵巢内的 Esr1 表达显著升高,Gper1 表达同步升高,与卵巢内卵泡的过度活化和和雌激素对于 HPA 轴的增益有关。提示顺铂对类固醇激素合成组织卵巢的选择性更强。

综上所述,本研究发现,顺铂能够诱发小鼠气虚、精气不足相关证候表现;顺铂对于类固醇激素合成组织的卵巢选择性损伤大于肾上腺,顺铂对卵巢雄激素与雌激素合成存在替代途径的活跃方式,短期连续给药也进一步抑制 HPA 轴和 HPG 轴的高级中枢下丘脑和垂体功能。

参 考 文 献(References)

- [1] Wu Y, Ma C, Zhao H, et al. Alleviation of endoplasmic reticulum stress protects against cisplatin-induced ovarian damage [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16(1): 85.
- [2] 潘志强. “药源性证候”的新生学术问题与思考 [J]. 上海中

- 医药杂志, 2018, 52(6): 5-8.
- Pan ZQ. New academic problems and thinking of drug-induced syndromes [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2018, 52(6): 5-8.
- [3] 王文健, 沈自尹, 张新民, 等. 补肾法对老年男性下丘脑-垂体-性腺轴作用的临床和实验研究 [J]. 中医杂志, 1986, 4: 32-36.
- Wang WJ, Shen ZY, Zhang XM, et al. Clinical research and experimental study about the function of hypothalamo-pituitary-gonadal axis in senile men by tonify the kidney [J]. J Tradit Chin Med, 1986, 4: 32-36.
- [4] 张新民, 段元丽, 沈自尹, 等. 三类中药复方对侧脑室内注射 IL-1 大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴反应状态的影响 [J]. 中医杂志, 2002, 1: 59-62.
- Zhang XM, Duan YL, Shen ZY, et al. The rats' hypothalamic-pituitary-adrenal cortex axis response to IL-1 injected into intracerebroventricular under reaction conditions by 3 kinds of traditional Chinese medicines [J]. J Tradit Chin Med, 2002, 1: 59-62.
- [5] 周宇, 贾玉玲, 严大为, 等. 两种小鼠卵巢早衰模型的比较 [J]. 上海医学, 2018, 41(8): 489-494.
- Zhou Y, Jia YL, Yan DW, et al. Comparison of two kinds of premature ovarian failure model in mice [J]. Shanghai Med J, 2018, 41(8): 489-494.
- [6] 饶晨晨. 二仙汤及核心药对仙茅、仙灵脾对顺铂致卵巢氧化损伤的保护作用 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2019.
- Rao CC. Xianmao and Yinyanghuo, the core medicine of Erxian soup can effectively cure POF by ROS of cisplatin [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2019.
- [7] 段相林, 常彦忠. 组织学图谱 [M]. 北京: 高等教育出版社; 2012.
- Duan XL, Chang YZ. Atlas of histology [M]. Beijing: Higher Education Press; 2012.
- [8] Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection [J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(6): 673-693.
- [9] 董若曦, 朱小丹, 樊伯珍, 等. 不同剂量顺铂腹腔注射建立大鼠化疗损伤性卵巢早衰模型 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 104-109.
- Dong RX, Zhu XD, Fan BZ, et al. Intraperitoneal injection in different dosages of cisplatin to establish a rat model of premature ovarian failure induced by chemotherapy [J]. Lab Anim Comp Med, 2020, 40(2): 104-109.
- [10] 张玫, 丁金萌, 卢佳姝. 313 例铂类化疗药物常见不良反应分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(99): 179-181.
- Zhang M, Ding JM, Lu JS. Analysis of adverse reactions with 313 common platinum-based chemotherapy drugs [J]. World Latest Med Inf, 2017, 17(99): 179-181.
- [11] 王一花, 张慧君, 孙宸伟, 等. 卵巢早衰型不孕的中医论治 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(1): 81-84.
- Wang YH, Zhang HJ, Sun CW, et al. Chinese traditional treatment on premature ovarian failure [J]. J Basic Chin Med, 2019, 25(1): 81-84.
- [12] Klinge CM. Estrogenic control of mitochondrial function [J]. Redox Biol, 2020, 31: 101435.
- [13] 王贤慧, 刘敏, 邹汐洋, 等. 顺铂诱导肺腺癌 H1650 细胞线粒体氧化应激损伤的实验研究 [J]. 湖北医药学院学报, 2020, 39(1): 22-25, 29.
- Wang XH, Liu M, Zhou XY, et al. Experimental study of Cisplatin-induced mitochondrial oxidative stress injury in lung adenocarcinoma H1650 cells [J]. J Hubei Univ Med, 2020, 39(1): 22-25, 29.
- [14] 张晗, 于磊. 卵泡颗粒细胞黄体化过程中的基因表达、孕酮合成及与 LDL 的作用 [J]. 黑龙江动物繁殖, 2020, 28(2): 50-53, 60.
- Zhang H, Yu L. Gene expression, progesterone synthesis and the role of LDL in follicular granulosa cells during luteinization [J]. Heilongjiang J Anim Reprod, 2020, 28(2): 50-53, 60.
- [15] 牛万祥, 周晨旭, 牛朝诗. CYP17A1 和 AR 在脑胶质瘤中的表达及意义 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(1): 1-4.
- Niu WX, Zhou CX, Niu CS. Expression of CYP17A1 and androgen receptor in glioma and its clinical significance [J]. J Inter Neurol Neurosurg, 2017, 44(1): 1-4.
- [16] Hamada A, Danesi R, Price DK, et al. Association of a CYP17 polymorphism with overall survival in Caucasian patients with androgen-independent prostate cancer [J]. Urology, 2007, 70(2): 217-220.
- [17] Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes-sex differences in regulation of stress responsivity [J]. Stress, 2017, 20(5): 476-494.
- [18] 倪秀贤, 黄梓培, 谢谦怀, 等. 枸杞多糖对正己烷染毒大鼠性激素和卵巢雌激素受体表达影响 [J]. 中国职业医学, 2020, 47(3): 291-297.
- Ni XX, Huang ZP, Xie QH, et al. Effect of lyciumbarbarum polysaccharide on sex hormone and ovarian estrogen receptor in rats exposed to n-hexane [J]. Chin Occup Med, 2020, 47(3): 291-297.

[收稿日期] 2021-04-26

罗勇, 黄金玲. 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症及运动能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 637-643.

Luo Y, Huang JL. Effects of 8 weeks' aerobic exercise on the skeletal muscle inflammation and exercise ability of obese mice [J].

Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 637-643.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.010

8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症及运动能力的影响

罗勇^{1*}, 黄金玲²

(1. 南京信息职业技术学院, 南京 210023; 2. 南京工业大学浦江学院, 南京 211134)

【摘要】 目的 探索 8 周有氧运动对高脂膳食诱导的小鼠肥胖的改善作用及可能的作用途径。**方法** C57BL/6 雄性小鼠 46 只, 随机分为正常膳食组和高脂膳食组制备肥胖小鼠模型后, 再组内随机分为对照安静组 (CS 组)、对照运动组 (CE 组)、肥胖安静组 (OS 组) 和肥胖运动组 (OE 组)。运动组进行 8 周最大运动强度 60% 的中等强度有氧运动。运动干预前后均对各组小鼠进行最大运动能力测试, 干预期间检测小鼠能量摄入水平及体重变化。末次运动 48 h 后取小鼠双侧后肢背侧腓肠肌, 制作骨骼肌冰冻切片, 免疫荧光染色检测小鼠骨骼肌骨架蛋白 Desmin 分布; HE 染色检测小鼠骨骼肌横截面积和炎症细胞浸润。Western Blot 方法检测小鼠骨骼肌萎缩和炎症相关蛋白表达。**结果** 与 CS 组相比, OS 组小鼠能量摄入、体重、Atrogin-1 蛋白、MuRF1 蛋白和 TNF- α 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$), 运动能力、骨骼肌纤维横截面积、IL-10 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.05$), Desmin 蛋白排列紊乱; 有氧运动干预后, 与 OS 组相比, OE 组小鼠能量摄入无显著性差异 ($P > 0.05$), 体重、Atrogin-1 蛋白、MuRF1 蛋白、TNF- α 蛋白和 IL-1 β 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.05$), 运动能力、骨骼肌纤维横截面积、IL-10 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.05$); 另外, 与 CS 组相比, CE 组 Atrogin-1 蛋白、MuRF1 蛋白、TNF- α 蛋白和 IL-1 β 蛋白表达均显著下降 ($P < 0.01$), IL-10 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** 高脂膳食相关肥胖诱发骨骼肌慢性炎症反应, 导致骨骼肌萎缩和运动能力下降; 而有氧运动有效改善肥胖诱导的骨骼肌萎缩, 进而发挥提高运动能力并改善肥胖的作用, 骨骼肌组织中炎症调节可能是其中的重要原因之一。

【关键词】 有氧运动; 肥胖; 骨骼肌炎症; 肌萎缩; 运动能力

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0637-07

Effects of 8 weeks' aerobic exercise on the skeletal muscle inflammation and exercise ability of obese mice

LUO Yong^{1*}, HUANG Jinling²

(1. Department of Sports, Nanjing Vocational College of Information Technology, Nanjing 210023, China.

2. Pujiang Institute, Nanjing Tech University, Nanjing 211134)

Corresponding author: LUO Yong. E-mail: 330390155@qq.com

【Abstract】 We aimed to determine the effects of 8 weeks of aerobic exercise on obesity in mice induced by high-fat diet-feeding and the mechanisms involved. Forty-six male C57BL/6 mice were randomly allocated to a normal diet group and high-fat diet group, then to a Control Sedentary group (CS group), a Control Exercise group (CE group), an Obese Sedentary group (OS group), and an Obese Exercise group (OE group). The exercise groups underwent moderate-intensity

[基金项目] 江苏省社科联研究课题 (19SYB-116)。

Funded by the Research Project of Jiangsu Federation of Social Sciences (19SYB-116).

[作者简介] 罗勇 (1981—), 男, 副教授, 研究方向: 运动促进健康。Email: 330390155@qq.com

aerobic exercise at 60% of maximum exercise intensity for 8 weeks. Before and after this exercise intervention, the maximum exercise ability of each group was determined, and the dietary energy intake and body mass of the mice were measured regularly during the intervention. The mice were euthanized and both gastrocnemius muscles were removed 48 hours after the last exercise bout. The desmin distribution in the muscles was assessed following immunofluorescence staining, and the cross-sectional area and inflammatory cell infiltration in skeletal muscle were assessed following hematoxylin and eosin staining. Western Blot was used to measure the expression of proteins related to atrophy and inflammation in skeletal muscle. The energy intake, body mass, and expression of atrogen-1, muscle ring finger (MuRF1), and tumor necrosis factor (TNF)- α protein was significantly higher in the OS group than in the CS group ($P < 0.05$); whereas the exercise ability, cross-sectional area of muscle fibers, and interleukin (IL)-10 protein expression were significantly lower ($P < 0.05$). In addition, desmin protein expression was disordered. After aerobic exercise, there was no significant difference in energy intake between the OS and OE groups. However, the body mass and protein expression of atrogen-1, MuRF1, TNF- α , and IL-1 β were significantly lower in the OS group ($P < 0.05$) and the exercise ability, cross-sectional area of muscle fibers, and IL-10 protein expression were significantly higher ($P < 0.05$). In addition, the protein expression of atrogen-1, MuRF1, TNF- α , and IL-1 β in the CE group was significantly lower than in the CS group ($P < 0.01$), whereas the IL-10 protein expression was significantly higher ($P < 0.05$). In conclusion, high-fat diet-induced obesity is associated with chronic inflammation in skeletal muscle, which leads to skeletal muscle atrophy and a decline in exercise capacity. Conversely, aerobic exercise ameliorates this skeletal muscle atrophy, which improves exercise ability, and a reduction in local inflammation may play a key role in this effect.

【Keywords】 aerobic exercise; obesity; skeletal muscle inflammation; muscle atrophy; exercise ability

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

诸多研究证实高脂膳食诱导的肥胖与机体慢性炎症的出现息息相关^[1],同时机体慢性炎症也是肥胖诱发胰岛素抵抗的重要因素^[2-3],与2型糖尿病、心血管疾病、非酒精性脂肪肝等多种慢性代谢性疾病的发生发展关系密切^[4-5]。

众所周知,运动干预是防治肥胖等多种慢性代谢性疾病的有效手段,而探索运动改善慢性代谢性疾病的途径对于更好的理解其在防治慢性代谢性疾病中的作用具有重要意义^[6-7]。因此,本文对高脂膳食诱导的肥胖小鼠进行为期8周的有氧运动干预,检测有氧运动对肥胖小鼠运动能力、骨骼肌骨架蛋白分布、肌萎缩相关蛋白表达、骨骼肌炎症细胞浸润以及炎症因子蛋白表达的影响,并提出假设:高脂膳食相关肥胖诱发骨骼肌慢性炎症反应,导致骨骼肌萎缩和运动能力下降,而有氧运动可能通过降低骨骼肌中慢性炎症水平,改善肥胖诱导的骨骼肌萎缩,进而发挥提高运动能力并改善肥胖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

46只SPF级5周龄C57BL/6健康雄性小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK

(京)2016-0006】,体重约为 (17.54 ± 1.46) g,饲养于SPF级动物实验室【SYXK(京)2016-0033】。大鼠自由饮水进食,温度 $22 \sim 24^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~60%,12h昼/12h夜循环照明,饲喂普通维持饲料和高脂膳食均由北京华阜康生物科技有限公司【SCXK(京)2020-0004】提供。所有实验方案均获得运动科学伦理委员会批准(IACUC 2019025A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Desmin、Atrogen-1、MuRF1、TNF- α 、IL-1 β 和IL-10抗体均购自美国Abcam公司, β -tubulin抗体购自北京中杉金桥公司,苏木精-伊红染色试剂购自北京碧云天生物公司。

实验动物气体代谢监测系统购自美国Columbus公司,酶标仪、垂直电泳仪及凝胶成像仪均购自美国BIO-RAD公司,病理切片机、激光共聚焦显微镜均购自德国Leica公司。

1.2 方法

1.2.1 肥胖小鼠模型制备

小鼠平均体重为 (17.54 ± 1.46) g,适应性喂养1周后,将小鼠随机分为对照组(16只,正常饲料,3.85 kcal/g,脂肪供能比为12%)和高脂膳食组(30只,高脂饲料,5.24 kcal/g,脂肪供能比为60%),喂养12周制备肥胖小鼠模型。以空腹条件下高脂膳食组体重超过对照组平均体重20%作为判断肥胖

小鼠模型建模成功标准^[8],本研究通过 12 周高脂膳食制备肥胖模型小鼠 20 只,用于后续干预研究。

1.2.2 运动干预及实验分组

采用实验动物气体代谢监测系统对小鼠最大运动能力测试,计算最大运动强度作为设定运动干预强度的参考。最大运动能力测试后,对照组和肥胖组均组内随机分为对照安静组(CS 组,8 只)、对照运动组(CE 组,8 只)、肥胖安静组(OS 组,10 只)和肥胖运动组(OE 组,10 只)。CS 组和 OS 组维持原有饲养条件,CE 组和 OE 组维持原有膳食不变,进行最大运动强度 60% 的中等强度跑台有氧运动,坡度 0°,每周 6 d,每天 1 h,持续 8 周。干预结束后再次对各组小鼠进行最大运动能力测试。

1.2.3 实验样本采集与制备

末次运动 48 h 后对小鼠进行称重取材,取材前禁食 12 h。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉小鼠后取双侧后肢背侧腓肠肌,用手术刀剔除肌腱等结缔组织,一侧标本经 PBS 漂洗,滤纸吸干水分后迅速置于液氮中用于提取蛋白进行后续检测;另一侧标本置于包埋剂中包埋,用于后续制作冰冻切片进行免疫化学染色和 HE 染色。

1.2.4 免疫荧光染色检测小鼠骨骼肌骨架蛋白分布

制备小鼠骨骼肌组织冰冻切片,PBS 清洗后以组化笔在组织周围画圈。5% 羊血清室温封闭 30 min,一抗 Desmin(1 : 500)在湿盒内 4℃ 孵育过夜,次日清洗后以一抗相同种属的荧光二抗避光孵育 2 h(1 : 500),清洗后 DAPI 孵育 10 min 并以抗荧光淬灭封片剂封片。处理完毕后激光共聚焦显微镜观察并采集图像,以 Image Pro Plus 6.0 软件处理图像。

1.2.5 HE 染色检测小鼠骨骼肌横截面积和炎症细胞浸润

制备小鼠骨骼肌组织冰冻切片,切片入苏木素染液浸染 5 min,自来水洗后切片入乙醇脱水,然后入伊红染液中染色。之后切片依次放入无水乙醇和二甲苯逐步脱水,最后中性树胶封片后以显微镜镜检并采集图像进行分析。图像中细胞质呈红色,细胞核呈蓝色。

1.2.6 Western Blot 检测小鼠骨骼肌萎缩和炎症相关蛋白表达

称取小鼠骨骼肌组织约 200 mg,加入 RIPA 试剂匀浆,4℃ 离心后以 BCA 方法进行蛋白定量,电泳

时上样量为每孔 30 μg。一抗 Atrogin-1(1 : 2000)、MuRF1(1 : 1000)、TNF-α(1 : 2000)、IL-1β(1 : 3000)、IL-10(1 : 3000)和 β-tubulin(1 : 5000)4℃ 孵育过夜。次日洗膜并加入一抗相同种属的二抗(1 : 3000)孵育 2 h。充分洗二抗后使用试剂盒进行化学发光,于凝胶成像仪中显像。β-tubulin 为内参,Image Pro Plus 6.0 软件处理图像。

1.3 统计学分析

实验数据均以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计分析。采用 Levene 检验进行方差齐性检验,双因素方差分析(Two-way ANOVA)方法处理数据。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。Graphpad prism 7 绘制图表。

2 结果

2.1 8 周有氧运动对肥胖小鼠体重的影响

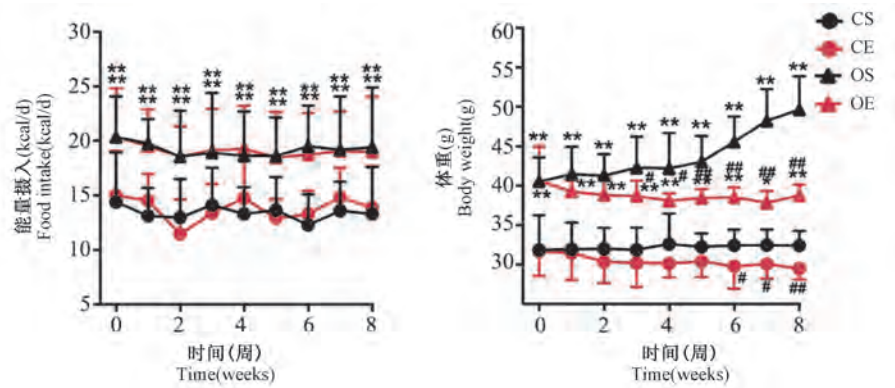
图 1 显示,8 周运动干预期间 OS 组和 OE 组能量摄入均分别显著高于 CS 组和 CE 组($P < 0.01$),且 CE 组和 OE 组能量摄入均分别与 CS 组和 OS 组无显著差异($P > 0.05$)。通过检测小鼠体重,发现有氧运动干预前 OS 组和 OE 组体重均分别显著高于 CS 组和 CE 组($P < 0.01$),干预期间 OS 组体重均显著高于 CS 组($P < 0.01$);尽管 OE 组体重同样显著高于 CE 组($P < 0.05$),但有氧运动干预至第 3 周,OE 组体重即显著低于 OS 组($P < 0.05$),至第 5 周以后差异非常显著($P < 0.01$)。另外,有氧运动干预第 6 周起,CE 组小鼠体重显著低于 CS 组($P < 0.05$)。

2.2 8 周有氧运动对肥胖小鼠运动能力的影响

图 2 显示,OS 组小鼠的运动时长、跑动距离和峰值跑速均显著低于 CS 组($P < 0.01$)。尽管有氧运动干预 8 周后,OE 组小鼠的运动时长、跑动距离和峰值跑速同样显著低于 CE 组($P < 0.01$),但相较于 OS 组,以上指标均显著提高($P < 0.05$)。另外,有氧运动干预期间 CE 组与 CS 组小鼠运动至力竭的运动时长、跑动距离和峰值跑速未见明显差异($P > 0.05$)。

2.3 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌骨架蛋白和肌萎缩相关蛋白表达的影响

图 3 显示,CS 组和 CE 组小鼠骨骼肌中 Desmin 蛋白排列整齐且分布均匀,而高脂膳食干预的 OS 组小鼠骨骼肌中 Desmin 蛋白排列紊乱、模糊甚至缺失,提示 OS 组小鼠骨骼肌存在一定程度损伤。有

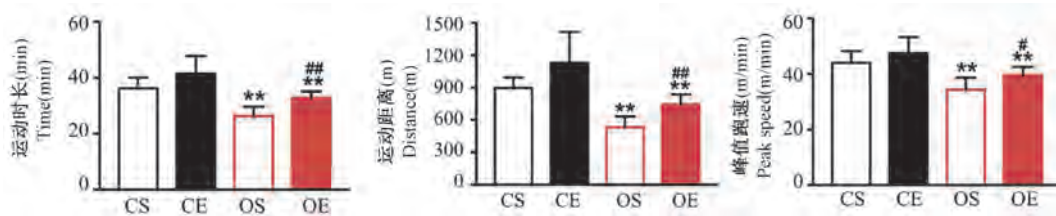


注:CS:安静对照组;CE:运动组;OS:肥胖组;OE:肥胖运动组;与对应的C组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对应的S组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。(下图同)

图1 8周有氧运动下肥胖小鼠能量摄入和体重变化

Note. CS. Control-sedentary group. CE. Control-exercise group. OS. Obesity-sedentary group. OE. Obesity-exercise group. Compared with matched control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with matched sedentary group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Changes of food intake and body weight in obese mice during 8-week aerobic exercise

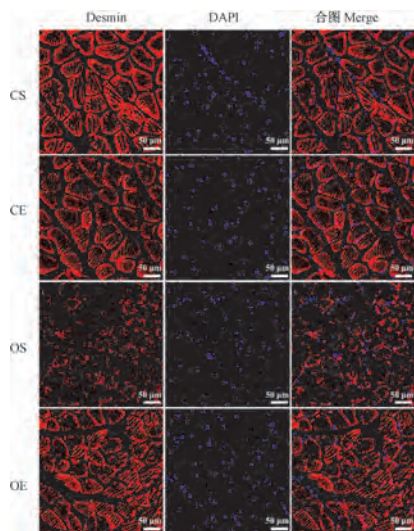


注:逐级递增负荷试验检测小鼠运动至力竭的运动时长,运动距离和峰值跑速。

图2 8周有氧运动对肥胖小鼠运动至力竭的运动时长、运动距离和峰值跑速的影响

Note. Time, distance and peak speed exercising to exhaustion were detected by a graded exercise testing with animal metabolism detection system.

Figure 2 Effects of 8-week aerobic exercise on the time, distance and peak speed in obese mice exercising to exhaustion



注:免疫荧光染色检测 Desmin 蛋白分布情况。

图3 8周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌 Desmin 蛋白分布的影响

Note. Distribution of Desmin protein was detected by Immunofluorescent staining.

Figure 3 Effect of 8-week aerobic exercise on the distribution of Desmin protein in skeletal muscle of obese mice

氧运动干预 8 周后,OE 组小鼠骨骼肌中 Desmin 蛋白相比 OS 组更趋于整齐排列并均匀分布。

图 4 显示,OS 组小鼠骨骼肌中 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达均显著高于 CS 组($P < 0.01$)。有氧运动干预 8 周后,OE 组小鼠骨骼肌中 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达则均显著低于 OS 组($P < 0.01$)。另外,CE 组小鼠骨骼肌中 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达同样显著低于 CS 组($P < 0.01$)。

2.4 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症细胞浸润的影响

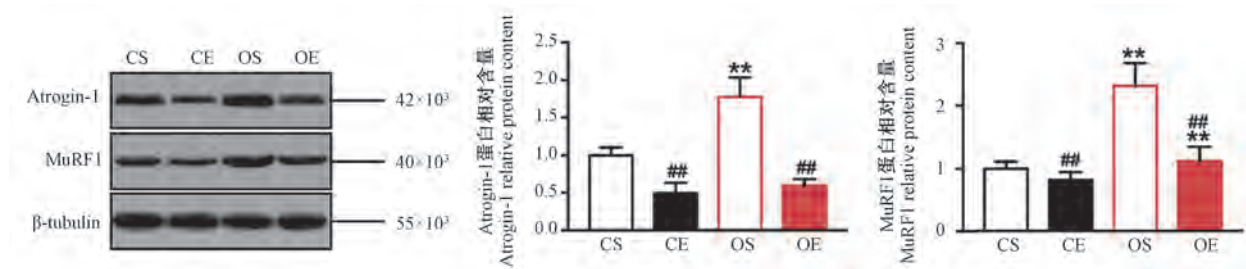
图 5 显示,OS 组小鼠骨骼肌纤维横截面积显著低于 CS 组($P < 0.01$),而有氧运动干预 8 周后 OE 组小鼠骨骼肌纤维横截面积则均显著高于 OS 组($P < 0.01$),这一结果与图 4 中骨骼肌萎缩相关蛋白表达结果一致。通过观察小鼠骨骼肌切片中炎症细胞浸润情况,发现 OS 组小鼠骨骼肌出现萎缩同时炎症细胞浸润明显增加(黑色箭头标识),而有氧运动干预 8 周后 OE 组小鼠骨骼肌中炎症细胞浸润明

显减少,提示骨骼肌炎症可能参与有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌萎缩的改善作用。

2.5 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌炎症因子蛋白表达的影响

图 6 显示,相较于 CS 组,OS 组小鼠骨骼肌中 TNF α 蛋白表达显著增加($P < 0.01$),IL-10 蛋白表

达显著下降($P < 0.05$)。有氧运动干预 8 周后,相较于 OS 组,OE 组小鼠骨骼肌中 TNF α 和 IL-1 β 蛋白表达显著下降($P < 0.05$),IL-10 蛋白表达则显著增加($P < 0.01$)。另外,CE 组小鼠骨骼肌中 TNF α 和 IL-1 β 蛋白表达均显著下降($P < 0.01$),IL-10 蛋白表达则显著增加($P < 0.05$)。

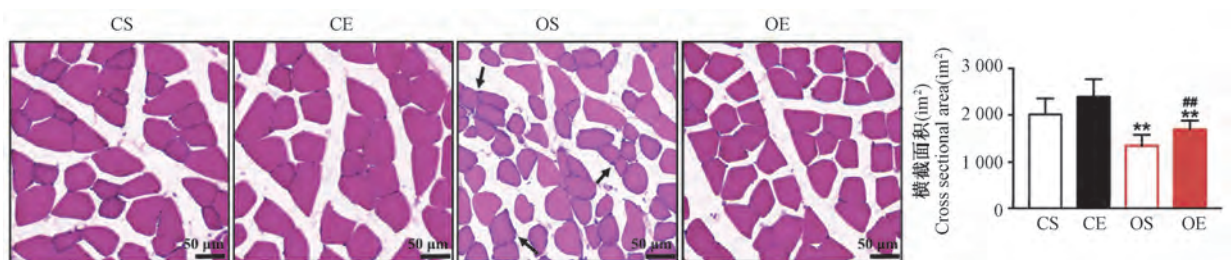


注:Western Blot 检测 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达水平。

图 4 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达的影响

Note. Expression of Atrogin-1 and MuRF1 were detected by Western Blot.

Figure 4 Effect of 8-week aerobic exercise on the expression of Atrogin-1 and MuRF1 protein in skeletal muscle of obese mice

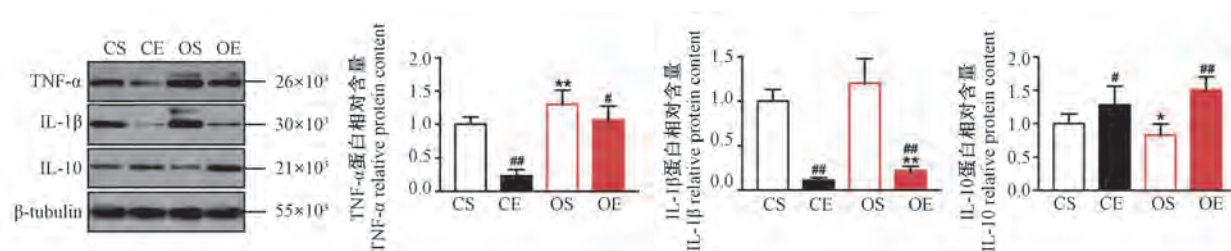


注:对骨骼肌切片进行 HE 染色。

图 5 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌纤维横截面积和炎症浸润的影响

Note. Slides of skeletal muscle tissue were performed with HE staining.

Figure 5 Effects of 8-week aerobic exercise on skeletal muscle fiber cross-sectional area and inflammatory infiltration in obese mice



注:Western Blot 检测 TNF α 、IL-1 β 和 IL-10 蛋白表达。

图 6 8 周有氧运动对肥胖小鼠骨骼肌 TNF α 、IL-1 β 和 IL-10 蛋白表达的影响

Note. Expression of TNF α 、IL-1 β 和 IL-10 were detected by Western Blot.

Figure 6 Effect of 8 weeks aerobic exercise on the expression of TNF α 、IL-1 β and IL-10 protein in skeletal muscle of obese mice

3 讨论

肥胖是一种严重危害人类健康的慢性疾病,而

肥胖相关的慢性炎症是胰岛素抵抗等慢性代谢性疾病发生发展的关键因素,已成为近年来人们关注和研究的重点^[9-10]。众所周知,有氧运动干预是防

治慢性代谢性疾病的有效手段,已被纳入治病处方中^[11];而运动对于慢性代谢性疾病的防治作用是全身性的整合过程,探索运动改善慢性代谢性疾病的途径对于更好的理解其在防治慢性代谢性疾病中的作用具有重要意义^[12]。本研究通过 12 周高脂膳食干预制备肥胖小鼠模型,然后以最大运动强度 60% 的中等强度有氧运动干预 8 周,检测运动干预后小鼠体重、运动能力、骨骼肌骨架蛋白分布、肌萎缩相关蛋白表达、骨骼肌炎症细胞浸润以及炎症因子蛋白表达的变化,旨在一方面为理解有氧运动改善肥胖的作用提供重要新证据,另一方面有助于进一步阐明运动改善肥胖等慢性代谢性疾病的可能途径及慢性炎症的调节作用。

肥胖患者普遍存在运动能力降低,这不仅影响其日常生活活动,更造成其生命质量低下和社会功能下降^[13]。本研究中 12 周高脂膳食诱导的肥胖小鼠运动至力竭的运动时长、跑动距离和峰值跑速均明显低于正常小鼠,这与大部分相关研究结果一致^[7,9]。在不改变小鼠膳食构成前提下,8 周有氧运动干预有效降低肥胖小鼠体重的同时使得肥胖小鼠运动能力得到明显提高,说明有氧运动是独立于饮食方式的改善肥胖等慢性代谢性疾病的有效手段^[14-15]。

运动能力受多种因素制约,其中骨骼肌质量是影响运动能力的关键因素^[16]。同时,肥胖期间内脏脂肪组织的肥大导致肌肉功能障碍,抑制肌管中收缩蛋白表达,进而导致骨骼肌萎缩^[17-18]。因此,本研究接下来以骨骼肌萎缩为切入点,研究有氧运动改善肥胖并提高运动能力的可能途径。Atrogin-1 和 MuRF1 是在骨骼肌中表达的 E3 泛素连接酶,是骨骼肌萎缩发生的标志蛋白^[19]。王继等^[20]研究发现,高脂膳食诱导的糖尿病小鼠骨骼肌中 MuRF1 和 Atrogin-1 表达均显著降低,而 4 周运动干预可有效降低骨骼肌中 MuRF1 和 Atrogin-1 表达。本研究同样发现肥胖小鼠骨骼肌中 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达明显增加且骨骼肌纤维横截面积明显下降,说明肥胖小鼠体内存在骨骼肌萎缩现象。8 周有氧运动干预后,肥胖小鼠 Atrogin-1 和 MuRF1 蛋白表达明显减少且骨骼肌纤维横截面积明显增加。Desmin 是骨骼肌肌节外骨架蛋白,连接相邻肌原纤维 Z 线和肌纤维膜,是维持骨骼肌 Z 线稳定的重要蛋白^[21]。本研究还发现高脂膳食诱导的肥胖小鼠骨骼肌中 Desmin 排列紊乱、模糊甚至缺失,8 周离

心运动干预后肥胖小鼠骨骼肌中 Desmin 蛋白排列明显趋于整齐并均匀分布。以上提示有氧运动干预可能通过抑制骨骼肌萎缩、促进修复来发挥提高肥胖小鼠运动能力并降低体重的作用。

炎症是机体固有的保护性免疫机制,但慢性炎症导致骨骼肌萎缩,被认为是糖尿病、非酒精性脂肪肝、心血管疾病等常见疾病的发病基础^[22]。同时,诸多研究证实高脂膳食诱导的肥胖与机体慢性炎症的出现息息相关^[23-24]。本研究接下来从骨骼肌炎症角度探索有氧运动改善骨骼肌损伤并抑制骨骼肌萎缩,进而提高运动能力、降低体重的可能途径。研究表明,TNF- α 和 IL-1 β 是典型的促炎性细胞因子,参与机体慢性炎症的发生与发展^[25];IL-10 是典型的抗炎性细胞因子,抑制机体炎症反应并促进组织修复^[26]。本研究中高脂膳食诱导的肥胖小鼠骨骼肌中出现明显的炎症浸润,同时促炎因子 TNF- α 表达明显增加、抗炎因子 IL-10 表达明显减少,说明肥胖小鼠骨骼肌中存在慢性炎症现象。8 周有氧运动干预后,肥胖小鼠骨骼肌中炎症浸润现象明显减轻,促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 表达明显减少、抗炎因子 IL-10 表达明显增加,提示有氧运动干预可能通过降低骨骼肌中慢性炎症反应来改善肥胖诱导的骨骼肌萎缩和运动能力下降,继而发挥改善肥胖等慢性代谢性疾病的作用。

综上所述,本研究从运动能力、骨骼肌骨架蛋白分布、骨骼肌纤维横截面积及其萎缩标志蛋白表达、骨骼肌炎症细胞浸润及其炎症因子蛋白表达 4 个方面证实高脂膳食相关肥胖诱发骨骼肌慢性炎症反应,导致骨骼肌萎缩和运动能力下降;而有氧运动有效改善肥胖诱导的骨骼肌萎缩,进而发挥提高运动能力并改善肥胖的作用,骨骼肌组织中炎症调节可能是其中的重要原因之一。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kuroda M, Sakaue H. Adipocyte death and chronic inflammation in obesity [J]. J Med Invest, 2017, 64(3): 193-196.
- [2] Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance [J]. Physiology (Bethesda), 2016, 31(4): 283-293.
- [3] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Metabolism, 2016, 65(8): 1038-1048.
- [4] Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health benefits of the mediterranean diet: metabolic and molecular mechanisms [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2018, 73(3): 318-326.
- [5] Rani V, Deep G, Singh RK, et al. Oxidative stress and

- metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Life Sci, 2016, 148: 183–193.
- [6] Ramos LO, Milagro FI, Allayee H, et al. Guide for current nutrigenetic, nutrigenomic, and nutriepigenetic approaches for precision nutrition involving the prevention and management of chronic diseases associated with obesity [J]. J Nutrigenet Nutrigenomics, 2017, 10(1–2): 43–62.
- [7] Liao CD, Tsao JY, Lin LF, et al. Effects of elastic resistance exercise on body composition and physical capacity in older women with sarcopenic obesity: a CONSORT-compliant prospective randomized controlled trial [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(23): e7115.
- [8] 陶瑀, 谢颖, 刘秀娟. 不同运动对肥胖大鼠机体免疫和炎症反应的影响 [J]. 中国体育科技, 2019, 55(10): 74–80.
Tao Y, Xie Y, Liu XJ. Effects of different exercises on immune and inflammatory responses in obese rats [J]. Chin Sport Sci Tech, 2019, 55(10): 74–80.
- [9] Kyle TK, Dhurandhar EJ, Allison DB. Regarding obesity as a disease: evolving policies and their implications [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2016, 45(3): 511–520.
- [10] Harris R, Card TR, Delahooke T, et al. Obesity is the most common risk factor for chronic liver disease: results from a risk stratification pathway using transient elastography [J]. Am J Gastroenterol, 2019, 114(11): 1744–1752.
- [11] Gui YJ, Liao CX, Liu Q, et al. Efficacy and safety of statins and exercise combination therapy compared to statin monotherapy in patients with dyslipidaemia: a systematic review and meta-analysis [J]. Eur J Prev Cardiol, 2017, 24(9): 907–916.
- [12] Mach N, Fuster BD. Endurance exercise and gut microbiota: a review [J]. J Sport Health Sci, 2017, 6(2): 179–197.
- [13] Bell JA, Sabia S, Singh MA, et al. Healthy obesity and risk of accelerated functional decline and disability [J]. Int J Obes (Lond), 2017, 41(6): 866–872.
- [14] Sanchez DG, Martinez TB, Olza J, et al. Activating brown adipose tissue through exercise (ACTIBATE) in young adults: rationale, design and methodology [J]. Contemp Clin Trials, 2015, 45(4): 416–425.
- [15] 覃飞, 徐旻霄, 瞿超艺, 等. 空气污染暴露与体育活动: 如何保障健康 [J]. 体育科学, 2020, 40(2): 58–69.
Qin F, Xu MX, Qu CY, et al. Air pollution exposure and exercise: how to protect health [J]. Chin Sport Sci, 2020, 40(2): 58–69.
- [16] 林小晶, 鲁林, 王晓慧. 雄激素受体在抗阻和耐力训练提高大鼠运动能力中的作用 [J]. 中国运动医学杂志, 2018, 37(7): 573–580.
Lin XJ, Lu L, Wang XH. Effects of androgen receptor on the promotion of exercise performance of rats induced by resistance and endurance trainings [J]. Chin J Sports Med, 2018, 37(7): 573–580.
- [17] Pellegrielli V, Rouault C, Rodriguez CS, et al. Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity [J]. Diabetes, 2015, 64(9): 3121–3134.
- [18] 汪敏加, 齐梓伊, 朱玮华, 等. 肌肉萎缩机制及临床研究进展: 基于第 65 届美国运动医学学会年会的思考 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(15): 2421–2426.
Wang MJ, Qi ZY, Zhu WH, et al. Mechanism and clinical research advance of muscle atrophy: thinking based on the 65th Annual Meeting of American College of Sports Medicine [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2019, 23(15): 2421–2426.
- [19] Kim H, Jang M, Park R, et al. Conessine treatment reduces dexamethasone-induced muscle atrophy by regulating MuRF1 and Atrogin-1 expression [J]. J Microbiol Biotechnol, 2018, 28(4): 520–526.
- [20] 王继, 杨中亚, 张龙, 等. AMPK/PGC-1 α 在有氧运动改善 2 型糖尿病大鼠骨骼肌萎缩中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(20): 3180–3185.
Wang J, Yang ZY, Zhang L, et al. Effect of AMPK/PGC-1 α on improving skeletal muscle atrophy in type 2 diabetic rats by aerobic exercise [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2020, 24(20): 3180–3185.
- [21] 马涛, 李世昌. 细胞骨架及运动性骨骼肌微损伤研究进展 [J]. 体育学刊, 2006, 13(5): 48–52.
Ma T, Li SC. Progress in the research on cytoskeleton and kinetic micro damage of skeletal muscle [J]. J Phys Edu, 2006, 13(5): 48–52.
- [22] 术蓉, 张任飞, 史丹丹, 等. PNIPAM 温敏水凝胶诱导小鼠骨骼肌慢性炎症 [J]. 免疫学杂志, 2016, 32(11): 935–940.
Zhu R, Zhang RF, Shi DD, et al. PNIPAM hydrogel induces skeletal muscle inflammation response [J]. Immunol J, 2016, 32(11): 935–940.
- [23] Saltiel AR, Olefsky JM. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease [J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 1–4.
- [24] 梁爽, 左之才, 辜旭初, 等. 肥胖对非致死性肺炎模型小鼠脾脏、外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 免疫学杂志, 2019, 35(1): 21–28.
Liang S, Zuo ZC, Gu XC, et al. Effects of obesity on T lymphocyte subsets in spleen and peripheral blood of mice infected with nonfatal pneumonia [J]. Immunol J, 2019, 35(1): 21–28.
- [25] Batra R, Suh MK, Carson JS, et al. IL-1 β (Interleukin-1 β) and TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) impact abdominal aortic aneurysm formation by differential effects on macrophage polarization [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(2): 457–463.
- [26] Rojas JM, Avia M, Martín V, et al. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections [J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 6104054.

[收稿日期] 2021-02-18

徐海燕,杜青,徐琳本,等. 两种肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的构建及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 644-650.

Xu HY, Du Q, Xu LB, et al. Construction and evaluation of two obese rat models of polycystic ovary syndrome with insulin resistance [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 644-650.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.011

两种肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型的构建及评价

徐海燕,杜青*,徐琳本,黄建华,王红梅,丁正香

(湖南省中医药研究院,长沙 410006)

【摘要】 目的 采用两种不同方式联合高脂饮食建立肥胖型多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗(PCOS-IR)大鼠动物模型,比较其内分泌及代谢特征变化。**方法** 将大鼠随机分为3组:对照组,给予普通饲料和纯净水;Letrozole组,采用来曲唑(1 mg/kg)灌胃,HCG+INS组,皮下注射绒促性素和胰岛素(HCG+INS),两组均采用高脂饲料和5%葡萄糖液饲养。革兰氏染色观察两个动情周期变化;在第23天和第30天,测量子宫和卵巢湿重;苏木素-伊红(HE)染色观察卵巢组织病理学改变;血液生化仪测定空腹血糖(FBG)、血脂(甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)变化;酶联免疫吸附(ELISA)法测定性激素(卵泡刺激素FSH、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、总睾酮(T)、血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β))水平变化;计算胰岛素抵抗指数HOMA-IR;实时荧光定量PCR测定卵巢TNF- α 和IL-1 β mRNA变化。**结果** 与对照组比,Letrozole组和HCG+INS组两个动情周期皆紊乱,但HCG+INS组存在偶发排卵现象;在第23天,Letrozole组子宫湿重和E₂水平显著减少,卵巢湿重、INS、HOMA-IR、TG、TC水平显著增加,HCG+INS组INS、HOMA-IR、TC、TG、LH水平显著增加,E₂水平显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第30天,两组FBG、INS、HOMA-IR、TG、FSH、LH水平及血清TNF- α 和IL-1 β 水平和卵巢mRNA均明显升高,同时Letrozole组肥胖、无排卵、高雄激素血症、卵巢多囊样改变等特征更明显。**结论** 两种造模方式均可成功诱导PCOS-IR动物模型,第30天时来曲唑造模法在体重、内分泌及代谢指标的改变更符合肥胖型PCOS-IR病理特征。

【关键词】 多囊卵巢综合征;肥胖;胰岛素抵抗;来曲唑;绒促性素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0644-07

Construction and evaluation of two obese rat models of polycystic ovary syndrome with insulin resistance

XU Haiyan, DU Qing*, XU Linben, HUANG Jianhua, WANG Hongmei, DING Zhengxiang

(Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Corresponding author: DU Qing. E-mail: 791166938@qq.com

【Abstract】 Objective To establish an animal model of obese polycystic ovary syndrome combined with insulin resistance (PCOS-IR) using two different method with a high-fat diet, and to compare the changes in endocrine and metabolic characteristics. **Methods** Rats were randomly divided into a control group (ordinary feed and purified water), a letrozole group (intragastric administration of 1 mg/kg), and a human chorionic gonadotropin + insulin (HCG+INS) group (subcutaneous injections). The latter two groups were fed a high-fat diet and 5% glucose solution. Gram staining was used to observe two estrous cycles. On the 23rd and 30th day, ovarian and uterine wet weights were measured. Hematoxylin-eosin

【基金项目】 湖南省自然科学基金(2019JJ50350, 2019JJ50345), 湖南省中医药科研计划项目(201941), 湖南省中医药研究院重点项目(201803)。

Fund by the Natural Science Foundation of Hunan Province(2019JJ50350, 2019JJ50345), Hunan Traditional Chinese Medicine Scientific Research Project(201941), Key Project of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine(201803).

【作者简介】 徐海燕(1985—),女,医学硕士,主治医师,研究方向:中西医结合防治妇科内分泌疾病。Email:250440397@qq.com

【通信作者】 杜青(1991—),女,助理研究员,研究方向:中药药理与创新药物。Email:791166938@qq.com

staining was used to observe ovarian histopathology. Fasting blood glucose (FBG), and blood levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) were measured by a biochemical analyzer. Serum levels of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), total testosterone (T), and inflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect ovarian TNF- α and IL-1 β mRNA levels. **Results** The letrozole and HCG+INS groups both had disordered estrous cycles compared with the control group, but the HCG+INS group had occasional ovulation. On the 23rd day, uterine weight and E2 levels were significantly reduced, and ovarian weight, INS, HOMA-IR, TG, and T levels were significantly increased in the letrozole group compared with controls. In the HCG+INS group, INS, HOMA-IR, TC, TG, and LH levels were significantly increased, and E2 levels were significantly reduced compared with controls. On the 30th day, the levels of FBG, INS, HOMA-IR, TG, FSH, LH, serum TNF- α and IL-1 β , and ovarian TNF- α and IL-1 β mRNA levels were significantly increased in the letrozole and HCG+INS groups versus the control group. The letrozole group exhibited anovulation, hyperandrogenism, and obesity, as well as more obvious pathological changes consistent with polycystic ovaries. **Conclusions** Both approaches successfully induced the PCOS-IR animal model. The changes in body weight, and endocrine and metabolic indexes of the letrozole model on the 30th day were more consistent with the pathological characteristics of obese PCOS-IR.

【Keywords】 polycystic ovary syndrome; obesity; insulin resistance; letrozole; chorionic gonadotropin

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

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种以慢性无排卵、高雄激素血症 (多毛、痤疮、雄激素性脱发) 以及卵巢多囊样改变为主要特征的内分泌代谢紊乱疾病, 影响着 12% ~ 18% 的女性^[1]。长期的内分泌紊乱可导致不孕、肥胖、糖脂代谢异常, 并带来一系列远期并发症, 严重影响患者的生存质量^[2]。其中, 肥胖是促进 PCOS 病情发生发展的重要因素之一, 肥胖型 PCOS 约占总发病率的一半, 体内还存在明显的胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[3]。胰岛素抵抗和高胰岛素血症是 PCOS 病理生理的主要特征, 约 50% ~ 65% PCOS 患者存在胰岛素抵抗^[4]。IR 不仅是导致 PCOS 患者生殖障碍和代谢异常的主要原因, 还可增加 2 型糖尿病、心脑血管疾病、代谢综合征等风险, 严重影响患者身心健康^[5]。

PCOS-IR 由于发病机制复杂, 临床组织样本获取困难, 已成为目前研究的热点和难点, 现有可供研究的实验动物模型众多, 但与临床 PCOS-IR 特征的符合程度仍存在一定的差异^[6-7], 建立理想的 PCOS-IR 动物模型在实验研究中显得尤为重要。PCOS 的动物造模方法主要包括经典 Poresky 法、雄激素联合 HCG 法、孕激素联合 HCG 法、雌激素法、芳香花酶抑制剂法等^[8-10]。尽管造模方法多样, 但仍有不尽完美之处, 如雄激素大多属于油剂, 长期皮下注射, 药物不易吸收, 容易导致造模不理想; 孕激素法可能会影响促排卵药物的疗效, 不适合促排

卵药物研究; 雌激素法对模型下丘脑-垂体轴有一定的损害, 不适合后期治疗研究^[4]。筛选并建立一种更贴近临床病理生理特征的 PCOS-IR 的实验动物模型对于临床防治具有重要意义。本实验采用两种不同方式分别联合高糖高脂饮食建立肥胖型 PCOS-IR 动物模型, 通过比较两种模型不同时间节点生殖、内分泌和代谢指标差异, 以期筛选出更符合临床特征的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 6 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】, 在湖南省中医药研究院实验动物中心【SYXK(湘)2020-0008】饲养, 允许大鼠在恒定温度、湿度和光暗循环 ((22±2)℃; 55% ± 10%; 7:00 ~ 19:00 光照循环) 下自由饮水和食物。本研究经湖南省中医药研究院动物伦理委员会批准 (伦理审批号 IACUC2019-0029), 按照与湖南省中医药研究院实验动物中心的有关协议进行, 所有程序均按照中国科学技术部制定的“实验动物护理和使用指导意见”进行。

1.1.2 主要试剂与仪器

来曲唑片 (规格: 每片 2.5 mg, 批号: 190426KF, 江苏恒瑞医药股份有限公司); 胰岛素注射液 (规

格;每支 400 IU,批号:21801204,江苏万邦生化医药集团有限责任公司);注射用绒促性素 HCG(每支 1000 U,批号:190303,丽珠集团丽珠制药厂);快速革兰氏染色液(批号 MA0391-Jun-20E),购于大连美仑生物;卵泡刺激素(FSH,批号 JM-01972R1)、促黄体生成素(LH,批号 JM-02030R1)、雌二醇(E_2 ,批号 JM-01475R1)、总睾酮(T,批号 JM-10537R1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β ,批号 JM-01454R1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α ,批号 JM-10494R1)、胰岛素(INS,批号 JM-01993R1)酶联免疫吸附试剂盒(ELISA),购于江苏晶美生物技术有限公司。IL-1 β 和 TNF- α RT-PCR 上下游引物(上海生物工程技术服务有限公司);逆转录反应试剂盒(TaKaRa)。血糖仪及血糖试纸(艾科,美国);Olympus 生物显微镜(OLYMPUS 公司,日本);TrilogyII 型生化分析仪(Drew Scientific,美国);envision2105 型酶标仪(PerkinElmer,美国);生物组织切片机(Thermo Scientific,美国);水平琼脂糖电泳槽(北京六一,中国);实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

将 36 只 SD 大鼠按体重随机分为 3 组:对照组,每日灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠溶液;Letrozole 组,每日灌胃来曲唑溶液(1 mg/kg),HCG+INS 组,颈背部皮下注射逐渐增量的胰岛素注射液,第 1 天(每天 1 次、每次 0.5 U),第 2、3 天(每天 1 次、每次 1.5 U),第 4 天(每天 1 次、每次 2 U),第 5 天(每天 1 次、每次 2.5 U),第 6 天(每天 1 次、每次 3 U),第 7、8 天(每天 1 次、每次 4 U),第 9、10 天(每天 1 次、每次 5 U),第 11~30 天(每天 1 次、每次 6 U),并加用 HCG 每天 1 次、每次 3.0 U。其中对照组给予普通饲料和纯净水,Letrozole 组和 HCG+INS 组皆给予高脂饲料(基础维持饲料 61.5%、猪油 12%、蔗糖 5%、奶粉 5%、花生 5%、鸡蛋 10%、麻油 1%、食盐 0.5%)和 5%葡萄糖溶液饲养,连续 30 d。

1.2.2 一般状态观察

每天观察记录各组动物活动、进食、粪便等,每周进行体质量监测。在造模第 18 天开始进行阴道涂片,连续 10 d,判断大鼠动情周期变化。每天固定时间,抓住大鼠腰背部皮肤,腹部朝上,露出阴道口,将沾有生理盐水的无菌棉棒轻置于阴道内,转动 4~5 圈,将粘液均匀涂在载玻片上、风干、采用

快速革兰氏染色法进行染色,风干后显微镜下观察排卵情况。分别在第 23、30 天挑选各组动物的一半进行以下处理。

1.2.3 样本采集

动物禁食不禁水 12 h,腹腔麻醉后,腹主动脉取血,离心(3000 r/min,15 min),收集上清,-80℃保存待用。实施安死术后取子宫、卵巢,称取重量。将左侧卵巢保存在 4%多聚甲醛固定液中,右侧卵巢液氮速冻,-80℃保存待用。

1.2.4 代谢指标和性激素检测

取上述保存的血清,采用生化仪检测空腹血糖(FBG)、血清总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)水平;采用酶联免疫吸附法,按照试剂盒说明操作,检测血清胰岛素(INS)、卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E_2)、总睾酮(T)水平变化。并计算胰岛素抵抗指数($HOMA-IR = FBG(\text{mmol/L}) \times INS(\text{mIU/L}) / 22.5$)。

1.2.5 卵巢病理形态学检测

取固定的各组大鼠卵巢组织,使用 70%、90%、95%乙醇,二甲苯进行常规脱水,石蜡包埋、切 4 μm 薄片,以及苏木素-伊红(HE)染色,脱水,封片,显微镜下观察卵巢病理形态学变化。

1.2.6 血清和卵巢炎症因子检测

按照 ELISA 试剂盒说明操作,检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平变化。采用实时荧光定量 PCR 法,检测冻存的卵巢组织中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平,取约 20 mg 卵巢组织,加入 1 mL TRIzol,充分研磨,裂解 5 min,提取样本总 RNA,核酸蛋白测定仪测定 260/280 nm 处 A 值,进行定量。按照逆转录反应试剂盒说明书将定量的 RNA 逆转录合成 cDNA,反应体系为 2X SYBGreen PCR Master Mix 15 μL ,ddH₂O 11 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,cDNA 1 μL 。扩增条件为 95℃预变性 15 min,95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,共 40 个循环。以 β -actin 为内参,反应结束后以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算分析目的基因 TNF- α 和 IL-1 β 相对表达水平,以基因/内参吸光度比值的($\bar{x} \pm s$)表示。引物序列见表 1。

1.3 统计学分析

数据分析采用统计软件 SPSS 17.0,所有计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差分析(One-way-ANOVA),不服从正态分布用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

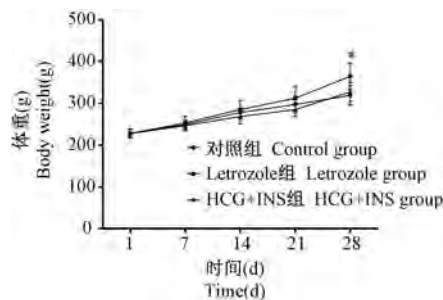
表 1 TNF- α 和 IL-1 β 引物序列Table 1 TNF- α and IL-1 β primer sequences

引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Upstream primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primer(5'-3')
TNF- α	GTCCCAACAAGGAGGAGAAGT	CTGGTATGAAATGGCAAATCG
IL-1 β	CCCTTGTCGAGAATGGGCAG	GACCAGAATGTGCCACGGTT
β -actin	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC

2 结果

2.1 体重变化

每周体重监测发现,各组大鼠体重逐渐增长,与对照组比,Letrozole 组大鼠在第 4 周,体重显著增加($P < 0.05$),HCG+INS 组无显著性差异(见图 1)。



注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠体重增长曲线

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

Figure 1 Growth curve of rat body mass in each group

2.2 阴道涂片观察

于造模第 18 天,开始进行阴道涂片,共 10 d,每 5 d 为一个动情周期,一共两个动情周期,观察大鼠动情周期的变化。对照组大鼠的阴道涂片显微镜下观察可见规律的排卵周期,在动情期可见大量的角质化鳞状上皮细胞(见图 2);Letrozole 组大鼠阴

道涂片未观察到规律性周期,在第二个动情周期多数表现为大量的白细胞和有核上皮细胞,未见角质化细胞;HCG+INS 组偶见大片不规则角质化鳞状上皮细胞,大部分表现为白细胞和有核上皮细胞共存,提示有偶发排卵的情况存在(见图 2)。

2.3 脏器湿重比较

称量各组大鼠子宫和双侧卵巢重量,与对照组大鼠比较,在第 23 天和第 30 天,Letrozole 组来曲唑给药大鼠子宫湿重皆显著性降低,卵巢湿重明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第 30 天,HCG+INS 组注射给药大鼠在卵巢湿重明显增加($P < 0.05$),子宫湿重增加但无显著性差异(见图 3)。

2.4 卵巢形态学变化

光镜下观察发现,对照组大鼠卵巢皮质区卵泡数目较多,处于不同发育阶段,黄体清晰,可见卵丘和卵母细胞,颗粒细胞层大多呈现 8 ~ 9 层,紧密排列,成熟卵泡结构完整,无充血、水肿等现象;Letrozole 组大鼠卵巢囊性改变,卵泡囊性扩张明显,闭锁较多,颗粒细胞层数量减少,黄体数量减少;HCG+INS 组大鼠各级未发育成熟的小卵泡数较 Letrozole 组稍少,黄体较大,颗粒细胞层减少,排列疏松(见图 4)。其中,在实验第 23 天和第 30 天各组大鼠卵巢形态学差异不明显。

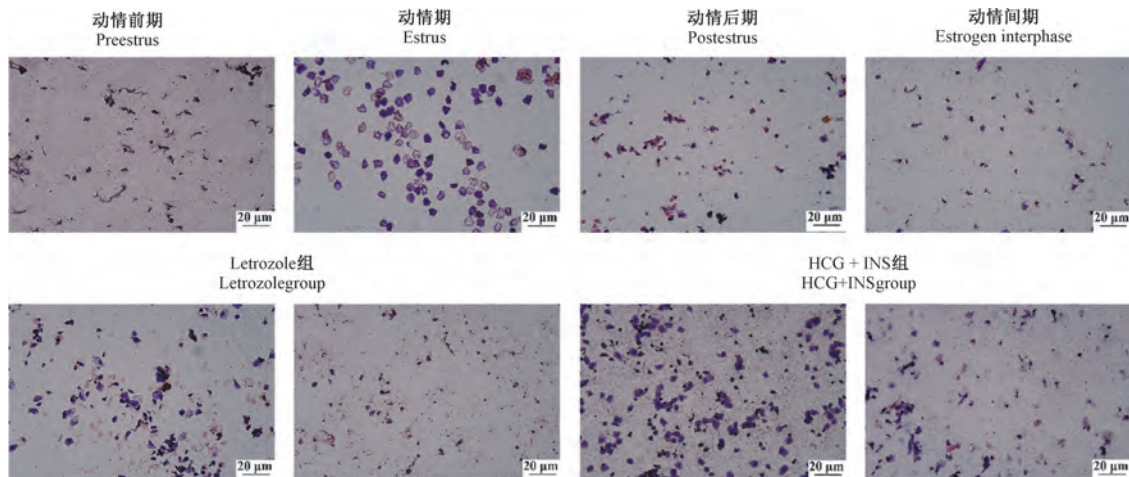
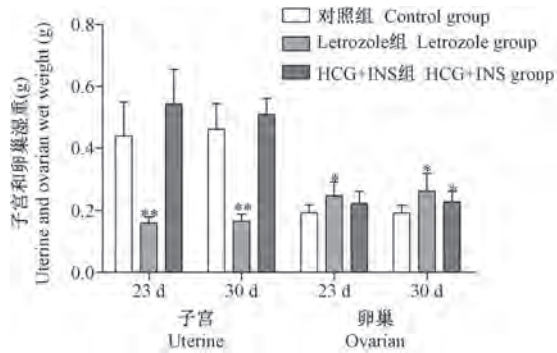


图 2 各组大鼠阴道脱落细胞涂片观察

Figure 2 Smears observation of vaginal exfoliated cell of rats in each group



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

图3 各组大鼠子宫和卵巢的湿重比较

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

(The same in the following figures)

Figure 3 Comparison of wet weight of uterus and ovary of rats in each group

2.5 空腹血糖、胰岛素和血清总胆固醇、甘油三酯变化

与对照组比较,第23天,Letrozole组和HCG+INS组空腹胰岛素和胰岛素抵抗指数升高,TG水平

明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第30天,两组空腹血糖、空腹胰岛素和胰岛素抵抗指数皆明显高于对照组,TC、TG水平皆显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见图5)。

2.6 血清性激素浓度变化

在第23天,与对照组比较,Letrozole组T水平升高, E_2 水平降低($P < 0.05$),HCG+INS组LH增加, E_2 降低($P < 0.05$);在第30d,两组FSH、LH水平均显著上调, E_2 水平下调,且Letrozole组T水平最高,具有统计学意义($P < 0.05$)(见图6)。

2.7 各组大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平和卵巢TNF- α 和IL-1 β mRNA比较

在第23天,与对照组比,Letrozole组血清TNF- α 水平和卵巢TNF- α 和IL-1 β mRNA表达显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HCG+INS组血清TNF- α 、IL-1 β 水平和卵巢IL-1 β mRNA表达显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在第30天,两组血清TNF- α 和IL-1 β 水平皆显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见图7)。

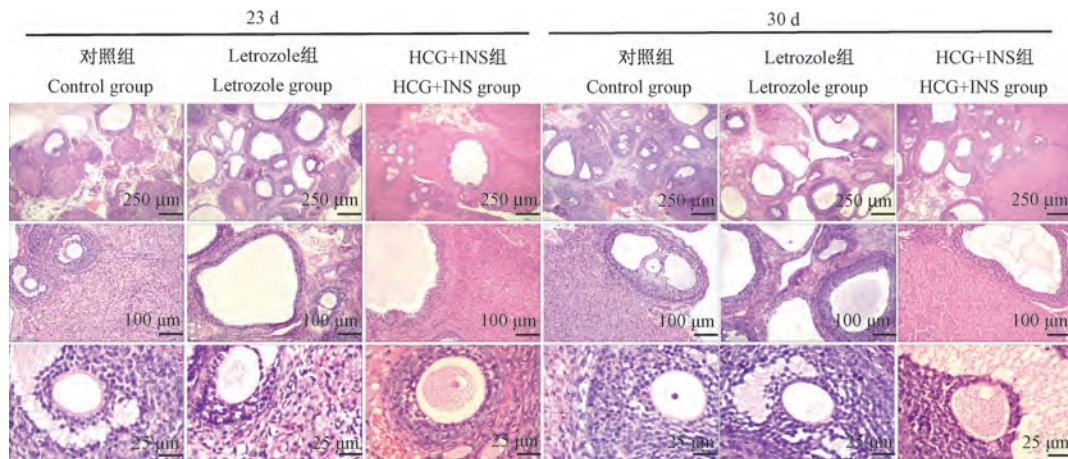


图4 各组大鼠不同时间节点卵巢HE染色

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of the ovary of rats at different time points in each group

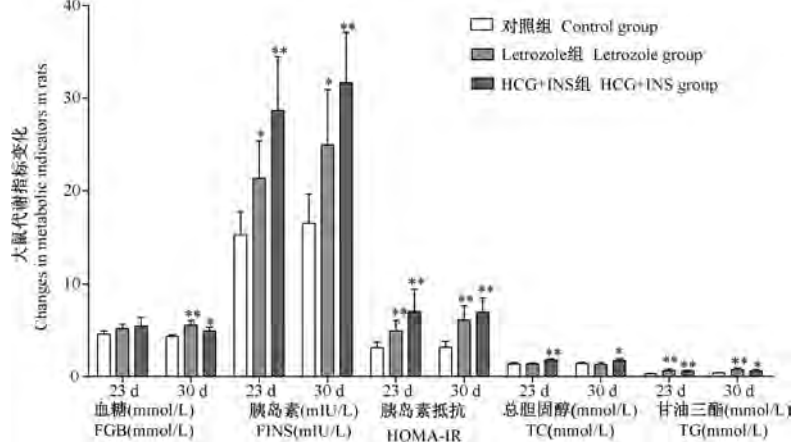


图5 各组大鼠空腹血糖、胰岛素含量、胰岛素抵抗、血清总胆固醇、甘油三酯比较

Figure 5 Comparison of fasting blood glucose, insulin content, insulin resistance, serum total cholesterol and triglyceride of rats in each group

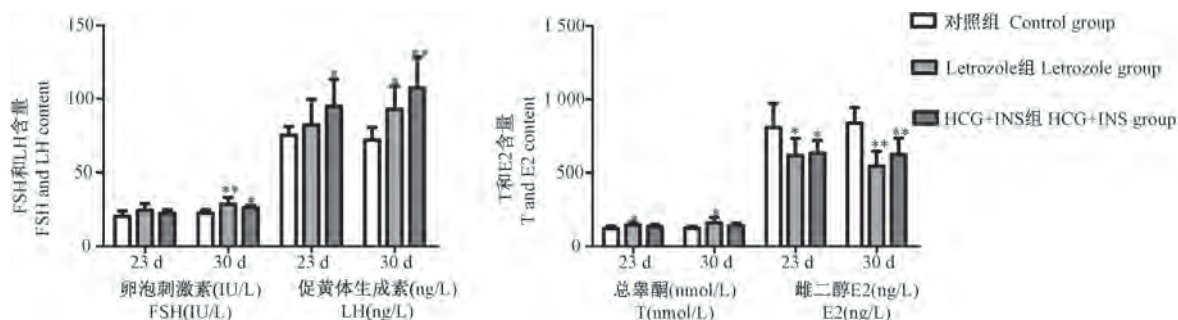


图6 各组大鼠血清性激素水平比较

Figure 6 Comparison of serum sex hormone levels in rats in each group

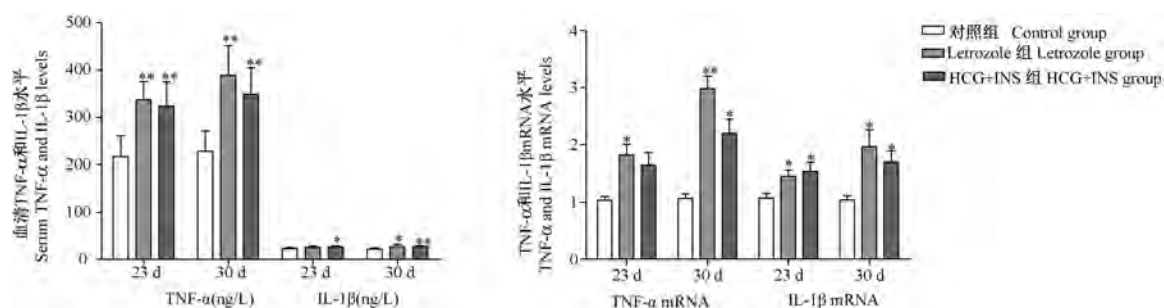


图7 各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β 水平和卵巢 TNF-α、IL-1β mRNA 表达变化

Figure 7 Changes of serum TNF-α and IL-1β levels and ovarian TNF-α and IL-1β mRNA expression in rats in each group

3 讨论

PCOS 是育龄期女性最常见的内分泌疾病之一,也是累及全身多系统的疾病。其诊断通常基于临床指标月经失调、Ferriman-Gallwey 得分、超声检查、肥胖症 (BMI) 及生化相关指标,如性激素六项、空腹血糖、空腹胰岛素等^[11]。目前,可以用来制备 PCOS 的动物模型主要有大鼠、小鼠、家兔和猴,根据模型的经济性、稳定性、标准性以及重复性原则,大鼠被选为常用动物^[4]。PCOS 模型建立以无排卵或偶发性排卵、性激素分泌紊乱、糖脂代谢异常、胰岛素抵抗、卵巢多囊性病理改变等为主要评价指标。本研究以近年来研究发现的胰岛素抵抗致 PCOS 代谢异常特征为主要关注点,并比较众多 PCOS 造模方法的实施难易程度、可复制性及与临床症状的吻合程度,从中优选了比较常用和适合的 PCOS-IR 造模方法:来曲唑法和经典的 Poresky 法。

来曲唑是一种新型芳香化酶抑制剂,其通过抑制体内雄激素向雌激素转化,导致体内雄激素增加,高雄激素血症不仅可以导致 IR,更是形成 PCOS 的基础^[12]。经典的 Poresky 法是胰岛素联合 HCG 法,利用外源性胰岛素刺激卵泡膜细胞和间质细胞合成雄激素,造成高雄激素血症;同时 HCG 是一种 LH 的类似物,能促使 LH 水平增加,阻碍卵泡颗粒细胞的正常有丝分裂,并且与胰岛素有协同作用,

共同加重高雄激素血症,导致排卵障碍,卵巢多囊样改变^[13]。因 PCOS-IR 患者大多表现为肥胖,相较于非肥胖型 PCOS 患者,肥胖型 PCOS 患者胰岛素抵抗表现更为严重^[14]。但是,单纯的来曲唑灌胃给药和胰岛素联合 HCG 注射给药难以造成动物肥胖,因此,本研究采用 5% 葡萄糖液和高脂饲料饲养,促使动物肥胖,形成了更符合临床肥胖型 PCOS 特征的动物模型。文献调研发现,PCOS-IR 动物模型造模时长难以选择,蔡云等^[12]发现,30 d 来曲唑联合高脂饲料喂养可成功诱导出 PCOS-IR 大鼠模型;魏巍等^[15]研究表明,21 d 胰岛素联合 HCG 法和来曲唑法均可成功诱导大鼠 PCOS-IR 模型,且大鼠模型其生殖及代谢指标的变化前者更具优势;王丽珍等^[13]发现,8 周胰岛素联合 HCG 法联合高脂饲料才可成功诱导大鼠 PCOS-IR 模型。因造模时间长短不一,PCOS-IR 动物模型与临床特征吻合程度也存在差异,故本实验对两种不同方法和不同时间 PCOS-IR 动物模型各主要评价指标进行比较探讨。

研究结果显示,在造模第 23 天,来曲唑联合高脂饮食法和经典 Poresky 法联合高脂饮食基本能够诱导出 PCOS-IR 动物模型。在造模第 30 天,两种综合评价指标诱导 PCOS-IR 动物模型更接近 PCOS 临床特征,出现排卵障碍、LH、FSH 升高。与经典 Poresky 法相比,虽然来曲唑组大鼠血脂 TC 水平无显著变化,但体重明显增加,并出现显著的排卵障

碍,无偶发排卵现象,卵巢多囊性改变明显,性激素分泌更加紊乱,伴高雄激素血症。因此,来曲唑造模联合高脂饲料法在第 30 天更加符合临床肥胖型 PCOS-IR 特征。相比前人的研究,进一步丰富了肥胖型 PCOS-IR 动物造模方法的评价及选择,为后续药物研究模型的选择上提供更加有效的参考。

由于 PCOS 患者处于长期的慢性低度炎症状态,炎症反应目前被认为是 PCOS 性激素失衡和胰岛素抵抗的关键环节,体内升高的促炎性因子(TNF- α 和 IL-1 β 等)可进一步加剧胰岛素抵抗,加重代谢紊乱和卵巢功能障碍,形成恶性循环^[16-17]。临床研究显示,相比非肥胖型 PCOS-IR 患者,肥胖型 PCOS-IR 患者体内炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 等显著升高^[18-19]。因此,本实验对每组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的含量和卵巢中 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达进行了检测,发现这些炎症因子水平均明显升高,这与临床报道一致。该实验通过对不同 PCOS-IR 动物模型的筛选与炎症机制的初探,为后续临床诊断和药物开发奠定良好的实验基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Jeanes YM, Reeves S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges [J]. *Nutr Res Rev*, 2017, 30(1): 97-105.
- [2] Barber TM, Dimitriadis GK, Andreou A, et al. Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance [J]. *Clin Med (Lond)*, 2016, 16(3): 262-266.
- [3] 王瑞杰,李晖,王自闯.补肾活血化痰方对多囊卵巢综合征模型大鼠的治疗作用机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(7): 899-902.
Wang RJ, Li H, Wang ZC. Study on the curative mechanism of Bushen Huoxue Huatan formula on polycystic ovarian syndrome model rats [J]. *Chin Pharm*, 2017, 28(7): 899-902.
- [4] 苗明三,闫晓丽,方晓艳,等.多囊卵巢综合征动物模型制备规范(草案)[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2576-2579.
Miao MS, Yan XL, Fang XY, et al. Specification for preparation of animal polycystic ovary syndrome models (draft) [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(6): 2576-2579.
- [5] Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(5): 467-520.
- [6] Wang Z, Zhai D, Zhang D, et al. Quercetin decreases insulin resistance in a polycystic ovary syndrome rat model by improving inflammatory microenvironment [J]. *Reprod Sci*, 2016, 24(5): 682-690.
- [7] Wang MX, Yin Q, Xu X. A rat model of polycystic ovary syndrome with insulin resistance induced by letrozole combined with high fat diet [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e922136.
- [8] Seow KM, Ting CH, Huang SW, et al. The use of dehydroepiandrosterone-treated rats is not a good animal model for the study of metabolic abnormalities in polycystic ovary syndrome [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018, 57(5): 696-704.
- [9] Zhang Y, Hu M, Meng F, et al. Metformin ameliorates uterine defects in a rat model of polycystic ovary syndrome [J]. *Ebiomedicine*, 2017, 18: 157-170.
- [10] Fu LL, Xu Y, Li DD, et al. Expression profiles of mRNA and long noncoding RNA in the ovaries of letrozole-induced polycystic ovary syndrome rat model through deep sequencing [J]. *Gene*, 2018, 657: 19-29.
- [11] Moghetti P. Insulin resistance and polycystic ovary syndrome [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(36): 5526-5534.
- [12] 蔡云,许昕.来曲唑联合高脂饲料建立 PCOS-IR 大鼠模型实验研究[J]. *首都医科大学学报*, 2017, 38(2): 244-248.
Cai Y, Xu X. Experimental study on establishment of rat model of polycystic ovary syndrome with insulin resistance by letrozole combined with high fat diet [J]. *J Capit Med Univ*, 2017, 38(2): 244-248.
- [13] 王丽珍,祝鸿发,朱妹妹,等.两种 PCOS 伴胰岛素抵抗大鼠动物模型构建与评价[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(10): 139-143.
Wang LZ, Zhu HF, Zhu MM, et al. Construction and evaluation of two kinds of PCOS rats-IR animal model [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2017, 19(10): 139-143.
- [14] Behboudi GS, Ramezani TF, Rostami DM, et al. Insulin resistance in obesity and polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(5): 343-353.
- [15] 魏巍,徐泰安,王秋实,等.两种多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗大鼠模型比较研究[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2019, 53(1): 12-16.
Wei W, Xu TA, Wang QS, et al. Comparison study of polycystic ovarian syndrome and insulin resistance rat models [J]. *J Harbin Med Univ*, 2019, 53(1): 12-16.
- [16] Patel S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 182: 27-36.
- [17] González F. Inflammation in polycystic ovary syndrome: Underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction [J]. *Steroids*, 2012, 77(4): 300-305.
- [18] Saray S, Almawi WY. Levels of CD40L and other inflammatory biomarkers in obese and non-obesewomen with polycystic ovary syndrome [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(4): 285-291.
- [19] Rey-Roldan E, Perez Lana MB, Galluzzo L, et al. Is the polycystic ovary syndrome the causative of the increase in inflammatory markers and metabolic risk? [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29(2): 141-144.

[收稿日期] 2021-03-01

赵勇, 武文卿, 谭邓旭, 等. 人脑胶质瘤小型猪原位移植模型的建立及评估 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 651-656.
Zhao Y, Wu WQ, Tan DX, et al. Establishment and evaluation of orthotopic transplantation model of human glioma in miniature pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 651-656.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.012

人脑胶质瘤小型猪原位移植模型的建立及评估

赵勇^{1#}, 武文卿^{2#}, 谭邓旭¹, 丁桂荣³, 师长宏^{1*}

(1. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710322; 2. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071;
3. 空军军医大学放射医学教研室, 西安 710032)

【摘要】 目的 利用免疫抑制剂处理小型猪, 建立人脑胶质瘤小型猪原位移植模型, 为胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体相近的实验工具。**方法** 人胶质瘤细胞 U87-MG 移植于裸鼠皮下, 待形成肉眼可见肿瘤后备用。选择小型猪联合口服免疫抑制剂环孢素软胶囊 (20 mg/kg) 和他克莫司胶囊 (0.01 mg/kg) 进行免疫干预。3 d 后, 取裸鼠皮下新鲜的 U87-MG 肿瘤组织, 将其修剪为 1 mm³ 组织块, 通过立体定向仪和套管针将肿瘤组织移植于经免疫抑制剂处理的小型猪大脑纹状体, 持续使用免疫抑制剂 21 d, 进行核磁共振成像, 确认肿瘤的位置。必要时处死动物并解剖, 取肿瘤组织固定, 进行 HE 和 IHC 染色以确定肿瘤的组织形态。**结果** 12 头猪进行了原位移植, 3 周后, 核磁检测确认 11 头猪成像, 肿瘤发生率达到 90% 以上, 胶质瘤猪原位移植模型肿瘤组织 HE 染色结果、生长特征均符合肿瘤特征; 人线粒体抗体染色显示其为人源性组织, 胶质瘤特异性标志物 GFAP 表达阳性。**结论** 联合环孢素软胶囊和他克莫司免疫抑制处理, 通过移植肿瘤组织成功建立人脑胶质瘤小型猪原位移植模型。

【关键词】 人脑胶质瘤; 异种移植; 猪; 免疫抑制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0651-06

Establishment and evaluation of orthotopic transplantation model of human glioma in miniature pigs

ZHAO Yong^{1#}, WU Wenqing^{2#}, TAN Dengxu¹, DING Guirong³, SHI Changhong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710322, China. 2. Laboratory Animal Center, Military Medical Science Academy, Beijing 100071. 3. Department of Radiology, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fuuu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish an orthotopic xenograft model of human glioma miniature pigs by treatment with immunosuppressive agents, and provide ideal experimental tools for screening glioma drug and imaging studies. **Methods** Human glioma cells U87-MG were transplanted into nude mice subcutaneously, and tumors were visible after two weeks. Then, we choose miniature pigs to be treated with oral immunosuppressant both cyclosporine soft capsules (20 mg/kg) and tacrolimus capsules (0.01 mg/kg). Three days later, the fresh tumor tissue derived from nude mice were collected and trim them into 1 mm³ tissue pieces. The tumor tissue were transplanted into cerebral striatum of the miniature pigs treated with immunosuppressive agents through a stereotactic instrument. After 21 days of continuous use of immunosuppressive agents, the animals displayed obviously thin, and space-occupying lesions in the brain were detected by

【基金项目】 基础加强计划重点基础研究项目 (2017-JCJQ-ZD-051-04), 军队实验动物专项课题 (SYDW(2017)02, SYDW(2017)05)。Funded by Key Basic Research Projects of the Foundation Strengthening Plan (2017-JCJQ-ZD-051-04), Laboratory Animal Foundation of Military (SYDW(2017)02, SYDW(2017)05)。

【作者简介】 赵勇 (1982—), 男, 实验师, 研究方向: 疾病动物模型制备。Email: zhaoyong8@aliyun.com;

武文卿 (1984—), 男, 助理研究员, 研究方向: 动物实验技术与管理。Email: wwq5206@sina.cn。

#共同第一作者

【通信作者】 师长宏 (1973—), 男, 教授, 研究方向: 疾病动物模型制备。Email: changhong@fmmu.edu.cn

Magnetic Resonance Imaging(MRI) to confirm tumors formation. These miniature pigs were sacrificed and dissected, then the tumor tissues were fixed. The histomorphological characteristics of tumor were confirmed by H&E and IHC staining.

Results Three weeks after orthotopic transplantation of the glioma tissue into the brain striatum of miniature pigs, 12 pigs have been implanted with U87-MG, 11 have presented a macroscopic significant tumor, with radiological and pathological characteristics of high-grade glioma. we found that the tumor incidence reached more than 90% by MRI scan. Both the HE staining result and growth characteristics of the tissue were consistent with tumor characteristics. The staining of human mitochondrial antibody demonstrated that this tumor was human-derived tissue and the glioma-specific marker GFAP was expressed positively. **Conclusions** Combined with cyclosporine soft capsule and tacrolimus immunosuppressive treatment, an orthotopic xenograft miniature pig model of human glioma was successfully established by transplanting tumor tissue.

【Keywords】 glioma; xenograft; pig; immunosuppression

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

恶性脑胶质瘤是成人最常见的侵袭性、原发性恶性脑肿瘤^[1],目前还没有确切的治疗方法,因其高度侵袭性和脑实质浸润导致多数患者死亡^[2]。其通常局限于中枢神经系统,不向外转移。恶性脑胶质瘤占所有原发性中枢神经系统肿瘤的近 25%, 占所有神经胶质瘤的 55%^[3-4]。恶性脑胶质瘤的治疗是一个世界性难题,其治疗效果差的关键问题在于恶性的胶质瘤细胞分化不全且深入神经细胞深处,导致手术不可能全部切除,复发率极高^[1]。预后最差的是多形性胶质母细胞瘤^[5],其中位生存时间为 14.6 个月,迫切需要更有效的肿瘤特异性疗法^[6-7]。建立有效、稳定的脑胶质瘤动物模型对其治疗研究具有重要意义^[8-9]。通常建立肿瘤移植模型的方法是采用小鼠或者大鼠来源的细胞系进行原位移植或者选取裸鼠移植人的肿瘤细胞^[10]。前者的鼠源性细胞系与人体存在很大差别,后者裸鼠体型较小并且生存期短,在建立模型之后进行肿瘤干预性治疗窗口期短,动物实验操作和饲养要求严格^[11]。

既往的研究成果是以大、小鼠为实验对象获得的,而人体脑组织结构和颅骨厚度与小动物相比差异较大,故不能将其效应及参数推及到人^[12-13]。小型猪体型适中,与人体较为接近,猪在解剖、组织和生理生化等许多生物学指标上与人类非常相似,被认为是研究人类疾病最合适的实验动物模型,特别在肿瘤相关的代谢、影像和治疗研究的理想动物模型。本研究将人脑胶质瘤细胞移植裸鼠后成瘤,进一步将该肿瘤组织原位移植免疫抑制剂处理的小型猪大脑形成胶质瘤,建立猪胶质瘤异种原位移植模型。核磁检测确认肿瘤的发生,处死动物解剖后能够观察到脑部肿瘤的形成,进一步进行 HE 染色和组化分析确认肿瘤的组织形态,从而为人胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体接近的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 只 6 ~ 7 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠, 20 ~ 22 g, 购自北京维通利华【SCXK(京)2016-0011】, 饲养在空军军医大学实验动物中心屏障设施内【SYXK(陕)2019-001】。环境温度 23 ~ 25℃, 相对湿度 40%, 12 h/12 h 昼夜交替, 饮用水经高压灭菌处理, 动物自由摄食和饮水。12 头 4 ~ 5 月龄普通巴马小型猪, 雌性, 体重 15 ~ 20 kg。购自北京创世纪小型猪养殖基地【SCXK(京)2018-0011】, 饲养在空军军医大学实验动物中心普通设施内【SYXK(陕)2019-001】。本研究通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会审核(IACUC-20200602)。

1.1.2 主要试剂与仪器

环孢霉素软胶囊(新赛斯平)和他克莫司(普乐可复)(空军军医大学第一附属医院);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);苏木精和伊红(H&E)染色液(北京雷根生物技术有限公司);人线粒体抗体和胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体(美国 abcam 公司, 货号: ab92824, ab7260), 前者是小鼠单克隆抗体仅与人源化组织标本反应, 不与大小鼠反应, 工作液 1 : 1000 稀释;二抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物科技有限公司);DAB 显色试剂盒、小鼠 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司);人胶质瘤细胞 U87-MG(ATCC HTB-14)。

大动物脑立体定位仪(瑞沃德 68868 N), 颅钻(瑞沃德 78067)和核磁共振(西门子 skyra 3.0 T)。

1.2 方法

1.2.1 人胶质瘤 U87-MG 细胞培养及移植

人胶质瘤细胞系 U87-MG 由本实验室保存, 培

养在 37℃, 5% CO₂ 的加湿培养箱中, 培养基为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 加入青霉素 (100 IU/mL)/链霉素 (100 μg/mL), 收集对数期 U87-MG 肿瘤细胞, 胰酶/EDTA 联合消化后用 PBS 重选至 2×10^7 备用。收集的 U87-MG 肿瘤细胞接种于裸鼠右侧背部皮下。待肿瘤体积长至 500 ~ 600 mm³ 时, CO₂ 安乐死处死裸鼠, 分离 U87-MG 肿瘤组织并修剪成 1 mm³ 组织块备用。

1.2.2 小型猪免疫抑制剂处理

术前 3 d 选用两种免疫抑制剂对小型猪进行预处理, 分别为环孢素软胶囊 (新赛斯平)^[14] 和他克莫司胶囊 (普乐可复)^[15]。联合使用剂量分别为环孢素 20 mg/kg; 他克莫司 0.01 mg/kg。免疫抑制剂给药方式为口服, 将两种胶囊拌在液体饲料中进食。给药后动物出现消瘦等免疫抑制症状, 但并未出现死亡和并发症的发生。术后持续上述药物剂量连续用药 21 d。当动物出现偏头、颤抖、体重下降大于 20% 时, 提前终止实验, 对动物实施安乐死。

1.2.3 小型猪的麻醉和手术

麻醉剂选择丙泊酚注射液, 麻醉剂量 4 mg/kg, 麻醉方式为耳静脉注射。实验前适应性饲养 1 周。头部皮肤去毛消毒, 在枕骨嵴前颅骨中线上, 纵向切开 4 ~ 5 cm 的颅骨皮肤。在枕骨嵴前 3 cm, 距中线 1 cm 处用 1.2 mm 颅钻开颅骨孔, 硬脑膜用注射器穿透。将修剪备用的裸鼠皮下 U87-MG 肿瘤组织用套管针将其移入深度为硬脑膜下 9 ~ 10.5 mm 的纹状体位置。颅骨钻孔用骨蜡填充, 创口消毒后缝合, 关闭皮肤层 (手术过程如图 1)。术后持续观察动物的生存状况。

1.2.4 核磁影像学检测

丙泊酚麻醉实验猪, 西门子 skyra 3.0 T 磁共振检测, 分别执行横断面 T2W1 加权、矢状面 T2W1 加权、横断面 T1 加权、弥散序列等成像序列检测肿瘤

的大小和位置。

1.2.5 HE 染色和免疫组织化学分析

核磁检测后, 200 mg/mL 戊巴比妥心内注射处死动物并解剖。解剖后分离出小型猪的大脑, 依据影像结果, 肉眼观察, 初步确认肿瘤发生的部位, 取该部位组织 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋制作切片, 脱蜡和水化后, HE 染色确认其胶质瘤组织形态。同时用非特异性蛋白封闭并消除内源性过氧化物酶活性, 一抗分别选择人线粒体抗体和 GFAP 在 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 (羊抗鼠) 室温孵育 20 min, DAB 显色后苏木素复染, 酒精脱水, 甲醛透明并中性树脂封片, 光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 建立人胶质瘤裸鼠皮下移植模型

收集对数生长期的人胶质瘤细胞 U87-MG, 皮下接种裸鼠, 3 周后肿瘤体积达到 500 ~ 600 mm³。裸鼠实施安乐死, 一部分肿瘤组织用于小型猪原位较重, 另一部分肿瘤组织 4% 多聚甲醛固定后, 石蜡包埋切片 HE 染色确认其胶质瘤组织形态。GFAP 染色后肿瘤组织强阳性表达确认其胶质瘤特征, 人线粒体特异性抗体强阳性表达确认其人性特征, 而正常鼠脑组织表达为阴性 (图 2)。病理组织学观察, 正常裸鼠脑组织皮质结构清晰, 细胞结构完整, 无炎症细胞浸润; 而小鼠脑胶质瘤细胞呈多边形或纺锤形, 存在少量的纤维血管间质。胞浆嗜酸性, 细胞核圆形或不规则, 有 1 或 2 个核仁。确认裸鼠皮下瘤为人源性胶质细胞瘤。

2.2 免疫抑制剂处理效果

环孢素软胶囊临床上使用剂量为 10 ~ 15 mg/(kg·d), 两次给药, 该剂量维持至术后 1 ~ 2 周。在本研究中, 结合临床用药剂量和实验动物的表现, 进行多个浓度批次的摸索。在使用高剂量时, 先后出现部分动物死亡, 或表现出腹泻、体格消瘦、皮肤炎症等不良反应, 最后确定环孢素的每次使用浓度为 20 mg/kg。环孢素和他克莫司联合使用可以进一步限制 T 细胞功能, 因此联合使用环孢素 (20 mg/kg) 和他克莫司 (0.01 mg/kg), 动物出现消瘦等症状, 但并未出现死亡和并发症, 说明该剂量的控制是有效的。基于术前和术后免疫干预, 免疫抑制方案从术前 3 d 开始一直持续到术后 3 周, 并伴随体重的变化及时调整用量。



图 1 人脑胶质瘤组织小型猪原位移植手术过程

Figure 1 Operative procedure of human glioma orthotopic xenograft in miniature pigs

2.3 核磁扫描结果

术后 3 周,麻醉小型猪进行核磁检测。西门子 skyra 3.0 T 磁共振成像序列检测肿瘤的大小和位置(图 3)。累计共完成 12 例小型猪脑胶质瘤模型手术制备,有 11 例通过核磁检测发现脑部肿瘤形成,肿瘤大小约 15 mm × 20 mm。

2.4 肿瘤组织形态和特异性标志物的表达

持续观察小型猪神经行为症状,必要时使用 200 mg/mL 戊巴比妥心内注射处死动物并解剖。分离颅内肿瘤组织,4%多聚甲醛固定后切片,HE 染色结果显示为胶质瘤特征(图 4)。免疫组织化学染色结果如图 5 和图 6 所示,人线粒体抗体和 GFAP 在胶质瘤发生部位均表达阳性,而正常的猪脑组织表达为阴性。

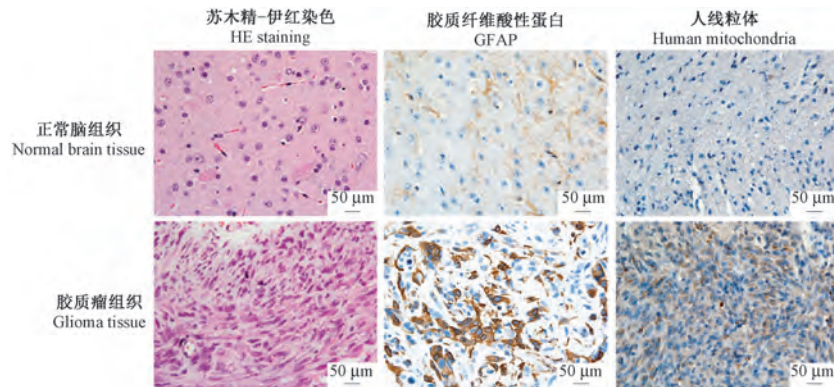


图 2 U87-MG 脑胶质瘤裸鼠移植瘤组织形态特征

Figure 2 Morphological changes of transplanted tumor of U87-MG glioma in nude mice

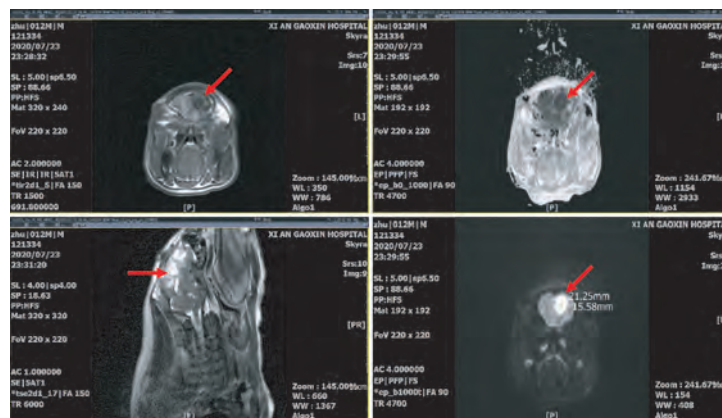


图 3 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部核磁扫描结果(箭头所指部位为肿瘤病灶)

Figure 3 MRI result for 3 weeks transplanted tumor of U87 glioma in miniature pigs (Arrow shows tumor)

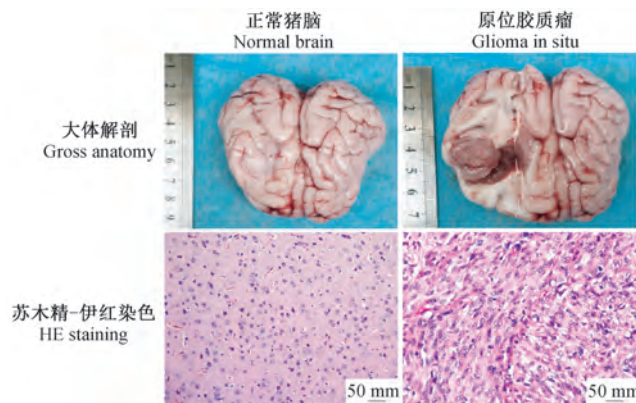


图 4 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织形态

Figure 4 Histomorphology of 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

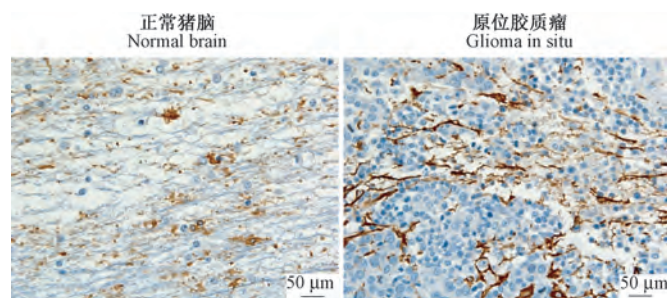


图 5 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织中 GFAP 表达阳性

Figure 5 IHC result shows GFAP express positive in 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

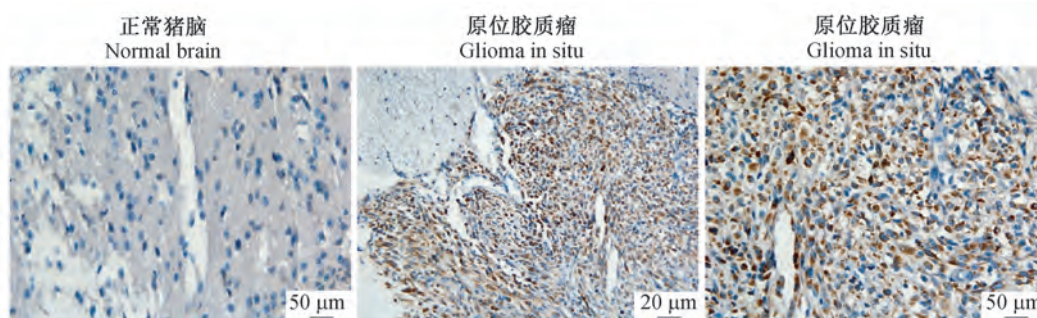


图 6 U87 肿瘤组织移植小型猪 3 周后脑部肿瘤组织中人线粒体表达阳性

Figure 6 IHC result shows human mitochondria express positive in 3 weeks brain tumor of U87 glioma in miniature pigs

3 讨论

利用小型猪建立肿瘤模型报道相对较少,主要集中在自发性皮肤黑色素瘤模型^[16],不同来源和遗传背景的小型猪可自发皮肤黑色素瘤。但该类模型发生比率不宜控制、时间长、个体差异大、短期内很难获取大量肿瘤学资料^[17]。在胶质瘤研究方面,已报道的脑胶质瘤动物模型多以啮齿类动物为主。但啮齿类动物大脑皮层光滑,无脑沟和脑回,与人脑解剖结构差异较大,导致大多成功用于小动物模型的肿瘤疗法在人类身上无法复制。猪脑因其解剖学、组织学和血管分布于人脑相似,制备小型猪脑胶质瘤模型对开展脑胶质瘤临床前应用研究具有重要的价值和意义。建立小型猪异种移植模型,最重要的问题是解决猪本身对人体组织细胞的免疫排斥反应,即必须选择合适的免疫抑制剂确定相应的剂量。环孢霉素软胶囊和他克莫司均是临床常用的免疫抑制剂,多用于器官移植和自身免疫疾病^[14,18]。环孢素软胶囊主要是通过选择性抑制 T 淋巴细胞活化而发挥免疫抑制作用^[19]。他克莫司主要通过抑制 IL-2 的释放,全面抑制 T 淋巴细胞的作用,从而达到免疫水平的抑制^[20]。结合实验

探索,本实验设计他克莫司和环孢素软胶囊联合用药进行免疫抑制,确定的联合剂量用于小型猪并未出现死亡和并发症的发生。体重变化一定程度上反应了免疫抑制剂的药效,联合用药组体重增长最慢,同时说明该剂量的控制是有效的。

相比于肿瘤细胞系移植模型,本实验将人脑胶质瘤细胞 U87-MG 接种裸鼠,将获取的荷瘤鼠肿瘤组织原位移植到小型猪脑部纹状体,不仅可以较好地保留瘤组织的结构和微环境,而且有利于肿瘤的生长,有效提高异种移植的成功率。同时,直接移植分散的人体肿瘤细胞,很容易被猪(免疫抑制剂处理)体内残存的免疫系统-排斥,前期直接移植人 U87-MG 肿瘤细胞均未在免疫抑制剂处理的猪建立起肿瘤模型;而移植的肿瘤组织,已经形成完整的组织结构且细胞成分复杂,猪体内的免疫系统很难排斥完整肿瘤组织,从而会有利于肿瘤的形成,提高肿瘤异种移植的成功率。因此,本研究通过将人胶质瘤细胞移植裸鼠,获得肿瘤组织,进一步通过移植肿瘤组织建立小型猪脑胶质瘤原位移植模型,建模成功率达到 90%。

本实验成功建立了小型猪脑胶质瘤模型,能确保术后小型猪的存活。胶质瘤组织块原位移植到

猪脑纹状体 3 周时,核磁检测确认肿瘤发生率达到 90%以上,处死动物解剖后能够观察到脑部肿瘤的形成,进一步进行 H&E 染色确认肿瘤的组织形态;人特异性线粒体表达强阳性确定该移植瘤来源于人;星形胶质细胞活化的标志物 GFAP 表达呈阳性,确认了其胶质瘤特性。总之,本实验获得的人脑胶质瘤小型猪移植模型可为人胶质瘤药物筛选和影像学研究提供与人体接近的实验工具。

参 考 文 献(References)

- [1] Dréan A, Goldwirth L, Verreault M, et al. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma [J]. Expert Rev Neurother, 2016, 16(11): 1285-1300.
- [2] Ferreira WA, Pinheiro Ddo R, Costa Junior CA, et al. An update on the epigenetics of glioblastomas [J]. Epigenomics, 2016, 8(9): 1289-1305.
- [3] Mujokoro B, Adabi M, Sadroddiny E, et al. Nano-structures mediated co-delivery of therapeutic agents for glioblastoma treatment: A review [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 69: 1092-1102.
- [4] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review [J]. JAMA, 2013, 310(17): 1842-1850.
- [5] Welling L, Lynch JC, Pereira C, et al. Glioblastoma Multiforme. The experience at the hospital dos Servidores do Estado in Rio de Janeiro [J]. J Brasileiro De Neurocirurgia, 2018, 24(1): 21-26.
- [6] Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, et al. Angiogenesis and invasion in glioma [J]. Brain Tumor Pathol, 2011, 28(1): 13-24.
- [7] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment [J]. Genes Dev, 2007, 21(21): 2683-2710.
- [8] 朱惠芳, 张远旭, 赵旭东. 脑胶质瘤动物模型的研究及应用进展 [J]. 动物学研究, 2012, 33(3): 337-342.
Zhu HF, Zhang YX, Zhao XD. Animal models of human glioma: the progress of application and investigation [J]. Zool Res, 2012, 33(3): 337-342.
- [9] 仰滨臻, 刘瑜洁, 齐宪荣. 脑胶质瘤治疗及其动物模型的研究进展 [J]. 药学研究, 2014, 33(10): 559-563.
Yang ZZ, Liu YJ, Qi XR. Advances in glioma therapy and its animal models [J]. J Pharm Res, 2014, 33(10): 559-563.
- [10] Lyustikman Y, Lassman AB. Glioma oncogenesis and animal models of glioma formation [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2006, 20(6): 1193-1214.
- [11] Seleak L, Seigneuret E, Nugue G, et al. Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: the first induced glioma model in a large animal [J]. J Neurosci Methods, 2014, 221(2): 159-165.
- [12] 张冬, 吴悝, 冯晓源, 等. 适于 MRI 研究的脑干胶质瘤模型的建立 [J]. 临床放射学杂志, 2005, 24(4): 357-360.
Zhang D, Wu X, Feng X, et al. The Establishment of rat glioma model of brain stem for MRI study [J]. J Clin Radiol, 2005, 24(4): 357-360.
- [13] Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, et al. *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma [J]. Neuroimage, 2008, 40(37): 47-58.
- [14] Selby R, Ramirez CB, Singh R, et al. Brain abscess in solid organ transplant recipients receiving cyclosporine-based immunosuppression [J]. Arch Surg, 1997, 132(3): 304-310.
- [15] Mcalister VC, Gao Z, Peltekian K, et al. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression [J]. Lancet, 2000, 355(9201): 376-377.
- [16] Bourneuf E. The MeLiM minipig: an original spontaneous model to explore cutaneous melanoma genetic basis [J]. Frontiers in Genetics, 2017, 8: 146.
- [17] van der Weyden L, Brenn T, Patton EE, et al. Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma [J]. J Pathol, 2020, 252(1): 4-21.
- [18] Khoshnevis M, Carozzo C, Bonnefont-Rebeix C, et al. Development of induced glioblastoma by implantation of a human xenograft in Yucatan minipig as a large animal model [J]. J Neurosci Methods, 2017, 282: 61-68.
- [19] Haczku A, Alexander A, Brown P, et al. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation *in vitro*: Comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93(2): 510-519.
- [20] Vafadari R, Kraaijeveld R, Weimar W, et al. Tacrolimus inhibits NF- κ B activation in peripheral human T cells [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e60784.

[收稿日期] 2020-01-04

王勇平, 张怀斌, 谢瑞敏, 等. 新西兰兔全膝关节置换术后假体周围感染模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 657-663.

Wang YP, Zhang HB, Xie RM, et al. Establishment of a peri-prosthetic infection model after total knee arthroplasty in New Zealand rabbits [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 657-663.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.013

新西兰兔全膝关节置换术后假体周围 感染模型的建立

王勇平¹, 张怀斌¹, 谢瑞敏¹, 陶贵彦¹, 侯卫华¹, 刘小荣^{2*}

(1. 兰州大学第一医院骨科, 兰州 730000; 2. 西北民族大学, 兰州 730000)

【摘要】 目的 探讨建立新西兰兔全膝关节置换术后假体周围感染模型的方法及可行性。**方法** 选取健康新西兰兔 48 只, 随机分成 3 组: 实验组(假体周围感染组)、对照组(假体未感染组)及空白对照组(假手术组), 每组各 16 只; 实验组左膝关节全膝关节置换术后 7 d 于新西兰兔关节腔内注射 0.5 mL 金黄色葡萄球菌悬液(1×10^7 CFU/mL), 对照组左膝关节全膝关节置换术后 7 d 于新西兰兔关节腔内注射 0.5 mL 生理盐水, 空白对照组左膝关节囊切开缝合术后未进行任何处理。各组分别于术前和术后 7、21 d 进行血液学检查, 术后 21 d 进行 X 线检查、细菌学及病理学检查。**结果** 术后 21 d 实验组成活率 87.5% (14/16), 对照组及空白对照组成活率 100%。术后 21 d X 线检查显示实验组及对照组均显示关节假体在位, 未见假体周围松动, 实验组关节周围软组织肿胀, 对照组及空白对照组关节周围软组织肿胀不明显; 血液学检查结果显示实验组白细胞总数(WBC)、ESR 和 CRP 较对照组及空白对照组高, 有统计学意义($P < 0.05$); 细菌学检查显示实验组细菌培养结果均为阳性, 感染率 100% (14/14), 对照组细菌培养阳性 1 例, 感染率 6.3% (1/16); 空白对照组细菌培养均为阴性, 感染率 0% (0/16); 病理学检查显示实验组假体周围及周围组织有大量炎性细胞浸润; 对照组及空白对照组假体周围及周围组织无炎性细胞浸润。**结论** 新西兰兔行全膝关节置换术后 7 d, 关节腔内注射 0.5 mL 金黄色葡萄球菌悬液, 可成功建立人工关节置换术后感染模型。

【关键词】 关节置换; 假体周围感染; 细菌; 新西兰兔

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0657-07

Establishment of a peri-prosthetic infection model after total knee arthroplasty in New Zealand rabbits

WANG Yongping¹, ZHANG Huaibin¹, XIE Ruimin¹, TAO Guiyan¹, HOU Weihua¹, LIU Xiaorong^{2*}

(1. Department of Orthopaedics, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China. 2. Department of Laboratory, College of Clinical Medicine of Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730000)

Corresponding author: LIU Xiaorong. E-mail: Liuxr610@163.com

【Abstract】 Objective To explore the method and feasibility of establishing a peri-prosthetic infection model after total knee arthroplasty in New Zealand rabbits. **Methods** Forty-eight healthy New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: an experimental group (peri-prosthetic infection group), a control group (non-peri-prosthetic infection group), and a blank control group (sham surgery group). A bacterial suspension of *Staphylococcus aureus* (0.5 mL, $1 \times$

【基金项目】 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSHY-2015-53), 中央高校基本科研业务费项目(31920200021)。

Funded by Health Industry Scientific Research Project of Gansu Province(GSWSHY-2015-53), Basic Scientific Research Operating Expenses of Central Universities(31920200021).

【作者简介】 王勇平, 男, 医学博士、博士后, 副教授, 研究生导师, 研究方向: 关节外科、创伤骨科及骨科生物材料。

Email: wangyp312@163.com

【通信作者】 刘小荣, 女, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 微生物检验基础与临床。Email: Liuxr610@163.com

10^7 CFU/mL) was injected into the joint cavity of New Zealand rabbits 7 d after total knee arthroplasty in the experimental group, while 0.5 mL saline was injected into the joint cavity of New Zealand rabbits 7 d after the total knee arthroplasty in the control group, and no treatment was undertaken after the capsule incision and suture of the knee joint in the blank control group. Hematology examination was performed 1 day before surgery and 7, 14, and 21 d after surgery in each group. X-ray examination, bacteriology, and pathology examination were performed 21 d after surgery. **Results** The survival rate of the experimental group was 87.5% (14/16), and that of the control group and the blank control group was 100%. Twenty-one days after surgery, X-ray examination showed that the prosthesis was good in the experimental group and the control group, and there was no loosening around the prosthesis. The soft tissue around the joint was swollen in the experimental group, but not in the control group and the blank control group. Hematology examination showed that WBC, ESR, and CRP were significantly higher in the experimental group than in the control and blank control groups ($P < 0.05$). The bacteriological examination showed that the bacterial culture was positive in the experimental group, and the infection rate was 100% (14/14), while the infection rate was 6.3% (1/16) in one case in the control group, and the bacterial culture was negative in the blank control group, with an infection rate of 0% (0/16). Pathological examination showed that there was a large amount of inflammatory cell infiltration around the prosthesis in the experimental group. Conversely, there was no inflammatory cell infiltration around the prosthesis in the control group and blank control group. **Conclusions** Injection of 0.5 mL *Staphylococcus aureus* into the joint cavity 7 days after total knee arthroplasty in New Zealand rabbits was successfully established as a peri-prosthetic infection model after total knee arthroplasty.

【Keywords】 joint replacement; peri-prosthetic infection; bacteria; New Zealand rabbit

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

人工关节置换术(joint replacement)是治疗终末期关节疾病(疼痛、畸形及功能障碍)最有效的手段,可显著改善患者生活质量。然而,关节假体周围感染(peri-prosthetic joint infection, PJI)是关节置换术常见的并发症,也是导致关节置换手术失败的常见原因之一^[1-4]。目前,关节假体周围感染的诊断和治疗仍然是骨科的一大难题,其主要原因是关节假体周围感染的病原菌会形成细菌生物膜,建立合适的动物模型是深入研究人工关节置换术后感染的基础^[5-6]。PJI 动物模型最初是由 Schurman 等^[7]在 1975 年提出和设计的,将不锈钢颗粒和金黄色葡萄球菌植入兔髌骨上囊,而不是植入骨中,此方法无法模拟骨-水泥-假体界面。1985 年 Petty 等^[8]把不同种类的细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌)注射到狗的股骨远端髓腔,分别用不锈钢合金、钴铬合金、高密度聚乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯聚合等材料假体进行实验。尽管像狗这样的大型动物拥有与人类相似的肌肉骨骼和免疫系统,可以很好地模拟人类膝关节的环境,但由于伦理、经济成本等条件限制,在以后的 PJI 模型中,研究人员更倾向于选择兔子、大鼠和小鼠等。2010 年 Bernthal 等^[9]采用了同样的方法,将不锈钢克氏针逆行插入小鼠股骨远端建立 PJI 模型。髓腔内植入物最初是为了模仿 TKA 术后的 PJI,但实际上混淆了骨髓炎模型和 PJI 模型。然而由于其操作的简单性和可重复

性,许多研究人员仍然使用该方法进行 PJI 建模。但是与目前 TKA 中常用的钛合金材料相比,不锈钢承重能力有限,而且没有使用骨水泥固定假体;虽然最小感染剂量很低,但它不能完全复制假体周围的环境,这些因素都影响了假体表面生物膜的形成。Bernthal 等^[9]也认为术中未切除的股骨和胫骨软骨可能与致病菌相互作用。在 2005 年 Craig 等^[10]在兔膝关节外侧副韧带前侧股骨髁钻孔,依次植入 0.1 mL 骨水泥、全螺纹不锈钢空心钉和超分子量聚乙烯(UHMWPE)垫圈,材料位于膝关节外侧,只能承受垂直方向的压应力,不能承受旋转应力;此外该实验没有分离髓腔和关节腔,术中没有移除关节软骨,这些都限制了其在未来的进一步应用。2017 年 Carli 等^[11]首次将钛合金 3D 打印胫骨假体应用于 PJI 小鼠模型,描述了一种基于由关节底板和髓内茎组成的压贴合钛胫骨种植体的小鼠模型,在手术时使用金黄色葡萄球菌关节内接种。虽然该模型具有植入物负重表面的优点,但可能不能准确代表延迟发病、低水平 PJI 的临床特征,血液培养仍为阴性,全身炎症标志物通常在正常范围内^[12]。

利用钛合金假体行新西兰兔全膝关节置换术,更类似于目前在 TKA 中使用的材料和技术,更利于手术膝关节局部低水平 PJI 的建立和持续,为诊治人工关节置换术后假体周围感染提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

48 只健康清洁级成年新西兰兔, 体重 3.0 ~ 3.5 kg, 购于中国农业科学院兰州兽医研究所, 实验动物设施许可证【SYXK(甘)2020-0009】, 动物生产许可证【SCXK(甘)2020-0001】, 动物饲养条件: 温度 20 ~ 26℃, 湿度 40% ~ 70%, 光照周期 12 h / 12 h, 动物自由采食和饮水。本研究符合兰州大学第一附属医院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准(伦理审批号: LDYYLL2020-40); 实验过程中按照 2006 年中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》进行^[13]。

1.1.2 分组

将 48 只新西兰兔随机分成 3 组, 实验组(假体周围感染组)、对照组(假体未感染组)及空白对照组(假手术组), 每组各 16 只。实验组行左膝关节全膝关节置换术后 7 d 于新西兰兔关节腔内注射 0.5 mL 金黄色葡萄球菌液; 对照组行左膝关节全膝关节置换术后 7 d 于新西兰兔关节腔内注射 0.5 mL 生理盐水; 空白对照组只进行左膝关节囊切开缝合术, 未植入假体, 术后 7 d 未进行任何处理。

1.1.3 主要试剂与仪器

3% 胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基(北京路桥公司), 3% 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(北京路桥公司), 0.4% 结晶紫染料(武汉 Servicebio 公司), 盐酸氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司), 盐酸塞拉嗪(吉林省华牧动物保健品有限公司), 注射用青霉素钠(每支 800 000 U, 山东鲁抗医药股份有限公司), DR 成像系统(荷兰 Philips 数字化 X 线成像系统)。

1.1.4 细菌及菌液配置

实验用菌株为金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 由甘肃省第二人民医院检验科提供。将细菌接种于血琼脂培养基中, 放于 37℃ 温箱培养 24 h 后, 挑取单个菌落用无菌 0.8% NaCl 溶液配置浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液, 用此浊度计确定其浓度。

1.2 方法

1.2.1 全膝关节置换术

术前 1 d 10% 硫化钠溶液脱毛备皮, 术前 4 h 禁食、禁水, 术中用盐酸塞拉嗪(4 mg/kg)和氯胺酮(8

mg/kg) 肌肉注射麻醉^[14]。

麻醉平稳后常规消毒铺巾, 取左膝正中纵切口长约 3 cm, 逐层切开皮肤及皮下组织, 髌旁内侧纵行切开髌旁组织及关节囊, 显露关节腔, 外翻髌骨并屈曲膝关节, 切除内外侧半月板、前交叉韧带, 依次对胫骨、股骨进行截骨和适度扩髓后植入关节假体, 最后冲洗切口逐层缝合, 包扎固定患肢, 1 周后随意活动。空白对照组在相同的条件下行左膝关节囊切开, 不植入假体, 缝合关节囊(图 1)。

术后预防性使用 40 万单位青霉素, 肌肉注射, 每天 1 次共 3 d, 术后每 3 d 换药 1 次, 14 d 拆除伤口缝线。

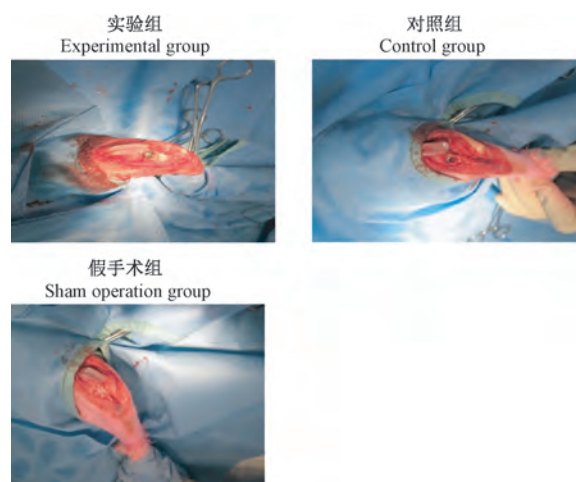


图 1 假体植入

Figure 1 Prosthesis implantation

1.2.2 细菌接种

术后 7 d, 实验组于手术侧膝关节经髌韧带外侧缘, 紧贴髌骨下极向内、后进针, 触及假体后向腔内注射 0.5 mL 金黄色葡萄球菌液(1×10^7 CFU/mL), 对照组以相同的方法于手术侧膝关节腔内注射 0.5 mL 生理盐水, 空白对照组未做任何处理。

1.2.3 观察指标

(1) 一般情况观察: 术后每天观察新西兰兔体温、体重、精神状态、步态及伤口愈合。

(2) 影像学检查: 3 组新西兰兔于术后 14、21 d, 用盐酸塞拉嗪(4 mg/kg)和氯胺酮(8 mg/kg)肌肉注射麻醉后进行左侧膝关节 X 线检查。

(3) 血液学检查: 分别于手术当天及术后 1、7、21 d, 经耳缘静脉取血 5 mL, 行白细胞计数(WBC)、C 反应蛋白(CRP)及血沉(ESR)检测。

(4) 细菌学检查: 术后 21 d 处死新西兰兔, 多处取样(取样过程严格无菌): ①关节液、脓液; ②部分关节囊; ③假体, 假体周围组织。将样本分别置于

营养肉汤中,放入 37℃ 恒温箱孵育 24 h 后接种于血琼脂培养基,继续于 37℃ 恒温箱培养 24 ~ 48 h,若有菌落形成,观察其形态特征进行触酶试验、血浆凝固酶试验和 ATB-New 鉴定仪鉴定,结果鉴定为金黄色葡萄球菌,即为阳性,至少两份取样阳性时定为感染^[15-16]。

(5)病理学检查:术后 21 d 处新西兰兔,取左侧膝关节,通过肉眼、光镜观察膝关节局部病理变化。

1.3 统计学分析

各组数据采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 SPSS 13.0 软件对每组实验结果进行统计分析。同组内不同时间点比较采用单因素方差,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

实验组新西兰兔术后 21 d 存活 14 只,1 只于术后 14 d 死亡,1 只于术后 16 d 死亡,存活率为 87.5%;对照组及空白对照组新西兰兔均无死亡。术后 3 d 3 组新西兰兔精神状态差;术后 14 d 实验组新西兰兔精神状态差、体重稍降低,对照组及空白对照组新西兰兔精神状态可、无体重降低;术后 21 d 实验组新西兰兔术侧膝关节红肿、皮温较高,对照组及空白对照组新西兰兔术侧膝关节无红肿、皮温正常(见图 2)。

2.2 影像学检查

实验组及对照组新西兰兔术后 14、21 d X 线片均显示关节假体稳定在位,未见假体松动,术后 21 d

实验组可见关节周围软组织肿胀,对照组及空白对照组关节周围软组织无明显肿胀(见图 3)。

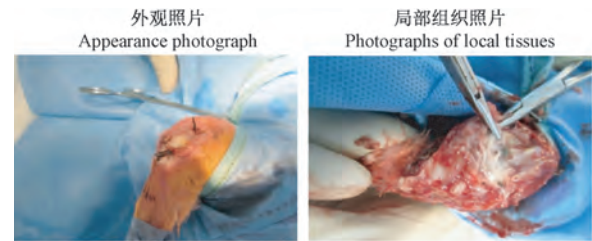


图 2 关节腔注射细菌后 2 周

Figure 2 2 weeks after injecting bacteria into the joint cavity

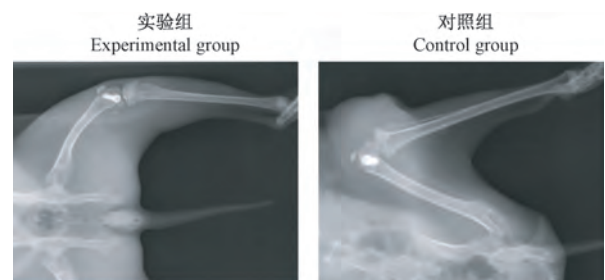
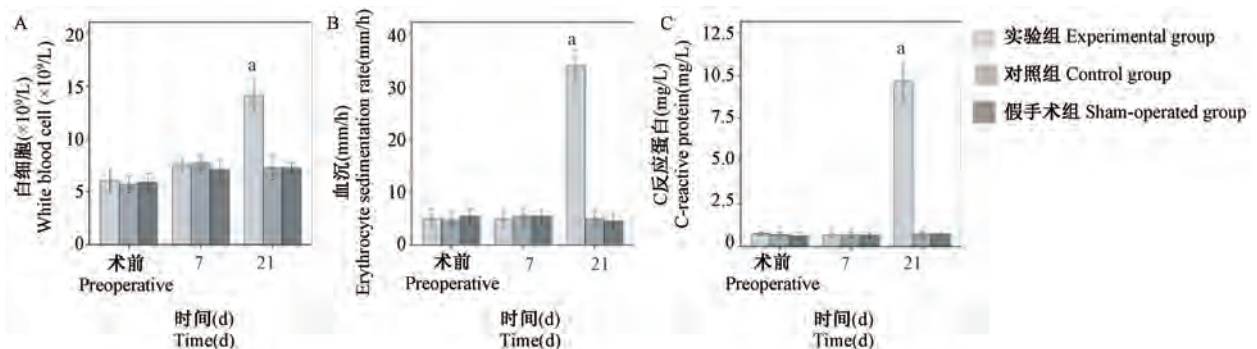


图 3 假体植入后 3 周 X 线

Figure 3 X ray 3 weeks after prosthesis implantation

2.3 血液学检查

各组新西兰兔手术当天及术后 1、7、21 d WBC、ESR、CRP 结果进行比较,结果显示术后 21 d 实验组 WBC 较对照组及空白对照组高(图 4A),具有显著性差异($P < 0.05$);实验组 ESR 较对照组及空白对照组高(图 4B),具有显著性差异($P < 0.05$);实验组 CRP 较对照组及空白对照组高(图 4C),具有显著性差异($P < 0.05$)。



注:A:各组术前及术后不同时期血液白细胞结果;B:各组术前及术后不同时期血沉结果;C:各组术前及术后不同时期 C 反应蛋白结果;与对照组相比,^a $P < 0.05$ 。

图 4 不同时期血液学指标测定结果

Note. A. Results of white blood cells at different stages before and after operation in each group. B. Results of erythrocyte sedimentation rate before and after operation in each group. C. C-reactive protein results of each group at different stages before and after operation. Compared with control group, ^a $P < 0.05$.

Figure 4 Results of hematological indexes in different periods

2.4 细菌学检查

术后 21 d 实验组培养结果均为阳性;对照组细菌培养阳性 1 例,阴性 15 例;空白对照组细菌培养均为阴性(图 5)。

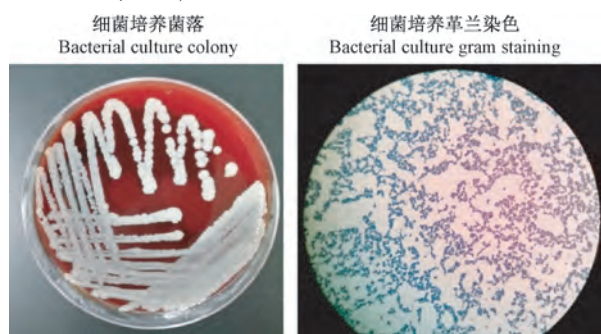


图 5 关节腔注射细菌后 2 周细菌培养菌落及细菌培养革兰染色($\times 100$)

Figure 5 2 weeks after intracavitary injection of bacteria, bacterial culture colonies and Gram staining were observed($\times 100$)

2.5 病理学检查

术后 21 d 实验组新西兰兔术侧膝关节滑膜肿胀,关节腔内及假体周围可见大量脓液,行 HE 染色:关节假体周围组织见大量炎性细胞浸润,假体周围纤维组织增生较明显,可见扩张、充血的小血管;对照组及空白对照组新西兰兔术侧膝关节腔内及假体周围可见少许透明液体,行 HE 染色:假体周围可见轻度纤维组织增生,未见炎性细胞浸润。

3 讨论

关节假体周围感染是关节置换术常见的并发症,也是关节置换手术失败的常见原因之一^[1-4]。目前,关节假体周围感染的诊断和治疗仍然是骨科的一大难题,其主要原因是关节假体周围感染的病原菌会形成细菌生物膜^[5-6]。

细菌生物膜是以细菌为生态群落,被包裹在其自身分泌的多聚物中所形成的一种膜状菌落结构^[17],其形成过程主要包括 4 个阶段,即:定植阶段、聚集阶段、成熟阶段、脱落与再定植阶段,其中细菌生物膜形成最关键的阶段是定植阶段,在此阶段多糖蛋白复合物首先将细菌包裹形成膜状物,然后牢固附着在假体表面^[18];当细菌以固着形定植在假体表面时,生物膜便进入聚集与成熟阶段,此时细菌生长繁殖的同时分泌大量胞外聚合物聚集细菌,成熟的细菌生物膜表面存在一些通道,表层细菌通过这些通道容易获得营养物质和排除代谢废物,对抗菌药敏感,拥有活跃的代谢状态,而里层细

菌与外层细菌相反,不易获得营养物质和排除代谢废物,代谢缓慢,处于“休眠状态”,对抗菌药不敏感^[19];成熟的细菌生物膜在内在机制或外部冲刷力等的作用下部分脱落或者释放成为浮游状态,在新的部位定植形成新的细菌生物膜,导致感染的扩散与复发。由于细菌生物膜形成过程的周而复始,使关节假体周围感染的病原学诊断及治疗面临极大的困难。

目前认为导致关节假体周围感染的病原菌可通过 2 种途径入侵,即直接浸润或血源传播,其中经血源性传播导致假体周围感染者约占 20%,而手术中细菌直接进入伤口导致假体周围感染者高达 63%^[20]。尽管人工关节置换术后假体周围感染动物模型细菌接种方法包括静脉接种、即刻局部接种和延期局部接种,但本研究根据上述研究结果后选取术后 7 d 于关节腔内直接注射适量致病菌模拟病原菌直接进入关节腔导致关节置换术后假体周围感染。

几乎所有的细菌都可引起假体周围感染。人工关节假体植入后,可发生单一细菌感染,也可发生复合细菌感染。Fulkerson 等^[21]对 146 例 THA 和 TKA 翻修术后(共 194 个关节,其中髋关节 110 个,膝关节 84 个)的临床样本进行细菌培养,其中金黄色葡萄球菌最常见(35%),其次是表皮葡萄球菌(31%)和链球菌(11%),故本实验使用金黄色葡萄球菌作为致病菌,建立人工关节置换术后早期感染细菌模型。

由于关节腔注射的细菌浓度过高会引起模型动物脓毒血症,死亡率较高,若关节腔注射的细菌浓度过低则达不到假体周围感染的目的,因此,研究者有不同的探索,Southwood 等^[22]在股骨的髓质部分注入 1×10^3 CFU 的金黄色葡萄球菌,THA 术后所有兔的假体周围感染;王子明等^[23]利用 1×10^6 CFU 和 1×10^8 CFU 两种剂量的 MRSE 进行关节腔注射, 1×10^6 CFU 的细菌可造成兔股骨头置换术后 75%感染,而 1×10^8 CFU 的细菌可造成兔股骨头置换术后 100%感染;吴宇黎等^[24]在关节腔内接种 1×10^4 CFU 的 MRSE SL-76,导致 TKA 术后全部大鼠假体周围感染;王志酬等^[16]在关节腔内接种 5×10^5 CFU 的 MRSA,TKA 术后全部兔发生假体周围感染;丛锐军等^[25]在关节腔内接种 1×10^5 CFU 的金黄色葡萄球菌,成功构建稳定的兔 TKA 术后假体周围感染模型。

影像学检查、血液学检查、细菌学检查及病理学检查都是诊断假体周围感染的方法,其中细菌培养是判断感染是否存在的金标准。X 线检查是骨科最常用的检查手段之一,然而在假体周围感染早期缺乏典型的 X 线改变,不能准确反映感染的病理过程,因此 X 线对早期假体周围感染诊断意义不大。血液学检查简单、快速,是目前临床上最常用的检测方法^[26]。假体周围感染最常用的血液学实验室检查是 WBC、ESR、CRP 和白细胞介素 6(IL-6)等,其中 WBC、CRP 及 ESR 对感染诊断虽然有帮助,但都是非特异性的指标,WBC 一般只对急性感染和引起全身症状时比较敏感,而在亚急性感染、慢性感染和低毒性感染时无意义;CRP 和 ESR 常在关节置换术后即快速升高,ESR 一般迟于 CRP 达到其峰值,其可能持续数月,而在术后 2 个月内 CRP 则可降到正常^[27];如果术前 CRP 正常,术后 3 个月 CRP 仍高于正常或者下降后又上升,表明该患者存在关节假体周围感染的可能,一般情况下 CRP 正常提示不存在感染,但也可能是由于抗菌药物的应用或低毒性细菌感染导致的假阴性;IL-6 峰值出现在关节置换术后 6 ~ 12 h,在术后 48 ~ 72 h 恢复正常^[28],由于血液学指标的非特异性,因此本研究采用多项血液学指标测定,旨在探讨利用血液学指标检测新西兰兔全膝关节置换术后感染模型的效果^[12]。本研究中将细菌培养作为判断感染的唯一标准,在实验中,将不同组织样本放置于营养肉汤中,放入 37℃ 恒温箱孵育 24 h 后接种于血琼脂培养基,继续于 37℃ 恒温箱培养 24 ~ 48 h,这样大大降低了培养结果的假阴性率。

总之,细菌生物膜影响假体周围感染的诊断和治疗,往往存在临床提示感染但是细菌培养阴性的情况,使临床医生无法早期诊断并及时使用敏感抗生素治疗^[29]。因此,正确诊断引起假体周围感染的病原菌是假体周围感染治疗成功与否的关键步骤之一。本研究结果表明新西兰兔全膝关节置换术后 7 d 接种 0.5 mL 1×10^7 CFU 的金黄色葡萄球菌可成功构建假体周围感染模型,为人工关节置换术后感染的诊断及治疗提供了实验依据,并为进一步研究人工关节置换术后感染以及生物膜形成的机制提供理论依据和基础。

参 考 文 献(References)

- [1] Romanò CL, Khawashki HA, Benzakour T, et al. The W.A.I.O. T. definition of high-grade and low-grade peri-prosthetic joint infection [J]. J Clin Med J Clin Med, 2019, 8(5): 650.
- [2] DeFrancesco CJ, Fu MC, Kahlenberg CA, et al. Extended antibiotic prophylaxis may be linked to lower peri-prosthetic joint infection rates in high-risk patients: an evidence-based review [J]. HSS J, 2019, 15(3): 297-301.
- [3] Wang KH, Yu SW, Iorio R, et al. Long term treatment results for deep infections of total knee arthroplasty [J]. J Arthroplasty, 2015, 30(9): 1623-1628.
- [4] 杨培丽, 王丽娟, 王奕翔, 等. 关节假体感染细菌生物膜的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(9): 1113-1116.
Yang PL, Wang LJ, Wang YX, et al. Advances in the study of bacterial biofilms infected with joint prosthesis [J]. Int J Lab Med, 2008, 39(9): 1113-1116.
- [5] Morris JL, Letson HL, Elliott L, et al. Evaluation of bacteriophage as an adjunct therapy for treatment of peri-prosthetic joint infection caused by staphylococcus aureus [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226574.
- [6] 郭艾, 马立峰. 人工关节置换术后假体关节周围感染的诊疗进展 [J]. 国际外科学杂志, 2019, 46(7): 433-436.
Guo A, Ma LF. Progress in the diagnosis and treatment of periparticular infection after artificial joint replacement [J]. Int J Surg, 2019, 46(7): 433-436.
- [7] Schurman DJ, Johnson BL Jr, Amstutz HC. Knee joint infections with staphylococcus aureus and micrococcus species [J]. J Bone Joint Surg Am, 1975, 57(1): 40-49.
- [8] Petty W, Spanier S, Shuster JJ, et al. The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model [J]. J Bone Joint Surg Am, 1985, 67(8): 1236-1244.
- [9] Bernthal NM, Stavrakis AI, Billi F, et al. A mouse model of post-arthroplasty staphylococcus aureus joint infection to evaluate *in vivo* the efficacy of antimicrobial implant coatings [J]. PLoS One, 2010, 5(9): e12580.
- [10] Craig MR, Poelstra KA, Sherrell JC, et al. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits [J]. J Orthop Res, 2005, 23(5): 1100-1104.
- [11] Carli AV, Bhimani S, Yang X, et al. Quantification of peri-implant bacterial load and *in vivo* biofilm formation in an innovative, clinically representative mouse model of periprosthetic joint infection [J]. J Bone Joint Surg Am, 2017, 99(6): e25.
- [12] Morris JL, Letson HL, Grant A, et al. Experimental model of peri-prosthetic infection of the knee caused by staphylococcus aureus using biomaterials representative of modern TKA [J]. Biol Open, 2019, 8(9): bio045203.
- [13] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见 [R]. 北京, 2006.
Ministry of Science and Technology, PRC. Guidelines on treating laboratory animals well [R]. Beijing, 2006.
- [14] 王勇平, 蒋垚, 毛琳, 等. 可降解金属 Mg-Nd-Zn-Zr 镁合金的降解行为 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(47): 8189-8195.
Wang YP, Jiang Y, Mao L, et al. Degradation of biodegradable mG-Nd-ZN-ZR magnesium alloys [J]. J Clin Rehabil Tis Eng

- Res, 2013, 17(47): 8189-8195.
- [15] Kipp F, Becker K, Peters G, et al. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small colony variant soft staphylococcus aureus [J]. Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1277-1279.
- [16] 王志酬, 曹力, 龚时国, 等. 兔膝关节置换术后感染模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(2): 258-260.
- Wang ZC, Cao L, Gong SG, et al. Establishment of infection model after knee arthroplasty in rabbits [J]. Chin J Exp Surg, 2010, 27(2): 258-260.
- [17] 祝司霞. 细菌生物膜的结构及形成机制的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报, 2015, 17(2): 115-117.
- Zhu SX. Research progress on the structure and formation mechanism of bacterial biofilm [J]. J Shenyang Med Coll, 2015, 17(2): 115-117.
- [18] Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 8(9): 881-890.
- [19] 林迪, 孙长贵. 生物膜研究相关进展 [J]. 临床检验杂志, 2017, 35(4): 241-245.
- Lin D, Sun CG. Research progress of biofilm [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2017, 35(4): 241-245.
- [20] Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(3): 276-301.
- [21] Fulkerson E, Valle CJ, Wise B, et al. Antibiotic susceptibility of bacteria infecting total joint arthroplasty sites [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(6): 1231-1237.
- [22] Southwood RT, Rice JL, McDonald PJ, et al. Infection in experimental hip arthroplasties [J]. Clin Orthop Relat Res, 1985, 67(224): 33-36.
- [23] 王子明, 王爱民, 唐桂阳, 等. 骨水泥型人工股骨头置换和术后感染模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2007, 9(1): 16-19.
- Wang ZM, Wang AM, Tang GY, et al. A model of bone cement artificial femoral head replacement and postoperative infection [J]. Chin J Exp Surg, 2007, 9(1): 16-19.
- [24] 吴宇黎, 王继芳, 卢世璧, 等. 人工关节假体感染动物模型的建立 [J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(4): 236-238.
- Wu YL, Wang JF, Lu SB, et al. Establishment of animal model of artificial joint prosthesis infection [J]. Chin J Orthop, 1999, 19(4): 236-238.
- [25] 丛锐军, 符培亮, 刘伟, 等. 兔关节内植物植入术后金黄色葡萄球菌感染模型的建立 [J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2012, 6(6): 920-930.
- Cong RJ, Fu PL, Liu W, et al. Establishment of staphylococcus aureus infection model after rabbit arthroplasty [J]. Chin J Joint Surg (Electronic Edition), 2012, 6(6): 920-930.
- [26] 王丽娟, 杨培丽, 王奕翔, 等. 关节假体感染细菌生物膜病原菌检测方法的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(12): 1495-1498.
- Wang LJ, Yang PL, Wang YX, et al. Research progress in detecting bacterial biofilm pathogens of joint prosthesis infection [J]. Int J Lab Med, 2008, 39(12): 1495-1498.
- [27] Arvieux C, Common H. New diagnostic tools for prosthetic joint infection [J]. Orthop Traumatol Surg Res, 2019, 105(1): 23-30.
- [28] Berns E, Barrett C, Gardezi M, et al. Current clinical methods for detection of peri-prosthetic joint infection [J]. Surg Infect (Larchmt), 2020, 21(8): 645-653.
- [29] Nelson CL, McLaren AC, McLaren SG, et al. Is aseptic loosening truly aseptic? [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 437: 25-30.

[收稿日期] 2020-12-03

孙红爽,李鹏霖,刘永双,等. 姜黄素对非酒精性脂肪肝大鼠肝 11 β -HSD1 表达及胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 664-669.

Sun HS, Li PL, Liu YS, et al. Effect of curcumin on hepatic 11 β -HSD1 expression and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 664-669.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.014

姜黄素对非酒精性脂肪肝大鼠肝 11 β -HSD1 表达及胰岛素抵抗的影响

孙红爽,李鹏霖,刘永双,乜春城*,高玲娜

(哈励逊国际和平医院药学部,河北 衡水 053000)

【摘要】 目的 观察姜黄素对非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 大鼠肝 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 (11 β -HSD1) 表达及胰岛素抵抗的影响。**方法** 大鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、姜黄素低剂量组 (C1 组)、姜黄素高剂量组 (C2 组),高热量饲料喂养 8 周建立大鼠 NAFLD 模型,C1、C2 组 (姜黄素 200、400 mg/(kg·d)) 治疗 8 周。实验结束后进行相关指标检测。**结果** 姜黄素治疗可以降低肝指数,改善肝功能,降低血脂及肝脂质沉积,减轻肝组织病理改变,同时显著改善胰岛素抵抗状态且以上治疗作用呈剂量依赖性。肝组织 11 β -HSD1 mRNA 及蛋白表达显示,C1 组 (0.157 $\pm$ 0.013、0.264 $\pm$ 0.062) 和 C2 组 (0.091 $\pm$ 0.009、0.191 $\pm$ 0.021) 较模型组 (0.264 $\pm$ 0.015、0.477 $\pm$ 0.074) 均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且 C2 组更明显。**结论** 姜黄素对高热量饲料所致大鼠 NAFLD 有较好治疗作用,可能与其抑制 11 β -HSD1 表达,进而改善胰岛素抵抗有关。

【关键词】 姜黄素;非酒精性脂肪肝;高热量饲料;11 β -羟基类固醇脱氢酶 1;胰岛素抵抗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0664-06

Effect of curcumin on hepatic 11 β -HSD1 expression and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver disease

SUN Hongshuang, LI Penglin, LIU Yongshuang, NIE Chuncheng*, GAO Lingna

(Harrison International Peace Hospital, Hengshui 053000, China)

Corresponding author: NIE Chuncheng. E-mail: hyshs1239@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of curcumin on hepatic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) expression and insulin resistance in rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups: control, NAFLD model, low-dosage curcumin treatment (C1) and high-dosage curcumin treatment (C2) groups. The NAFLD model was established by a high-fat/high-sugar diet. After 8 weeks of the diet, the C1 and C2 groups were given 200 and 400 mg/(kg·d) curcumin, respectively, by intragastric administration for 8 weeks. **Results** Compared with the model group, the NAFLD was significantly improved in the C1 and C2 groups, expressed as the reduction of the fatty liver index, serum lipids, liver lipid deposition, improvement of liver function and pathological changes. Insulin resistance was also significantly improved. The relative expression levels of 11 β -HSD1 mRNA and protein in liver tissue were significantly lower in the C1 (0.157 $\pm$ 0.013 and 0.264 $\pm$ 0.062, respectively) and C2 groups (0.091 $\pm$ 0.009 and 0.191 $\pm$ 0.021, respectively) than those in the model group (0.264 $\pm$

【基金项目】衡水市人民医院研究生科研基金项目 (2018-06),河北省 2021 年度医学科学研究课题 (20211184)。

Funded by the Graduate Research Foundation of the People's Hospital of Hengshui (2018-06), Hebei Provincial Medical Science Research Planning Project (20211184).

【作者简介】孙红爽 (1985—),女,硕士,副主任药师,研究方向:药理学及临床药学。Email: 282962760@qq.com

【通信作者】乜春城 (1984—),男,硕士,副主任检验师,研究方向:临床检验医学。Email: hyshs1239@163.com

0.015 and 0.477 ± 0.074 , respectively) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). All curcumin treatment effects were dose-dependent.

Conclusions Curcumin significantly improved NAFLD in rats, and this effect may be related to the inhibition of 11β -HSD1 expression and the improvement of insulin resistance.

【 Keywords 】 curcumin; nonalcoholic fatty liver disease; high-fat/high-sugar diet; 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; insulin resistance

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

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是临床上常见的慢性肝病之一, 与 2 型糖尿病、肥胖、高血压、高脂血症等疾病密切相关^[1]。NAFLD 的发病机制尚不完全明确, 但“二次打击”理论已被普遍认同, 胰岛素抵抗、氧化应激、炎症反应和脂质代谢紊乱在其疾病进展过程中发挥了重要作用^[2]。姜黄素 (curcumin) 是中药材姜黄的主要有效单体组分, 具有抗炎、抗氧化、调节血脂、保护肝细胞、抗肿瘤等多种药理作用^[3]。本研究自 2019 年 3 月至 2020 年 3 月, 通过高热量饲料喂养建立非酒精性脂肪肝大鼠模型, 观察姜黄素对非酒精性脂肪肝大鼠肝 11β -羟基类固醇脱氢酶 1 (11β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11β -HSD1) 表达及胰岛素抵抗的影响, 为姜黄素治疗 NAFLD 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

36 只 8 周龄清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 由河南实验动物中心提供【SCXK(豫)2017-0001】, 饲养于中国药科大学药理教研室【SYXK(苏)2018-0018】。饲养条件: 温度 21 ~ 25℃, 湿度 50% ~ 60%, 光照控制保证 12 h 明、暗条件, 自由饮水摄食。适应性喂养 1 周后开始实验。本研究经哈励逊国际和平医院伦理委员会审核批准 (批件号: 2018-3-015)。

1.1.2 主要试剂与仪器

姜黄素 (Sigma 公司, 美国); 全自动生化分析仪 (7600-020, 日立公司, 日本); 两步法 RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); 11β -HSD1 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国); 实时定量 PCR 仪 (MJ Research 公司, 美国); Mini-Protean 3 电泳槽、半干式转膜槽、Power PacTM Basic 电源 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药

36 只大鼠随机分为 4 组: 对照组 8 只、模型

组 12 只、姜黄素低剂量组 (C1 组) 8 只姜黄素高剂量组 (C2 组) 8 只。对照组喂给普通饲料, 其他 3 组喂给自制高热量饲料 (配方: 22% 猪油 + 8% 糖 + 2% 胆固醇 + 2% 食盐 + 66% 基础饲料), 饮用自来水。8 周后, 模型组处死 4 只, 确定造模是否成功。造模成功后, C1 组、C2 组分别灌胃给以姜黄素 200 mg/(kg·d) 和 400 mg/(kg·d)。连续给药 8 周。

1.2.2 胰岛素耐量试验

末次给药后, 进行胰岛素耐量试验, 试验方法参考文献^[4]。

1.2.3 样本采集及处理

实验结束时, 大鼠禁食 12 h, 称体重, 麻醉后颈动脉插管取血, 3500 r/min 离心 10 min, 分离血清, 于 -20℃ 保存待测。取大鼠肝, 称重, 计算肝指数 (hepatic index, HI): $HI (mg/g) = \text{肝重量} (g) / \text{体重} (g) \times 1000$ 。制作肝石蜡切片, 苏木精-伊红染色法 (HE) 染色, 光学显微镜下观察, 参照非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 临床研究评分系统^[5]评分, 评分标准参考文献^[6]。

1.2.4 血液指标测定

采用全自动生化分析仪检测各组血清丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglycerides, TG)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)、游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 及血糖。采用 DFM-96 型 16 管放射 γ 免疫计数器检测血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和胰岛素。并计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR): $HOMA-IR = (\text{空腹胰岛素} \times \text{空腹血糖}) / 22.5$ 。

1.2.5 肝组织生化指标测定

取新鲜肝组织 200 mg, 制成 10% 的组织匀浆, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 测定肝组织 TC、TG、FFA 及 TNF- α 含量, 检测方法同血液指标测定。

1.2.6 肝组织 11 β -HSD1 基因表达

11 β -HSD1 引物上游 5'-GCAGAGCGATTTC TTGTT-3', 引物下游 5'-TGTCTATGAAGCCGAGGA-3'; β -actin 上游 5'-CATCACCATGGCAATGAGCGG-3', 下游 5'-TGCGGTCCACGATGGAGGGGCC-3'。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 30 s, 然后 94℃ 变性 4 min, 48℃ 退火 1.5 min, 72℃ 延伸 2 min, 运行 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像分析系统进行灰度扫描, 计算各组相对灰度。

1.2.7 肝组织 11 β -HSD1 蛋白表达

提取肝组织蛋白进行 Western Blot 检测。14.7% 分离胶、5% 浓缩胶, 60 V 电泳后转膜 2 h, 室温封闭 2 h, 以免抗小鼠 11 β -HSD1 多克隆抗体为一抗 (1:200 稀释) 4℃ 过夜, 以羊抗兔 IgG-HRP 抗体为二抗 (1:800 稀释) 室温作用 2 h, ECL 检测。Bandscan 软件对结果进行定量分析, 并用自身 β -actin 灰度值校正。

1.3 统计学分析

结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理采用 SPSS 13.0 软件。多组间比较采用单因素方差分析 (Oneway ANOVA) 及 LSD 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素耐量试验

与对照组 (4.28 ± 0.28) mmol/L 比较, 模型组基础血糖值 (5.18 ± 0.39) mmol/L 显著升高。腹腔注射胰岛素 30 min 后, 对照组、模型组、C1 组和 C2 组血糖分别下降了 44.15%、13.53%、28.14%、32.58%。与对照组 (11.76 ± 0.70) mmol * h/L 比

较, 模型组 AUC 值 (16.89 ± 1.36) mmol * h/L 显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, C1 组 (14.98 ± 0.88) mmol * h/L 和 C2 组 (12.96 ± 0.51) mmol * h/L AUC 值均显著下降 ($P < 0.01$), 且 C2 组下降更明显 (见图 1)。

2.2 血液生化指标

与对照组比较, 模型组大鼠 AST、ALT、血糖、血脂、胰岛素及炎症因子 TNF- α 水平均显著性升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, C1 组和 C2 组以上各项指标均有不同程度的好转, 且 C2 组变化更为明显; 其中 TG 只有下降趋势, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 其余各项指标均有显著性差异 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.3 肝指数和肝生化指标

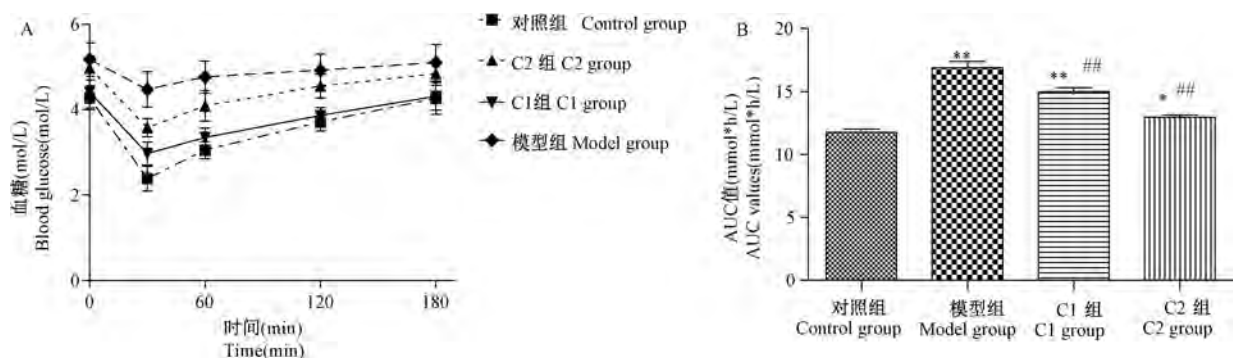
与对照组比较, 模型组大鼠肝指数明显增大, 出现明显的肝脂质沉积, 且肝 TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, C1 组和 C2 组以上各项指标均显著下降 ($P < 0.05$), 且 C2 组下降更为明显 (见表 2)。

2.4 肝组织 11 β -HSD1 基因及蛋白表达

与对照组 0.052 ± 0.008 、 0.102 ± 0.024 比较, 模型组 0.264 ± 0.015 、 0.477 ± 0.074 肝组织 11 β -HSD1 mRNA 及蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, C1 组 0.157 ± 0.013 、 0.264 ± 0.062 和 C2 组 0.091 ± 0.009 、 0.191 ± 0.021 肝组织 11 β -HSD1 mRNA 及蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 C2 组变化更为明显 (见图 2)。

2.5 肝组织病理学观察与评分

对照组大鼠肝细胞结构完整, 肝小叶清晰, 所有动物均未显示有肝组织病变迹象; 模型组 8 只动物均存不同程度的脂肪变性, 7 只存在汇管区炎症, 6 只存在轻度或中度肝细胞气球样变, 4 只出现肝纤



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 1 胰岛素耐量试验中不同时间点的血糖值和 AUC 值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

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

Figure 1 Blood glucose values at different time points and AUC values in Wistar rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

纤维化;C1 组 6 只存在轻度脂肪变性,4 只出现汇管区炎症,5 只存在轻度肝细胞气球样变,2 只出现肝纤维化;C2 组 3 只存在轻度脂肪变,2 只出现汇管区炎症,2 只存在轻度肝细胞气球样变(图 3,表 3)。

表 1 各组大鼠血液生化指标($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Serum parameters of Wistar rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

血液指标 Serum parameters	对照组 Control group	模型组 Model group	C1 组 C1 group	C2 组 C2 group
血糖 (mmol/L) Blood glucose (mmol/L)	4.60 ± 0.21	5.70 ± 0.23 **	5.09 ± 0.19 ** ##	4.91 ± 0.26 ** ##
胰岛素 (mIU/L) Insulin (mIU/L)	14.30 ± 1.38	37.93 ± 3.58 **	28.17 ± 3.50 ** ##	20.35 ± 2.52 ** ##
HOMA-IR	2.92 ± 0.32	9.63 ± 1.16 **	6.37 ± 0.84 ** ##	4.43 ± 0.51 ** ##
ALT (U/L)	41.38 ± 9.33	70.25 ± 13.04 **	63.00 ± 5.71 **	48.38 ± 13.32 ##
AST (U/L)	99.88 ± 14.27	189.63 ± 20.50 **	167.00 ± 17.07 ** #	140.38 ± 16.24 ** ##
TC (mmol/L)	1.53 ± 0.18	2.10 ± 0.15 **	1.87 ± 0.20 ** #	1.66 ± 0.24 ##
TG (mmol/L)	0.59 ± 0.06	0.68 ± 0.07 *	0.65 ± 0.06	0.63 ± 0.05
HDL (mmol/L)	1.04 ± 0.11	0.81 ± 0.11 **	0.87 ± 0.07 **	0.92 ± 0.10 * #
FFA (μmol/L)	649.34 ± 57.24	1082.96 ± 55.51 **	879.42 ± 62.67 ** ##	767.15 ± 77.98 ** ##
TNF-α (fmol/ml)	5.63 ± 1.48	13.16 ± 1.12 **	10.92 ± 0.96 ** ##	9.54 ± 1.18 ** ##

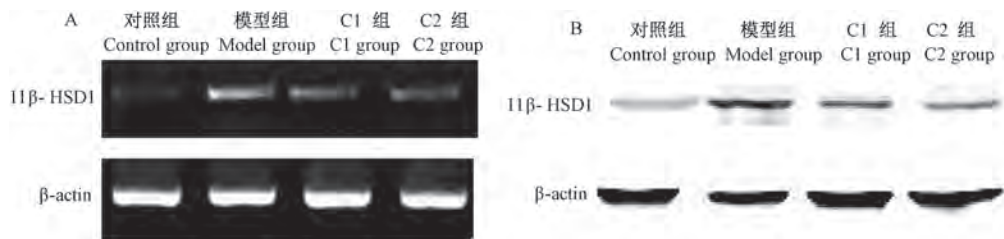
注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下表同)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following table)

表 2 各组大鼠肝生化指标($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Hepatic tissue biochemical parameters of Wistar rats($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

肝组织指标 Hepatic tissue biochemical parameters	对照组 Control group	模型组 Model group	C1 组 C1 group	C2 组 C2 group
HI (mg/g)	23.12 ± 1.13	25.71 ± 1.08 **	24.87 ± 1.26 *	23.83 ± 1.95 #
TC (mmol/gprot)	1.43 ± 0.12	2.11 ± 0.27 **	1.89 ± 0.25 **	1.56 ± 0.21 ##
TG (mmol/gprot)	4.47 ± 0.31	5.70 ± 0.40 **	5.22 ± 0.69 **	4.89 ± 0.34 * ##
FFA (μmol/gprot)	586.68 ± 52.18	1485.68 ± 141.57 **	1047.63 ± 115.82 ** ##	785.53 ± 157.38 ** ##
TNF-α (fmol/mgprot)	9.34 ± 1.78	22.54 ± 1.80 **	19.13 ± 2.34 ** #	16.79 ± 2.01 ** ##



注:A:肝组织 11β-HSD1 基因表达;B:肝组织 11β-HSD1 蛋白表达。

图 2 各组大鼠肝组织 11β-HSD1 基因及蛋白表达

Note. A. The expression of 11β-HSD1 mRNA in liver. B. Western Blot analysis of 11β-HSD1 in liver.

Figure 2 Expression of 11β-HSD1 mRNA and protein in liver of Wistar rats

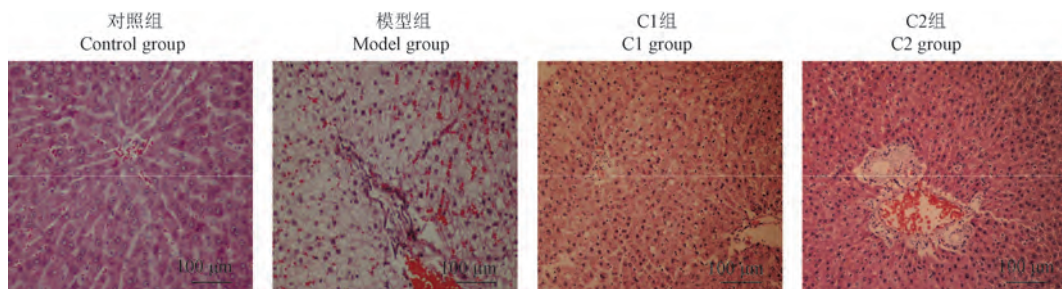


图 3 大鼠肝病理切片

Figure 3 Representative histopathological findings in the liver of Wistar rats

表 3 肝组织切片评分结果

Table 3 Histopathological assessment of steatosis, lobular inflammation, hepatocyte ballooning, portal inflammation and fibrosis

组别 Groups	编号 No.	脂肪变性 Steatosis	脂肪变性类型 Type of steatosis	炎症 Inflammation		气球样变 Hepatocyteballooning	纤维化 Fibrosis
				小叶 Lobular	汇管区 Portal		
对照组 Control group	1	0	—	0	0	0	0
	2	0	—	0	0	0	0
	3	0	—	0	0	0	0
	4	0	—	0	0	0	0
	5	0	—	0	0	0	0
	6	0	—	0	0	0	0
	7	0	—	0	0	0	0
	8	0	—	0	0	0	0
	9	2	m	0	1	1	1
模型组 Model group	10	3	m=M	0	1	2	0
	11	2	m	0	1	2	0
	12	2	m	0	1	2	1
	13	3	m>M	0	1	1	0
	14	1	m	0	1	0	0
	15	1	—	0	0	0	1
	16	2	m	0	1	1	1
	17	1	m	0	0	1	0
	18	2	m=M	0	1	1	1
C1 组 C1 group	19	1	m	0	0	2	0
	20	2	m>M	0	1	0	0
	21	0	—	0	0	0	0
	22	1	m	0	1	2	0
	23	0	—	0	0	0	0
	24	1	m	0	1	1	1
	25	1	m	0	1	1	0
	26	0	—	0	0	0	0
	27	1	m	0	0	0	0
C2 组 C2 group	28	0	—	0	0	0	0
	29	0	—	0	0	0	0
	30	0	—	0	0	0	0
	31	1	m	0	1	1	0
	32	0	—	0	0	0	0

注:m;微泡脂肪变性;m=M;微泡性脂肪变性与大泡性脂肪变性同时存在;m>M;微泡性脂肪变性较多。
Note. m. Microvesicular steatosis. m=M. Macro- and microvesicular steatosis. m>M. Microvesicular rather than macrovesicular steatosis.

3 讨论

NAFLD 是代谢综合征疾病谱中的重要一员,其发病机制尚未完全阐明,但现已证实其发病过程与胰岛素抵抗密切相关^[5]。本研究通过高热量饲料喂养的方式成功复制了大鼠 NAFLD 模型,表现为:肝指数增大、肝功能损伤、血脂紊乱、肝脂质沉积等病理改变,同时胰岛素耐量试验结果及 HOMA-IR 显示大鼠处于胰岛素抵抗状态,这也进一步证实了胰岛素抵抗在 NAFLD 发病机制中的重要作用。截至目前,并没有针对 NAFLD 的特效治疗药物,多采用改善饮食结构、运动等行为方式改变,结合降脂药物、胰岛素增敏剂、抗氧化剂、保肝药物等对症治疗^[7-8]。

姜黄素是从中药姜黄根茎中提取的活性成分,具有广泛的药理活性,可用于治疗炎症、糖尿病、心

血管疾病、代谢综合征、肿瘤等^[9]。近年来,文献报道了关于姜黄素治疗非酒精性脂肪肝的实验研究,但治疗效果及作用机制尚不明确。舒泳翔等^[10]研究发现,姜黄素干预可改善氧化应激水平,抑制炎症因子释放,同时降低肝细胞凋亡水平,从而有效治疗高脂饮食所致的大鼠 NAFLD。吴鹏波等^[11]认为姜黄素可通过上调自噬相关蛋白表达水平,减轻 NAFLD 大鼠肝组织脂质沉积和炎症反应。另外,也有学者认为姜黄素是一种天然的 11β-HSD1 抑制剂,可通过选择性的抑制 11β-HSD1 活性,从而有效改善胰岛素抵抗和肝脂肪性病变^[12-13]。11β-HSD1 是一种低亲和力、NADPH 依赖的微粒体酶,主要在肝、脂肪、骨骼肌和胰腺中表达,在体内可以催化无活性的 17-羟-11 脱氢皮质酮转化为有活性的皮质醇,从而调节内循环中糖皮质激素水平来发挥生理

效应^[14]。11 β -HSDI 与代谢综合征、2 型糖尿病等密切相关,11 β -HSDI 基因敲除后可改善动物胰岛素抵抗,11 β -HSDI 抑制剂有类似效果^[15-16]。本次研究结果显示,姜黄素治疗对高热量饲料引起的大鼠 NAFLD 有显著改善作用,可以降低肝指数,改善肝功能,降低血脂及肝脂质沉积,减少炎症因子的释放,肝组织切片观察结果与指标检测结果吻合。模型组大鼠肝组织 11 β -HSD1 基因及蛋白表达量均显著升高,姜黄素治疗可有效抑制肝组织内的 11 β -HSD1 基因和蛋白表达,改善胰岛素抵抗,且姜黄素高剂量组以上改善作用更为明显。

综上所述,推测姜黄素作为一种选择性 11 β -HSD1 抑制剂,可有效抑制肝组织内的 11 β -HSD1 基因和蛋白表达,增加胰岛素敏感性,进而发挥对 NAFLD 的治疗作用。

参 考 文 献(References)

- [1] 蔡江帆, 陈民利. 非酒精性脂肪肝炎动物模型的研究概况 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 128-136.
Cai JF, Chen ML. Research progress on animal models of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 128-136.
- [2] Jha P, McDevitt MT, Gupta R, et al. Systems analyses reveal physiological roles and genetic regulators of liver lipid species [J]. Cell Syst, 2018, 6(6): 722-733.
- [3] 刘晓晨, 张社峰, 王改凤. 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 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 29-35.
Liu XC, Zhang SF, Wang GF. Effects of aerobic exercise combined with curcumin on diabetic liver lesions and fatty acid β -oxidation in liver [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 29-35.
- [4] 孙红爽, 郑文卿, 刘雯, 等. 急性或慢性应激对高热量饲料喂养大鼠 HPA 轴的影响 [J]. 安徽医药, 2010, 14(1): 17-19.
Sun HS, Zheng WQ, Liu W, et al. Effect of acute or chronic stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in high calorie diet fed rats [J]. Anhui Med Pharm J, 2010, 14(1): 17-19.
- [5] 楼琦, 石巧娟, 郭红刚, 等. 非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及病理变化的动态观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3): 5-11.
Lou Q, Shi QJ, Guo HG. The dynamic observation of lipid metabolism and pathological changes in non-alcoholic fatty liver rats [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(3): 5-11.
- [6] 孙红爽, 卞春城, 马红芳, 等. 高热量饲料结合慢性应激致大鼠非酒精性脂肪肝病变化过程的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(2): 201-208.
Sun HS, Nie CC, Ma HF, et al. The aggravated process of nonalcoholic fatty liver disease induced by the combination of high-fat-sugar diet and chronic stress in rats [J]. J Anhui Agr Univ, 2015, 42(2): 201-208.
- [7] 周宗涛, 邓利明, 胡丽君, 等. 非酒精性脂肪肝药物治疗靶点及药物研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(2): 1363-1374.
Zhou ZT, Deng LM, Hu LJ, et al. Recent advances in research on targets and drugs for treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J New Drugs, 2020, 29(2): 1363-1374.
- [8] 王梦瑶, 黄志军. 非酒精性脂肪肝治疗新药研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(20): 2452-2455.
Wang MY, Huang ZJ. Recent advance in novel drug development for non-alcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2018, 34(20): 2452-2455.
- [9] 严颖, 谭睿陟, 赵长英, 等. 姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型肾纤维化的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 52-58.
Yan Y, Tan RZ, Zhao CY, et al. Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(1): 52-58.
- [10] 舒泳翔, 吴鹏波, 柳健, 等. 姜黄素对实验性大鼠非酒精性脂肪肝病氧化应激、炎症因子及细胞凋亡水平的影响 [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(3): 126-130.
Shu YX, Wu PB, Liu J, et al. Curcumin's effect on the level of oxidative stress, inflammation factors and apoptosis in experimental non-alcoholic fatty liver disease rats [J]. J Med Res, 2016, 45(3): 126-130.
- [11] 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. 姜黄素激活自噬干预非酒精性脂肪肝病模型大鼠氧化应激及炎症反应 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(11): 1720-1725.
Wu PB, Song Q, Yu YJ, et al. Curcumin ameliorates inflammatory reaction and oxidative stress through activation of autophagy in experimental non-alcoholic fatty liver disease rats [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2020, 24(11): 1720-1725.
- [12] Hu GX, Lin H, Lian QQ, et al. Curcumin as a potent and selective inhibitor of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: improving lipid profiles in high-fat-diet-treated rats [J]. PLoS One, 2012, 8(3): e49976.
- [13] Yuan X, Li H, Bai H, et al. The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor protects against the insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 788: 140-151.
- [14] 孙红爽, 卞春城, 马红芳, 等. 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 与胰岛素抵抗及其抑制剂的研究进展 [J]. 中国医师杂志, 2015, 17(8): 1275-1277.
Sun HS, Nie CC, Ma HF, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), insulin resistance and 11 β -HSD1 inhibitors [J]. J Chin Phys, 2015, 17(8): 1275-1277.
- [15] 邹显彤, 纪立农. 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 型在代谢综合征中的作用 [J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(4): 378-380.
Zou XT, Ji LN. The role of 11 β -HSD1 in metabolic syndrome [J]. Chin J Diabetes, 2015, 23(4): 378-380.
- [16] 张晶晶, 蔡金艳, 郭皎. 11 β -羟基类固醇脱氢酶 1 在 2 型糖尿病中的研究进展 [J]. 食品与药品, 2017, 19(2): 142-147.
Zhang JJ, Cai JY, Guo J. Progress on 11 β -hydroxy steroid dehydrogenase type 1 in type 2 diabetes mellitus [J]. Food Drug, 2017, 19(2): 142-147.

[收稿日期] 2021-03-26

王冬冬, 杨利峰, 赵德明, 等. 传染性海绵状脑病果蝇模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 670-674.

Wang DD, Yang LF, Zhao DM, et al. Progress in research into transmissible spongiform encephalopathies using *Drosophila* models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 670-674.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.015

传染性海绵状脑病果蝇模型研究进展

王冬冬, 杨利峰*, 赵德明, 周向梅

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

【摘要】 传染性海绵状脑病又称朊病毒疾病, 是一组能感染人类和动物的致死性传染病, 目前普遍认为是由细胞型朊蛋白(PrP^C)发生错误折叠后形成的致病型朊蛋白(PrP^{Sc})所引起。PrP^{Sc}的生物检测通常是将试验材料接种到哺乳类实验动物的脑组织或腹腔, 在动物表现明显症状时实施安乐死, 整个过程繁琐且耗时, 也越来越容易引起伦理争论。果蝇是低等无脊椎动物, 具有易饲养、生命周期短及繁殖能力强等诸多优点, 通过基因改造等技术可表现哺乳动物海绵状脑病的一些病理学特征。本文综述已发表的文献, 概述了传染性海绵状脑病果蝇模型的构建方法, 以促进果蝇模型的应用, 减少和替代部分高等实验动物使用。

【关键词】 传染性海绵状脑病; 朊病毒; 果蝇; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0670-05

Progress in research into transmissible spongiform encephalopathies using *Drosophila* models

WANG Dongdong, YANG Lifeng*, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Corresponding author: YANG Lifeng. E-mail: yanglf@cau.edu.cn

【Abstract】 Transmissible spongiform encephalopathies, or prion diseases, are a group of fatal neurodegenerative illnesses that affect humans and other mammalian species. All forms of prion disease are associated with misfolding of the host-encoded prion protein, PrP^C, into one of several pathogenic isoforms, collectively termed PrP^{Sc}. The current bioassays for prions typically involve intracerebral or peripheral inoculation of test material into an experimental host and subsequent euthanasia when clinical signs of terminal prion disease become evident. Consequently, bioassays of prion infectivity invertebrate species are cumbersome, time-consuming, expensive, and increasingly open to ethical dispute because the test animals are subjected to terminal neurodegenerative disease. Here, we discuss the development of a *Drosophila*-based prion bioassay, a highly sensitive and rapid invertebrate *in vivo* assay that efficiently identifies mammalian prions and permits the reduction and replacement of sentient experimental animals. This article provides an overview of the methodology involved in the model and discusses the experimental data that describe its viability and usefulness in place of more sentient species.

【Keywords】 transmissible spongiform encephalopathy(TSE); prion; *Drosophila*; animal model

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

[基金项目] 国家自然科学基金(31972641)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(31972641).

[作者简介] 王冬冬(1990—), 男, 博士, 研究方向: 动物传染性海绵状脑病的研究。Email: B20203050401@cau.edu.cn

[通信作者] 杨利峰, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 兽医病理学的教学与研究工作。Email: yanglf@cau.edu.cn

传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSEs), 又称朊蛋白/朊病毒疾病 (prion diseases, PrD) 是一组能够感染人和动物的慢性、致死性、神经退行性传染病^[1-2]。致病型朊蛋白 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) 是 TSEs 的致病因子, 俗称朊病毒, 由细胞型朊蛋白 (cellular prion protein, PrP^C) 错误折叠形成^[3]。在哺乳动物中, PrP^C 是高度保守的朊蛋白基因 (PRNP) 编码的一种糖蛋白, 可能在神经系统、T 细胞信号转导及核酸代谢等方面发挥一定作用; PrP^{Sc} 富含 β 折叠, 可抵抗蛋白酶水解, 有很强的聚合倾向, 最终聚合成淀粉样斑块造成大脑海绵状退化变性。目前 PrP^C 转化为 PrP^{Sc} 的机制并不明确, 成核-多聚化模型 (nucleation-polymerization model) 和再折叠模型 (refolding model) 是描述转化机制的两种假说^[1]。

果蝇 (*Drosophila*) 属于果蝇科果蝇属, 是一类无脊椎动物。黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是果蝇的一种, 其遗传背景清晰、生命周期短、繁殖速度快且饲养成本低, 已广泛用于生命科学研究^[4]。果蝇基因组不含 PRNP, 是 TSEs 疾病研究的理想模型^[5]。本文综述前人利用转基因果蝇对 TSEs 疾病的研究, 以引起研究者的兴趣, 促进果蝇模型的应用, 减少和部分替代哺乳类实验动物的使用。

1 PrP 转基因果蝇构建技术的发展

PrP^{Sc} 与病毒和细菌等传统病原体不同, 因其缺乏核酸为基础的基因组, 不能利用 PCR 等核酸检测方法确定病原。蛋白质错误折叠循环扩增技术 (PMCA) 和实时振荡诱导转换技术 (RT-QuIC) 可以在体外灵敏检测 PrP^{Sc}, 但无法检测其感染性^[6-8]。通过接种哺乳类实验动物进行生物测定是目前检测 PrP^{Sc} 感染性的可靠方法, 但整个测定过程繁琐、耗时、昂贵, 并因动物生命晚期患有神经退行性疾病而越来越容易引起伦理争论^[9-10]。果蝇遗传背景清晰简单, 易于遗传修饰, 利用分子生物学等技术可产生具有组织特异性的转基因表达, 其神经系统相对简单, 但具有一定的完整性和复杂性, 可以完成多种复杂行为, 常用于学习记忆、神经退行性疾病等神经科学研究^[11-12]。通过不断探索和发展果蝇转基因技术, PrP 转基因果蝇已初步应用于 TSEs 的研究, 见表 1。

1.1 基于 P 转座子构建 PrP 转基因果蝇

P 转座子 (P-element) 是果蝇中诱发杂种不育

的转座子, 研究者根据其特性已设计不同载体, 用于基因中断、染色体工程、基因标签和基因表达/抑制等方面的研究^[13]。Raeber 等^[14]利用 P 转座子介导法将叙利亚仓鼠朊蛋白 (SHaPrP) 基因导入果蝇胚系, 在热休克启动子 Hsp70 控制下诱导表达 SHaPrP, 开启了应用果蝇进行 TSEs 疾病研究的先河, 遗憾的是没有产成具有 TSEs 疾病表型的果蝇。后来 Fernandez 等针对上述果蝇未形成 TSEs 疾病表型开展研究, 详见 2.3。

1.2 基于 UAS/GAL4 系统构建转基因果蝇

UAS/GAL4 系统原是存在于酵母中的基因表达调控系统, Brand 等^[15]最先将 UAS/GAL4 系统应用于果蝇。Deleault 等^[16]利用 UAS/GAL 系统将野生型或携带致病突变体 PG14 (14 个八重复序列) 的小鼠朊蛋白 (MoPrP) 基因导入果蝇胚系, 获得了具有 PrP^{Sc} 的高转化率的转基因果蝇, 但没有神经退化表现。Gavin 等^[17]利用 UAS/GAL4 系统获得了在胆碱能神经元特异性表达野生型和突变型 (P101L) MoPrP 的转基因果蝇, 也是第一个具有神经退行性表型和构象变化的成功模型。

1.3 基于 ϕ C31 整合酶系统构建转基因果蝇

Groth 等^[18]将噬菌体 ϕ C31 整合酶系统应用于转基因果蝇的构建, 该系统可介导其 attB 和 attP 识别位点之间的单向位点特异性重组。Murali 等^[19]利用 ϕ C31 整合酶系统将野生型和突变体 (P101L) MoPrP 基因插入同一个 attP 位点, 排除了插入于不同基因区域的影响。野生型 MoPrP 与突变体 (P101L) 转基因的表达水平相当, 但 P101L 在胆碱能神经元的表达能导致细胞表面形成更大的点状沉积物, P101L 转基因果蝇的运动和电生理缺陷都比野生型 MoPrP 转基因果蝇严重。

2 PrP 转基因果蝇应用进展

果蝇已广泛应用于阿尔兹海默症、帕金森病等神经退行性疾病研究, 并获得了相当多的专业知识。因此, 应用 PrP 转基因果蝇研究哺乳动物 TSEs 疾病无明显障碍。

2.1 SHaPrP 转基因果蝇中 PrP 的构象变化

Fernandez 等^[20]构建了 SHaPrP 转基因果蝇, 分析了野生型 PrP 在其体内的动态变化: 在幼龄果蝇中, PrP 表现出正常 PrP^C 的特性; 在老年果蝇中, PrP 错误折叠, 获得 PrP^{Sc} 的生化 and 结构特性, 并诱导脑神经元海绵状变性。由于这种 PrP 构象对蛋白

酶仍然敏感,果蝇不会自发产生朊蛋白/朊病毒(prion),因此,Fernandez-Funez 认为在果蝇中研究 PrP 是相对安全的^[5]。

2.2 MoPrP/SHaPrP/RaPrP 在转基因果蝇中的构象动力学差异

Fernandez 等^[21]构建了第一个表达兔朊蛋白(RaPrP)的转基因果蝇模型,并比较了与 MoPrP 和 ShaPrP 在构象动力学和诱导神经毒性等方面的差异:HaPrP 可以诱导产生海绵状神经退行性变化,并形成高度聚集似羊痒病(scrapie)的错误折叠蛋白;RaPrP 不诱导产生海绵状病理变化,也不会聚集形成错误折叠蛋白;MoPrP 介于上述两者之间,诱导了轻微的神经过行性变化,并积累了少量的似羊痒病的错误折叠蛋白。

2.3 Hsp70 与 PrP 的构象调控

Fernandez 等^[20]在 SHaPrP 转基因果蝇的脑神

经元中过表达 PrP 和 Hsp70,发现 Hsp70 直接与膜结构域中的 PrP 相互作用,可以防止异常蛋白积累和神经元丢失,解释了 Raeber 等^[14]在 1995 年的研究中没能产生 TSEs 表型果蝇的原因。

2.4 PrP 位点突变与致病性的影响

Park 等^[22]通过构建含有人/仓鼠 3F4 表位的 MoPrP^{3F4}转基因果蝇,发现 MoPrP^{3F4}可能是通过引起的氧化和自噬信号改变,增强了多聚谷氨酰胺毒性,造成了果蝇眼部病变。

Thackray 等^[23]构建了绵羊朊蛋白(OvPrP)转基因果蝇,幼虫暴露于羊痒病脑匀浆可加速 OvPrP 的表达,在成年果蝇中表现为运动能力显著降低。通过比较,A¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹(ARQ) PrP 转基因果蝇的寿命不受 OvPrP 的影响,而 V¹³⁶R¹⁵⁴Q¹⁷¹(VRQ) PrP 转基因果蝇的运动活性不受 OvPrP 的影响,这些表型的差异可能是 OvPrP 基因型差异造成^[24]。

表 1 果蝇转基因方法比较

Table 1 Comparison of transgenic methods for *Drosophila*

转基因方法 Transgenic method	方法原理 Principle of the method	方法特点 Characteristics of the method	应用于 TSEs 研究示例 Example of application in TSE research
P 转座子 P-element	通过转座酶,基因片段能在果蝇染色体中进行转移 Through transposase, gene fragments can be transferred in <i>Drosophila</i> chromosomes	果蝇本身的一种转座子,整合进入基因组的基因片段大小受限制,基因插入位置具有随机性 As a transposon of <i>Drosophila</i> , the size of gene fragment integrated into the genome is limited, and the insertion position of gene is random	将 SHaPrP 基因导入果蝇胚系并表达,但未产生 TSEs 疾病表型 ^[14] SHaPrP gene was introduced into <i>Drosophila</i> embryos and expressed, but did not produce TSE disease phenotype
UAS/GAL4 系统 UAS/GAL4 system	Gal4 蛋白可特异性连接到 UAS 序列上,进而引起连接在 UAS 下游的基因被激活表达 Gal4 protein can be specifically linked to the UAS sequence, resulting in the activation and expression of genes linked downstream of UAS	源于酵母中的基因表达调控系统,选用不同的 Gal4 启动子可实现目的基因在不用组织的特异表达 Derived from the gene expression regulation system in yeast, the specific expression of the target gene in tissues can be achieved by selecting different Gal4 promoters.	将 MoPrP 基因导入果蝇胚系,基因在胆碱能神经元中特异表达,产生了具有渐进性退化表型和 PrP 构象变化 ^[17] MoPrP gene was introduced into <i>Drosophila</i> embryos, and the gene was specifically expressed in cholinergic neurons, resulting in progressive degeneration phenotype and PrP conformation change
φC31 整合酶系统 φC31 integrase system	介导 attB 和 attP 识别位点之间的单向位点特异性重组 Integrase can catalysis the homologous recombination between the site attB and the site attP	源于噬菌体,可将转基因结构整合到特定位点,其介导的基因片段大于 P 转座子 Derived from bacteriophage, the transgenic structure can be integrated into a specific site, and the gene fragment mediated is larger than P-element	建立了两种 MoPrP 基因果蝇模型,两种基因在同一位点表达,排除插入于不同基因区域的影响 ^[19] Two <i>Drosophila</i> models of MoPrP gene were established which genes were expressed at the same site, excluding the effect of insertion in different gene regions
CRISPR/Cas9 基因编辑技术 CRISPR/Cas9 genome editing system	在 sgRNA 的引导下,Cas9 蛋白到达靶标区域进行基因编辑 Under the guidance of sgRNA, Cas9 protein reaches the target region for gene editing	源于细菌和古细菌免疫系统,可实现基因的敲入和敲除 Derived from the immune system of bacteria and archaea, gene knock-in and knock-out can be realized.	暂无 None for the time being

Thackray 等^[25]还通过 RNA-Seq 转录组测序对 OvPrP 转基因果蝇进行分析,发现细胞周期活动异常、蛋白质合成抑制和线粒体功能改变,这与哺乳动物感染 TSEs 疾病相类似。

PrP 的第 159 位天冬氨酸位点(D159)是在犬类动物中发现的特殊氨基酸位点,能保护犬类动物免受 TSEs 感染^[26]。Sandez 等^[27]在 MoPrP 转基因果蝇上进行了 N159D 突变,证实了单一位点 D159 的替换足以防止 PrP 构象变化和致病性产生。

2.5 OvPrP 转基因果蝇的传染性

Thackray 等^[28]证明,OvPrP 转基因果蝇可以表现出哺乳动物 PrP^{Sc} 抗蛋白酶 K(PK)的显著特征。小鼠接种了成年转基因果蝇脑匀浆后,最终可表现 TSEs 症状;转基因果蝇幼虫暴露于成年转基因果蝇脑匀浆,该幼虫在成年时也表现出等同于暴露于羊痒病脑匀浆的症状^[29]。

3 结语

果蝇具有易饲养、生命周期短、繁殖能力强等诸多优点,已成为生命科学领域重要的模式生物,与之相关的研究也多次获得诺贝尔奖。基于 P 转座子、UAS/GAL4 系统以及 φ C31 整合酶系统等技术的优化、联合和改进,PrP 转基因果蝇构建的效率和准确性得到巨大提升。表达哺乳动物 PrP 的转基因果蝇模型在揭示 PrP 生理学功能方面得到初步应用,推动了 TSEs 疾病的研究进程。近些年,CRISPR/Cas9 基因编辑技术快速发展,已在果蝇上得到利用,可实现简便、特异、高效、经济的基因编辑,但未见文献报道用于 TSEs 疾病研究。展望未来,将果蝇 CRISPR/Cas9 基因编辑技术应用于 PrP 转基因模型构建,将积极推进 TSEs 疾病的致病机制及防控探究,并减少或替代部分哺乳类实验动物的使用,符合实验动物福利伦理及 3R 原则。

参 考 文 献(References)

- [1] 赵德明. 传染性海绵状脑病 [M]. 北京: 中国农业大学出版社; 2012.
- [2] Zhang X, Zhao D, Wu W, et al. Melatonin regulates mitochondrial dynamics and alleviates neuron damage in prion diseases [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11): 11139–11151.
- [3] Wu W, Zhao D, Shah SZA, et al. OPA1 overexpression ameliorates mitochondrial cristae remodeling, mitochondrial dysfunction, and neuronal apoptosis in prion diseases [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(10): 710.
- [4] 刘志勇. 果蝇作为学习记忆实验动物模型的研究回顾 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2): 108–111.
- [5] Liu ZY. Review on learning and memory model of *Drosophila* [J]. Chin J Comp Med, 2005, 15(2): 108–111.
- [6] Fernandez FP, Sanchez GJ, Rincon LDE. *Drosophila* models of prionopathies: insight into prion protein function, transmission, and neurotoxicity [J]. Curr Opin Genet Dev, 2017, 44: 141–148.
- [7] Cheng K, Vendramelli R, Sloan A, et al. Endpoint quaking-induced conversion: a sensitive, specific, and high-throughput method for antemortem diagnosis of creutzfeldt-jacob disease [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(7): 1751–1754.
- [8] Yoshioka M, Matsuura Y, Okada H, et al. Rapid assessment of bovine spongiform encephalopathy prion inactivation by heat treatment in yellow grease produced in the industrial manufacturing process of meat and bone meals [J]. BMC Vet Res, 2013, 9: 134.
- [9] Thackray AM, Andréoletti O, Bujdosó R. The use of PrP transgenic *Drosophila* to replace and reduce vertebrate hosts in the bioassay of mammalian prion infectivity [J]. F1000Res, 2018, 7: 595.
- [10] Ascari LM, Rocha SC, Goncalves PB, et al. Challenges and advances in antemortem diagnosis of human transmissible spongiform encephalopathies [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2020, 8: 585896.
- [11] Kramm C, Soto P, Nichols TA, et al. Chronic wasting disease (CWD) prion detection in blood from pre-symptomatic white-tailed deer harboring PRNP polymorphic variants [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 19763.
- [12] 唐润东, 宋思远, 吴薇. 饮食中糖分控制对雌黑腹果蝇寿命和中肠干细胞的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2): 118–123.
- [13] Tang RD, Song SY, Wu W. Effect of sugar concentration control on the longevity and the mid-gut stem cells of female *Drosophila melanogaster* [J]. Lab Anim Comp Med, 2019, 39(2): 118–123.
- [14] 杨文静, 赵勇. 实验动物在神经科学领域中的应用 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(3): 37–45.
- [15] Yang WJ, Zhao Y. Application of laboratory animals in neuroscience [J]. Lab Anim Sci, 2016, 33(3): 37–45.
- [16] Bachmann A, Knust E. The use of P-element transposons to generate transgenic flies [J]. Methods Mol Biol, 2008, 420: 61–77.
- [17] Raeber AJ, Muramoto T, Kornberg TB, et al. Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic *Drosophila melanogaster* [J]. Mech Dev, 1995, 51(2–3): 317–327.
- [18] Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes [J]. Development, 1993, 118(2): 401–415.
- [19] Deleault NR, Dolph PJ, Feany MB, et al. Post-transcriptional

- suppression of pathogenic prion protein expression in *Drosophila* neurons [J]. J Neurochem, 2003, 85(6): 1614–1623.
- [17] Gavin BA, Dolph MJ, Deleault NR, et al. Accelerated accumulation of misfolded prion protein and spongiform degeneration in a *Drosophila* model of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome [J]. J Neurosci, 2006, 26(48): 12408–12414.
- [18] Groth AC, Fish M, Nüsse R, et al. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕ C31 [J]. Genetics, 2004, 166(4): 1775–1782.
- [19] Murali A, Maue RA, Dolph PJ. Reversible symptoms and clearance of mutant prion protein in an inducible model of a genetic prion disease in *Drosophila melanogaster* [J]. Neurobiol Dis, 2014, 67: 71–78.
- [20] Fernandez FP, Casas TS, Zhang Y, et al. *In vivo* generation of neurotoxic prion protein; role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms [J]. PLoS Genet, 2009, 5(6): e1000507.
- [21] Fernandez FP, Zhang Y, Casas TS, et al. Sequence-dependent prion protein misfolding and neurotoxicity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(47): 36897–36908.
- [22] Park Y, Kim W, Kim AY, et al. Normal prion protein in *Drosophila* enhances the toxicity of pathogenic polyglutamine proteins and alters susceptibility to oxidative and autophagy signaling modulators [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(2): 638–645.
- [23] Thackray AM, Muhammad F, Zhang C, et al. Ovine PrP transgenic *Drosophila* show reduced locomotor activity and decreased survival [J]. Biochem J, 2012, 444(3): 487–495.
- [24] Thackray AM, Muhammad F, Zhang C, et al. Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Exp Mol Pathol, 2012, 92(2): 194–201.
- [25] Thackray AM, Lam B, Shahira Binti Ab Razak A, et al. Transcriptional signature of prion-induced neurotoxicity in a *Drosophila* model of transmissible mammalian prion disease [J]. Biochem J, 2020, 477(4): 833–852.
- [26] Khan MQ, Sweeting B, Mulligan VK, et al. Prion disease susceptibility is affected by beta-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(46): 19808–19813.
- [27] Sanchez GJ, Jensen K, Zhang Y, et al. A single amino acid (Asp159) from the dog prion protein suppresses the toxicity of the mouse prion protein in *Drosophila* [J]. Neurobiol Dis, 2016, 95: 204–209.
- [28] Thackray AM, Di Y, Zhang C, et al. Prion-induced and spontaneous formation of transmissible toxicity in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Biochem J, 2014, 463(1): 31–40.
- [29] Thackray AM, Andreoletti O, Bujdoso R. Mammalian prion propagation in PrP transgenic *Drosophila* [J]. Brain, 2018, 141(9): 2700–2710.

[收稿日期] 2020-12-22

侯丽雅,李欣悦,白琳. 窖蛋白-1 在衰老中的作用和信号通路 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 675-680.
Hou LY, Li XY, Bai L. Role and signaling pathway of Caveolin-1 in aging [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 675-680.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.016

窖蛋白-1 在衰老中的作用和信号通路

侯丽雅,李欣悦,白琳*

(国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京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】 衰老是生物随着时间的推移而自发的必然过程,并会导致与衰老相关的疾病发展,老年疾病的增加使得社会医疗负担加重,因此寻找衰老相关疾病的治疗靶点是衰老生物学重要的研究方向。窖蛋白-1 (Caveolin-1, Cav-1) 是胞膜窖的重要结构蛋白,参与细胞信号转导、胆固醇平衡、迁移和衰老等许多过程。众多研究表明, Cav-1 在介导和调节衰老中发挥重要的功能,本文总结分析了 Cav-1 在细胞衰老、机体衰老和不同物种衰老中的作用,同时对 Cav-1 调节衰老的 p53/p21、生长因子受体、ROS、K-RAS 等上下游分子作了综述,可能为衰老及衰老相关疾病提供潜在的治疗靶点。

【关键词】 窖蛋白-1;衰老;信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0675-06

Role and signaling pathway of Caveolin-1 in aging

HOU Liya, LI Xinyue, BAI Lin*

(NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, CAMS&PUMC; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: BAI Lin. E-mail: bailin49@163.com

【Abstract】 Aging is an inevitable process in organisms that proceeds spontaneously over time and leads to the development of aging-related diseases. The increase of senile diseases adds to the medical burden of society. Therefore, an important research direction in aging biology is to find therapeutic targets for aging-related diseases. Caveolin-1 (Cav-1) is an important structural protein of caveolin, which is involved in many cellular processes, such as signaling transduction, cholesterol balance, migration and aging. Numerous studies have shown that Cav-1 plays an important role in mediating and regulating aging. This article reviews the role and signaling pathways of Cav-1 in aging and potential therapeutic targets for aging and aging-related diseases.

【Keywords】 Caveolin-1; aging; signaling pathway

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

衰老是一个复杂的多因素过程,其特征是退化过程的积累,涉及分子途径内的多种变化和破坏,衰老产生机制包括 DNA 损伤、活性氧 (ROS) 累积、分泌表型的变化等,这些过程不仅发生在细胞和分

子水平,也发生在组织和器官系统^[1]。衰老的本质是一种细胞反应,表现为细胞周期停滞、炎性介质的分泌以及其他表型改变^[1-2]。衰老细胞随着年龄的增长在组织中逐渐积累,并导致衰老和相关的疾

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (31672374),北京自然科学基金面上项目 (5202024)。

Funded by the National Science Foundation of China(31672374), Beijing Natural Science Foundation(5202024)。

【作者简介】 侯丽雅 (1998—),女,硕士研究生,研究方向:细胞生物学。Email: houliya1998@163.com

【通信作者】 白琳 (1984—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:干细胞治疗。Email: bailin49@163.com

病发展,例如癌症、II 型糖尿病及动脉粥样硬化等^[3]。

胞膜窖作为细胞膜的重要成分,对于衰老信号的应激、转导都有重要的作用。研究表明窖蛋白-1 在调节衰老的过程中发挥重要作用^[4]。目前已有众多研究表明窖蛋白-1 在不同组织器官、不同细胞系中影响衰老并调节相关信号通路,然而其对调节衰老的作用和信号通路各不相同。因此,本文概述了窖蛋白-1 的结构和功能,从细胞、组织、器官和整体水平综述了窖蛋白-1 在衰老中的作用和调节机制,可能为治疗衰老及相关疾病提供潜在的靶点。

1 窖蛋白-1 的结构及功能

胞膜窖(caveolae)又称小窝,是存在于许多哺乳动物细胞膜表面上的瓶颈状内陷,具有特殊的脂筏结构,含有丰富的胆固醇、鞘磷脂以及许多跨膜蛋白,与细胞信号转导、脂质调节以及内吞作用等许多功能有关^[5]。目前已鉴定出 3 种哺乳动物的窖蛋白,分别是窖蛋白-1、窖蛋白-2 及窖蛋白-3,它们在不同的组织细胞中表达^[6]。其中对窖蛋白-1 的结构和功能研究最为广泛,众多研究表明其在衰老中发挥重要作用^[7]。

窖蛋白-1(Caveolin-1, Cav-1)是胞膜窖的标志性支架蛋白,分子量为 22×10^3 ,在许多细胞类型中表达,包括脂肪细胞、内皮细胞和成纤维细胞等^[8]。Cav-1 在细胞膜上形成发夹结构,其蛋白序列包含四个结构域:(1)NH2 末端结构域;(2)能够识别胆固醇并与之相互作用的共有序列(CRAC),以及泛素化位点的支架结构域(CSD;第 82-101 位残基);(3)与膜脂质相互作用的膜结构域;(4)具有三个棕榈酰化位点的 COOH-末端结构域^[4]。其 N 端和 C 端两个末端结构域都保留在细胞质中,支架结构域(CSD)序列可结合许多不同的信号分子并影响细胞信号转导,例如与 Src 家族蛋白、表皮生长因子(EGF)受体、异源三聚体 G 蛋白、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 等相互作用^[9]。除此以外,Cav-1 在维持胞膜窖的形成和稳定性、胞吐和胞吞、平衡胆固醇、脂质代谢、线粒体功能、增殖、迁移和衰老等方面也具有重要作用^[4,9]。

2 Cav-1 在衰老中的作用

Cav-1 在调控衰老的过程中发挥重要作用。对

Cav-1 在动物方面的研究包括在小鼠、大鼠、线虫、蠕虫等多种动物上。动物研究表明,老年大鼠的脑、脾、肺^[10]、老年小鼠骨骼肌^[11]中均显示出 Cav-1 的大量增加,表明 Cav-1 与衰老相关。Head 等^[12]还发现 Cav-1 敲除(KO)的年轻小鼠表现出神经元过早衰老和退化的迹象。Razani 等^[13]观察到 Cav-1 KO 小鼠在进入老年后体重显著降低,这表明缺乏 Cav-1 的小鼠可能在神经发育、脂质代谢或脂肪细胞功能方面存在问题;小鼠缺乏 Cav-1 与多种表型有关,如肺和心脏缺陷、血管异常、动脉粥样硬化、代谢障碍和癌症^[14-15]。与此结果相反的是,Cav-1 表达减少会延长秀丽隐杆线虫的寿命^[16]。用 Cav-1 RNAi 细菌处理无菌的 CF512 蠕虫,发现 Cav-1 的敲除导致寿命延长^[16],这种相反的结论还没有找到科学的解释。

在细胞水平,Cav-1 在不同细胞系、衰老细胞以及过表达、敲除、敲降细胞系等方面均有研究。Hayflick 等^[17]观察到人类二倍体成纤维细胞在有限数量的细胞分裂后永久停止分裂,在细胞周期的 G1 期变得不可逆性停滞。因此对细胞衰老的定义为体细胞不可逆的细胞周期停滞(大多数肿瘤细胞和某些干细胞除外),并能分泌过多的炎症介质和生长因子,从而改变衰老细胞的微环境^[4]。Park 等^[10]发现衰老的人二倍体成纤维细胞中 Cav-1 表达上调,并与 EGFR 共定位。虽然衰老细胞中的 Cav-1 水平较高,但通过降低 Cav-1 的水平可以逆转衰老表型,在衰老细胞中敲除 Cav-1 可导致细胞呈年轻状态的形态变化,导致它们变小和呈纺锤形^[18]。Yu 等^[19]针对不同细胞系中 Cav-1 的表达进行了研究,在 A549 人肺癌细胞、H460 人肺癌细胞中、HCT116 人结直肠癌细胞以及人二倍体成纤维细胞(HDFs)中敲降 Cav-1 后,发现这些细胞系均表现衰老,其细胞增殖能力和集落形成能力均显著降低。Cav-1 敲降不仅阻止了 G1 期的细胞周期,还显著升高了另外两个 G1 期阻滞标记 p53 和 p21 的表达。Yang 等^[20]同样表明 Cav-1 敲降会诱导人大肠癌细胞的衰老样形态变化,并阻止其在体外和体内的细胞生长。此外,早有研究表明 Cav-1 的过表达在小鼠成纤维细胞的原代培养物中会诱导细胞早衰^[21]。因此,Cav-1 的过度表达和强烈抑制都会导致细胞过早衰老,而正常的细胞功能可通过 Cav-1 表达的正常化来恢复。严重的 Cav-1 缺乏在某些细胞类型中会导致早衰,这种效应与线粒体功能障碍有

关^[19]。Cav-1 的过度表达抑制了包括血管平滑肌细胞在内的各种细胞的生长,这是进入衰老终末状态的前奏^[20,22]。

在人的大脑皮层中^[23]、前列腺平滑肌以及上皮^[24]中发现 Cav-1 的表达随着年龄的增长而升高。Kruglikov 等^[25]发现 Cav-1 的表达随着皮肤的老化逐渐上升,并且伴随着皮肤中透明质酸含量下降以及胶原蛋白表达的减少。Powter 等^[26]发现 Cav-1 还参与血管的衰老表型和炎症反应。这些结果表明,Cav-1 在老年人的多种器官、组织中表达上调,表明其在衰老中的关键调控作用。阿尔茨海默病是衰老相关疾病,阿尔茨海默病患者海马的 Cav-1 蛋白水平和额叶皮质 Cav-1 基因水平增加^[27]。此外,在 Cav-1 对早衰的研究中,Xin 等^[28]发现 Cav-1 通过 p53 途径介导高糖诱导的人肾小球系膜细胞衰老,阻断 Cav-1 能够显著降低细胞衰老,为治疗肾功能衰竭提供了新的靶点。

3 Cav-1 衰老相关通路

细胞衰老可能由多种因素引起,氧化应激是造成细胞衰老的一个主要原因。氧化应激造成的 DNA 损伤导致细胞周期停滞,加速衰老的开始,即为早衰。氧化应激与衰老理论表明,衰老细胞的积累导致衰老相关的功能丧失。氧化应激诱导衰老的确切机制仍不清楚,但可能通过增加活性氧(ROS)的水平导致细胞衰老,可以阻止细胞增殖以响应复制过程中发生的损坏^[29]。衰老细胞获得不可逆的衰老相关分泌表型,例如导致衰老的 p53/p21 途径的调节、NF- κ B 活性增加、叉头蛋白 O (FoxO) 蛋白活性的抑制、胰岛素/胰岛素样生长因子 1(IGF1)介导的对氧化应激的保护、分泌大量炎症因子等^[30]。

3.1 Cav-1 与 p53/p21 途径

p53/p21 通路的激活是 Cav-1 促进衰老的关键信号。在小鼠胚胎成纤维细胞中,Cav-1 缺乏通过 p53/p21 途径诱导细胞衰老^[19];在髓核细胞中,Cav-1 同样通过体外 p53/p21 信号通路调节氧化应激诱导的细胞衰老^[30]。

Cav-1 过表达诱导早衰并激活 p53 途径,Cav-1 通过支架结构域直接与信号中间体结合,从而激活 p53 肿瘤抑制蛋白,p53 负调控子 Mdm2 具有 Cav-1 结合基序,并被 Cav-1 隔离胞膜窖中,限制其与 p53 的相互作用,从而稳定 p53 并使得下游蛋白 p21 表

达上调,导致细胞周期停滞和早衰^[31]。因此,Cav-1 表达通过 p53/p21^{Waf1/Cip1} 依赖机制诱导 G0/G1 期阻滞而负调节细胞周期进程^[32]。

共济失调毛细血管扩张症突变激酶(ATM)是应激诱导的 p53 和 p53 信号通路的关键调节因子^[33]。Cav-1 在氧化应激后通过将蛋白磷酸酶 2A (PP2A)的催化亚单元——ATM 隔绝到胞膜窖中来激活 ATM,ATM 磷酸化并激活 p53。PP2A 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶的保守磷酸蛋白磷酸酶家族,调节多种细胞过程^[34]。PP2A 是由催化性 C 亚基(PP2A-C)、支架 A 亚基(PP2A-A)和调节性 B 亚基(PP2A-B)组成的全酶。Volonte 等^[35]的研究表明,吸烟可导致 Cav-1 的表达增加,进而激活 ATM,激活 p53,上调 p21^{Waf1/Cip1},从而诱导肺成纤维细胞的细胞衰老,发展成肺气肿,较为清晰地阐明了 Cav-1/p53/p21 诱导衰老的途径(图 1a)。

此外,研究表明聚合酶 I 和转录释放因子(PTRF)通过 Cav-1/p53/p21 途径诱导造血干细胞衰老^[36]。PTRF 可作为胞膜窖的外壳蛋白。PTRF 通过 p53/p21 和 Cav-1 途径调节细胞衰老(图 1a),PTRF 过表达诱导了细胞衰老,PTRF 表达减少则延长了细胞的复制寿命,Cav-1 似乎受 PTRF 磷酸化的调节^[37],然而其内在确切机制仍需要进一步探究。

Cav-1 激活 p53/p21 途径并诱导早衰,这是由于其能够直接与 Mdm2、PP2A-C、Sirt1 等相互作用,并在氧化应激后将其隔离到胞膜窖中^[4]。Mdm2 是 p53 的负调节因子,促进 p53 降解。Mdm2 在胞膜窖中的隔离导致 Mdm2 活性的抑制,p53 表达的稳定和早衰^[31]。PP2A 是体内自动磷酸化和活性的负调节因子。氧化应激后,Cav-1 介导的 PP2A-C 在胞膜窖中的定位抑制了 PP2A,促进 p53 的 ATM 依赖性磷酸化/活化,从而诱导细胞衰老^[35]。Sirt1 是一种Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,调节多种细胞过程,包括细胞衰老。氧化应激促进 Sirt1 与 Cav-1 相互作用,使 Sirt1 失活,进而导致 p53 乙酰化/活化和诱导早衰^[38]。因此,p53/p21 途径被激活导致细胞衰老^[39]。

p53/p21 途径的激活还可以通过多种机制发生。除上述之外还有很多,例如致癌相关蛋白 K-Ras、氧化低密度脂蛋白(oxLDL)、博莱霉素、高糖、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、胰岛素/IGF-1 途径通过 Cav-1 介导的信号转导诱导衰老(图 1b)。最近的研究还表明胰岛素/IGF-1 信号调节窖蛋白可调节秀丽隐杆线虫的衰老^[40]。最后,由 Cav-1 激

活的黏附斑激酶(FAK)和 GTPases 促进衰老细胞典型的形态学改变。氧化低密度脂蛋白(oxLDL)上调 Cav-1 的表达,并促进 NADPH 氧化酶亚单位 p47phox 向巨噬细胞膜窝的移位/激活,导致 ROS 依赖性衰老表型的发展^[41]。

3.2 Cav-1 与生长因子受体

Cav-1 与生长因子受体(如表皮生长因子和胰岛素受体)以及其他信号分子(如蛋白激酶 A、Src 激酶等)相互作用,导致这些蛋白质的活性大多受到负调节^[20,40]。胰岛素/PI3K(磷酸肌醇 3-激酶)/PKB(蛋白激酶 B)(又称 Akt)途径是调节多种细胞功能和过程的主要信号途径^[42]。FoxO 转录因子是线虫转录因子 DAF-16(衰老加速因子 16)的人类同源物,含有翼螺旋结构域的蛋白质,受胰岛素/PI3K/PKB 信号级联的直接控制。研究表明 FoxO 通过与 Cav-1 启动子区域的直接结合介导 Cav-1 对生长因子信号的内源性调节,并且这种调节方式与细胞周期无关^[43]。蛋白激酶 B(PKB)磷酸化使得 FoxO 家族转录因子失活。当激活时,FoxO 因子可与 Cav-1 启动子序列中的 DNA 结合,随后调节基因表达;在基因和蛋白质水平上过度表达 FoxO 因子,Cav-1 的表达增加;激活的 Cav-1 介导表皮生长因子(EGF)诱导的信号减弱,FoxO 对 Cav-1 的上调部分导致 EGF 诱导的 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)磷酸化,从而使得 MAPK 活性明显下调(图 1c)。然而,这种衰老表型可以通过降低 Cav-1 的表达水平来逆转^[43-44],这表明这种衰老状态是可逆的表型。

此外,Cav-1 的过表达可能通过抑制 EGF 诱导的 EGFR 介导的 Raf/MEK 激酶 ERK 激酶(MEK)/ERK(Raf-MEK-ERK)通路的信号转导^[20](图 1c)。Cav-1 表达的下调激活体内 MEK 和 ERK 的信号,可能是通过提前释放激活的 ERK-1/2 和 p42/44 MAP 激酶的其他成分级联到胞质溶胶中^[20]。Cav-1 过表达抑制 EGF 的表达,从而抑制下游 EGFR 介导的 Raf-MEK-ERK 信号通路^[14,20]。

3.3 Cav-1 与其他信号分子

Cav-1 参与衰老和细胞周期停滞的基因转录中存在许多细胞类型依赖性控制,其调控机制较为复杂。最近有文献表明衰老相关基因 PAI-1 调控 Cav-1 介导的衰老相关信号通路(TGF- β 1/Src 激酶/p53)的分子机制,进一步阐明 Cav-1 相关的衰老通路^[22]。除此之外,氧化应激可通过 p38/MAPK/Sp1 介导的两个富含 GC 的启动子元件的激活来刺激 Cav-1 基因转录,从而诱导早衰(图 1d),该途径在表达 Cav-1 的正常上皮细胞中有活性,但在不表达 Cav-1 并在氧化应激后发生凋亡的 MCF-7 乳腺癌细胞中没有活性,因此 Cav-1 可能作为控制氧化应激的乳腺癌细胞中衰老和凋亡细胞程序的转换^[45]。

衰老细胞通常会伴随着不可逆的衰老相关分泌表型,例如炎症因子的释放。NF- κ B 是一种驱动衰老的重要转录因子,在对炎症、遗传毒性和氧化应激的反应中被激活。高浓度 ROS 促进 NF- κ B 的激活,而 NF- κ B 可以通过上调 Cav-1 的表达介导衰老的信号通路^[46](图 1d)。

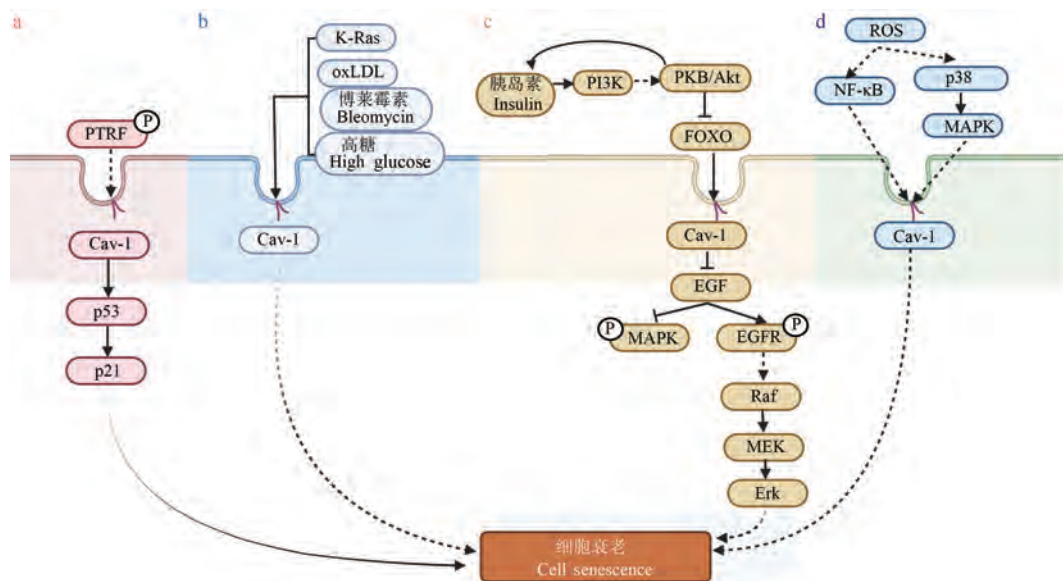


图 1 Cav-1 介导细胞衰老的相关通路

Figure 1 Cav-1 related pathways that mediate cell senescence

4 讨论

综上, Cav-1 在调控衰老的过程中发挥重要作用。对 Cav-1 在动物水平研究中, 大部分研究表明在老年动物中 Cav-1 表达上调, Cav1 过表达会诱导早衰, Cav-1 缺乏将导致衰老相关的多种疾病, 然而也有部分研究结果与之相反, 主要集中在线虫, Cav-1 表达减少会延长线虫的寿命, 推测这可能是由于不同物种间基因表达差异导致的相反结论。在人类的多种器官及组织中, Cav-1 表达上调, 并伴随着年龄相关疾病的发展, 提示 Cav-1 的研究对于延缓衰老、治疗衰老相关疾病发挥潜在作用。研究表明 Cav-1 是细胞衰老的主要调节因子^[4]。其过表达或抑制均会产生衰老的相关表型。关于 Cav-1 在细胞衰老过程中的作用, 同样会出现一些自相矛盾的观察, 例如, 尽管线粒体功能障碍会导致衰老, 然而 Cav-1 缺乏能够防止活性氧诱导的细胞衰老^[19]。这种悖论出现已久, 可能是 Cav-1 在不同细胞类型或者不同应激或衰老诱导剂中发挥的作用不同所导致, Yu 等^[19]的研究与此推测一致, 虽然 Cav-1 的减少和增加都与早衰有关, 大部分研究表明这与氧化应激诱导有关, 但 Cav-1 缺乏是通过一种活性氧非依赖性途径诱导细胞衰老, Cav-1 缺乏通过激活 p53-p21 途径诱导细胞衰老, 并损害线粒体呼吸, 导致 SIRT1 失活。

Cav-1 介导的细胞衰老通路较为复杂, 目前仅现冰山一角。本文主要介绍了 Cav-1 调控衰老的几条关键通路, 如 p53/p21 途径、胰岛素/PI3K/PKB/FoxO 途径、p38MAPK 途径、NF- κ B 途径等。Cav-1 介导的细胞衰老通路仍没有确切的全部机制, 有一些通路之间的关联及分子机制尚不明确, 因此, 对于 Cav-1 介导的细胞衰老相关通路仍需要进一步探究。

参 考 文 献 (References)

- [1] da Costa JP, Vitorino R, Silva GM, et al. A synopsis on aging-theories, mechanisms and future prospects [J]. Ageing Res Rev, 2016, 29: 90-112.
- [2] McHugh D, Gil J. Senescence and aging: causes, consequences, and therapeutic avenues [J]. J Cell Biol, 2017, 217(1): 65-77.
- [3] Dudău M, Codrici E, Tanase C, et al. Caveolae as potential hijackable gates in cell communication [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 581732.
- [4] Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence [J]. Cancer Metastasis Rev, 2020, 39(2): 397-414.
- [5] Williams TM, Lisanti MP. The caveolin proteins [J]. Genome Biol, 2004, 5(3): 214.
- [6] Parton RG. Caveolae and caveolins [J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(4): 542-548.
- [7] Nguyen KC, Cho KA. Versatile functions of caveolin-1 in aging-related diseases [J]. Chonnam Med J, 2017, 53(1): 28-36.
- [8] Low JY, Nicholson HD. Epigenetic modifications of caveolae associated proteins in health and disease [J]. BMC Genet, 2015, 26: 71.
- [9] Baker N, Tuan RS. The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(4): 90-90.
- [10] Park WY, Park JS, Cho KA, et al. Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20847-20852.
- [11] Oh YS, Khil LY, Cho KA, et al. A potential role for skeletal muscle caveolin-1 as an insulin sensitivity modulator in ageing-dependent non-obese type 2 diabetes: studies in a new mouse model [J]. Diabetologia, 2008, 51(6): 1025-1034.
- [12] Head BP, Peart JN, Panneerselvam M, et al. Loss of Caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15697.
- [13] Razani B, Combs TP, Wang XB, et al. Caveolin-1-deficient mice are Lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities [J]. J Biol Chem, 2002, 277(10): 8635-8647.
- [14] Hou K, Li S, Zhang M, et al. Caveolin-1 in autophagy: A potential therapeutic target in atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2021, 513(6801): 25-33.
- [15] Shao S, Qin T, Qian W, et al. Cav-1 ablation in pancreatic stellate cells promotes pancreatic Cancer growth through Nrf2-Induced shh signaling [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1868764.
- [16] Roitenberg N, Bejerano SM, Bocholez H, et al. Modulation of caveolae by insulin/IGF-1 signaling regulates aging of Caenorhabditis elegans [J]. EMBO Rep, 2018, 19(8): e45673.
- [17] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1961, 25(3): 585-621.
- [18] Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, et al. Morphological adjustment of senescent cells by modulating Caveolin-1 status [J]. J Biol Chem, 2004, 279(40): 42270-42278.
- [19] Yu DM, Jung SH, An HT, et al. Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction [J]. Aging Cell, 2017, 16(4): 773-784.
- [20] Yang J, Zhu T, Zhao R, et al. Caveolin-1 Inhibits proliferation, migration, and invasion of human colorectal cancer cells by suppressing phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 332-341.
- [21] Volonte D, Zhang K, Lisanti MP, et al. Expression of Caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of

- murine fibroblasts [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13 (7): 2502–2517.
- [22] Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, et al. The TGF- β 1/p53/PAI-1 signaling axis in vascular senescence: role of caveolin-1 [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 341.
- [23] Kang MJ, Chung YH, Hwang CI, et al. Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(2): 126–133.
- [24] Herbert Z, Bötticher G, Aschoff A, et al. Changing caveolin-1 and oxytocin receptor distribution in the ageing human prostate [J]. *Anat Histol Embryol*, 2007, 36(5): 361–365.
- [25] Kruglikov IL, Zhang Z, Scherer PE. Caveolin-1 in skin aging-From innocent bystander to major contributor [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55: 100959.
- [26] Powter EE, Coleman PR, Tran MH, et al. Caveolae control the anti-inflammatory phenotype of senescent endothelial cells [J]. *Ageing Cell*, 2015, 14(1): 102–111.
- [27] Gaudreault SB, Dea D, Poirier J. Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25 (6): 753–759.
- [28] Xin F, Wei G, Yao L. Caveolin-1 is involved in high glucose accelerated human glomerular mesangial cell senescence [J]. *Korean J Intern Med*, 2017, 32(5): 883–889.
- [29] Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 757–772.
- [30] Ding L, Zeng Q, Wu J, et al. Caveolin-1 regulates oxidative stress-induced senescence in nucleus pulposus cells primarily via the p53/p21 signaling pathway *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9521–9527.
- [31] Bartholomew JN, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (7): 2878–2886.
- [32] Galbiati F, Volonté D, Liu J, et al. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21 (WAF1/Cip1)-dependent mechanism [J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(8): 2229–2244.
- [33] Hwang SY, Kuk MU, Kim JW, et al. ATM mediated-p53 signaling pathway forms a novel axis for senescence control [J]. *Mitochondrion*, 2020, 55: 54–63.
- [34] Wlodarchak N, Xing Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016, 51(3): 162–184.
- [35] Volonte D, Kahkonen B, Shapiro S, et al. Caveolin-1 expression is required for the development of pulmonary emphysema through activation of the ATM-p53-p21 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(9): 5462–5466.
- [36] Bai L, Lyu Y, Shi G, et al. Polymerase I and transcript release factor transgenic mice show impaired function of hematopoietic stem cells [J]. *Ageing (Albany NY)*, 2020, 12(20): 20152–20162.
- [37] Bai L, Deng X, Li J, et al. Regulation of cellular senescence by the essential caveolar component PTRF/Cavin-1 [J]. *Cell Res*, 2011, 21(7): 1088–1101.
- [38] Volonte D, Zou H, Bartholomew JN, et al. Oxidative stress-induced inhibition of Sirt1 by caveolin-1 promotes p53-dependent premature senescence and stimulates the secretion of interleukin 6 (IL-6) [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(7): 4202–4214.
- [39] Volonte D, Liu Z, Musille PM, et al. Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(12): 1852–1862.
- [40] Roitenberg N, Bejerano-Sagie M, Bocholez H, et al. Modulation of caveolae by insulin/IGF-1 signaling regulates aging of *Caenorhabditis elegans* [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19 (8): e45673.
- [41] Wang J, Bai Y, Zhao X, et al. oxLDL-mediated cellular senescence is associated with increased NADPH oxidase p47phox recruitment to caveolae [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38 (3): BSR20180283.
- [42] 张桂仙, 袁娅金, 熊薇, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路预防治疗 2 型糖尿病肌少症研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(5): 1110–1115.
- Zhang GX, Yuan YJ, Xiong W, et al. Research progress of prevention and treatment of type 2 diabetic sarcopenia based on PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41 (5): 1110–1115.
- [43] van den Heuvel AP, Schulze A, Burgering BM. Direct control of caveolin-1 expression by Foxo transcription factors [J]. *Biochem J*, 2005, 385(3): 795–802.
- [44] Bist A, Fielding PE, Fielding CJ. Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein freecholesterol [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(20): 10693–10698.
- [45] Dasari A, Bartholomew JN, Volonte D, et al. Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 1805–18014.
- [46] 陆依菁, 田孟贤, 冯少芊, 等. 小窝蛋白-1 介导的信号通路在衰老中的作用 [J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(3): 475–478.
- Lu YJ, Tian MX, Feng SQ, et al. The role of caveolin-1 mediated signaling pathway in aging [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2019, 36(3): 475–478.

[收稿日期] 2021-04-14

王娇娇,李苗,史平玲,等. 糖尿病视网膜病变动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 681-688.

Wang JJ, Li M, Shi PL, et al. Research progress of animal model of diabetic retinopathy [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 681-688.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.017

糖尿病视网膜病变动物模型研究进展

王娇娇,李苗,史平玲,张贝贝,魏圆梦,王艳歌,宋宗明*

(河南省人民医院,河南省立眼科医院,郑州 450003)

【摘要】 糖尿病视网膜病变是成年人低视力和致盲的主要原因,其发病机制复杂,动物模型能使我们更加全面地了解疾病的病因病机,一个合理的动物模型成为人们探索其发病机制的关键。该文根据糖尿病视网膜病变的临床表现,对药物诱导型、高脂高糖饮食型和遗传性动物模型进行介绍,并将不同方法诱导的糖尿病视网膜病变动物模型的病理特点简要总结,以期为糖尿病视网膜病变机制研究及相应的药物研发提供参考。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;动物模型;研究进展

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0681-08

Research progress of animal model of diabetic retinopathy

WANG Jiaojiao, LI Miao, SHI Pingling, ZHANG Beibei, WEI Yuanmeng, WANG Yange, SONG Zongming*

(Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China)

Corresponding author: SONG Zongming. E-mail: szmeyes@126.com

【Abstract】 Diabetic retinopathy is the main cause of low vision and blindness in adults, and its pathogenesis is complex. Animal models can help us to understand the pathogenesis of diseases more comprehensively. A reasonable animal model is the key to explore the pathogenesis of diseases. According to the clinical manifestations of diabetic retinopathy, drug-induced, high-fat and high-sugar diet and genetic animal models were introduced in this paper. In addition, the pathological characteristics of animal models of diabetic retinopathy induced by different method were briefly summarized in order to provide reference for the research on the mechanism of diabetic retinopathy and the corresponding drug development.

【Keywords】 diabetic retinopathy; animal model; research progress

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

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见的微血管并发症之一,是成年人低视力和致盲的主要原因^[1-3]。我国是世界上 II 型糖尿病患者最多的国家,成年人糖尿病患病率约为 10.9% ~ 11.6%^[3-4],其中约 27.9%发展成 DR^[5]。DR 的发病机制复杂,具体机制尚不明确^[6],研究表明 DR 病理改变涉及视网膜

缺血,异常新生血管,视网膜炎,血管通透性增加^[7],神经元和神经胶质异常等诸多表现^[8],给 DR 的临床诊治及研究带来不便。受临床标本来源及伦理学限制,围绕 DR 发病机制的临床研究极难开展。DR 动物模型不仅能帮助人们更加全面地了解 DR 的病因病机,同时也能更好地进行新型药物和干预手段的筛选,更重要的是动物模型具有可控

【基金项目】 国家自然科学基金(82004426),中国博士后科学基金(2020M682305),河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190817),河南省立眼科医院基础研究专项(20JCQN007)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(82004426), Postdoctoral Science Foundation of China(2020M682305), Henan Province Medical Science and Technology Research Project(LHGJ20190817), Basic Research Project of Henan Provincial Eye Hospital(20JCQN007)。

【作者简介】 王娇娇(1988—),女,博士后,研究方向:糖尿病视网膜病变的基础研究。Email: wjjnzy@126.com

【通信作者】 宋宗明,男,博士,主任医师,教授,研究方向:糖尿病视网膜病变的基础和临床研究。Email: szmeyes@126.com

性、易得性及预知性等特点,具备了优于人体研究的优势。因此,选择可靠、可行和适当的动物模型是探索 DR 病因病机的关键。近年来随着 DR 发病率及危害性的持续升高,诸多 DR 动物模型被学者筛选并建立。其中啮齿类动物以其成本较低,造模时间短,取材方便,重复性好等优势成为建立 DR 模型的首选。目前,国际上围绕 DR 的动物模型主要有药物诱导型、高脂高糖饮食型和遗传型动物模型。为全面了解 DR 动物模型的优劣势,为实验研究提供参考,特将当前主流 DR 动物模型综述如下,以资参考。

1 药物诱导型

DR 根据眼底血管损伤程度分为非增生型糖尿病视网膜病变 (nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR) 和增生型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 两类。NPDR 以血管迂曲、视网膜出血、微血管瘤和脂质渗出为特点,当出现异常新生血管增殖时发展为 PDR。DR 另一个重要病理特征为糖尿病黄斑水肿,主要由液体积聚在神经视网膜中导致视网膜增厚和黄斑囊样改变引起^[9]。能否较好模拟 DR 临床病理特征,是判断模型成功与否的重要标志。药物诱导模型因建模便捷,病理改变模拟性强等特点是当前 DR 常用动物模型。药物诱导型主要包括链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 及四氧嘧啶诱导 (alloxan, AXL) 模型。

STZ 是诱发糖尿病最常用的药物,其药效机制主要通过破坏胰岛 β 细胞导致高血糖^[10-13]。STZ 诱导的糖尿病大鼠,2 ~ 4 周出现血-视网膜屏障 (blood-retinal barrier, BRB) 破坏,4 ~ 6 周时神经胶质细胞的凋亡增加,同时伴随视网膜外核层厚度的变薄和神经细胞的减少,紧接着出现感光细胞的死亡^[14]。基底膜的增厚、周细胞的丢失是 DR 的基本病理改变,且周细胞和内皮细胞结构和功能的完整性对维持视网膜毛细血管的稳定性具有十分重要的作用,STZ 诱导的糖尿病可出现上述一系列病理改变,成为 DR 早期病理改变的理想动物模型。研究显示,STZ 可诱导兔出现视网膜出血、血管病变、静脉血栓形成和增殖性视网膜病变,并可诱导猴子出现带有棉絮斑和高荧光斑的缺血性视网膜病变,STZ 可诱导猪的视网膜 BRB 通透性增加,INL 和神经节细胞层 (GCL) 变薄,毛细血管基底膜增厚^[15]。

STZ 诱导动物模型所致 DR 在病理改变上能够较好地模拟临床常见 DR 病理特征,能够为 DR 发病机制研究及治疗提供预测性,在 DR 研究中应用广泛。

此外,在 STZ 诱导 DR 模型中,由于胰岛 β 细胞的损伤程度取决于 STZ 的剂量,因此 STZ 诱导的糖尿病可能因剂量的不同,成模效果有所差别^[16]。唐东红等^[17]使用单次大剂量 (60 mg/kg, 45 mg/kg) 和多次小剂量 (30 mg/kg) 的 STZ 静脉注射恒河猴,结果发现实验猴均出现不同程度的视网膜病,分别显示早期眼底微血管动脉扩张、视网膜出血瘤、微血管瘤、新生血管及晚期白内障等。但是,单次大剂量注射倾向于造成胰岛素依赖性糖尿病,而多次小剂量注射倾向于造成慢性持续性高血糖症,后者诱发的 DR 模型与人类极为相似,表现为胰岛 β 细胞受到损害导致的糖代谢紊乱,损伤视网膜上的微血管,发生纤曲、变形,甚至破裂,进而形成微血管瘤。有文献表明单次大剂量注射 STZ 可快速导致大量的胰岛 β 细胞坏死,而多次小剂量注射可造成部分胰岛 β 细胞损伤,激发炎症反应,从而导致胰岛 β 细胞迅速失活^[18]。因此,在实验研究中需要选择合适的剂量,既要保证 DR 的发生,又要避免胰岛素合成和分泌功能的衰竭,且尽量减少 STZ 对其它组织的损害。基于当前 DR 模型的病理结果研究,STZ 诱导 DR 模型以采取小剂量多次诱导方法更为适宜。

AXL 和 STZ 机理类似,目前 AXL 广泛用于小鼠、大鼠、狗、兔子、猪等多种动物中诱导 DR。大鼠给药 AXL 一周内出现糖尿病^[19],2 个月时出现光感受器的破坏和间质水肿,且视网膜的厚度减小,伴随脉络膜血管数量减少,内皮细胞和血管壁紊乱^[20]。另外,四氧嘧啶可诱发幼犬糖尿病,每周给药 1 次,持续 5 周,诱导的视网膜病变与人类的 DR 非常相似。综合而论,药物诱导 DR 动物模型能够不同程度上模拟 DR 临床病理改变特征,其中以 STZ 诱导模型与临床符合度最高。在实验研究中,学者可以根据对 DR 病理改变的研究侧重选择相应动物模型。

2 高脂高糖饮食型

高脂高糖饮食诱发的啮齿类视觉疾病动物模型已经有 50 年的历史^[21-22]。小鼠在高脂高糖饮食 6 周时出现高血糖,15 个月后,观察到视网膜内皮细胞减少,21 个月后,可观察到微动脉瘤和视网膜增

厚的病变^[15]。而使用高脂高糖饲料喂养大鼠 4 周后,大鼠的视锥细胞感光器对光的敏感度下降^[23]。然而,此种模型的缺点是视网膜病变的发展需要更长的时间,发病较慢,但其优点是比其他模型的小鼠活得更久,可以观察更长时间。因此,目前比较常用的是高脂高糖饮食联合 STZ 注射来诱导的 DR 模型,通过高脂高糖饮食诱导胰岛素抵抗之后,再注射低剂量 STZ 损伤胰岛功能,引起血糖的升高,模拟 II 型糖尿病的发病过程^[24]。研究表明此种方法可导致视网膜变薄和结构的紊乱,和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达升高^[25-26]。因此,单纯使用高脂高糖饮食诱导 DR 动物模型常见于对 DR 的长期研究观察及药物筛选中,常规实验研究中应用较少。

3 遗传性动物模型

DR 成因复杂,主要观点认为糖尿病病程和血糖控制情况是 DR 出现的核心诱因,但临床研究发现部分患者即使血糖控制良好,糖尿病病程持续时间短,也可能短期内出现 DR。而部分患者血糖控制较差,糖尿病病程持续时间较长,但也不可能不会发展为 DR,表明 DR 的发生发展存在异质性^[26]。且基于人群研究显示,DR 呈现一定的种族发病特征,表明遗传因素是 DR 发病的重要诱因^[27]。为探索 DR 遗传病因及机制,遗传性 DR 动物模型被大量建立。I 型和 II 型糖尿病诱发的 DR 都存在遗传性动物模型,常用的实验动物模型包括小鼠、大鼠和斑马鱼等。由于啮齿类动物具有简便易得、操纵性强、经济高效等特点,因此啮齿类动物常被用作 DR 的遗传模型。

3.1 小鼠遗传模型

DR 的遗传小鼠模型主要包括 Ins2Akita、非肥胖糖尿病(non-obese diabetic, NOD)、db/db (Leprdb)、Kimba 和 Akimba 共 5 种,它们在遗传模式、疾病病因学、病理学和疾病进展方面各不相同。Ins2Akita 小鼠是 I 型糖尿病模型,主要是由于胰岛素基因 Ins2 突变,导致胰岛素蛋白的构象变化,引起的细胞死亡^[28-29]。该模型可表现为血管通透性增加,周细胞丢失和新生血管的形成^[30]。因此,Ins2Akita 小鼠较适合于研究 DR 的早期进展和神经保护作用类药物药效评价^[31]。NOD 小鼠 I 型糖尿病的动物模型,小鼠在 12 周龄发生自发型高血糖,血糖升高 4 周后就开始出现周细胞、内皮细胞和

RGCs 凋亡,视网膜毛细血管基底膜增厚^[32],约 4 个月可检测到大血管收缩和退行性变,微血管异常^[33]。db/db (Leprdb) 小鼠是美国 Jackson 实验室发现的自发型基因突变小鼠,为 II 型糖尿病的成熟模型,其瘦素受体发生突变,在 4 ~ 8 周大时,出现肥胖和高血糖,持续 6 周后,可观察到 RGCs 数量减少,中央视网膜厚度增加,15 个月,这些小鼠表现出 BRB 的严重破坏、周细胞丢失、RGCs 细胞凋亡、胶质细胞激活^[34]。Kimba 小鼠是一种增殖性视网膜病变的非糖尿病模型,用纯合子 Kimba 小鼠和 Ins2Akita 小鼠交配培育出 Akimba 小鼠,Akimba 小鼠的表现兼有 Kimba 小鼠和 Ins2Akita 小鼠的特征^[35]。主要包括是周细胞和血管缺失,视网膜新生血管和弥漫性血管渗漏,随着疾病的进展可以观察到视网膜厚度的减少及视网膜持续水肿甚至视网膜脱离^[36-37]。

3.2 大鼠遗传模型

DR 的遗传大鼠模型主要包括 Zucker 大鼠(zucker diabetic fatty, ZDF)、Long-Evans 大鼠(otsuka long-evans tokushima fatty, OLETF)、BB 大鼠(biobreeding, BB)、WBN/Kob 大鼠、GK 大鼠(goto kakizaki, GK)和 Torii 大鼠(spontaneously diabetic torii, SDT)。ZDF 大鼠是一种自发性 II 型糖尿病模型大鼠,该模型在 3 个月时出现稳定的高血糖,高血糖 8 个月后,表现出类似 DR 的毛细血管基底膜增厚,毛细血管核密度增加等病理改变^[38]。OLETF 大鼠亦是一种自发性 II 型糖尿病和肥胖的模型,由于 G 蛋白偶联受体 GPR10 的起始密码子发生突变,导致肥胖^[39-40],约在 12 周可表现为轻度肥胖,直到 18 周时才出现高血糖,27 周时可观察到视网膜神经纤维层变薄^[41]。据报道 OLETF 大鼠的视网膜毛细血管超微结构的形态学变化以及视网膜电图的变化与 DR 患者相似。因此,不同于 I 型糖尿病小鼠模型和 STZ 诱导的动物模型,OLETF 大鼠表现为高血糖、胰岛素抵抗和病理特征类似于人类的 II 型糖尿病^[42]。BB 大鼠模型被广泛应用于 I 型糖尿病所致 DR 的研究,该模型在 8 ~ 11 个月时出现视网膜病变、周细胞丢失、毛细血管变性和微动脉瘤,以及由于自身免疫反应导致的胰腺小细胞凋亡^[43]。WBN/Kob 大鼠模型的特点是具有新生血管形成和腔内血管透明化的病变,这使其成为了解 DR 新生血管的理想模型^[44]。GK 大鼠和 SDT 大鼠均属于非肥胖 II 型糖尿病大鼠模型。52 周龄的 GK 大鼠可表现为

脉络膜厚度增加,内层脉络膜血管密度降低,视网膜内 VEGFR2 免疫反应性增强等^[45]。SDT 大鼠的一个显著特征是在视盘周围出现巨大的视网膜皱襞,并有广泛的渗漏,类似于在人类中观察到的视网膜脱离^[46]。

3.3 斑马鱼遗传模型

除了啮齿类动物,最新研究表明斑马鱼也是 DR 的常用模型。Vhl 斑马鱼的 von Hippel-Lindau

肿瘤抑制基因发生突变,导致血管形成增加,同时,缺氧诱导因子上调,触发 VEGF 的 mRNA 高表达,该模型的特点是玻璃样血管增多并伴有血管渗漏、黄斑水肿、视网膜脱离和严重的新生血管形成^[47]。

为系统了解各种 DR 动物模型在模拟病理改变上的特征,特将当前主要动物模型所表现的病理改变总结如下,见表 1。

表 1 研究 DR 的动物模型
Figure 1 Animal model of DR

动物模型 Animal model	形成机制 Formation mechanism	病理改变 Pathological changes	模型评价 Model evaluation
STZ 诱导 STZ induced	破坏胰岛 β 细胞 Destroy islet β cells	BRB 破坏,神经胶质细胞凋亡,外核层变薄,感光细胞死亡等 BRB breakdown, glial cell apoptosis, outer nuclear layer becomes thinner, photoreceptor cells death	优点:类似于人非增殖期 DR 表现 Advantages: Similar to non-proliferative DR in humans 缺点:持续时间较长,增加实验成本,注射剂量需合适选择 Disadvantages: Long duration, increase the cost of the experiment, the injection dose needs to be appropriately selected
AXL 诱导 AXL induced	破坏胰岛 β 细胞 Destroy islet β cells	光感受器的破坏和间质水肿,视网膜的厚度减小,脉络膜血管数量减少,内皮细胞和血管壁紊乱 Damage of photoreceptors and interstitial edema, decreased retinal thickness, decreased choroid vessels, and endothelial cells and vascular walls are disturbed	临床表现和发病机制类似 STZ 诱导,但建模时间长于 STZ 诱导 The clinical manifestations and pathogenesis are similar to that of STZ induction model, but the modeling time is longer than that of STZ induction model
高脂高糖饮食 High-fat/high-sugar diet	胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱 Insulin resistance, metabolism disorder	内皮细胞减少,微动脉瘤和视网膜增厚,视锥细胞感光器对光的敏感度下降 Endothelial cells decrease, microaneurysms and retina thickens, and the sensitivity of cone photoreceptors to light decreases	优点:动物活的更久,可观察更长时间 Advantages: Animals live longer and can be observed for longer 缺点:建模较慢,持续时间久 Disadvantages: Modeling is slow and takes a long time
Ins2Akita 小鼠模型 Ins2Akita mice model	胰岛素基因突变 Mutation of insulin gene	血管通透性增加,周细胞丢失和新生血管的形成 Increased vascular permeability, pericyte loss, and neovascularization	优点:具有新生血管形成的 PDR 表现 Advantages: PDR features of neovascularization 缺点:建模成本较高 Disadvantages: Modeling costs are high
NOD 小鼠模型 NOD mice model	自发性 I 型糖尿病模型 Spontaneous type I diabetes model	周细胞、内皮细胞和 RGCs 凋亡,视网膜毛细血管基底膜增厚,大血管收缩和退行性变,微血管异常 Apoptosis of pericytes, endothelial cells and RGCs, thickened capillary basement membrane, vasoconstriction and degeneration, and microvascular anomaly	优点:DR 建模较快 Advantages: The model is built quickly 缺点:建模成本较高 Disadvantages: Modeling costs are high
db/db 小鼠模型 db/db mice model	II 型糖尿病模型,瘦素受体发生突变 Type II diabetes model, the leptin receptor mutates	RGCs 数量减少,中央视网膜厚度增加,BRB 的破坏、周细胞丢失、RGCs 细胞凋亡、胶质细胞激活 Decreased RGCs, increased central retinal thickness, damaged BRB, pericyte loss, apoptosis of RGCs, glial cell activation	优点:模型成熟,应用较多 Advantages: The model is mature and widely used 缺点:建模成本较高 Disadvantages: Modeling costs are high
Akimba 小鼠模型 Akimba mice model	Kimba 小鼠与 Ins2Akita 小鼠杂交 Kimba mice were hybridized with Ins2Akita mice	周细胞和血管缺失,视网膜新生血管和弥漫性血管渗漏 Pericyte and vascular loss, retinal neovascularization and diffuse vascular leakage	优点:具有新生血管和视网膜脱离等严重的 PDR 表现 Advantages: Severe PDR manifestations such as neovascularization and retinal detachment 缺点:建模成本较高 Disadvantages: Modeling costs are high

续表 1

动物模型 Animal model	形成机制 Formation mechanism	病理改变 Pathological changes	模型评价 Model evaluation
ZDF 大鼠模型 ZDF rat model	自发性 II 型 糖尿病模型(肥胖) Spontaneous type II diabetes model (obesity)	毛细血管基底膜增厚, 毛细血管核密度增加 Thickened capillary basement membrane, increased capillary density	优点:肥胖 II 型糖尿病模型, 无化学药物器官 损害 Advantages: It is obesity type 2 diabetes model and there is no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
OLETF 大鼠模型 OLETF rat model	自发性 II 型糖尿病模型(肥 胖) Spontaneous type II diabetes model (obesity)	脉络膜厚度增加, 内层脉络膜血管密度降低, 视网膜内 VEGFR2 免疫反应性增强 Thickened choroid, decreased inner choroid vessels density, enhanced immune reactivity of VEGFR2 in the retina	优点:肥胖 II 型糖尿病模型, 无化学药物器官 损害 Advantages: It is obesity type 2 diabetes model and there is no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
BB 大鼠模型 BB rat model	I 型糖尿病模型 Type I diabetes model	周细胞丢失、毛细血管变性和微动脉瘤 Pericyte loss, capillary degeneration and microaneurysm	优点:I 型糖尿病模型, 无化学药物器官损害 Advantages: It is type 1 diabetes model and there is no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
WBN/Kob 大鼠 模型 WBN/Kob rat model	I 型糖尿病模型 Type I diabetes model	新生血管形成和腔内血管透明化 Neovascularization and vascular transparency	优点:有新生血管形成, I 型糖尿病模型, 无化 学药物器官损害 Advantages: neovascularization, type 1 diabetes model, no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
GK 大鼠模型 GK rat model	自发性 II 型 糖尿病(非肥胖) Spontaneous type II diabetes model (non- obesity)	脉络膜厚度增加, 内层脉络膜血管密度降低, 视网膜内 VEGFR2 免疫反应性增强 Thickened choroid, decreased inner choroid vessels density, enhanced immune reactivity of VEGFR2 in the retina	优点:非肥胖 II 型糖尿病模型, 无化学药物器 官损害 Advantages: It is non-obesity type 2 diabetes model and there is no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
SDT 大鼠模型 SDT rat model	自发性 II 型 糖尿病(非肥胖) Spontaneous type II diabetes model (non- obesity)	视盘周围出现巨大的视网膜皱襞, 并有广泛 的渗漏 Large retinal folds surround the optic disk and extensive leakage	优点:非肥胖 II 型糖尿病模型, 无化学药物器 官损害 Advantages: It is non-obesity type 2 diabetes model and there is no chemical organ damage 缺点:造模成本高 Disadvantages: Modeling costs are high
Vhl 斑马鱼 Vhl zebrafish	基因突变 Genetic mutations	血管渗漏、黄斑水肿、视网膜脱离和严重的新 生血管形成 Vascular leakage, macular edema, retinal detachment and severe neovascularization	优点:繁殖率高, 后代数量大。有新生血管形 成, 无化学药物器官损害 Advantages: High reproductive rate and large number of offspring and there is neovascularization and no chemical organ damage 缺点:体积较小, 实验操作较难 Disadvantages: Small volume and experimental operation is difficult

4 展望

动物模型是实验研究的基础,高度还原 DR 的临床特征和发病状态的动物模型是研究 DR 的理想对象。目前围绕 DR 的病因及发病机制而研发的动物模型不断增多,一方面显示了学术界对本病的不断重视,同时模型的多样化也体现了对 DR 病因及发病机制的研究缺乏明确的结论,表现出一定的局限性。目前针对动物模型优劣的评价,国际上多从表面效度、结构效度及预测效度三个维度进行评价。表面效度,即模型能够模拟疾病的典型特征;结构效

度,即模型要符合一定的理论假说且病理生理改变与假说或理论相一致;预测效度,即模型的药理学反映及非药理学反应与临床治疗表现相一致,并能够为远期的治疗及发病机制研究提供预测性^[48]。基于评价三维度,结合模型制备的难易程度及经济效应进行评价,当前 DR 主要动物模型中,STZ 诱导模型能够较好模拟 DR 临床病理表现及临床特征,且 STZ 诱导模型在细胞因子、胶质细胞增生等发病机制上能够为 DR 发病机制研究提供一定的方向预测,具有一定的预测效度,故 STZ 诱导 DR 模型为目前较理想动物模型,且建模成本低,操作方便。对于

其他药物诱导 DR 模型,均能够模拟 DR 临床症状及对疾病发病机制进行一定的模拟,均有较好的表面效度及预测效度,而在模拟 DR 临床病例特征是不能够较全面与临床相吻合,结构效度不足。高脂高糖诱导动物模型结构效度、预测效度较差,且建模时间长,经济效益一般,元气淘汰可能性较大,除非进行长期药理观察,目前选择性较低。对于基因遗传模型,其建模目的围绕模拟疾病遗传发病机制而设立,本身具有较药物诱导模型更好的预测效度,但在模拟 DR 病理改变及临床症状时,遗传模型具有特定针对性,其结构效度及表面效度弱于药物诱导 DR 模型。遗传型动物模型的优点是能够自发形成 I 型或 II 型糖尿病,减少化学诱导方法可能带来的器官损害,但是该类模型造模成本高,繁殖力低,某些模型只有纯合子或者单一性别的鼠才能自发形成糖尿病,因此增加了动物的饲养数量^[49]。

此外,尽管 STZ 诱导模型具有较好的表面效度、结构效度及预测效度,STZ 诱导大鼠或小鼠糖尿病是目前比较公认的经典模型。但有一点需要指出,PDR 是以新生血管的形成成为主要标志的糖尿病微血管并发症,如果研究 PDR 必然涉及到新生血管,而 STZ 诱导模型视网膜新生血管非常困难,有研究表明糖尿病大鼠成模 3 个月后 HE 染色显示视网膜组织出现水肿,成模 6 个月时视网膜各层结构不清晰,周围水肿更加明显,毛细血管明显扩张,但是并未看到明显的 PDR 表现^[50]。因此,对于 PDR 的研究,STZ 诱导模型的应用受限,在造模剂量、方法上需要继续探索。目前,由于糖尿病性新生血管模型建立困难,目前,非糖尿病性氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型已经成为研究视网膜新生血管的经典模型,被广泛使用。OIR 模型利用了小鼠出生时只有部分发育的血管系统和后天对氧气浓度的控制可以影响血管行为这一特点,用于评估视网膜新生血管和中央血管闭塞。另外,往兔玻璃体腔内注射 DL- α -氨基己二酸(DL-AAA),可造成持续性视网膜新生血管,可导致长达 48 周的持续性血管渗漏^[51]。但是这些模型终究不是高血糖引起的视网膜新生血管模型,结合 DR 疾病本身的复杂性,难以开发出一种和人类具有相同的所有的表型和基因型特征的“完美”模型,还没有一个单一的模型能够显示出在人类身上看到的 DR 的所有临床特征。

目前,已经建立的各种动物模型各具优点及缺

点,都只能模拟人类 DR 的早期特征,并没有一种动物模型可以代表人 DR 的所有特征。因此,在选取 DR 的动物模型时,应认识到模型的优势和劣势,结合自己的实验设计和目的选择合适的动物模型。未来仍然需要大量的实验研究结合先进的检测技术开发出更加合适的 DR 模型,探索一种完美模拟 DR 的动物模型已成为本研究领域最大的挑战。

参 考 文 献(References)

- [1] Zhao K, Liu J, Dong G, et al. Preliminary research on the effects and mechanisms of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin-induced diabetic retinopathy [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(2): 849–858.
- [2] Xiao F, Li L, Fu JS, et al. Regulation of the miR-19b-mediated SOCS6-JAK2/STAT3 pathway by lncRNA MEG3 is involved in high glucose-induced apoptosis in hRMECs [J]. *Bioscience Rep*, 2020, 40(7): BSR20194370.
- [3] Sinclair SH, Schwartz SS. Diabetic retinopathy—an underdiagnosed and undertreated inflammatory, neuro-vascular complication of diabetes [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 843.
- [4] Chan JC, Zhang Y, Ning G. Diabetes in China: a societal solution for a personal challenge [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(12): 969–979.
- [5] Zhang G, Chen H, Chen W, et al. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in China: a multi-hospital-based cross-sectional study [J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101(12): 1591–1595.
- [6] Shafabakhsh R, Aghadavod E, Ghayour MM, et al. Role of histone modification and DNA methylation in signaling pathways involved in diabetic retinopathy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 7839–7846.
- [7] Roy S, Kern TS, Song B, et al. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: implications for targeting diabetic retinopathy [J]. *Am J Clin Pathol*, 2017, 187(1): 9–19.
- [8] Fehér J, Taurone S, Spoletini M, et al. Ultrastructure of neurovascular changes in human diabetic retinopathy [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 31: 394632017748841.
- [9] 张凤俊, 李晶明, 刘秋平. 糖尿病视网膜病变发病机制及潜在治疗研究进展 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40(7): 677–685. Zhang FJ, Li JM, Liu QP. Pathogenesis and potential treatment of diabetic retinopathy [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40(7): 677–685.
- [10] Samaha MM, Said E, Salem HA. Modulatory role of imatinib mesylate on pancreatic β -cells' secretory functions in an STZ rat model of diabetes mellitus [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 328: 109197.
- [11] Li S, Huang Q, Zhang L, et al. Effect of CAPE-pNO against type 2 diabetes mellitus via the AMPK/GLUT4/ GSK3 β /PPAR α pathway in HFD/STZ-induced diabetic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 853: 1–10.

- [12] Yuan X, Ni H, Chen X, et al. Identification of therapeutic effect of glucagon-like peptide 1 in the treatment of STZ-induced diabetes mellitus in rats by restoring the balance of intestinal flora [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(12): 10067–10074.
- [13] Ammon HPT. Boswellic extracts and 11-keto- β -boswellic acids prevent type 1 and type 2 diabetes mellitus by suppressing the expression of proinflammatory cytokines [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153002.
- [14] Zhang J, Wu Y, Jin Y, et al. Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(2): 732–742.
- [15] Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison [J]. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 106594.
- [16] 朱超, 朱莹莹. II 型糖尿病动物模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2): 84–88.
Zhu C, Zhu YY. Animal models of type II diabetes: an overview [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2013, 21(2): 84–88.
- [17] 唐东红, 代解杰, 蒋禄芝, 等. STZ 诱发实验恒河猴糖尿病性视网膜并发症模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2002, 10(3): 173–176.
Tang DH, Dai JJ, Jiang LZ, et al. Establishment of diabetic retinopathy complication animal model induced by streptozotocin in experimental rhesus monkey [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2002, 10(3): 173–176.
- [18] 高鑫, 宋洪元, 沈炜. 链脲佐菌素诱导的小鼠糖尿病视网膜病变模型的构建 [J]. *第二军医大学学报*, 2018, 39(12): 1360–1363.
Gao X, Song HY, Shen W. Establishment of streptozotocin-induced diabetic retinopathy model in mice [J]. *Acad J Second Mil Med Univ*, 2018, 39(12): 1360–1363.
- [19] Vattam KK, Raghavendran H, Murali MR, et al. Coadministration of alloxan and nicotinamide in rats produces biochemical changes in blood and pathological alterations comparable to the changes in type II diabetes mellitus [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2016, 35(8): 893–901.
- [20] Danilova I, Medvedeva S, Shmakova S, et al. Pathological changes in the cellular structures of retina and choroidea in the early stages of alloxan-induced diabetes [J]. *World J Diabetes*, 2018, 9(12): 239–251.
- [21] Clarkson-Townsend DA, Douglass AJ, Singh A, et al. Impacts of high fat diet on ocular outcomes in rodent models of visual disease [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 204: 108440.
- [22] Vidal E, Lalarme E, Maire MA, et al. Early impairments in the retina of rats fed with high fructose/high fat diet are associated with glucose metabolism deregulation but not dyslipidaemia [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5997.
- [23] Zhao L, Liao Q, Zhang Y, et al. Ischemic postconditioning mitigates retinopathy in tree shrews with diabetic cerebral ischemia [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 6286571.
- [24] 杨架林, 李果, 刘优萍, 等. 长期高脂饮食加小剂量链脲佐菌素建立人类普通 II 型糖尿病大鼠模型的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(3): 138–141.
Yang JL, Li G, Liu YP, et al. Establishing a rat model similar to the adult patient of the general type 2 diabetes by long-term fat-enriched fed and lower dose of streptozotocin-treated rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2003, 11(3): 138–141.
- [25] Wang CF, Yuan JR, Qin D, et al. Protection of tauroursodeoxycholic acid on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells dysfunction and streptozotocin-induced diabetic retinopathy rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185: 162–170.
- [26] Cai Z, Lu X, Zhang C, et al. Hyperglycemia cooperates with Tet2 heterozygosity to induce leukemia driven by proinflammatory cytokine-induced lncRNA Morbid [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1): e140707.
- [27] 包敏, 蔺晓慧. 糖尿病视网膜病变易感性与相关基因多态性研究进展 [J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21(2): 262–265.
Bao M, Lin XH. Research progress on susceptibility to diabetic retinopathy and related gene polymorphism [J]. *Inter Eye Sci*, 2021, 21(2): 262–265.
- [28] 邓宇轩, 叶雯青, 孙艳婷, 等. 中国糖尿病视网膜病变患病率的荟萃分析 [J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(48): 3846–3852.
Deng YX, Ye WQ, Sun YT, et al. A meta-analysis of prevalence of diabetic retinopathy in China [J]. *Natl Med J Chin*, 2020, 100(48): 3846–3852.
- [29] Araújo RS, Silva MS, Santos DF, et al. Dysregulation of trophic factors contributes to diabetic retinopathy in the Ins2 mouse [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 194: 108027.
- [30] Wang W, Tam KC, Ng TC, et al. Long-term lutein administration attenuates retinal inflammation and functional deficits in early diabetic retinopathy using the Ins2 mice [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2020, 8(1): e001519.
- [31] Vieira E, Mirizio GG, Barin GR, et al. Clock genes, inflammation and the immune system-implications for diabetes, obesity and neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9743.
- [32] Li CR, Sun SG. VEGF expression and cell apoptosis in NOD mouse retina [J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 3(3): 224–227.
- [33] Lee S, Harris NR. Losartan and ozagrel reverse retinal arteriolar constriction in non-obese diabetic mice [J]. *Microcirculation*, 2008, 15(5): 379–387.
- [34] Tang L, Zhang Y, Jiang Y, et al. Dietary wolfberry ameliorates retinal structure abnormalities in db/db mice at the early stage of diabetes [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(9): 1051–1063.
- [35] 李才锐, 孙曙光. 自发型糖尿病视网膜病变啮齿动物模型 [J]. *国际眼科纵览*, 2010, 34(2): 119–122.
Li CR, Sun SG. Rodent model of spontaneous diabetic retinopathy [J]. *Int Rev Ophthalmol*, 2010, 34(2): 119–122.
- [36] Rakoczy EP, Ali Rahman IS, Binz N, et al. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2659–2670.
- [37] Katsuda Y, Ohta T, Miyajima K, et al. Diabetic complications in

- obese type 2 diabetic rat models [J]. *Exp Anim*, 2014, 63(2): 121–132.
- [38] Wohlfart P, Lin J, Dietrich N, et al. Expression patterning reveals retinal inflammation as a minor factor in experimental retinopathy of ZDF rats [J]. *Acta Diabetol*, 2014, 51(4): 553–558.
- [39] Kubota R, Hayashi N, Kinoshita K, et al. Inhibition of γ -glutamyltransferase ameliorates ischaemia-reoxygenation tissue damage in rats with hepatic steatosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(22): 5195–5207.
- [40] Fujita N, Goto N, Nakamura T, et al. Hyperbaric normoxia improved glucose metabolism and decreased inflammation in obese diabetic rat [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 2694215.
- [41] Baek SM, Kim K, Kim S, et al. SP prevents T2DM complications by immunomodulation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16753.
- [42] Deguchi S, Ogata F, Yamaguchi M, et al. In situ gel incorporating disulfiram nanoparticles rescues the retinal dysfunction via ATP collapse in otsuka long-evans tokushima fatty rats [J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2171.
- [43] Wallis RH, Wang K, Marandi L, et al. Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease [J]. *Diabetes*, 2009, 58(4): 1007–1017.
- [44] Tsuji N, Matsuura T, Ozaki K, et al. Diabetic retinopathy and choroidal angiopathy in diabetic rats (WBN/Kob) [J]. *Exp Anim*, 2009, 58(5): 481–487.
- [45] Campos A, Martins J, Campos EJ, et al. Choroidal and retinal structural, cellular and vascular changes in a rat model of type 2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110811.
- [46] Kakehashi A, Saito Y, Mori K, et al. Characteristics of diabetic retinopathy in SDT rats [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22(6): 455–461.
- [47] van Rooijen E, Voest E, Logister I, et al. von Hippel-Lindau tumor suppressor mutants faithfully model pathological hypoxia-driven angiogenesis and vascular retinopathies in zebrafish [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(5–6): 343–353.
- [48] 周荣易, 党伟利, 周正, 等. 孤独症谱系障碍动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 380–386.
Zhou RY, Dang WL, Zhou Z, et al. Advances in research of animal models of autism spectrum disorders [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(3): 380–386.
- [49] 陈大年, 王钰娇. 重视不同糖尿病视网膜病变动物实验模型的差异及应用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(6): 404–409.
Chen DN, Wang YJ. Paying attention to the differences and applications of animal models diabetic retinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(6): 404–409.
- [50] 逢冰. 益气温阳通络法预防糖尿病大鼠视网膜病变发生的作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院; 2018.
Pang B. Study on the mechanism of preventing rats from diabetic retinopathy by boosting qi, warming yang and dredging collaterals principle [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences; 2018.
- [51] Moon SW, Sun Y, Warther D, et al. New model of proliferative vitreoretinopathy in rabbit for drug delivery and pharmacodynamic studies [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 600–610.

[收稿日期] 2021-03-18

杨文静,崔淑芳. 裸鼹鼠脑形态研究进展及应用展望 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 689-694.

Yang WJ, Cui SF. Research progress of brain morphology and function in naked mole-rats and application prospects [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 689-694.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.018

裸鼹鼠脑形态研究进展及应用展望

杨文静,崔淑芳*

(海军军医大学基础医学院实验动物学教研室,上海 200433)

【摘要】 裸鼹鼠具有抗肿瘤、耐低氧、耐疼痛、寿命长等优势特性,近年来逐渐成为科研界的新星,但是其在神经科学领域的应用尚待进一步深入推广。本文通过对裸鼹鼠脑形态,及大脑结构中控制视觉、听觉、嗅觉、感觉等功能的中枢结构进行系统的描述,系统阐述裸鼹鼠在长期演化过程中对低氧、黑暗等地下环境所做出的的适应性改变。裸鼹鼠这一结构与功能相适应的特征性改变,有望使其成为研究神经系统疾病包括神经退行性病变等方面的优势动物模型,从而进一步推动人类健康医学的发展。

【关键词】 裸鼹鼠;脑;视觉;听觉;神经退行性病变

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 05-0689-06

Research progress of brain morphology and function in naked mole-rats and application prospects

YANG Wenjing, CUI Shufang*

(Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Corresponding author: CUI Shufang. E-mail: youngstar_sf@163.com

【Abstract】 Recently, naked mole-rats have become increasingly used in scientific research because of their advantages in anti-tumor, anti-hypoxia, anti-pain and long life-span studies. In this article, we summarize the brain morphology of naked mole-rats, and systematically describe the central structures of the brain that control the functions of vision, hearing, olfactory sense and sensation, and the adaptation of naked mole-rats to low oxygen, darkness and other underground environments. The naked mole rat is expected to become a dominant animal model for the study of neurodegenerative diseases and other aspects of neurological disorders, and may promote the development of medicines for human neurological health in the future.

【Keywords】 naked mole-rats; brain; visual function; auditory function; neurodegeneration

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

裸鼹鼠是一种分布于非洲东部地区、营真社会性生活的啮齿类动物,体格大小与小鼠相近。裸鼹鼠基因组有 93% 的区域与人类、小鼠、大鼠保持较好的共线性关系^[1]。裸鼹鼠长期生活在地下 2 m

左右的黑暗环境中^[2],潮湿黑暗的环境,势必会影响其视觉功能的发育,而代偿性引起听觉及感觉功能的增强,以满足地下生活的需求。由于穴居密度高,与外界气体交换不顺畅,洞穴中空气的 CO₂

【基金项目】 国家自然科学基金青年项目(31700923),上海市科技发展基金(16140900100)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China, Youth Program(31700923), the Shanghai Committee of Science and Technology(16140900100)。

【作者简介】 杨文静(1986—),女,讲师,博士,研究方向:裸鼹鼠生物学特性及机制。Email:wenjing2006123@126.com

【通信作者】 崔淑芳(1968—),女,教授,硕士,研究方向:实验动物资源开发及特性。Email:youngstar_sf@163.com

含量很高,而氧含量极低(10% ~ 15%)^[2],需要其大脑在整体结构的分布及功能的分配上进行最优的调整,以满足低氧条件下低能耗的生理过程^[2]。因此,与适应地表生活的啮齿类动物相比,裸鼹鼠脑结构需要作出多方面的生物学改变,以适应特殊的地下环境。本文将从裸鼹鼠视觉、听觉、嗅觉、感觉等结构及功能方面的改变进行系统的阐述,揭示裸鼹鼠独特的脑形态及结构功能特点,为裸鼹鼠在生物医学领域的应用推广奠定一定的基础。

1 裸鼹鼠脑形态

裸鼹鼠脑由内皮、表皮、脑膜以及较厚的颅骨逐层包被,从上面观呈两侧半球略宽的扁球形,脑-体重比为 1.00:91.74,由嘴侧至尾侧,腹侧至背侧的顺序,脑部结构依次为嗅球、新皮质、梨状皮质、小脑、脑干^[3]。

2 视觉系统

完整视觉功能的是通过眼球、视神经以及大脑中枢三个部分有机协作以实现视觉信号输入及信息的整合,并最终为机体做出相应的行为学反应,这显然是一个非常消耗能量的过程^[4-6]。野外自然环境中裸鼹鼠在终年不见阳光的地下穴居生活,在漫长的演化过程中裸鼹鼠的视觉功能逐渐退化,包括其眼部结构、视神经以及视觉中枢均出现了不同程度的结构和功能上的削弱。这对于裸鼹鼠来说,无论从功能上和能量消耗方面来看都是其不断演化的必然结果^[4,6]。目前,裸鼹鼠视觉功能也得到了广泛和深入的研究^[7-12]。总体来说,裸鼹鼠大脑中视丘和外侧膝状体显著萎缩^[10],橄榄状顶盖前区虽然存在但退化明显。此外,视交叉上核功能与其他啮齿类动物相似并在结构上得到了完好的保存。

2.1 裸鼹鼠眼球结构功能

裸鼹鼠眼球与其他哺乳动物结构组成相同:包括角膜、晶状体、虹膜以及视网膜等结构,区别在于以下几个方面。首先,裸鼹鼠的眼球冠状面外围直径大约是 1.6 mm,而同体积小鼠为 3.4 mm^[3-4]。其次,相对于小鼠或者其他哺乳动物的球状眼球而言,裸鼹鼠眼球更类似于块茎状,并且在其基部有脂肪组织,位于视网膜后方^[6]。再次,裸鼹鼠眼窝大小与同体积小鼠无区别,被大量软组织所占据,其中也包含有副泪腺结构^[13]。另外,裸鼹鼠的眼球附着的位置和深度与其他哺乳动物存在一定的差

异。成年裸鼹鼠视网膜与典型的哺乳动物视网膜类似,由巩膜向玻璃体侧,依次为光感受器、外核层、外网层、内核层、内网层以及神经节细胞层^[9],裸鼹鼠视神经节细胞数目远低于其他哺乳动物^[14]。裸鼹鼠眼部晶状体厚度在 0.85 ~ 0.9 mm 范围内^[7],其视网膜厚度会随着年龄增长而逐渐降低^[6],视网膜结构紊乱也严重限制了其视觉成像功能^[4]。

2.2 裸鼹鼠视觉神经系统特点

裸鼹鼠视觉神经系统组成与其他啮齿动物类似,主要由视神经及位于外侧膝状体、上丘和顶盖前区等区域的核团组成,但是裸鼹鼠视神经在显微及超微结构上与其他动物存在一定的差异。

裸鼹鼠视神经髓鞘包裹层数与沙鼠几乎一致,但透射电镜下可见裸鼹鼠视神经横截面积远远小于沙鼠,其视神经髓鞘化比例仅有沙鼠的 1/2^[6],单层髓鞘的厚度远远小于沙鼠。这样的结果便是裸鼹鼠神经轴突外围髓鞘厚度远远低于沙鼠。

外侧膝状体是位于丘脑的一个小小的神经核团,直径只有几个毫米,是视觉信号在大脑中的第一站。外侧膝状体可以初步检测视觉图形的方位信息、运动方向和运动速度信息。裸鼹鼠外侧膝状体与同体积小鼠相比,发生了高度退化:体积大幅萎缩,仅有小鼠的 10%(裸鼹鼠为 0.05 mm³,小鼠为 0.46 mm³)^[6];厚度被压缩至 80 ~ 250 μm 的单层或数层,而同体积小鼠厚度为 350 ~ 450 μm^[6];背侧膝状体比腹侧膝状体退化更为严重,仅占小鼠的 5%,而腹侧则占 18%^[6]。

上丘是中脑背侧四叠体的上一对小丘,是视觉反射中枢,即接受视束及枕叶皮质来的纤维,又发出纤维参与构成顶盖延髓束和顶盖脊髓束,交叉后下行,止于脑神经运动核及脊髓前角细胞,完成视觉反射。裸鼹鼠中脑大部分结构与小鼠相似,唯有其上丘严重退化^[6],上丘中的视网膜投影主要投射向对侧而少量投射至同侧。这一投射区厚度仅有 30 ~ 100 μm,远远小于同体积小鼠的 300 μm 平均水平,视网膜投影区大约只有同体积小鼠的 15%(裸鼹鼠 0.08 mm³,小鼠 0.53 mm³),整个上丘体积也只有小鼠的 42% 左右(裸鼹鼠 1.41 mm³,小鼠 3.34 mm³)^[6]。与鼯形鼠属和 Ansell's 鼯鼠,裸鼹鼠的投射区密度较低,并且几乎没有视神经投射至对侧视交叉上核或者终纹床核以及其他边缘结构中^[6],这也是导致其视觉辨认能力受到极大程度削

弱的重要原因之一。

顶盖前区作为裸鼹鼠视觉中枢中一个非常重要的结构,位于上丘嘴侧位置,同其他鼹鼠相似,保持着典型的橄榄状,但其体远小于同体积小鼠,只有小鼠体积的 15% ~ 25% (裸鼹鼠为 0.01 mm^3 ; 小鼠为 0.03 mm^3)^[6],这就导致裸鼹鼠顶盖前区发挥视觉功能的数量显著降低。虽然尚能接受视网膜投影,但是却丧失实现清晰的图像成像能力^[15]。

针对上述视觉神经系统的功能学检测证实,裸鼹鼠选择性的丧失了控制视觉成像功能的中枢结构而仅仅保留了已经高度退化的橄榄状顶盖前区用于处理分析光线信号,以保证机体必需的昼夜节律^[6]。

3 听觉系统

听觉传导通路主要由三级神经元组成,听感受器为螺旋器,声波的震动通过外耳道使骨膜振动,骨膜带动鼓室内的听小骨,把声波的振动经卵圆窗传至内耳蜗的外淋巴,进一步影响到蜗管内的淋巴振动,最后传到螺旋器,刺激 Corti 器上的毛细胞,使其发生极化而产生听觉冲动,经听觉传导通路传向听觉中枢,期间需要经过多次中继和反复交叉才能传至丘脑和听皮质,而重要的中继站有上橄榄核、斜方体核、外侧丘脑、下丘和内侧膝状体等^[16-17]。

穴居动物的听觉功能最近几年才开始得到研究人员的关注^[18-20]。穴居物种的听觉功能显著区别于适应地面、高空以及水中环境的物种,出现了一定程度的退化,可能是洞穴中的特殊环境(狭长、封闭)限制了其听力的发展,这也是其它穴居生活动物的共同特点:比如分布于北美的独居动物衣囊鼠^[19],以及分布在地中海东部的独居动物盲鼹鼠都具有明显的听力退化^[17-18,21]。

裸鼹鼠虽然是穴居动物,但是并非独居而是营大型群居生活,群落中可多达 300 个以上个体,它们可以至少产生 17 种不同的声音与特定的行为动作相对应^[22],但是它们却与营独居生活的穴居动物一样,听力退化,不依靠声音传播来完成群落内个体间的信息交流,这也是进行群居生活的物种中的一个特例。

3.1 裸鼹鼠听觉灵敏度及声源定位功能

近年来,研究人员在裸鼹鼠听觉灵敏度和声源定位功能方面也取得了一定的进展。

首先从外观来看,裸鼹鼠没有外耳廓,只有皮肤构成的环状结构位于外耳道开口处。与生活在地表的啮齿类动物相比,裸鼹鼠听力的独特之处在于其极低的听觉灵敏度和高频波段听力^[7]。裸鼹鼠能接收的声音信号范围非常局限,接收声音阈值只有 35 dB(出现在声波为 4 KHz 时)^[7];能接收的高频率声音波段范围只有(60 dB 声压级时)65 Hz ~ 12.8 Hz,甚至低于擅长识别低频波段声音的啮齿类动物能感知的高频波段声波。噪声阈值测试显示,裸鼹鼠只有在声音持续相当长的时间直至逼近渐进阈值时才能感知到声音信号^[7]。

在声源定位方面,由于裸鼹鼠听力精准度极低并且无法区分噪音和所需声音导致其声源定位能力几乎丧失。持续时间低于 40 ms 或者持续时间较长的声音无法被裸鼹鼠利用双耳的定位功能辨别出其声源地^[7]。

3.2 裸鼹鼠听觉中枢的功能特点

虽然裸鼹鼠听觉灵敏度和听力定位功能在演化过程中出现了严重的退化,但是这并不妨碍裸鼹鼠听觉神经中枢结构的保留,这一现象与听力退化的衣囊鼠和盲鼹鼠相似^[17,19]。裸鼹鼠的听觉中枢——前庭蜗神经核得到了保留,这些核团结构正常,只是体积较小,尤其是负责双耳定位功能的核团体积萎缩更为明显。这些结构主要包括蜗腹侧后核、蜗神经后核(其中的颗粒细胞散在分布在其中)、蜗腹侧前核、橄榄核复合体以及斜方体等^[7]。这也从一定程度上可以推断,裸鼹鼠听觉灵敏度功能退化可能只是适应其生活习惯而出现的适应性改变,而并非负责听力的相关结构出现改变所致。但是与其他穴居地下的动物类似,裸鼹鼠脑中控制高频波段上橄榄核、外侧上橄榄核、斜方体内侧核以及斜方体^[23-25]等结构小于其他啮齿类动物。这些核团体积上的萎缩可能一定程度上与整体听觉灵敏度降低以及声源定位功能退化有关^[17]。

4 躯体感觉系统

哺乳动物的躯体感觉系统包括触觉、痛觉及温度觉等系统。Henry 等^[11]研究人员发现裸鼹鼠躯体感觉皮质主要包括三个区域:初级躯体感觉皮质、次级躯体感觉皮质及壁腹侧区。

4.1 初级躯体感觉皮质

初级躯体感觉皮层位于中央后回,是躯体感觉系统的一部分。在初级躯体感觉皮层,触觉表现从

脚趾(大脑半球顶部)到嘴部(底部)有序排列(以倒置方式)^[11]。

裸鼹鼠脑部结构中一个最显著的特点就是其接收体感信号输入的新皮质区。躯体感觉皮质几乎占据了裸鼹鼠新皮质尾侧所有区域,这是以牺牲皮层其他功能区域为代价实现的。裸鼹鼠的初级躯体感觉皮质具有其诸多独特之处。与其他啮齿类动物相比,裸鼹鼠初级躯体感觉皮质区域显著大于现已研究过的其他啮齿类动物(初级躯体感觉皮质区域体积/整个皮层体积比增加了大约 50%)^[8],这一增加的比例显著高于已经报道的盲鼹鼠^[26],并且裸鼹鼠初级躯体感觉皮质区缺少无应答区。其次,与盲鼹鼠类似,本应为初级视觉皮质区域的皮层中央及尾侧部位已经被裸鼹鼠初级躯体感觉皮质大量占据^[8,26],这可能是鼹鼠属的一个共性。裸鼹鼠初级躯体感觉皮质最为重要的特点在于其外侧皮质主要用于控制牙齿的功能,其中控制上下切牙功能的皮质区域大于超过了初级躯体感觉皮质区域的 30%^[8],远远超过了同体积小鼠中控制上下切牙功能的皮质区域^[27]。这一现象与裸鼹鼠行为学表型一致,裸鼹鼠在其自然生存的环境中主要依赖其切牙进行觅食、挖掘以及搬运物体等重要活动。较大的牙齿功能皮层控制区域得裸鼹鼠有望成为研究控制牙齿功能的初级躯体感觉皮质可塑性首选的实验动物^[28]。

4.2 次级躯体感觉皮质

在初级躯体感觉皮质后侧及外侧边缘相邻的区域为次级躯体感觉皮质,这一区域主要用于控制对侧躯体感觉。次级躯体感觉皮质在形态上是初级躯体感觉皮质的缩小版并且以面部和鼻部中线为界与后者呈镜像对称状。次级躯体感觉皮质从垂直方向来看,其中控制面部功能的区域位于中间,而控制四肢和躯干的区域位于侧面。同初级躯体感觉皮质区域相比,裸鼹鼠次级躯体感觉皮质中控制躯体和面部功能的区域较前者大^[8,11]。

4.3 壁腹侧区皮质

壁腹侧区皮质只存在于少数哺乳动物中^[29],位于次级躯体感觉皮质侧面^[30-31]。此区域主要参与控制面部和嘴部躯干的活动。裸鼹鼠中的三级皮质感觉区的位置目前还存在一些争议。

5 展望

裸鼹鼠作为一种新兴的实验动物资源,其寿命

长、肿瘤耐受性高、耐疼痛、耐低氧等生物学特性使其逐渐成为生物医学的研究热点。近年来,随着人口老龄化的到来,越来越多的神经退行性疾病也成为影响人类生活质量的重要医学难题。而裸鼹鼠大脑在长期演化过程中产生的一些改变,是其适应环境的演化结果,这也使其成为研究神经退行性变的最具潜力型动物模型之一。

长期黑暗的环境,使得裸鼹鼠视觉功能严重退化,其眼部结构几乎可以用“迷你”来描述,视网膜以及其他附属结构简化,远不及其他视力正常的啮齿类动物^[4-5]。其视力只能感受到无定形的光线信号,但无法接收清晰的图像信号^[6]。它对图形图像识别能力降低,是相应神经核团退化的结果^[4,6],可能与人类大脑在受到创伤、炎症及缺血缺氧性损伤时发生病变的核团定位相似,可成为研究神经源性视觉功能退变的天然动物模型。继发性视神经损伤是由各种原因所致的脑损伤,如脑外伤、脑血管意外、脑炎或脑膜炎后遗症、缺血缺氧性脑病。视神经损伤后可出现视力下降甚至失明,直接光反射消失,间接光反射有时正常^[32]。另外,裸鼹鼠视网膜功能退化,也可以使其成为视觉病变的优势动物模型,进行相应的分子机制及药物研发的研究^[33]。

裸鼹鼠听觉系统及听力也到了一定程度的削弱。首先外耳廓在演化过程中消失,在耳开口处只有由皮肤组成的环状结构^[7]。在听觉方面,其声源定位能力障碍,只能辨识以泥土为传播介质的低频声音^[7]。在临床患者当中,经常有一些听觉中枢处理障碍的患者,如自闭症、听神经病、部分老年性聋等^[34],严重影响患者的生活质量。近十多年来,人工听觉(人工耳蜗和人工中耳等)已成为治疗耳聋的重要方法之一。然而这些装置还有待于通过研究来发展和改善,这就需要可靠的耳聋模型。而裸鼹鼠恰可以成为研究听觉系统障碍的天然动物模型,尤其是用于研究神经中枢发育异常或者病变导致的听力受损的生物学机制研究。

但是,裸鼹鼠其他功能则代偿性增强:在与其身体直径相当的洞穴中,裸鼹鼠主要依赖其体表数根触须发挥的触觉功能代偿其严重退化的视力和听力^[8-9]。这些生理功能的变化可能主要是其脑内对应脑区的形态结构和功能出现适应性的变化造成的^[8-11]。那么,调控裸鼹鼠感觉系统功能的基因可进行深入挖掘,包括触觉、痛觉等方面的功能基因,使其成为研究感觉功能异常的天然动物模型。

6 结语

综上,深入揭示裸鼹鼠神经系统结构和功能的特征,一方面能够使这一动物的生物学信息更加清晰,另一方面可以使其在神经科学领域得到更为广泛的应用,从而进一步推动生物医学的发展,为解决相应的生物医学难题提供有效的技术支持。

参 考 文 献(References)

- [1] Kim EB, Fang X, Fushan AA, et al. Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat [J]. Nature, 2011, 479(7372): 223-227.
- [2] Larson J, Park TJ. Extreme hypoxia tolerance of naked mole rat brain [J]. Neuroreport, 2009, 20(18): 1634-1637.
- [3] Xiao J, Levitt JB, Buffenstein R. A stereotaxic atlas of the brain of the naked mole-rat (Heterocephalus glaber) [J]. Neuroscience, 2006, 141(3): 1415-1435.
- [4] Mills SL, Catania KC. Identification of retinal neurons in a regressive rodent eye (the naked mole-rat) [J]. Vis Neurosci, 2004, 21(2): 107-117.
- [5] Nikitina NV, Maughan BB, O' Riain MJ, et al. Postnatal development of the eye in the naked mole rat (Heterocephalus glaber) [J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004, 277(2): 317-337.
- [6] Hetling JR, Baig-Silva MS, Comer CM, et al. Features of visual function in the naked mole-rat Heterocephalus glaber [J]. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2005, 191(4): 317-330.
- [7] Heffner RS, Heffner HE. Degenerate hearing and sound localization in naked mole-rats (Heterocephalus glaber) with an overview of central auditory structures [J]. J Comp Neurol, 1993, 331(3): 418-433.
- [8] Catania KC, Remple MS. Somatosensory cortex dominated by the representation of teeth in the naked mole-rat brain [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5692-5697.
- [9] Crish SD, Rice FL, Park TJ, et al. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats I: vibrissa-like body hairs comprise a sensory array that mediates orientation to tactile stimuli [J]. Brain Behav Evol, 2003, 62(3): 141-151.
- [10] Park TJ, Comer C, Carol A, et al. Somatosensory organization and behavior in naked mole-rats: II. Peripheral structures, innervation, and selective lack of neuropeptides associated with thermoregulation and pain [J]. J Comp Neurol, 2003, 465(1): 104-120.
- [11] Henry EC, Remple MS, O' Riain MJ, et al. Organization of somatosensory cortical areas in the naked mole-rat (Heterocephalus glaber) [J]. J Comp Neurol, 2006, 495(4): 434-452.
- [12] Crish SD, Dengler-Crish CM, Catania KC. Central visual system of the naked mole-rat (Heterocephalus glaber) [J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2006, 288(2): 205-212.
- [13] Pevet P, Heth G, Hiam A, et al. Photoperiod perception in the blind mole rat (Spalax ehrenbergi, Nehring): involvement of the Harderian gland, atrophied eyes, and melatonin [J]. J Exp Zool, 1984, 232(1): 41-50.
- [14] Cernuda CR, DeGrip WJ, Cooper HM, et al. The retina of Spalax ehrenbergi: novel histologic features supportive of a modified photosensory role [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2374-2383.
- [15] Nemec P, Burda H, Peichl L. Subcortical visual system of the African mole-rat Cryptomys anselli: to see or not to see? [J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(3): 757-768.
- [16] Aitkin LM, Horseman BG, Bush BMH. Some aspects of the auditory pathway and audition in the european mole, Talpa europaea [J]. Brain Behav Evol, 1982, 21(2-3): 49-59.
- [17] Bronchti G, Heil P, Scheich H, et al. Auditory pathway and auditory activation of primary visual targets in the blind mole rat (Spalax ehrenbergi): I. 2-deoxyglucose study of subcortical centers [J]. J Comp Neurol, 1989, 284(2): 253-274.
- [18] Bruns V, Müller M, Hofer W, et al. Inner ear structure and electrophysiological audiograms of the subterranean mole rat, Spalax ehrenbergi [J]. Hear Res, 1988, 33(1): 1-9.
- [19] Heffner RS, Heffner HE. Vestigial hearing in a fossorial mammal, the pocket gopher (Geomys bursarius) [J]. Hear Res, 1990, 46(3): 239-252.
- [20] Müller M, Burda H. Restricted hearing range in a subterranean rodent, Cryptomys hottentotus [J]. Naturwissenschaften, 1989, 76(3): 134-135.
- [21] Heffner RS, Heffner HE. Hearing and sound localization in blind mole rats: Spalax ehrenbergi [J]. Hear Res, 1992, 62(2): 206-216.
- [22] Pepper JW, Braude SH, Lacey EA, et al. Vocalizations of the naked mole-rat [M]. Princeton: Princeton University Press; 1991.
- [23] Helfert RH, Snead CR, Altschuler RA. The ascending auditory pathways [M]. New York: Raven Press; 1991.
- [24] Kudo M, Nakamura Y, Tokuno H, et al. Auditory brainstem in the mole (Mogera): Nuclear configurations and the projections to the inferior colliculus [J]. J Comp Neurol, 1990, 298(4): 400-412.
- [25] Aitkin LM, Horseman BG, Bush BMH. Some aspects of the auditory pathway and audition in the european mole, Talpa europaea [J]. Brain Behav Evol, 1982, 21(2-3): 49-59.
- [26] Necker R, Rehkämper G, Nevo E. Electrophysiological mapping of body representation in cortex of the blind mole rat [J]. Neuroreport, 1992, 3(6): 505-508.
- [27] Chapin JK, Sadeq M, Guise JL. Corticocortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat [J]. J Comp Neurol, 1987, 263(3): 326-346.
- [28] Henry EC, Marasco PD, Catania KC. Plasticity of the cortical dentition representation in the naked mole-rat [J]. J Comp Neurol, 2005, 485(1): 64-74.
- [29] Krubitzer L, Manger P, Pettigrew J, et al. Organization of

- somatosensory cortex in monotremes; in search of the prototypical plan [J]. J Comp Neurol, 1995, 351(2): 261-306.
- [30] Fabri M, Burton H. Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats [J]. J Comp Neurol, 1991, 311(3): 405-424.
- [31] Remple MS, Henry EC, Catania KC. Organization of somatosensory cortex in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*): evidence for two lateral areas joined at the representation of the teeth [J]. J Comp Neurol, 2003, 467(1): 105-118.
- [32] 姚璟. 干细胞移植联合针灸治疗 1 例继发性视神经损伤患者的护理 [J]. 护理实践与研究, 2011, 8(24): 155-156.
- Yao J. Nursing care of a patient with secondary optic nerve injury treated by stem cell transplantation [J]. Nursing Prac Res, 2011, 8(24): 155-156.
- [33] Polo V, Rodrigo MJ, Garcia-Martin E, et al. Visual dysfunction and its correlation with retinal changes in patients with Alzheimer's disease [J]. Eye (Lond), 2017, 31(7): 1034-1041.
- [34] 李兴启. 中国听力学的发展与未来 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2016, 24(3): 217-223.
- Li XQ. Development and future of audiology in China [J]. J Audiol Speech Disorders, 2016, 24(3): 217-223.
- [收稿日期] 2021-03-12

将大鼠子宫内层移植到小鼠模拟人类子宫内层异位症的新动物模型

子宫内层异位症是子宫内层细胞在子宫外腹腔或盆腔生长的一种病理状态,其并发症可导致女性不孕。虽然小鼠模型在不孕和生殖领域的研究应用广泛,但因啮齿类动物没有月经周期和子宫内层脱落,所以小鼠不可能自然出现子宫内层异位症。如何诱导建立小鼠子宫内层异位症的动物模型是十分必要的。

伊朗克尔曼沙医科大学解剖系的研究人员,通过对比了三种制作啮齿类动物子宫内层异位症模型的方式,制作了一种新的用于模拟人类子宫内层异位的动物模型。

研究将小鼠分为了手术组对照组、同种异体小鼠子宫内层移植组,以及大鼠子宫内层移植至小鼠手术组,其中手术组又分为子宫内层移植至前腹壁和子宫内层移植至肠系膜组。为了增加子宫内层厚度便于移植及解剖操作,本实验选用有妊娠经历的大/小鼠并放置于雄性鼠周围,诱导雌激素分泌,同时将受体小鼠暴露于雄性小鼠周围促进雌激素分泌以保证子宫内层的激素依赖性,最终通过病理学及相关分子标志物的测定,判断模型是否构建成功。

研究发现,与对照组相比,同种及异种子宫内层移植到小鼠腹壁的 *HOXA10* 和 *HOXA11* 的基因表达显著降低,且呈现子宫内层细胞的高速率增殖后产生的氧化应激;对血管生成率的评价中,同种及异种小鼠子宫内层移植组的血管生成数量高于手术对照组;且发现了巨噬细胞中含铁血黄素的沉积。提示模型中出现了血管生成及巨噬细胞的过度活化;但是只有大鼠子宫内层移植到小鼠前腹壁模型组,可出现 VEGF-A、TNF- α 、NO、MDA、血清 CA-125 和 IL-37 浓度升高,动物总重量降低,子宫内层病变的重量和大小显著增加。

综上所述,本文通过构建并对比了几种不同的子宫内层异位症动物模型,发现将大鼠子宫内层移植到小鼠前腹壁的异种移植,在形态学、组织学和遗传学上可模拟人类子宫内层异位症,可作为一种新的子宫内层异位症动物模型。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2021, 4(3): 268-277; <https://doi.org/10.1002/ame2.12181>)。

陈雨荣,安星兰,张胜,等. 中国小型猪在生物医药领域的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(5): 695-706.

Chen YR, An XL, Zhang S, et al. Progress in the use of Chinese miniature pigs in biomedical research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(5): 695-706.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.05.019

中国小型猪在生物医药领域的研究进展

陈雨荣¹, 安星兰¹, 张胜¹, 翟岩辉¹, 于浩², 代相鹏^{1*}, 李子义^{1*}

(1. 吉林大学第一医院人类疾病动物模型国家地方联合工程实验室, 长春 130021;

2. 吉林大学动物科学学院, 长春 130062)

【摘要】 小型猪在生理、解剖结构、营养代谢、药物代谢以及疾病发生发展上与人类相似, 被广泛应用于人类疾病研究中。我国小型猪资源丰富, 不同种群遗传性状稳定并各具特色。但如何结合中国小型猪的特点, 建立符合生物医药研究需要的人类疾病小型猪模型仍处于探索阶段。本文对不同品种中国小型猪在人类疾病模型研究中的应用现状进行概述, 以期为进一步利用中国小型猪研究人类疾病提供参考和指导。

【关键词】 中国小型猪; 生物医药; 疾病模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)05-0695-12

Progress in the use of Chinese miniature pigs in biomedical research

CHEN Yurong¹, AN Xinglan¹, ZHANG Sheng¹, ZHAI Yanhui¹, YU Hao², DAI Xiangpeng^{1*}, LI Ziyi^{1*}

(1. National & Local Joint Engineering Laboratory for Animal Models of Human Diseases, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China. 2. College of Animal Science, Jilin University, Changchun 130062)

Corresponding author: LI Ziyi. E-mail: ziyi@jlu.edu.cn; DAI Xiangpeng. E-mail: daixiangpeng@hotmail.com

【Abstract】 Miniature pigs are similar to humans in terms of their physiology, anatomy, nutrition, metabolism, drug metabolism, and disease development and are therefore widely used in the study of human disease. Chinese miniature pigs have stable genetics but are also outbred. However, the harnessing of the characteristics of Chinese miniature pigs in the establishment of mini-pig models of human disease that meet the needs of biomedical research is still in the exploratory stage. In this article, we summarize the status of the breeds of Chinese miniature pig with respect to research into human diseases in order to provide a reference and guidance for the further use of this species in the study of human diseases.

【Keywords】 Chinese miniature pig; biomedicine; human disease model

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

人类疾病动物模型是为阐明人类疾病的发生发展机制或建立预防、诊断和治疗方法而制作的具有人类疾病模拟表现的实验动物^[1]。小型猪在生理生化指标、解剖结构、营养代谢、药物代谢和疾病发展等方面与人类相似, 是理想的研究人类疾病的动物模型^[2]。我国小型猪实验动物化研究开

展于上世纪 80 年代, 与欧美国家相比落后 40 多年。但我国小型猪资源丰富, 一些地方小型猪种长期在封闭环境中进行繁育, 形成了体型小、性成熟早、遗传性状稳定等优良特性, 具有广阔的应用前景。我国实验动物化培育的小型猪品系包括: 巴马小型猪、贵州小型猪、中国实验用小型猪、五

【基金项目】 国家重点研发计划(干细胞及转化研究重点专项)(2017YFA0104400), 吉林大学第一医院启动经费(04035020001)。

Funded by National Key R&D Program of China (the Key Project of Stem Cell and Transformation) (2017YFA0104400), Startup Funding of First Hospital, JLU(04035020001)。

【作者简介】 陈雨荣(1998—), 女, 硕士, 研究方向: 发育生物学。Email: 18843007591@139.com

【通信作者】 李子义, 男, 博士生导师, 研究方向: 发育生物学和疾病模型。Email: ziyi@jlu.edu.cn;

代相鹏, 男, 博士生导师, 研究方向: 蛋白翻译后修饰和疾病模型。Email: daixiangpeng@jlu.edu.cn。

* 共同通信作者

指山小型猪、西藏小型猪、版纳微型猪、蕨麻小型猪等^[3-4]。目前研究人员已建立了多种基于中国小型猪的人类疾病模型,但不同品系的小型猪在模拟不同的人类疾病上具有差异。为方便科研人员依照研究目的选择合适的小型猪进行疾病研究,本文将对中国小型猪资源现状及近年来建立的人类疾病模型进行综述,为利用中国小型猪研究人类疾病提供参考和指导。

1 中国小型猪的资源现状

在国家畜禽遗传资源委员会办公室近期公布的《国家畜禽遗传资源品种名录-猪志》中总共提及 83 个猪地方品种,其中属于小型猪有香猪、五指山猪、藏猪、滇南小耳猪等。中国小型猪具有体重小、抗逆性强、性成熟早、肉质好等特点,是发展生猪产业、培育新品种、保护遗传多样性、研究人类疾病的重要资源。由于中国小型猪种类较多,品种形成历史复杂,为了进一步明确中国小型猪的起源和进化

关系,选择了 12 个代表性的各个地域的小型猪品种,以西南野猪、东北野猪、欧洲野猪为种的外类群,非洲疣猪为属的外类群。利用 MEGA X 软件,采用最小进化法基于线粒体 DNA 全基因组序列进行系统发生树的构建(见图 1)^[5-10]。结果表明:中国小型猪主要起源于西南野猪,而与东北野猪、欧洲野猪的进化距离较远。首先从西南野猪分化出来的是江浙地区的金华猪,另外一个是由两个亚类群组成的大类群,其中一支由云贵地区的版纳微型猪、从江香猪与滇南小耳猪组成的亚类群,另一支则是由巴马香猪、五指山猪、陆川猪、藏猪、碧湖猪、隆林猪、莱芜猪和荷包猪构成的最大类群。在最大的子类群中,云贵地区的小型猪无论从地理上还是遗传距离上都更接近西南野猪。推测中国的小型猪品种最初是从西南地区,尤其是云贵地区开始品种形成并逐渐向外扩散,可能由于人类迁移的不确定性等因素的影响,后期形成的小型猪种并没有形成地理依赖性聚类。

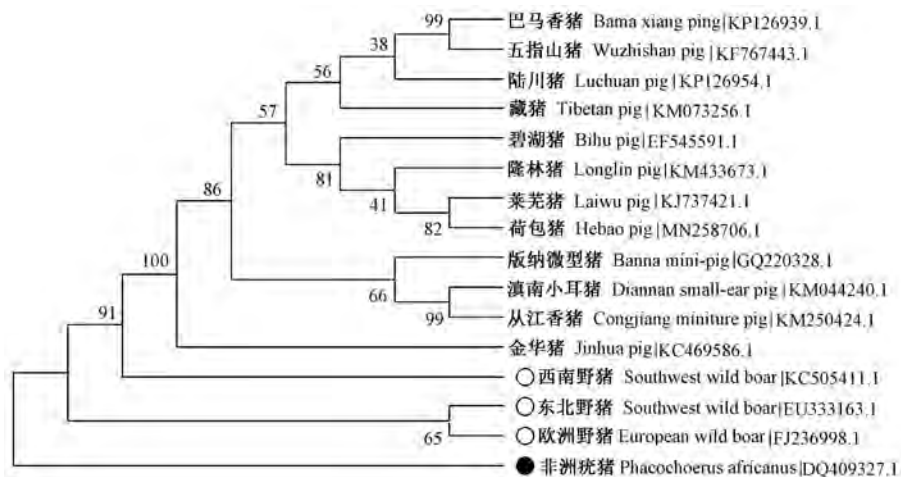


图 1 基于线粒体全基因组构建的中国小型猪分子发生树

Figure 1 Molecular phylogenetic trees of Chinese miniature pigs based on complete mitochondrial genome

2 中国小型猪在生物医药领域的研究

2.1 香猪

香猪包括从江香猪、环江香猪、剑白香猪、久仰香猪以及巴马香猪^[11]。

2.1.1 巴马香猪 (Bama xiang pig)

巴马香猪原产于广西巴马瑶族自治县,因其肉味鲜香得名“香猪”。巴马香猪体型较小,具有臀头黑、其余白的“两头乌”的毛色。成年母猪体重为 (40.88 ± 1.14) kg,公猪 (27.13 ± 2.06) kg,母猪 72 日龄,公猪 110 日龄性成熟,母猪多产,平均窝产仔数 10.07 头。巴马县巴马镇设有一巴马香猪国家级

保种厂^[11]。

广西巴马小型猪是 1987 年广西大学王爱德教授等^[12-13]以巴马香猪为原始基础群,采用闭锁纯繁近交方式培育而成的小型猪封闭群品系。1994 年定名为“广西巴马小型猪”,简称“巴马小型猪”。该品系成年母猪体重为 40 kg 左右,公猪 35 kg 左右^[12-13]。

(1) 在心血管系统疾病中的研究

巴马小型猪的部分血液生理指标、心脏解剖结构以及冠脉系统的分布与人类相似,目前已被广泛应用于心血管疾病的研究中^[14]。

采用球囊封堵冠状动脉法可制备巴马小型猪急性心肌梗死模型,该方法对实验动物的创伤小,但容易引起心室颤动以及血栓^[15]。开胸结扎冠状动脉可建立良好的巴马小型猪心肌缺血模型,该方法操作简单,但创伤大且死亡率较高^[16]。

李艳君等^[17]采用高脂高胆固醇饲料持续饲喂诱导巴马小型猪发生动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),动脉粥样硬化指数可达 3.8 以上,且 AS 特征可稳定持续 3 个月以上。Fang 等^[18]采用 CRISPR 技术使载脂蛋白 E 基因(apolipoprotein E, ApoE)发生移码突变,获得 ApoE^{-/-}巴马小型猪,经高脂高糖饲料喂养 6 个月后模型猪出现严重的高胆固醇血症和动脉粥样硬化。研究人员认为该模型对 AS 的转化研究具有重要意义。

采用高脂高盐饲料连续诱导 8 周可建立巴马小型猪高血压模型,模型猪的收缩压和舒张压显著上升。该模型模拟了人类自然状态下高血压发生进程,对人类高血压病的预防和干预具有重要意义^[19]。

Hai 等^[20]利用 CRISPR 技术敲除猪血管性血友病因子基因,建立了血管性血友病巴马小型猪模型,模型猪出现严重凝血功能障碍,与临床血友病患者症状较为相似。

(2) 在内分泌系统疾病中的研究

此外,巴马小型猪可用于糖、脂代谢紊乱等相关代谢疾病的研究。研究人员也建立了巴马小型猪 II 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)模型。Li 等^[21]、相磊等^[22]利用高脂高糖饲料诱导建立了巴马小型猪 T2DM 模型,实验组小型猪出现高胰岛素血症以及肥胖症状。而采用饮食诱导联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)的方法可成功建立疾病特征更为稳定的 T2DM 模型^[23-24]。

(3) 在消化系统疾病中的研究

巴马小型猪的肝质量、肝内血管及胆管分布、肝轮廓等方面与人类相似,是研究肝疾病的理想动物模型^[25]。周忠信等^[26]及廖锦元等^[27]采用四氯化碳(CCl₄)复合因素造模法成功制备出小型猪肝硬化模型,实验组小型猪丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶及总胆红素等水平逐渐升高,而球蛋白水平下降。并且,随造模时间的延长,模型猪由肝纤维化逐步发展为不可逆转的肝硬化,可用于研究肝炎、肝硬化的病理及生化指标的变化。

(4) 在神经系统疾病中的研究

为建立巴马小型猪帕金森病(Parkinson disease, PD)模型,2015 年赖良学团队利用 CRISPR 技术成功敲除巴马小型猪的磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) 和帕金森蛋白 2 基因(parkin 2, PARK2)基因,但 7 月龄小型猪未表现出如震颤、运动迟缓等帕金森病的典型症状^[28]。随后,该团队以相同方法敲除巴马小型猪 parkin、PINK1 和 DJ-1 基因,但 10 月龄时小型猪表现正常^[29]。Zhu 等^[30]采用 CRISPR 技术使 α 突触核蛋白(α -synuclein)基因发生错义突变,但 3 月龄小型猪未出现帕金森症状,仍需定期检查是否会出现疾病表型。

(5) 在免疫系统疾病中的研究

α -1, 3-半乳糖基转移酶(α -1, 3-galactosyltransferase, GGTA1)、胞苷磷酸-N-乙酰神经氨酸羟化酶(cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH)和 β -1, 4 N-乙酸氨基半乳糖转移酶(β -1, 4 N-acetylgalactosaminyltransferase 2, β 4GalNT2)是 3 种引起异种移植排斥的主要抗原。潘登科团队利用 CRISPR 等技术分别建立了 GTTA1/ β 4GalNT2 双基因敲除^[31]、CMAH/GTTA1 双基因敲除^[32]以及表达 hCD47 的 GTTA1/hCD47^[33]巴马小型猪模型。模型猪的健康状况和繁殖能力正常,可为进一步降低异种器官移植急性排斥反应提供低免疫原性供体,并可用于探究 hCD47 基因在减弱受体巨噬细胞对异种移植各器官的排斥反应。2017 年,杨璐菡团队利用 CRISPR 技术培育出了世界上首批不携带内源性逆转录病毒(porcine endogenous retroviruses, PERV)的巴马猪,解决了 PERV 可能感染人的问题,大大提高了一种移植的安全性^[34]。2020 年,该团队在 PERV 灭活巴马猪的基础上利用 CRISPR 技术敲除 GGTA1, CMAH 和 β 4GalNT2 基因,并通过转座子敲入了 9 个降低异种排斥反应的人源基因(hCD46、hCD55、hCD59、hB2M、HLA-E、hCD47、hTHBD、hTFPI 和 hCD39),实现了异种移植的又一重大突破。体外实验中,模型猪细胞对人体体液免疫、细胞介导的损伤以及凝血功能失调相关的发病机制具有抵抗性^[35]。

白介素受体 γ 链基因(interleukin-2 receptor gamma gene, IL2RG)和重组活化基因 1/2(recombination activating gene 1/2, RAG1/2)与淋巴细胞发育相关。RAG1/2 敲除纯合猪表现出 T、B 细

胞缺乏、脾发育不良等明显的严重联合免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID) 症状^[36]。2014 年, Huang 等^[37]利用类转录激活效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 技术成功敲除巴马小型猪 RAG1/2 基因, 模型猪表现出免疫器官发育不全、无法进行 V(D)J 重组、缺乏成熟的 B、T 细胞等典型的 SCID 症状。吉林大学第一医院人类疾病动物模型国家地方联合工程实验室李子义、杨永广团队联合中科院动物所周琪团队, 在国家重点研发项目和中科院先导项目等支持下, 目前已获得 RAG1 和 IL2RG 双基因突变的 (RAG1^{-/-}/IL2RG^{-/-}) SCID 猪, 仔猪表现出明显的 SCID 症状。这些免疫缺陷模型对研究人类 SCID 相关疾病、评价干细胞移植的效率和安全性以及生产人源化动物模型具有重要意义 (未发表)。

(6) 在其他疾病中的研究

Zhang 等^[38]利用乙酰基亚硝基脲 (ethylnitrosourea, ENU) 诱导双氧化酶 2 (dual oxidase 2, DUOX2) 基因发生纯合错义突变, 建立了甲状腺功能减退巴马小型猪模型。模型猪出现严重的甲状腺功能减退、贫血和免疫缺陷。

敲除 4-羟基苯丙酮酸氧化酶 (4-OH phenylpyruvate dioxygenase, 4HPPD/HPD) 可建立 III 型酪氨酸血症巴马小型猪模型。模型猪血液中酪氨酸含量以及尿液中 4-羟基苯乳酸和 4-羟基苯乙酸水平显著上升, 符合人类 III 型酪氨酸血症的临床特征, 可作为人类 III 型酪氨酸血症的理想模型^[39]。

2.1.2 从江香猪 (Congjiang xiang pig)

从江香猪 (贵州香猪) 主要分布在贵州从江、苗族自治区及广西环江县等地。该品系猪被毛全黑, 成年体重 (母猪) 为 (55.88 ± 2.91) kg, 性成熟较早, 公猪 30 日龄即有精液排出, 窝产仔数为 (7.11 ± 2.35) 头^[11]。

贵州小型猪是 1985 年贵州中医学院甘世祥教授等以贵州小型香猪为基础群, 通过封闭培育、适度近交培育而成小型猪品系。1987 年经专家鉴定后正式命名为“贵州小型猪”。该品系小型猪 12 月龄不超过 25 kg^[40]。

中国实验用小型猪是 1985 年中国农业大学的裴德智等以川黔交界山区小香猪为基础群, 采用全同胞近交、负向选择方法培育而成的小型猪品系。该品系小型猪成年体重为 35 ~ 40 kg^[41]。

(1) 在心血管系统疾病中的研究

采用开胸结扎法^[42]、球囊封堵法^[43]以及导丝介入栓塞法^[44]均可建立贵州小型猪急性心肌梗死模型, 研究人员认为相比开胸结扎法, 球囊封堵法以及介入栓塞法对实验结果干扰小, 与临床条件更为相近。

刘录山等^[45]采用高脂高胆固醇饲喂法成功建立了贵州小型猪动脉粥样硬化模型。模型猪冠脉和腹主动脉管腔内出现明显与人类成熟斑块特点相似的凸起斑块, 具有脂质坏死核心、大量泡沫细胞及炎性细胞等。

(2) 在内分泌系统疾病中的研究

采用高脂高糖饲料诱导法^[46-47]或 STZ 连续诱导法^[48]可成功建立贵州小型猪 T2DM 模型, 模型猪血糖升高, 可用于 T2DM 的研究。另外, 陈华等^[49]研究发现与巴马小型猪和五指山小型猪相比, 中国实验用小型猪对高脂饲料诱发 T2DM 相对不敏感, 建模需要较长时间诱导, 可作为糖尿病抗性品系。

(3) 在消化系统疾病中的研究

Wang 等^[50]采用肝动脉灌注 80% 乙醇方法建立了贵州小型猪肝硬化和门脉高压模型。模型猪的疾病病理生理发展过程与人类相似, 出现肝细胞变性坏死, 肝发生明显的纤维化, 可用于研究肝硬化的诊断及治疗方法。

采用外科手术方法可建立人工不完全性腭裂动物模型^[51]以及牙槽嵴裂动物模型^[52], 这类唇腭裂模型效果稳定, 对临床唇腭裂治疗研究具有重要意义。

(4) 在运动系统疾病中的研究

猪膝关节解剖结构与人类相似, 并且猪在运动过程中膝关节也存在大量屈曲动作。贵州小型猪还被用于建立双膝关节软骨缺损模型, 研究人员分别采取移植骨髓有核细胞 (bone marrow nucleated cells, BNCs)^[53]或自体骨髓间充质干细胞^[54]治疗软骨缺损, 并发现两种方法对软骨缺损修复效果均良好, 但 BNCs 的移植较为经济方便。

(5) 在其他疾病中的研究

多囊蛋白 1 (polycystin-1, PDK1) 和多囊蛋白 2 (polycystin-2, PDK2) 基因突变可能导致常染色体显性遗传性多囊肾病。2013 年, He 等^[55]建立了 PDK2 过表达转基因多囊肾病模型, 但肾功能无明显变化。2015 年, 该团队利用锌指核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN) 技术敲除 PDK1 基因, 建立了

多囊性肾病中国实验用小型猪模型。模型猪发生肝、肾囊肿,可用于研究多囊性肾病的发病机制^[56]。

2.2 五指山猪(Wuzhishan pig)

五指山猪原产于海南中部黎族、苗族聚居的五指山地区,因体型矮小又得名“老鼠猪”。该猪被毛多为黑色或棕色,腹部和四肢内侧为白色,成年体重为 30 ~ 35 kg,公猪 5 ~ 6 月龄,母猪 6 ~ 7 月龄初配,母猪初产(4.37 ± 0.22)头,经产(6.58 ± 0.31)头。1998 年,海南省农业科学院畜牧兽医研究所对五指山猪进行了保种工作,并成立了五指山猪原猪场^[11]。

五指山小型猪近交系是 1989 年中国农业科学院北京畜牧研究所冯书堂教授等以同窝的 1 公 1 母五指山猪通过“母配子”、“全同胞”的近交繁育方式培育而成的高度近交小型猪品系。该品系小型猪基因纯合度较高,毛色为上黑下白,成年猪体重为 35 kg 左右^[57-58]。

实验用五指山小型猪封闭群是 2007 年由广东省实验动物检测所王希龙等从五指山地区引种 108 头五指山猪建立而成,该品系小型猪可分为花色系和白色系,12 月龄体重为(27.72 ± 6.56) kg^[4]。

2.2.1 在心血管系统疾病中的研究

全基因组测序结果显示五指山小型猪与人类在冠心病相关基因上存在很多相似之处,在已检测的 247 个冠心病相关基因中仅缺失年龄相关性黄斑变性易感基因 2 (age-related maculopathy susceptibility 2, ARMS2) 基因和胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl ester transfer protein, CETP) 基因,并且五指山小型猪有 1618 个药物靶点与人类同源^[59]。

采用微球分次灌注法或球囊封堵联合微球栓塞法可建立五指山小型猪心力衰竭模型,两种造模方法均具有闭胸、高成功率和重复性好等优点^[60-61]。

采用高脂饮食诱导法可建立五指山小型猪高脂血症模型,连续诱导 3 ~ 4 月后小型猪血清中 TC、HDL 水平显著提高。该模型模拟了人类高脂血症发病过程,可用于研究血脂异常诱发心血管疾病的机制及预防治疗办法^[62-63]。

延长高脂饮食诱导时间可建立五指山小型猪 AS 模型^[64-65]。研究发现模型猪血浆和 AS 斑块中脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 的表达明显升高,并且 Lp-PLA2 在血管炎症发生和 AS 斑块形成中发挥了

关键作用^[65]。

2.2.2 在内分泌系统疾病中的研究

Kong 等^[66]建立了肝特异性表达 11 β -羟类固醇脱氢酶 1 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, 11 β -HSD1) 基因,胰岛 β 细胞特异性表达人胰岛淀粉多肽(human islet amyloid polypeptide, hIAPP) 基因和 DNA 损伤诱导转录物 3 (C/EBP homologous protein, CHOP) 基因的三基因共转五指山小型猪。转基因猪肝脏脂肪含量增加以及 β 细胞的凋亡,血糖并未升高。研究人员认为该模型具有 T2DM 发展潜力,可用于开发治疗糖尿病的新型药物。Li 等^[67]建立了过表达显性负性突变生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 的转基因猪模型,转基因猪身材矮小,体重显著降低,血糖轻度升高,胰岛素/胰岛素样生长因子 1 通路紊乱。该模型可用于研究生长激素与癌症、糖尿病和寿命的关系方面。

2.2.3 在消化系统疾病中的研究

2008 年,丁鳌等^[68]通过牙周翻瓣、丝线结扎和接种牙龈卟啉单胞菌造成小型猪牙周感染,再结合高脂诱导,建立了五指山小型猪牙周感染与 AS 复合模型。模型猪牙周袋加深,牙龈出血指数增加,并且主动脉出现早期 AS 病变,可用于研究牙周炎与冠心病的关系。

2.2.4 在免疫系统疾病中的研究

潘登科团队先后采用免疫磁珠吸附^[69]和 TALEN 技术^[70]敲除 α -1,3-半乳糖基转移酶(α -1,3-galactosyltransferase, GGTA1) 基因,成功制备了 GGTA1 基因缺失的五指山小型猪。GGTA1 基因敲除后可降低免疫排斥反应,为异种器官移植研究的可靠供体。随后该团队建立了遗传稳定的胰岛特异表达 LEA29Y 转基因五指山小型猪模型。LEA29Y 是一种能够高效抑制 T 细胞活性的新型人工融合蛋白。该转基因猪用于胰岛移植可以阻断 T 细胞激活的共刺激通路,降低胰岛移植术后人体内 T 细胞介导的免疫排斥反应,是胰岛异种移植的可靠供体^[71]。戴一凡团队采用 CRISPR 技术分别建立了 GGTA1/CMAH 双基因敲除^[72]、GGTA1/ β 4GalNT2 双基因敲除^[73]以及 GGTA1/ β 4GalNT2/CMAH 三基因敲除^[74]五指山小型猪,模型猪表现较低的免疫原性。这些模型为异种器官移植的研究与利用提供了良好的研究材料。

2.2.5 在运动系统疾病中的研究

杨程等^[75]通过外科手术方法建立了五指山

小型猪膝关节软骨缺损模型,并发现骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 和肋软骨细胞 (costal chondrocytes, CCs) 共培养构建组织工程软骨及共培养细胞修复五指山小型猪膝关节软骨缺损均具有较好的修复作用,为临床修复关节软骨缺损提供了理论依据和实验基础。

2.3 滇南小耳猪 (Diannan small-ear pig)

滇南小耳猪主要分布于云南省,中心产区为西双版纳州一市两县境内,由长期近亲繁殖、选育形成。该猪被毛黑色,少数有六白特征,成年母猪体重为 (49.69 ± 0.27) kg,公猪 (48.81 ± 0.61) kg,母猪 4 月龄、公猪 3 月龄即可配种,初产母猪产仔数为 8 头,经产为 9 头左右。西双版纳州种猪场承担滇南小耳猪的保种工作^[11]。

版纳微型猪属于滇南小耳猪。因其生长缓慢体型矮小等独特形状,1987 年经盛志廉教授定名为版纳微型猪。该品系成年母猪体重为 (43.3 ± 1.0) kg,公猪 (36.1 ± 1.1) kg^[76-77]。

版纳微型猪近交系是 1980 年由云南农业大学曾养志教授等以云南版纳拉祜族寨子中的滇南小耳猪为基础群,通过全同胞或亲子交两种高度近交方法培育而成。该品系近交程度高,成年猪体重平均为 36 kg^[78-80]。

2.3.1 在代谢系统疾病中的研究

肖国华等^[81]采用高脂高糖联合低剂量 STZ 诱导法建立了版纳微型猪 T2DM 模型。喂养 12 个月后,实验组小型猪空腹血糖值明显升高。随后实验发现,模型猪骨骼肌纤维普遍萎缩、肌纤维排列紊乱、糖原合成减少,肌肉素 (Musclin) 蛋白表达水平升高,因此推测肌肉素可能在 T2DM 的发生发展过程中发挥重要作用^[82]。

2.3.2 在免疫系统疾病中的研究

2013 年, Xin 等^[83]选用版纳微型猪近交系小型猪,采用 TALEN 技术成功敲除小型猪 GGTA1 基因。该模型猪可用于异种器官移植研究。

2.3.3 在其他疾病中的研究

Zhou 等^[28]采用 CRISPR 技术成功敲除版纳微型猪的酪氨酸酶 (tyrosinase, TRY) 双等位基因,建立了白化病版纳微型猪模型。该猪皮肤、毛发以及眼睛中的黑色素全部消失,表现出典型的白化病特性,是研究人类白化病的发病机制以及治疗办法的良好模型。

2.4 西藏藏猪 (Xizang Tibetan pig)

西藏藏猪主要分布于西藏的农区和半农牧区,是典型的高原猪种。全身被毛为黑灰色或淡黑色,少数为棕色,12 月龄母猪体重为 (22.98 ± 0.65) kg,成年公猪 (24.52 ± 0.92) kg,4 ~ 6 月龄性成熟,经产母猪产仔数为 5.75 头。西藏农牧学院目前建立了藏猪保种厂^[4,11]。

西藏小型猪是 2004 年由南方医科大学顾为望教授等从西藏自治区林芝市工布江达县引进的 42 头藏猪为基础,进行封闭群管理建立而成,目前已完成风土驯化以及实验动物化研究。西藏小型猪全身黑色,体型矮小,是目前我国已知小型猪品系中体重最轻的品种。成年母猪体重为 (28.06 ± 3.92) kg,公猪 (33.31 ± 4.40) kg^[84-85]。

2.4.1 在心血管系统疾病中的研究

与其他常见小型猪相比,西藏小型猪冠状动脉分支较少,是建立心梗模型的理想实验动物^[86]。采用开胸结扎法^[86]及球囊封堵法^[87]均可建立西藏小型猪心肌梗死模型,病理切片结果显示梗死区域心肌结构失去完整性并且形成大量瘢痕组织。

陈民利团队采用高脂诱导和高脂胆固醇诱导方法建立了藏猪胰岛素抵抗 AS 模型,模型猪主动脉脂质沉积和粥样硬化程度明显,并伴有胰岛素抵抗,可用于研究人类胰岛素抵抗和心血管疾病的疾病发生发展机制^[88-90]。与五指山小型猪相比,在高脂环境下西藏小型猪的炎症反应程度较高而血脂较低,易形成向心性肥胖,脂肪多沉积在心脏、肾脏组织。研究人员认为西藏小型猪可能适合于研究中心肥胖型胰岛素抵抗的心血管疾病^[91-92]。

赖良学团队先后利用 ZFN 技术和转基因克隆技术成功建立糖尿病和心血管病相关的重要靶点基因 PPAR γ 基因敲除的杂合西藏小型猪模型^[93],以及 PPAR γ 过表达转基因西藏小型猪模型^[94],该类模型可用于研究 PPAR γ 基因在心血管系统中的功能及其对糖尿病和心血管病的影响,以及开发靶向 PPAR γ 的新型胰岛素激动剂药物。

2.4.2 在神经系统疾病中的研究

赖良学团队利用转基因克隆技术成功培育出世界上首个转 htt^{N208-105Q} 的亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 西藏小型猪模型,模型猪脑神经元发生凋亡,出现运动障碍及舞蹈样运动^[95]。随后该团队利用相同方法建立了铜/锌超氧化物歧化酶 (copper/zinc superoxide dismutase 1,

SOD1) 基因突变^[96]以及反式激活反应-DNA 结合蛋白 (TAR DNA-binding protein 43, TDP-43) 基因突变的西藏小型猪, 模型猪表现出人肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 类似症状, 如运动神经受损和肌肉萎缩等。

2.4.3 在运动系统疾病中的研究

手术切除西藏小型猪的左膝关节外侧半月板并离断其前交叉韧带可建立早期膝骨性关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 动物模型。模型猪术后四

周的组织学检查结果最符合 KOA 软骨变化, 可用于 KOA 早期 MRI 诊断以及早期治疗研究^[97]。

2.4.4 在其他疾病中的研究

2017 年, 顾为望团队采用体细胞核移植技术成功建立了 DKK1 转基因西藏小型猪, pDKK1 转基因在皮肤特异性表达, 但并未出现无毛表型^[98]。研究人员认为结果可能与转基因表达量不足以诱导无毛表型或 DKK1 在猪和小鼠中发挥不同作用有关 (见表 1)。

表 1 中国小型猪在多种疾病研究中的应用

Table 1 Application of Chinese miniature pigs in various diseases

品系 Strain	来源 Source	疾病模型 Disease model
巴马香猪 Bama xiang pig	广西 Guangxi	心血管疾病 ^[15-20] 、糖尿病 ^[21-24] 、肝病 ^[26-27] 、PD ^[28-30] 、 Cardiovascular disease ^[15-20] , diabetes ^[21-24] , liver disease ^[26-27] , PD ^[28-30] , 异种移植 ^[31-35] 、SCID ^[37] 、甲减 ^[38] 、酪氨酸血症 ^[39] Xenotransplantation ^[31-35] , SCID ^[37] , hypothyroidism ^[38] , tyrosinemia ^[39]
从江香猪 Congjiang xiang pig	贵州及广西 Guizhou and Guangxi	心血管疾病 ^[42-45] 、糖尿病 ^[46-49] 、肝病 ^[50] 、 Cardiovascular disease ^[42-45] , diabetes ^[46-49] , liver disease ^[50] , 口腔/骨骼疾病 ^[51-54] 、多囊肾病 ^[55-56] Oral/skeletal diseases ^[51-54] , polycystic kidney disease ^[55-56]
五指山猪 Wuzhishan pig	海南 Hainan	心血管疾病 ^[59-65] 、糖尿病 ^[49, 66-67] 、 Cardiovascular disease ^[59-65] , diabetes ^[49, 66-67] , 异种移植 ^[69-74] 、口腔/骨骼疾病 ^[68, 75] Xenotransplantation ^[69-74] , oral/skeletal diseases ^[68, 75]
滇南小耳猪 Diannan small-ear pig	云南 Yunnan	糖尿病 ^[81-82] 、异种移植 ^[83] 、白化病 ^[28] Diabetes ^[81-82] , xenotransplantation ^[83] , albinism ^[28]
西藏藏猪 Xizang Tibetan pig	西藏 Xizang	心血管疾病 ^[86-94] 、HD ^[95-96] 、ALS ^[97] 、无毛症 ^[98] Cardiovascular disease ^[86-94] , HD ^[95-96] , ALS ^[97] , ahairy ^[98]

3 展望

中国小型猪资源丰富, 不同种群各具特色, 可被广泛应用于人类疾病的研究中。目前已建立了涉及心血管疾病、糖尿病、肝病、神经退行性疾病、异种移植及免疫缺陷、口腔及骨骼疾病等多个系统的疾病模型, 其中心血管疾病及糖尿病模型占较大比例。在已有的中国小型猪品系中, 巴马小型猪的应用最为广泛。但中国小型猪的开发与实验动物化及其推广仍处于初级阶段, 存在育成品系较少、保护力度不足和发展阻力较大等问题。并且由于用小型猪建立疾病模型的时间较短, 一些模型虽具有表面效度及结构效度但缺乏预测效度, 限制了小型猪疾病模型的推广应用及成果转化。

为进一步推动我国在以猪为模式动物的表型和遗传领域的研究, 推动研究成果的转化应用, 《国家重大科技基础设施建设中长期规划 (2012-2030)》中明确指出“模式动物表型与遗传研究国家重大科技基础设施”为“十二五”期间优先安排

内容。据报道, 中国农业大学负责猪表型与遗传研究设施建设。该项目总投资 7.5914 亿元, 于 2019 年动工, 预计将在 2023 实现开放共享。该设施计划对猪的培育、表型和遗传分析进行一体化研究, 建成世界上首个以猪为模式动物的大型综合研究设施, 确立我国以猪为模式动物开展生命研究的国际领先地位。由中国农业大学主导的国际模式猪计划 (Pig Model Project, PMP) 是该项目的重要内容, 计划对猪所有基因进行敲除, 建立完整的基因敲除猪表型品系, 促进国内外合作, 实现猪的模式动物化。

总之, 通过加大科技投资力度, 建立多种技术平台, 利用基因编辑、体细胞核移植等新兴技术并结合我国小型猪品系的特点和优势, 建立更多符合生物医药研究要求的小型猪新品系及疾病模型, 促进资源开放共享与交流合作, 将有助于提高小型猪资源的利用价值, 为基因功能、人类疾病、异种器官移植研究以及动物遗传育种提供良好的实验材料。

参 考 文 献(References)

- [1] 施新猷, 顾为望. 人类疾病动物模型 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2008.
Shi XY, Gu WW. Animal models of human diseases [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2008.
- [2] 袁进, 顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 108-111.
Yuan J, Gu WW. Application of miniature pig as animal model of human disease in biomedical research [J]. Prog Vet Med, 2011, 32(2): 108-111.
- [3] 王桂花, 尹晓敏, 孙霞, 等. 国内外小型猪资源概况 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 71-73.
Wang GH, Yin XM, Sun X, et al. General situation of miniature pig resources at home and abroad [J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(2): 71-73.
- [4] 陈华. 小型猪医学研究模型的建立与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2015.
Chen H. The establishment and application of miniature pig medical research model [M]. Beijing: People's Medical Publishing House; 2015.
- [5] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [6] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. P Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [7] Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics [M]. New York: Oxford University Press; 2000.
- [8] Kumar S. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13(4): 584-593.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [10] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [11] 国家畜禽遗传资源委员会组编. 中国畜禽资源志(猪志) [M]. 北京: 中国农业出版社; 2011.
China National Commission of Animal Genetic Resource. Animal genetic resources in China (pigs) [M]. Beijing: China Agricultural Press; 2011.
- [12] 邹迪莎, 于健. 巴马小型猪动物模型在医学领域的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1128-1134.
Zhou DS, Yu J. Research progress on animal models of Bama miniature pigs in the field of medicine [J]. Chin Anim Husbandry Vet Med, 2017, 44(4): 1128-1134.
- [13] 王爱德. 广西巴马小型猪的选育研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(3): 160.
Wang AD. Breeding of Guangzhou Ba-Ma mini-pig [J]. Chin J Comp Med, 2004, 14(3): 160.
- [14] 王爱德, 郭亚芬, 李柏, 等. 巴马小型猪血液生化指标 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(1): 8-12.
Wang AD, Guo YF, Li B. Determination of some haemal biochemical parameters in Ba-Ma mini-pig [J]. Shanghai Lab Anim Sci, 2001, 21(1): 8-12.
- [15] 尹巧香, 赵玉生, 王姮, 等. 延迟增强核磁共振评估经皮球囊封堵冠状动脉法制备的小型猪心肌梗死模型 [J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1): 34-39.
Yin QX, Zhao YS, Wang D, et al. Delayed-enhanced magnetic resonance imaging for assessing a minipig myocardial infarction model established by percutaneous balloon occlusion [J]. J Southern Med Univ, 2013, 33(1): 34-39.
- [16] 侯洁, 肖俊睿, 孙玉, 等. 次全结扎冠状动脉法构建巴马小型猪心肌缺血模型 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2018, 15(9): 561-565.
Hou J, Xiao JR, Sun Y, et al. Establishment of myocardial ischemia model in Bama mini-pig by partial ligation of coronary artery [J]. Chin J Interv Imaging Ther, 2018, 15(9): 561-565.
- [17] 李艳君, 宋少锐, 郭亚芬, 等. 广西巴马小型猪动脉粥样硬化模型的制作 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(7): 1770-1776.
Li YJ, Song SR, Guo YF, et al. Preparation of atherosclerosis model using Guangxi Bama mini-pig [J]. Chin Anim Husbandry Vet Med, 2015, 42(7): 1770-1776.
- [18] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(10): dmm036632.
- [19] 戎亦骊, 潘永明, 黄俊杰, 等. 高脂高盐饮食诱导巴马小型猪高血压模型的建立及其机制探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 474-479.
Rong YD, Pan YM, Huang JJ, et al. Establishment of a Bama minipig model of hypertension induced by high fat and high salt diet and its mechanism [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 474-479.
- [20] Hai T, Teng F, Guo R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system [J]. Cell Res, 2014, 24(3): 372-375.
- [21] Li L, Zhao Z, Xia J, et al. A long-term high-fat/high-sucrose diet promotes kidney lipid deposition and causes apoptosis and glomerular hypertrophy in Bama minipigs [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e142884.
- [22] 相磊, 陈华, 赵德明. 高糖高脂饲料诱导的小型猪肥胖模型 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(4): 1-5, 9.
Xiang L, Chen H, Zhao DM. High fat and high sugar diet induced the fat model of Bama miniature pigs [J]. Lab Anim Sci, 2019, 36(4): 1-5, 9.
- [23] 于健, 邹迪莎, 叶瑶, 等. 磷脂酰肌醇 3 激酶及葡萄糖转运蛋白 4 在巴马小型猪 2 型糖尿病模型中的表达 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(4): 421-424.
Yu J, Zou DS, Ye Y, et al. Expressions of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in a Bama miniature pig model with type 2 diabetes mellitus [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23(4): 421-424.

- [24] 吴延军, 夏攀洁, 严雪瑜, 等. 高脂高糖饲料联合低剂量链脲佐菌素(STZ)诱导广西巴马小型猪 2 型糖尿病动物模型的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2393-2398.
- Wu YJ, Xia PJ, Yan XY, et al. Combination of high fat/high carbohydrates diet and low-dose Streptozotocin(STZ) induced a model for type 2 diabetes in Guangxi Bama mini-pig [J]. Genom Appl Biol, 2017, 36(6): 2393-2398.
- [25] Chen JY, Luo YK, Cai SW, et al. Ultrasound-guided radiofrequency ablation of the segmental Glissonian pedicle: A new technique for anatomic liver resection [J]. Surgery, 2016, 159(3): 802-809.
- [26] 周忠信, 王捷, 罗葆明. 小型猪肝硬化模型建立过程中肝脏功能及组织病理学的改变[J]. 上海实验动物科学, 2002, 22(2): 102-105.
- Zhou ZX, Wang J, Luo BM. Functional and histopathological changes of liver in cirrhosis model of mini-pigs [J]. Shanghai Lab Anim Sci, 2002, 22(2): 102-105.
- [27] 廖锦元, 黄仲奎, 黎宁钦, 等. 小型猪肝硬化模型肝脏病理及生化指标的变化[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(2): 8-11.
- Liao JY, Huang ZK, Li NQ, et al. Pathological and biochemical changes of the liver in mini-pig models of hepatic cirrhosis [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(2): 8-11.
- [28] Zhou X, Xin J, Fan N, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(6): 1175-1184.
- [29] Wang X, Cao C, Huang J, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system [J]. Sci Rep, 2016, 6: 20620.
- [30] Zhu XX, Zhong YZ, Ge YW, et al. CRISPR/Cas9-mediated generation of Guangxi Bama minipigs harboring three mutations in α -synuclein causing Parkinson's disease [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12420.
- [31] 唐雨婷, 高景波, 龙川, 等. CRISPR/Cas9 介导的 β 4GalNT2 基因敲除猪制备[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(10): 1697-1705.
- Tang YT, Gao JB, Long C, et al. Generation of β 4GalNT2 gene knockout pigs (*Sus scrofa*) via CRISPR/Cas9 [J]. J Agr Biotechnol, 2017, 25(10): 1697-1705.
- [32] 黄林华, 李西睿, 龙川, 等. CRISPR/Cas9 介导 CMAH 基因敲除猪创制及繁育分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1064-1073.
- Huang LH, Li XR, Long C, et al. CRISPR/Cas9 mediated CMAH gene knockout and breeding analysis of pigs (*Sus scrofa*) [J]. J Agr Biotechnol, 2018, 26(6): 1064-1073.
- [33] 曾国敏, 蒋应弟, 冯冲, 等. 表达人 CD47 基因的巴马小型猪创建及其表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(8): 1251-1258.
- Zeng GM, Jiang YD, Feng C, et al. Generation and expression analysis of human (*Homo sapiens*) CD47 transgenic Bama miniature pig (*Sus scrofa*) [J]. J Agr Biotechnol, 2016, 24(8): 1251-1258.
- [34] Niu D, Wei H, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 [J]. Science, 2017, 357(6357): 1303-1307.
- [35] Yue Y, Xu W, Kan Y, et al. Extensive germline genome engineering in pigs [J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(2): 134-143.
- [36] Boettcher AN, Loving CL, Cunnick JE, et al. Development of severe combined immunodeficient (SCID) pig models for translational cancer modeling: future insights on how humanized SCID pigs can improve preclinical cancer research [J]. Front Oncol, 2018, 8: 559.
- [37] Huang J, Guo X, Fan N, et al. RAG1/2 knockout pigs with severe combined immunodeficiency [J]. J Immunol, 2014, 193(3): 1496.
- [38] Zhang Y, Xue Y, Cao C, et al. Thyroid hormone regulates hematopoiesis via the TR-KLF9 axis [J]. Blood, 2017, 130(20): 2015-2017.
- [39] 顾鹏, 陈傍柱, 徐涛, 等. Hpd 基因修饰制备高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 11-16.
- Gu P, Chen BZ, Xu T, et al. Generation of a Bama minipig model of hereditary tyrosinemia type III by modifying the Hpd gene [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 11-16.
- [40] 杨述林, 任红艳, 王恒, 等. 中国实验用小型猪种群血液生理指标分析[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 38-41.
- Yang SL, Ren HY, Wang H. Investigation on the hematology parameters of Chinese laboratory miniature pig breeds [J]. Chin Anim Husbandry Vet Med, 2007, 34(2): 38-41.
- [41] 詹纯列, 徐本法, 白朝晖. 小型猪及医学实验应用概述[J]. 华南国防医学杂志, 2001, 15(2): 24-28.
- Zhan CL, Xu BF, Bai ZH. Overview of miniature pigs and medical experiment application [J]. Mil Med J S Chin, 2001, 15(2): 24-28.
- [42] 谢忠忱, 尹明, 荀鹏, 等. 开胸与微创方法制备小型猪急性心肌梗死模型的对比研究[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(7): 46-49.
- Xie ZC, Yin M, Gou P, et al. Method comparison of model establishment of acute myocardium infarction induced by open-chest and by minimally invasive in minipigs [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(7): 46-49.
- [43] 王静, 周玉杰, 葛海龙, 等. 冠状动脉结扎与微创方法制备小型猪急性心肌梗死模型的对比研究[J]. 辽宁医学院学报, 2010, 31(5): 397-399.
- Wang J, Zhou YJ, Ge HL, et al. Comparative study of minipigs' acute myocardium infarction model induced by open-chest and minimally invasive methods [J]. J Liaoning Univ, 2010, 31(5): 397-399.
- [44] 刘兴华, 董国礼, 张小明, 等. 介入栓塞法小型猪急性心肌梗死模型的建立[J]. 川北医学院学报, 2015, 30(1): 51-55.
- Liu XH, Dong GL, Zhang XM, et al. Establishment of acute

- myocardial infarction model by interventional em-bolization in mini-pigs [J]. J North Sichuan Med Coll, 2015, 30(1): 51-55.
- [45] 刘录山, 杨永宗, 冯大明, 等. 小型猪动脉粥样硬化斑块稳定性模型研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(2): 196-200.
- Liu LS, Yang YZ, Feng DM. Study on the stability model of atherosclerotic plaque in miniature pigs [J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(2): 196-200.
- [46] Xi S, Yin W, Wang Z, et al. A minipig model of high-fat/high-sucrose diet-induced diabetes and atherosclerosis [J]. Int J Exp Pathol, 2004, 85(4): 223-231.
- [47] 姚峰, 王宗保, 谭翔文, 等. 贵州小型猪 2 型糖尿病动物模型的建立 [J]. 南华大学学报 (医学版), 2004, 32(3): 294-297.
- Yao F, Wang ZB, Tan XW, et al. Establishment of model of type 2 diabetes in miniature pigs [J]. J Nanhua Univ Med Edit, 2004, 32(3): 294-297.
- [48] Lu L, Zhang Q, Pu L. Elevation of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 levels in aortic intima of Chinese Guizhou minipigs with streptozotocin-induced diabetes [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(6): 479-484.
- [49] 陈华, 刘亚千, 李春海, 等. 三个品系小型猪 II 型糖尿病模型的比较研究 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 49-55.
- Chen H, Liu YQ, Li CH. Comparison of three strains of minipigs with induced type II diabetes mellitus [J]. Lab Anim Sci, 2007, 24(6): 49-55.
- [50] Wang L, He FL, Liu FQ, et al. Establishment of a hepatic cirrhosis and portal hypertension model by hepatic arterial perfusion with 80% alcohol [J]. World J Gastroentero, 2015, 21(32): 9544-9553.
- [51] 余小明, 田锟, 钱宁, 等. 贵州小型猪腭裂动物实验模型的建立 [J]. 遵义医学院学报, 2007, 30(1): 23-24.
- She XM, Tian K, Qian N, et al. To set up animal model of Guizhou mini-pig cleft palate [J]. J Zunyi Med Univ, 2007, 30(1): 23-24.
- [52] 田锟, 余小明, 钱宁, 等. 贵州小型猪牙槽嵴裂动物模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 84-85.
- Tian K, She XM, Qian N, et al. Established alveolar cleft model on Guizhou miniature pigs [J]. Lab Anim Sci, 2007, 24(6): 84-85.
- [53] Zhang Y, Wang F, Chen J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus bone marrow nucleated cells in the treatment of chondral defects [J]. Int Orthop, 2012, 36(5): 1079-1086.
- [54] Zhang Y, Tan H, Chen G, et al. One-step strategy for chondral defect repair [J]. Front Biosci, 2019, 24: 628-647.
- [55] He J, Ye J, Li Q, et al. Construction of a transgenic pig model overexpressing polycystic kidney disease 2 (PKD2) gene [J]. Transgenic Res, 2013, 22(4): 861-867.
- [56] He J, Li Q, Fang S, et al. PKD1 mono-allelic knockout is sufficient to trigger renal cystogenesis in a mini-pig model [J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(4): 361-369.
- [57] 冯书堂, 李奎, 刘岚, 等. 小型猪近交系新品种的培育与开发利用 [J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(2): 274-280.
- Feng ST, Li K, Liu L, et al. Cultivation and application of miniature pig (*Sus scrofa*) inbred [J]. J Agri Biotechnol, 2015, 23(2): 274-280.
- [58] 张青峰, 冯书堂. 小型猪品系五指山猪 (WZSP) 的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(14): 161-162.
- Zhang QF, Feng ST. Research progress of Wuzhishan pig (WZSP) [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2007, 13(14): 161-162.
- [59] Fang X, Mou Y, Huang Z, et al. The sequence and analysis of a Chinese pig genome [J]. GigaScience, 2012, 1(1): 16.
- [60] 傅向华, 刘晓坤, 谷新顺, 等. 经导管法冠脉内微球灌注建立小型猪慢性缺血性心力衰竭模型研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(16): 1129-1132.
- Fu XH, Liu XK, Gu XS, et al. Experimental research on establishing chronic ischemic heart failure model of minipig with intracoronary perfusion of plastic microspheres by catheterization [J]. Nat Med J Chin, 2006, 86(16): 1129-1132.
- [61] 张晶, 傅向华, 贾辛未, 等. 小型猪急性心肌梗死后心力衰竭模型的构建 [J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(1): 33-36.
- Zhang J, Fu XH, Jia XW, et al. Establishment of a minipig model of ischemic heart failure with acute myocardial infarction by coronary balloon occlusion and injection of intermixture of microthrombi and plastic microspheres [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(1): 33-36.
- [62] 谢忠忱, 黄广勇, 陈华, 等. 五指山小型猪高脂血症模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(9): 537-540.
- Xie ZC, Huang GY, Chen H. Establishment of hyperlipidemia animal model in Wuzhishan mini-pigs [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(9): 537-540.
- [63] 陈亮, 潘永明, 徐孝平, 等. 五指山小型猪高脂血症模型的心脏自主神经功能变化 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(5): 35-40.
- Chen L, Pan YM, Xu XP. Changes of the autonomic nervous function in Wuzhishan minipig models of hyperlipidemia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(5): 35-40.
- [64] 陈华, 谢忠忱, 黄广勇, 等. 五指山小型猪动脉粥样硬化模型的建立 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 39-43, 80.
- Chen H, Xie ZC, Huang GY, et al. The diet-induced atherosclerosis in Wuzhishan minipigs [J]. Lab Anim Sci, 2007, 24(6): 39-43, 80.
- [65] 汪晶, 潘永明, 徐孝平, 等. 高脂诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型的建立及 Lp-PLA2 的表达调控 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 194-200.
- Wang J, Pan YM, Xu XP, et al. Establishment of a Wuzhishan minipig model of atherosclerosis induced by high fat/cholesterol diet and regulation of Lp-PLA2 expression [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(2): 194-200.
- [66] Kong S, Ruan J, Xin L, et al. Multi-transgenic minipig models exhibiting potential for hepatic insulin resistance and pancreatic

- apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 669–680.
- [67] Li F, Li Y, Liu H, et al. Transgenic Wuzhishan minipigs designed to express a dominant-negative porcine growth hormone receptor display small stature and a perturbed insulin/IGF-1 pathway [J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(6): 1029–1042.
- [68] 丁鳌, 王晓燕, 唐昊喆, 等. 小型猪牙周感染与动脉粥样硬化复合模型的建立 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18(4): 190–194.
- Ding A, Wang XY, Tang HZ. Establishment of periodontal infection and atherosclerosis compound model in minipig [J]. *Chin J Conserv Dent*, 2008, 18(4): 190–194.
- [69] 王飞, 冯冲, 龙川, 等. 利用体细胞 LOH 突变制备 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶基因 (GGTA1) 缺失的五指山小型猪 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(4): 522–527.
- Wang F, Feng C, Long C. Production of $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase gene-deficient Wuzhishan miniature pigs by fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations [J]. *Acta Vet Zootechnica Sci*, 2013, 44(4): 522–527.
- [70] 龙川, 高景波, 唐雨婷, 等. 敲除 $\alpha 1, 3$ -半乳糖基转移酶基因五指山小型猪的繁育和鉴定 [J]. *器官移植*, 2017, 8(2): 121–126.
- Long C, Gao JB, Tang YT. Breeding and identification of Wuzhishan miniature pigs with $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase gene-knockout [J]. *Organ Transplant*, 2017, 8(2): 121–126.
- [71] 邢向阳, 于淑珍, 朱辉斌, 等. 胰岛特异表达 LEA29Y 转基因猪继代遗传分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(6): 1084–1092.
- Xing XY, Yu SZ, Zhu HB, et al. Subgenetic analysis of islet specific LEA29Y in transgenic pigs (*Sus scrofa*) [J]. *J Agric Biotechnol*, 2018, 26(6): 1084–1092.
- [72] Gao H, Zhao C, Xiang X, et al. Production of $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase and cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-deficient pigs by CRISPR/Cas9 and handmade cloning [J]. *J Repro Develop*, 2017, 63(1): 17–26.
- [73] 李楚, 任雪洋, 李琳, 等. GGTA1/ $\beta 4$ GalNT2 双基因敲除近交系五指山小型猪的建立 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 835–840.
- Li C, Ren XY, Li L, et al. Generation of inbred Wuzhishan miniature pigs with GGTA1/ $\beta 4$ GalNT2 double gene knockout [J]. *J Nanjing Med Univ*, 2019, 39(6): 835–840.
- [74] Zhang R, Wang Y, Chen L, et al. Reducing immunoreactivity of porcine bioprosthetic heart valves by genetically-deleting three major glycan antigens, GGTA1/ $\beta 4$ GalNT2/CMAH [J]. *Acta Biomater*, 2018, 72: 196–205.
- [75] 杨程, 倪江东, 张寿, 等. 自体骨髓间充质干细胞和同种异体肋软骨细胞共培养修复五指山小型猪膝关节软骨缺损的实验研究 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017, 42(8): 919–926.
- Yang C, Ni JD, Zhang S, et al. Repair of articular cartilage defects by autologous bone mesenchymal stem cells and allogeneic costal chondrocytes in the knee of Wuzhishan miniature pigs [J]. *J Central South Univ (Med Ed)*, 2017, 42(8): 919–926.
- [76] 连林生, 王鹤云, 徐家珍, 等. 版纳微型猪的生物学特性 [J]. *上海实验动物科学*, 1993, 13(4): 185–191.
- Lian LS, Wang HY, Xu JZ. Biological characteristics of Banna mini pig [J]. *Shanghai Lab Anim Sci*, 1993, 13(4): 185–191.
- [77] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用 [J]. *实验动物科学*, 2007, 24(6): 111–118.
- Feng ST. Experimental cultivation and development and utilization of miniature pig resources in China [J]. *Lab Anim Sci*, 2007, 24(6): 111–118.
- [78] 曾嵘, 苗永旺, 霍金龙, 等. 版纳微型猪近交系 133 家系 SLA-DQ cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(4): 215–221.
- Zeng R, Miao YW, Huo JL. Molecular cloning and characterization of SLA-DQ cDNA of the Banna mini-pig inbred line family 133 [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2005, 13(4): 215–221.
- [79] 霍金龙, 成文敏, 魏红江, 等. 版纳微型猪近交系 SRY 基因编码区序列克隆及生物信息学分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(4): 324–330.
- Huo JL, Cheng WM, Wei HJ. Cloning and bioinformatics analysis of coding region of the SRY gene in Banna mini-pig inbred line (BMI) [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2011, 19(4): 324–330.
- [80] 邓景致. 版纳微型猪近交系生长相关基因遗传背景分析 [D]. 长春: 吉林大学; 2012.
- Deng JZ. Analysis of genetic background of the growth related genes in Banna miniature inbreeding pig [D]. Changchun: Jilin University; 2012.
- [81] 肖国华, 张素君, 余坚, 等. 高糖高脂联合低剂量 STZ 诱导版纳微型猪 2 型糖尿病动物模型的建立 [J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(4): 351–356.
- Xiao GH, Zhang SJ, Yu J, et al. Establishment of model of type 2 diabetes in Chinese Banna miniature pigs induced by high sucrose/high fat diet and STZ [J]. *J Univ South China (Med Ed)*, 2012, 40(4): 351–356.
- [82] 肖国华, 张亚丽, 王月婷, 等. 高糖高脂联合低剂量链脲佐菌素对版纳微型猪骨骼肌糖原合成及肌肉素表达的影响 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(12): 1135–1140.
- Xiao GH, Zhang YL, Wang YT. Effect of high sucrose/high fat diet and Streptozotocin on amylon composition and musclin expression of skeletal muscles in Chinese Banna mini pigs [J]. *Chin J Diabetes*, 2017, 25(12): 1135–1140.
- [83] Xin J, Yang H, Fan N, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84250.
- [84] 龚宝勇, 刘运忠, 曾昭智, 等. 广州地区西藏小型猪的繁殖行为学表现 [J]. *中国实验动物学报*, 2006, 14(4): 315–317.
- Gong BY, Liu YZ, Zeng ZZ. Breeding performance and reproductive behavior of Tibet mini-pigs raised in Guangzhou area [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2006, 14(4): 315–317.

- [85] 岳敏, 范沛, 唐华, 等. 西藏小型猪与高原藏猪的血液生理生化值的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 431-432.
- Yue M, Fan P, Tang H. Comparison of blood physiological and biochemical parameters between Tibetan pigs and Tibet mini-pigs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(5): 431-432.
- [86] 叶永才, 谭伟江, 李想, 等. 西藏小型猪心肌梗死模型的制备及超声动态心功能进展评价 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(1): 43-46, 50, 52.
- Ye YC, Tan WJ, Li X, et al. Preparation of Tibet mini pig for myocardial infarction model, and review on the research of ultrasound dynamic heart function [J]. Guangdong J Anim Vet Sci, 2019, 44(1): 43-46, 50, 52.
- [87] 彭朝权, 王景峰, 杨珂, 等. 经皮球囊封堵冠状动脉法制备小型猪心肌梗死模型及评价 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(9): 1867-1872.
- Peng CQ, Wang JF, Yang K, et al. Establishment of miniature swine myocardial infarction model by percutaneous balloon occlusion method [J]. Chin J Pathophys, 2010, 26(9): 1867-1872.
- [88] 马毅超, 潘永明, 陈亮, 等. 胰岛素抵抗动脉粥样硬化小型猪模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(1): 12-17.
- Ma YC, Pan YM, Chen L, et al. The research of the insulin resistance atherosclerosis model of mini-swine [J]. Chin J Comp Med, 2014, 24(1): 12-17.
- [89] Pan YM, Cai ZW, Ma YC, et al. Involvement of peroxisome proliferator-activated receptors in cardiac and vascular remodeling in a novel minipig model of insulin resistance and atherosclerosis induced by consumption of a high-fat/cholesterol diet [J]. Cardiovasc diabetol, 2015, 14: 6.
- [90] Pan Y, Rong Y, Huang J, et al. Lower cardiovagal tone and baroreflex sensitivity associated with hepatic insulin resistance and promote cardiovascular disorders in Tibetan minipigs induced by a high fat and high cholesterol diet [J]. J Diabetes Complications, 2019, 33(4): 278-288.
- [91] 陈民利. 西藏小型猪和五指山小型猪的生理特点及其动脉粥样硬化的发病特征比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 325-328.
- Chen ML. A comparative study on the physiological characteristics of Tibet mini-pigs and Wuzhishan mini-pigs and the characteristics of atherosclerosis [J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(5): 325-328.
- [92] 郁晨, 刘志华, 潘永明, 等. 高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪冠心病相关血脂和炎症易感基因的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 1-10.
- Yu C, Liu ZH, Pan YM, et al. Expression of coronary artery disease-related blood lipid and inflammatory susceptibility genes in Wuzhishan minipigs and Tibetan minipigs under a high-fat diet environment [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 1-10.
- [93] Yang D, Yang H, Li W, et al. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning [J]. Cell Res, 2011, 21(6): 979-982.
- [94] 吴彩霞, 刘朝明, 颜泉梅, 等. 糖尿病和心血管病相关的重要靶点基因 PPAR γ 过表达转基因克隆猪模型的建立 [J]. 中国兽医学报, 2020, 40(7): 1366-1371.
- Wu CX, Liu CM, Yan QM, et al. Establishment of transgenic pig model of PPAR γ overexpression, an important target gene related to diabetes mellitus and cardiovascular disease [J]. Chin J Vet Sci, 2020, 40(7): 1366-1371.
- [95] Yang D, Wang C, Zhao B, et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(20): 3983-3994.
- [96] Yang H, Wang G, Sun H, et al. Species-dependent neuropathology in transgenic SOD1 pigs [J]. Cell Res, 2014, 24(4): 464-481.
- [97] 吴清洪, 杨朝湘, 邹华章, 等. 猪膝关节早期骨性关节炎模型的建立 [J]. 动物医学进展, 2018, 39(6): 33-37.
- Wu QH, Yang CX, Zou HZ, et al. Establishment of porcine models of early knee osteoarthritis [J]. Prog Vet Med, 2018, 39(6): 33-37.
- [98] Liu W, Wu LH, Yue M, et al. Generation of DKK1 transgenic Tibet minipigs by somatic cell nuclear transfer (SCNT) [J]. Oncotarget, 2017, 8(43): 74331-74339.

[收稿日期] 2021-01-25