

# 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2期 2021年4月30日出版

## 目次

### 研究报告

- 肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)敲除和人源化小鼠模型的建立 ..... 黄艺滢,白琳,雷雪裴,李珂雅,李欣悦,侯丽雅,石桂英(137)
- 基底前脑催产素受体基因沉默对大鼠认知行为和胆碱能通路的影响 ..... 荣翠平,宋双双,侯雪芹(145)
- 羊骨胶原肽钙螯合物对去卵巢大鼠肾组织病变的改善作用 ... 冀霞,段小超,马林峰,韩克光,霍乃蕊(152)
- 蜂王浆对雌性未孕大鼠乳腺组织的影响 ..... 刘一冰,陈恒,徐浩,周桂华,蔺哲广,吉挺(160)
- iTRAQ法分析增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化 ..... 朱明雪,匡海学,兰辛键,梁华(168)
- 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响 ..... 张慧琴,霍乃蕊,冀霞,段卓,马林峰,古少鹏(176)
- SRC激酶和磷酸酶PP1 $\gamma$ 2/PP2A的相互作用对小鼠附睾精子成熟及运动的调控 ..... 吴文静,张昕,谭霞,解道豪,杨明华,李亚辉(183)
- 注射突变p53基因CRISPR/Cas9质粒和肝癌细胞建立肝癌小鼠模型 ..... 王燕鸽,高子涵,李宗霖,王康龙,白雪,李瑞芳,有曼,王红伟(190)
- 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究 ..... 沙依拜·沙比提,丛媛媛,古丽尼歌尔·阿布都米吉提,帕丽达·阿不力孜(197)
- 病毒性皮肤疣小鼠模型的建立 ..... 李丹,蔡方舟,李哲,王卫(204)
- EV71、CA16、CA10三价VP1蛋白疫苗的有效性和安全性研究 ..... 牛栋,赵彬彬,武婧,彭婉君,张丽红,刘江宁(210)
- 2型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 ..... 张译心,王鑫,刘博,纪凤兰,温富春,丁涛,徐惠波(219)

### 研究进展

- 去势抵抗性前列腺癌PDX模型研究进展 ..... 税雪,许荣,赵菊梅,师长宏(230)
- 肺动脉高压动物模型研究进展 ..... 刘云,孙增先(236)

前列腺癌异质性转化 PDX 模型研究进展 ..... 师长宏(242)

非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展 ..... 黄涛,张海涛,李志雄,曹华,王心睿(248)

寨卡病毒母婴传播及动物模型的研究进展 ..... 奎秀莹,代解杰(256)

间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用 ..... 孙庆云,闫振宇(262)

神经退行性疾病动物模型嗅觉障碍的研究进展 ..... 林丽珍,范杰诚,郭培武,朱宗景,丁晨英,张淑云(268)

广告 ..... (封二,封三,内插)

---

<p><b>主 管</b> 中国科学技术协会</p> <p><b>主 办</b> 中国实验动物学会 中国医学科学院医学实验动物研究所</p> <p><b>主 编</b> 秦川</p> <p><b>编辑部主任</b> 李继平</p> <p><b>编 辑</b> 《中国实验动物学报》编辑部</p> <p><b>出 版</b> 《中国实验动物学报》编辑部</p> <p><b>发 行</b> 《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 <a href="http://zgsydw.cnjournals.com/sydwybjyx/ch/index.aspx">http://zgsydw.cnjournals.com/sydwybjyx/ch/index.aspx</a></p> <p><b>本期执行主编</b> 谭毅</p> <p><b>本期责任编辑</b> 陈慧 张悦莹</p>	<p><b>照 排</b> 同方知网(北京)技术有限公司</p> <p><b>印 刷</b> 北京博海升彩色印刷有限公司</p> <p><b>邮发代号</b> 2-748</p> <p><b>广告发布登记</b> 京朝工商广登字 20170142 号</p> <p><b>定 价</b> 每期 50.00 元,全年 300.00 元</p> <p><b>中国标准连续出版物号</b> <u>ISSN 1005-4847</u> CN 11-2986/Q</p> <p>2021 年版权归中国实验动物学会所有</p> <p>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。</p> <p>本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:<a href="http://www.183read.com">www.183read.com</a></p>
--	--

---

---

---

# ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 29, Number 2, April 30, 2021

---

## CONTENTS

- Establishment of TNFRSF4 knockout and humanized mice .....  
..... HUANG Yiyi, BAI Lin, LEI Xuepei, LI Keya, LI Xinyue, HOU Liya, SHI Guiying (137)
- Effects of silencing the oxytocin receptor in the basal forebrain on cognitive behaviors and the cholinergic pathway in rats ..... RONG Cuiping, SONG Shuangshuang, HOU Xueqin (145)
- Sheep bone collagen peptide calcium chelate ameliorates renal tissue lesions in ovariectomized rats .....  
..... JI Xia, DUAN Xiaochao, MA Linfeng, HAN Keguang, HUO Nairui (152)
- Effects of royal jelly on mammary gland tissue of non-pregnant female rats .....  
..... LIU Yibing, CHEN Heng, XU Hao, ZHOU Guihua, LIN Zheguang, JI Ting (160)
- Proteomic changes analyzed by iTRAQ in liver of aging female mice .....  
..... ZHU Mingxue, KUANG Haixue, LAN Xinjian, LIANG Hua (168)
- Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages .....  
..... ZHANG Huiqin, HUO Nairui, JI Xia, DUAN Zhuo, MA Linfeng, GU Shaopeng (176)
- Regulation of the maturation and motility of mouse epididymal sperm by interaction of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A ..... WU Wenjing, ZHANG Xin, TAN Xia, XIE Daohao, YANG Minghua, LI Yahui (183)
- Construction of a hepatocellular carcinoma mouse model by injection of a mutant p53 gene CRISPR/Cas9 plasmid and hepatoma cells .....  
WANG Yange, GAO Zihan, LI Zonglin, WANG Kanglong, BAI Xue, LI Ruifang, YOU Man, WANG Hongwei (190)
- In vivo* anti-tumor activities of *Fomes Officinalis* polysaccharide and the underlying mechanisms .....  
..... SHAYIBAI · Shabiti, CONG Yuanyuan, GULINIGEER · Abudumijiti, PALIDA Abulizi (197)
- Development of a mouse model of papillomavirus-mediated skin wart .....  
..... LI Dan, CAI Fangzhou, LI Zhe, WANG Wei (204)
- Study of the efficacy and safety of a trivalent EV71, CA16, CA10 VP1 protein vaccine .....  
..... NIU Dong, ZHAO Binbin, WU Jing, PENG Wanjun, ZHANG Lihong, LIU Jiangning (210)

Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index ..... ZHANG Yixin, WANG Xin, LIU Bo, JI Fenglan, WEN Fuchun, DING Tao, XU Huibo(219)

Research progress in PDX models of castration-resistant prostate cancer ..... SHUI Xue, XU Rong, ZHAO Jumei, SHI Changhong(230)

Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension ..... LIU Yun, SUN Zengxian(236)

Research progress in patient-derived tumor xenograft models of heterogeneous transformation of prostate cancer ..... SHI Changhong(242)

Research progress in non-human primate virus infection models ..... HUANG Tao, ZHANG Haitao, LI Zhixiong, CAO Hua, WANG Xinrui(248)

Research progress in mother-to-child transmission of Zika virus and animal models ..... KUI Xiuying, DAI Jiejie(256)

Research progress and application of stem cells in the repair of osteoarthritis ..... SUN Qingyun, YAN Zhenyu(262)

Research progress in animal models of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases ..... LIN Lizhen, FAN Jiecheng, GUO Peiwu, ZHU Zongjing, DING Chenying, ZHANG Shuyun(268)

---

**Responsible Institution**

China Association for Science and Technology

**Sponsor**

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

**Editor-in-Chief**

QIN Chuan(秦川)

**Managing Editor**

LI Jiping(李继平)

**Editing**

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

**Publishing**

Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica

**Distributor**

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

**CSSN**

ISSN 1005-4847  
CN 11-2986/Q

**Copyright 2021 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences**

黄艺滢,白琳,雷雪裴,等. 肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)敲除和人源化小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 137-144.

Huang YY, Bai L, Lei XP, et al. Establishment of TNFRSF4 knockout and humanized mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 137-144.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.001

# 肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)敲除和人源化小鼠模型的建立

黄艺滢,白琳,雷雪裴,李珂雅,李欣悦,侯丽雅,石桂英\*

(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】 目的** 建立肿瘤坏死因子受体超家族成员4(TNFRSF4)基因人源化小鼠模型,同时建立TNFRSF4基因敲除小鼠模型,为针对TNFRSF4靶点的肿瘤治疗性抗体研发和筛选提供有效的小鼠模型,并为研究TNFRSF4在免疫过程中的作用机制提供小鼠模型。**方法** 利用CRISPR/Cas9技术,建立TNFRSF4基因人源化和敲除小鼠模型,利用PCR、RT-PCR、免疫组织化学、流式细胞术等方法鉴定及比较分析人源化小鼠、敲除小鼠和野生型小鼠的差异。**结果** 获得表达人源TNFRSF4基因小鼠和TNFRSF4基因敲除小鼠。在TNFRSF4人源化小鼠中稳定表达人源TNFRSF4,未检测到小鼠TNFRSF4表达。在TNFRSF4敲除小鼠中未检测到TNFRSF4表达。TNFRSF4人源化及敲除小鼠出生后6个月内均正常存活,组织病理学表型及免疫系统未见明显异常。**结论** 利用CRISPR/Cas9技术构建TNFRSF4人源化小鼠及敲除小鼠,可用于筛选及评估与TNFRSF4基因相关的治疗性抗体及药物或研究TNFRSF4在免疫过程中作用机制。

**【关键词】** 肿瘤坏死因子受体超家族成员4;人源化;基因敲除;小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0137-08

## Establishment of TNFRSF4 knockout and humanized mice

HUANG Yiying, BAI Lin, LEI Xuepei, LI Keya, LI Xinyue, HOU Liya, SHI Guiying\*

(NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS&PUMC; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: SHI Guiying. E-mail:guiying\_shi77@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (TNFRSF4) knockout and humanized mice for TNFRSF4-targeted cancer therapeutic antibodies development, and to study the function of TNFRSF4 in the immune response. **Methods** The TNFRSF4 knockout and humanized mice were established with the CRISPR/Cas9 method. The mice were characterized by PCR, RT-PCR, HE staining and fluorescence-activated cell sorting. **Results** We successfully generated mice expressing the human TNFRSF4 gene, as well as TNFRSF4 gene knockout mice. TNFRSF4 humanized mice expressed human TNFRSF4, but not murine TNFRSF4. No TNFRSF4 expression was detected in TNFRSF4 knockout mice. TNFRSF4 humanized mice and knockout mice survived normally within 6 months after birth, and there were no obvious abnormalities in histopathology and immune system. **Conclusions** TNFRSF4 humanized mice and knockout mice produced using CRISPR/Cas9 technology can be used as animal models for screening

**【基金项目】**国家自然科学基金面上项目(31672374),中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费(2017-I2M-2-005)。

Funded by National Science Foundation of China(31672374), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(CIFMS)(2017-I2M-2-005).

**【作者简介】**黄艺滢(1991—),女,硕士,专业:细胞生物学。Email:huangyiyi91@163.com

**【通信作者】**石桂英(1977—),女,副主任技师,研究方向:干细胞临床转化。Email:guiying\_shi77@163.com

and evaluating of TNFRSF4-targeted cancer therapeutic antibodies or for studying the role of TNFRSF4 in immune processes.

**【Keywords】** TNFRSF4; humanization; gene knockout; mouse

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

目前免疫检查点阻滞剂在肿瘤免疫治疗中受到很大关注,靶向程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death, PDCD1) 和细胞毒 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA4) 的治疗剂的成功为癌症治疗策略提供了更多的选择<sup>[1-2]</sup>。然而,尽管此疗法在一些患者中能够消除肿瘤并实现患者的长期生存,但并非对所有患者都有效果<sup>[3]</sup>,许多患者对基于免疫检查点阻断的单一药物治疗有抗药性<sup>[4]</sup>。因此,具有不同作用机制或不同靶点的新型免疫调节药物亟待开发<sup>[5-6]</sup>。肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, TNFRSF4) (也称为 OX40 或 CD134) 是 TNF 受体超家族的一员,在活化的 T 细胞上高度表达,有一个已知配体 TNFSF4 (也称为 OX40 L 或 CD252),主要在活化的抗原呈递细胞上表达<sup>[7-8]</sup>。TNFRSF4 与配体结合并激活后, T 细胞中的下游细胞内信号通路激活,导致核因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) 的转录激活<sup>[9]</sup>。目前,在早期癌症临床试验中测试了几种 anti-TNFRSF4 激动性单克隆抗体,越来越多的临床前证据支持其临床发展<sup>[4]</sup>。人类和小鼠的 TNFRSF4 只具有 69.17% 的同源性,为进一步研究 TNFRSF4 相关药物,使用 TNFRSF4 人源化小鼠是更好的选择。

采用 CRISPR/Cas9 的方法将人源 TNFRSF4 基因导入到小鼠的受精卵中,同时敲除小鼠内源 TNFRSF4 基因的表达。TNFRSF4 人源化小鼠 (TNFRSF4<sup>h/h</sup>) 及 TNFRSF4 敲除小鼠 (TNFRSF4<sup>-/-</sup>) 表型正常。通过建立基因结构和调节方式与人类相似的模型,改善 TNFRSF4 在人与小鼠中种属差异导致的在临床测试与动物实验结果差异,从而使药物评价的结果更加客观。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 J (雌性, 3 ~ 4 周龄, 30 只, 7 ~ 12 g; 雄性, 8 周龄, 30 只, 19 ~ 25 g) 及 ICR 小鼠 (雌性, 8 ~ 10 周龄, 8 只, 25 ~ 33 g), 购自北京华

阜康生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2020-0004】并在本所 SPF 级动物屏障环境动物房【SYXK (京) 2019-0014】中长期饲养繁殖。实验中繁殖产生 TNFRSF4<sup>h/h</sup> 和 TNFRSF4<sup>-/-</sup> 及其野生型小鼠, 其中各 10 只用于实验。饲养环境: 温度 20 ~ 26°C, 湿度 40% ~ 70%, 光照周期明暗比 12 h: 12 h。饲养期间小鼠自由进食饮水, 垫料、鼠盒、水瓶、均经过高温高压灭菌处理。涉及动物操作程序和动物实验经本所动物使用与管理委员会 (IACUC) 批准 (批准号: BL18003)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

载体构建: 试剂盒 MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Ambion, Am1354); 试剂盒 mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion, Am1345); 基因型鉴定: EasyPure® Genomic DNA Kit (Transgen, EE101-12); 鼠尾直接 PCR 试剂盒 (Bimake, B45012); 细胞培养: MEM 培养基 (Gibco, 12571063)、胎牛血清 (Gibco, 10099141C)、青链霉素 (Gibco, 15140122)、CD3 抗体 (Santa, sc-20047); RT-PCR: TRIzol (Invitrogen, 15596018); 反转录试剂盒 (Thermo, K1682); 流式细胞术: 红细胞裂解液 (BD, 555899); 抗体: CD4、B220、CD8、CD11b、NK1.1、CD3、TNFRSF4 (Invitrogen)。

多样品研磨珠均质仪 (OMNI, Bead Ruptor 24 Elite); 电泳仪 (Bio-Rad); PCR 仪 (Hema); 细胞培养箱 (Thermo); 流式细胞仪 (BD FACSAria); 组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 载体构建

小鼠 TNFRSF4 基因位于第四号染色体的 4E2 区段 (Chromosome 4: 156,013,843-156,016,612, ENSMUSG0000029075)。针对该基因, 设计并合成一对向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 作用靶点 (上海英潍捷基), 分别为靶点 1: 5'-CCTGTC CGCCTACTCTTCTTG-3' (寡核苷酸序列为: m-TNFRSF4-gRNA UP1: 5'-TAGCCAAGAAGAGTAG GCGGAC-3' 和 m-TNFRSF4-gRNA DOWN1: 5'-AAACGTCCGCCTACTCTTCTTG-3') 和靶点 2: 5'-CTTTGAGATGTACTGGCCGGG-3' (寡核苷酸序列

为: m-TNFRSF4-gRNA UP2 : 5'-TAGGCTTTGAGATGTAGTGGCC-3' 和 m-TNFRSF4-gRNA DOWN2 : 5'-AAACGGCCACTACATCTCAAAG-3')。克隆测序结果正确的用于后续实验。将合成的 TNFRSF4 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段。用 Bsa I 酶切 pUC57-sgRNA 表达载体使其线性化, 然后与 TNFRSF4 sgRNA 双链进行连接。

构建完成的 sgRNA 载体和 pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 载体分别利用试剂盒 T7 Transcription Kit 或 T7 ULTRA Transcription Kit 通过体外转录成为可注射的 sgRNA 和 Cas9-RNA。

### 1.2.2 显微注射

将 sgRNA 与 Cas9-RNA 混合, 用显微注射法注射于 C57 小鼠受精卵中, 用 ICR 雌鼠作为假孕受体, 将注射后的受精卵移植到受体鼠输卵管壶腹部, 等待小鼠出生。

### 1.2.3 基因型鉴定

小鼠出生后进行编号, 并取尾尖进行鉴定。使用 EasyPure<sup>®</sup> Genomic DNA Kit 提取基因组 DNA, 根据人源化小鼠序列信息分别设计 2 对人源化及 1 对野生检测引物(上海英潍捷基), 2 对人源化检测引物分别为: M-TNFRSF4-UP-S: 5'-CAACACCATGCAGCTCACAACACTGCC-3', M-TNFRSF4-UP-A: 5'-TGTCCTCACAGATTGCGTCC-3' (产物 1451 bp) 和 M-TNFRSF4-DOWN-S: 5'-CAGAAGTGGGAGTGAGCGG-3', M-TNFRSF4-DOWN-A: 5'-TCTGCTTGAGTCACTTCCACTTC-3' (产物 1696 bp), 可以分别检测转入人源 TNFRSF4 基因的上游和下游; 1 对野生引物为 M-TNFRSF4-WT-S: 5'-GTTTACCCTGCCTA TAACTCTAGCTC-3' 和 M-TNFRSF4-WT-A: 5'-CTTCATTGTAGAAGCCAGTCTCACAC-3', 检测鼠源 TNFRSF4 基因。使用 2 对人源化检测引物时, 人源化小鼠子代 PCR 产物中 TNFRSF4 人源基因上下游表达, 且大小正确, 则小鼠含有该人源基因且插入位置正确, 为杂合或纯合小鼠, 若同时使用野生引物检测未表达鼠源 TNFRSF4 基因(产物 886 bp), 则为人源化纯合小鼠。

根据敲除小鼠序列信息设计 1 对敲除引物为 M-TNFRSF4-KO-F: 5'-TGCCTGTCCGCTACTCTTC-3' 和 M-TNFRSF4-KO-R: 5'-CTTTCAAACCCCTACCCTATACTTCTG-3', 检测敲除小鼠基因型。使用敲除引物时, 小鼠子代 PCR 产物中若含有 1964 pb 的片段, 则小鼠含有正常鼠源 TNFRSF4 基因, 若含有

503 bp 的片段, 则小鼠含有敲除后的 TNFRSF4 基因, 敲除小鼠子代若只含有敲除后的 TNFRSF4 基因而无正常鼠源基因, 则为纯合敲除小鼠。

使用鼠尾直接 PCR 试剂盒进行 PCR, 扩增程序为 95°C 15 min; (95°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 2 min) × 30 循环; 72°C 10 min。使用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳。随后, 选取包含突变的 PCR 产物进行 TA 克隆, 并进行测序分析, 确定 DNA 缺失片段信息。

### 1.2.4 逆转录 PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测 TNFRSF4 mRNA 在小鼠各组织中的表达

取后续繁育的雌性 TNFRSF4 人源化小鼠纯合 (*TNFRSF4<sup>h/h</sup>*) (3 月龄) 及其同窝野生 (*TNFRSF4<sup>m/m</sup>*) 各 1 只, 取心、肝、脾、肺、肾、胸腺、脑、骨髓, 用 TRIzol 分离总 RNA, 并使用反转录试剂盒获得 cDNA。根据序列信息分别设计 1 对人源及 1 对小鼠源 TNFRSF4 mRNA 检测引物(上海英潍捷基), 分别为 hTNFRSF4-F: 5'-TGGGCTGGGGCTGAGC-3', hTNFRSF4-R: 5'-TTGTAGCTGTCCAGGGGCTGG-3', TM 为 65°C, 产物 304 个碱基对; 和 mTNFRSF4-F: 5'-CATCCGTGTGAGACTGGCTT-3', mTNFRSF4-R: 5'-AGCTGTTTCCCCAACAAGGT-3', TM 为 60°C, 产物 580 个碱基对。并设计一对内参检测引物  $\beta$ -actin-F: 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3',  $\beta$ -actin-R: 5'-TTGATGTCACGCACGATTTTC-3', TM 为 60°C, 产物 223 个碱基对。

### 1.2.5 HE 染色检测淋巴细胞在各组织中的分布

选用 3 月龄的 *TNFRSF4<sup>h/h</sup>* 雄性小鼠和同窝 *TNFRSF4<sup>m/m</sup>* 小鼠、2 月龄 *TNFRSF4<sup>-/-</sup>* 雄性小鼠和同窝 *TNFRSF4<sup>+/+</sup>* 小鼠各 2 只, 福尔马林固定 24 h 以上, 取心、肝、脾、肺、肾、胸腺、脑、骨髓脱水、包埋、切片, 最后进行 HE 染色。

### 1.2.6 流式细胞术检测小鼠外周血中各类细胞的比例

*TNFRSF4<sup>h/h</sup>* 小鼠 7 只和同窝 *TNFRSF4<sup>m/m</sup>* 小鼠 5 只, 取外周血 100  $\mu$ L (EDTA 抗凝), 使用红细胞裂解液去除红细胞。每管血中加入 40  $\mu$ L PBS + CD4 (FITC)、NK1.1 (PE)、CD3 (PerCP-Cy5.5)、B220 (PE-Cy7)、CD8 (APC)、CD11b (APC-Cy7) 小鼠单克隆抗体各 0.5  $\mu$ L。避光 4°C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 1500 r/min 离心 5 min, 200  $\mu$ L PBS 重悬, 使用流式细胞仪分析染色细胞, FlowJo 软件计算细胞表面抗原阳性表达率。

### 1.2.7 流式细胞术检测 TNFRSF4 在基因敲除小鼠脾中的表达

取 TNFRSF4 敲除小鼠纯合 ( $TNFRSF4^{-/-}$ ) 及其同窝野生型 ( $TNFRSF4^{+/+}$ ) 小鼠各 2 只 (2 月龄, 雌雄各半), 获取脾细胞后用 MEM 培养基加入 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素, 在 37℃ 及 5%  $CO_2$  环境中培养, 并用 CD3 抗体 (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激培养 4 d。每管血中加入 40  $\mu\text{L}$  PBS、CD4 (FITC)、CD3 (PerCP-Cy5.5)、TNFRSF4 (PE-Cy7)、CD8 (APC) 小鼠单克隆抗体各 0.5  $\mu\text{L}$ 。避光 4℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 1500 r/min 离心 5 min, 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬, 使用流式细胞仪分析染色细胞, FlowJo 软件计算细胞表面抗原阳性表达率。

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建

pUC57-sgRNA 表达载体经 Bsa I 酶切线性化, 合成的 TNFRSF4 sgRNA 双链的粘性末端与表达载体 Bsa I 酶切后的粘性末端相匹配, 两者连接, 成功构建 TNFRSF4 sgRNA 表达载体, 经测序验证序列

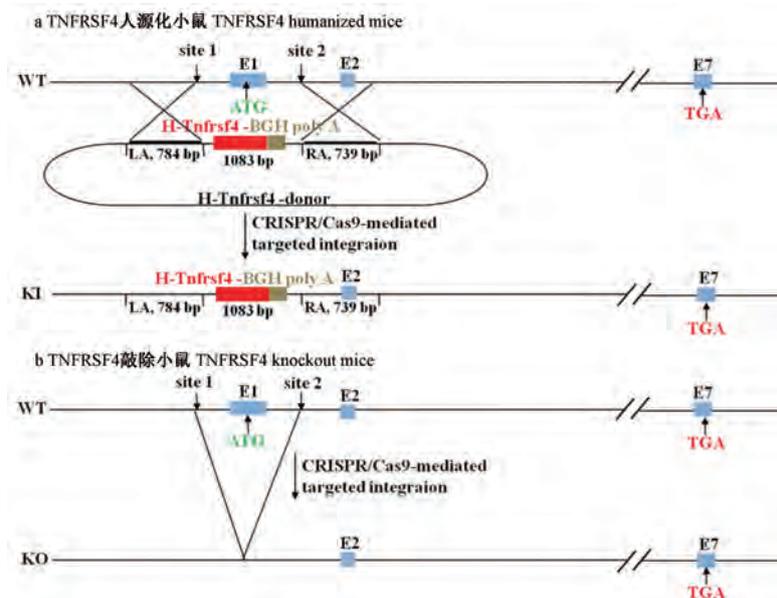
正确。

### 2.2 TNFRSF4 敲除及人源化小鼠的构建

按照实验方案 (图 1), 将转录后的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合后通过显微注射技术注射到 C57 小鼠受精卵中, 移植到 ICR 假孕鼠子宫内, 第 1 批出生 23 只幼仔, 第 2 批出生 22 只幼仔, 使用 PCR 进行基因型鉴定。根据 PCR 结果, 选取分子量不同于野生型条带的 PCR 产物测序并与野生型小鼠 TNFRSF4 基因序列比较。结果显示, 第 1 批小鼠中, 2#, 7# 小鼠发生基因敲入, 第 2 批小鼠中, 7# 小鼠发生基因敲除。将 F0 代小鼠与 C57 小鼠进行杂交, 获得杂合子  $TNFRSF4^{h/m}$  或  $TNFRSF4^{+/-}$ , 将杂合子互交并将子代进行基因型鉴定 (图 2), 得到纯合敲入或敲除小鼠  $TNFRSF4^{h/h}$  或  $TNFRSF4^{-/-}$ 。

### 2.3 TNFRSF4 敲除及人源化小鼠组织中 TNFRSF4 的表达

为了鉴定人源化小鼠是否在蛋白水平发生 TNFRSF4 敲除或人源化转入, 取 3 月龄小鼠外周血进行流式细胞鉴定, 使用种属反应性为小鼠的 TNFRSF4 抗体检测 TNFRSF4 表达 (图 3a)。结果显



注: 在 sgRNA 和 Cas9 mRNA 的参与下, 小鼠 TNFRSF4 第一外显子被剪切; a: 使用人 TNFRSF4 的 CDS 区及 BGH Poly A 组成的 1083 bp 阅读框, 成功替换了小鼠 TNFRSF4 第一外显子的编码区, 建立 TNFRSF4 人源化小鼠; b: 阅读框未能替换小鼠 TNFRSF4 第一外显子的编码区, 建立 TNFRSF4 敲除小鼠。

图 1 TNFRSF4 人源化及敲除小鼠建立方案

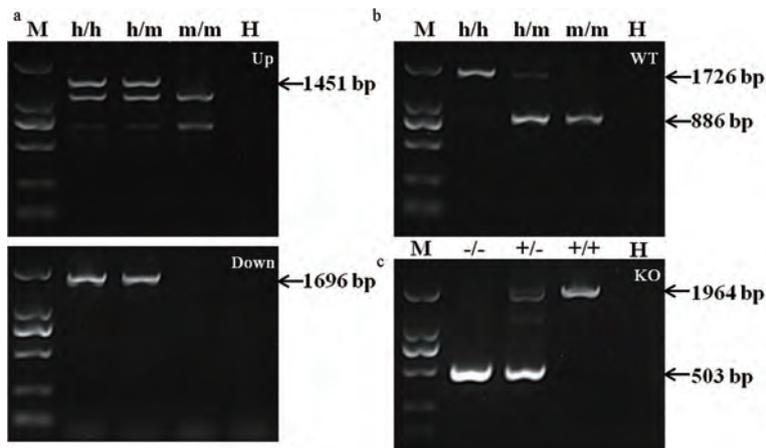
Note. With the participation of sgRNA and Cas9 mRNA, the first exon of mouse TNFRSF4 was cut. a. The 1083 bp reading frame composed of the CDS region of human TNFRSF4 and BGH Poly A was used to replace the coding region of the first exon of mouse TNFRSF4 to establish a humanized TNFRSF4 mouse. b. The reading frame did not replace the coding region of the first exon of mice TNFRSF4 and a TNFRSF4 knockout mice was established.

Figure 1 Establishment of TNFRSF4 humanization and knockout mice

示,在 *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> 小鼠的外周血中, *TNFRSF4* 表达被敲除。

由于市售蛋白抗体无法区分人源与小鼠源 *TNFRSF4* 蛋白,使用 RT-PCR 鉴定 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 和

*TNFRSF4*<sup>m/m</sup> 小鼠各组织中 mRNA 表达(图 3b)。结果可见人特异性引物只能扩增 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠的 cDNA,而小鼠特异性引物也只能扩增 *TNFRSF4*<sup>m/m</sup> 的 cDNA,结果可见在 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠中,鼠源

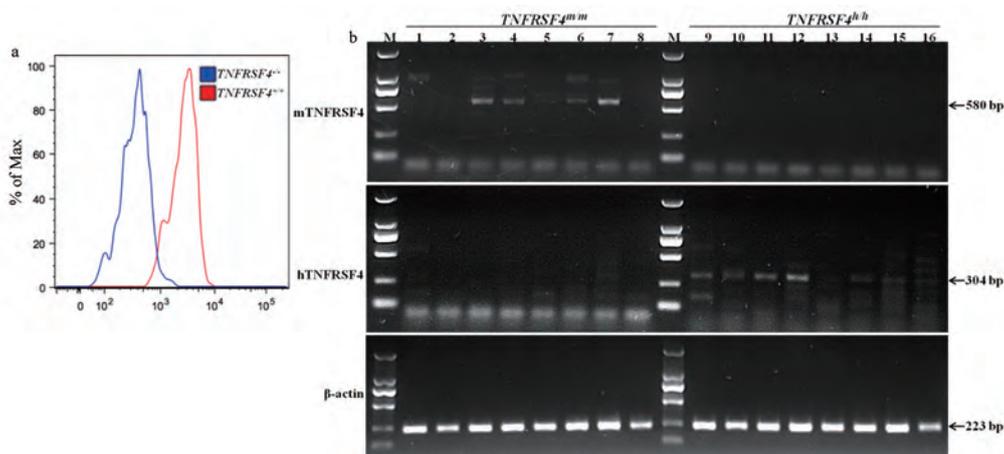


注:使用 PCR 鉴定子代小鼠基因型,突变可传代;M:Marker(TaKaRa, DL2000);H: 水;h/h: *TNFRSF4* 人源化纯合子小鼠;h/m: *TNFRSF4* 人源化杂合子小鼠;m/m: 同窝野生型小鼠;a: 鉴定使用引物 M-*TNFRSF4*-UP, M-*TNFRSF4*-DOWN; b: 鉴定使用引物 M-*TNFRSF4*-WT; c: -/-: *TNFRSF4* 基因敲除纯合子小鼠; +/-: *TNFRSF4* 基因敲除杂合子小鼠; +/+ : 野生型小鼠;使用鉴定引物 M-*TNFRSF4*-KO。

图 2 PCR 鉴定子代小鼠基因型

Note. Offspring mice were identified by PCR, the mutation can be transmitted. M.Marker(TaKaRa, DL2000). H. H<sub>2</sub>O. h/h. Humanized *TNFRSF4* homozygous mouse. h/m. Humanized *TNFRSF4* heterogeneous mouse. m/m. Wild-type mice. a. Identification used primers M-*TNFRSF4*-UP and M-*TNFRSF4*-DOWN. b. Identification used primers M-*TNFRSF4*-WT. c. -/-: *TNFRSF4* knock-out mice. +/-: *TNFRSF4* heterogeneous mice. +/+ : Wild-type mice. Identification used primers M-*TNFRSF4*-KO.

Figure 2 Identify the genotype of the offspring mice by PCR



注:a: 流式细胞术统计 *TNFRSF4*<sup>+/+</sup> 和 *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> 小鼠培养的脾细胞中 CD3+CD4+T 细胞中 *TNFRSF4*<sup>+</sup> 细胞的直方图;b: *TNFRSF4* 在 *TNFRSF4*<sup>m/m</sup>(1~8) 和 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠(9 ~ 16)心(1,9)、肝(2,10)、脾(3,11)、肺(4,12)、肾(5,13)、胸腺(6,14)、脑(7,15)、骨髓(8,16)中的表达;h*TNFRSF4*: 人特异性 *TNFRSF4* 引物;m*TNFRSF4*: 小鼠特异性 *TNFRSF4* 引物;β-actin: 小鼠特异性 β-actin 引物;M: Marker (TaKaRa, DL2000)。

图 3 *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> 及 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠中 *TNFRSF4* 表达

Note. a. Proportion of *TNFRSF4*<sup>+</sup> cells in CD3+CD4+T cells of splenocytes by flow cytometry. b. Expression of *TNFRSF4* in heart (1,9), liver (2, 10), spleen (3,11), lung (4,12), kidney (5,13), thymus (6,14), brain (7,15) and bone marrow (8,16) of *TNFRSF4*<sup>m/m</sup>(1~8) and *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> mice (9 ~ 16). h*TNFRSF4*. Human-specific *TNFRSF4* primer. m*TNFRSF4*. Mouse-specific *TNFRSF4* primer. β-actin. Mouse-specific β-actin primer. M. Marker (TaKaRa, DL2000).

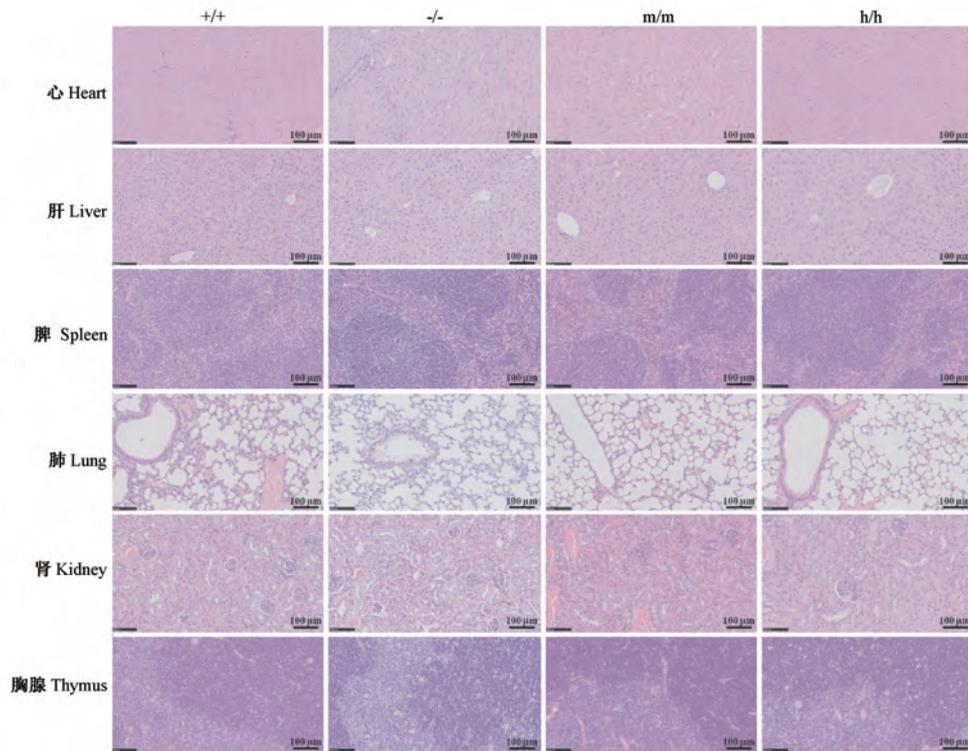
Figure 3 *TNFRSF4* expression in *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> and *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> mice

TNFRSF4 被人源替代。

### 2.4 人源 TNFRSF4 基因可正常替代小鼠 TNFRSF4 基因

HE 染色结果显示,在 *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> 小鼠及 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠的各组织中,没有观察到淋巴细胞的浸润(图 4),且全身病理检查未发现异常。结果表明,*TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 及 *TNFRSF4*<sup>-/-</sup> 小鼠发育正常,在 6 个月内没有观察到自身免疫性疾病发展的迹象。利用

流式细胞术检测了 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠外周血中各类细胞的比例,发现其外周血中 B 细胞(B220<sup>+</sup>)、T 细胞(CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)、粒细胞(CD11b<sup>+</sup>)和 NK(NK1.1<sup>+</sup>)细胞的比例都没有明显差异(图 5)。结果说明人源化 TNFRSF4 基因后没有改变正常生理状态下小鼠免疫系统的组成。因此,在 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠中,人源 TNFRSF4 等位基因可以替代小鼠 TNFRSF4 基因。

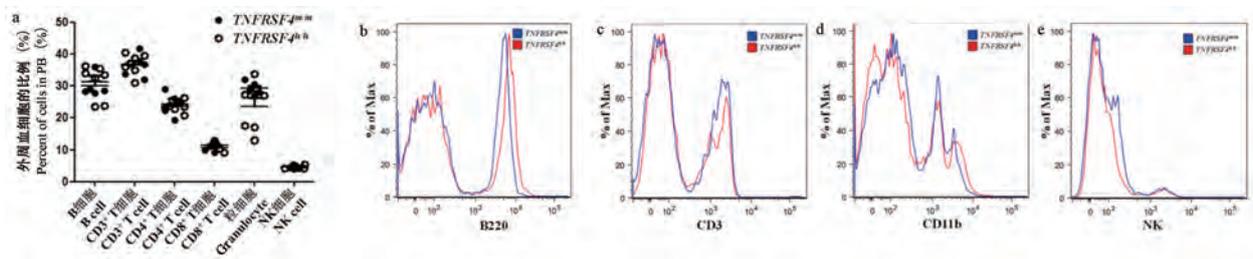


注:m/m;野生型小鼠;h/h;TNFRSF4 人源化纯合子小鼠;+/+:野生型小鼠;-/-;TNFRSF4 基因敲除纯合子小鼠。

图 4 组织 HE 染色

Note. m/m. Wild-type mice. h/h. Humanized TNFRSF4 mice. +/+. Wild-type mice. -/-. TNFRSF4 knockout mice.

Figure 4 Tissue HE staining



注:a;流式细胞术统计不同免疫细胞在外周血中的比例;b ~ e;流式细胞术检测外周血中 B220(b), CD3(c), CD11b(d), NK1.1(e) 表达。

图 5 在 *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> 小鼠外周血中不同免疫细胞的比例

Note. a. Proportion of different immune cells in peripheral blood by flow cytometry. b~e. Expression of B220(b), CD3(c), CD11b(d), NK1.1 (e) in peripheral blood by flow cytometry.

Figure 5 Proportion of different immune cells in peripheral blood of *TNFRSF4*<sup>h/h</sup> mice

### 3 讨论

TNFRSF4 最初被鉴定为 T 细胞活化标志物<sup>[10]</sup>, 在之后的研究中发现它是具有共刺激功能的 NGFR/TNFR 超家族成员<sup>[11-14]</sup>。TNFRSF4 可以在活化的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞上表达, 但是在静止的初始 T 细胞或大多数静止的记忆 T 细胞上都没有发现<sup>[10-12]</sup>。尽管长期以来人们一直认为 TNFRSF4 表达仅限于活化的常规 T 细胞, 但现在已经在活化的调节性 T 细胞<sup>[15]</sup>, NK 细胞<sup>[16-17]</sup>, NKT 细胞<sup>[18-19]</sup> 和嗜中性粒细胞<sup>[20]</sup> 上发现了它。

TNFRSF4 敲除小鼠在正常情况下无明显病理反应, 研究表明, TNFRSF4 敲除小鼠免疫后产生的初始效应 CD4<sup>+</sup> T 细胞要更少, 并且对 TNFRSF4 基因敲除动物或缺乏 TNFRSF4 的 CD4<sup>+</sup> T 细胞的研究进一步阐明了, TNFRSF4-TNFSF4 的相互作用在初始 T 细胞的有效克隆扩增和产生有效的初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答中起了重要作用<sup>[21-24]</sup>。

抗 CTLA4 抗体 ipilimumab (Yervoy®) 在 2011 年获得批准, 通过显著提高转移性黑色素瘤患者的长期生存率, 改变了免疫肿瘤学领域。从那时起, 许多其他免疫肿瘤学药物已进入临床开发。除了检查点抑制剂外, 这些还包括共刺激分子, 例如 TNFRSF4 和糖皮质激素诱导的 TNFR 相关蛋白等<sup>[2, 25-26]</sup>。然而, 由于 T 细胞的系统性活化, CTLA4 阻断抗体与严重的免疫相关不良事件有关, 这限制了它们的使用<sup>[27-28]</sup>。与 CTLA4 相似, 在肿瘤微环境中, TNFRSF4 在活化的 T 细胞上表达高度上调<sup>[29-31]</sup>。目前, 几种抗 TNFRSF4 单克隆抗体正在作为单一疗法或与检查点抑制剂联用进行临床开发<sup>[32-34]</sup>。有文献表明, 将检查点抑制剂与 T 细胞共刺激性激动抗体组合可以通过增强 T 细胞扩增和效应子功能, 同时控制 Tregs 的抑制功能, 将冷肿瘤转变为热肿瘤<sup>[35-36]</sup>。与单特异性抗体相比, 通过靶向在肿瘤中过度表达的两个受体, 有可能增加对肿瘤区域的定位, 并且降低全身性 T 细胞活化的风险并提高疗效。由于人类和小鼠的 TNFRSF4 只具有约 70% 的同源性, 为进一步研究 TNFRSF4 相关药物, 使用 TNFRSF4 人源化小鼠可以更好的与临床接轨。TNFRSF4 基因人源化小鼠的免疫应答是在自然环境中产生的, 可以用于评估与潜在人类治疗性抗体相关的自身免疫副作用的能力。

因此, 本研究建立的 TNFRSF4 人源化小鼠模型

可以改善 TNFRSF4 在人与小鼠中种属差异导致的实验结果差异, 从而使药物评价的结果更加客观, 为治疗性抗体的验证提供了更有价值的实验动物模型。同时, 建立的 TNFRSF4 敲除小鼠为 TNFRSF4 在免疫过程中的作用机制研究提供了小鼠模型。

#### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade [J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1350-1355.
- [ 2 ] Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(9): 1069-1086.
- [ 3 ] Swart M, Verbrugge I, Beltman JB. Combination approaches with immune-checkpoint blockade in cancer therapy [J]. *Front Oncol*, 2016, 6: 233.
- [ 4 ] Aspeslagh S, Postel VS, Rusakiewicz S, et al. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 52: 50-66.
- [ 5 ] Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle [J]. *Immunity*, 2013, 39(1): 1-10.
- [ 6 ] Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point [J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 321-330.
- [ 7 ] Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134) [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 57-78.
- [ 8 ] Jacquemin C, Augusto JF, Scherlinger M, et al. OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE [J]. *JCI Insight*, 2018, 3(24): e122167.
- [ 9 ] Vanamee ES, Faustman DL. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling [J]. *Sci Signal*, 2018, 11(511): ea04910.
- [ 10 ] Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, et al. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts [J]. *Mol Immunol*, 1987, 24(12): 1281-1290.
- [ 11 ] Mallett S, Fossum S, Barclay AN. Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes - a molecule related to nerve growth factor receptor [J]. *EMBO J*, 1990, 9(4): 1063-1068.
- [ 12 ] Calderhead DM, Buhlmann JE, van den Eertwegh AJ, et al. Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions [J]. *J Immunol*, 1993, 151(10): 5261-5271.
- [ 13 ] Godfrey WR, Fagnoni FF, Harara MA, et al. Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4 + T cells with homology to tumor necrosis factor [J]. *J Exp Med*, 1994, 180(2): 757-762.
- [ 14 ] Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, et al. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses [J]. *J Immunol*, 1998, 161(12): 6510-6517.
- [ 15 ] So T, Lee SW, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB [J]. *Cytokine Growth*

- Factor Rev, 2008, 19(3-4): 253-262.
- [16] Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, et al. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions [J]. *J Immunol*, 2004, 173(6): 3716-3724.
- [17] Liu C, Lou Y, Lizée G, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3): 1165-1175.
- [18] Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(8): 2347-2357.
- [19] Zaini J, Andarini S, Tahara M, et al. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4+ Th cell antitumor immunity in mice [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3330-3338.
- [20] Baumann R, Yousefi S, Simon D, et al. Functional expression of CD134 by neutrophils [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(8): 2268-2275.
- [21] Kopf M, Ruedl C, Schmitz N, et al. OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL Responses after virus infection [J]. *Immunity*, 1999, 11(6): 699-708.
- [22] Song J, Salek AS, Rogers PR, et al. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(2): 150-158.
- [23] Jember AG, Zuberi R, Liu FT, et al. Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40 [J]. *J Exp Med*, 2001, 193(3): 387-392.
- [24] Song J, So T, Cheng M, et al. Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion [J]. *Immunity*, 2005, 22(5): 621-631.
- [25] Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, et al. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 39.
- [26] Tang J, Shalabi A, Hubbard-Lucey VM. Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(1): 84-91.
- [27] Hodi FS. Overcoming immunological tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4 [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2010, 6: 16-23.
- [28] Bertrand A, Kostine M, Barnette T, et al. Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Med*, 2015, 13: 211.
- [29] Vetto JT, Lum S, Morris A, et al. Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers [J]. *Am J Surg*, 1997, 174(3): 258-265.
- [30] Montler R, Bell RB, Thalhofer C, et al. OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer [J]. *Clin Transl Immunology*, 2016, 5(4): e70.
- [31] Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, et al. Fc Effector function contributes to the activity of human anti-CTLA-4 antibodies [J]. *Cancer cell*, 2018, 33(4): 649-663.e4.
- [32] Emerson DA, Redmond WL. Overcoming tumor-induced immune suppression: from relieving inhibition to providing costimulation with T cell agonists [J]. *BioDrugs*, 2018, 32(3): 221-231.
- [33] Mayes PA, Hance KW, Hoos A. The promise and challenges of immune agonist antibody development in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(7): 509-527.
- [34] Glisson BS, Leidner RS, Ferris RL, et al. Safety and clinical activity of MEDI0562, a humanized OX40 agonist monoclonal antibody, in adult patients with advanced solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(20): 5358-5367.
- [35] Redmond WL, Linch SN, Kasiewicz MJ. Combined targeting of costimulatory (OX40) and coinhibitory (CTLA-4) pathways elicits potent effector T cells capable of driving robust antitumor immunity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(2): 142-153.
- [36] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218.

[收稿日期] 2021-01-11

荣翠平,宋双双,侯雪芹. 基底前脑催产素受体基因沉默对大鼠认知行为和胆碱能通路的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 145-151.

Rong CP, Song SS, Hou XQ. Effects of silencing the oxytocin receptor in the basal forebrain on cognitive behaviors and the cholinergic pathway in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 145-151.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.002

# 基底前脑催产素受体基因沉默对大鼠认知行为和胆碱能通路的影响

荣翠平<sup>1</sup>, 宋双双<sup>2</sup>, 侯雪芹<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学, 第二临床医学院, 广州 510006; 2. 山东第一医科大学, 药学院药理学研究所, 山东 泰安 271016)

**【摘要】** 目的 胆碱能系统损伤是阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)的重要发病机制,但单纯应用拟胆碱药物治疗AD效果不理想,这可能与其复杂的网络通路有关。本研究旨在建立一种基底前脑Meynert基底核(nucleus basalis of Meynert, NBM)催产素受体(oxytocin receptor, OXTR)基因沉默的大鼠模型,评价OXTR敲低对认知行为和胆碱能通路的影响,为研究AD的复合治疗靶点提供基础。**方法** (1)利用重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)和短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)介导的基因干扰技术,将不同稀释倍数的rAAV9-EGFP-Oxtr-shRNA(OXTR-shRNA)病毒注射至大鼠基底前脑NBM区,分别于注射后2、3、4、5周,观察各组脑组织NBM区EGFP荧光表达,比较病毒感染效果,确定最佳的病毒感染剂量与感染时间进行下一步实验。(2)将大鼠随机分为假手术(Sham)组、阴性对照病毒(Con-shRNA)组、OXTR沉默(OXTR-shRNA)组, Morris水迷宫和避暗实验检测大鼠的空间学习记忆和恐惧记忆;免疫荧光染色检测NBM区OXTR蛋白表达水平,评估OXTR沉默效果;ELISA法检测大鼠皮质区乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)水平变化;免疫荧光染色检测皮质区乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)的表达。**结果** (1)OXTR-shRNA的感染效果呈剂量和时间依赖性;(2)OXTR-shRNA组大鼠在水迷宫实验中的逃避潜伏期高于假手术组和Con-shRNA组;在避暗实验的巩固阶段,OXTR-shRNA组大鼠进入暗箱的潜伏期低于假手术组和Con-shRNA组;免疫荧光染色结果显示OXTR-shRNA组NBM区OXTR表达减少;OXTR-shRNA组皮质中Ach水平以及ChAT表达低于另外两组。**结论** 成功建立了一种基底前脑OXTR敲减动物模型,该模型具有学习记忆障碍、胆碱能系统损伤的表型,将为认知功能障碍相关疾病的研究提供依据。

**【关键词】** 重组腺相关病毒;催产素受体;基底前脑;学习记忆;胆碱能系统

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0145-07

## Effects of silencing the oxytocin receptor in the basal forebrain on cognitive behaviors and the cholinergic pathway in rats

RONG Cuiping<sup>1</sup>, SONG Shuangshuang<sup>2</sup>, HOU Xueqin<sup>2\*</sup>

(1. Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China.

2. Institute of Pharmacology, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271016)

Corresponding author: HOU Xueqin. E-mail: xqhhou@tsmc.edu.cn

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81703901),山东省重点研发项目(2019GSF108069)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81703901), the Key Research and Development Project of Shandong Province (2019GSF108069).

**【作者简介】** 荣翠平(1987—),女,在读博士研究生,研究方向:中医药治疗神经退行性疾病。Email:rcp0220@163.com

**【通信作者】** 侯雪芹,女,医学博士,硕士生导师,研究方向:神经药理学。Email:xqhhou@tsmc.edu.cn

**【Abstract】 Objective** Dysfunction of the cholinergic system is an important pathogenetic feature of Alzheimer's disease (AD). However, the efficacy of cholinomimetic agents in treating AD is low, which may be related to the complexity of the affected pathways. In this study, we established an animal model of oxytocin receptor (OXTR) gene silencing in the nucleus basalis of Meynert (NBM) in the basal forebrain, and we investigated the effects of silencing on learning and memory behaviors and on the cholinergic pathway. **Methods** Recombinant adeno-associated virus (rAAV) containing short hairpin RNA (shRNA) to the OXTR gene (rAAV9-EGFP-Oxtr-shRNA (OXTR-shRNA)) was injected at different dosages into the NBM region of the basal forebrain. Then, 2, 3, 4 and 5 weeks later, EGFP expression was measured to assess the rate of infection. An optimal dose of OXTR-shRNA and infection duration were selected for subsequent experiments. Rats were randomly divided into Sham, negative control shRNA (Con-shRNA) and OXTR-shRNA groups. Morris water maze and light-dark box were used to assess spatial learning and fear memory, respectively. To evaluate the effect of silencing on OXTR protein expression, immunofluorescence staining was used to detect the protein in the NBM region. Acetylcholine (Ach) level and the expression of choline acetyltransferase (ChAT) protein in the cortex were assessed by ELISA and immunofluorescence staining, respectively. **Results** The effects of OXTR-shRNA infection showed dose-dependency and time-dependency. In the water maze test, escape latency was longer in the OXTR-shRNA group than in the Sham and Con-shRNA groups. During the consolidation stage of the light-dark box test, the latency to enter the dark chamber was shorter in the OXTR-shRNA group than in the Sham and Con-shRNA groups. Immunofluorescence staining showed that OXTR expression was decreased in the NBM in the OXTR-shRNA group. Ach levels and ChAT expression in the cortex were reduced in the OXTR-shRNA group compared with the two other groups. **Conclusions** An animal model of OXTR gene silencing in the basal forebrain was successfully established in this study. This animal model has phenotypes of learning and memory impairment and cholinergic system damage, and therefore can be used to study diseases associated with cognitive dysfunction.

**【Keywords】** recombinant adeno-associated virus; oxytocin receptor; basal forebrain; learning and memory; cholinergic system

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

中枢胆碱能神经系统损伤是阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 关系最密切的信号通路之一, 乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 减少时可导致认知功能障碍<sup>[1]</sup>。与 Ach 相似, 催产素能神经纤维末梢释放的催产素可作为神经递质, 释放到大脑的不同脑区<sup>[2]</sup>, 并且催产素信号系统可能与毒蕈碱乙酰胆碱信号相互作用, 调节认知状态过程<sup>[3]</sup>。催产素通过其受体发挥作用<sup>[4]</sup>。以胆碱能神经元为主的基底前脑 Meynert 基底核 (nucleus basalis of Meynert, NBM) 中表达催产素受体<sup>[5]</sup>, 而且在学习记忆密切相关的胆碱能投射靶区海马和皮质中也有催产素能神经纤维的传入<sup>[2,6]</sup>。因此, 催产素受体信号通路可能与胆碱能通路存在关联。本文利用重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 和短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 技术干扰大鼠基底前脑催产素受体 (oxytocin receptor, OXTR), 研究 OXTR 对学习记忆的影响, 探讨 OXTR 对胆碱能通路的调控作用, 为认知行为中催产素相关机制的研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

65 只 SPF 级 3 月龄雌性 SD 大鼠, 体重 (240 ± 10) g, 购于济南朋悦实验动物繁殖有限公司【SCXK (鲁) 20190003】。饲养在山东第一医科大学动物房【SYXK (鲁) 20190022】, 12 h 昼夜明暗交替, 相对湿度 (50 ± 5)%, 室温 (23 ± 2) °C, 动物自由饮水和进食。动物实验经过山东第一医科大学实验动物伦理审查 (审批号: 2017047), 动物管理和使用符合法规要求。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

rAAV9-EGFP-Oxtr-shRNA (以下简称 OXTR-shRNA) 腺相关病毒 (靶点序列: CGGGTCAGTAGTGCAAGCTT) 由上海吉凯基因化学技术有限公司提供; 抗荧光淬灭封片剂 (谷歌生物, 货号: G1401), 乙酰胆碱转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 抗体 (Servicebio 公司, 货号 GB11070, 兔源); OXTR 抗体 (Bioss 公司, 货号 bs-1314R, 兔源), Cy3 标记山羊抗兔 IgG (Servicebio 公

司, 货号 GB21303), Cy5 标记山羊抗兔 IgG (Servicebio 公司, 货号 GB27303), Ach 酶联免疫吸附测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 批号 m1003048-C)。

台式低温离心机 (Eppendorf, 德国); Tecan infinite200 酶标仪 (TECAN, 瑞士); 电子天平 (Sartorius, 德国); 制冰机(上海安亭科学仪器厂, 中国); 涡旋混匀机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 中国); 超净工作台(上海海新前医疗器械制造有限公司, 中国); Morris 水迷宫、明暗箱、TopScan 行为分析系统 (CSI, 美国); 37°C 恒温箱 (Thermo 科技有限公司); 荧光显微镜 (Olympus, 日本)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 OXTR 基因沉默大鼠模型的制备和病毒感染效率鉴定

参照作者前期方法<sup>[7]</sup>, 大鼠充分麻醉后, 固定在脑立体定位仪上, 剪掉颅顶毛发, 常规消毒头皮, 暴露前囟, 根据 Paxinos 和 Watson 的《大鼠脑立体定位图谱》确定的 NBM 坐标点 (AP: -1.0 mm, L: ± 2.7 mm, V: 7.8 mm) 调整好钻孔位置 (图 1), 用颅骨钻在进针处钻孔, 微量进样器抽取病毒质粒 OXTR-shRNA 或空病毒载体 rAAV9-EGFP (Con-shRNA) 以 5 nL/s 的速度注入基底前脑, 单侧注射体积 0.2 μL (低、中、高剂量分别为 0.558、1.116、2.232 v.g/mL, 用无菌生理盐水稀释), 注射完后留针 5 min。以同样方法向对侧操作。

分别于注射病毒后的第 2、3、4、5 周, 麻醉动物, 取脑组织, 福尔马林固定组织 4 ~ 6 h, 30% 蔗糖脱水直至脑组织完全下沉, 制备冰冻切片, 显微镜下观察荧光表达, 比较不同剂量和感染时间的病毒感

染效率。

### 1.2.2 OXTR 基因沉默对大鼠学习记忆和胆碱能通路的影响

(1) 动物分组: 根据随机对照表分组, 33 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (Sham)、阴性病毒对照组 (Con-shRNA)、OXTR 沉默组 (OXTR-shRNA)。其中, 假手术组注射生理盐水; Con-shRNA 组注射空病毒载体 rAAV9-EGFP; OXTR-shRNA 组选取中剂量病毒注射 (1.116 v.g/mL), 感染周期 3 周 (选择依据见结果部分)。手术方法参考模型制备部分。

(2) Morris 水迷宫: 实验大鼠进行 Morris 水迷宫的装置包括记录系统、黑色圆形水池 (直径 180 cm, 高 50 cm) 以及平台 (直径 12 cm, 高 30 cm)。水池平均分为四象限, 平台放入其中 1 个象限, 没于水面下方 1 ~ 2 cm。测试的前 1 d 为适应期, 先将大鼠放在平台上 60 s, 然后从不同象限入水, 自由游泳 120 s, 找不到平台的大鼠, 人为引导其至平台停留 20 s。测试期共连续 5 d, 每只大鼠每天测试 4 次, 每次从不同象限入水, 记录大鼠找到平台的时间 (逃避潜伏期), 若大鼠 120 s 未找到平台, 逃避潜伏期记为 120 s, 并使其在平台停留 20 s。

(3) 避暗实验: 避暗箱由两个大小完全相同的白色明箱和黑色暗箱组成, 底部为可控制电流的电栏栅, 两箱中间由电动门连接。实验分为适应、获得和巩固三个阶段。第 1 天为适应阶段, 电动门打开, 电栏栅不通电, 将大鼠从明箱放入 (每次放入均背朝电动门), 让其自由活动 90 s, 记录第 1 次进入暗箱的时间 (潜伏期)。第 2 天为获得阶段, 电动门打开, 从明箱放入大鼠, 当动物四肢进入暗箱中, 关闭电动门, 暗箱通电 0.2 mA 持续 3 s, 停留 10 s 再



注: 大鼠脑组织矢状切面所示的注射点 (左, 红圈内) 与脑矢状面图谱的 NBM 脑区 (右, 红框内) 相符。

图 1 注射位点 NBM 区示意图

Note. Injection site (left, in the red circle) shown on the sagittal section of the rat brain is consistent with the NBM region (right, in the red box) on the sagittal plane of the brain map.

Figure 1 Schematic diagram of the injection site NBM region

次通电 0.2 mA 持续 2 s, 停留 10 s 后将大鼠取出。第 3 天为巩固阶段, 电动门打开, 电栏栅不通电, 从明箱放入大鼠, 让其自由活动 90 s, 记录第 1 次进入暗箱的时间, 90 s 未进入则记为 90 s。每次实验, 每只大鼠完成之后, 需用酒精喷洒擦拭干净, 再进行下 1 只。

(4) 脑组织样品处理: 行为学测试结束后, 禁食 12 h, 麻醉大鼠, 打开胸腔, 经心脏灌注 0.9% 生理盐水, 每组随机抽 3 ~ 4 只大鼠用于制备脑组织切片标本, 在流出液体变澄清后用福尔马林冲洗, 断头分离脑, 福尔马林固定, 用于制备冰冻切片。其余动物经心脏灌注生理盐水后, 分离脑组织,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

(5) ELISA 法检测皮质区 Ach 含量: 操作步骤参照上海酶联生物公司的大鼠 Ach ELISA 试剂盒说明书。

(6) 免疫荧光法检测 NBM 区 OXTR 和皮质区 ChAT 蛋白表达: 将冰冻切片于磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中室温平衡 15 min, 弃 PBS, 加封闭用血清室温孵育 1 h; 去封闭液, 加一抗 (OXTR 稀释比例 1 : 100, ChAT 稀释比例 1 : 3000),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 吸出一抗, PBS 漂洗, 加荧

光标记的二抗 (OXTR 对应使用 Cy3 标记山羊抗兔 IgG, 稀释比例 1 : 300; ChAT 对应使用 Cy5 标记山羊抗兔 IgG, 稀释比例 1 : 300),  $37^{\circ}\text{C}$  恒温摇床上避光孵育 1 h; PBS 漂洗, DAPI 复染细胞核; PBS 漂洗, 将切片贴在载玻片上, 滴加防荧光淬灭封片剂, 盖玻片封片, 荧光显微镜观察荧光表达。

### 1.3 统计学分析

使用 IBM SPSS Statistics 20 软件分析数据, 所有数据均平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。水迷宫逃避潜伏期采用一般线性模型中重复测量的方差分析 (Repeated Measures ANOVA) 进行处理, 分析 1 ~ 5 d 各组间逃避潜伏期是否具有统计学差异, 在差异具有统计学意义的前提下, 采用 LSD (Least-significant Difference) 法进行组间两两比较 (post hoc multiple comparison)。避暗实验中的潜伏期和皮质 Ach 数据分析采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OXTR-shRNA 感染大鼠 NBM 区的效率呈剂量和时间依赖性

基底前脑 NBM 区注射不同量 OXTR-shRNA

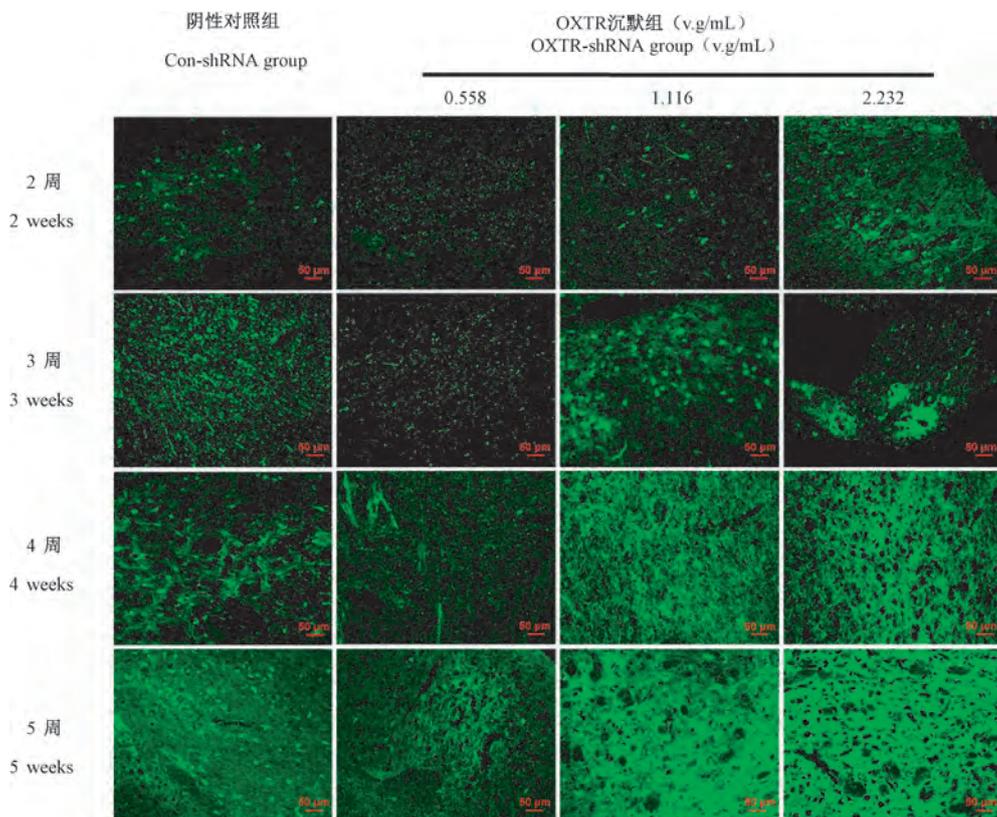


图 2 NBM 区注射病毒后的感染效率  
Figure 2 Efficiency of virus infection in the NBM region after injection

后,低剂量组在第 2、3、4 周时未观察到明显 EGFP 荧光表达,在第 5 周时见少量 EGFP 阳性细胞;中、高剂量组在第 2 周时可见少量 EGFP 阳性细胞,第 3 周时 EGFP 阳性细胞增多,第 4、5 周时 EGFP 表达量均明显增多(图 2)。

### 2.2 中剂量 OXTR-shRNA 感染大鼠 NBM 区 3 周后对 OXTR 的沉默效果

通过对不同剂量 OXTR-shRNA 感染大鼠 NBM 区的观察,选择中剂量 OXTR-shRNA 感染 3 周作进一步研究。免疫荧光染色结果显示,OXTR-shRNA 组 OXTR 阳性表达比假手术组和 Con-shRNA 组减少(图 3)。

### 2.3 沉默大鼠 NBM 区 OXTR 可影响学习记忆

各组大鼠的逃避潜伏期随着训练天数的增加呈现缩短趋势。OXTR-shRNA 组第 5 天逃避潜伏期比假手术组和阴性对照病毒组延长,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 4)。

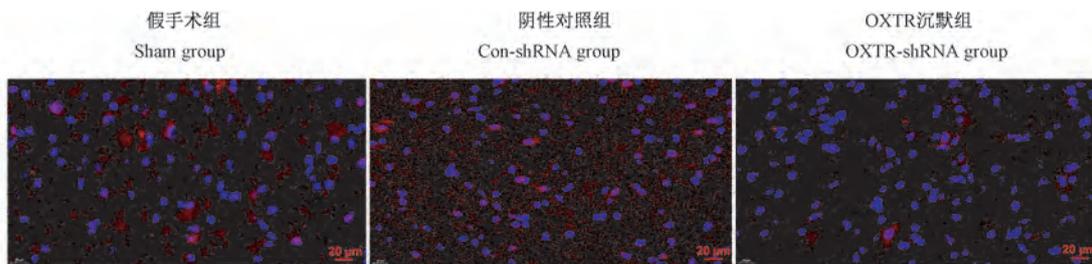
在避暗实验中,各组大鼠在适应阶段进入暗箱的潜伏期之间的差异无显著性( $P > 0.05$ );在巩固阶段,假手术组和阴性对照病毒组大鼠进入暗箱的潜伏期延长,OXTR-shRNA 组大鼠进入暗箱的潜伏期与适应阶段无明显差异,并且低于假手术组和阴性对照病毒组,具有显著性差异( $P < 0.01$ )(图 5)。

### 2.4 沉默大鼠 NBM 区 OXTR 可降低皮质区 Ach 水平

OXTR-shRNA 组皮质中 Ach 浓度比假手术组和阴性对照病毒组减少,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 6)。

### 2.5 沉默大鼠 NBM 区 OXTR 可下调皮质区 ChAT 蛋白表达

图 7 为各组大鼠皮质区 ChAT 免疫荧光染色结果,OXTR-shRNA 组 ChAT 阳性表达量比假手术组和 Con-shRNA 组少,荧光强度弱。

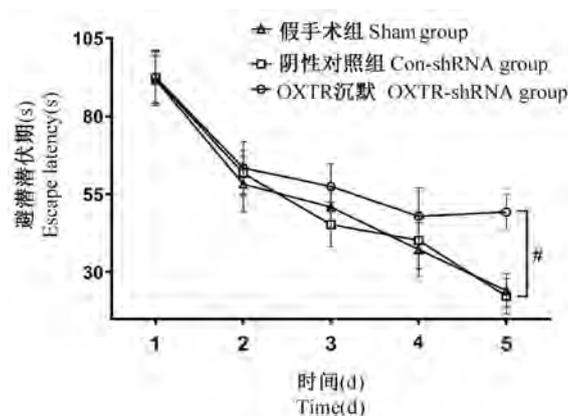


注:红色荧光表示 OXTR 阳性,蓝色荧光为 DAPI 表示细胞核。

图 3 大鼠基底前脑 NBM 区 OXTR 表达

Note. Red fluorescence indicates OXTR-positive, blue fluorescence indicates DAPI (nucleus).

Figure 3 Expression of OXTR in the NBM region of basal forebrain in rats

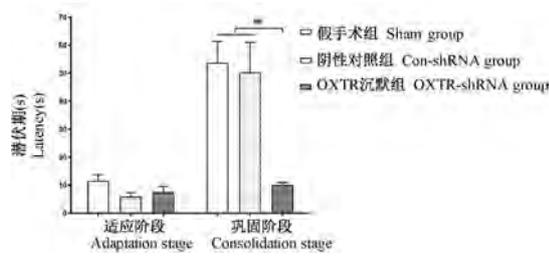


注:假手术组  $n = 10$ ;阴性对照组  $n = 9$ ;OXTR 沉默组  $n = 12$ ;与假手术组、阴性对照组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。(下同)

图 4 水迷宫实验中各组大鼠逃避潜伏期变化

Note. Sham group  $n = 10$ . Con-shRNA group  $n = 9$ . OXTR-shRNA group  $n = 12$ . Compared with sham group and con-shRNA group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ . (The same in the following figures)

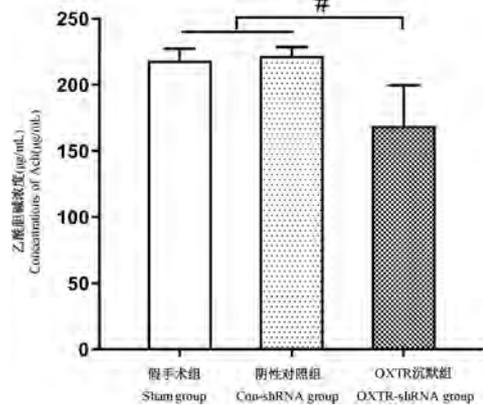
Figure 4 Escape latency in the water maze test



注:假手术组  $n=10$ ;阴性对照组  $n=9$ ;OXTR 沉默组  $n=12$ ;与假手术组、阴性对照组相比,### $P<0.01$ 。

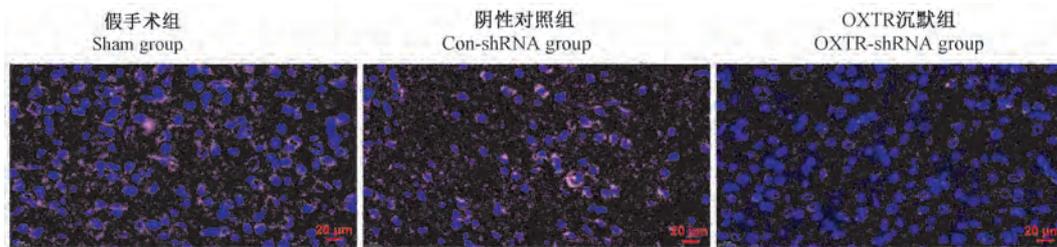
**图 5** 避暗实验中各组大鼠进入暗箱潜伏期  
Note. Sham group  $n=10$ . Con-shRNA group  $n=9$ . OXTR-shRNA group  $n=12$ . Compared with sham group and con-shRNA group, ### $P<0.01$ .

**Figure 5** Latency to enter the dark chamber in the light-dark box test



**图 6** 各组大鼠皮质区 Ach 水平 ( $n=6$ )

**Figure 6** Ach levels in the cortex of rats ( $n=6$ )



注:粉色荧光表示 ChAT 阳性,蓝色荧光为 DAPI 表示细胞核。

**图 7** 大鼠皮质区 ChAT 表达

Note. Pink fluorescence indicates ChAT-positive, blue fluorescence indicates DAPI (nucleus).

**Figure 7** Expression of ChAT in the cortex of rats

### 3 讨论

AD 是一种慢性进行性神经系统变性疾病,为常见的痴呆类型,其发病率逐年增加。胆碱能系统损伤是 AD 发病机制的核心,可表现为乙酰胆碱大量降解等,进而引起和促进一系列病理变化,最终导致 AD 复杂多样的病理特征和临床表现。因此,临床上用于治疗 AD 的一线药物主要是拟胆碱药物,但其治疗效果并不理想。由于 AD 发病机制较为复杂,单独采用拟胆碱药物治疗不能达到理想的效果,多靶点治疗可能更有利于改善 AD<sup>[8]</sup>。胆碱能通路并不是单独运作的,因此阐明胆碱能通路与其他通路之间的关联将有助于发现协同治疗 AD 的靶点。Freeman 等<sup>[5]</sup>发现,在胆碱能神经元分布的脑区(包括基底前脑 NBM 区和脚桥被盖核),OXTR 特异性表达。另外,胆碱能投射靶区海马和皮质也有催产素能神经纤维的传入<sup>[2,6]</sup>,提示胆碱能通路可能与催产素受体通路具有潜在关联。因此,本实验建立了 NBM 区 OXTR 基因沉默的大鼠模型,阐明 OXTR 对胆碱能通路和认知行为的影响。

rAAV 载体可在体内外有效介导外源基因长期稳定表达,不同血清型的组织的特异性不同,其中 rAAV9 具有较好的脑组织靶向性<sup>[9]</sup>。因此,选取 rAAV9 提高其转导效率。通过对 NBM 区注射不同量 OXTR-shRNA 后不同感染周期的观察发现,中剂量 OXTR-shRNA 感染 3 周后 EGFP 阳性细胞表达明显,提示该条件下已经可以达到较好的感染效果。第 4、5 周时中、高剂量组的 EGFP 阳性表达增多,说明病毒的感染效果较为稳定且可维持较长时间,为开展成模后的进一步研究提供了时间上的保障。当采用中剂量 OXTR-shRNA 感染 NBM 区 3 周后,感染部位 OXTR 表达下降,提示 OXTR 被敲低。而且,沉默 NBM 区 OXTR 对大鼠的空间学习记忆和恐惧记忆均产生了损害,表明该模型大鼠表现出类似于 AD 的行为表型。

皮质是基底前脑 NBM 区胆碱能神经元投射的靶区。通过检测皮质区 Ach 水平和 Ach 的合成酶 ChAT 的表达情况,发现沉默 NBM 区 OXTR 使皮质中 Ach 水平和 ChAT 表达均减少,提示 OXTR 可能

影响了 NBM-皮质环路的胆碱能神经元,进而对动物的学习记忆产生损伤,进一步证实沉默基底前脑 NBM 区 OXTR 基因可模拟 AD 的典型病理变化,提示其作为 AD 动物模型的可行性。

AD 患者常伴有不同程度的神经精神症状,如淡漠、抑郁、睡眠障碍等<sup>[10-11]</sup>。针对神经精神症状的治疗在一定程度上有利于改善 AD 患者的认知功能<sup>[12]</sup>,或者延缓 AD 的进程<sup>[13]</sup>。可见,综合治疗可能更有利于改善 AD。基底前脑-皮质胆碱能神经环路不仅与学习记忆密切相关,也与焦虑、睡眠等行为相关<sup>[14]</sup>。由于 OXTR 在胆碱能神经元分布的脑区有较高的特异性表达<sup>[5]</sup>,OXTR 也参与调节恐惧记忆、抑郁等精神行为<sup>[15-16]</sup>。因此,综合解剖学和功能学,通过调控 OXTR 介导的精神行为可能会进一步影响认知功能。综上,催产素受体-胆碱能通路可能是治疗 AD 的潜在复合靶点,但其深入机制有待后续研究。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Giovannini MG, Lana D, Pepeu G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2015, 119: 18-33.
- [ 2 ] Acevedo RA, Mani SK, Handa RJ. Oxytocin and estrogen receptor beta in the brain: an overview [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 160.
- [ 3 ] Quintana DS, Rokicki J, van der Meer D, et al. Oxytocin pathway gene networks in the human brain [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 668.
- [ 4 ] Ebner NC, Lin T, Muradoglu M, et al. Associations between oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, plasma oxytocin, and attachment across adulthood [J]. *Int J Psychophysiol*, 2019, 136: 22-32.
- [ 5 ] Freeman SM, Inoue K, Smith AL, et al. The neuroanatomical distribution of oxytocin receptor binding and mRNA in the male rhesus macaque ( *Macaca mulatta* ) [ J ]. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, 45: 128-141.
- [ 6 ] Paul S, Jeon WK, Bizon JL, et al. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment [J]. *Front Aging Neurosci*, 2015, 7: 43.
- [ 7 ] Hou XQ, Zhang L, Yang C, et al. Alleviating effects of Bushen-Yizhi formula on ibotenic acid-induced cholinergic impairments in rat [J]. *Rejuvenation Res*, 2015, 18(2): 111-127.
- [ 8 ] González JF, Alcántara AR, Doadrio AL, et al. Developments with multi-target drugs for Alzheimer's disease: an overview of the current discovery approaches [J]. *Expert Opin Drug Dis*, 2019, 14(9): 879-891.
- [ 9 ] 殷子斐,王丽娜,王园,等. 提高重组型腺相关病毒转导效率的研究现状 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(9): 49-59.
- Yin ZF, Wang LN, Wang Y, et al. Research advances on increasing the transduction efficiency of recombinant adeno-associated viral vectors [J]. *Biotechnol Bull*, 2015, 31(9): 49-59.
- [ 10 ] Chang YT, Hsu JL, Huang SH, et al. Functional connectome and neuropsychiatric symptom clusters of Alzheimer's disease [J]. *J Affect Disord*, 2020, 273: 48-54.
- [ 11 ] Clement A, Wiborg O, Asuni AA. Steps towards developing effective treatments for neuropsychiatric disturbances in Alzheimer's disease: insights from preclinical models, clinical data, and future directions [J]. *Front Aging Neurosci*, 2020, 12: 56.
- [ 12 ] Nagata T, Shinagawa S, Nakajima S, et al. Association between neuropsychiatric improvement and neurocognitive change in Alzheimer's disease: analysis of the CATIE-AD study [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 66(1): 139-148.
- [ 13 ] Dafsari FS, Jessen F. Depression-an underrecognized target for prevention of dementia in Alzheimer's disease [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 160.
- [ 14 ] Záborszky L, Gombkoto P, Varsanyi P, et al. Specific basal forebrain-cortical cholinergic circuits coordinate cognitive operations [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(44): 9446-9458.
- [ 15 ] Hirota Y, Arai A, Young LJ, et al. Oxytocin receptor antagonist reverses the blunting effect of pair bonding on fear learning in monogamous prairie voles [J]. *Horm Behav*, 2020, 120: 104685.
- [ 16 ] 谢诗意,俞佳,胡燕,等. 催产素及受体基因与抑郁症相关性的研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2020, 47(10): 1880-1883.
- Xie SY, Yu J, Hu Y, et al. Research advances on relationship between oxytocin and its receptor genes and depression [J]. *Modern Prev Med*, 2020, 47(10): 1880-1883.

[ 收稿日期 ] 2020-10-31

冀霞,段小超,马林峰,等. 羊骨胶原肽钙螯合物对去卵巢大鼠肾组织病变的改善作用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 152-159.

Ji X, Duan XC, Ma LF, et al. Sheep bone collagen peptide calcium chelate ameliorates renal tissue lesions in ovariectomized rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 152-159.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.003

# 羊骨胶原肽钙螯合物对去卵巢大鼠肾组织病变的改善作用

冀霞<sup>#</sup>, 段小超<sup>#</sup>, 马林峰, 韩克光, 霍乃蕊<sup>\*</sup>

(山西农业大学动物医学学院, 山西 晋中 030801)

**【摘要】** 目的 探究羊骨胶原肽钙螯合物(collagen peptide chelated calcium, CPCC)对雌激素缺乏大鼠肾的保护作用及相关机制。方法 摘除大鼠双侧卵巢, CPCC高(CPCC-H)和低(CPCC-L)剂量组的灌胃剂量分别为5 g/(kg·d)和1 g/(kg·d), 假手术组和模型组灌胃等体积蒸馏水。8周后测定肾抗氧化指标并观察肾组织形态学变化; qRT-PCR测定JAK/STAT通路相关基因mRNA表达量。结果 与假手术组相比, 去卵巢模型组大鼠肾T-SOD、GSH-Px和T-AOC水平极显著下降, MDA含量极显著增加( $P < 0.01$ ), 肾组织结构紊乱、淋巴细胞浸润; 血清中炎症因子IL-2、TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 水平极显著增加( $P < 0.01$ ), JAK2、STAT1和STAT3基因mRNA的相对表达量极显著增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比, CPCC剂量组的T-SOD、GSH-Px和T-AOC水平极显著增加, MDA含量极显著下降( $P < 0.01$ ); 肾组织病变明显减轻, 淋巴细胞数量减少; 血清中各炎症因子水平极显著下降( $P < 0.01$ ); JAK2、STAT1和STAT3基因mRNA表达量均极显著下降( $P < 0.01$ )。结论 CPCC可抑制去卵巢大鼠的氧化应激水平, 可能通过JAK/STAT通路改善肾组织病变。

**【关键词】** 肽钙螯合物; 氧化应激; 炎症细胞因子; JAK/STAT信号通路

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0152-08

## Sheep bone collagen peptide calcium chelate ameliorates renal tissue lesions in ovariectomized rats

Ji Xia<sup>#</sup>, DUAN Xiaochao<sup>#</sup>, MA Linfeng, HAN Keguang, HUO Nairui<sup>\*</sup>

(College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Corresponding author: HUO Nairui. E-mail: tgnrhuo@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective effect and the underlying mechanisms of action of sheep bone collagen peptide chelated calcium (CPCC) on the kidney of estrogen-deficient rats. **Methods** Rats were subjected to bilateral ovariectomy. The CPCC dosages for the high-dose (CPCC-H) and low-dose (CPCC-L) groups were 5 g/(kg·d) and 1 g/(kg·d), respectively. In the model and sham groups, the same volume of distilled water was intragastrically administered every day. After 8 weeks, the kidney antioxidant indexes were measured, and the morphological changes in kidney tissues were observed. qRT-PCR was used to measure the mRNA expression of JAK/STAT signaling pathway-related genes. **Results** Compared with the sham group, the kidney T-SOD, GSH-Px and T-AOC activities in the model group

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31201347), 山西省重点研发计划(201803D221024-2)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31201347), Province Key R&D Program of Shanxi(201803D221024-2)。

**【作者简介】** 冀霞(1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: 2714800274@qq.com;

段小超(1997—), 女, 本科在读, 研究方向: 兽医公共卫生。Email: 15034073043@163。

<sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 霍乃蕊(1972—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向: 生物技术及利用。Email: tgnrhuo@163.com

were decreased significantly, and the MDA content was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Furthermore, normal renal tissue structure was perturbed and lymphocyte infiltration was observed. Levels of the serum inflammatory factors IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were increased significantly ( $P < 0.01$ ). qRT-PCR analysis showed that the mRNA expression levels of the JAK2, STAT1 and STAT3 genes were increased significantly ( $P < 0.01$ ). After CPCC treatment, compared with the model group, T-SOD, GSH-Px and T-AOC levels increased significantly ( $P < 0.01$ ), and MDA content decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Renal tissue lesions were significantly reduced, and the number of lymphocytes was decreased. Furthermore, serum levels of various inflammatory factors were decreased significantly ( $P < 0.01$ ), and mRNA expression levels of JAK2, STAT1 and STAT3 genes were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** CPCC inhibits oxidative stress in ovariectomized rats and may ameliorate renal tissue pathology through the JAK/STAT signaling pathway.

**【Keywords】** peptide calcium chelate; oxidative stress; inflammatory cytokines; JAK/STAT signaling pathway

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

雌激素是维持雌性动物内环境稳态必不可少的信号分子<sup>[1]</sup>。雌激素缺乏易引起机体氧化应激<sup>[2]</sup>,导致机体氧化与抗氧化作用失衡,从而诱导炎症和脂质过氧化,造成细胞毒性,危害机体健康<sup>[3]</sup>。传统的雌激素替代疗法由于致癌风险,已逐渐被临床治疗所摒弃<sup>[2]</sup>,因此,如何有效改善雌激素缺乏引起的氧化应激已成为当前研究的热点。

我国羊骨资源丰富,可通过酶解获得大量生物活性肽<sup>[4-5]</sup>,但目前羊骨副产品多限于制作低值的动物饲料或骨胶,大部分被填埋浪费<sup>[6]</sup>。前期研究证实羊骨胶原肽钙螯合物(collagen peptide chelated calcium, CPCC)比雌激素更安全<sup>[7]</sup>,可有效抑制去卵巢大鼠骨质疏松的发生<sup>[8]</sup>。雌激素替代疗法容易诱发子宫内膜癌和乳腺癌<sup>[2]</sup>,相比之下,CPCC具有稳定性好、生物效价高、安全无毒副作用等优点<sup>[9]</sup>。

通过观察去卵巢大鼠肾形态学变化、测定肾 GSH-Px、T-SOD、T-AOC 和 MDA 氧化应激指标以及血清炎症因子 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的含量,探讨雌激素缺乏与肾组织损伤的关系; qRT-PCR 检测 CPCC 对去卵巢大鼠 JAK/STAT 信号通路相关基因 mRNA 的表达量,揭示 CPCC 改善雌激素缺乏所致肾氧化应激和炎性病变的相关作用机制,为雌激素缺乏相关疾病的防治提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

32 只 8 周龄体重为(203  $\pm$  20)g 的 SPF 级雌性 SD 大鼠,购自中国食品药品检定研究院(大兴)【SCXK(京)2017-0005】,24 只行双侧卵巢切除

术<sup>[10]</sup>,8 只切除卵巢周围等量脂肪,各组大鼠分笼饲养于山西农业大学动物实验室【SYXK(晋)2020-0003】。实验期间给予大鼠充足的维持型饲料,购自山西医科大学动物实验中心,自由饮水,温度为(22  $\pm$  2)°C,相对湿度 60% ~ 65%。所有操作均符合山西农业大学实验动物伦理委员会要求(IACUC 审查号: SXAU-EAW-2020SD0201)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

CPCC 按照实验室前期方法制备<sup>[11]</sup>,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  试剂盒购自北京华英生物研究所。qRT-PCR 及 SYBR<sup>TM</sup> Premix Ex Tap<sup>TM</sup> II 试剂购自大连宝生物工程有限公司。

CFX Maestro 实时荧光定量 PCR 仪购自上海伯乐生命医学产品有限公司,高级智能全封闭组织脱水机(ASP 200S)购自上海博讯医疗生物仪器股份有限公司,生物组织包埋机(KD-BM)购自浙江科迪仪器设备有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及实验干预

去卵巢大鼠手术 2 周后随机分为模型组(model)、CPCC 高(CPCC-H)和低(CPCC-L)剂量组,CPCC-H 和 CPCC-L 组灌胃剂量分别为 5 g/(kg·d)和 1 g/(kg·d),模型组和假手术组灌胃等体积蒸馏水,连续 8 周。

### 1.2.2 肾组织形态学观察及取材

最后一次给药结束后禁食 12 h,眼眶后静脉采

血,脱颈处死大鼠,收集肾组织,部分用 10% 甲醛溶液固定,24 h 后修剪为约 3 mm<sup>3</sup> 的组织块,二甲苯浸渍透明,石蜡包埋,切片厚度 5 μm,蒸馏水展片,44℃ 烤片,常规苏木精伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色<sup>[12]</sup>,中性树胶封片,10 × 40 倍镜下拍照,光学显微镜观察肾组织形态学变化并对肾组织切片行病理组织学评分,评分标准如下:肾小球萎缩 (0 ~ 5 分);红细胞浸润 (0 ~ 5 分);淋巴细胞浸润 (0 ~ 5 分);肾小管内形成管型 (0 ~ 5 分);肾小管上皮细胞脱落、坏死 (0 ~ 5 分)。

### 1.2.3 抗氧化指标的测定

肾组织 (g) 和生理盐水 (v) 以 1:9 的比例冰浴混合,充分研磨,瞬时离心收集上清,制备 10% 肾组织匀浆,-20℃ 保存备用。采用比色法检测 T-AOC 和

GSH-Px 活力,硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,羟胺法测定 T-SOD 活性,均按照试剂盒说明操作。

### 1.2.4 炎症因子水平测定

采用酶联免疫竞争法检测血清中 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 的含量。参照说明书梯度稀释标准品并测定 OD<sub>450 nm</sub> 值,建立标准曲线拟合方程。检测大鼠血清样本 OD<sub>450 nm</sub> 值,代入拟合方程得出各组大鼠血清中 IL-2、TNF-α 和 IFN-γ 的含量。

### 1.2.5 qRT-PCR 检测 JAK/STAT 信号通路相关基因 mRNA 表达

设计引物序列,并在 NCBI 数据库中比对大鼠 JAK2、STAT1、STAT3 基因及内参基因 GAPDH 的目标序列 (见表 1)。将 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,并送交上海生物工程股份有限公司测序。

表 1 qRT-PCR 引物序列及产物大小

Table 1 qRT-PCR primer sequences and product sizes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences	登录号 Accession NO.	产物大小 (bp) Product size (bp)
JAK2	F:GTGGAGATGTGCCGCTATG R:CCTGTACTTCACGATGTTGTC	XM_032891777.1	157
STAT1	F:TTGGTGGACTACAGACTGAAGA R:ATCAGAGTGGGAAGGAAACAGT	NM_032612.3	182
STAT3	F:CACCCATAGTGAGCCCTTGA R:TTTTTGGAGTGCAGTGACCAGGACAG	XM_006247259.3	139
GAPDH	F:TCAAGAAGGTGTTGAAGCAG R:AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGT	XM_017592435.1	233

提取大鼠肾总 RNA<sup>[13]</sup>,紫外分光光度计测定总 RNA 纯度及浓度,选择 OD<sub>260/280</sub> 比值在 1.8 ~ 2.0 间的总 RNA 进行反转录<sup>[14]</sup>。建立 qRT-PCR 扩增体系:SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 ×) 5 μL、ROX Reference Dye II (50 ×) 0.2 μL、PCR 上游序列 (10 μmol/L) 0.3 μL、PCR 下游序列 (10 μmol/L) 0.3 μL、cDNA 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 补充至 10 μL。反应条件为:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s,40 个循环;插入溶解曲线,95℃ 15 s;60℃ 1 min;95℃ 15 s。

### 1.3 统计学分析

利用统计学软件 SPSS 26.0 对实验数据进行单因素方差分析,LSD 进行多重比较,实验数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。抗氧化指标所有结果均以牛血清白蛋白为标准<sup>[15]</sup>归一化为蛋白质含量,各项指标独立检测。qRT-PCR 结果以相对表达定量 (relative quantity, RQ) 表示。计算方式如下:RQ = 2<sup>-ΔΔCT</sup>;ΔCT = 目的基因 CT 值 - 内参基因 CT 值;

ΔΔCT = 实验组 ΔCT - 对照组 ΔCT。

## 2 结果

### 2.1 肾组织形态学变化

模型组较假手术组肾小球稍有萎缩,肾小囊壁层上皮细胞崩解。肾小管管腔形成管型,上皮细胞脱落、坏死,间质毛细血管散在大量红细胞和淋巴细胞 (图 1A、B)。CPCC 干预可以显著减轻肾病变 (图 1C、D)。总体来说,假手术组得分极显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ),CPCC 各剂量组得分极显著低于模型组 ( $P < 0.01$ ) (图 1E)。

### 2.2 CPCC 对去卵巢大鼠抗氧化能力的影响

按照试剂盒说明,酶的百分抑制率在 45% ~ 55% 间,T-SOD 和 GSH-Px 的活力最强。由图 2 知,当肾组织匀浆液浓度为 0.2% 和 0.8% 时,T-SOD 和 GSH-Px 的百分抑制率在 45% ~ 55% 之间。因此,0.2% 和 0.8% 为测定相应酶活性的最佳取样浓度。

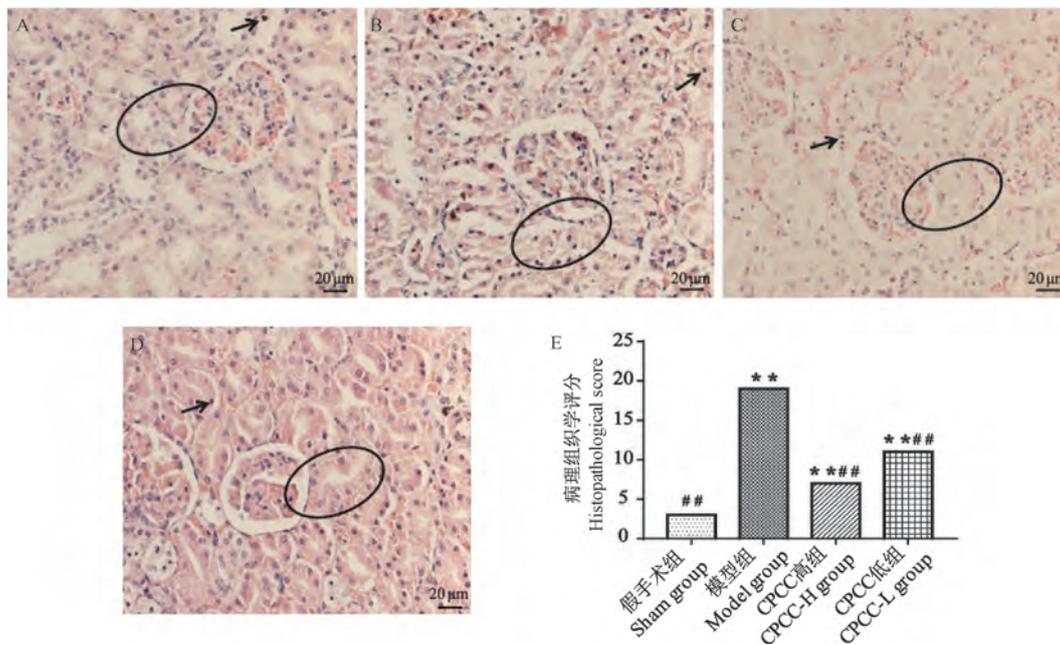
由图 3 可知,与假手术组相比,模型组 T-SOD、

GSH-Px 和 T-AOC 水平极显著降低,MDA 含量极显著增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,CPCC 各剂量组 T-SOD、GSH-Px 和 T-AOC 水平均极显著增加,MDA 含量极显著下降( $P < 0.01$ )。

### 2.3 CPCC 对血清炎症因子的影响

按照试剂盒说明书操作,建立标准曲线拟合方程。IL-2 标准曲线拟合方程为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ , 其中  $A = 1.25373$ 、 $B = 1.79750$ 、 $C =$

$354.53007$ 、 $D = 0.19753$ 、 $r^2 = 0.99685$ 。TNF- $\alpha$  标准曲线拟合方程为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ , 其中  $A = 1.62753$ 、 $B = 1.46026$ 、 $C = 45.24075$ 、 $D = 0.50353$ 、 $r^2 = 0.99840$ 。IFN- $\gamma$  标准曲线拟合方程为: $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$ , 其中  $A = 1.56921$ 、 $B = 1.13601$ 、 $C = 75.14627$ 、 $D = 0.11419$ 、 $r^2 = 0.99865$ 。测定样本 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的 OD 值,代入标准拟合曲线得到其血清含量,如图 4。与



注:A:假手术组;B:模型组;C:CPCC 高组;D:CPCC 低组;E:病理组织学评分;箭头表示淋巴细胞浸润;与假手术组相比, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组相比, ##  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 大鼠肾组织病理学切片及评分

Note. A. Sham group. B. Model group. C. CPCC-H group. D. CPCC-L group. E. Histopathological score of kidney. Arrow indicating lymphocyte infiltration. Compared with sham group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with model group, ##  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Pathological sections and scores of rats kidney tissue

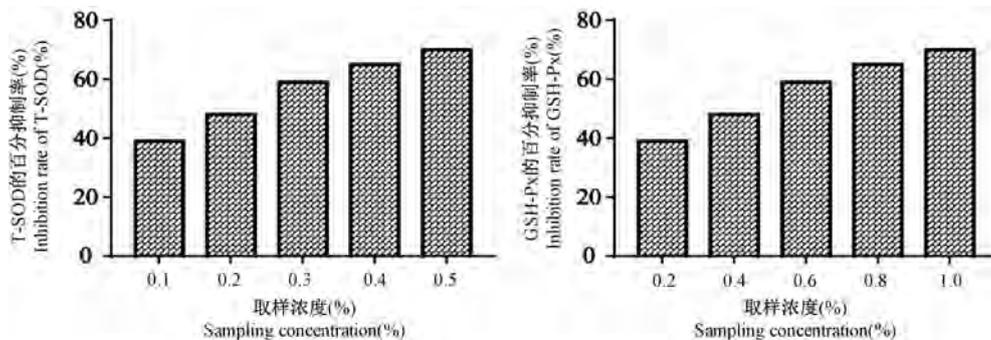


图 2 肾组织匀浆液中 T-SOD 和 GSH-Px 的百分抑制率

Figure 2 Inhibition rate of T-SOD and GSH-Px in kidney tissue homogenates

假手术组比,模型组 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平极显著增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比,CPCC 各剂量组 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平极显著下降( $P < 0.01$ )。

#### 2.4 CPCC 对 JAK/STAT 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响

由图 5A 可知,JAK2、STAT1 和 STAT3 基因的 PCR 产物条带单一、明亮且无非特异性扩增,产物大小依次为 157、182 和 139 bp,与预期一致。测序结果表明各基因序列与基因标准序列同源性  $\geq 98\%$ 。由图 5B-5D 可知,与假手术组相比,模型组 JAK2、STAT1 和 STAT3 基因 mRNA 表达量均极显著增加( $P < 0.01$ )。CPCC 各剂量组均能极显著抑制 JAK2、STAT1 和 STAT3 基因 mRNA 表达( $P <$

0.01)。其中 CPCC 低组 JAK2 基因 mRNA 表达量极显著低于假手术组( $P < 0.01$ );CPCC 高组 STAT1 基因 mRNA 表达量与假手术组无显著性差异( $P > 0.05$ );CPCC 高组 STAT3 基因 mRNA 表达量极显著低于假手术组( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肾是全身毒性和氧化应激的靶点<sup>[16]</sup>。肾组织损伤后生成大量活性氧自由基,损伤肾小球基底膜和毛细血管、破坏细胞结构、造成脂质过氧化并产生 MDA<sup>[17]</sup>。MDA 能破坏细胞膜和细胞酶系统,使抗氧化水平降低,导致对活性氧自由基的清除能力减弱,最终造成氧化应激<sup>[18-20]</sup>。本研究模型组大鼠

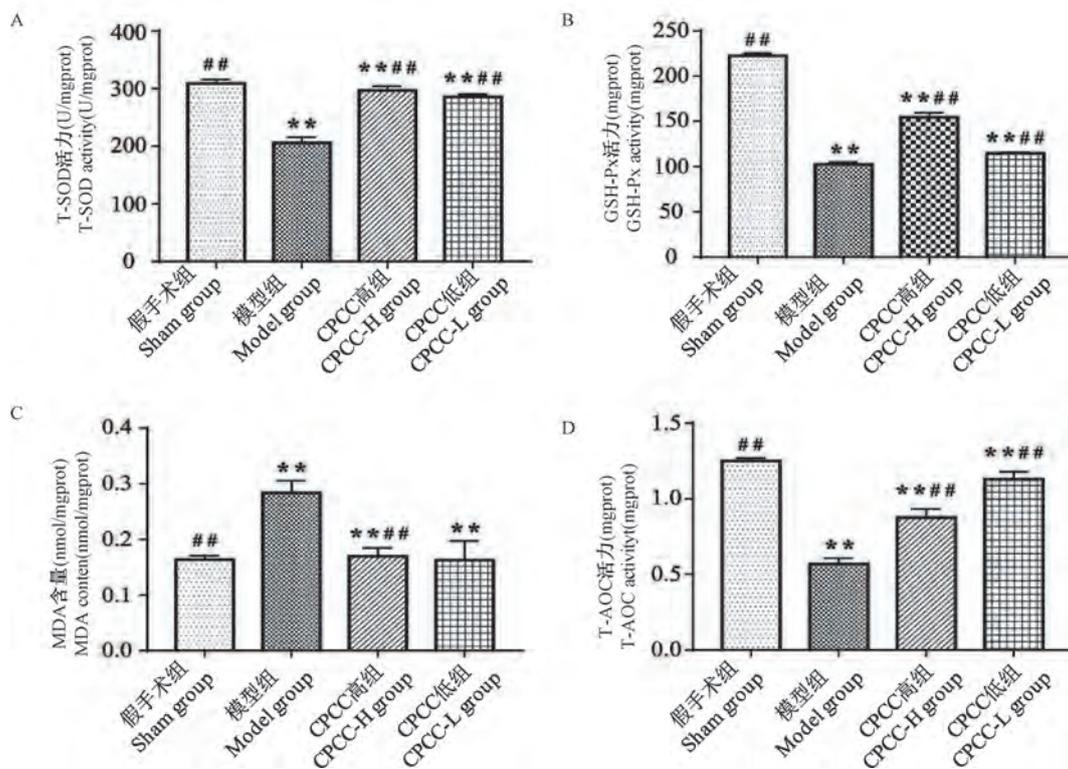


图 3 各组大鼠肾组织抗氧化指标

Figure 3 Antioxidant index of renal tissue in each group

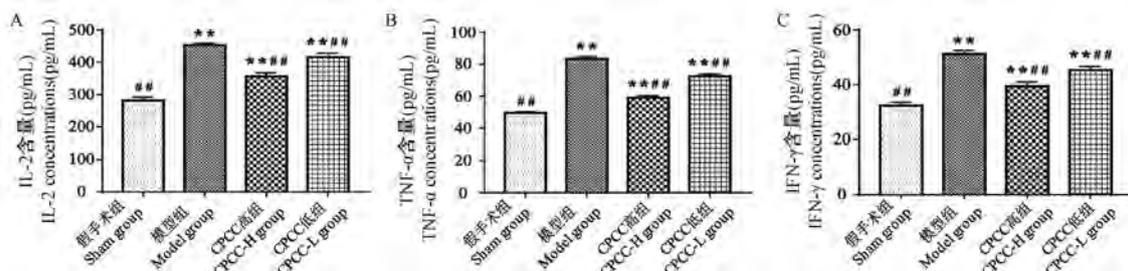
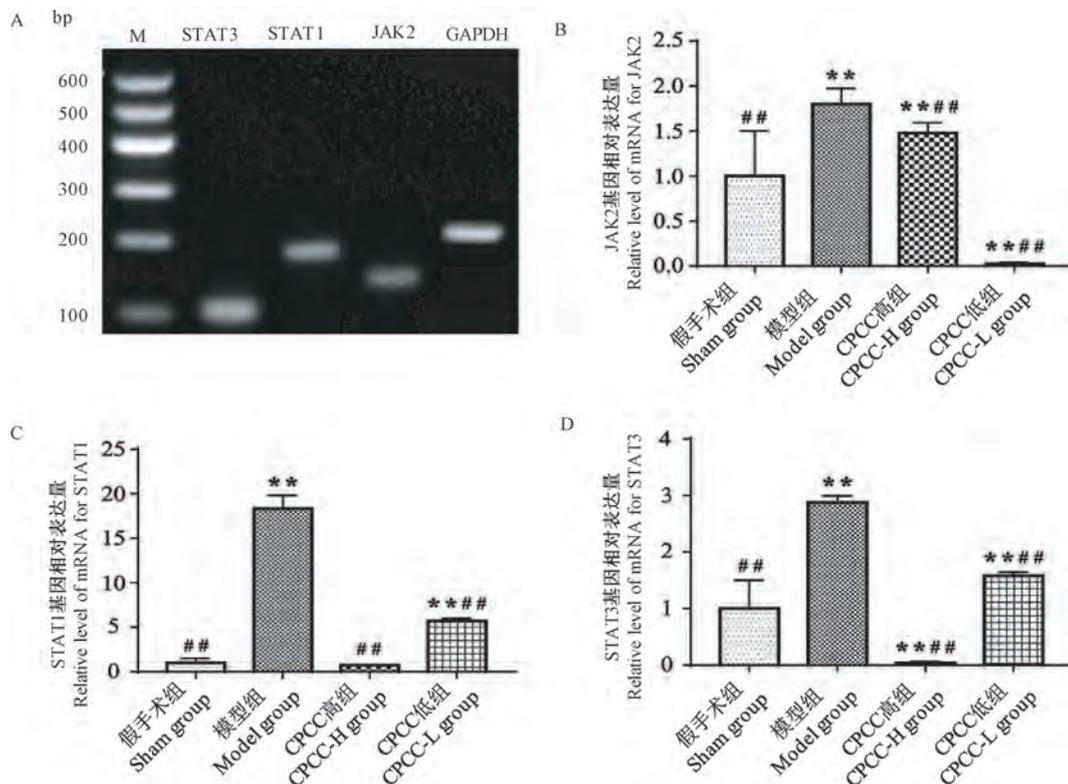


图 4 各组 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平

Figure 4 IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels in each group



注: M; DL600 DNA marker.

图 5 JAK2、STAT1、STAT3 基因 2% 琼脂糖凝胶电泳及 qRT-PCR 结果

Note. M. DL600 DNA marker.

Figure 5 JAK2, STAT1, STAT3 genes 2% agarose gel electrophoresis and qRT-PCR results

肾抗氧化能力极显著下降,而 MDA 含量极显著增加,肾组织淋巴细胞浸润,结构改变,血清中炎症细胞因子 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平极显著升高,与王海敏等<sup>[21]</sup>、钱珺等<sup>[22]</sup>、靳贝芳等<sup>[23]</sup> 研究结果一致,说明雌激素缺乏可引起肾发生氧化应激和炎症反应。

JAK/STAT 通路通过 STAT 蛋白介导从质膜到细胞核的应激信号传导<sup>[24]</sup>,主要由 JAKs 蛋白家族和 STATs 蛋白家族组成,磷酸化的 JAKs 激活受体,形成 STATs 停靠位点,STATs 与停靠位点结合并磷酸化,形成异源二聚体,进入细胞核参与基因转录,调节氧化应激、炎症反应等的发生发展<sup>[25]</sup>。Rai 等<sup>[26]</sup> 发现通过抑制 JAK/STAT 信号通路相关基因的表达可以抑制大肠癌中的氧化/代谢应激。本研究模型组大鼠肾组织 JAK2、STAT1 和 STAT3 基因 mRNA 相对表达量均极显著高于假手术组,说明雌激素缺乏致肾氧化应激可导致 JAK/STAT 信号通路激活,与他人研究结果一致<sup>[27-28]</sup>。去卵巢大鼠灌胃 CPCC,各剂量组 JAK2、STAT1 和 STAT3 基因的 mRNA 表达水平均极显著低于模型组,同时肾的抗

氧化能力极显著增加,MDA 含量极显著下降,肾组织病变减轻,淋巴细胞浸润减少,说明 CPCC 可通过下调 JAK/STAT 信号通路相关基因的表达抑制雌激素缺乏引起的肾氧化应激和炎症反应。

卵巢切除常用于建立骨质疏松模型<sup>[29-30]</sup>,本研究模型组大鼠经血清学指标和骨 micro-CT 扫描证实发生了骨质疏松<sup>[9]</sup>,说明雌激素缺乏不仅可引发骨质疏松,还可引起肾病变,CPCC 对松质骨<sup>[31]</sup> 和肾病变都有改善效果。本研究发现 CPCC 可能通过激活 JAK/STAT 信号通路提高去卵巢大鼠肾的抗氧化能力,减轻肾病变,是比雌激素替代疗法更为安全的选择。

参 考 文 献 (References)

[ 1 ] Ezhilarasan D. Critical role of estrogen in the progression of chronic liver diseases [ J ]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2020, 19(5): 429-434.  
 [ 2 ] Giaze TR, Shuid AN, Soelaiman IN, et al. Bone turnover and oxidative stress markers in estrogen-deficient rats treated with Marantodes pumilum leaves and roots: a comparative study [ J ]. Trop J Pharm Res, 2018, 17(4): 611.  
 [ 3 ] Sullivan JM, Shala BA, Miller LA, et al. Progesterin enhances

- vasoconstrictor responses in postmenopausal women receiving estrogen replacement therapy [J]. *Menopause*, 2018, 25(11): 1180-1186.
- [ 4 ] Liu F, Wang WC, Xia YQ, et al. Protection by collagen peptides from walleye pollock skin on bone formation via inhibition of oxidative stress [J]. *J King Saud Univ Sci*, 2020, 32(5): 2527-2533.
- [ 5 ] Bechaux J, Gatellier P, Page JFL, et al. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications [J]. *Food Funct*, 2019, 10(10): 6244-6266.
- [ 6 ] Gao LL, Wang ZY, Li Z, et al. The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumuin sheep) [J]. *J Integr Agr*, 2018, 17(3): 704-711.
- [ 7 ] 金淑秀, 王钰慧, 霍乃蕊, 等. 羊骨髓肽及其钙螯合物对成骨细胞增殖和活性的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(12): 2745-2752.
- Jin SX, Wang YH, Huo NR, et al. Function of bone marrow peptide and its calcium-chelated form in the proliferation and the osteogenic activity of cultured osteoblasts [J]. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2018, 49(12): 2745-2752.
- [ 8 ] 陈静, 姚薇, 韩克光, 等. 羊骨髓肽-钙螯合物对诱导分化的破骨细胞形成和吸收的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 574-579.
- Chen J, Yao W, Han KG, et al. Effects of sheep bone marrow peptides with and without calcium chelation on RANKL-induced osteoclast formation and activity [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(5): 574-579.
- [ 9 ] 韩克光, 申勇涛, 原恺, 等. 钙螯合羊骨胶原多肽抑制骨质疏松发生的 RANK/RANKL/OPG 信号机制 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(5): 1047-1053.
- Han KG, Shen YT, Yuan K, et al. Regulation of RANK/RANKL/OPG signal pathway by calcium chelated sheep bone collagen peptide in inhibiting the occurrence of osteoporosis [J]. *Chin J Anim Vet Sci*, 2018, 49(5): 1047-1053.
- [ 10 ] 高文伟, 申勇涛, 程稚玲, 等. 钙螯合胶原多肽与雌激素对去卵巢大鼠骨质改善作用的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(3): 256-262.
- Gao WW, Shen YT, Cheng ZL, et al. Comparison of the ameliorating calcium and estrogen on the bone quality in ovariectomized rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(3): 256-262.
- [ 11 ] 韩克光, 甄守艳, 范华, 等. 钙螯合羊骨胶原多肽的制备及表征分析 [J]. *农业工程学报*, 2015, 31(21): 301-307.
- Han KG, Zhen H, Fan H, et al. Preparation and characteristic analysis of calcium-chelated ossein peptide [J]. *T Chin Soc Agr Eng*, 2015, 31(21): 301-307.
- [ 12 ] 于红燕, 杨占东, 杨琪, 等. 单染与复染在观察 SIRT1 基因敲除小鼠骨关节炎切片中的差异比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(10): 34-39.
- Yu HY, Yang ZD, Yang Q, et al. Observation of the articular cartilage of osteoarthritis in SIRT1 gene knock-out mice through single staining and compound staining [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(10): 34-39.
- [ 13 ] 欧阳春, 张里克, 卢远航, 等. TAK1 抑制剂对糖尿病大鼠 MAPK 与 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及其对肾脏保护机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(1): 67-72.
- Ou YC, Zhang ZD, Lu YH, et al. Regulatory effect of TAK1 inhibitors on MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathway in diabetic rats and its renal protection mechanism [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(1): 67-72.
- [ 14 ] 高文强. 丹参酮 I 通过调节 Nrf2-ARE 信号通路在肾脏缺血再灌注损伤中的保护作用研究 [D]. 江苏: 东南大学; 2017.
- Gao WQ. Tanshinone I protects ischemia/reperfusion induced renal injury via activation of Nrf2-ARE pathway [D]. Jiangsu: Southeast University; 2017.
- [ 15 ] Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [ 16 ] 章林明, 许珍珍, 常越辰, 等. G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 10-16, 24.
- Zhang LM, Xu ZZ, Chang YC, et al. G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(6): 10-16, 24.
- [ 17 ] Hasan R, Lasker S, Hasan A, et al. Canagliflozin ameliorates renal oxidative stress and inflammation by stimulating AMPK-Akt-eNOS pathway in the isoprenaline-induced oxidative stress model [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 14659.
- [ 18 ] Jadoon S, Malik A. A review article on the formation, mechanism and biochemistry of mda and mda as a biomarker of oxidative stress [J]. *IJAR*, 2017, 5(12): 811-818.
- [ 19 ] 李建瑛, 肇寅辉, 康燕, 等. 姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠肾病理损伤及氧化应激的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(11): 48-52, 122.
- Li JY, Zhao YH, Kang Y, et al. Effect of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke in a dry heat environment [J]. *Chin J Comp Med*, 2018, 28(11): 48-52, 122.
- [ 20 ] 李佳岑, 罗瑶, 曾思. 亚甲蓝与七氟醚在肺缺血再灌注 (IR) 损伤大鼠模型中对血清及肺组织氧化应激指标及炎症因子的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 93-97, 102.
- Li JC, Luo Y, Zeng S. Effects of methylene blue and sevoflurane on oxidative stress indexes and inflammatory factors in serum and lung tissue in rats with lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(4): 93-97, 102.
- [ 21 ] 王海敏, 汤旭磊, 王朝旭. 叶酸对去卵巢大鼠抗氧化酶、一氧化氮合酶和一氧化氮的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(2): 359-362, 370.
- Wang HM, Tang XL, Wang CX. Effects of folic acid on antioxidant enzyme, nitric oxide synthase and nitric oxide in ovariectomized rats [J]. *Chin J Pathophys*, 2016, 32(2): 359-362, 370.
- [ 22 ] 钱珺, 谢凡, 卫克昭, 等. 复方滋阴颗粒对去卵巢大鼠性激

- 素和氧化应激水平的影响 [J]. 药学实践杂志, 2020, 38(5): 431-434.
- Qian J, Xie F, Wei KZ, et al. Effects of compound Ziyin granule on sex hormones and oxidative stress levels of ovariectomized rats [J]. *J Pharm Pract*, 2020, 38(5): 431-434.
- [23] 靳贝芳, 卢钦镇, 张妍, 等. 氧化应激和炎症反应在甲状腺功能亢进小鼠肾损伤中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1625-1630.
- Ji BF, Lu QZ, Zhang Y, et al. Effects of oxidative stress and inflammatory response on kidney injury in mice with hyperthyroidism [J]. *Chin J Pathophys*, 2020, 36(9): 1625-1630.
- [24] Zhao L, Wu D, Sang M, et al. Stachydrine ameliorates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by suppressing inflammation and oxidative stress through inhibiting NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signaling pathways in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 48: 102-109.
- [25] 王敏, 李作孝. 基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 62-68.
- Wang M, Li ZX. Intraperitoneal injection of compound glycyrrhizin exerts preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis via the JAK2/STAT3/SOCS3 signaling pathway [J]. 2020, 30(6): 62-68.
- [26] Rai A, Kumar U, Raj V, et al. Novel 1, 4-benzothiazines obliterate COX-2 mediated JAK-2/STAT-3 signals with potential regulation of oxidative and metabolic stress during colorectal cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 132: 188-203.
- [27] 王刚, 常明泉, 杨光义, 等. 白及多糖对氧化损伤的人角质形成细胞 JAK/STAT 信号通路的影响 [J]. 医药导报, 2012, 31(6): 701-705.
- Wang G, Chang MQ, Yang GY, et al. Effects of bletilla striata polysaccharide on JAK/STAT signaling pathway in oxidative damaged human keratinocyte [J]. *Herald Med*, 2012, 31(6): 701-705.
- [28] 王菲, 贾莉莉, 孙英, 等. JAK2/STAT1 信号通路对大鼠肝脏冷缺血及再灌注后急性肾损伤的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2017, 38(5): 297-301.
- Wang F, Jia LL, Sun Y, et al. Effect of JAK2/STAT1 on acute kidney injury induced by liver cold ischemia reperfusion in rats [J]. *Chin J Organ Transplant*, 2017, 38(5): 297-301.
- [29] Liu Y, Wang C, Wang G, et al. Loureirin B suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomized osteoporosis via attenuating NFATc1 and ROS activities [J]. *Theranostics*, 2019, 9(16): 4648-4662.
- [30] 김남석, 김하림, 이득주, et al. Effects of ramie leaves on regulation of osteoporosis in ovariectomized mice [J]. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2018, 47(2): 123-130.
- [31] Hu SW, Zhou XM, Li C, et al. Effects of collagen peptide from tuna bone chelated calcium on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Hans J Food Nutr ence*, 2019, 8(1): 61-67.

[收稿日期] 2020-10-28

刘一冰,陈恒,徐浩,等. 蜂王浆对雌性未孕大鼠乳腺组织的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 160-167.

Liu YB, Chen H, Xu H, et al. Effects of royal jelly on mammary gland tissue of non-pregnant female rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 160-167.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.004

## 蜂王浆对雌性未孕大鼠乳腺组织的影响

刘一冰<sup>1</sup>,陈恒<sup>1</sup>,徐浩<sup>1</sup>,周桂华<sup>2</sup>,蔺哲广<sup>1</sup>,吉挺<sup>1\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009; 2. 广西蜜博士蜂业有限责任公司,南宁 530000)

**【摘要】** 目的 本研究旨在探讨蜂王浆(Royal Jelly, RJ)对雌性未孕大鼠(青春期末到性成熟初期)血清激素水平和乳腺组织的影响。**方法** 将50只Wistar大鼠随机分为5组,每组10只。处理组大鼠每只灌服不同浓度(100、200、400、800 mg/(kg·d))RJ,对照组(CK组)大鼠每只灌服无菌水(每天2 mL)。35 d后,测定大鼠生长指标和乳头直径;运用酶联免疫吸附测定法测定大鼠血清雌激素(E2)、孕激素(P)、催乳素(PRL)水平;对乳腺组织进行苏木精-伊红染色后,观察其组织学形态变化。**结果** RJ200组和RJ400组大鼠血清E2、PRL水平显著高于CK组( $P < 0.05$ ),而RJ200、RJ400和RJ800组血清P水平显著低于CK组( $P < 0.05$ ),RJ100组与CK组血清E2、P、PRL水平均不显著( $P < 0.05$ )。乳腺导管直径结果显示,与CK组相比,各处理组导管直径均显著升高( $P < 0.05$ ),其中RJ100组 < RJ200、RJ400和RJ800组,乳腺组织学变化与导管直径结果相一致。另外,RJ200和RJ800组大鼠乳头直径较CK组略有增加( $P < 0.05$ )。**结论** 每日摄入低剂量(100 mg/kg)RJ不会对雌性未孕大鼠血清激素水平和乳腺发育造成影响。但当摄入量达到200 mg/(kg·d)或400 mg/(kg·d)时,可能对雌性未孕大鼠乳腺组织的发育和血清激素水平的稳定带来不利影响。

**【关键词】** 蜂王浆;大鼠;雌性;乳腺;血清激素

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0160-08

## Effects of royal jelly on mammary gland tissue of non-pregnant female rats

LIU Yibing<sup>1</sup>, CHEN Heng<sup>1</sup>, XU Hao<sup>1</sup>, ZHOU Guihua<sup>2</sup>, LIN Zheguang<sup>1</sup>, JI Ting<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China.

2. Guangxi Honey Bee Industry Co. LTD, Nanning 530000)

Corresponding author: JI Ting. E-mail: tji@yzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** The purpose of this study was to investigate the effect of royal jelly (RJ) on serum hormone levels and mammary gland tissues of female non-pregnant rats (late puberty to early sexual maturity). **Methods** Fifty Wistar rats were randomly divided into 5 groups with 10 rats in each group. Rats in the treatment group were given RJ at different doses (100, 200, 400, 800 mg/(kg·d)), while rats in the control group (CK group) were given sterile water (2 mL). After 35 d, the growth index and nipple diameter were measured. The serum levels of estrogen (E2), progesterone (P) and prolactin (PRL) were measured by ELISA. After hematoxylin-eosin staining of breast tissue, histological morphological changes were observed. **Results** The result showed that serum E2 and PRL levels in the RJ200 group and RJ400 group were significantly higher than those in the CK group ( $P < 0.05$ ), while serum P levels in the RJ200, RJ400 and RJ800 groups were significantly lower than those in the CK group ( $P < 0.05$ ). Serum E2, P and PRL levels in the RJ100 and CK groups were not significantly different ( $P < 0.05$ ). Breast duct diameter measurements showed

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(31902220),国家蜂产业技术体系专项(CARS-45-SYZ6),江苏省科技支撑计划(BE2018353)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31902220), National Bee Industry Technology System Special Project (CARS-45-SYZ6), Jiangsu Science and Technology Support Plan (BE2018353).

**【作者简介】** 刘一冰(1995—),女,在读硕士研究生,研究方向:蜂产品药理学。Email:yibing-liu@foxmail.com

**【通信作者】** 吉挺(1974—),男,教授、博士,研究方向:蜜蜂科学。Email:tji@yzu.edu.cn

that compared with the CK group, duct diameter in each of the treatment groups was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The histological changes in the breast were consistent with duct diameter in the RJ100 group being lower than that in the RJ200, RJ400 and RJ800 groups. In addition, the diameter of the nipple in the RJ200 and RJ800 groups was slightly increased compared with the CK group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Daily intake of low-dose (100 mg/kg) RJ did not affect serum hormone levels or breast development in female non-pregnant rats. However, at higher doses of 200 and 400 mg/(kg·d), it may adversely affect the development of breast tissue and the stability of serum hormone levels in female non-pregnant rats.

**【Keywords】** royal jelly; rats; female; mammary gland; serum hormone

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

蜂王浆 (Royal Jelly, RJ) 是青年工蜂头部上颚腺和咽下腺共同分泌的乳白色或淡黄色的浆状天然产物,因其特有的化学组分及丰富的生物学活性而被广泛应用于保健品、医药、日化等领域<sup>[1]</sup>。RJ 具有抗菌<sup>[2]</sup>、抗炎<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗衰老<sup>[6]</sup>、降血压<sup>[7]</sup>、增强免疫力<sup>[8]</sup>等生物学活性,并在癌症<sup>[5]</sup>、高血压<sup>[7]</sup>、高胆固醇血症<sup>[9]</sup>、阿尔茨海默症<sup>[10]</sup>和帕金森<sup>[11]</sup>等疾病的治疗和预防中得到了广泛的研究。

近年来,RJ 对生殖系统、繁殖性能、激素水平等的影响引起了众多学者的关注。Suzuki 等<sup>[12]</sup>研究表明,RJ 中含有的脂肪酸类物质 10-羟基-2-癸烯酸 (10-HDA)、10-羟基-反式-2-癸烯酸 (10-H2DA)、反式-2-癸烯酸 (2-DEA) 及甾醇 24-亚甲基胆固醇 (24-MET) 在未成年大鼠中表现出雌激素活性,但相比己烯雌酚或植物雌激素弱。在动物实验中,连续灌服 45 d 蜂王浆主蛋白 (major royal jelly proteins, MRJPs) 可加速雌性未成年大鼠青春期的开始,促进卵泡发育<sup>[13]</sup>。另外,RJ 中的  $57 \times 10^3$  蛋白可诱导蜜蜂幼虫发育为蜂王,增加蜜蜂的体型和卵巢发育,缩短蜜蜂的发育时间<sup>[14]</sup>。在果蝇的研究中也发现,补充 MRJPs 可以延长其寿命、增强繁殖能力和采食量<sup>[15]</sup>。因此,RJ 可能通过改变激素分泌或通过其中的激素样化合物来发挥生殖功能<sup>[13]</sup>。

目前,RJ 关于生殖、激素成分的研究大多集中于卵巢、子宫、睾丸等生殖器官<sup>[12-13,16-17]</sup>。然而,RJ 对与生殖、激素、内分泌系统息息相关的乳腺组织的影响及机制尚不清楚。在其它雌激素样化合物的研究中发现,乙烯基雌二醇能改变雌性啮齿类动物的乳腺发育<sup>[18]</sup>。E2 能促进青春期前女性的乳腺生长,增加生物标志物基质金属蛋白酶-3 的 mRNA 水平<sup>[19]</sup>。此外,Boberg 等<sup>[20]</sup>的研究表明,围产期暴露于植物 E2 中的成年女性发生乳腺增生的患病率增加。因此,探究 RJ 对乳腺组织及生殖激素水平的

影响尤为重要。

本研究评估了 RJ 对雌性未孕青年大鼠生长指标、乳头直径变化、血清激素水平、乳腺组织学形态变化的影响,以确定 RJ 是否会促进乳腺发育或促使乳腺过度发育 (增生),了解 RJ 对乳腺组织的剂量反应关系,为 RJ 的安全生产和制定正确食用方法提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物

50 只清洁级雌性未孕 Wistar 大鼠,7 周龄,体重为  $(200 \pm 20)$  g,购自扬州大学比较医学中心【SCXK(苏)2017-0007】。以上动物均饲养于扬州大学比较医学中心实验室【SYXK(苏)2017-0044】。本实验已通过扬州大学实验动物福利伦理委员会批准(201911-001)。饲养环境:温度  $22 \sim 25^\circ\text{C}$ ,湿度  $40\% \sim 60\%$ ,光照周期明暗均为 12 h。实验期间动物自由采食、饮水,在实验前及之后的每周进行称重。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

苏木素染液套装 (武汉谷歌生物科技有限公司,G1005),大鼠 E2、P 和 PRL 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司,ml002871、ml002894、ml002881)。

病理切片机 (上海徠卡仪器有限公司,RM2016);组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,KD-P);正置光学显微镜 (尼康,Nikon Eclipse E100,日本);酶标仪 (Rayto,RT-6100)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 蜂王浆用量

RJ 生产于江苏省扬州大学实验蜂场【生产许可证编号:SC12632100300076】, $-20^\circ\text{C}$  条件下储存。

根据体表面积(body surface area, BSA)标准化方法得出,大鼠 RJ 摄食量为 100 mg/kg 时可与人类传统上消耗的 RJ(1 g/kg, 体重)相关<sup>[21-22]</sup>。因此,本研究将 RJ 的剂量梯度设置为 100 mg/kg(低剂量)、200 mg/kg(中等剂量)、400 mg/kg(高剂量)和 800 mg/kg(超高剂量)。

### 1.2.2 动物分组

适应性饲养 1 周后,将 50 只 7 周龄雌性未孕 Wistar 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只。正常对照组(CK 组)大鼠,每天灌服 2 mL 蒸馏水;RJ100、RJ200、RJ400、RJ800 组大鼠每天灌服 2 mL RJ,剂量分别为 100、200、400、800 mg/kg。所用 RJ 事先用无菌水稀释成不同倍数,现备现用。实验为期 35 d,结束后,大鼠禁食过夜。采样当天用 2% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后开始采样工作。

### 1.2.3 乳头直径及生长指标测定

(1)体重测定(灌服前):实验开始当天进行第 1 次称重,记录初始体重。之后每周称重 1 次,总计 6 次。

(2)乳头直径测定:大鼠麻醉后,用酒精棉球将第 2 对乳头周围被毛浸湿,使乳头裸露,再用精密游标卡尺测量第 2 对乳头直径,左右乳头各测量 3 次,读数记录后取平均值。

(3)器官指数:大鼠肝、子宫、卵巢组织的分离在采血处死后进行,用 PBS 溶液洗去表面残留血液后称取湿重,计算相应的器官指数,器官指数(%) = 器官湿重/大鼠体重。

### 1.2.4 血清激素水平测定

乳头直径测量完毕,进行腹主动脉采血,血液收集到促凝管中静置 1 ~ 2 h 后离心(4000 rpm, 10 min),取上层血清至 1.5 mL 离心管内,酶联免疫吸附测定法测定血清 E2、P、PRL 水平。

### 1.2.5 乳腺组织学观察

采集第 2 对乳头及周围乳腺组织于 4% 多聚甲醛组织固定液中固定,制作石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察乳腺组织形态,拍照测量乳腺导管直径,结合病理检查结果对乳腺组织进行综合评价。

## 1.3 统计学分析

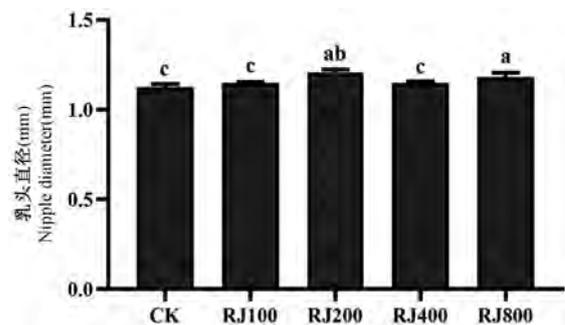
实验数据处理使用软件 IBM SPSS Statistics 25 完成,采用 ANOVA 中的 LSD 多重比较进行分析,所有数据均为平均值 ± 标准误差( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ ), $P < 0.05$

表示为差异具有显著性。乳腺组织切片在软件 MShot Image Analysis System 中进行测量分析。

## 2 结果

### 2.1 蜂王浆对大鼠乳头直径的影响

从图 1 可以看出,与 CK 组相比,RJ200 和 RJ800 组的乳头直径显著增宽。RJ100 和 RJ400 组的乳头直径明显低于 RJ200 组,且与 CK 组无明显差异。



注:CK:正常对照组;RJ100、RJ200、RJ400、RJ800 组:每只大鼠每天灌服 2 mL RJ 100、200、400、800 mg/kg。与 CK 组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 RJ100 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 RJ200 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。(下图/表同)。

图 1 蜂王浆对大鼠乳头直径的影响

Note. CK. Normal control group. RJ100, RJ200, RJ400 and RJ800 groups. Each rat was given 2 mL of RJ100, 200, 400, 800 mg/kg every day. Compared with the CK group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the RJ100 group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the RJ200 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Effect of royal jelly on nipple diameter of rats

### 2.2 蜂王浆对大鼠体重及器官指数的影响

由表 1 知,第 1 次称重时 RJ100 和 RJ800 组大鼠体重相对较高,但经过 1 周的饲养,各组大鼠间体重无差异。实验进行到第 3 周时,与 CK 组比 RJ100 组大鼠体重显著升高,之后的第 4、5 周各组间无差异。实验第 35 天称重发现,与 CK 组比高剂量 RJ400 组和超高剂量 RJ800 组大鼠体重显著降低。

对大鼠卵巢、子宫、肝称重后计算器官指数,结果如图 2 所示。与 CK 组相比,各组大鼠卵巢指数、子宫指数、肝指数差异均不显著,表明灌服蜂王浆不会影响大鼠卵巢、子宫和肝的重量。

### 2.3 蜂王浆对大鼠血清 E2、P、PRL 的影响

RJ 对大鼠血清 E2 水平影响如图 3A 所示。

与 CK 组比, RJ200 和 RJ400 组血清 E2 水平显著升高, 且 RJ200 组显著高于 RJ400 组。RJ100 组血清 E2 水平显著低于 RJ200 和 RJ400 组, 且与 CK 组几乎相同。CK 组、RJ100 和 RJ800 组之间无明显差异。

图 3B 为 RJ 对大鼠血清 P 水平的影响, 从图中可以发现 RJ200、RJ400 和 RJ800 组血清 P 水平显著低于 CK 组, 尤以 RJ200 和 RJ400 组最为明显。RJ100 组与 CK 组血清 P 水平显著高于 RJ200 和 RJ400, 且两组间血清 P 水平几乎相同。

与 CK 组相比, RJ200 和 RJ400 组大鼠血清 PRL 水平显著升高。其中, CK 组、RJ100 和 RJ800 组血清 PRL 水平显著低于 RJ200 和 RJ400 组。另外 RJ100、RJ800 组血清 PRL 水平与 CK 组无明显差异(图 3C)。

由上述结果可以看出, RJ100 组大鼠血清 E2、P 和 PRL 水平均与 CK 组保持一致, 而 RJ200 组大鼠三种血清激素水平均与 CK 组激素水平差异具有显著性。其中, 与 CK 组相比, RJ200 组

E2 和 PRL 显著升高, P 水平显著减低。RJ400 组 P 和 PRL 水平与 RJ200 组保持一致, 但 RJ400 组 E2 水平显著低于 RJ200 组。RJ800 组 E2 和 PRL 水平与 RJ100 组保持一致, 而 P 水平显著低于 RJ100 组。

#### 2.4 蜂王浆对大鼠乳腺组织及乳腺导管直径的影响

大鼠乳腺组织由乳腺小叶、腺泡、导管和结缔组织等组成, 乳腺组织切片病理检查结果显示: CK 组(图 4a、b)乳腺组织可见个别导管结构和少量腺泡结构, 上皮为排列整齐的单层立方上皮, 未见明显增生和导管扩张, 乳腺组织处于静息状态; RJ100 组(图 4c、d)乳腺组织中导管较 CK 组增多, 但导管结构完整, 无明显增生和扩张; 与 CK 组和 RJ100 组相比, RJ200(图 4e、f)、RJ400(图 4g、h)、RJ800(图 4i、j)组可见到数量较多的导管结构, 乳腺小叶数量增多, 部分小叶内腺泡分界不清(无扩张)。另外在这三组中还发现乳头管上皮增厚、总导管轻微扩张的现象, 尤以 RJ800 组较为明显。

表 1 蜂王浆对大鼠体重的影响

Table 1 Effects of royal jelly on body weight of rats

组别 Groups	第 1 次称重(g) First weighing(g)	第 2 次称重(g) Second weighing(g)	第 3 次称重(g) Third weighing(g)	第 4 次称重(g) Fourth weighing(g)	第 5 次称重(g) Fifth weighing(g)	第 6 次称重(g) Sixth weighing(g)
CK	211.50 ± 1.86	216.30 ± 2.45	215.30 ± 2.08	218.90 ± 2.58	220.70 ± 2.45	229.00 ± 3.47
RJ100	216.10 ± 1.28 <sup>a</sup>	220.30 ± 1.17	223.90 ± 1.62 <sup>a</sup>	224.30 ± 1.38	226.40 ± 1.64	226.95 ± 1.61
RJ200	214.40 ± 2.56	215.80 ± 3.51	217.20 ± 2.44	220.20 ± 2.56	225.00 ± 3.15	222.82 ± 2.28
RJ400	212.70 ± 1.10	215.90 ± 2.01	218.20 ± 2.11	218.60 ± 2.16	222.20 ± 2.29	221.19 ± 2.28 <sup>a</sup>
RJ800	216.80 ± 1.82 <sup>a</sup>	217.70 ± 1.84	218.70 ± 1.95	218.80 ± 2.20	222.40 ± 1.94	221.49 ± 2.22 <sup>a</sup>

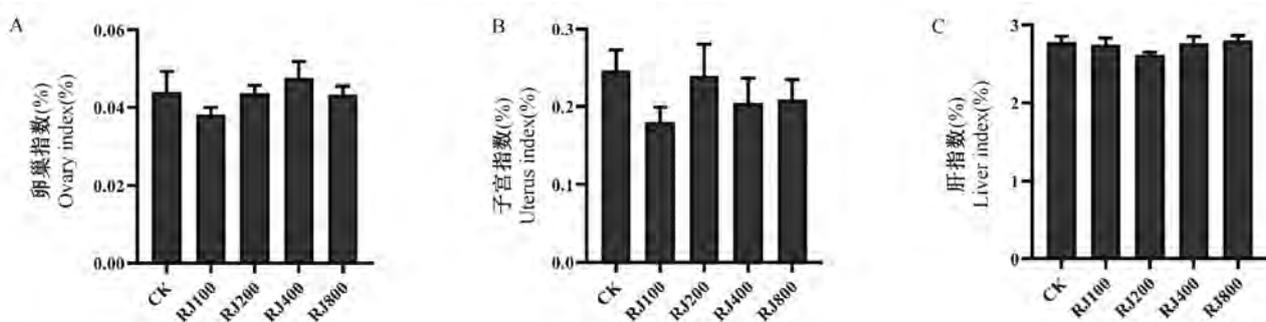


图 2 蜂王浆对大鼠器官指数的影响

Figure 2 Effect of royal jelly on organ index of rats

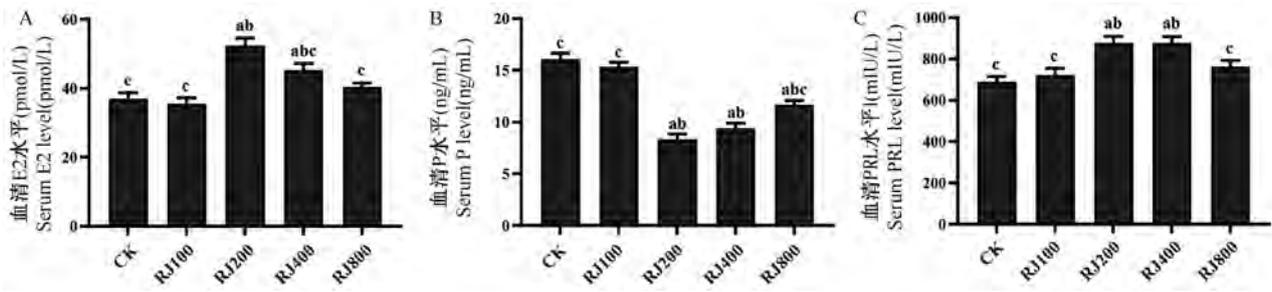


图3 蜂王浆对大鼠血清激素的影响

Figure 3 Effect of royal jelly on serum hormones of rats

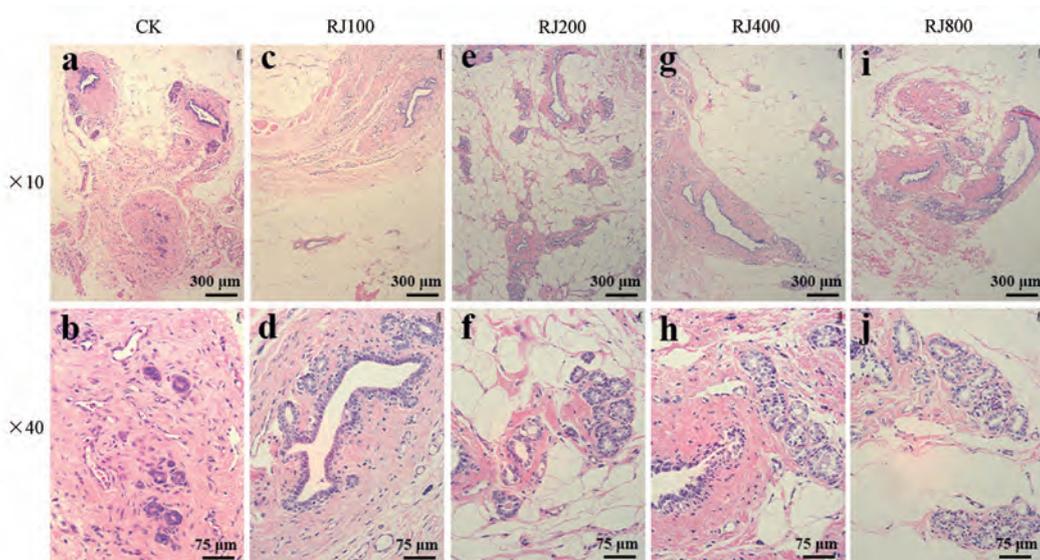


图4 大鼠乳腺组织切片

Figure 4 Mammary gland sections of ovariectomized virgin rats

由各组大鼠乳腺导管直径结果知,与CK组相比,RJ100、RJ200、RJ400和RJ800组大鼠导管直径显著增大,其中RJ100组显著低于RJ200、RJ400和RJ800组,且后3组之间无显著性差异(图5)。

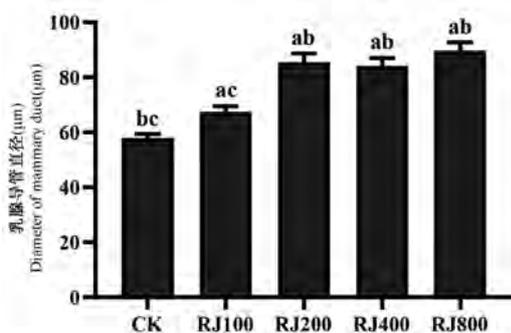


图5 蜂王浆对大鼠乳腺导管直径的影响

Figure 5 Effect of royal jelly on the diameter of mammary duct in rats

### 3 讨论

#### 3.1 蜂王浆对雌性未孕大鼠生长指标的影响

灌服RJ 35 d后,各组大鼠的体重都随着生长而增加,CK、RJ100、RJ200、RJ400、RJ800组大鼠体重分别比实验第1天增加了8.27%、5.02%、3.93%、3.99%、2.16%。有研究表明,RJ能促进小鼠褐色脂肪组织代谢产热,增加能量消耗,对肥胖、脂肪肝、代谢紊乱等疾病具有改善作用<sup>[23-24]</sup>。因此,口服高剂量RJ可能对减轻肥胖有辅助作用。MRJPs可加速雌性大鼠青春期的发生,促进卵泡发育<sup>[13]</sup>,但在本实验结果中未发现RJ对大鼠卵巢指数有明显的影。而在RJ类雌激素样活性物质的研究中得出,摄入RJ后使子宫上皮细胞高度略有增加,而对子宫重量没有影响<sup>[12]</sup>,本研究中未探究子宫上皮细胞高度,但子宫重量不变是与之之前研究结果保持一致的。RJ的弱雌激素作用可能对卵巢和子宫结构都有有益影响<sup>[17]</sup>。

### 3.2 蜂王浆对雌性未孕大鼠血清激素水平的调控

乳腺组织的发育受多种性腺激素和生长因子的调控,如 E2、P、PRL、生长素(GH)等<sup>[25]</sup>。其中 E2 能够刺激乳腺导管生长和性成熟阶段乳腺导管的生成,血清 E2 浓度还可作为评价下丘脑-垂体-生殖腺轴功能的指标之一<sup>[26-27]</sup>。

本实验的研究结果显示,当 RJ 摄入量为 100 mg/(kg·d) (RJ100 组,低剂量)时大鼠血清 E2 水平与 CK 组无显著性差异,且该剂量与人体正常消耗的 RJ 的量(1 g/kg)相关<sup>[22]</sup>。然而,RJ200 组和 RJ400 组大鼠血清 E2 的水平较 CK 组(CK:37.03 pmol/L)E2 水平升高 41.29% 和 22.48%,表明补充中、高剂量 RJ 后,机体内血清 E2 水平显著上升,表现出雌激素活性,这与之前的研究结果相一致<sup>[17]</sup>。提示当 RJ 摄入量达到 200 mg/(kg·d) (RJ200 组,中等剂量)和 400 mg/(kg·d) (RJ400 组,高剂量)时,可提高大鼠血清中 E2 水平,因此,过多的摄入 RJ 可能会提高处于能量储备高度敏感期的青春期末女性的 E2 水平<sup>[28]</sup>,进而促进生殖器官发育。

大鼠血清 P 也是一种非常重要的性腺激素,可促进乳腺小叶的形成和腺泡的发育<sup>[27]</sup>。实验结果显示,除 RJ100 组外,RJ200、RJ400、RJ800 组大鼠血清 P 水平较 CK 组(CK:16.45 ng/mL)显著降低,分别为:50.19%、41.53%、27.44%。乳腺是内分泌激素的靶器官,当体内 E2 和 P 水平发生周期性分泌失调,即 E2 水平绝对或相对升高、P 水平不足时,容易导致乳腺增生的发生<sup>[29]</sup>。那么长期摄入中、高剂量 RJ 有可能会促进乳腺组织过度发育,甚至发生乳腺增生。研究人员发现,机体内 PRL 水平升高会对乳腺组织造成一定的刺激,还可通过抑制黄体期黄体酮的分泌,导致雌孕激素比例失调<sup>[30]</sup>。结果显示,当雌性大鼠摄入 RJ 的量为 200 mg/(kg·d) 和 400 mg/(kg·d) 时,大鼠血清 PRL 水平较 CK 组(CK:688.87 mIU/L)分别升高 27.48% 和 27.32%,而摄入 100 mg/(kg·d) 时,对血清 PRL 无影响。因此,当 RJ 摄入量超过低剂量 2 倍甚至更高时,可能会对性成熟初期大鼠乳腺组织发育及内分泌系统造成不利影响。

### 3.3 蜂王浆对雌性未孕大鼠乳腺发育及乳腺组织形态的影响

青春期后,机体内激素水平逐渐提高,乳腺导管系统迅速生长扩张,乳腺开始发育<sup>[31]</sup>。本研究中乳腺组织切片病理检查结果显示,与 CK 组(CK:

57.87  $\mu\text{m}$ )相比,四个剂量组大鼠的乳腺导管直径分别增加了 16.43%、47.49%、45.34%、55.04%。乳腺组织切片显示,CK 组存在极少量腺导管组织,且导管上皮细胞排列整齐,表明性成熟初期雌性大鼠乳腺组织发育正常。补充 RJ 后,RJ100 组乳腺组织中可见零星导管,并出现乳导管上皮轻微增厚的变化;RJ200、RJ400、RJ800 组乳腺组织中导管明显增多,并可见散在的乳腺小叶存在,其中 RJ800 组最为明显,可发现该组乳腺组织中总导管的数量及管腔明显扩张。大鼠乳头直径结果中,与 CK 组(CK:1.13 mm)相比,RJ100、RJ200、RJ400、RJ800 组乳头直径分别增加 1.89%、7.22%、1.98%、4.8%,与乳腺组织切片结果基本保持一致。表明摄入高剂量 RJ 可能会促进雌性未孕大鼠的乳腺发育并促使乳腺导管数量增多。

RJ 通过与雌激素受体(ERs)相互介导而表现出雌激素活性,可导致细胞增殖和基因表达的改变<sup>[32]</sup>。Suzuki 等<sup>[12]</sup>研究表明 RJ 中四种活性物质 10-HDA、10-H2DA、2-DEA、24-MET 可优先结合 ER $\beta$  来发挥雌激素作用。因此,当 RJ 摄入过多时,四种活性物质含量增多,这可能是导致大鼠血清 E2 水平和导管数量增多的原因<sup>[12]</sup>。超高剂量组(800 mg/(kg·d))的血清 E2 水平与对照组无明显差异,可能是因为 RJ 本身的剂量依赖效应导致的。

## 4 结论

本文是首次研究 RJ 对雌性未孕大鼠乳腺组织发育的影响。研究发现,每天摄入 100 mg/kg 的 RJ 对雌性未孕大鼠血清 E2、P、PRL 水平,乳腺组织形态及生长指标无影响,能够有效发挥 RJ 的多种生物学活性功能,提示 100 mg/(kg·d) 可能是雌性未孕大鼠摄入 RJ 的最佳剂量;但每天摄入 RJ 达到 200、400、800 mg/kg 时,可不同程度上提升雌性未孕大鼠血清 E2、PRL 水平,降低血清 P 水平,促进乳腺组织发育,且呈剂量依赖效应<sup>[33]</sup>。这些影响可能部分归因于 RJ 所具有的雌激素活性和提高繁殖性能的功能<sup>[12-13]</sup>,但其中确切的作用机制还有待进一步研究。

综上,由于内分泌功能失调(E2 升高、P 下降以及 PRL 升高)可能会导致多种内分泌功能紊乱性疾病的发生,特别是乳腺增生的发生与发展。因此,处于青春期的女性或本身内分泌功能紊乱的患者应在医生的指导下正确食用 RJ,以免过量摄入对机

体造成不利影响。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Wytrychowski M, Chenavas S, Daniele G, et al. Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding [ J ]. J Food Compos Anal, 2013, 29(2): 126-133.
- [ 2 ] Schuh CMAP, Aguayo S, Zavala G, et al. Exosome-like vesicles in *Apis mellifera* bee pollen, honey and royal jelly contribute to their antibacterial and pro-regenerative activity [ J ]. J Exp Biol, 2019, 222(20): 208702.
- [ 3 ] Chen YF, You MM, Liu YC, et al. Potential protective effect of Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid on the inflammation induced by lipoteichoic acid [ J ]. J Funct Foods, 2018, 45: 491-498.
- [ 4 ] Park MJ, Kim BY, Park HG, et al. Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly [ J ]. J Asia Pac Entomol, 2019, 22(3): 684-689.
- [ 5 ] Miyata Y, Sakai H. Anti-cancer and protective effects of royal jelly for therapy-induced toxicities in malignancies [ J ]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3270.
- [ 6 ] Kawano Y, Makino K, Jinnin M, et al. Royal jelly regulates the proliferation of human dermal microvascular endothelial cells through the down-regulation of a photoaging-related microRNA [ J ]. Drug Discov Ther, 2019, 13(5): 268-273.
- [ 7 ] Fan P, Han B, Feng M, et al. Functional and proteomic investigations reveal major royal jelly protein 1 associated with anti-hypertension activity in mouse vascular smooth muscle cells [ J ]. Sci Rep, 2016, 6: 30230.
- [ 8 ] Mihajlovic D, Rajkovic I, Chinou I, et al. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells [ J ]. J Funct Foods, 2013, 5(2): 838-846.
- [ 9 ] Chiu HF, Chen BK, Lu YY, et al. Hypocholesterolemic efficacy of royal jelly in healthy mild hypercholesterolemic adults [ J ]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 497-502.
- [ 10 ] You M, Pan Y, Liu Y, et al. Royal jelly alleviates cognitive deficits and  $\beta$ -amyloid accumulation in APP/PS1 mouse model via activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF pathway and inhibition of neuronal apoptosis [ J ]. Front Aging Neurosci, 2019, 10: 428.
- [ 11 ] Inoue Y, Hara H, Mitsugi Y, et al. 4-Hydroperoxy-2-decenoic acid ethyl ester protects against 6-hydroxydopamine-induced cell death via activation of Nrf2-ARE and eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathways [ J ]. Neurochem Int, 2018, 112: 288-296.
- [ 12 ] Suzuki KM, Isohama Y, Maruyama H, et al. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly [ J ]. Evid Based Complement Alternat Med, 2008, 5(3): 295-302.
- [ 13 ] Liu X, Jiang CM, Chen Y, et al. Major royal jelly proteins accelerate onset of puberty and promote ovarian follicular development in immature female mice [ J ]. Food Sci Hum Well, 2020, 5: 8.
- [ 14 ] Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees [ J ]. Nature, 2011, 473(7348): 478-483.
- [ 15 ] Xin XX, Chen Y, Chen D, et al. Supplementation with major royal-jelly proteins increases lifespan, feeding, and fecundity in drosophila [ J ]. J Agric Food Chem, 2016, 64(29): 5803-5812.
- [ 16 ] 许宝华, 刘志勇, 曾志将. 蜂王浆对雄兔生长及繁殖性能的影响 [ J ]. 中国农业科学, 2011, 44(10): 2154-2160.  
Xu BH, Liu ZY, Zeng ZJ. Effect of royal jelly on growth and reproduction performance of male rabbits [ J ]. Sci Agr Sin, 2011, 44(10): 2154-2160.
- [ 17 ] Ghanbari E, Khazaei MR, Khazaei M, et al. Royal jelly promotes ovarian follicles growth and increases steroid hormones in immature rats [ J ]. Int J Fertil Steril, 2018, 11(4): 263-269.
- [ 18 ] Takagi H, Shibutani M, Lee KY, et al. Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats [ J ]. Reprod Toxicol, 2004, 18(5): 687-700.
- [ 19 ] Mandrup KR, Johansson HK, Boberg J, et al. Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting chemicals affect mammary gland development in female and male rats [ J ]. Reprod Toxicol, 2015, 54: 47-57.
- [ 20 ] Boberg J, Mandrup KR, Jacobsen PR, et al. Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens [ J ]. Reprod Toxicol, 2013, 40: 41-51.
- [ 21 ] Reagan SS, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited [ J ]. FASEB J, 2008, 22(3): 659-661.
- [ 22 ] Ab Hamid N, Abu Bakar AB, Zain AAM, et al. Composition of royal jelly (RJ) and its anti-androgenic effect on reproductive parameters in a polycystic ovarian syndrome (PCOS) animal model [ J ]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(6): 499.
- [ 23 ] Yoneshiro T, Kaede R, Nagaya K, et al. Royal jelly ameliorates diet-induced obesity and glucose intolerance by promoting brown adipose tissue thermogenesis in mice [ J ]. Obes Res Clin Pract, 2018, 12(1): 127-137.
- [ 24 ] Alamdari NM, Irandoost P, Roshanravan N, et al. Effects of royal jelly and tocotrienol rich fraction in obesity treatment of calorie-restricted obese rats: a focus on white fat browning properties and thermogenic capacity [ J ]. Nutr Metab (Lond), 2020, 17(1): 42.
- [ 25 ] 王佳鑫, 张政, 孙震, 等. 小鼠乳腺发育的研究进展 [ J ]. 现代畜牧兽医, 2020, 7: 60-64.  
Wang JX, Zhang Z, Sun Z, et al. The research progress of mammary gland development in mice [ J ]. Mod J Anim Husb Vet Med, 2020, 7: 60-64.
- [ 26 ] 郭旭东, 刁其玉, 王月影, 等. 芦丁对去卵巢处大鼠乳腺发育作用的影响 [ J ]. 中国农业科学, 2011, 44(6): 1266-1276.  
Guo XD, Diao QY, Wang YY, et al. Experiment study of rutin

- on mammary gland development in ovariectomized virgin rats [J]. *Sci Agr Sin*, 2011, 44(6): 1266-1276.
- [27] 张琼. 乳腺增生病肝郁气滞证心理应激及内分泌的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2006.
- Zhang Q. Correlation study on psychological stress and endocrine of liver qi stagnation syndrome in mammary gland hyperplasia [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2006.
- [28] Castellano JM, Tena SM. Metabolic control of female puberty: potential therapeutic targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(10): 1181-1193.
- [29] 王灿, 苗明三. 乳络通胶囊对大鼠乳腺增生模型的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(2): 128-131.
- Wang C, Miao MS. Effect of Ruluotong Capsule on rat mammary gland hyperplasia model [J]. *Pharmacol Clin Chin Materia Med*, 2014, 30(2): 128-131.
- [30] 吴喜宏, 张治军, 王志刚, 等. 疏肝散结消癖汤对大鼠乳腺增生及内分泌激素的影响 [J]. *实用临床医药杂志*, 2012, 16(17): 9-12.
- Wu XH, Zhang ZJ, Wang ZG, et al. Effect of Shugansanjie Xiaopi tang on hyperplasia of mammary gland and sex hormones of rat models [J]. *J Clin Med Pract*, 2012, 16(17): 9-12.
- [31] 郝振荣, 朱志宁, 郭玉琴, 等. 大豆黄酮对产奶量和牛奶品质的影响 [J]. *北京农学院学报*, 2009, 24(4): 26-27, 38.
- Hao ZR, Zhu ZN, Guo YQ, et al. Effect of Daidzein supplementation in diet on milk yield and quality in holstein lactating cows [J]. *J Beijing Univ Agric*, 2009, 24(4): 26-27, 38.
- [32] Moutsatsou P, Papoutsis Z, Kassi E, et al. Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions [J]. *Plos One*, 2010, 5(12): e15594.
- [33] Kohno K, Okamoto I, Sano O, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(1): 138-145.

[收稿日期] 2020-10-02

朱明雪,匡海学,兰辛键,等. iTRAQ法分析增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 168-175.  
Zhu MX, Kuang HX, Lan XJ, et al. Proteomic changes analyzed by iTRAQ in liver of aging female mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 168-175.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.005

# iTRAQ法分析增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化

朱明雪<sup>1,2</sup>, 匡海学<sup>1</sup>, 兰辛键<sup>3</sup>, 梁华<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 大连大学, 辽宁 大连 116622; 3. 长春中医药大学, 长春 130117)

**【摘要】** 目的 研究增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化,寻找增龄相关核心差异蛋白,基于蛋白质组学探讨增龄机理,为衰老机制的研究提供分子靶位。**方法** 使用同位素标记的相对与绝对定量(iTRAQ法)、LC-MS及生物信息学分析12月龄、3月龄雌性小鼠间差异蛋白。**结果** 两组对比鉴定到差异蛋白数369个,其中182个表现为上调,187个表现为下调。筛选后得到核心DEP中与增龄相关的差异蛋白共7个。**结论** 差异蛋白的挖掘与深入研究,将有助于阐明衰老机制及发现潜在的标志物,为衰老的预防及增龄性疾病的诊断和治疗提供新的分子靶位。

**【关键词】** 增龄;蛋白质组学;同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0168-08

## Proteomic changes analyzed by iTRAQ in liver of aging female mice

ZHU Mingxue<sup>1,2</sup>, KUANG Haixue<sup>1</sup>, LAN Xinjian<sup>3</sup>, LIANG Hua<sup>1\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China. 2. Dalian University, Dalian 116622.

3. Chanchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

Corresponding author: LIANG Hua. E-mail: hljucm\_lianghua@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the proteomic changes in the liver of aging female mice, to find the core age-related differential proteins, and to explore the aging mechanism based on proteomics, with the aim of providing molecular targets for the study of the mechanisms of aging. **Methods** In this study, differential proteins between 12- and 3-month-old female mice were analyzed using relative and absolute quantitative isotopic labeling (iTRAQ), LC-MS and bioinformatics. **Results** A total of 369 different proteins were identified by comparing the two groups, among which 182 were upregulated and 187 were downregulated. After screening, 13 age-related differential proteins in the core DEP were obtained. **Conclusions** The exploration and in-depth study of differential proteins will help elucidate the mechanisms of aging and identify potential markers, providing new molecular targets for the prevention of aging and the diagnosis and treatment of aging-related diseases.

**【Keywords】** aging; proteomics; iTRAQ

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

增龄是指机体在成熟期以后,随着年龄增加所致的衰老表现。人口老龄化的急剧增加和低出生率迅速推动了社会老龄化,并增加了与老龄化相关

的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>,但人类对衰老机制的研究从未间断。蛋白质组的研究不仅能为生命活动规律提供物质基础<sup>[2]</sup>,也能为众多种疾病机理的阐明及

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81473563)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81473563).

[作者简介]朱明雪(1986—),女,在站博士后,教师,研究方向:补益剂对增龄小鼠的作用。Email:283827171@qq.com

[通信作者]梁华(1962—),女,教授,博士生导师,研究方向:衰老及营养代谢相关病证的方剂配伍规律。Email:hljucm\_lianghua@126.com

攻克提供理论根据和解决途径<sup>[3]</sup>,亦可为中医学证候的客观化研究及病证结合研究提供新的方法和手段<sup>[4-5]</sup>。基于蛋白质组学筛选不同月龄小鼠的差异蛋白,有助于阐明衰老机制及发现潜在的标志物,为衰老的预防及增龄性疾病的诊断和治疗具有重要意义。因此,本研究使用同位素标记的相对与绝对定量(iTRAQ法)、LC-MS及生物信息学分析12月龄、3月龄雌性小鼠间差异蛋白,并深入挖掘、研究,为衰老的预防及增龄性疾病的诊断和治疗提供新的分子靶位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

无特定病原体 SPF 级 ICR 小鼠,3 月龄( $20 \pm 2$ )g、12 月龄( $35 \pm 2$ )g 雌性小鼠各 10 只,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物生产许可证号【SCXK(辽)2020-0002】。饲养期间小鼠自由摄食、饮水,饲喂普通固体饲料,由哈尔滨市南岗区玉英养殖厂提供。实验地点黑龙江中医药大学研究楼负一层屏障环境,使用许可证号【SYXK(黑)2016-004】。饲养环境:室内昼夜自然明暗交替照明,室温( $22 \pm 2$ )℃,湿度( $55\% \pm 20\%$ ),空气新鲜。所有操作均符合黑龙江中医药大学实验伦理要求(审批号:2014120101)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒(生工生物工程,中国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术,中国),iTRAQ 标记试剂盒(AB SCIEX,美国),小鼠抗细胞色素 c 单克隆抗体(BD Pharmingen,556433,美国),鼠源性抗 GAPDH 单克隆抗体(Sigma 技术有限公司,G8795-100UL,美国), $\beta$ -Actin(8H10D10) Mouse mAb(Cell signaling,3700S,美国),DTT(Sigma 技术有限公司,美国),SDS(Sigma 技术有限公司,美国),Tris(上海双向西巴斯科技发展有限公司,中国),30% Acrylamide/Bis Solution 29:1(Bio-Rad,美国),TEMED(Bio-Rad,美国),过硫酸铵(Sigma 技术有限公司,美国),COX IV(3E11) Rabbit mAb(Cell signaling,4850S,美国),IAA(Sigma 技术有限公司,美国),TEAB(Sigma 技术有限公司,美国),ACN(Merck KguA Darmstadt,德国),氨水(Acros Organics,美国),甘油、乙醇、乙腈、乙酸、甘氨酸、溴酚蓝(国药试剂,中国),生理盐

水(哈尔滨三联药业有限公司,中国)。

Mili-Q 超纯水系统(Millipore,美国),蛋白电泳仪(Bio-Rad,美国),安捷伦液相色谱仪 1290 Infinity(Agilent Technologies,美国),Waters Xbridge BEH C18 2.5  $\mu$ m 3.0  $\times$  100 mm Column XP(Waters Corporation,美国),Easy-nLC 1000 纳升级液相色谱仪(Thermo scientific,美国),Obritrapp Elite 组合式质谱仪(Thermo scientific,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

将各组小鼠颈椎脱位法处死后迅速摘取其肝,称其湿重,用胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒提取肝微粒体,基于色氨酸浓度的荧光分光光度法检测蛋白质浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳进行样品完整性检测,具体步骤均参照说明书。

#### 1.2.2 蛋白质酶解

采用蛋白滤膜辅助酶解(FASP)方法<sup>[6]</sup>,制取肽段。

#### 1.2.3 iTRAQ 标记

按照 AB SCIEX 公司 iTRAQ 标记试剂盒使用说明书操作,每组样品各取 20  $\mu$ g,用于 iTRAQ 标记。

#### 1.2.4 肽段分级

选用 Easy-nLC 1000 纳升级液相色谱仪,Waters Xbridge BEH C18 2.5  $\mu$ m 3.0  $\times$  100 mm Column XP 的分离柱对样品进行分离,得到 22 个组分。将样品冻干后用 0.1% 的甲酸复溶合并为若干份。

#### 1.2.5 LC-MS 分析

采用 Easy nLC1000 和 obritrapp Elite 液质联用平台对 iTRAQ 标记样品进行数据采集。运用 Obritrapp Elite 进行质谱分析,所有数据采集均基于 Xcalibur 软件平台进行。

#### 1.2.6 生物信息学分析

将质谱检测的原始数据通过 Maxquant 网站中的 Uniprot release 2016\_07(www.uniprot.org)数据库进行检索,将数据归一化处理后,利用 gene ontology 数据库、KEGG 数据库、STRING 数据库、经 R studio 软件对鉴定到的蛋白进行功能注释、生物通路信息分析,以及蛋白质-蛋白质相互作用网络构建(PPI)。

## 2 结果

### 2.1 蛋白质定量分析结果

蛋白质含量与色氨酸的含量成正线性相关

关系,通过测定蛋白质样品中的色氨酸含量,计算蛋白质的浓度。色氨酸定量标准曲线见图 1,根据样品测得的吸光度计算出 3 月雌鼠蛋白质含量为  $16.02 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 12 月雌鼠蛋白质含量为  $14.94 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

## 2.2 样品完整性检测结果

经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析得出蛋白质抽提定量后的跑胶质量控制结果。由图 2 可见,蛋白质电泳结果条带清晰,定量较为整齐,降解较少。

## 2.3 蛋白质鉴定结果

经数据库检索后,筛选出 12 月与 3 月雌鼠对比鉴定到蛋白数 3079 个。使用 Significant B 算法利用余补误差函数,筛选 Significant B 值的分层 (sign.level)  $\geq 2$ , 即  $P < 0.05$  者为差异蛋白,差异蛋白数 369 个,其中 182 个表现为上调,187 个表现为下调。部分差异蛋白见表 1 ( $P < 0.01$ , 蛋白信号质谱检测强度分层 (int.level)  $\geq 9$ )。

## 2.4 差异蛋白 GO 注释富集分析

通过对差异表达蛋白 (DEP) 进行 GO 功能注释

(见图 3),从分子功能 (MF)、生物过程 (BP)、细胞组成 (CC) 三方面进行分析,发现 DEP 主要涉及氧化还原、脂类生物合成、类固醇生物合成及代谢、大分子复合亚基组织、辅因子代谢过程、脂肪酸代谢过程等分子功能,细胞定位主要在线粒体、内质网等部位。

## 2.5 KEGG 信号通路分析

通过对差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析,发现差异蛋白参与的通路包括类固醇生物合成、药物代谢、P450 细胞色素 P450 对外源性药物代谢的影响、氧化磷酸化、视黄醇代谢、丙酸酯代谢、柠檬酸循环等 (见图 4)。

## 2.6 核心 DEP 的 PPI 网络构建

特异蛋白相互作用关系采用 STRING 数据库进行构建差异表达蛋白的子网络。筛选出 241 个 DEP 节点 (Significant B  $< 0.05$ ), 本项目将 Significant B  $< 0.01$  定义为核心 DEP, 共计 55 个 DEP 节点, 其可交互式网络图 (见图 5)。经筛查,核心 DEP 中与增龄相关的差异蛋白共 13 个 (见表 2)。

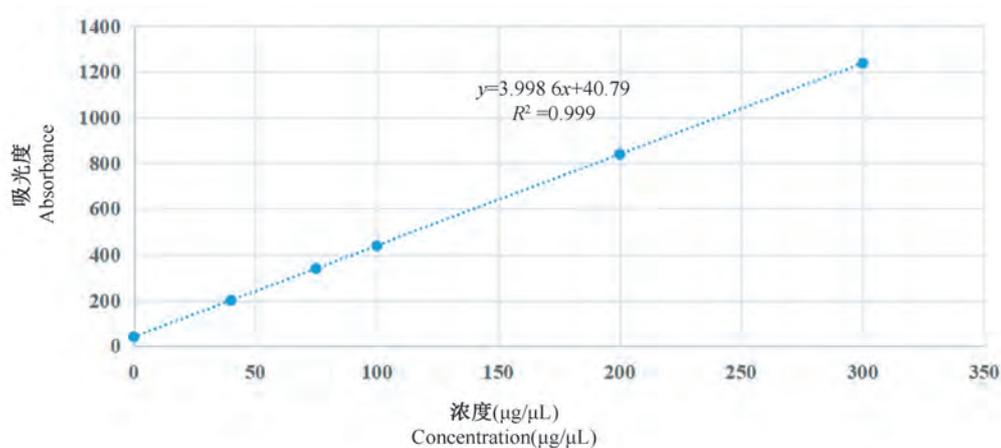


图 1 色氨酸定量标准曲线

Figure 1 Standard curve for tryptophan quantification



图 2 肝微粒体蛋白完整性检测结果

Figure 2 Detection results of liver microsomal protein integrity

表 1 部分差异蛋白信息

Table 1 Some information about the different proteins

蛋白编号 Protein number	蛋白信息描述 Protein information description	编码基因 Coding gene	变化趋势 Changing trend
P01872	免疫球蛋白重恒定 Immunoglobulin heavy constant mu	Ighm	↑
Q8CGP2	组蛋白 H2B 类型 1-P Histone H2B type 1-P	Hist1h2bp	↑
Q9DBE0	半胱氨酸亚磺酸脱羧酶 Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Csad	↑
P84244	组蛋白 H3.3 Histone H3.3	H3-3a	↑
Q9EQK5	体蛋白 Major vault protein	Mvp	↑
Q9CQT1	甲基硫代核糖-1-磷酸异构酶 Methylthioribose-1-phosphate isomerase	Mri1	↑
P0DN34	NADH 脱氢酶[泛醌] 1β 亚复合物亚基 1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 β subcomplex subunit 1	Ndufb1	↑
Q61425	羟酰基辅酶 A 脱氢酶, 线粒体 Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	Hadh	↑
Q99LC5	电子转移黄素蛋白亚基, 线粒体 Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	Etfa	↑
Q9CR21	酰基载体蛋白, 线粒体 Acyl carrier protein, mitochondrial	Ndufab1	↑
P62806	组蛋白 H4 Histone H4	H4c1	↑
Q9D823	60 核糖体蛋白 60S Ribosomal protein L37	Rpl37	↓
Q9CW42	线粒体 a 胺肪减少成分 1 Mitochondrial amidoxime-reducing component 1	Mtarc1	↓
P33267	细胞色素 P450 2F2 Cytochrome P450 2F2	CYP2F2	↓
P29416	β-己糖胺酶亚基 α β-hexosaminidase subunit α	Hexa	↓
Q6XVG2	细胞色素 P450 2C54 Cytochrome P450 2C54	CYP2C54	↓
P02088	血红蛋白亚基 β-1 Hemoglobin subunit β-1	Hbb-b1	↓
P56135	ATP 合酶亚基 f, 线粒体 ATP synthase subunit f, mitochondrial	Atp5mf	↓
P11589	主要尿蛋白 2 Major urinary protein 2	Mup2	↓
Q63880	羧基酯酶 3 A Carboxylesterase 3 A	Ces3a	↓

注: 蛋白编号; 蛋白质数据库 [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) 中的蛋白质编号; 蛋白信息描述; 基于蛋白质序列的数据库中蛋白质功能描述。

Note. Protein number. Protein number in the Protein database named 'www.uniprot.org'. Protein information description. Protein function description in a biomolecular structure based database.

表 2 核心 DEP 中与增龄相关的差异蛋白

Table 2 Differential age-related proteins in core DEP

蛋白编号 Protein number	蛋白名称 Protein name	变化趋势 Changing trend	分子功能 Molecular function	生物过程 Biological process
O88736	3-酮甾体还原酶/17-羟基甾体脱氢酶 3-keto-steroid reductase/17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	↑	氧化还原酶 Oxidoreductase	脂质生物合成, 脂质代谢, 类固醇生物合成 Lipid biosynthesis, lipid metabolism, steroid biosynthesis
Q64481	细胞色素 P450 3A16 Cytochrome P450 3A16	↓	单加氧酶, 氧化还原酶 Monooxygenase, oxidoreductase	氧化脱甲基, 类固醇代谢过程 Oxidative demethylation, a steroid metabolic process
Q6XVG2	细胞色素 P450 2C54 Cytochrome P450 2C54	↓	单加氧酶, 氧化还原酶 Monooxygenase, oxidoreductase	氧化还原过程, 花生四烯酸代谢过程, 亚油酸代谢过程 Redox processes, arachidonic acid metabolism, linoleic acid metabolism
P12791	细胞色素 P450 2B10 Cytochrome P450 2B10	↓	单加氧酶, 氧化还原酶 Monooxygenase, oxidoreductase	氧化还原过程, 细胞酮代谢过程, 环氧酶 P450 途径, 有机酸代谢过程 Redox process, keto metabolism, cyclooxygenase P450 pathway, organic acid metabolism
P63028	翻译控制的肿瘤蛋白 Translationally-controlled tumor protein	↑	钙离子结合, 转录因子结合 Calcium binding, transcription factor binding	外胚层发育的负调控, DNA 损伤反应中固有凋亡信号通路的负调控 Negative regulation of ECTODERMAL development, the negative regulation of Intrinsic apoptotic signal pathway in DNA damage response
Q8K0C4	羊毛甾醇 14-α 脱甲基酶 Lanosterol 14-α demethylase	↑	单加氧酶, 氧化还原酶 Monooxygenase, oxidoreductase	胆固醇生物合成, 胆固醇代谢, 甾类生物合成, 甾醇生物合成, 甾醇代谢 Cholesterol biosynthesis, cholesterol metabolism, lipid biosynthesis, steroid biosynthesis, sterol biosynthesis, sterol metabolism
Q62433	NDRG1 蛋白质 Protein NDRG1	↓	肿瘤抑制因子 Tumor suppressor	细胞对缺氧的反应, DNA 损伤反应, 通过 p53 类介体进行信号转导 Cellular responses to Hypoxia, DNA damage, signal transduction through p53

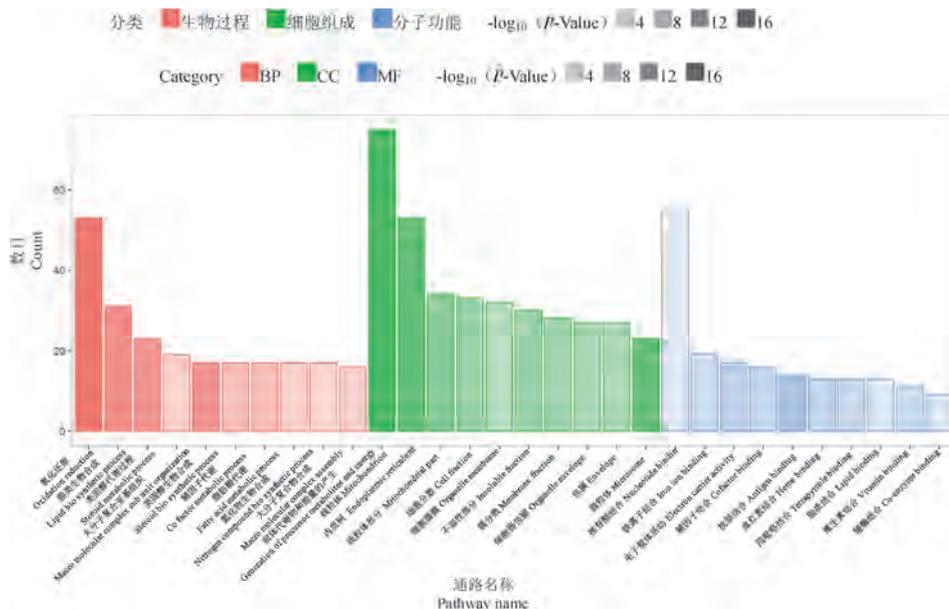


图 3 GO 分析 DEP 在 BP、CC、MF3 个方面的分布

Figure 3 Go Analysis of the distribution of DEP in BP, CC and MF3

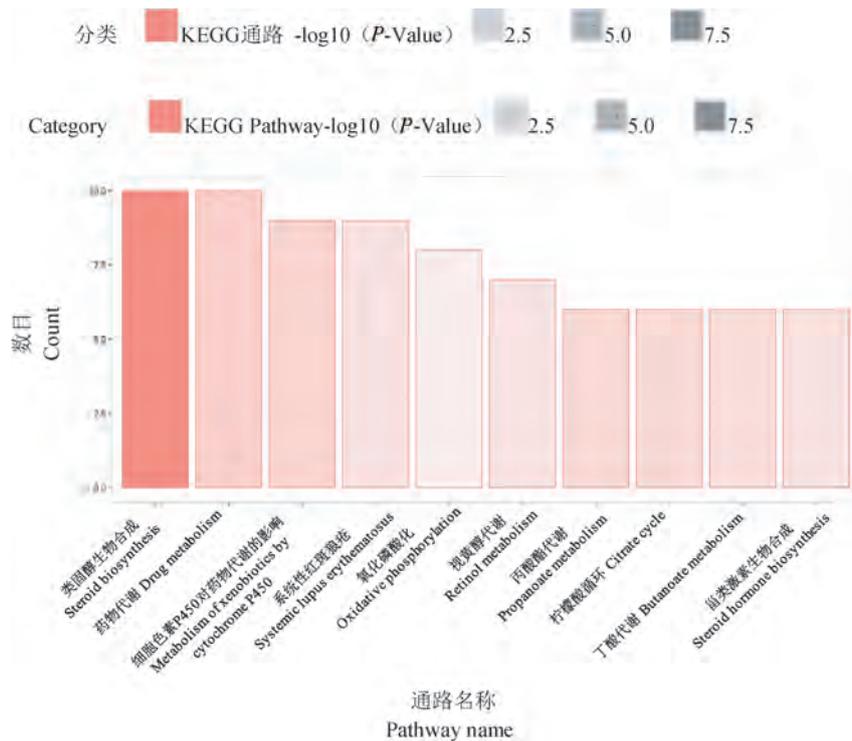
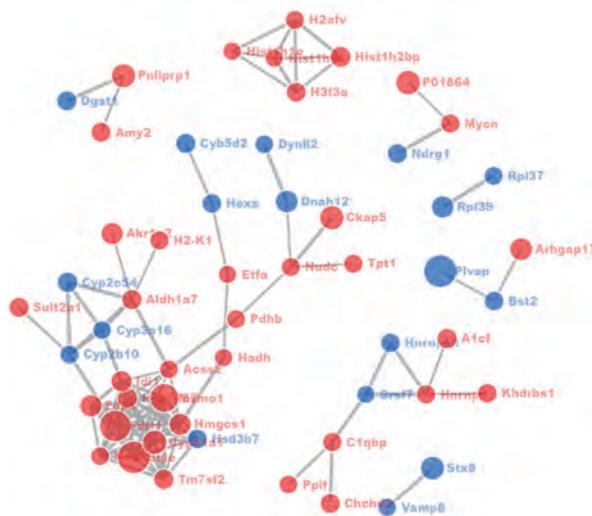


图 4 差异蛋白 KEGG 通路分析

Figure 4 Analysis of differential protein KEGG pathway



注:红色节点表示上调表达,蓝色节点表示下调表达,节点大小表示该节点再改组对比中的差异显著程度;边长度表示综合得分,成反比关系。

图 5 核心 DEP 可交互式网络图

Note. The red node indicates up expression, the blue node indicates down expression, the size of the node indicates the significant difference in the comparison of the node reorganization, and the side length indicates the comprehensive score, which is inversely proportional.

Figure 5 Core DEP interactive network diagram

### 3 讨论

3-keto-steroid reductase/17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 7 蛋白编号 O88736, 编码基因 Hsd17b7, 涉及类固醇激素代谢和胆固醇生物合成

的双功能<sup>[7]</sup>。Hsd17b7 参与角鲨烯后胆固醇的生物合成,从而完成了该中央代谢途径的所有基因的分子克隆,它作为胆固醇生物合成的 3-酮类固醇还原酶,是胆固醇代谢先天缺陷的新候选者<sup>[8]</sup>。Matsuoka 等<sup>[9]</sup>人研究发现,Hsd17b7 蛋白水平、活性

程度可影响卒中型自发性高血压模型大鼠胆固醇的含量。与 3 月龄雌鼠相比,12 月龄雌鼠 O88736 呈升高趋势,说明小鼠体内的胆固醇水平与其月龄呈正相关。

蛋白编号为 Q64481、Q6XVG2、P12791、Q8K0C4 的蛋白,均属于细胞色素 P450 氧化还原酶,是一组血红素硫醇单加氧酶,在许多组织中存在,在激素合成和分解,胆固醇代谢、维生素 D 代谢中有重要作用<sup>[10]</sup>。同时,细胞色素 P450 酶类在体内毒素包括药物、内源代谢产物,主要是肝中胆红素的代谢中起作用。在肝微粒体中,该酶参与 NADPH 依赖性电子转运途径。细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)被认为是氧化应激相关代谢性疾病的分子靶点<sup>[11]</sup>。与 3 月龄雌鼠相比,12 月龄雌鼠 Q64481、Q6XVG2、P12791 呈下降趋势,胆固醇代谢降低;Q8K0C4 呈上升趋势,胆固醇生物合成加快,导致体内的胆固醇数量增多。

实验表明,以人类年龄计算实验动物年龄,小鼠的整个生命周期约为 730 d,生殖衰退期节点为其出生后的 450 d,老年期持续时长为 280 d<sup>[12]</sup>,故 12 月雌鼠处于生殖衰退阶段,即卵巢功能衰退阶段,此阶段是心血管疾病的独立危险因素<sup>[13]</sup>。以上 5 个核心差异蛋白的发掘,说明增龄小鼠患动脉粥样硬化或血管变窄,诱发心脏病发作或中风等严重疾病的几率升高,其可能为衰老导致的血管变性疾病的分子靶位。

蛋白编号 P63028,编码基因 Tpt1, Translationally-controlled tumor protein,翻译控制肿瘤蛋白(TCTP),在调节细胞生长和体内平衡中发挥多种作用。研究表明,TCTP 在肝癌组织中显著高表达,对 AKT 和 ERK 通路的磷酸化激活有重大作用<sup>[14]</sup>,且通过激活 mTORC2/AKT 信号通路促进肝再生<sup>[15]</sup>。TCTP 具有抗凋亡活性和调控肿瘤转移的作用,已成为肿瘤治疗的一个有前景的靶点<sup>[16]</sup>。蛋白编号 Q62433,Protein NDRG1,肿瘤转移抑制因子,编码基因 NDRG1,参与上皮细胞分化,受雄激素调控表达<sup>[17]</sup>,并与 p53 蛋白的积累和活动引起细胞凋亡有关。衰老是肿瘤发生的一个重要风险因素,肿瘤发生一定程度上是衰老的自然结果<sup>[18]</sup>。本实验中与 3 月龄小鼠相比,12 月龄小鼠 P63028 升高、Q62433 降低,说明随着小鼠月龄的增长,小鼠患有

肿瘤的概率升高,其可能为衰老导致的肿瘤性疾病的分子靶位。

研究发现,衰老、神经退行性疾病和代谢疾病都与线粒体相关联<sup>[19]</sup>,且内质网与线粒体的接触决定着线粒体的复制、分裂和分布<sup>[20]</sup>。而本实验的差异蛋白细胞定位主要在线粒体、内质网等部位,亦验证了以上结论。

综上所述,本研究基于 iTRAQ 法对 3 月、12 月雌性小鼠肝微粒体蛋白进行检测分析,发现不同月龄小鼠与增龄性改变相关的关键蛋白和主要信号通路,与胆固醇合成升高、代谢降低及 TCTP 升高、肿瘤转移抑制因子降低有关。该研究有助于阐明衰老机制及发现潜在的标志物,为衰老的预防及增龄性疾病的诊断和治疗提供新的分子靶位。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Choi SH, Lee R, Nam SM, et al. Ginseng gintonin, aging societies, and geriatric brain diseases [J]. Integr Med Res, 2020, 10(1): 10045.
- [2] Castro CN, Rosenzweig M, Carapito R, et al. NCKAP1L defects lead to a novel syndrome combining immunodeficiency, lymphoproliferation, and hyperinflammation [J]. J Exp Med, 2020, 217(12): e20192275.
- [3] Shi Y, Song R, Wang L, et al. Identifying Plasma Biomarkers with high specificity for major depressive disorder: A multi-level proteomics study [J]. J Affect Disord, 2020, 277: 620-630.
- [4] 梁华,朱明雪,李奇玮,等.基于蛋白质组学的补益剂与其对应虚证的相关性研究[J].中医学报,2016,44(1):18-21.  
Liang H, Zhu MX, Li QW, et al. Correlative study on tonic prescriptions based on proteomics and its corresponding deficiency syndrome [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2016, 44(1): 18-21.
- [5] Xu X, Zhang J, Zhang Z, et al. Systems pharmacology in combination with proteomics reveals underlying mechanisms of Xihuang pill against triple-negative breast cancer [J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 1170-1188.
- [6] Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [7] Nokelainen P, Peltoketo H, Vihko R, et al. Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase ( m17HSD7 ), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat [J]. Mol Endocrinol, 1998, 12(7): 1048-1059.

- [ 8 ] Marijanovic Z, Laubner D, Moller G, et al. Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase, the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis [ J ]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(9): 1715-1725.
- [ 9 ] Matsuoka H, Uchino Y, Choshi M, et al. Stroke-prone spontaneously hypertensive rats have reduced hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 7 levels for low cholesterol biosynthesis [ J ]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47(2): 255-262.
- [ 10 ] Zhang J, Guan Y, He L, et al. Influence of a combination of triptolide and ferulic acid on the activities of CYP450 enzymes and oxidative stress in HaCaT cells [ J ]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 157.
- [ 11 ] Santes PR, Olgún RS, Hernández OSL, et al. Differential inhibition of naringenin on human and rat cytochrome P450 2E1 activity [ J ]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 69:105009.
- [ 12 ] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展 [ J ]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 116-122.  
Chen Y, Su D, Gui WJ, et al. Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans [ J ]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(11): 116-122.
- [ 13 ] 谢梅青, 谢小倩. 围绝经期女性心血管疾病的防治 [ J ]. *实用妇产科杂志*, 2020, 36(9): 647-649.  
Xie MQ, Xie XQ. Prevention and treatment of cardiovascular diseases in perimenopausal women [ J ]. *J Prac Obst Gynecol*, 2020, 36(9): 647-649.
- [ 14 ] 林智斌, 汪建林, 刘奇, 等. TCTP 在肝癌细胞增殖过程中的作用及机制研究 [ J ]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(4): 634-637.  
Lin ZB, Wang JL, Liu Q, et al. Effects and mechanisms of translationally controlled tumor protein on the proliferation of hepatoma cells [ J ]. *Prog Mod Biomed*, 2020, 20(4): 634-637.
- [ 15 ] Lin Z, Zhang X, Wang J, et al. Correction: Translationally controlled tumor protein promotes liver regeneration by activating mTORC2/AKT signaling [ J ]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 114.
- [ 16 ] Lee JS, Jang EH, Woo HA, et al. Regulation of autophagy is a novel tumorigenesis-related activity of multifunctional translationally controlled tumor protein [ J ]. *Cells*, 2020, 9(1): 257.
- [ 17 ] 李艾为, 乔艳, 朱熹, 等. 肿瘤转移抑制因子 NDRG1 的研究进展 [ J ]. *实用医学杂志*, 2017, 33(1): 147-149.  
Li AW, Qiao Y, Zhu X, et al. Research progress of tumor metastasis suppressor NDRG1 [ J ]. *J Practical Med*, 2017, 33(1): 147-149.
- [ 18 ] Poropatich K, Fontanarosa J, Samant S, et al. Cancer immunotherapies: are they as effective in the elderly? [ J ]. *Drugs Aging*, 2017, 34(8): 567-581.
- [ 19 ] Filippov MA, Tatarnikova OG, Pozdnyakova NV, et al. Inflammation/bioenergetics-associated neurodegenerative pathologies and concomitant diseases: a role of mitochondria targeted catalase and xanthophylls [ J ]. *N Neural Regen Res*, 2021, 16(2): 223-233.
- [ 20 ] Lewis SC, Uchiyama LF, Nunnari J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells [ J ]. *Science*, 2016, 353(6296): aaf5549.

[ 收稿日期 ] 2020-10-22

张慧琴,霍乃蕊,冀霞,等. 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 176-182.  
Zhang HQ, Huo NR, Ji X, et al. Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 176-182.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.006

# 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响

张慧琴<sup>#</sup>, 霍乃蕊<sup>#</sup>, 冀霞, 段卓, 马林峰, 古少鹏<sup>\*</sup>

(山西农业大学动物医学学院, 山西 晋中 030801)

**【摘要】** 目的 探究羊骨胶原肽(sheep bone collagen peptide, SBCP)对正常状态及脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)活化状态巨噬细胞免疫能力的影响。方法 以不同剂量的 SBCP 作用于未经 LPS 活化和 LPS 活化的大鼠腹腔巨噬细胞, 分别以 MTT 法和中性红法测定巨噬细胞代谢活力和吞噬活性, Griess 法测定 NO 分泌量, ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量, qRT-PCR 测定 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)通路相关基因及负性调控因子单 Ig 区 IL-1 相关受体(Single Ig IL-1-related receptor, SIGIRR)的 mRNA 表达量。结果 SBCP 作用于正常状态的巨噬细胞, 可提高其代谢活力, 吞噬活性及 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌量, 上调 TLRs 通路相关基因表达量, 下调 SIGIRR mRNA 表达量, 均呈剂量依赖性, SBCP 剂量为  $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$  时, 与 LPS 空白组无显著性差异。SBCP 作用于 LPS 活化的巨噬细胞时, 可抑制其代谢活力, 以  $10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$  效果最佳; 对吞噬活性及 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌量的抑制均以  $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$  最佳; 并下调 TLRs 相关基因表达量且上调 SIGIRR mRNA 的表达量。结论 SBCP 通过 TLRs 信号通路对炎症反应发挥双向调节作用, 剂量为  $10 \sim 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$  时可增强巨噬细胞的免疫能力,  $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$  时可诱导巨噬细胞释放大量炎症介质。而对 LPS 诱导的炎症反应, SBCP 各剂量组均具有抑制作用。

**【关键词】** 羊骨胶原肽; 巨噬细胞; 免疫功能; Toll 样受体(TLRs); 炎症因子

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0176-07

## Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages

ZHANG Huiqin<sup>#</sup>, HUO Nairui<sup>#</sup>, JI Xia, DUAN Zhuo, MA Linfeng, GU Shaopeng<sup>\*</sup>

(College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Corresponding author: GU Shaopeng. E-mail: shpgu@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of sheep bone collagen peptide (SBCP) on the immune function of macrophages with or without stimulation with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Rat peritoneal macrophages were treated with different doses of SBCP, with or without stimulation with LPS. The metabolic activity and phagocytic ability of macrophages were measured by MTT assay and the neutral red method, respectively. The production of NO was measured with the Griess reaction, and TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression levels of key genes in the Toll-like receptor pathway and the negative regulatory factor Single Ig IL-1-related receptor were measured by qRT-PCR. **Results** SBCP treatment of normal macrophages increased their metabolic activity, phagocytosis, NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production, and upregulated mRNA expression of key genes in the TLR pathway and

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31201347), 山西省重点研发计划(201803D221024-2)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31201347), Province Key R&D Program of Shanxi(201803D221024-2).

**【作者简介】** 张慧琴(1995—), 女, 硕士, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: 1374096546@qq.com;

霍乃蕊(1972—), 女, 教授, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: tgnrhuo@163.com。

<sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 古少鹏(1968—), 男, 教授, 研究方向: 兽医公共卫生与动物疾病防治。Email: shpgu@163.com

downregulated SIGIRR mRNA expression in a dose-dependent manner. At a concentration of  $10^5 \mu\text{g/mL}$ , there was no significant difference between the SBCP and LPS group. SBCP treatment of LPS-stimulated macrophages inhibited their metabolic activity, with  $10^2 \mu\text{g/mL}$  having the greatest effect, while  $10^3 \mu\text{g/mL}$  most strongly inhibited phagocytosis and the secretion of NO, TNF- $\alpha$  and IL-6. This concentration also downregulated the mRNA expression of TLR-related genes and upregulated the mRNA expression of SIGIRR. **Conclusions** SBCP has a dual regulatory effect on the inflammatory response through the TLR signaling pathway. At a concentration of  $10 \sim 10^4 \mu\text{g/mL}$ , it enhances the immune activity of macrophages, while at  $10^5 \mu\text{g/mL}$ , it induces macrophages to release various inflammatory mediators. However, SBCP inhibits the inflammatory reaction induced by LPS.

**【Keywords】** sheep bone collagen peptide; macrophages; immunity; Toll-like receptors (TLRs); inflammatory factors  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国为畜牧大国<sup>[1]</sup>,羊骨资源十分丰富,但其生物利用率极低,多用于动物饲料的添加<sup>[2]</sup>。羊骨营养丰富,蛋白含量约为 15.4%,但 90% 以上的羊骨蛋白为生物利用度很低的胶原蛋白<sup>[2-3]</sup>。通过酶解制成羊骨胶原多肽 (sheep bone collagen peptide, SBCP), 不仅可提高生物利用度<sup>[4-5]</sup>, 而且赋予了其独特的生理功能, 如抗氧化<sup>[6]</sup>、免疫调节<sup>[7]</sup>、改善骨质疏松骨<sup>[8]</sup>等。

巨噬细胞是一种多功能细胞<sup>[9]</sup>, 几乎存在于所有组织, 构成机体免疫的第一道防线, 是炎症反应的核心细胞<sup>[10]</sup>。巨噬细胞受到细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后, 释放炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 和 IFN- $\gamma$  等, 产生 NO、活性氧等一系列炎症介质, 激活 TLRs、NF- $\kappa$ B、MAPK 等信号通路<sup>[11]</sup>, 参与机体的炎症级联反应<sup>[12]</sup>。

前期研究表明, SBCP 可增强大鼠的免疫功能<sup>[7]</sup>。本研究旨在探究 SBCP 对大鼠腹腔巨噬细胞体外吞噬活性、代谢活力、炎症因子释放能力等免疫功能的影响; 同时以 LPS 刺激大鼠腹腔巨噬细胞, 建立炎症免疫调节的细胞模型, 探究 SBCP 对炎症的免疫调节作用, 为 SBCP 开发为免疫调节剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

30 只 2 ~ 3 月龄 SPF 级 SD 大鼠, 体重 ( $203 \pm 20$ ) g, 雌雄兼用购自中国食品药品检定研究院 (大兴)【SCXK(京)2017-0005】。饲养于山西农业大学动物实验室【SYXK(晋)2020-0003】。维持饲料购自山西医科大学动物实验中心。自由饮水, 控制环境温度 ( $22 \pm 2$ ) °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 昼夜交替各 12 h, 其它环境条件符合 GB14923-2001 的要

求。本试验方案符合山西农业大学动物护理与使用委员会的要求 (SXAU-EAW-2020SD0201)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

羊骨胶原肽购自内蒙古锡盟肽好, 蛋白含量为 98.78%, 其中含 90.78% 分子量  $\leq 1000$  Da 的肽, 6.89% 羟脯氨酸。RPMI-1640 基础培养液 (Hyclone)、脂多糖 (索莱宝, 北京)、胎牛血清 (ScienCell, 美国)、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白介素 6 (Interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒购自江苏酶免; RT-PCR 及 SYBR<sup>TM</sup> Premix Ex Tap<sup>TM</sup> II 试剂为 TaKaRa 产品等。

311 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo, 美国); SpectraMax M5 酶标仪 (Molecular Devices, 美国); StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠腹腔巨噬细胞的制备及分组处理

大鼠腹腔巨噬细胞的提取参照 Petinatti 等<sup>[13]</sup>的方法, 离心 ( $1500 \text{ r/min}$ ,  $5 \text{ min}$ ) 所得沉淀即腹腔巨噬细胞, 加入 RPMI-1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素-庆大霉素混合溶液) 重悬细胞, 调节细胞浓度至每毫升  $2 \times 10^6$  个。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养至细胞贴壁, 弃掉培养液, 无血清培养基洗去未贴壁细胞即得纯化的巨噬细胞。

96 孔板, 每孔接种  $2 \times 10^5$  个巨噬细胞, 培养至贴壁, 更换 RPMI-1640 完全培养基, 加入 SBCP (PBS 溶解) 和/或 LPS 后, 用完全培养基补充至 200  $\mu\text{L}$ 。SBCP 组分别加入终浓度为  $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5 \mu\text{g/mL}$  的 SBCP; LPS + SBCP 组在加入上述浓度 SBCP 的同时加入 10  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS。所有处理组每个浓度设置 3 个复孔, 并设置阴性对照孔 (只含巨噬细胞)、炎症模型孔 (巨噬细胞 + 10  $\mu\text{g/mL}$  的 LPS) 和调零孔 (只含培养基)。

#### 1.2.2 巨噬细胞代谢活力及吞噬活性的测定

各组细胞培养 12 h 后,弃去培养液,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL)和 90  $\mu\text{L}$  完全培养基,孵育 4 h,加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO,缓慢震荡 10 min,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值( $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ )。巨噬细胞吞噬中性红的测定参照左爱玲<sup>[7]</sup>的方法进行。

### 1.2.3 巨噬细胞炎性介质和炎性因子分泌量的测定

收集各组细胞上清液,参考 Kim 等<sup>[14]</sup>的方法测定其中炎性介质 NO 的含量,按试剂盒说明测定其中炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量。

### 1.2.4 巨噬细胞总 RNA 的提取及 qRT-PCR

6 孔板,每孔接种  $2 \times 10^6$  个巨噬细胞,培养至贴壁,更换 RPMI-1640 完全培养基,加入 SBCP 和/或 LPS 后,用完全培养基补充至 3 mL。参照田胜男等<sup>[15]</sup>的方法提取巨噬细胞 RNA,微量紫外分光光度计测定浓度。RT-PCR 参照李杰等<sup>[16]</sup>的方法进行。qRT-PCR 按照 TaKaRa 试剂盒说明建立总体积为 10  $\mu\text{L}$  的反应体系,程序:95 $^{\circ}\text{C}$  10 min;95 $^{\circ}\text{C}$  15 s,60 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  10 s,40 个循环;插入熔解曲线,60 $^{\circ}\text{C}$  1 min,95 $^{\circ}\text{C}$  15 s。反应结束后,以 GAPDH 为内参基因,2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算 TLRs 通路相关基因在巨噬细胞中 mRNA 的表达量。巨噬细胞 TLR4 等引物序列(上海生工合成)及预期产物大小见表 1。将 qRT-PCR 产物送至生工(上海)进行测序,确保其为目的基因片段。

### 1.3 统计学分析

SPSS 26.0 对试验数据进行单因素方差分析,

多重比较使用 LSD,以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,GraphPad Prism 8.0 绘制柱状图, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SBCP 对巨噬细胞代谢活力和吞噬活性的影响

MTT 法中,巨噬细胞的代谢活力与  $\text{OD}_{490\text{ nm}}$  值呈正相关,SBCP 各剂量组除 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  外均极显著增强巨噬细胞代谢活力( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。经 LPS 诱导后,巨噬细胞代谢活力极显著增强( $P < 0.01$ ),SBCP 各剂量组均可抑制其代谢活力,以  $10^2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  效果最佳(图 1A)。在中性红吞噬试验中, $\text{OD}_{540\text{ nm}}$  值越大,巨噬细胞的吞噬活性越强,不经 LPS 刺激的正常巨噬细胞,SBCP 浓度越大,巨噬细胞的吞噬功能越强;经 LPS 刺激后,其吞噬活性极显著增强,SBCP ( $10^2 \sim 10^4$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的加入则起到极显著的抑制作用( $P < 0.01$ ),以  $10^3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  效果最佳(图 1B)。

### 2.2 SBCP 对巨噬细胞炎性介质和炎性因子分泌量的影响

SBCP 各剂量组均可促进巨噬细胞炎性介质 NO(图 2A)和炎性因子 TNF- $\alpha$ (图 2B)、IL-6(图 2C)的分泌,且呈剂量依赖性,浓度为  $10^5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,上述物质的分泌量与 LPS 组无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 1 TLRs 通路各基因的 qRT-PCR 引物序列及预期产物大小

Table 1 Primer sequences and the expected size of qRT-PCR product of genes in TLRs pathway

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	产物大小(bp) Product size (bp)
TLR4	F:GACTTTAACTACCAACAGAGAGGAT R:AAATCAGAATAAGAACAGCAACC	120
SIGIRR	F:GTGGCTGAAAGATGCTCTGGCATTG R:CAGGTGAAGGTTCCATAGTCTCTGTC	123
Nf- $\kappa$ Bp65	F:AGAGAAGCACAGATACCACTAAGA R:GTTACAGCCTCATAGAAGCCATC	165
MyD88	F:ATTGAGAAAAGGTGTCGTCGCAT R:TCGCAGATAGTATGAACCGTAGG	191
TRAF6	F:GAGAGATTCTTTCCCTGACGGTA R:TTGGGGACAAATCACTAGAGCC	119
TNF- $\alpha$	F:TCGTCTACTCCTCAGAGCCC R:ACTTCAGCGTCTCCTGTGTT	128
GAPDH	F:TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R:AGTGGGAGTTGCTGTTGAAGT	233

经 LPS 诱导,巨噬细胞的 NO, TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), 不同剂量的 SBCP 均可抑制上述炎症介质和炎症因子的分泌, 均以  $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$  效果最佳。

### 2.3 SBCP 对巨噬细胞内 TLRs 通路相关基因 mRNA 表达量的影响

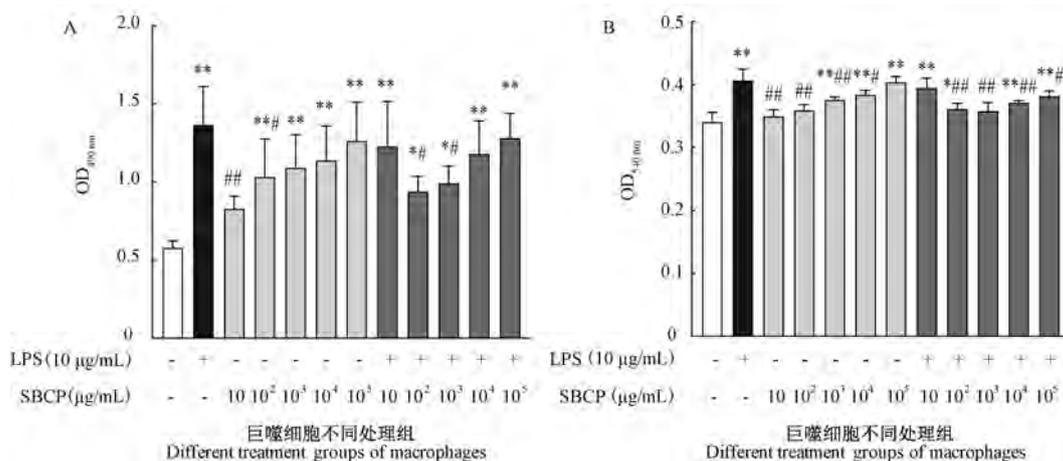
不同剂量的 SBCP 均可上调巨噬细胞中 TLR4 (图 3A)、Nf- $\kappa\text{Bp}65$  (图 3C)、MyD88 (图 3D)、TRAF6 (图 3E) 和 TNF- $\alpha$  (图 3F) mRNA 的表达量, 并下调其负性调控因子 SIGIRR (图 3B) mRNA 的表达量, 且均呈剂量依赖性。

经 LPS 诱导, 巨噬细胞 TLR4、Nf- $\kappa\text{Bp}65$ 、

MyD88、TRAF6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), SIGIRR mRNA 的表达量极显著降低 ( $P < 0.01$ )。LPS+SBCP 组中, 不同剂量的 SBCP 对 TLRs 通路上述相关基因表达则呈反向调节,  $10^3 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 SBCP 极显著下调 Nf- $\kappa\text{Bp}65$ 、TRAF6、TNF- $\alpha$  mRNA 的表达量 ( $P < 0.01$ ),  $10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 SBCP 极显著下调 MyD88 mRNA 的表达量 ( $P < 0.01$ ),  $10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$  的 SBCP 使 TLR4 的表达极显著下降, 使 SIGIRR mRNA 表达极显著上升 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

炎症反应过程中, 机体组织中的巨噬细胞首先



注:“-”代表不加 LPS,“+”代表加 LPS;与阴性对照组比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与炎症模型组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。(下同)。

图 1 SBCP 对巨噬细胞代谢活性及吞噬活性的影响

Note. “-” means no LPS. “+” means adding LPS. Compared to the negative control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared to the inflammatory model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

Figure 1 Effects of SBCP on metabolic activity and phagocytic function of macrophages with or without the stimulation by LPS

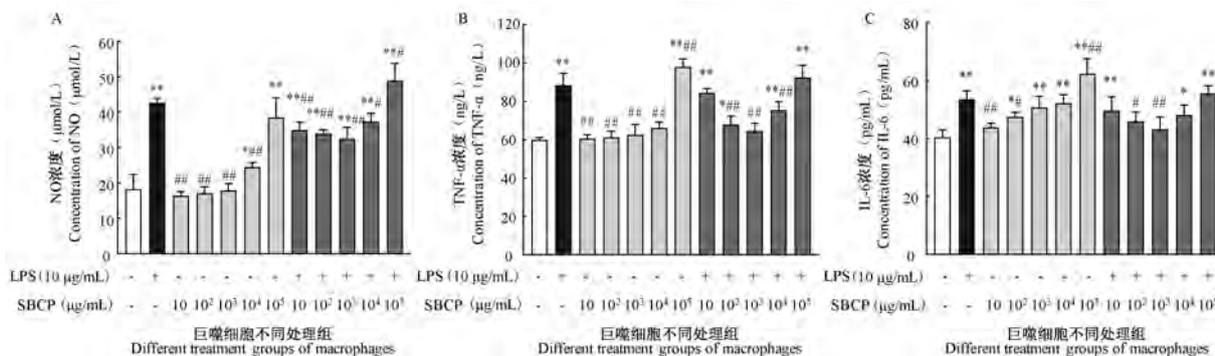


图 2 SBCP 对巨噬细胞 NO、TNF- $\alpha$  及 IL-6 分泌量的影响

Figure 2 Effects of SBCP on NO, TNF- $\alpha$  and IL-6 production by macrophages

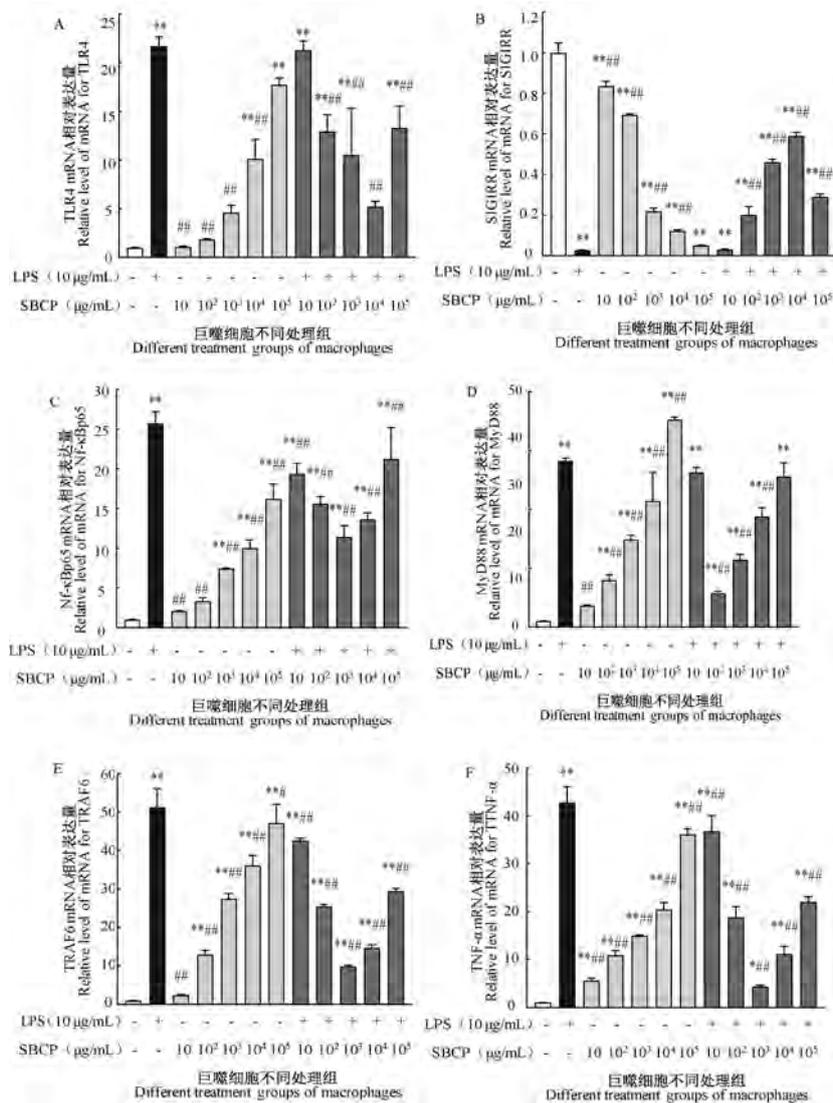


图3 SBCP对巨噬细胞TLRs通路关键基因mRNA表达量的影响

Figure 3 Effects of SBCP on mRNA expression of key genes in TLRs signaling pathway in macrophages

与异物接触而活化,分泌并释放各种炎症介质和炎症细胞因子,招募单核细胞、嗜中性粒细胞等到达炎灶,吞噬降解细菌、递呈抗原,激活Th、Tc以及B淋巴细胞,辅助激活特异性免疫应答,在抗感染、抗肿瘤免疫中发挥作用<sup>[17]</sup>。炎症是一种保护性的生理反应,反应初期,炎症介质和炎症因子的适量释放有助于机体对抗炎症反应,过量释放则加重炎症反应,造成机体组织损伤。本研究 $10 \sim 10^4 \mu\text{g/mL}$  SBCP可增强巨噬细胞的吞噬活性和代谢活性,促进TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎症因子和炎症介质NO的释放,但 $10^5 \mu\text{g/mL}$ 的SBCP刺激巨噬细胞时上述指标变化与LPS差异都不显著,所以在实际应用中应当控制SBCP的用量,适当浓度可发挥免疫增强作用,浓

度过高则可能诱发炎症反应。

炎症反应初期NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6的分泌量是判断炎症模型是否建立成功的标志<sup>[18-19]</sup>。经LPS活化的巨噬细胞,炎症介质NO及炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6等的分泌量极显著增加,与姜文清等<sup>[20]</sup>、庞逸敏等<sup>[21]</sup>的研究结果一致,说明LPS诱导的巨噬细胞炎症模型建立成功。LPS+SBCP组中,不同剂量的SBCP对巨噬细胞的代谢活力和吞噬活性均起到抑制作用,同时可降低炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和炎症介质NO的释放,说明SBCP可通过抑制巨噬细胞的代谢和吞噬活性,降低炎症因子和炎症介质的分泌发挥抗炎作用。

TLRs是介导炎症反应的主要信号通路<sup>[22]</sup>。

LPS 与巨噬细胞表面的 Toll 样受体相互作用,进一步激活 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[23]</sup>,NF- $\kappa$ B 转移至细胞核内,启动炎症因子 TNF- $\alpha$  等基因的转录和翻译,引发炎症反应<sup>[24]</sup>。LPS 刺激下,负性调控因子 SIGIRR 与 TLR4 受体复合物结合,抑制 TLRs 信号通路的传导,从而抑制炎症的发生<sup>[25]</sup>。qPCR 结果表明,不同剂量的 SBCP 均可上调巨噬细胞 TLRs 通路相关基因 mRNA 的表达量,下调 SIGIRR mRNA 的表达量,说明 SBCP 可通过激活 TLRs 通路增强机体免疫功能。LPS 诱导的炎症模型中,巨噬细胞 TLRs 通路相关基因 mRNA 的表达量极显著升高,SIGIRR mRNA 的表达量极显著降低,与 Brady 等<sup>[26]</sup>的研究结果一致。LPS 诱导,加入不同剂量的 SBCP 对 TLRs 通路相关基因及 SIGIRR 表达呈反向调节,说明 SBCP 可通过抑制 TLRs 通路相关基因的表达,促进负性调控因子的表达从而发挥抗炎作用。

综上所述,SBCP 可通过 TLRs 信号通路对炎症反应发挥双向调节作用,剂量为  $10 \sim 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$  可增强巨噬细胞的免疫能力, $10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$  时诱导巨噬细胞释放大量炎性介质,引起炎症反应。而对 LPS 诱导的炎症反应,SBCP 各剂量组均发挥抑制作用,具有一定的抗炎效果。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 霍乃蕊,马俪珍,忻欣,等.羊骨酶解发酵液钙螯合物对骨质疏松大鼠骨密度和骨代谢生化指标的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(3):216-220.  
Huo NR, Ma LZ, Xin X, et al. Effect of SBEF-Ca on bone mineral density and biochemical parameters of bone metabolism in rats with osteoporosis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(3): 216-220.
- [ 2 ] 霍乃蕊,岳文斌,刘玉花,等.羊骨木瓜蛋白酶水解物对小鼠免疫功能的影响[J].中国实验动物学报,2010,18(5):417-420.  
Huo NR, Yue WB, Liu YH, et al. Immunomodulatory effect of papain hydrolysate originated from sheep bone on mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(5): 417-420.
- [ 3 ] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens-structure, function, and biosynthesis [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2003, 55(12): 1531-1546.
- [ 4 ] Zhao Y, Li B, Dong S, et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioidea hydrolysate [J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [ 5 ] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chem, 2009, 113(1): 238-245.
- [ 6 ] 张琪.骨胶原肽及钙螯合胶原肽对去卵巢大鼠抗氧化能力的改善作用[D].太谷:山西农业大学;2018.  
Zhang Q. The improvement of antioxidant capacity of sheep bone collagen peptide (SBCP) and collagen peptide chelated calcium (CPCC) in ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2018.
- [ 7 ] 左爱玲.钙螯合胶原肽等对去卵巢大鼠免疫功能的改善作用[D].太谷:山西农业大学;2017.  
Zuo AL. Immunoregulatory Effect of calcium chelating collagen peptides on ovariectomized rats [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University; 2017.
- [ 8 ] 原恺,李爱玲,韩克光,等.羊骨胶原肽对去卵巢大鼠的骨质改善作用[J].山西农业大学学报(自然科学版),2019,39(1):102-106.  
Yuan K, Li AL, Han KG, et al. Sheep bone collagen peptide improve bone quality of ovariectomized rats [J]. J Shanxi Agr Univ (Social Sci Edition), 2019, 39(1): 102-106.
- [ 9 ] van Rooijen N, Sanders A. Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? [J]. J Leukoc Biol, 1997, 62(6): 702-709.
- [ 10 ] Song JY, Han SK, Son EH, et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan [J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(7): 857-865.
- [ 11 ] Lai JC, Peng LZ, Chen HD, et al. Amino acid sequence identification and anti-inflammatory potency evaluation of dandelion oligopeptides in LPS-induced RAW264.7 macrophage cells [J]. J Mol Struct, 2020, 1216: 128280.
- [ 12 ] Pioletti DP, Takei H, Lin T, et al. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function [J]. Biomaterials, 2000, 21(10): 1103-1114.
- [ 13 ] Petinatti PD, Nogueira EF, Callejon DR, et al. Novel bisabolane derivative from "arnica-da-serra" (Vernoniaeae: Asteraceae) reduces pro-nociceptive cytokines levels in LPS-stimulated rat macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3): 993-998.
- [ 14 ] Kim GY, Choi GS, Lee SH, et al. Acidic polysaccharide isolated from Phellinus iinteus enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from peritoneal macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 95(1): 69-76.
- [ 15 ] 田胜男,苏静芬,向志光,等.两种核酸提取方法对小鼠诺如病毒 RNA 提取效能的比较[J].中国比较医学杂志,2013,23(9):60-63.  
Tian SN, Su JF, Xiang ZG, et al. Comparison of two RNA extraction methods for Murine Norovirus [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(9): 60-63.
- [ 16 ] 李杰,谢燕燕,王馨,等.人凝血因子 IX 基因在小鼠脂肪干细胞中的稳定表达[J].中国实验动物学报,2020,28(4):532-538.  
Li J, Xie YY, Wang X, et al. Stable expression of human coagulation factor IX in mouse adipose-derived stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 532-538.

- [17] Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 531(6): 29-43.
- [18] 李玉秀, 李覃, 姬文婕, 等. 土荆皮乙酸对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应及 M1 表型偏移的抑制作用 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(5): 625-629.  
Li YX, Li T, Ji WJ, et al. Inhibitory effects of pseudolaric acid B on inflammatory response and M1 phenotype polarization in RAW264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Cell Mol Imm*, 2016, 32(5): 625-629.
- [19] Balne K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs [J]. *J Pain Res*, 2015, 8: 105-118.
- [20] 姜文清, 戚艳, 沙若荷, 等. PTEN 在多烯磷脂酰胆碱下调 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 44-49.  
Jiang WQ, Qi Y, Sha RH, et al. Inhibitory effect of PTEN on polyene phosphatidylcholine in downregulating LPS-induced macrophage inflammatory response [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8): 44-49.
- [21] 庞逸敏, 甘露, 王献哲, 等. 塞来昔布对脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型炎症因子的影响 [J]. *中国当代医药*, 2017, 24(10): 4-7.  
Pang YM, Gan L, Wang XZ, et al. Influence of Celecoxib on inflammatory cytokines of inflammation model in RAW 264.7 macrophages induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin Mod Med*, 2017, 24(10): 4-7.
- [22] 王琴, 付宇, 王平. 沉默 miRNA-16 对肺结核模型小鼠免疫功能的调控作用及其机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 86-91.  
Wang Q, Fu Y, Wang P. Regulatory effect and mechanism of silencing microRNA-16 on immune function in mice with pulmonary tuberculosis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 86-91.
- [23] Haque MA, Jantan I, Harikrishnan H, et al. Standardized extract of Zingiber zerumbet suppresses LPS-induced pro-inflammatory responses through NF- $\kappa$ B, MAPK and PI3K-Akt signaling pathways in U937 macrophages [J]. *Phytomedicine*, 2019, 54: 195-205.
- [24] Guma M, Stepniak D, Shaked H, et al. Constitutive intestinal NF- $\kappa$ B does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation [J]. *J Exp Med*, 2011, 208(9): 1889-1900.
- [25] O'Neil LA. SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(9): 823-824.
- [26] Brady M, Bhatia M, Christmas S. Expression of the chemokine MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2002, 25(3): 260-269.

[收稿日期] 2020-10-28

吴文静,张昕,谭霞,等. SRC 激酶和磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的相互作用对小鼠附睾精子成熟及运动的调控 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 183-189.

Wu WJ, Zhang X, Tan X, et al. Regulation of the maturation and motility of mouse epididymal sperm by interaction of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 183-189.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.007

# SRC 激酶和磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的相互作用对小鼠附睾精子成熟及运动的调控

吴文静<sup>#</sup>, 张昕<sup>#</sup>, 谭霞, 解道豪, 杨明华<sup>\*</sup>, 李亚辉<sup>\*</sup>

(云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201)

**【摘要】** 目的 哺乳动物附睾精子成熟、运动能力的获得与维持是保证精子执行正常功能、完成受精的前提和基础,但调控此过程的机制仍未完全阐明。SRC 激酶参与小鼠精子获能的调控, Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 是调控小鼠精子成熟、运动性获得的关键酶,但二者是否具有相互作用且这种相互作用是否调控着精子运动并不清楚。为此,本研究探究了小鼠精子中 SRC 激酶与磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的关联性及其对精子运动的调控作用,旨在阐明其调控精子运动的作用机制。**方法** 通过 Western Blot 技术、酶活性分析技术以及免疫共沉淀技术分析昆明小鼠附睾头和附睾尾精子苏氨酸磷酸化水平、SRC 激酶活性、附睾头和附睾尾精子酶活性和 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶相互关系,探讨 SRC 激酶抑制剂(SU6656)和激活剂(sc-3052)分别对附睾尾、附睾头精子磷酸酶活性和运动度的影响。**结果** 附睾尾精子苏氨酸磷酸化水平高于附睾头精子;附睾头精子中的 SRC 激酶活性低于小鼠附睾尾精子;附睾头精子磷酸酶活性显著高于附睾尾精子磷酸酶活性( $P < 0.05$ );附睾尾精子中 SRC 激酶与 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 具有关联性作用,进而调控精子活力;在 SRC 激酶活性较高的附睾尾精子中,添加 SU6656,磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 活性随之增加,精子活力下降;在 SRC 激酶活性较低的附睾头精子中,添加 sc-3052,磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 活性随之下降,而精子活力增加。**结论** 小鼠附睾头与附睾尾精子中 SRC 激酶和磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的活性具有显著差异;小鼠精子中 SRC 激酶与 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 具有相互作用,呈负相关性,即 SRC 激酶通过抑制精子中磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 活性以调控精子运动。

**【关键词】** SRC; PP1 $\gamma$ 2/PP2A; Ser/Thr 磷酸酶; 附睾; 精子运动; 精子成熟

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0183-07

## Regulation of the maturation and motility of mouse epididymal sperm by interaction of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A

WU Wenjing<sup>#</sup>, ZHANG Xin<sup>#</sup>, TAN Xia, XIE Daohao, YANG Minghua<sup>\*</sup>, LI Yahui<sup>\*</sup>

(Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Corresponding author: YANG Minghua. E-mail: 1161205847@qq.com; LI Yahui. E-mail: kmliyh@163.com

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(31860330,31460308),云南省农业基础研究联合专项重点项目(2018FG001-012)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31860330,31460308), Joint Special Program for Basic Agricultural Research of Yunnan Province(2018FG001-012).

**【作者简介】** 吴文静(1994—),男,在读硕士研究生,研究方向:动物生殖生物学。Email:2538584791@qq.com;

张昕(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:动物生殖生物学。Email:740856160@qq.com。

<sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 杨明华(1967—),女,硕士,高级实验师,研究方向:动物学及动物营养与代谢调控。Email:1161205847@qq.com;

李亚辉(1967—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:动物生殖与发育生物学。Email:kmliyh@163.com。

<sup>\*</sup>共同通信作者

**【Abstract】 Objective** The maturation of mammalian epididymal sperm and the acquisition and maintenance of motility are prerequisites for normal sperm function and complete fertilization; however, the mechanism that regulates this process is still unclear. SRC kinase is involved in the regulation of mouse sperm capacitation, and the serine/threonine phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A is the key enzyme that regulates epididymal sperm maturation and motility. However, it is unclear whether these molecules interact with each other and whether this interaction regulates sperm motility (including motility acquisition). In this study, we investigated the role of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A in Kunming mouse sperm and their regulation of sperm functions. **Methods** Using western blot, enzyme activity assay and co-immunoprecipitation assay, we examined threonine phosphorylation level as well as enzyme activity of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A in Kunming mouse sperm from caput and cauda epididymis. In addition, we investigated the interaction of SRC kinase and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A. We also investigated the effects of a SRC inhibitor (SU6656) and an activator (sc-3052) on phosphatase activity and motility of sperm from cauda and caput epididymis. The phosphorylation level of threonine in sperm of cauda epididymis was higher than that in caput epididymis. SRC kinase activity in sperm from caput epididymis was lower than that in epididymal cauda sperm. The phosphatase activity of sperm from caput epididymis was significantly higher than that from cauda epididymis ( $P < 0.05$ ). SRC kinase in mouse epididymal sperm modulates phosphatase PP1 $\gamma$ 2 or PP2A, which in turn influences sperm motility. **Results** In epididymal cauda sperm, where SRC is more active, when SRC activity is inhibited by SU6656, the activity of phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A is increased, while sperm motility is decreased. In epididymal caput sperm where SRC is less active, when SRC activity is enhanced by sc-3052, the PP1 $\gamma$ 2/PP2A phosphatase activity is reduced, while sperm motility is increased. **Conclusions** The activity of SRC and phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A in caput sperm from mouse epididymis is significantly different from that in cauda sperm. SRC kinase interacts with phosphatase PP1 $\gamma$ 2 or PP2A in mouse sperm. SRC kinase modulates sperm motility (including motility acquisition) by inhibiting the activity of phosphatase PP1 $\gamma$ 2/PP2A.

**【Keywords】** SRC; PP1 $\gamma$ 2/PP2A; Ser/Thr phosphatase; epididymis; sperm motility; sperm maturation  
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

蛋白激酶和磷酸酶调控细胞内蛋白的磷酸化水平,已有的研究更多的是蛋白激酶对精子功能的调控,而磷酸酶对精子功能的调控研究报道较少,且在精子功能(如精子运动)调控中蛋白激酶与磷酸酶是否存在相互作用,其作用机制如何等均未被阐明。

在 SRC 家族激酶 (SRC family kinases, SFKs) 中,最早发现的 SFKs 成员是 SRC 激酶<sup>[1-2]</sup>。Stival 等<sup>[3]</sup>建立了 *Src* 基因敲除的小鼠模型,发现 *Src* 基因敲除的小鼠精子活力显著降低。进一步研究发现抑制 SRC 激酶会抑制小鼠获能相关的酪氨酸磷酸化增加、改变精子运动性以及小鼠精子的顶体反应<sup>[4]</sup>。

Ser/Thr 磷酸酶在由未成熟精子变成成熟精子过程中发生磷酸化,并且与精子运动性有密切联系<sup>[5]</sup>。刘芳等<sup>[6]</sup>的研究表明小鼠精子中磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2 和 PP2A 对小鼠附睾精子成熟、运动性及精子获能具有重要的调控作用,表现出负调控的作用方式:即 PP1 $\gamma$ 2 和 PP2A 活性高,精子运动性低,PP1 $\gamma$ 2 和 PP2A 活性低,则精子运动性高,但这种负调控机制至今不清楚。Signorelli 等<sup>[7]</sup>研究发现人精子中的 PP1 $\gamma$ 2 被抑制时,获能精子数显著增加。

Ser/Thr 磷酸酶在获能过程中酶活性呈下降趋势,但其蛋白表达量不发生改变,这种磷酸酶活性的下降和随后苏氨酸磷酸化的增加可能是精子获能成功的重要条件。Krapf 等<sup>[8]</sup>研究发现 SRC 激酶抑制剂 SU6656 或 SKI606 能够抑制小鼠精子获能及获能时发生的蛋白酪氨酸磷酸化,但 Ser/Thr 磷酸酶抑制剂如 Okadaic acid 和 Calyculin-A 能够消除 SU6656 或 SKI606 对小鼠精子获能的抑制作用。表明 Ser/Thr 磷酸酶抑制剂克服了 SFKs 抑制剂对获能相关信号转导的阻碍,这些信号转导包括与精子获能相关的超激活运动<sup>[8]</sup>。鉴于精子运动性是保证精子获能的前提条件,且精子在获能过程中伴随着超激活运动,说明获能中的一些分子及事件可能对精子运动产生影响,因此认为:Ser/Thr 磷酸酶可能对精子的运动具有调控作用,且其作用可能与 SRC 分子相关,这一观点在此之前并未得到证明。而且,磷酸酶对精子运动性的调控大多来自牛、犬、灵长类、仓鼠等物种的实验,在小鼠上仅报道过其对精子超激活运动的调节<sup>[9-13]</sup>。SRC 激酶参与小鼠精子获能的调控,Ser/Thr 磷酸酶是调控小鼠精子成熟、运动性获得的关键酶,但目前都是从单个分子角度研究对小鼠精子获能的调控,目前对 Ser/Thr

磷酸酶与 SRC 激酶的关联性研究仅限于 Krapf 等<sup>[8]</sup>这篇关于精子获能的报道, Krapf 等<sup>[8]</sup>从精子获能相关的参数研究了这两者之间对小鼠精子获能的调控作用, 而精子获能伴随着精子超激活运动的发生, 所以 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶可能会共同调控小鼠精子运动, 为了获得其精子运动性的调控以及精子成熟机理, 为此, 本研究探索了 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶之间的联系对小鼠精子运动的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

本试验选用 60 只 8 ~ 12 周龄体重至少 36 g 性成熟雌性清洁级昆明小鼠, 由昆明医科大学【SCXK(滇)2020-0004】提供。所有小鼠饲养在昆明医科大学实验动物楼【SYXK(滇)K2020-0006】, 饲养环境: 室温(22 ± 3) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 12 h 循环灯光, 自由取食饮水。按照云南农业大学生命科学伦理委员会批准的实验方案进行(审批号: 202005011)。

#### 1.1.2 主要试剂

洗精液: NaCl、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、Glucose、Pyruvic acid、lactic acid、Hepes(获能液包含 CaCl<sub>2</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、BSA)除 BSA 购自 Solarbio 公司, 其它试剂均购自 Sigma 公司; SRC 抗体(Cell Signaling Technology, 2108 s); phos-SRC 抗体(Cell Signaling Technology, 59548 s); phos-Threonine 抗体(Cell Signaling Technology, #9386); PP1γ2 抗体(Abcam, ab134947); PP2A 抗体(Abcam, ab32104); sc-3052(Santa Cruz Biotechnology, sc-3052); SU6656(Med Chem Express, HY-B0789); 洗精液参照文献 Tateno 等<sup>[14]</sup>的方法配制。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 不同获能时间对小鼠附睾头和附睾尾精子中苏氨酸磷酸化的影响

小鼠附睾精子在洗精液中游离出来后观察精子活力并计数, 附睾头精子悬液不孵育直接提取蛋白, 附睾尾精子悬液按照 0、10、30、60、90 min 时间梯度孵育然后进行 Western Blot 分析。

#### 1.2.2 SRC 激酶在小鼠附睾头和附睾尾精子中的存在形式

将小鼠附睾头和附睾尾精子直接提取蛋白, 然

后进行 Western Blot 分析。

#### 1.2.3 SRC 激酶与 PP1γ2 和 PP2A 的免疫共沉淀分析

SRC 激酶与 PP1γ2 和 PP2A 的相互作用通过免疫共沉淀分析, 具体的实验操作步骤采用 Stival 等<sup>[3]</sup>的方法。

#### 1.2.4 小鼠附睾头和附睾尾精子磷酸酶活性分析

采用 Jin 等<sup>[15]</sup>的方法对小鼠精子中磷酸酶活性进行分析。

#### 1.2.5 SRC 抑制剂及激活剂分别对小鼠附睾尾和附睾头精子磷酸酶活性和运动度影响

向小鼠附睾头和附睾尾精子悬液分别加入 50 μmol/L sc-3052 和 50 μmol/L SU6656, 具体的实验操作步骤采用 Jin 等<sup>[15]</sup>的方法。

#### 1.2.6 小鼠附睾头和附睾尾精子中 SRC 激酶活性的分析

小鼠附睾精子在洗精液中游离出来后观察精子活力并计数, 具体的实验操作步骤采用 Leclerc 等<sup>[16]</sup>的方法。

## 2 结果

### 2.1 不同获能时间对小鼠附睾头和附睾尾精子中苏氨酸磷酸化的影响

小鼠附睾尾精子中苏氨酸的磷酸化水平高于附睾头精子, 并且小鼠附睾尾精子在 0 min 就开始磷酸化(见图 1)。结果表明, 参与 Ser/Thr 去磷酸化的 Ser/Thr 磷酸酶在附睾头精子中比在附睾尾精子中更活跃。

### 2.2 SRC 在小鼠附睾头和附睾尾精子中的存在形式

附睾头精子中 SRC 激酶的非磷酸化水平明显高于附睾尾精子。相反, 在附睾头精子中磷酸化的 SRC 激酶(Y416 位点)的水平明显低于附睾尾精子(见图 2)。一般来说, 非磷酸化的 SRC 激酶代表没有或很少催化活性, 而磷酸化的 SRC(Y416 位点)具有较高的酶活性。因此, 结果表明, SRC 激酶在附睾头精子中的活性低于附睾尾精子。

### 2.3 SRC 激酶与 PP1γ2 和 PP2A 的免疫共沉淀分析

当 SRC 激酶抗体与精子悬液孵育时, 可以沉淀 SRC 激酶, 并通过 Western Blot 检测到 PP1γ2(图 3Aa)。相反, 阴性对照组不加 SRC 激酶抗体, 通过 Western Blot 没有检测到蛋白沉淀(图 3Ab)。结果

表明 SRC 激酶与 PP1 $\gamma$ 2 相互作用。当 SRC 激酶抗体与精子悬液孵育时,可以沉淀 SRC 激酶,并通过 Western Blot 检测到 PP2A(图 3Ba)。相反,阴性对照组不加 SRC 激酶抗体,通过 Western Blot 没有检测到蛋白沉淀(图 3Bb)。这些结果表明 SRC 激酶与 PP2A 相互作用。

#### 2.4 小鼠附睾头和附睾尾精子磷酸酶活性分析

为了确保准确的结果,分别用  $0.5 \times 10^6$  和  $1.0 \times 10^6$  细胞检测了附睾头和附睾尾精子的磷酸酶活性。对比结果如图 4 所示,表明无论精子细胞数量多少,附睾头精子的磷酸酶活性都明显高于附睾尾精子,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。

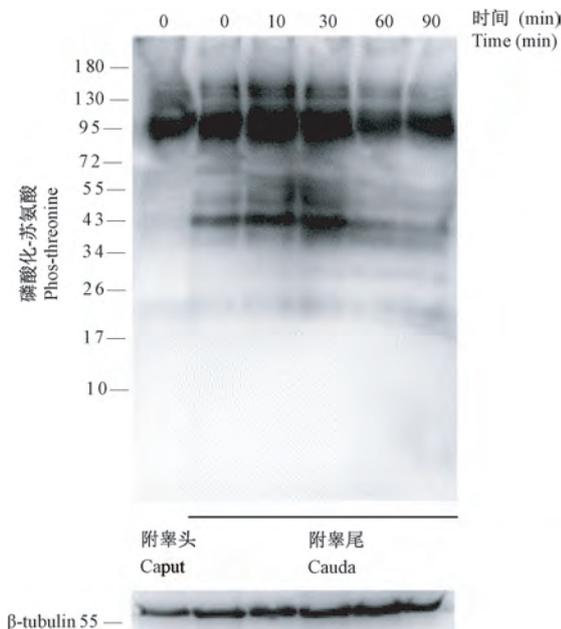


图 1 不同获能时间对小鼠附睾头和附睾尾精子中苏氨酸磷酸化的影响

Figure 1 Threonine phosphorylation in mouse sperm from the caput and cauda of epididymis

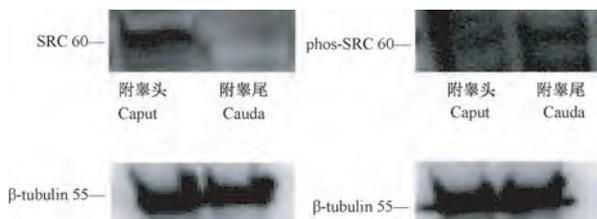


图 2 SRC 与 phos-SRC 在小鼠附睾头和附睾尾精子中的存在形式

Figure 2 Present form of SRC in mouse sperm from the caput and cauda of epididymis

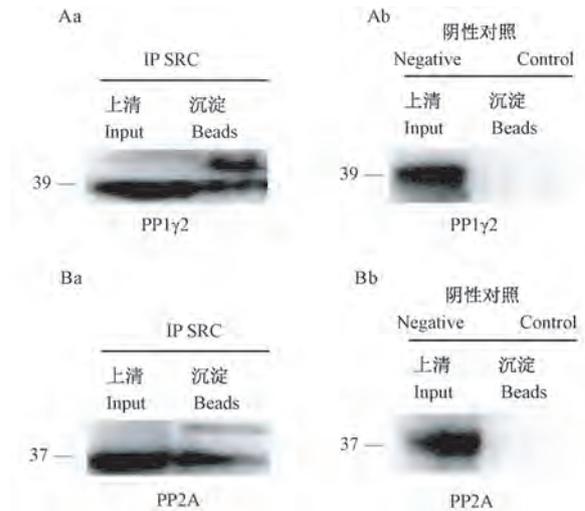
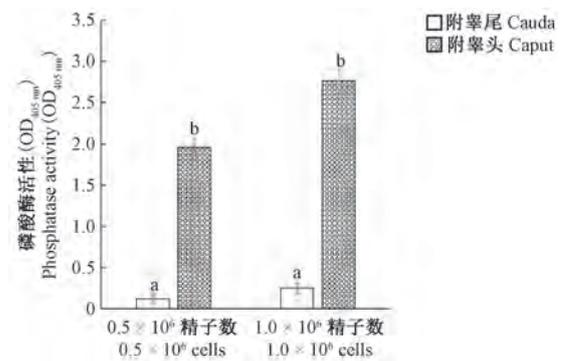


图 3 SRC 与 PP1 $\gamma$ 2 和 PP2A 的免疫共沉淀分析

Figure 3 Co-immunoprecipitation analysis of SRC with PP1 $\gamma$ 2 and PP2A



注:图中相同精子数条件下,与附睾尾比, $bP < 0.05$ 。

图 4 昆明小鼠附睾头和附睾尾精子磷酸酶活性分析  
Note. This is the same sperm count compared to caudal epididymis,  $bP < 0.05$ .

Figure 4 Analysis of phosphatase activity in caput and cauda sperm of mouse epididymis

#### 2.5 SRC 抑制剂对小鼠附睾尾精子磷酸酶活性和运动度的影响

对照组是成熟的附睾尾精子,当磷酸酶受到抑制或活性降低时,精子表现出较高的活力。然而,当 SRC 激酶抑制剂 SU6656 添加到附睾尾精子中孵育 30 min,磷酸酶活性增加,而精子的运动度与对照组相比显著降低( $P < 0.05$ )(见图 5),表明 SRC 激酶对磷酸酶有抑制作用, SRC 激酶通过抑制附睾尾精子的磷酸酶活性来调控精子运动度。这也表明,即使在精子成熟且运动活跃的附睾尾中,精子的运动度也是通过 SRC 激酶、磷酸酶等某些酶活性的改变而可逆的。同时表明 SRC 激酶、磷酸酶及其相互

作用在调节精子运动中起着关键作用。

### 2.6 SRC 激活剂对小鼠附睾头精子磷酸酶活性和运动度的影响

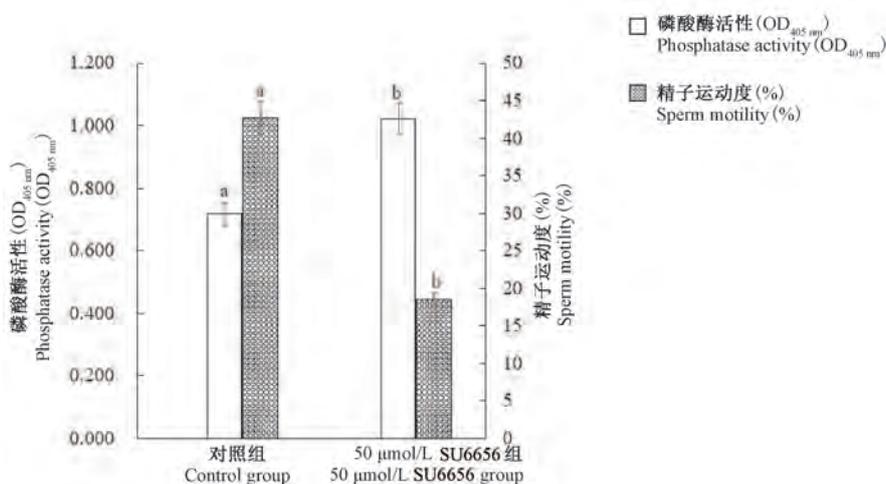
对照组是运动度较低的附睾头精子,但磷酸酶活性较高。然而,将 SRC 激活剂的激活剂 sc-3052 添加到附睾头精子中孵育 30 min,磷酸酶活性降低,而精子运动度与对照组相比显著增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 6),说明与附睾尾精子不同,SRC 激活剂在附睾头精子中是不活跃或活性较低,被 sc-3052 激活活性升高。

### 2.7 sc-3052 对小鼠附睾头精子中 SRC 激酶活性的影响

当 SRC 激酶的底物 enolase 与附睾头精子孵育时,enolase 组 SRC 激酶活性明显高于非 enolase 组。此外,在精子悬液中添加 SRC 激酶激活剂 sc-3052, SRC 激酶活性明显升高 (见图 7),说明 SRC 激酶在附睾头精子中是不活跃或活性很低,被 sc-3052 激活活性升高。

### 2.8 SU6656 对小鼠附睾尾精子中 SRC 激酶活性的影响

当 SRC 激酶的底物 enolase 与附睾尾精子孵育时,enolase 组 SRC 激酶活性明显高于非 enolase 组。



注:与对照组比,  $bP < 0.05$ 。(下图同)

图 5 SRC 激酶抑制剂对小鼠附睾尾精子磷酸酶活性和运动度影响

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

Figure 5 Effects of SRC inhibitor on sperm phosphatase activity and motility in cauda sperm of mouse epididymis

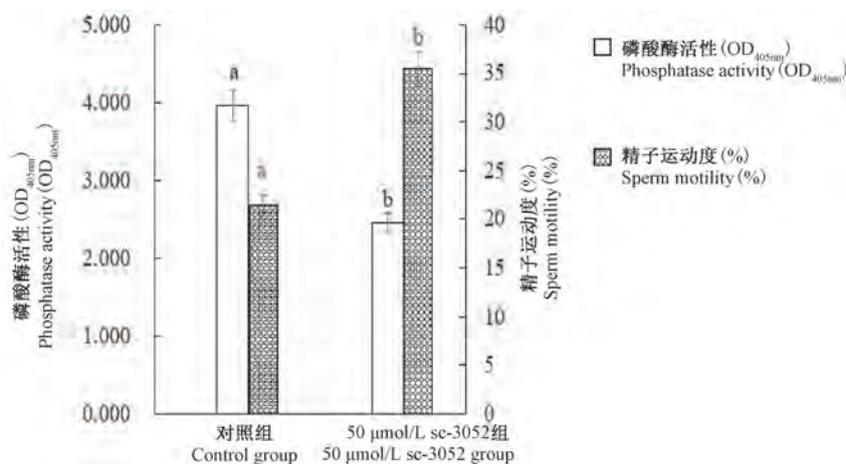


图 6 SRC 激酶激活剂对小鼠附睾头精子磷酸酶活性和运动度影响

Figure 6 Effects of SRC activator on phosphatase activity and motility in caput sperm of mouse epididymis

相反,在精子悬液中添加 SRC 激酶抑制剂 SU6656, SRC 激酶活性明显下降(见图 8)。SRC 激酶在附睾尾精子中的活性高于附睾头精子(与图 7 相比)。

### 3 讨论

研究显示 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 在不运动的小鼠附睾头精子中的催化活性远高于具有运动能力的附睾尾精子,且通过化学药物干预抑制或激活这两种磷酸酶可以使精子运动度发生显著变化,表明 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 在精子运动的启动和调节中发挥作用,这与其他物种上(如牛,灵长类等)的研究结果“磷酸酶对附睾精子成熟具有调控作用”一致<sup>[5,17]</sup>。此外本研究结果首次表明了 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的活性受 SRC 激酶的调节控制。

本研究发现小鼠附睾头精子中 SRC 激酶活性低于附睾尾精子,且精子运动度低于附睾尾精子,而 Ser/Thr 磷酸酶活性高于附睾尾精子,在运动度较低的附睾头精子中加入 SRC 激酶激活剂 sc-3052,能显著降低 Ser/Thr 磷酸酶活性但显著提高精子运动度,在运动度较高的附睾尾精子中加入 SRC 激酶抑制剂 SU6656,能显著增加 Ser/Thr 磷酸酶活性但显著降低精子运动度,表明 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶之间可能具有某种相互作用从而调控小鼠精子运动,且通过免疫共沉淀分析得到 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 具有关联性作用,其可能是这二者都参与调控精子运动性,结合其 Ser/Thr

磷酸酶活性以及运动度分析,表明 SRC 激酶通过抑制小鼠精子 Ser/Thr 磷酸酶活性从而调控小鼠精子运动度,其作用机制可能是小鼠精子在从附睾头转移至附睾尾的过程中, SRC 激酶活性增强,抑制了其 Ser/Thr 磷酸酶活性,通过其 Ser/Thr 磷酸酶活性变化而实现对精子运动的调控作用。未成熟精子从附睾头到附睾尾最终成为成熟精子,这个过程精子活力逐渐增强,而 Ser/Thr 磷酸酶活性逐渐下降,因此 Ser/Thr 磷酸酶活性变化与精子运动性有关<sup>[7]</sup>。从 Krapf 等<sup>[8]</sup>的研究表明, SRC 激酶抑制剂可以阻断小鼠精子获能相关的蛋白酪氨酸磷酸化,但 Ser/Thr 磷酸酶抑制剂能够消除 SRC 激酶抑制剂对获能的影响,包括体外受精。这似乎暗示了 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶具有某种关联性。本研究证明小鼠精子中 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 与 SRC 激酶确实存在相互作用,且 SRC 激酶通过调控 Ser/Thr 磷酸酶的活性而对小鼠精子运动作出调控,即 SRC 激酶通过抑制 Ser/Thr 磷酸酶而提高小鼠精子的运动能力。本研究首次为精子中 SRC 激酶和磷酸酶间存在互作关系之推测提供了直接的证据。研究所发现的小鼠精子中 SRC 激酶对 Ser/Thr 磷酸酶具有抑制作用这一现象与 SRC 激酶在其它细胞中的作用结果相一致,此前,有研究证明 SRC 激酶可以下调其它细胞的 Ser/Thr 磷酸酶<sup>[18-19]</sup>。SRC 激酶在不同种类细胞中对 Ser/Thr 磷酸酶具有相似的调控作用,说明 SRC 激酶作用机制的通用性。

探明 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶之间的联系对

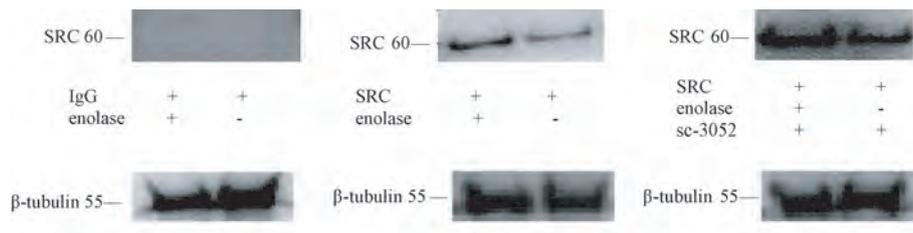


图 7 sc-3052 对小鼠附睾头精子中 SRC 激酶活性的影响

Figure 7 Effect of sc-3052 on SRC kinase activity in epididymal caput sperm

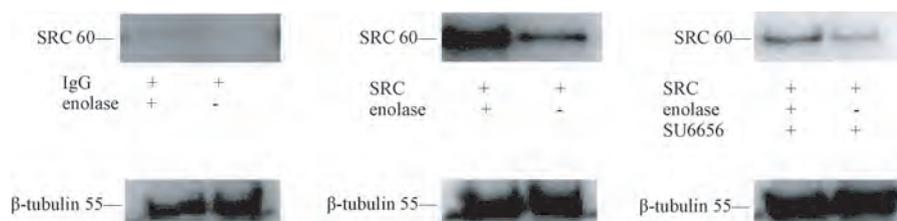


图 8 SU6656 对小鼠附睾尾精子中 SRC 激酶活性的影响

Figure 8 Effect of SU6656 on SRC kinase activity in epididymal cauda sperm

小鼠精子运动性的调控作用,有助于获得小鼠附睾尾精子成熟和运动的机理,还能丰富 SRC 激酶与 Ser/Thr 磷酸酶对小鼠精子运动性调控的研究内容以及作用机制,为相关男性不育症的理解和诊治提供科学依据。

本研究虽然阐明了 SRC 激酶和 Ser/Thr 磷酸酶 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 的相互作用及其对精子运动的调控作用,但其中仍有一些问题并不清楚,如 SRC 激酶活性的调节受控于何种分子、SRC 激酶和 Ser/Thr 磷酸酶之间是直接作用还是通过其他分子起作用、是何分子、何种磷酸酶(PP1 $\gamma$ 2 还是 PP2A 或 PP2B)起作用、磷酸酶失活(被抑制)后又是如何引发精子运动的,其下游的信号通路是什么等,这些重要问题的解答将有助于深入理解 Ser/Thr 磷酸酶对精子运动精细调控作用机制及较为完整的相关信号转导途径,它们可作为磷酸酶与精子功能关系领域中未来的重点研究内容,其中一些内容正在本实验室中进行。

## 4 结论

研究发现小鼠附睾头精子中 SRC 激酶活性低于附睾尾精子而 Ser/Thr 磷酸酶活性显著高于附睾尾精子,研究表明小鼠附睾精子中 SRC 激酶与 PP1 $\gamma$ 2/PP2A 具有相互作用,呈负相关性,即 SRC 激酶通过抑制精子中 Ser/Thr 磷酸酶活性以调控精子运动。

### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Signorelli JR, Diaz ES, Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(3): 765-782.
- [ 2 ] Chakrabarti R, Cheng L, Puri P, et al. Protein phosphatase PP1 gamma 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 445-452.
- [ 3 ] Stival C, La Spina FA, Baró GC, et al. Src is the connecting player between PKA activation and hyperpolarization through SLO3 regulation in mouse sperm [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(30): 18855-18864.
- [ 4 ] Mitchell LA, Nixon B, Baker MA, et al. Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(4): 235-243.
- [ 5 ] Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, et al. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility [J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(3): 719-727.
- [ 6 ] 刘芳, 杨明华, 朱方方, 等. PP1 $\gamma$ 2 对昆明小鼠精子成熟和运动性的调控作用 [J]. *云南农业大学学报*, 2018, 33(6): 1054-1059.
- [ 7 ] Liu F, Yang MH, Zhu FF, et al. Sperm maturation and motility in kunming mice regulated by protein phosphatase PP1 $\gamma$ 2 [J]. *J Yunnan Agr Univ (Nat Sci)*, 2018, 33(6): 1054-1059.
- [ 8 ] Signorelli JR, Díaz ES, Fara K, et al. Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81286.
- [ 9 ] Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV, et al. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of src kinase inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(11): 7977-7985.
- [ 10 ] Boatman DE, Robbins RS. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions [J]. *Biol Reprod*, 1991, 44(5): 806-813.
- [ 11 ] Iqbal N, Hunter AG. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation [J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78(1): 91-102.
- [ 12 ] Uhler ML, Leung A, Chan SY, et al. Direct effects of progesterone and antiprogesterone on human sperm hyperactivated motility and acrosome reaction [J]. *Fertil Steril*, 1992, 58(6): 1191-1198.
- [ 13 ] Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida [J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(6): 1280-1285.
- [ 14 ] Nichol R, Hunter RH, de Lamirande E, et al. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs [J]. *J Reprod Fertil*, 1997, 110(1): 79-86.
- [ 15 ] Tateno H, Kamiguchi Y. Evaluation of chromosomal risk following intracytoplasmic sperm injection in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(2): 336-342.
- [ 16 ] Jin C, He J, Zou J, et al. Phosphorylated lipid-conjugated oligonucleotide selectively anchors on cell membranes with high alkaline phosphatase expression [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2704.
- [ 17 ] Leclerc P, Goupil S. Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and inhibition by Ca<sup>2+</sup> [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 301-307.
- [ 18 ] Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity [J]. *Biol Reprod*, 1996, 54(3): 709-718.
- [ 19 ] Chen J, Parsons S, Brautigan DL. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(11): 7957-7962.
- [ 20 ] Srinivasan M, Begum N. Regulation of protein phosphatase 1 and 2A activities by insulin during myogenesis in rat skeletal muscle cells in culture [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(17): 12514-12520.

王燕鸽,高子涵,李宗霖,等. 注射突变 *p53* 基因 CRISPR/Cas9 质粒和肝癌细胞建立肝癌小鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 190-196.

Wang YG, Gao ZH, Li ZL, et al. Construction of a hepatocellular carcinoma mouse model by injection of a mutant *p53* gene CRISPR/Cas9 plasmid and hepatoma cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 190-196.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.008

# 注射突变 *p53* 基因 CRISPR/Cas9 质粒和肝癌细胞 建立肝癌小鼠模型

王燕鸽,高子涵,李宗霖,王康龙,白雪,李瑞芳\*,有曼,王红伟

(河南科技大学基础医学院药理学系,河南省肝病防治工程技术中心,河南 洛阳 471023)

**【摘要】** 目的 采用尾静脉注射突变 *p53* 基因 CRISPR/Cas9 质粒和 H22 细胞建立肝癌模型。方法 将健康雄性 BALB/c 小鼠随机空白组(生理盐水)、质粒组(质粒)、对照组(H22 细胞+盐水)、实验组(H22 细胞+质粒),每组 25 只。尾静脉注射建立肝癌模型。分别在注射后的 2、3、4、5 周中取材,眼眶采血检测小鼠血清转氨酶(ALT/AST)水平。观察肝、肺表面变化及结节数目,计算各组小鼠的成模率、死亡率以及脏器指数。HE 染色观察小鼠肝的组织病理形态学改变。免疫组化、Western Blot 等方法检测小鼠肝中 *p53* 及 PCNA 蛋白的表达情况。**结果** 实验组和对照组均能成功构建转移性肝癌小鼠模型,其中实验组和对照组小鼠的成模率分别为 60.87% 和 45.83%,死亡率为 4.35% 和 29.17%。两组小鼠血清 ALT、AST 水平均有显著增加,肝表面按时间顺序也出现大小不等的囊肿和白色颗粒状结节。HE 结果显示 5 周后实验组和对照组小鼠肝小叶结构均有不同程度的破坏,呈明显肿瘤病理学改变。质粒组与实验组小鼠肝中 *p53* 蛋白的表达量明显降低( $P < 0.05$ );实验组和对照组的肝组织中 PCNA 蛋白表达显著增加,且实验组表达量明显高于对照组( $P < 0.05$ )。**结论** 通过尾静脉注射突变 *p53* 基因 CRISPR/Cas9 质粒和 H22 细胞的方法能够成功快速构建转移性肝癌小鼠模型。

**【关键词】** 尾静脉注射;基因编辑;突变 *p53* 基因;H22 细胞;转移性肝癌模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0190-07

## Construction of a hepatocellular carcinoma mouse model by injection of a mutant *p53* gene CRISPR/Cas9 plasmid and hepatoma cells

WANG Yange, GAO Zihan, LI Zonglin, WANG Kanglong, BAI Xue, LI Ruifang\*, YOU Man, WANG Hongwei

(Department of Pharmacy, School of Basic Medicine, Henan University of Science and Technology, Henan Engineering Technology Center of Liver Disease Prevention and Control, Luoyang 471023, China)

Corresponding author: LI Ruifang. E-mail: ylliruifang@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish a mouse model of liver cancer by injecting mutant *p53* gene CRISPR/Cas9 plasmid and H22 cells into the tail vein. **Methods** Healthy male BALB/c mice were randomly divided into blank group (normal saline), plasmid group (Plasmid), control group (H22 cells + saline) and experimental group (H22 cells + Plasmid), each with 25 mice. Tail vein injection was used to establish the liver cancer model. Samples were taken at 2, 3, 4 and 5 weeks after the injection, and blood was collected from the orbit to detect serum aminotransferase (ALT/AST). Liver and lung surface changes and the number of nodules were observed, and successful modeling rate, mortality and organ

[基金项目]河南省科技攻关项目(202102310486)。

Funded by Henan Province Science and Technology Project(202102310486).

[作者简介]王燕鸽,硕士研究生,研究方向:肿瘤药理学研究。Email:wang666333@qq.com

[通信作者]李瑞芳,副教授,硕士生导师。Email:ylliruifang@163.com

index in each group were assessed. HE staining was used to observe the pathological and morphological changes in the liver. Immunohistochemistry, western blot and other method were used to evaluate the expression of p53 and PCNA protein in the liver. **Results** Both the experimental group and the control group showed successful generation of a mouse model of metastatic liver cancer. The rates of successful modeling in the experimental and control groups were 60.87% and 45.83%, respectively, and the mortality rate was 4.35% and 29.17%, respectively. The serum ALT and AST levels in the two groups of mice increased significantly, and cysts and white granular nodules of varying sizes appeared on the liver surface over time. The HE result showed that the liver lobules in the experimental and control groups were damaged to varying degrees after 5 weeks, showing obvious tumor-related pathological changes. The expression of p53 protein in the liver of the plasmid and experimental groups was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The expression of PCNA protein in the liver tissue of the experimental and control groups was increased significantly, and expression was significantly higher in the experimental group compared with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The method of injecting mutant p53 gene CRISPR/Cas9 plasmid and H22 cells through the tail vein can successfully and rapidly construct a mouse model of metastatic liver cancer.

**【Keywords】** tail vein injection; gene editing; mutant p53 gene; H22 cell; metastatic hepatocellular carcinoma model

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

肝癌是我国常见的恶性肿瘤,近年来发病率逐渐升高<sup>[1]</sup>。建立一种良好的循环肝癌细胞肝转移动物模型是研究和治疗肝癌的前提<sup>[2]</sup>。目前常见的肝癌建模方法有:化学诱导法、原位移植法、基因修饰法,化学诱导法会消耗大量的人力物力和时间;移植性肝癌模型不适用于所要研究的方向;所以,目前缺乏模拟人类循环肝癌细胞导致的肝内复发转移的动物模型<sup>[3]</sup>。研究发现,采用尾静脉注射的方法形成肝转移,从而成功构建出循环肝癌细胞肝转移动物模型<sup>[4]</sup>。肿瘤抑制基因 p53 作为基因组的守护者,在细胞应激反应中对细胞发挥多种作用,目前研究 p53 基因治疗肝癌是一个突破点<sup>[5]</sup>。另有研究证明,p53 基因的突变与肝癌的病理密切相关,突变率与肝癌分化呈负相关。所以人工注射靶向突变人 p53 基因,借此来调节小鼠的正常 p53 基因的表达<sup>[6]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以进行基因敲除,可编程性以及可同时编辑多个基因<sup>[7]</sup>。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,敲除正常的 p53 基因下调小鼠 p53 基因的表达,构建出符合人类肝癌患病机制的动物模型<sup>[8]</sup>。本研究拟采用尾静脉注射突变 p53 基因 CRISPR/Cas9 质粒和 H22 细胞的方法建立一种转移性肝癌小鼠模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

100 只 8 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,体重

( $20 \pm 2$ )g,购自于华中科技大学同济医院实验动物中心【SCXK(苏)2017-0001】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由河南省正骨研究院动物实验室【SYXK(豫)2015-0001】提供。饲养环境:维持 12 h;12 h 昼夜循环(7:00 ~ 19:00),湿度恒定 50%,温度控制在 22 ~ 25℃。按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。H22 肝细胞株,购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,由本研究室保存传代。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

质粒 DNA 大量抽提试剂盒、免疫组化试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自于北京索莱宝;AST、ALT 检测试剂盒(南京建成);Western Blot 实验系统(北京六一),抗体(武汉三鹰);荧光及化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物模型制备

100 只 BALB/c 小鼠,随机分为四组,空白组和质粒组,实验组和对照组。每组 25 只,实验组注射每毫升  $1 \times 10^6$  个的 H22 肝癌细胞+ 60  $\mu$ g 的质粒,对照组小鼠只进行注射每毫升  $1 \times 10^6$  个的 H22 肝癌细胞,空白组尾静脉注射同等体积的生理盐水,质粒组注射质粒。注射后的小鼠,正常进行喂食喂水,记录第 1 ~ 5 周生活状态、生理情况及体重。观察是否形成腹水。

### 1.2.2 血清学检测

注射 2、3、4、5 周随机抽取小鼠数只,眼眶取血,3000 rpm 4℃ 离心,取上清液,按照试剂盒说明书检

测血清转氨酶(ALT、AST)水平,评估各组小鼠的肝损伤程度,进行比较。

### 1.2.3 脏器大体观察

解剖处死的小鼠,取其肝,进行称重。观察脏器颜色、外观,记录脏器是否有转移结节或病变。计算各组小鼠的脏器指数、成模率、死亡率。

### 1.2.4 组织学检测

(1)HE 染色:取肝组织在 4%甲醛中固定 12 h,流水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋切片,进行 HE 常规染色,在显微镜下观察、拍照记录。

(2)免疫组织化学:切片进行常规脱蜡水化,抗原修复,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,血清封闭。用 p53、PCNA 抗体将切片在 4℃ 条件下孵育过夜。按照说明书 Masson 染色,进行中性树胶封片,显微镜下观察,拍照记录。

### 1.2.5 Western Blot 检测肝组织中 p53 和 PCNA 蛋白的表达情况

提取肝组织总蛋白,定量,取蛋白样品 100  $\mu$ g,经 SDS-PAGE 电泳后,转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, PBST 洗 2 次,一抗 p53 (1:2000)和 PCNA (1:2000)于杂交膜内,37℃ 孵育 1 h。PBST 洗 3 次,加入二抗(1:6000)37℃ 孵育 1 h, ECL 发光法显色,得出结果。

### 1.3 统计学分析

本次实验的数据采用 SPSS 17.0 软件进行数据的统计学分析,实验所用数据均以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间的数据比较将采用单因素方差分析法进行。组间的两两比较将采用 Tukey's test 方法进行。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

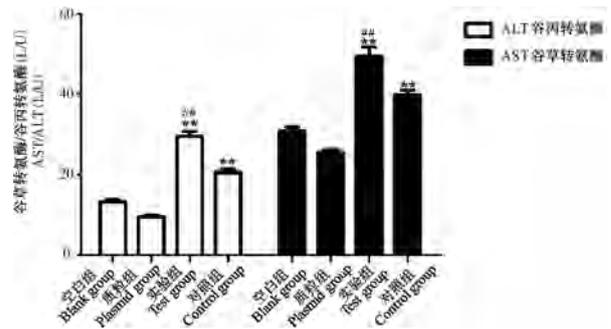
## 2 结果

### 2.1 小鼠成模率及死亡率

在建模过程中,由于注射原因导致 3 只小鼠死亡。实验组仅在第 2 周有 1 只小鼠死亡,经计算成模率为 60.87%,死亡率为 4.35%。而对照组小鼠则在第 2 周时有 5 只死亡,第 3 周时有 2 只死亡,通过计算成模率为 45.83%,死亡率为 29.17%。

### 2.2 小鼠血清转氨酶水平变化

经检测,实验组小鼠血清 ALT、AST 水平分别增加至(28.2  $\pm$  2.4)和(47.1  $\pm$  4.7);对照组小鼠血清 ALT、AST 水平分别增加至(19.6  $\pm$  1.6)和(38.6  $\pm$  2.3)( $P < 0.01$ )(见图 1)。



注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与对照组比较,## $P < 0.01$ 。(下同)

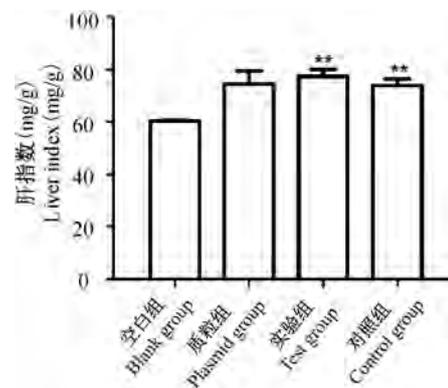
图 1 血清检测各组小鼠 ALT、AST 水平

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

Figure 1 Serum levels of ALT and AST in mice of each group

### 2.3 脏器大体观察

实验组与对照组小鼠的肝部发生不同程度的病变,在肝部表面均出现明显的灰白色结节,质地较硬,并随着周数的增加肝部结节数明显增多,体积增大( $P < 0.05$ )(见图 2,3)。



注:与空白组对比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图 2 肝移植模型对小鼠肝指数的影响

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

Figure 2 Effect of liver transplantation model on liver indexes of mice

### 2.4 HE 染色观察组织病理学变化

空白组与质粒组小鼠的肝组织结构较为正常,无病灶和癌巢结构。第 2 周实验组小鼠的肝小叶结构遭到破坏,肝索较为紊乱。第 3 周时,实验组与对照组肝小叶结构均有不同程度的破坏,实验组的肝组织中出現点灶样坏死和癌巢结构。第 4 周时,对照组与实验组中病灶部位与正常结构有着明显的分界线,实验组的病灶部位相对较大且数目较多。在第 5 周时,实验组与对照组小鼠肝的肝小叶可见

大面积癌变部位。病灶部位胞核密集且深染,胞质较少且色浅,可见分裂相细胞核,部分病变细胞排列成条索状,呈明显肿瘤病理学改变(见图 4,5)。

### 2.5 免疫组织化学法检测小鼠肝内 p53 和 PCNA 的表达

免疫组化结果表明,空白组小鼠的肝组织内

有 p53 阳性表达较高,对照组的癌巢内 p53 表达下降,质粒组与实验组 p53 阳性表达率明显降低,低于对照组。(P < 0.05)。实验组与对照组的小鼠肝组织癌巢中,均出现了不同程度的 PCNA 阳性表达,并且实验组表达明显高于对照组(P < 0.05)(见图 6,7)。

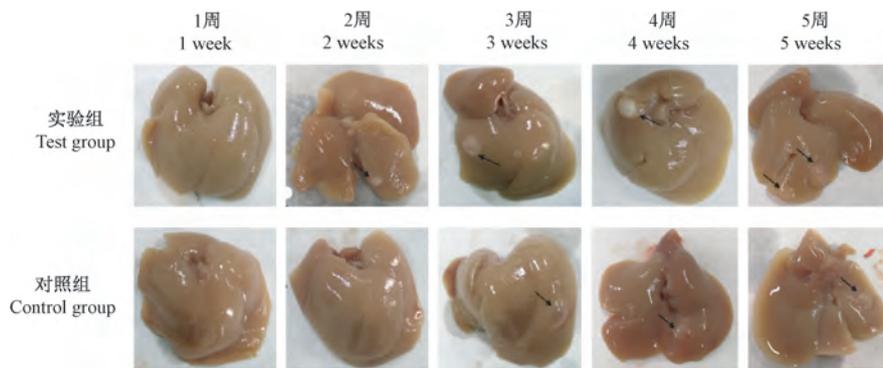


图 3 实验组与对照组 1 ~ 5 周肝比较

Figure 3 Comparison of liver in test group and control group at 1 ~ 5 weeks

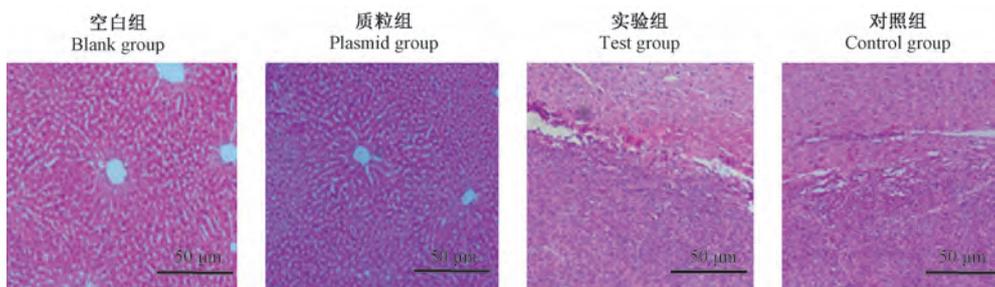


图 4 第 5 周时各小组肝组织病理学比较

Figure 4 Histopathological comparison of liver in each group at the 5 week

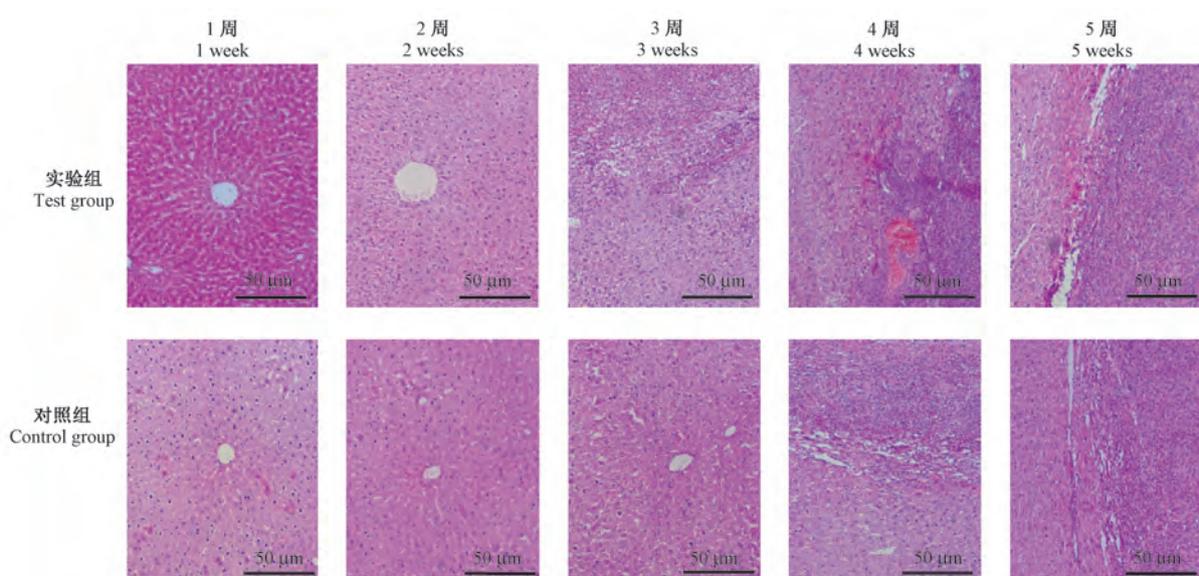


图 5 实验组与对照组 1 ~ 5 周肝组织病理学比较

Figure 5 Histopathological comparison of liver between test group and control group at 1 ~ 5 weeks

## 2.6 Western Blot 检测小鼠肝组织内 p53 和 PCNA 蛋白表达

质粒组与实验组小鼠肝组织中的 p53 蛋白的表达量明显的低于空白组, 而对照组小鼠肝组织中 p53 蛋白表达与正常组相比稍降, 差异无统计学意

义 ( $P < 0.01$ )。对于小鼠肝组织中 PCNA 蛋白表达与空白组或质粒组相比, 对照组和实验组小鼠肝组织内 PCNA 的表达量有着明显的增高; 并且实验组 PCNA 的表达量要显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (见图 8)。

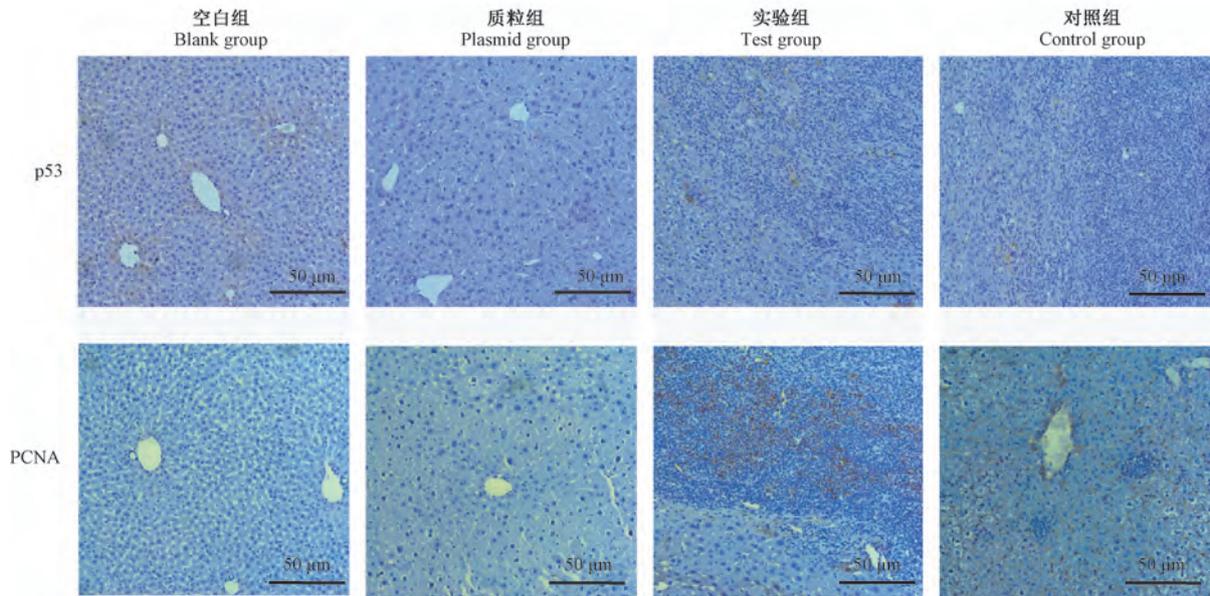


图 6 免疫组织化学法检测小鼠肝组织内 p53 和 PCNA 表达

Figure 6 Detection of p53 and PCNA expression in mouse liver tissue by immunohistochemistry

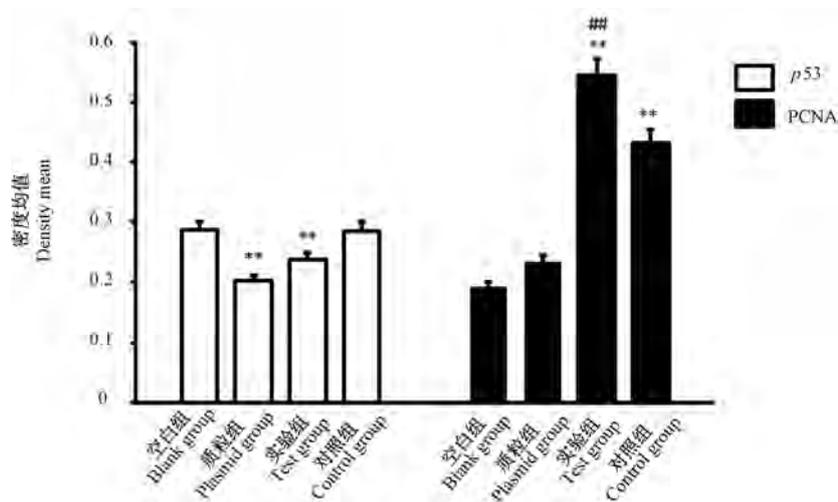


图 7 免疫组织化学法检测小鼠肝组织内 p53 和 PCNA 表达

Figure 7 Detection of p53 and PCNA expression in mouse liver tissue by immunohistochemistry

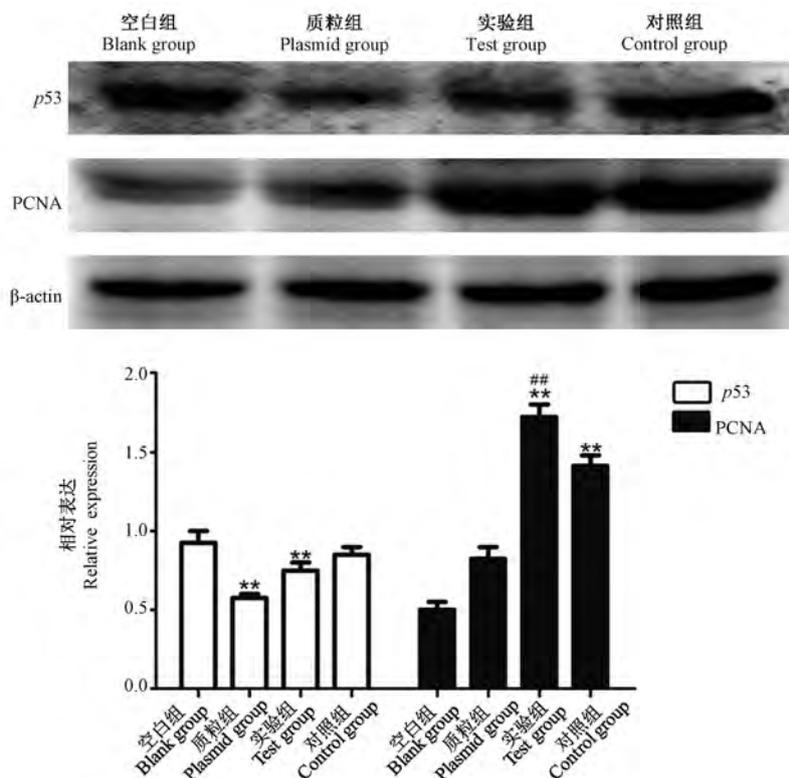


图 8 Western Blot 检测小鼠肝组织内 *p53* 和 PCNA 蛋白表达

Figure 8 Western Blot detection of *p53* and PCNA protein expression in mouse liver tissue

### 3 讨论

在 2 周后,发现空白组质粒组小鼠精神状态较好,无明显病态,对照组和实验组的小鼠精神状态较差,进食量减少。对照组与实验组小鼠可能因体内肺或肝出现病变,导致精神状态的下降。

根据结果得出,实验组小鼠的成模率为 60.87%,死亡率为 4.35%;对照组小鼠的成模率为 45.83%,死亡率为 29.17%。与仅注射 H22 细胞的小鼠的对照组比较,实验组小鼠的建模成功的概率更高,存活率有了一定的提高。本研究在 5 周较短的时间成功构建出肝癌肿瘤的转移模型。与对照组比较,实验组结节与囊肿出现的时间早,病变程度高,肝癌形成更加快速和严重。

HE 染色结果显示,实验组与对照组肝能够观察到细胞肿瘤样改变和癌巢存在,这表明构建的模型产生癌变,建模成功。与空白和质粒组相比,实验组小鼠血清转氨酶 ALT、AST 水平显著增加,表明实验组与对照组的肝功能明显受损。与对照组比较,实验组的转氨酶 ALT、AST 水平要明显高于对照组。结合成模率和死亡率、肝大体和病理形态学结

果,可以得出以下结论:本文利用基因编辑技术构建肝癌模型的方法要显著高于常规尾静脉注射 H22 细胞的建模方法。

第 5 周质粒组与实验组的 *p53* 蛋白低于正常值是因为,通过尾静脉将突变人 *p53* 基因之 CRISPR/Cas9 三合一工具质粒注射入小鼠体内,此质粒可定点突变 *p53* 抑癌基因,导致小鼠肝组织正常 *p53* 基因的表达下调<sup>[9]</sup>。PCNA 是评价细胞增殖状态的指标之一<sup>[10]</sup>。第 5 周时实验组和对照组小鼠肝组织内 PCNA 的表达高于空白组和质粒组,大多位于癌巢及与正常肝组织交界处,说明肝癌细胞处于高增殖状态并将进一步恶化。并且实验组的 PCNA 表达程度明显高于对照组。说明实验组细胞增殖程度要高于对照组。对于 PCNA 来说,因为对照组与实验组发生了肝转移,所以这两组的 PCNA 表达量要高于空白组与质粒组。

通过尾静脉注射靶向突变人 *p53* 基因之 CRISPR/Cas9 三合一工具质粒和肝癌细胞的方法快速建立肝癌小鼠模型的增加两个关键点,突变人 *p53* 基因和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术。该方法模型构建周期短,成功率高,节约成本,可用于肝癌转移和复发的防治研究。

## 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Yang Y, Yuan P, Wei X, et al. Cultivated and wild pleurotus ferulae ethanol extracts inhibit hepatocellular carcinoma cell growth via inducing endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent apoptosis [ J ]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 13984.
- [ 2 ] Fang T, Lin J, Wang Y, et al. Tetraspanin-8 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by increasing ADAM12m expression [ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40630-40643.
- [ 3 ] 张宇, 张大伟, 薛平. 肝细胞癌和胆管细胞癌动物模型构建的新进展 [ J ]. *岭南现代临床外科*, 2015, 32(3): 32.  
Zhang Y, Zhang DW, Xue P. Advance in the animal models of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma [ J ]. *Lingnan Modern Clin Surg*, 2015, 32(3): 32.
- [ 4 ] Li JF, Yao Q, Liu DX. Hydrodynamic cell delivery for simultaneous establishment of tumor growth in mouse lung, liver and kidney [ J ]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(8): 737-741.
- [ 5 ] Ladds MJGW, Lán S. Small molecule activators of the p53 response [ J ]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(3): 245-254.
- [ 6 ] 陈华, 吴小红, 谢忠忱. C-myc、p53 基因和 AFP 在家兔诱发性肝癌及癌旁组织中的表达 [ J ]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(4): 231-234.
- Chen H, Wu XH, Xie ZC. The Expression of C-myc, p53 and AFP in Liver Tumors and Pericarcinomatous Tissues of Rabbits Induced by Diethylnitrosamine [ J ]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2004, 12(4): 231-234.
- [ 7 ] 陈丽香, 彭秀华, 谭丹. 基于 CRISPR/Cas9 系统定点编辑小鼠 MAD2L1 基因及其脱靶效应分析 [ J ]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 587-593.  
Chen LX, Peng XH, Tan D. Mouse MAD2L1 gene editing by CRISPR/Cas9 and analysis of its off-target effect [ J ]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(6): 587-593.
- [ 8 ] Zhan T, Rindtorff N, Betteg J, et al. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 55: 106-119.
- [ 9 ] Haapaniemi E, Botla S, Persson J, et al. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response [ J ]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 927-930.
- [ 10 ] Hu L, Li HL, Li WF, et al. Clinical significance of expression of proliferating cell nuclear antigen and E-cadherin in gastric carcinoma [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(20): 3721-3729.

[ 收稿日期 ] 2020-10-22

沙依拜·沙比提, 丛媛媛, 古丽尼歌尔·阿布都米吉提, 等. 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 197-203.

Shayibai·SBT, Cong YY, Gulinigeer·ABDMJT, et al. *In vivo* anti-tumor activities of *Fomes Officinalis* polysaccharide and the underlying mechanisms [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 197-203.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.009

## 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究

沙依拜·沙比提, 丛媛媛, 古丽尼歌尔·阿布都米吉提, 帕丽达·阿不力孜\*

(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

**【摘要】** 目的 研究阿里红多糖(*Fomes Officinalis* polysaccharide, FOPS)抗肿瘤作用及其抑瘤机制。方法 通过腋部皮下接种 S180 小鼠腹水制备荷瘤小鼠模型。造模后随机分为空白组、模型组、阳性对照组、FOPS 低中高剂量组, 每组 10 只。空白组与模型组灌胃生理盐水, 阳性对照组腹腔注射 50 mg/kg 环磷酰胺, 低、中、高剂量小鼠分别灌胃不同浓度(50、100、200 mg/kg) FOPS 混悬液。给药 15 d 后, 检测各组小鼠抑瘤率及脏器指数; 检测外周血白细胞、淋巴细胞数目; ELISA 法检测荷瘤小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等细胞因子含量; qRT-PCR 法检测肿瘤组织 p38MAPK、*p-c-jun* mRNA 表达; Western Blot 法检测 p38MAPK、*p-c-jun*、NF- $\kappa$ B、*p-NF- $\kappa$ B* 蛋白表达量。结果 (1) 阳性对照组及 FOPS 低、中、高剂量组小鼠平均瘤重均显著低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 四组小鼠抑瘤率分别为 84.87%、54.29%、40.57%、30.84%。(2) 与模型组比较, FOPS 低剂量组小鼠脾指数、胸腺指数显著提高, 白细胞数目、淋巴细胞数目显著升高 ( $P < 0.05$ )。(3) 与模型组比较, FOPS 低剂量组小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量显著升高 ( $P < 0.05$ ), FOPS 低、中、高剂量组小鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。(4) FOPS 低剂量组 p38MAPK、*p-c-jun* mRNA 表达水平高于模型组 ( $P < 0.05$ ), p38MAPK、*p-c-jun* 和 *p-NF- $\kappa$ B* 蛋白表达水平高于模型组 ( $P < 0.05$ )。结论 FOPS 具有显著抗肿瘤活性, 其机制与上调 MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路中 p38MAPK、*p-c-jun* 和 *p-NF- $\kappa$ B* 等相关基因及蛋白的表达有关。

**【关键词】** 阿里红多糖; 抗肿瘤活性; 细胞因子; MAPK/NF- $\kappa$ B 信号通路

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0197-07

### *In vivo* anti-tumor activities of *Fomes Officinalis* polysaccharide and the underlying mechanisms

SHAYIBAI·Shabiti, CONG Yuanyuan, GULINIGEER·Abudumijiti, PALIDA Abulizi\*

(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: PALIDA Abulizi. E-mail: palida3345@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the antitumor activity of *Fomes Officinalis* polysaccharide (FOPS) and the underlying mechanisms. **Methods** The mice tumor-bearing model was established by subcutaneous injection of S180 ascites tumor cells into the axilla. Mice were randomly divided into control group, model group, CTX group, FOPS-L group, FOPS-M group and FOPS-H group, with 10 mice in each group. The mice were treated with NS, cyclophosphamide or FOPS for 15 d. Tumor inhibition rate and organ index were assessed, and white blood cell (WBC) and lymphocyte (LYM) were measured. Serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$  and IL-6 were detected by ELISA. The mRNA expression levels of p38MAPK and *p-c-jun* in tumor tissues were detected by qRT-PCR. The protein expression levels of p38MAPK, *p-*

**【基金项目】**新疆维吾尔自治区“十三五”重点学科(药学-高原学科)建设项目(新教研 2016-7 号)。

Funded by Key Medical Discipline (Pharmacy-Plateau Discipline) Construction Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region During the 13th Five-Year Plan Period (Xin Educational Research 2016-7).

**【作者简介】**沙依拜·沙比提(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:天然药物抗肿瘤的物质基础研究。Email:1329551027@qq.com

**【通信作者】**帕丽达·阿不力孜(1962—),女,教授,博士,研究方向:天然药物药效物质基础研究。Email:palida3345@163.com

*c-jun*, NF- $\kappa$ B and *p-NF- $\kappa$ B* were detected by Western Blot. **Results** (1) The mean tumor weights in the CTX and three FOPS groups were significantly decreased compared with the model group ( $P < 0.05$ ). The tumor inhibition rate in the CTX and three FOPS groups (-L, -M, -H) were 84.87%, 54.29%, 40.57% and 30.84%, respectively. (2) Compared with the model group, the spleen index, thymus index, WBC and LYM were increased significantly in the FOPS-L groups ( $P < 0.05$ ). (3) Compared with the model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 in the FOPS-L group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in the CTX and three FOPS groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). (4) The mRNA expression levels of p38MAPK and *p-c-jun*, and the protein expression levels of p38MAPK, *p-c-jun* and *p-NF- $\kappa$ B* in tumor tissue were significantly increased compared with the model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** FOPS has significant anti-tumor activities, and the mechanism of action is related to activation of the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Keywords】** *Fomes Officinalis* polysaccharide; anti-tumor activity; cytokine; MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway

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

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的一类常见疾病,寻找有效的抗癌药物和方法是世界医学面临的重要课题。研究发现中药治疗恶性肿瘤,无论是在减轻临床症状,提高生存质量,防止复发转移,延长生存期,还是在与放化疗配合,增效减毒等方面都有很好的效果。

阿里红(*Fomes Officinalis* (Vill.ex.Fr.) Ames)是一种药用菌,隶属多孔菌科、层孔菌属<sup>[1]</sup>。研究发现,阿里红中所含多糖(FOPS)为阿里红药材的活性成分之一,具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化等药理作用<sup>[2-4]</sup>。课题组前期研究表明阿里红多糖在体外具有抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>,但鲜有阿里红多糖体内抗肿瘤作用的报道。因此,本研究使用S180荷瘤小鼠,研究阿里红多糖体内抗肿瘤作用效果和机制,旨在为后续阿里红药效学研究提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60只6周龄SPF级雄性昆明小鼠,体重18~20g,购买于新疆医科大学动物实验中心【SCXK(新)2018-0002】。饲养于新疆医科大学动物实验中心【SYXK(新)2018-0003】。饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由新疆医科大学动物实验中心提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,恒温22~25℃、恒湿40%~70%。鼠源S180腹水瘤细胞,购自上海中乔新舟公司,由新疆医科大学动物实验中心传代保种。所有操作均符合新疆医科大学伦理委员会要求(批准文号: IACUC-20170222046)。

#### 1.1.2 试药

阿里红药材购于新疆维吾尔自治区,由新疆医科

大学天药/生药教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为阿里红 *Fomes Officinalis* Ames。按文献<sup>[6]</sup>制备FOPS,得率为3.06%,通过苯酚硫酸法测得含量为57.4%,用生理盐水制备5、10、20 mg/mL药液待用。注射用环磷酰胺(CTX,盛迪医药有限公司,18102525),生理盐水制备成5 mg/mL药液待用。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA试剂盒(安徽巧伊生物公司);引物 $\beta$ -actin、p38MAPK、*p-c-jun*(上海生工生物有限公司);抗体 $\beta$ -actin(CST公司);p38MAPK、*p-NF- $\kappa$ B*(Abcam公司);*p-c-jun*、NF- $\kappa$ B(Bioswamp公司);BCA蛋白定量试剂盒、蛋白分子量标准Marker、特超敏ECL化学发光试剂盒(索莱宝公司);实时荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司)。

Multiskan Go全波长酶标仪(美国Thermo公司);AB304-S电子分析天平(德国梅特勒公司);UV2700紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);3-30 K台式低温离心机(德国Sartorius公司);BC-5000VET血细胞分析仪(中国Mindray公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 荷瘤模型制备

常规方法复苏S180小鼠腹水瘤细胞,取0.2 mL细胞悬液注射于健康小鼠腹腔,连续传代两次得到S180腹水瘤小鼠。无菌条件下抽取腹水,调整浓度至每毫升 $1 \times 10^7$ 个,注射细胞悬液于适应饲养7d后的小鼠腋部皮下制备S180荷瘤模型。

### 1.2.2 动物分组及给药

将50只建模成功小鼠随机分为模型组、阳性对照组、FOPS低、中、高剂量组,健康小鼠作为空白组,每组10只。空白组与模型组给予生理盐水灌胃,阳性对照组腹腔注射50 mg/kg环磷酰胺,低、

中、高剂量组给予不同浓度 (50、100、200 mg/kg) FOPS 灌胃,连续给药 15 d。每日记录小鼠体重,观察小鼠饮食饮水、活动状态等一般表现。

1.2.3 抑瘤率及脏器指数检测

末次给药 24 h 后,颈椎脱臼处死小鼠,剥离瘤块、脏器称重,计算抑瘤率、脏器指数。抑制率 (%) = (模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%, 脏器指数 = 脏器质量 / 体重。

1.2.4 外周血常规常规检测

小鼠取血,BC-5000Vet 血细胞分析仪检测白细胞、淋巴细胞数目。

1.2.5 血清细胞因子含量检测

小鼠取血,静置 2 h,4℃ 条件下 3000 r/min 离心 10 min 分离血清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 TNF-α、IFN-γ、IL-2、IL-1β、IL-6 含量。

1.2.6 小鼠脏器病理学观察

剥离心、肝、脾、肺、肾等组织用 4% 甲醛固定,经石蜡包埋、切片、HE 染色观察病理学变化。

1.2.7 肿瘤组织 p38MAPK 和 p-c-jun mRNA 表达量检测

液氮研磨适量肿瘤组织,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定 RNA 总浓度,使用 PCR 循环仪进行逆转录。用 qRT-PCR 定量检测 p38MAPK 和 p-c-jun mRNA 表达量,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析法计算结果,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物 Primers	引物序列 Primer sequence	长度(bp) Length (bp)
p38MAPK	F:5'-CCGAGAGTTGCGTCTGCTGAAG-3'	22
	P:5'-TTGAATTCCTCCAGTGACCTTGCG-3'	24
p-c-jun	F:5'-TACGCCAACCTCAGCAACTTCAAC-3'	24
	P:5'-ACGGTCTGCGGCTCTTCCTTC-3'	21
β-actin	F:5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3'	23
	P:5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'	20

1.2.8 肿瘤组织 p38MAPK、p-c-jun、NF-κB 和 p-NF-κB 蛋白表达量检测

液氮研磨适量肿瘤组织,加入 RIPA 裂解液提取蛋白。在 4℃ 条件下,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。适宜条件下,进行电泳、转膜、封闭、一抗孵育,二抗孵育等步骤。ECL 化学发光试剂曝光显影,Image J 图像分析法进行灰度值分析。

1.3 统计学分析

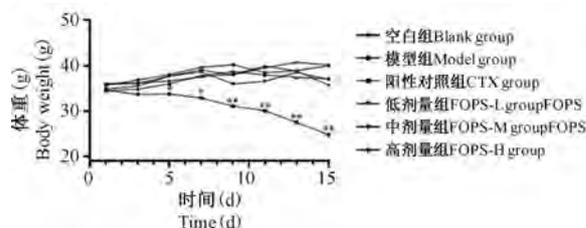
通过 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,采用单

因素方差分析,数据结果以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOPS 对荷瘤小鼠体重的影响

第 1 ~ 3 天各组小鼠一般表现正常。第 4 ~ 7 天小鼠腋部皮下出现明显瘤组织;模型组与阳性对照组小鼠皮毛粗糙、精神萎靡,与模型组比较,FOPS 低、中、高剂量组小鼠精神状态、饮食状态良好。第 8 ~ 15 天模型组小鼠瘤组织较大、右肢失去功能、皮毛稀松,阳性对照组食欲差、呼吸急促,由图 1 可见,体重下降,差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,FOPS 低、中、高剂量组皮毛光滑、体重变化小,差异无显著性。



注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 1 FOPS 对荷瘤小鼠体重的影响 ( $n = 10$ )

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

Figure 1 Effect of FOPS on body weight of tumor-bearing mice ( $n = 10$ )

2.2 FOPS 对荷瘤小鼠瘤重、抑瘤率的影响

由表 2 可见,与模型组比较,阳性对照组、FOPS 低、中、高剂量组小鼠平均瘤重均明显减小,差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),FOPS 低剂量组小鼠平均瘤重小于 FOPS 中、高剂量组。阳性对照组、FOPS 低、中、高剂量组抑瘤率分别为 84.87%、54.29%、40.57%、30.84%。结果提示,FOPS 对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长有抑制作用。

表 2 FOPS 对荷瘤小鼠瘤重、抑瘤率的影响 ( $n = 10$ )

Table 2 Effect of FOPS on tumor weight and tumor inhibition rate of tumor-bearing mice ( $n = 10$ )

组别 Groups	瘤重(g) Tumor weight (g)	抑瘤率 (%) Tumor inhibition rate (%)
模型组 Model group	6.21 ± 0.75	/
阳性对照组 CTX group	0.94 ± 0.32**	84.87%
FOPS 低剂量组 FOPS-L group	2.83 ± 0.48**	54.29%
FOPS 中剂量组 FOPS-M group	3.69 ± 0.51*	40.57%
FOPS 高剂量组 FOPS-H group	4.29 ± 0.51*	30.84%

### 2.3 FOPS 对荷瘤小鼠脏器指数、白细胞、淋巴细胞数目的影响

由表 3 可见,与模型组比较,FOPS 低、中剂量组小鼠脾指数、胸腺指数、白细胞数目均显著升高( $P < 0.05$ ),FOPS 低剂量组淋巴细胞数目显著升高( $P < 0.05$ )。结果提示,FOPS 可提高荷瘤小鼠脾指数、胸腺指数,升高白细胞、淋巴细胞数目。

### 2.4 FOPS 对荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

由表 4 可见,与模型组比较,FOPS 低、中剂量组 TNF- $\alpha$  含量均显著升高( $P < 0.05$ ),FOPS 低剂量组 IFN- $\gamma$  含量显著升高( $P < 0.05$ ),FOPS 低、中、高剂量组 IL-2 含量显著升高( $P < 0.05$ ),FOPS 低、中、高剂量组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量显著降低( $P < 0.01$ )。该结果提示 FOPS 可升高荷瘤小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 含量,降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 含量。

### 2.5 FOPS 对荷瘤小鼠脏器病理学的影响

由图 2 知,各组小鼠心脏组织切片心肌纤维排列整齐,形态正常。空白组肝细胞结构完整,排列

整齐,胞质丰富,核仁清晰;模型组与阳性对照组肝细胞排列分散无序,与模型组比,FOPS 低、中、高剂量组小鼠肝细胞排列规则,形态基本正常。空白组小鼠脾组织细胞排列整齐紧密,红髓与白髓分界清晰;模型组与阳性对照组小鼠脾组织红髓与白髓分界不清,不易观察;与模型组比,FOPS 低、中、高剂量组小鼠脾组织细胞排列相对整齐,红髓和白髓分界可见。各组小鼠肺组织切片组织结构疏松呈蜂窝状,未见炎细胞浸润现象。空白组肾组织细胞形态正常,结构完整;模型组肾组织细胞排列紊乱,肾小球体积减小;与模型组比较,FOPS 低、中、高剂量组肾小球结构相对完整,细胞排列相对整齐。

### 2.6 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤组织 p38MAPK 和 p-c-jun mRNA 表达的影响

由表 5 可见,与模型组比较,FOPS 低、中剂量组小鼠 p38MAPK mRNA 表达量升高,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),FOPS 低剂量组小鼠 p-c-jun mRNA 表达量升高,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

表 3 FOPS 对荷瘤小鼠脏器指数、白细胞、淋巴细胞数目的影响( $n = 10$ )

Table 3 Effect of FOPS on organ index, WBC and LYM of tumor-bearing mice( $n = 10$ )

组别 Groups	脾指数 Spleen index	胸腺指数 Thymus index	白细胞数目( $10^{-9}$ L) WBC( $10^{-9}$ L)	淋巴细胞数( $10^{-9}$ L) LYM( $10^{-9}$ L)
空白组 Control group	5.17 $\pm$ 0.71 **	1.79 $\pm$ 0.24 **	7.99 $\pm$ 1.61	3.73 $\pm$ 1.75 *
模型组 Model group	3.35 $\pm$ 0.23	0.62 $\pm$ 0.18	5.06 $\pm$ 1.06	1.00 $\pm$ 0.28
FOPS 低剂量组 FOPS-L group	5.16 $\pm$ 0.33 **	1.32 $\pm$ 0.22 **	9.82 $\pm$ 1.23 **	3.94 $\pm$ 0.48 *
FOPS 中剂量组 FOPS-M group	4.83 $\pm$ 0.40 *	1.17 $\pm$ 0.08 *	8.83 $\pm$ 1.87 *	2.64 $\pm$ 0.11
FOPS 高剂量组 FOPS-H group	3.28 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.06	7.53 $\pm$ 0.76	2.52 $\pm$ 0.15

表 4 FOPS 对荷瘤小鼠血清细胞因子的影响( $n = 10$ )

Table 4 Effect of FOPS on serum cytokines of tumor-bearing mice( $n = 10$ )

组别 Groups	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
空白组 Control group	85.20 $\pm$ 16.53 *	52.57 $\pm$ 4.34 *	19.20 $\pm$ 2.53 *	44.67 $\pm$ 2.42 **	23.31 $\pm$ 6.93 **
模型组 Model group	45.69 $\pm$ 4.65	28.20 $\pm$ 6.84	7.40 $\pm$ 0.75	87.14 $\pm$ 7.90	92.52 $\pm$ 16.47
FOPS 低剂量组 FOPS-L group	91.22 $\pm$ 9.50 **	53.29 $\pm$ 10.97 *	15.67 $\pm$ 2.63 *	51.70 $\pm$ 1.11 **	30.55 $\pm$ 4.72 **
FOPS 中剂量组 FOPS-M group	78.33 $\pm$ 6.83 *	30.49 $\pm$ 10.73	14.40 $\pm$ 2.67 *	59.46 $\pm$ 1.53 **	35.63 $\pm$ 7.69 **
FOPS 高剂量组 FOPS-H group	71.14 $\pm$ 16.16	22.40 $\pm$ 2.62	13.33 $\pm$ 0.34 *	66.12 $\pm$ 1.95 **	38.19 $\pm$ 6.74 **

### 2.7 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤组织 p38MAPK、p-c-jun、NF- $\kappa$ B 和 p-NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

由表 6、图 3 可见,与模型组比较,FOPS 低剂量组 p38MAPK 表达量升高,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),FOPS 低、中剂量组 p-c-jun 表达量均升高,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),FOPS 低、中、高剂量组 p-NF- $\kappa$ B 表达量均升高,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

表 5 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤组织 p38MAPK 和 p-c-jun mRNA 表达的影响( $n = 6$ )

Table 5 Effect of FOPS on p38MAPK and p-c-jun mRNA expression in tumor tissues of tumor-bearing mice( $n = 6$ )

组别 Groups	p38MAPK	p-c-jun
模型组 Model group	0.51 $\pm$ 0.23	0.12 $\pm$ 0.01
FOPS 低剂量组 FOPS-L group	1.51 $\pm$ 0.04 *	0.71 $\pm$ 0.16 **
FOPS 中剂量组 FOPS-M group	1.30 $\pm$ 0.15 *	0.38 $\pm$ 0.11
FOPS 高剂量组 FOPS-H group	0.20 $\pm$ 0.18	0.09 $\pm$ 0.01

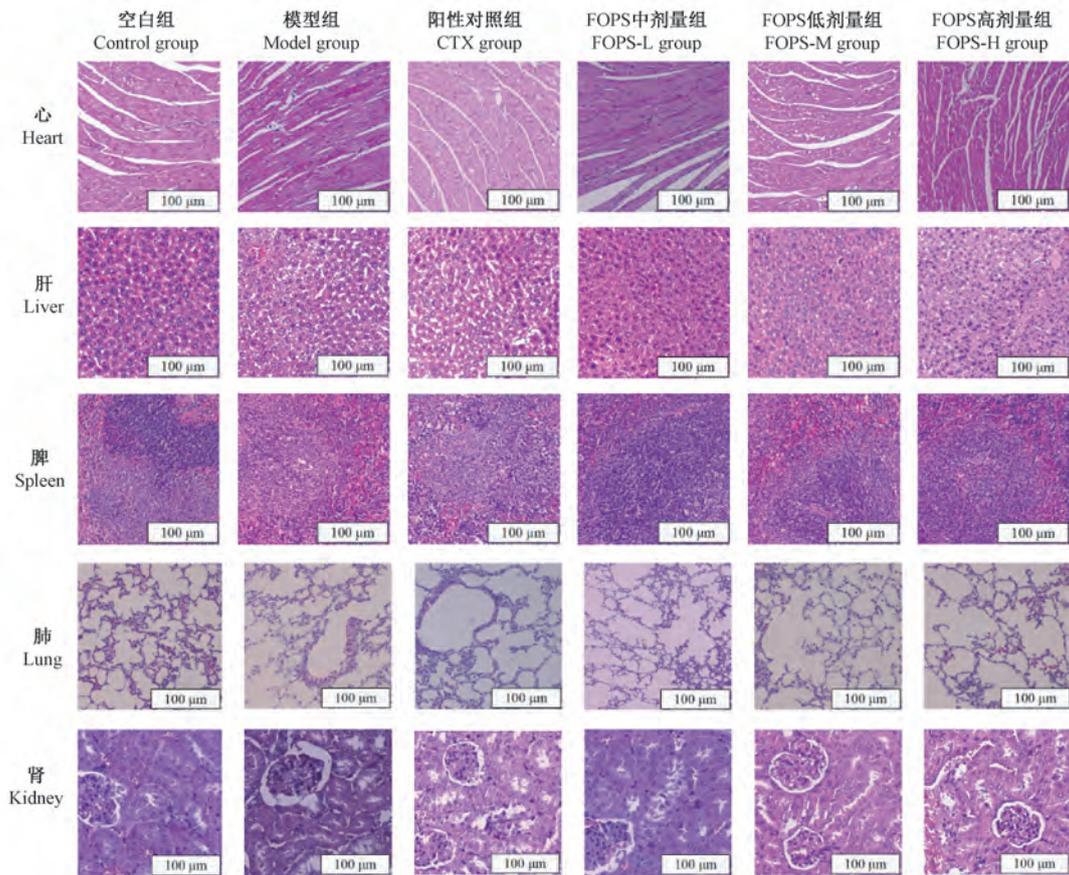


图 2 FOPS 对荷瘤小鼠脏器病理学变化的影响

Figure 2 Effect of FOPS on histopathological changes in tissues of tumor-bearing mice

表 6 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤组织 p38MAPK、*p-c-jun*、NF-κB 和 *p-NF-κB* 蛋白表达的影响 (n=6)

Table 6 Effect of FOPS on p38MAPK, *p-c-jun*, NF-κB and *p-NF-κB* protein expression in tumor tissues of tumor-bearing mice (n=6)

组别 Groups	p38MAPK/β-actin	<i>p-c-jun</i> /β-actin	NF-κB/β-actin	<i>p-NF-κB</i> /β-actin
模型组 Model group	0.56 ± 0.07	0.70 ± 0.81	1.13 ± 0.19	0.53 ± 0.05
FOPS 低剂量组 FOPS-L group	0.95 ± 0.16*	1.15 ± 0.19*	0.94 ± 0.14	0.99 ± 0.14**
FOPS 中剂量组 FOPS-M group	0.82 ± 0.11	1.16 ± 0.13*	0.96 ± 0.15	1.20 ± 0.14**
FOPS 高剂量组 FOPS-H group	0.91 ± 0.08	0.97 ± 0.08	1.05 ± 0.15	0.99 ± 0.09**

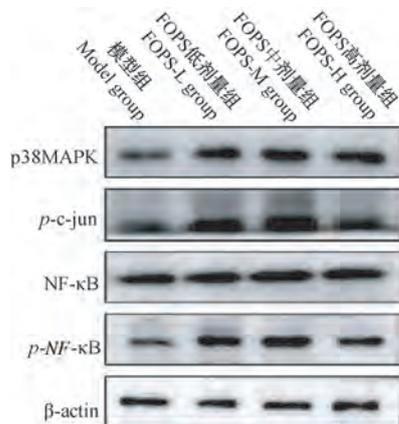


图 3 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤组织 p38MAPK、*p-c-jun*、NF-κB 和 *p-NF-κB* 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of FOPS on p38MAPK, *p-c-jun*, NF-κB and *p-NF-κB* protein expression in tumor tissues of tumor-bearing mice

### 3 讨论

#### 3.1 FOPS 对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用

恶性肿瘤治愈率低、致死率高,是严重危害人类健康的疾病之一<sup>[7]</sup>。环磷酰胺等抗肿瘤药物对多种实体瘤有良好的抑制作用,在小鼠 S180 移植瘤模型中常被用作阳性对照药。但其消化道反应、生殖毒性、骨髓抑制及免疫抑制等严重毒副作用及不良反应<sup>[8]</sup>,对人体产生较大损害。天然来源的植物多糖具有调节机体免疫、增强抗肿瘤活性、抗病毒、抗氧化等众多功效,且毒性反应及副作用小<sup>[9-11]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,FOPS 低、中、高剂量组小鼠瘤重均减小,差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ),FOPS 低剂量组抑瘤效果优于 FOPS 中、高剂量组。

通常,药物在一定范围内具有优良效果,超过范围药效降低、消失甚至产生毒副作用。该结果表明,FOPS对荷瘤小鼠肿瘤生长具有抑制作用,从量效关系来看不同浓度的FOPS对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用不同,并不是剂量越大药效越好。造成这种剂量与药效关系不成正比的原因可能是,FOPS是粗多糖,其中不同的多糖组分可能具有各自的作用途径或有效浓度范围,对不同的组织、细胞和细胞因子表达产生的影响可能不同。并且,中药存在多成分、多靶点的特性,FOPS剂量升高可能抑制或激活了其他作用靶点或受体,使其抗肿瘤活性降低。

### 3.2 FOPS对荷瘤小鼠免疫功能的影响

脾和胸腺是哺乳动物最主要的免疫器官。脾和胸腺发生功能或器质性改变,表现为淋巴细胞、白细胞减少和细胞因子的改变,极大增加细菌和病毒感染的机会<sup>[12-14]</sup>。本研究结果显示,FOPS可提高荷瘤小鼠脾指数、胸腺指数,升高小鼠外周血白细胞、淋巴细胞数目,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),该结果提示FOPS改善机体免疫功能。

### 3.3 FOPS对荷瘤小鼠细胞因子的影响

TNF- $\alpha$ 是由单核细胞与巨噬细胞产生的多肽类细胞因子,对肿瘤具有直接溶解和抑制增殖的作用。IFN- $\gamma$ 由淋巴细胞与NK细胞产生,可通过增加TNF- $\alpha$ 的释放来达到杀伤肿瘤细胞的作用。IL-2可促进IFN- $\gamma$ 分泌,也可促进T、B细胞活化和增殖,并最终提高细胞和体液反应<sup>[15-16]</sup>。IL-6、IL-1 $\beta$ 的大量产生则会引起广泛的炎症反应,促进肿瘤侵袭转移<sup>[17-18]</sup>。研究表明,FOPS升高TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$ 等细胞因子含量( $P < 0.05$ ),降低IL-6、IL-1 $\beta$ 含量( $P < 0.01$ ),从而发挥抗肿瘤作用。

### 3.4 FOPS对荷瘤小鼠脏器病理学的影响

本研究通过对心、肝、脾、肺、肾等脏器进行病理学观察考察FOPS的安全性,结果显示FOPS能减轻荷瘤小鼠脏器损伤,并且安全性较高。

### 3.5 FOPS对MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路的影响

MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路在多种肿瘤组织及细胞内活化表达,已成为研究抗肿瘤药物的热门靶点之一。MAPK是细胞内广泛存在的丝/苏氨酸蛋白激酶,与细胞周期调节、细胞存活、细胞因子分泌等过程有关<sup>[19-20]</sup>。NF- $\kappa$ B在细胞受到刺激时发生磷酸化,从细胞质进入细胞核内,与核内DNA特异序列结合,启动或增强相关基因转录。在癌症早期,NF- $\kappa$ B可以抑制肿瘤生长,但突变的积累可能导致

肿瘤抑制功能丧失。NF- $\kappa$ B被视为应激反应因素,在炎症过程中同时产生促炎和抗炎介质,发挥何种作用抑制肿瘤取决于时间和组织<sup>[21]</sup>。本研究结果表明,FOPS能够上调肿瘤组织p38MAPK和*p-c-jun*RNA表达及p38MAPK、*p-c-jun*和*p-NF- $\kappa$ B*蛋白表达,差异具有显著性( $P < 0.05$ ),激活MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路发挥抗肿瘤作用。

综上所述,体内给予FOPS可抑制S180荷瘤小鼠肿瘤生长,调节荷瘤小鼠血清细胞因子含量,其机制与激活MAPK/NF- $\kappa$ B信号通路有关。

### 参 考 文 献(References)

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草(第1卷)[M]. 上海: 上海科技出版社; 1999.  
Editorial Committee of Chinese Materia Medica. Chinese materia medica (Vol. 1) [M]. Shanghai: Shanghai Technology Press; 1999.
- [2] 从媛媛, 木尼萨·迪力夏提, 米仁沙·牙库甫, 等. 阿里红多糖及其组分对RAW264.7巨噬细胞中MAPK信号途径的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2019, 39(5): 333-339.  
Cong YY, Munisa D, Mirensha Y, et al. Effects of Fomes Officinalis polysaccharide and its purified constituent on mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling pathway in RAW264.7 macrophages [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2019, 39(5): 333-339.
- [3] 米仁沙·牙库甫, 祖丽胡玛尔·阿卜杜合力力, 木尼萨·迪力夏提, 等. 阿里红多糖组分对小鼠脾淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4369-4374.  
Mirensha Y, Zuhlumaer A, Munisa D, et al. Effects of polysaccharide from Fomes Officinalis Ames on immune function of murine splenic lymphocytes [J]. Food Safe Qual Detec Technol, 2018, 9(16): 4369-4374.
- [4] Hu M, Zhang H, Feng B, et al. Extraction of polysaccharides from Ames and their antitumor activity [J]. Exp Ther Med, 2013, 6(2): 451-454.
- [5] 周昱. 阿里红多糖抗氧化和抗肿瘤及免疫调节活性的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学; 2016.  
Zhou Y. The effects of antioxidant and anti-tumor and immunoregulation activity of polysaccharides from Fomes Officinalis Ames *in vivo* and *in vitro* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University; 2016.
- [6] 王勇. 维药阿里红中多糖提取及生物活性的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学; 2010.  
Wang Y. Extraction and preliminary biological activities of polysaccharides from Fomes Officinalis Ames [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University; 2010.
- [7] Wang J, Qi F, Wang Z, et al. A review of traditional Chinese medicine for treatment of glioblastoma [J]. Biosci Trends, 2020, 13(6): 476-487.

- [ 8 ] Kharya G, Bakane A, Agarwal S, et al. Pre-transplant myeloid and immune suppression, upfront plerixafor mobilization and post-transplant cyclophosphamide; novel strategy for haploidentical transplant in sickle cell disease [J]. Bone Marrow Transplant, 2020, 9: 1-13.
- [ 9 ] Ren L, Zhang J, Zhang T. Immunomodulatory activities of polysaccharides from Ganoderma on immune effector cells [J]. Food Chem, 2021, 340(8): 1-12.
- [ 10 ] Shamsaei S, Getso M, Ahmadikia K, et al. Recent findings on the role of fungal products in the treatment of cancer [J]. Clin Transl Oncol, 2020, 6: 1-8.
- [ 11 ] Xie L, Shen M, Hong Y, et al. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities [J]. Carbohydr Polym, 2020, 229(10): 1-41.
- [ 12 ] 王娜, 谢磊. 红景天苷调节免疫及抑制宫颈癌 U14 荷瘤小鼠肿瘤生长作用的研究 [J]. 中药材, 2020, 43(7): 1736-1740.
- Wang N, Xie L. Effect of salidroside on immune regulation and tumor growth inhibition of U14 cervical cancer bearing mice [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(7): 1736-1740.
- [ 13 ] 张丹, 王允野. 探讨干酪乳杆菌对胃癌大鼠的抗肿瘤作用及其免疫学机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 48-54.
- Zhang D, Wang YD. Anti-tumor effect and immunological mechanism of lactobacillus casei in a rat model of gastric cancer [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(12): 48-54.
- [ 14 ] 田嘉军, 黄聘和, 岳茜岚, 等. 免疫力低下小鼠动物模型建立及快速检测研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 77-82.
- Tian JJ, Huang PH, Yue QL, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 77-82.
- [ 15 ] 刘艳菊, 刘景超, 王永飞. 绞股蓝多糖对 MFC 胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制及免疫调节作用 [J]. 中成药, 2019, 41(12): 2876-2881.
- Liu YJ, Liu JC, Wang YF. Effects of Gynostemma pentaphyllum polysaccharides on tumor growth inhibition and immune regulation in MFC gastric cancer-bearing mice [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(12): 2876-2881.
- [ 16 ] Mizui M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases [J]. Clin Immunol, 2019, 206: 63-70.
- [ 17 ] 许宇媚, 杨芳, 孙茜, 等. 血清白介素和 ALP 水平与乳腺癌骨转移相关性探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(22): 1721-1725, 1742.
- Xu YM, Yang F, Sun Q, et al. Correlation between serum IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$  and ALP levels in breast cancer patients with bone metastasis [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2019, 26(22): 1721-1725, 1742.
- [ 18 ] 李锦源, 黄文涛, 韦园园, 等. 氧化苦参碱联合全反式维甲酸干预大鼠肝癌变进程中细胞因子的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 111-116, 134.
- Li JY, Huang WT, Wei YY, et al. Effects of oxymatrine combined with all-trans retinoic acid on cytokines during hepatocarcinogenesis in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 111-116, 134.
- [ 19 ] van Senten JR, Fan TS, Siderius M, et al. Viral G protein-coupled receptors as modulators of cancer hallmarks [J]. Pharmacol Res, 2020, 156: 104804.
- [ 20 ] Lai JL, Liu YH, Liu C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. Inflammation, 2017, 40(1): 1-12.
- [ 21 ] Tilborghs S, Corthouts J, Verhoeven Y, et al. The role of Nuclear Factor- $\kappa$ B signaling in human cervical cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 120: 141-150.

[ 收稿日期 ] 2020-10-10

李丹,蔡方舟,李哲,等. 病毒性皮肤疣小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 204-209.

Li D, Cai FZ, Li Z, et al. Development of a mouse model of papillomavirus-mediated skin wart [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 204-209.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.010

# 病毒性皮肤疣小鼠模型的建立

李丹,蔡方舟,李哲,王卫\*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

**【摘要】** 目的 疣是因人乳头瘤病毒(HPV)感染导致的皮肤科疾病之一,常表现为寻常疣、尖锐湿疣等症,治疗后易复发,目前尚无有效的小鼠模型。为研究皮肤疣的防治策略及产品,本研究拟建立病毒性皮肤疣小鼠模型。**方法** 免疫缺陷小鼠麻醉后,利用刀片轻轻刮擦小鼠尾部皮肤制造轻微创口,接种  $1.5 \times 10^8$  copies 小鼠乳头瘤病毒,定期观察尾部皮肤变化,使用不同方法检测病毒 DNA、病毒载量及病理分析。**结果** MmuPV1 感染小鼠尾部皮肤 16 周后,肉眼可见乳头瘤状增生,伴有过度角化以及表面粗糙;HE 染色分析为皮肤表面鳞状上皮增生,棘层和颗粒层有空泡变性,可原位检测 MmuPV1 E4 RNA 转录本。增生部位也可检测到 MmuPV1 DNA 以及病毒载量。**结论** 本研究利用小鼠乳头瘤病毒 MmuPV1 感染免疫缺陷小鼠尾部皮肤,成功建立病毒性皮肤疣小鼠模型,支撑皮肤型 HPV 感染、致病机制等研究。

**【关键词】** 皮肤疣;人乳头瘤病毒(HPV);小鼠;动物模型;小鼠乳头瘤病毒

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0204-06

## Development of a mouse model of papillomavirus-mediated skin wart

LI Dan, CAI Fangzhou, LI Zhe, WANG Wei\*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS). Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC). Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious Diseases. NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)  
Corresponding author: WANG Wei. E-mail: wangw@cnilas.org

**【Abstract】 Objective** Verruca is a dermatological disease caused by human papillomavirus (HPV), and includes conditions such as verruca vulgaris and condyloma acuminatum. Although treatments are available to remove skin warts, effective therapies are still lacking. Because of species specificity, the development of animal models of HPV infection has been limited. In this study, mouse papillomavirus (MmuPV1) was used to infect immunodeficient mice to establish a murine model of skin papillomatous hyperplasia. **Methods** After anesthesia, the tail skin was gently scraped with a blade to produce a slight wound, which was then inoculated with  $1.5 \times 10^8$  copies of viral DNA. Changes in the tail skin were observed, viral DNA and load were examined, and pathological analysis was performed. **Results** Sixteen weeks post-infection with MmuPV1, papillomatous hyperplasia with hyperkeratosis had developed at the infection sites. HE staining showed hyperplasia of squamous epithelium and vacuolar degeneration in the spinous and granular layers. MmuPV1 E4 transcript was detected by RNAscope *in situ* hybridization. MmuPV1 DNA in the samples was detected by PCR

**【基金项目】** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-019), 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项(2017ZX10304402-001-022)。

Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Sciences(2016-I2M-1-019), the National Megaproject of China for Major Infectious Diseases(2017ZX10304402-001-022)。

**【作者简介】** 李丹(1988—),女,博士,助理研究员,专业:预防兽医学。Email: lidan@cnilas.org

**【通信作者】** 王卫(1981—),副研究员,硕士生导师,研究方向:病原生物学。Email: wangw@cnilas.org

amplification of the E2 gene. Viral DNA was tested in all MmuPV1-infected NU/NU mice samples by qRT-PCR.

**Conclusions** Our result suggest that MmuPV1 skin infection in mice mimics HPV disease, and can therefore serve as a useful model for studying the pathogenesis and natural history of HPV infection.

**【Keywords】** skin wart; HPV; mouse; animal model; MmuPV1

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

人乳头瘤病毒(human papillomavir, HPV)可引起多种常见皮肤疾病,包括良性疣、光化性角化病及鳞状细胞癌等<sup>[1-2]</sup>,其中免疫抑制患者感染发病并进展为癌症比免疫健全的人高 100 倍<sup>[3]</sup>。由于乳头瘤病毒具有严格种属特异性,HPV 无法感染实验动物建立动物模型。科学家们通过犬口腔乳头瘤病毒(canine oral papillomavirus, COPV/CPV1)、棉尾兔乳头瘤病毒(cottontail rabbit papillomavirus, CRPV)、及兔口腔乳头瘤病毒(rabbit oral papillomavirus, ROPV)以及牛乳头瘤病毒(bovine papillomavirus, BPV)等感染动物模型来理解乳头瘤病毒感染过程及发病机制<sup>[4-5]</sup>,然而这些感染模型个体差异大及有限的技术等问题,使得更为理想的感染实验室小鼠模型尚待建立。2011 年,印度科学家从 NMRI-Foxn1(Nu)/Foxn1(Nu)裸鼠上分离得到小鼠乳头瘤病毒(mouse papillomavirus, MmuPV1),其可感染实验室小鼠品系,首次提供利用小鼠研究乳头瘤状病毒的机会<sup>[6-9]</sup>。本研究利用 MmuPV1 感染 T 细胞缺陷的 Crl;NU-Foxn1<sup>tm</sup>小鼠尾部并进展为病毒性皮肤疣模型,为进一步研究 HPV 持续感染、致病机制研究等提供研究平台,有望助力于 HPV 致病机制和治疗方法研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

15 只 6 ~ 8 周龄 SPF 级雌性 NU/NU(Crl;NU-Foxn1<sup>tm</sup>, 编号 403)小鼠,体重 18 ~ 25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-006】。动物饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL-2 级实验室【SYXK(京)2019-0014】。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。本动物实验已通过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会审批(批准号:WW19001)。

#### 1.1.2 病毒毒株

小鼠乳头瘤病毒(MmuPV1)及质粒 pMusPV 由

宾夕法尼亚州立大学 Jiafen Hu 教授惠赠。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

三溴乙醇(Sigma-Aldrich, T48402), DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, 69506), QuantiTect Probe PCR Kits(Qiagen, 204343), RNAscope® Probe-V-MusPV-E4(Advanced Cell Diagnostic, 473281), RNAscope® 2.5 HD reagent kit-Brown(Advanced Cell Diagnostic, 322300); Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity(Invitrogen, 11304029), Trans2K® Plus DNA Marker(全式金,中国)。

Bead Ruptor Elite 多功能生物样品均质器(OMNI International, 美国), PCR 仪(Bio-Rad T100 Thermal Cycler, 美国), 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems Quantstudio 3, 美国), NanoZoomer S60 数字切片扫描仪(HAMAMATSU, 日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病毒制备

MmuPV1 是从小鼠尾部病变部位分离<sup>[9]</sup>。具体步骤为利用手术刀片将增生组织置于匀浆管中,加入 PBS,电动匀浆器 5.65 m/s 45 s,间隔 30 s 后再次匀浆,将匀浆后的产物以 10 000 rpm 离心 2 min,上清液置于 EP 管中 -80℃ 储存。MmuPV1 病毒液与 PBS 按 1:5 进行稀释(即 40 μL 病毒液加入 200 μL PBS),混合后置于 0.22 μm 醋酸纤维素无菌离心过滤管,过滤管中再加入 200 μL PBS,因过滤过程的损失,最终可得到 250 μL 病毒液。

#### 1.2.2 小鼠感染

NU/NU 小鼠经三溴乙醇麻醉,按每公斤体重腹腔注射 240 mg。待小鼠麻醉后,利用刀片在小鼠尾部反复轻轻刮擦 20 次左右,取 10 μL 病毒液(1.5 × 10<sup>8</sup> copies vrial DNA)滴加到刮擦过的尾部,待病毒液体自然干燥后,将感染后的小鼠放回鼠笼。感染后 16 周安乐小鼠并收集增生组织。

#### 1.2.3 MmuPV1 DNA 及载量检测

利用 Dneasy Blood&Tissue Kit(Qiagen)提取病毒或动物组织 DNA。使用 MmuPV1 E2 上下游引物, MmuPV1\_E2\_1(5'-GCCCGAAGACAACACC GCCACG-3')和 MmuPV1\_E2\_2(5'-CCTCCGCCTCG

TCCCCAAAAAATGG-3') 扩增<sup>[10]</sup>, PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 具体为: 10  $\times$  High Fidelity PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTP Mix 0.5  $\mu\text{L}$ 、50 mmol/L  $\text{MgSO}_4$  1  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1\_E2\_1 primer 1  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1\_E2\_2 primer 1  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1 DNA 3  $\mu\text{L}$ 、Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerase High Fidelity 0.1  $\mu\text{L}$ 、去离子水 15.9  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  15 s、60 $^{\circ}\text{C}$  30 s、68 $^{\circ}\text{C}$  45 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

qRT-PCR 法检测病毒载量, 利用已知浓度 pMusPV 质粒绘制标准曲线, 同样靶向 MmuPV1\_E2 基因进行检测, 上下游引物同 PCR 扩增引物, 探针序列为 FAM-TGCCCTTTCAGTGGGTTGAGGACAG-MGB<sup>[10]</sup>。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 具体为: 2  $\times$  QuantiTect Probe PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1\_E2\_1 primer 1  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1\_E2\_2 primer 1  $\mu\text{L}$ 、MmuPV1\_E2\_probe 0.5  $\mu\text{L}$ 、Template DNA 1  $\mu\text{L}$ 、Rnase-free water 6.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。

#### 1.2.4 免疫组化

感染 16 周后, 将 MmuPV1 感染 NU/NU 小鼠进行安乐, 采集尾部增生部位皮肤, 制备成石蜡块进行苏木精-伊红(HE 染色)。方法简述: 增生组织经 10% 的多聚甲醛固定、脱水透明后, 石蜡包埋后切片; 切片脱蜡后进行 HE 染色, 显微镜下观察。

#### 1.2.5 RNA 原位杂交

制备的石蜡切片, 利用 RNAscope 检测<sup>[11]</sup>。具体为: (1) 切片脱蜡: 60 $^{\circ}\text{C}$  烤片 1 h, 二甲苯脱蜡, 100% 酒精, 室温静置干燥 5 min; (2) 双氧水靶标修复: 滴加 5 ~ 8 滴 RNAscope<sup>®</sup> 双氧水后孵育 10 min, 蒸馏水清洗, 浸没于煮沸的 1  $\times$  RNAscope<sup>®</sup> 靶标修复液中放置 15 min, 蒸馏水清洗, 100% 乙醇中清洗, 室温静置干燥 10 min; (3) 画疏水圈: 利用 Immedge<sup>™</sup> 疏水笔在检测样本周围画疏水圈 2 ~ 4 次; (4) 切片滴加 5 滴 RNAscope<sup>®</sup> 蛋白酶 plus 的切片放入 HybEZ<sup>™</sup> 湿盒, 再放入 40 $^{\circ}\text{C}$  杂交炉 30 min, 蒸馏水清洗; (5) 探针杂交: 切片滴加 4 滴 MmuPV1 E4 探针, 再放入湿盒, 杂交炉 40 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, 1  $\times$  清洗缓冲液清洗; (6) Amp 杂交反应: 依次加入 Amp1 ~ Amp6 杂交反应液 4 滴, 分别放回湿盒, 杂交炉 40 $^{\circ}\text{C}$  孵育, 结束后用 1  $\times$  清洗缓冲液清洗, 再依次进行下次杂交; (7) 信号检测: 切片上滴加 120  $\mu\text{L}$  DAB 工作液, 静置 10 min, 蒸馏水洗 3 ~ 5 次; (8) 切片复

染: 放入苏木精染色液中, 室温静置 2 min, 蒸馏水洗 3 ~ 5 次, 0.02% 氨水洗 1 次, 蒸馏水再洗 3 ~ 5 次; (9) 切片分别置于 70% 乙醇, 100% 乙醇孵育 2 min, 以及二甲苯溶液, 静置 5 min; (10) 切片风干后, 滴加 1 滴 Cytooseal 封片剂, 盖上盖玻片, 风干载玻片 1 min; (11) 结果判读: 观察 MmuPV1E4 转录本在感染增生组织中的表达, 棕色斑点判定为阳性信号。

## 2 结果

### 2.1 MmuPV1 感染尾部皮肤后外观性状

MmuPV1 病毒感染 NU/NU 小鼠 4 周左右, 其中 5 只小鼠即可见尾部皮肤出现小米粒大小增生; 16 周后可观察到, 小鼠尾部出现高于皮面, 圆形或不规则形状的乳头瘤样增生, 并且伴有角化过度, 表面粗糙(图 1)。收集增生组织, HE 染色进行病理分析, 组织学观察可见感染小鼠尾部皮肤表面鳞状上皮增生(图 2A), 棘层肥厚, 在棘层和颗粒层出现空泡化细胞(图 2B)。



图 1 MmuPV1 感染 16 周后的 NU/NU 小鼠尾部

Figure 1 Tail skin of MmuPV1 infected NU/NU mouse after 16 weeks

### 2.2 PCR 检测增生组织 MmuPV1 DNA

MmuPV1 感染增生部位提取 DNA, 利用 MmuPV1 E2 基因特异性引物扩增鉴定 MmuPV1 表达 97 bp 片段。利用感染 MmuPV1 的小鼠尾部提取 DNA 进行鉴定, 结果表明均可检测到 MmuPV1 DNA(图 3)。

### 2.3 qRT-PCR 法检测增生组织病毒载量

制备 MmuPV1 病毒液按 1:5 与 PBS 稀释后进行过滤, 又追加 200  $\mu\text{L}$  PBS。取 5  $\mu\text{L}$  过滤后的病毒液提取 DNA, 利用实时定量 PCR 方法检测感染病变组织中 MmuPV1 的病毒载量, 同样利用 MmuPV1 E2 基因进行定量。结果表明, 感染小鼠尾部增生部位均可检测到病毒载量, 该病毒提取物中每微升含有大于  $1.3 \times 10^8$  viral DNA copies, RNase-Free 水作为阴性对照(NC)(图 4)。

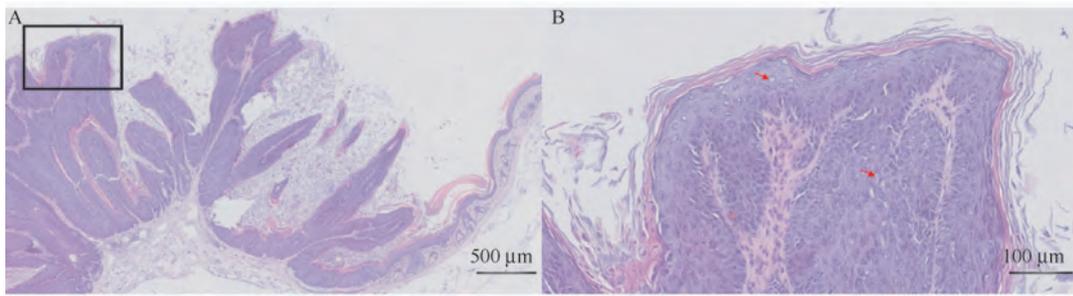


图 2 MmuPV1 感染小鼠尾部病变组织学分析

Figure 2 Immunohistochemical analysis of mouse tail hyperplasia by MmuPV1 infection



注:1 ~ 15;MmuPV1 感染小鼠尾部 DNA 样本;16:pMusPV 质粒(阳性对照);17:未感染小鼠尾部 DNA(阴性对照);18:水(空白对照);M:Trans 2 k Plus DNA Marker。

图 3 感染小鼠尾部 MmuPV1 E2 基因 PCR 鉴定

Note. 1 ~ 15. Samples DNA from MmuPV1 tail infection. 16. pMusPV plasmid (Positive control). 17. DNA from the mock mice (Negative control). 18. Water (Blank control). M. Trans 2 k Plus DNA Marker.

Figure 3 MmuPV1 DNA was analyzed by PCR on E2 gene from virus-induced mouse tails

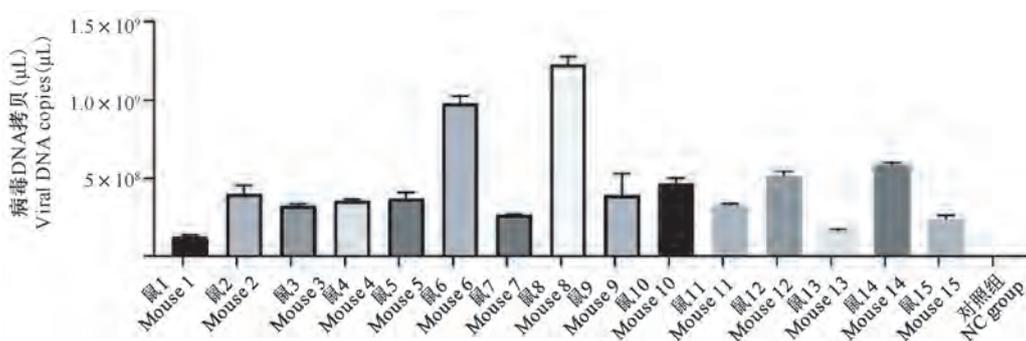


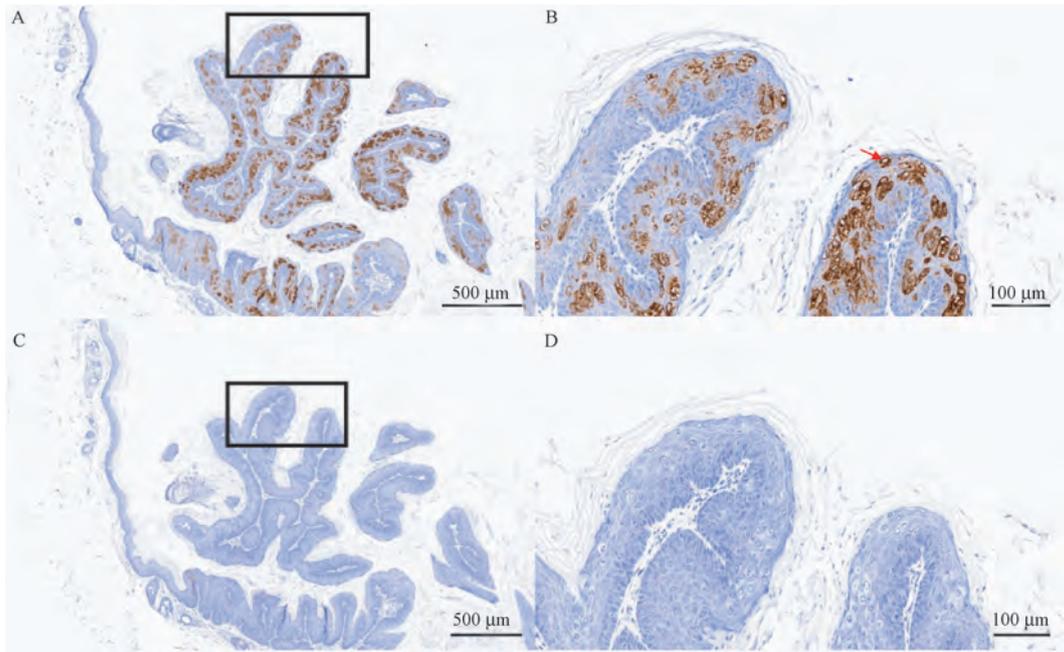
图 4 qPCR 法检测感染小鼠尾部病毒载量

Figure 4 Viral load in the MmuPV1-induced mouse tails by qPCR

## 2.4 RNA 原位杂交检测 MmuPV1 E4 转录本

RNAscope 原位 RNA 杂交技术可呈现单个细胞中 RNA 分子原位的可视化及量化。因此本研究利用 RNAscope 原位杂交检测 MmuPV1 E4 转录本表达,因 MmuPV1 E4 转录本存在于大多数乳头瘤病毒早期和

晚期转录过程。用 MmuPV1 E4 目的探针、阴性探针进行检测,出现棕色信号为探针结合 RNA 分子,蓝色信号为细胞核。结果表明,目的探针 MmuPV1 E4 杂交后可见明显的棕色斑点信号(图 5A,B),而阴性对照则只有蓝色信号(图 5C,D)。



注: A, B: RNAscope 原位杂交 E4 转录本检测; C, D: RNAscope 原位杂交阴性探针对照。

图 5 原位杂交检测感染小鼠尾部病变 MmuPV1 E4 转录本

Note. A, B. MmuPV1 E4 transcript probe. C, D. Negative probe.

Figure 5 *In situ* hybridization probe for detection of MmuPV1 E4 transcript in the infected mouse tails

### 3 讨论

乳头瘤病毒感染导致的相关疾病已成为世界范围内的主要问题。大多数 HPV 型感染是良性的, 但如 HPV16、HPV18 等高危型 HPV 可导致宫颈癌、皮肤癌、头颈鳞癌以及肛门生殖器癌症等恶性肿瘤。皮肤疣是因感染 HPV 而导致的一种良性增生, 儿童及青少年发病率较高, 多发于手、面和足部, 表现为圆形乳头状角化增生。目前的治疗方法主要以物理方法破坏疣体和手术切除, 或者局部用药、免疫增强剂等治疗<sup>[12]</sup>, 但这些方法易复发、易感染, 治疗时间久且治疗过程疼痛不适, 使患者增加精神及经济负担, 配合程度较差。HPV 属于自限性病毒, 在 HPV 感染、病变到致癌过程需经历数十年, 而目前对于治疗中的给药途径及剂量无法系统评价, 使得因 HPV 感染而引起良性或恶性病变的患者尚无有效治疗方案<sup>[13]</sup>。因为 HPV 感染具有严格物种特异性, 前期科学家建立了棉尾兔乳头瘤病毒 (CRPV)、多乳鼠乳头瘤病毒 (MnPV1) 等感染动物皮肤致病模型<sup>[14-15]</sup>, 但这些 HPV 参比模型存在个体差异大, 成本高和技术有限等问题, 理想的感染动物模型的缺乏很大程度阻碍了 HPV 感染致病机制及治疗手段的研究, 因此, 建立适合的动物模型

进行该疾病的研究一直具有挑战性。

MmuPV1 最初是从 NMRI-Foxn1<sup>tm</sup>/Foxn1<sup>tm</sup> 裸鼠中分离鉴定中分离得到, 与皮肤型  $\beta$ -HPV 基因组更为相似, 如 HPV5 和 HPV8 等皮肤型人乳头瘤病毒, 与疣状表皮发育不良及免疫抑制患者的鳞状细胞癌有关。前期多个科研团队已利用 MmuPV1 建立了尾巴、口腔周围、背部以及耳朵的多个小鼠品系感染模型<sup>[6,8,16-17]</sup>。因为免疫抑制患者更易感染而发展成疣或更高级病变, 前期也有研究表明, T 细胞缺陷对病毒感染及进展至关重要。因此, 建立了 MmuPV1 感染裸鼠皮肤模型, 显示其在尾部皮肤以及口腔周围皮肤 (未发表) 引起肉眼可见高出皮面的圆形丘疹, 乳头瘤状外生性增生, 角化过度, 组织病理学分析发现空泡细胞, 并可进展为高度鳞状上皮不典型增生, 与人类感染 HPV 引起的疣状病变相似。通过 PCR 可检测到 MmuPV1 DNA 以及利用 qRT-PCR 检测到病毒载量, RNAscope 技术是在 RNA 水平利用靶向特异性双 Z 设计探针检测单链 RNA 的原位杂交, 解决了尚无 MmuPV1 相应抗体检测及定量的问题, 本模型利用 RNA 原位杂交技术, 在 MmuPV1 感染小鼠尾部皮肤检测到明显的 E4 转录本信号, 即在增生部位可原位检测到乳头瘤病毒的存在。

多个科学家团队已证明, MmuPV1 具有广泛的组织嗜性<sup>[18]</sup>, 不仅可感染皮肤上皮细胞, 也可感染 HPV 性传播有关的部位, 如女性与男性生殖器粘膜、肛门和口咽部位, 头颈鳞癌等<sup>[11,17,19-22]</sup>, 这些结果与高危型 HPV 非常相似。综上所述, MmuPV1 的发现为乳头瘤病毒多个领域的研究提供关键平台, 其感染是模拟 HPV 病毒潜伏期、病变形成以及控制感染等方面更为充分的临床前动物模型, 有望改变我们对 HPV 相关疾病的理解, 并且帮助对 HPV 相关疾病治疗方法的建立。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer [J]. N Engl J Med, 2010, 363(1): 24-35.
- [ 2 ] Tommasino M. The biology of beta human papillomaviruses [J]. Virus Res, 2017, 231: 128-138.
- [ 3 ] Nehal KS, Bichakjian CK. Update on keratinocyte carcinomas [J]. N Engl J Med, 2018, 379(4): 363-374.
- [ 4 ] Gil da Costa RM, Peleteiro MC, Pires MA, et al. An update on canine, feline and bovine papillomaviruses [J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(5): 1371-1379.
- [ 5 ] Lambert PF. Transgenic mouse models of tumor virus action [J]. Annu Rev Virol, 2016, 3(1): 473-489.
- [ 6 ] Joh J, Chilton PM, Wilcher SA, et al. T cell-mediated antitumor immune response eliminates skin tumors induced by mouse papillomavirus, MmuPV1 [J]. Exp Mol Pathol, 2017, 103(2): 181-190.
- [ 7 ] Sundberg JP, Stearns TM, Joh J, et al. Immune status, strain background, and anatomic site of inoculation affect mouse papillomavirus (MmuPV1) induction of exophytic papillomas or endophytic trichoblastomas [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113582.
- [ 8 ] Uberoi A, Yoshida S, Frazer IH, et al. Role of ultraviolet radiation in papillomavirus-induced disease [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(5): e1005664.
- [ 9 ] Uberoi A, Yoshida S, Lambert PF. Development of an *in vivo* infection model to study Mouse papillomavirus-1 (MmuPV1) [J]. J Virol Methods, 2018, 253: 11-17.
- [10] Cladel NM, Jiang P, Li JJ, et al. Papillomavirus can be transmitted through the blood and produce infections in blood recipients: evidence from two animal models [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 1108-1121.
- [11] Spurgeon ME, Uberoi A, McGregor SM, et al. A novel *in vivo* infection model to study papillomavirus-mediated disease of the female reproductive tract [J]. mBio, 2019, 10(2): e00180-19.
- [12] 陈虹霞, 邹先彪. 2014 年英国皮肤科医师协会皮肤疣治疗指南解读 [J]. 实用皮肤病学杂志, 2015, 8(5): 360-362. Chen HX, Zou XB. Interpretation of British association of dermatologist` guideline for the management of cutaneous warts 2014 [J]. J Pract Dermatol, 2015, 8(5): 360-362.
- [13] Doorbar J, Quint W, Banks L, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses [J]. Vaccine, 2012, 5: 55-70.
- [14] Amtmann E, Volm M, Wayss K. Tumour induction in the rodent *Mastomys natalensis* by activation of endogenous papilloma virus genomes [J]. Nature, 1984, 308(5956): 291-292.
- [15] Brandsma JL. The cottontail rabbit papillomavirus model of high-risk HPV-induced disease [J]. Methods Mol Med, 2005, 119: 217-235.
- [16] Cladel NM, Budgeon LR, Cooper TK, et al. Mouse papillomavirus infections spread to cutaneous sites with progression to malignancy [J]. J Gen Virol, 2017, 98(10): 2520-2529.
- [17] Wei T, Buehler D, Ward SE, et al. An infection-based murine model for papillomavirus-associated head and neck cancer [J]. mBio, 2020, 11(3): e00908-e00920.
- [18] 李丹, 王卫. 乳头瘤病毒感染小鼠模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 120-126. Li D, Wang W. Advances in research on mouse models of papillomavirus infection [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 120-126.
- [19] Cladel NM, Budgeon LR, Balogh KK, et al. Mouse papillomavirus infection persists in mucosal tissues of an immunocompetent mouse strain and progresses to cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16932.
- [20] Cladel NM, Budgeon LR, Balogh KK, et al. Mouse papillomavirus MmuPV1 infects oral mucosa and preferentially targets the base of the tongue [J]. Virology, 2016, 488: 73-80.
- [21] Hu J, Budgeon LR, Cladel NM, et al. Tracking vaginal, anal and oral infection in a mouse papillomavirus infection model [J]. J Gen Virol, 2015, 96(12): 3554-3565.
- [22] Spurgeon ME, Lambert PF. Sexual transmission of murine papillomavirus (MmuPV1) in *Mus musculus* [J]. Elife, 2019, 8: e50056.

[收稿日期] 2021-01-18

牛栋,赵彬彬,武婧,等. EV71、CA16、CA10 三价 VP1 蛋白疫苗的有效性和安全性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 210-218.

Niu D, Zhao BB, Wu J, et al. Study of the efficacy and safety of a trivalent EV71, CA16, CA10 VP1 protein vaccine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 210-218.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.011

# EV71、CA16、CA10 三价 VP1 蛋白疫苗的有效性和安全性研究

牛栋,赵彬彬,武婧,彭婉君,张丽红,刘江宁\*

(北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,  
卫健委人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021)

**【摘要】 目的** 手足口病(HFMD)流行于5岁以下婴幼儿,由多种肠道病毒引发。由于该疾病具有多病原的特点,单纯针对某一种病原的疫苗具有很大的局限性,开发多价疫苗非常必要。本文制作了EV71、CA16和CA10病毒的三价VP1蛋白疫苗,在小鼠中检测其免疫活性和安全性,以证明多价蛋白疫苗的可行性。**方法** 三价VP1蛋白疫苗免疫小鼠后,定期测定血清中特异性抗体情况、确定抗体的中和活性,检测特异性T细胞免疫反应和细胞因子的变化情况,并通过体内感染实验评价免疫母鼠对乳鼠的被动免疫保护效果。**结果** 三价VP1蛋白疫苗免疫小鼠后,血清中能持续检测到特异性的IgG、IgM抗体,且免疫血清具有中和活性;除诱导病毒特异的体液免疫,三价VP1蛋白疫苗还活化了病毒特异的T细胞反应;三价VP1蛋白疫苗则只对乳鼠在感染EV71病毒时具有被动免疫保护作用。而在免疫过程中炎性细胞因子保持比较稳定的水平,表明疫苗具有良好的安全性。**结论** 三价VP1蛋白疫苗对EV71、CA16和CA10病毒具有一定的免疫保护活性,可用于手足口多价疫苗的进一步开发。

**【关键词】** 蛋白疫苗;肠道病毒;免疫保护

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0210-09

## Study of the efficacy and safety of a trivalent EV71, CA16, CA10 VP1 protein vaccine

NIU Dong, ZHAO Binbin, WU Jing, PENG Wanjuan, ZHANG Lihong, LIU Jiangning\*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College(PUMC); Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS); Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, National Health Commission, Beijing 100021, China)

Corresponding author: LIU Jiangning. E-mail:ljn\_zb03038@126.com

**【Abstract】 Objective** Hand, foot and mouth disease (HFMD) mainly affects children under the age of 5. Because HFMD is caused by a group of enteroviruses, a vaccine targeting only one pathogen would be greatly limited, and a multivalent vaccine would be more effective. In this study, we prepared a trivalent VP1 protein vaccine against EV71, CA16 and CA10 viruses. This vaccine was then injected into mice to examine immune activities and to evaluate safety. **Methods** After immunization with the trivalent VP1 protein vaccine, virus-specific antibodies and their neutralizing activities were analyzed, and virus-specific T cell immune responses and changes in cytokines were assessed. Furthermore,

**【基金项目】** 中国医学科学院创新工程(2016-12M-2-006), 国家科技重大专项“重大新药开发”(2016ZX09101120-006)。

Funded by Innovation Project of Chinese Academy of Medical Science(2016-12M-2-006), National Major Scientific and Technological Special Project for “Significant New Drugs Development”(2016ZX09101120-006)。

**【作者简介】** 牛栋(1996—),男,在读硕士研究生,研究方向:病原生物学。Email:291219697@qq.com

**【通信作者】** 刘江宁(1981—),男,研究员,硕士生导师,研究方向:肠道病毒的病原生物学及比较医学。Email:ljn\_zb03038@126.com

passive immunoprotective effects passed from immunized mothers to their neonatal offspring were evaluated with *in vivo* infection experiments. **Results** The trivalent VP1 protein vaccine continuously induced virus-specific IgGs and IgMs, which had the ability to neutralize the viruses. In addition to inducing virus-specific humoral immunity, the trivalent VP1 protein vaccine activated the virus-specific T cell response as well. The vaccine also provided passive immunity to neonatal mice against EV71 virus infection. Additionally, the stable levels of inflammatory cytokines during the immune response indicated that the vaccine was safe. **Conclusions** The trivalent VP1 protein vaccine was effective against EV71, CA16 and CA10 viral challenge, and could therefore be useful for the development of multivalent HFMD vaccines.

**【Keywords】** protein vaccine; enterovirus; immune protection

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

手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)是由多种肠道病毒引发的常见病毒性传染病,其主要传播途径为粪口传播,多发于婴幼儿及 5 岁以下儿童<sup>[1-5]</sup>。手足口病传染性强,通常是自限性的,但少数患儿可迅速发展为重症的神经系统并发症,如急性弛缓性麻痹、脑脊髓炎、无菌性脑炎、暴发性神经性肺水肿等,病死率较高<sup>[6-7]</sup>。2008 年手足口病在我国开始暴发流行,此后发病病例呈逐年上升趋势,到 2014 年至 2016 年累计已达 730 万例病例<sup>[8-11]</sup>。人类肠道病毒(human enteroviruses)是手足口病的主要病原,属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(Enterovirus),为单股正链 RNA 病毒,由蛋白外壳和核酸组成。人类肠道病毒 EV71 (enterovirus 71)和 CA16 (coxsackievirus A16)是手足口病的主要流行病原;近年来,由 CA10 (coxsackievirus A10)、CA6 (coxsackievirus A6)等病毒引起的手足口病病例有所增加<sup>[7-12]</sup>。其中, EV71 和 CA10 感染都可引起严重的神经系统疾病,如无菌性脑膜炎和病毒性脑膜炎,以及神经源性肺水肿和心肺功能障碍等,最终可能导致死亡。CA16 感染症状虽多为轻症或无症状病例,但有研究表明 EV71 与 CA16 混合型感染更易导致中枢神经系统并发症<sup>[13]</sup>。

目前在我国已上市了针对 EV71 的灭活疫苗,然而 EV71 疫苗并不能预防手足口病的其他病原,如 CA16 和 CA10<sup>[14-18]</sup>。因此,开发一种多价手足口病疫苗是更为有效的策略。由于肠道病毒感染可能与自身免疫性疾病有关<sup>[19-21]</sup>,灭活病毒免疫有引起自身免疫性疾病的潜在风险<sup>[22]</sup>;而重组蛋白疫苗可以去掉有害抗原表位,自由编辑、重组抗原蛋白,具有更好的灵活性。肠道病毒结构蛋白 VP1 含有主要的抗原决定簇,在 EV71 和 CA16 研究中都得到了证实。本文根据这一特性,将 EV71、CA16 和 CA10 病毒的 VP1 蛋白制成三价蛋

白疫苗,每隔 2 周对 ICR 小鼠进行 1 次免疫,并定期检测小鼠血清中特异性抗体的组成及中和活性,鉴定 T 细胞的特异性免疫反应,并评估对乳鼠的免疫保护效果。结果表明:三价 VP1 蛋白疫苗能够有效地诱导出病毒特异的体液免疫和细胞免疫,能够保护乳鼠抵御 EV71 病毒感染,同时具有良好的安全性;从而说明该蛋白疫苗具有进一步开发的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

110 只 6 周龄 SPF 级 ICR 小鼠,其中雌性 90 只,雄性 20 只,体重约为 25 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。于中国医学科学院医学实验动物研究所动物生物安全二级实验室(ABSL-2)中进行实验【SYXK(京)2019-0014】。饲养环境:室内温度 22 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,12 h 光照/黑暗循环。动物在笼内自由摄食饮水。本实验得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会的批准(批准号:LJN20013)。本实验所用的 EV71 病毒为 FY0805 毒株经小鼠传代所获得的适应株 MP10 (GenBank accession number:HQ712020),CA16 病毒为 shzh05-1 毒株 (GenBank accession number:262658),CA10 病毒毒株 (GenBank accession number:MF688814.1)。EV71 VP1 蛋白、CA10 VP1 蛋白经设计由北京义翘神州科技有限公司合成,蛋白浓度分别为 0.57 mg/mL 和 0.21 mg/mL。CA16 VP1 蛋白购自北京义翘神州科技有限公司,纯度大于 85%。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

弗氏完全佐剂 (Sigma-Aldrich, F5881-10ML), 弗氏不完全佐剂 (Sigma-Aldrich, F5506-10ML), 山

羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) (Abcam, ab6789), 山羊抗小鼠 IgM mu chain (HRP) (Abcam, ab97230), 单组分 TMB 显色液 (Solarbio, PR1200), PMA+Ionomycin 淋巴细胞刺激物 (达优, 20304210), Mouse IFN-gamma ELISpot PLUS (ALP), strips (MabTech, 3321-4AST-2), PROCARTAPLEX 11 PLEX (Invitrogen, PPX-11), TRIzol™ Reagent (Ambion, 15596018) QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, 204443), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, K1622), TB Green® Premix Ex Taq™ II (Takara, RR820A)。

多功能发光分析仪 (FLUOstar Omega, 德国), Mabtech IRIS ELISPOT 读板仪 (Mabtech, 瑞典), T100™ Thermal Cycler (Bio-rad, 美国), QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, 96-well, 0.2 mL (Applied Biosystems™, 美国)

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及免疫

6 周龄 ICR 母鼠随机分为 5 组, 每组 16 只。三价 VP1 蛋白疫苗组按照不同剂量分为 3 组, CV-2.5 组、CV-5 组和 CV-10 组; 经腹腔免疫 EV71、CA16、CA10 三种 VP1 蛋白等比混合的三价 VP1 蛋白疫苗 (每种 VP1 蛋白 2.5、5、10 μg)。阴性对照组: 腹腔免疫生理盐水。阳性对照组: 腹腔免疫 EV71、CA16、CA10 三种等比混合的阳性疫苗。各组在免疫后的 14、28 d 时加强免疫, 初次免疫用弗氏完全佐剂, 加强免疫时用弗氏不完全佐剂。在每次免疫前采血分离血清, 免疫后的 35 d 无菌取脾。血清用于细胞因子、病毒特异性抗体、中和抗体效价检测, 脾用于细胞免疫反应检测。每组的部分小鼠在 14 d 免疫后与雄鼠按 2:1 进行合笼。

### 1.2.2 细胞因子检测

采用 Luminex 法检测血清中细胞因子的水平。收集小鼠血液于 EP 管中, 分离血清, 按照试剂盒说明进行 IFN-γ、TNF-α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13 细胞因子的检测。

### 1.2.3 抗体阳性检测

采用间接 ELISA 的方法进行检测, 用包被液 (0.05 mol/L, PH=9.6 的碳酸盐缓冲液) 稀释抗原, 并加入到酶标板中 (每孔 100 μL), 4℃ 过夜; 弃去包被液, 洗涤后加入含有 1% BSA 的 PBST 封闭 1 h; 之后加入稀释好 (1:100/1:1000) 的血清 37℃ 孵育 2 h; 弃去孔内液体, 洗涤后加入 100 μL HRP 标记

的羊抗鼠抗体, 37℃ 孵育 1.5 h; 洗涤后加入 100 μL TMB 显色液 37℃ 显色 5 min, 加入 50 μL 2 mmol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色, 酶标仪测定 A<sub>450</sub>。根据 P/N 的值来判断抗体是否为阳性, P/N 值 (阳性孔/阴性孔 OD 值) 大于或等于 2.1 为阳性; P/N 值小于 2.1, 但大于 1.5 为可疑; P/N 值小于 1.5 为阴性。

### 1.2.4 中和抗体水平检测

采用体外微量中和试验进行检测。将血清放入 56℃ 的金属浴加热 30 min, 灭活补体后的血清从 2<sup>3</sup> 开始进行 2 倍系列稀释, 分别与 100 TCID<sub>50</sub> 的病毒进行等体积混合, 37℃ 中和 80 min, 将孵育好的混合液加入到长有 80% RD 细胞的培养板中, 正常 RD 细胞作为空白对照组, 病毒感染对照组加入 100 μL 的 100 TCID<sub>50</sub> 病毒液; 将细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 3 d, 在显微镜下观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE), 并按照 Reed-Muench 法计算中和抗体的滴度。

### 1.2.5 脾中特异性分泌 IFN-γ 的淋巴细胞检测

第 3 次免疫后 7 d, 每组随机抽取 6 只小鼠, 无菌取脾并制备细胞悬液, 按照每孔 3 × 10<sup>5</sup> 个细胞放入 96 孔板中, 并加入 PMA + Ionomycin 淋巴细胞刺激剂、灭活的 EV71 病毒、灭活的 CA16 病毒、灭活的 CA10 病毒刺激 24 h, 按照 ELISpot 试剂盒说明书检测细胞分泌 IFN-γ 时生成的斑点数。

### 1.2.6 新生乳鼠的病毒感染实验

经免疫的雌鼠产生的 1 日龄 ICR 小鼠 30 窝, 每窝 8 ~ 10 只, 分别经腹腔注射 LD<sub>50</sub> 剂量的 EV71、CA16 或 CA10 病毒, 观察组共观察 14 d, 期间记录临床评分、生存率、体重; 解剖组在 3 ~ 5 d 时取小鼠血液和后肢肌肉用于病毒载量的检测。

### 1.2.7 RNA 的提取以及 qPCR 检测病毒载量

血液与后肢肌肉采用 TRIzol 法进行总 RNA 的提取, 经 CA16 感染的小鼠样本需在提取 RNA 后利用反转录试剂盒进行反转, 并利用染料法 qPCR 制备的标准曲线测定样本中 CA16 病毒核酸的拷贝数。经 EV71 或 CA10 感染的组织样本利用探针法 qPCR 制备的标准曲线测定其 EV71 或 CA16 病毒核酸的拷贝数。

## 1.3 统计学分析

所有数据均使用 IBM SPSS 23 和 GraphPad Prism 8 软件处理, 两组间的比较采用独立样本 *t* 检验, 实验数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 三价 VP1 蛋白疫苗能够诱导产生病毒特异性的中和抗体

本实验采用 6 周龄 ICR 雌鼠对三价 VP1 蛋白疫苗(EV71、CA16 和 CA10 三种病毒的 VP1 蛋白混合疫苗)进行评价,蛋白疫苗按照剂量分为 2.5  $\mu\text{g}$  (CV-2.5)、5  $\mu\text{g}$  (CV-5) 和 10  $\mu\text{g}$  (CV-10) 3 个实验组,并以 EV71、CA16 和 CA10 三种灭活病毒混合形成的疫苗作为阳性对照(PC)、以生理盐水作为阴性对照(NC)。初次免疫后,分别在 14、28 d 进行第 2 次和第 3 次加强免疫。一免后 14、28、35 d 分别检测血清中 IgG、IgM 抗体水平。

三价 VP1 蛋白疫苗初次免疫后,在 14 ~ 35 d 的检测期内 VP1 蛋白特异的 IgG 和 IgM 抗体均为阳性,同时抗体能与灭活病毒进行特异性的结合(表 1)。选取免疫后 35 d 的血清来检测抗体的中和滴度(neutralization titer, NT)。从结果可见(图 1A):三价 VP1 蛋白疫苗的免疫血清对 CA10 病毒的中和活性最高,3 种剂量都超过了  $2^6$ ;对 EV71 病毒中和活性次之,NT 在  $2^5 \sim 2^6$  之间;对 CA16 病毒的中和能力较差,均不到  $2^5$ 。与 PC 组相比,蛋白疫苗免疫血清中和活性均下降约 4 倍。以上结果证明,三价 VP1 蛋白疫苗诱导产生的抗体具有中和活性,对 EV71 和 CA10 病毒的中和作用尤为明显;同时,三价 VP1 蛋白疫苗的不同剂量并未使疫苗血清的中和活性发生显著性的差异。

### 2.2 三价 VP1 蛋白疫苗能够诱导病毒特异的 T 细胞反应

根据动物实验和临床数据,EV71、CA16 的灭活

病毒疫苗能够有效的激活细胞免疫反应<sup>[23-24]</sup>;在本研究中 PC 组也得到了相似的结果,三种病毒特异的 T 细胞反应都得到了有效的诱导(图 1B、C)。同时,发现三价 VP1 蛋白疫苗对 T 细胞也具有活化作用;相对于阴性对照,接种过蛋白疫苗的小鼠有更多的脾细胞产生 IFN- $\gamma$ ;其中 EV71 VP1 蛋白的诱导作用最为突出,检测到的 IFN- $\gamma$  阳性点均超过 130;三种蛋白剂量中 CV-5 剂量组相对于 NC 组,在不同病毒刺激下其表达的 IFN- $\gamma$  均具有显著性差异,说明其激活病毒特异的 T 细胞反应更为稳定(图 1B、C)。研究表明,重组蛋白疫苗可通过被抗原递呈细胞(巨噬细胞、DC 细胞)吞噬、加工,再递呈给 T 细胞,产生特异的 T 细胞反应。本实验中的中剂量三价 VP1 蛋白疫苗能诱导出有效的、病毒特异的 T 细胞反应,其中 5  $\mu\text{g}$  的蛋白剂量表现更好;以 EV71 VP1 蛋白效果最佳,CA16 VP1 蛋白次之;但是蛋白疫苗均未达到灭活病毒疫苗的诱导活性。

### 2.3 三价 VP1 蛋白疫苗免疫未引发炎症反应

疫苗的安全性是疫苗研究的重要部分,由于在 EV71 感染引起的脑干脑炎、肺水肿并发症的患者体内,炎症细胞因子水平明显升高<sup>[25-26]</sup>,因此在疫苗的开发使用中有必要考虑细胞因子的变化情况。基于以上考虑,灭活 EV71 疫苗的研究中增加了对免疫前后的炎症细胞因子的检测<sup>[27]</sup>,结果表明接种疫苗引起的免疫应答中未产生炎症反应,从而支持了疫苗的安全性。同理,检查了三价 VP1 蛋白疫苗免疫后小鼠血清中 10 种炎症相关细胞因子的变化情况(图 2)。蛋白疫苗组血清中大部分炎症相关细胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70)的水平与同期采集的阴性对照组无显著

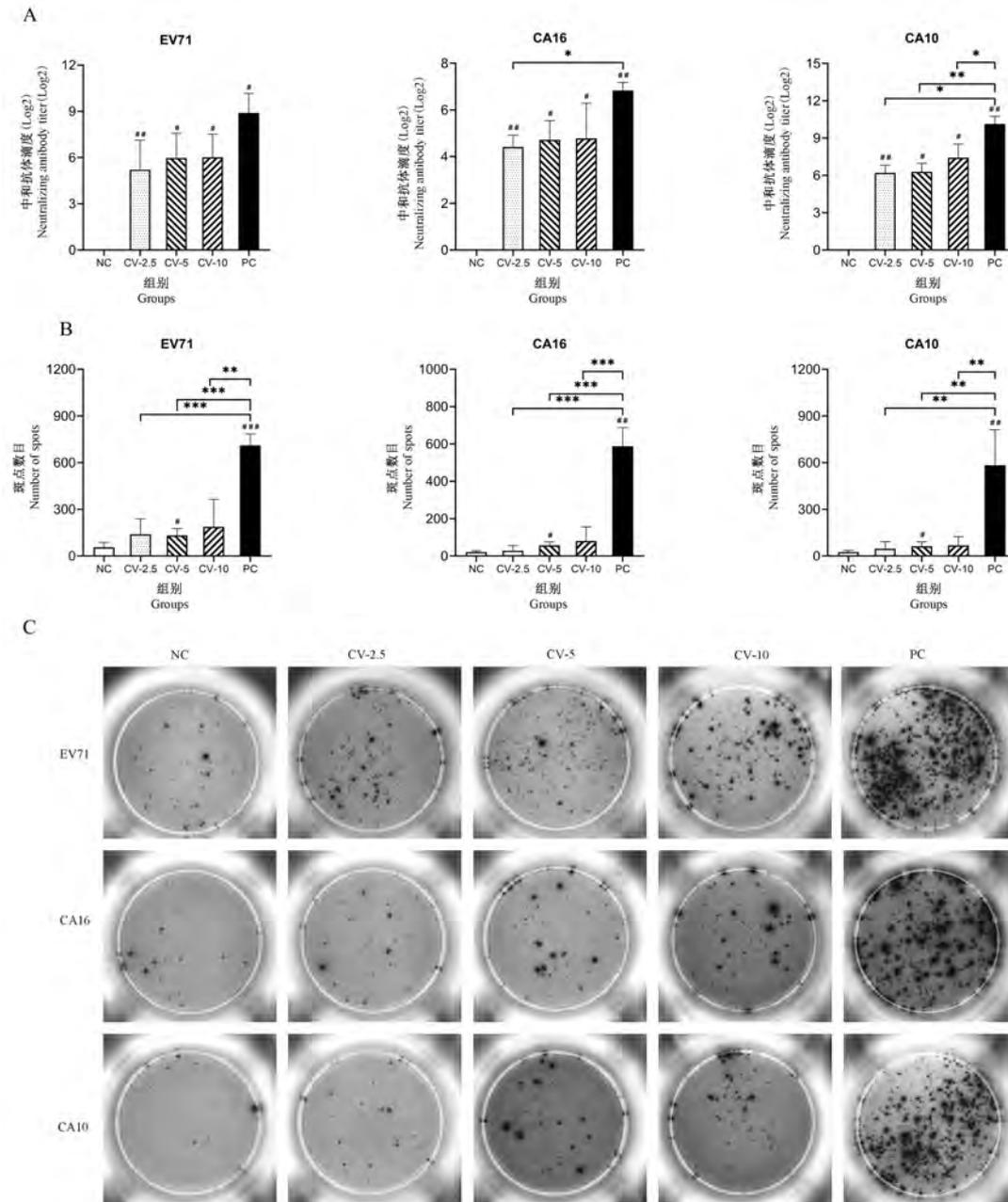
表 1 三价 VP1 蛋白疫苗三次免疫血清中抗体持续阳性情况检测结果

Table 1 Test results of continuous positive antibodies in the three immunized serums of the trivalent VP1 protein vaccine

组别 Groups	特异性 IgG 抗体 Specific IgG antibody						特异性 IgM 抗体 Specific IgM antibody					
	EV71 VP1 蛋白 EV71 VP1 protein		EV71 病毒 EV71 virus		CA16 VP1 蛋白 CA16 VP1 protein		CA16 病毒 CA16 virus		CA10 VP1 蛋白 CA10 VP1 protein		CA10 病毒 CA10 virus	
	EV71 VP1 protein	EV71 virus	CA16 VP1 protein	CA16 virus	CA10 VP1 protein	CA10 virus	EV71 VP1 protein	EV71 virus	CA16 VP1 protein	CA16 virus	CA10 VP1 protein	CA10 virus
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV-2.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CV-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CV-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:-表示 3 次免疫抗体持续阴性;+ 表示 3 次免疫抗体持续阳性;阳性判断标准,以 P/N 值(阳性孔/阴性孔 OD 值)大于或等于 2.1 为阳性;P/N 值小于 2.1,但大于 1.5 为可疑;P/N 值小于 1.5 为阴性。

Note. -. Indicates that the third immunization antibody continues to be negative. +. Indicates that the third immunization antibody continues to be positive. Positive judgment standard. P/N value (positive hole/negative hole OD value) is greater than or equal to 2.1 as positive, P/N value is less than 2.1, but greater than 1.5 is suspicious, P/N value is less than 1.5 as negative.



注:A:免疫 35 d 后小鼠血清的中和抗体滴度变化情况,  $n=3$ ; B:免疫 35 d 后小鼠脾细胞中病毒特异性 T 细胞免疫反应分泌 IFN- $\gamma$  结果,  $n=4$ ; C:免疫 35 d 后小鼠脾细胞中病毒特异性 T 细胞免疫反应分泌 IFN- $\gamma$  结果;与 PC 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 NC 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ 。

**图 1** 三价 VP1 蛋白疫苗免疫血清中中和抗体滴度变化情况及病毒特异性 T 免疫细胞反应检测结果

Note. A. Changes of neutralizing antibody titers in mouse serum after 35 d of immunization,  $n=3$ . B. IFN- $\gamma$  secreted by virus-specific T cell immune response in mouse spleen cells after 35 d of immunization,  $n=4$ . C. The results of IFN- $\gamma$  secreted by virus-specific T cell immune response in mouse spleen cells after 35 d of immunization,  $n=4$ . Compared with the PC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with the NC group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ .

**Figure 1** Changes of neutralizing antibody titers in the immune serum of the trivalent VP1 protein vaccine and the detection results of virus-specific T immune cell responses

性差异;CV-2.5 组的 IL-2 在 14 d 时有短暂的升高, 而到 35 d 时又恢复到免疫前水平;IL-13 作为抑制炎症的细胞因子,在蛋白免疫组(CV-2.5 组、CV-10

组)检测到了高水平的表达。PC 组免疫后 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的水平有短暂的升高,但最终降回至阴性对照水平。此外,在免疫后的小鼠日常观察中未发现

疫苗组小鼠与 NC 组存在明显差异。以上数据表明,三价 VP1 蛋白疫苗以及灭活病毒疫苗均不会使机体产生强烈的炎症反应,也未影响小鼠的正常生长,这些数据提示该疫苗具有良好的安全性。

### 2.4 三价 VP1 蛋白疫苗对新生乳鼠的免疫保护作用

由于免疫母鼠的母源抗体可以通过乳汁转移到新生乳鼠中,从而使乳鼠具有抵抗病毒感染的能[28-29]。实验证实灭活病毒疫苗(PC 组)对母鼠的免疫使其后代免受病毒的感染,且对三种病毒均有效(图 3)。与之相比,三价 VP1 蛋白疫苗只在 EV71 病毒感染时表现出明显的保护作用;5 μg 的

VP1 蛋白剂量(CV-5)的保护效果最为显著,其乳鼠的死亡率为 0;临床评分在感染后 3 ~ 10 d 之间有短期的上升,而到第 11 天即恢复正常;乳鼠的体重也接近于 PC 组;在抑制病毒复制方面,CV-5 组的乳鼠血液和肌肉组织中的病毒载量也显著降低。三价 VP1 蛋白疫苗虽然激活了母鼠体内对 CA16 和 CA10 的病毒特异性体液免疫和细胞免疫,但这些免疫反应并未给乳鼠提供免疫保护作用,从生存率、临床评分到病毒载量都没有显著改善。对三种病毒的不同反应,说明三价 VP1 蛋白疫苗提供的免疫保护作用存在病毒差异,这可能是不同病毒 VP1 蛋白免疫原特性存在差异。

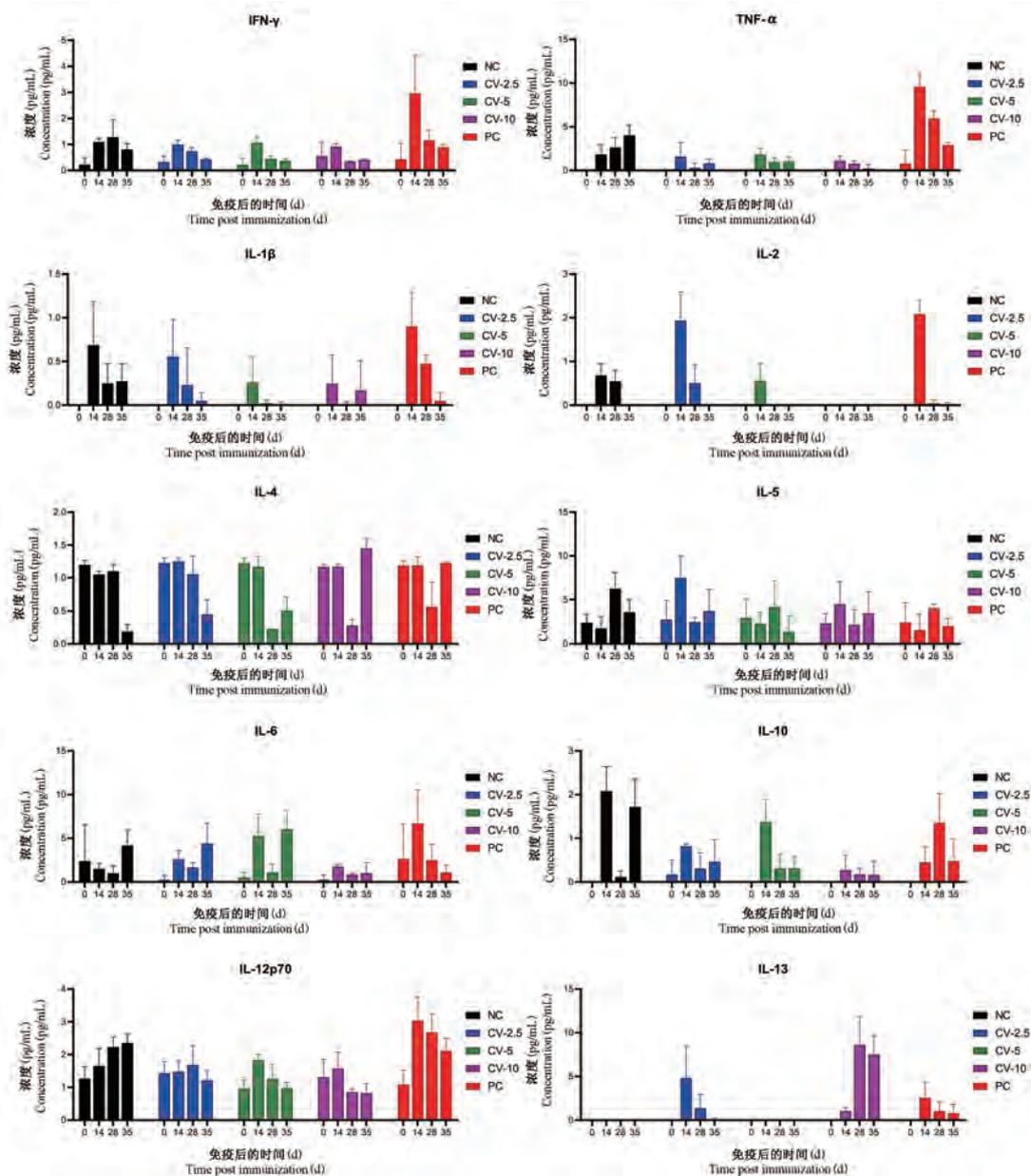
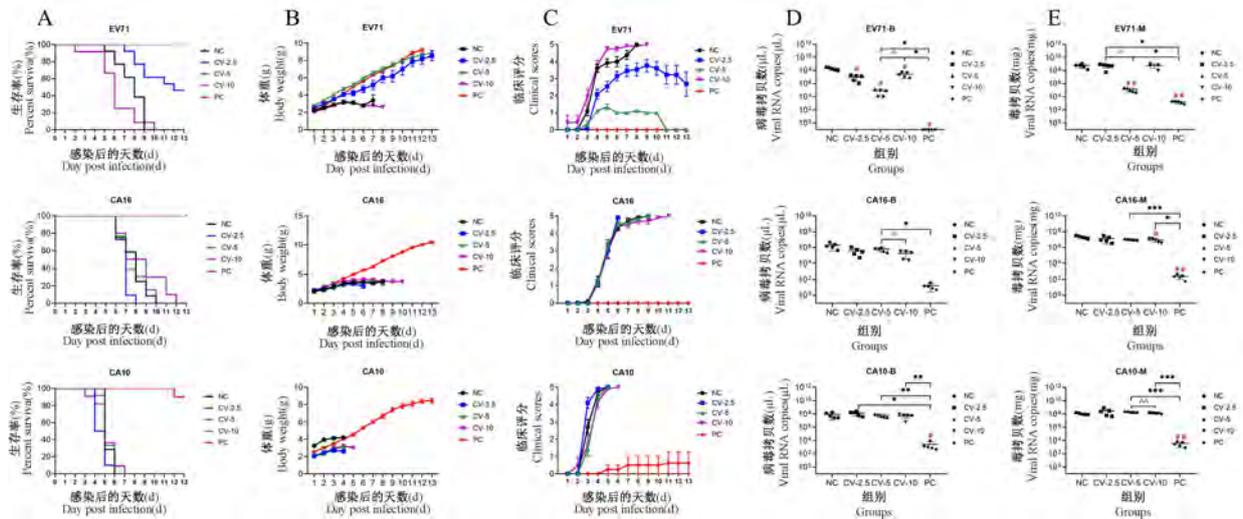


图 2 三价 VP1 蛋白疫苗免疫血清中细胞因子变化情况 (n=4)

Figure 2 Changes of cytokines in the immune serum of trivalent VP1 protein vaccine (n=4)



注:A:1日龄小鼠感染LD<sub>50</sub>病毒生存率变化结果,每种病毒感染乳鼠数量n=10;B:1日龄小鼠感染LD<sub>50</sub>病毒体重变化结果,每种病毒感染乳鼠数量n=10;C:1日龄小鼠感染LD<sub>50</sub>病毒临床评分结果,每种病毒感染乳鼠数量n=10;D:1日龄小鼠感染LD<sub>50</sub>病毒濒死时血液病毒载量结果,每种病毒感染乳鼠数量n=5;E:1日龄小鼠感染LD<sub>50</sub>病毒濒死时肌肉病毒载量结果,每种病毒感染乳鼠数量n=5;与CV-5组相比,ΔP<0.05,ΔΔP<0.01;与PC组相比,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001;与NC组相比,#P<0.05,##P<0.01。

图3 三价VP1蛋白疫苗对新生乳鼠的免疫保护作用

Note. A. Results of the survival rate of 1-day-old mice infected with LD<sub>50</sub> virus, the number of neonatal mice infected by each virus was n=10. B. Results of the body weight changes of 1 d mice infected with LD<sub>50</sub> virus, the number of neonatal mice infected by each virus was n=10. C. Results of clinical scoring of 1 d mice infected with LD<sub>50</sub>, the number of neonatal mice infected by each virus was n=10. D. Results of blood viral load when 1 d old mice were infected with LD<sub>50</sub> virus and were dying, the number of neonatal mice infected by each virus was n=5. E. Results of muscle viral load when 1 d old mice were infected with LD<sub>50</sub> virus and were dying, the number of neonatal mice infected by each virus was n=5. Compared with the CV-5 group, ΔP<0.05, ΔΔP<0.01. Compared with the PC group, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. Compared with the NC group, #P<0.05, ##P<0.01.

Figure 3 Immunoprotective effect of trivalent VP1 protein vaccine on neonatal mice

### 3 讨论

预防性疫苗一直是防止传染性疾病流行的重要手段,手足口病疫苗的研发也一向是我国疫苗研究的重要方向。目前,我国已上市了三种针对EV71病毒C4亚型的灭活疫苗,分别由中国医学科学院医学生物研究所、北京科兴生物制品有限公司和武汉生物制品研究所研发和生产,临床数据也证实了这些疫苗的有效性和安全性<sup>[14-18]</sup>。但是EV71疫苗只针对EV71感染有中和活性,对其他肠道病毒并无显著的交叉反应,而作为多病原的手足口病还需要多价疫苗来实现更广泛的保护作用。因此,近些年对于二价、三价、四价的手足口疫苗的研究越来越多,涉及的病毒包括流行最为广泛且具有高重症率的EV71、CA16、CA10和CA6病毒;疫苗类型常采用灭活病毒疫苗、重组病毒样颗粒(virus-like particle, VLP)疫苗、多肽疫苗等<sup>[19-20,23-24,28-29]</sup>。根据文献报道并结合前期工作,发现肠道病毒的VP1

蛋白含有病毒重要的抗原决定簇<sup>[21-22,30-31]</sup>,因此合成了EV71、CA16和CA10病毒的VP1蛋白作为疫苗的候选蛋白,按照低剂量(2.5 μg, CV-2.5)、中剂量(5 μg, CV-5)和高剂量(10 μg, CV-10)对ICR小鼠进行3次免疫,并以灭活病毒疫苗作为阳性对照(PC)、以生理盐水作为阴性对照(NC)。

从疫苗免疫后血清的抗体检测结果看来,三价VP1蛋白疫苗能够持续性的诱导机体产生VP1蛋白特异的IgG、IgM抗体和病毒特异的IgG、IgM抗体,并且这些抗体对病毒具有中和活性,其中对EV71和CA10病毒的中和能力较强;不过蛋白疫苗抗体的中和活性仍弱于灭活病毒疫苗,两者中和抗体滴度相差约4倍。除了诱导病毒特异性体液免疫反应,三价VP1蛋白疫苗也能激活病毒特异的T细胞反应,其中对EV71病毒的反应最为明显。通过检测免疫小鼠脾细胞中病毒特异的IFN-γ分泌T细胞,我们发现CV-5蛋白疫苗组具有有效、稳定的T细胞免疫反应,对三种病毒的刺激都能产生显著反

应。从这些体外实验的结果可见,三价 VP1 蛋白疫苗既能诱导机体产生病毒特异的抗体,又能活化病毒特异的 T 细胞反应,其中中剂量的 VP1 蛋白效果最佳。

除了疫苗的有效性,安全性也是疫苗关注的另一个重要方面。在临床上,手足口患儿、尤其是重症病人血液和脑脊液中能检测到高水平的促炎细胞因子,例如 IFN- $\gamma$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ;因此经常将促炎因子与病程重症性联系在一起<sup>[25-26]</sup>。通过检测 10 种主要的、与炎症反应相关的细胞因子在免疫血清中的水平,发现除了 IL-2 和 IL-13 其他细胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12p70)在蛋白疫苗免疫后并未发生显著变化。而 IL-2 只有短暂的上升,35 d 时已恢复到免疫前的水平;IL-13 是唯一在 35 d 时表达水平仍处于高位的细胞因子,其作用常与 IL-4 联系在一起,具有抑制炎症反应的作用<sup>[32]</sup>。另外,在小鼠免疫后的日常观察中也未发现蛋白疫苗组小鼠的异常,这些结果提示三价 VP1 蛋白疫苗具有良好的安全性。

与已上市的三家 EV71 灭活疫苗相比<sup>[33]</sup>,在动物实验中三价 VP1 蛋白疫苗对 EV71 保护有效性方面略低于灭活疫苗,但在中和抗体滴度方面三价 VP1 蛋白疫苗表现出了对 CA16、CA10 的保护作用,体现出了三价 VP1 蛋白疫苗的优势。

对于三价 VP1 蛋白疫苗的体内功能,本文利用了乳鼠感染模型。免疫后母鼠的母源抗体通过乳汁转移到新生乳鼠中,观察乳鼠对病毒感染的抵抗能力可以判断蛋白抗体的免疫保护作用<sup>[28-29]</sup>,灭活疫苗的这种被动免疫保护作用非常显著。根据存活率、临床评分、乳鼠体重、以及血液和肌肉组织中病毒载量的数据,发现三价 VP1 蛋白疫苗对乳鼠的被动免疫保护作用只针对 EV71 感染有效,VP1 蛋白免疫剂量为 5  $\mu\text{g}$  时不仅能使乳鼠全部存活,而且能够有效抑制 EV71 病毒的复制。但是,VP1 蛋白疫苗对 CA16 和 CA10 并未表现出足够的免疫活性,未能使乳鼠对这两种病毒的感染产生抵抗能力。综上所述,三价 VP1 蛋白疫苗能够诱导产生病毒特异的中和性 IgG、IgM 抗体,同时能激活病毒特异的 T 细胞免疫反应;中剂量的 VP1 蛋白可达到稳定的免疫效果;此外,蛋白疫苗免疫并未造成炎症细胞因子的剧烈变化,其安全性也得到了证实;从而表明三价 VP1 蛋白疫苗对开发手足口多价疫苗具有一定的启示性。但是,蛋白疫苗的免疫活性仍低于

灭活病毒疫苗,尤其对乳鼠的免疫保护作用只发生在 EV71 感染时,对其它两种病毒保护作用较低。这些缺陷说明:对于 CA16 和 CA10 病毒,简单的 VP1 蛋白并不能提供有效的免疫原性,有必要结合其他免疫决定簇,以形成更为完善的蛋白疫苗。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Huang MC, Wang SM, Hsu YW, et al. Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brainstem encephalitis in children [J]. *Pediatrics*, 2006, 118(6): e1785-e1788.
- [2] Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4): 308–318.
- [3] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1): 91–107.
- [4] Wang Y, Feng Z, Yang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility [J]. *Epidemiology*, 2011, 22(6): 781–792.
- [5] 陈鑫, 赵彬彬, 武婧, 等. 通过遗传多样性小鼠筛选 EV71 致病相关基因 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 8–13, 44.  
Chen X, Zhao BB, Wu J, et al. Screening of EV71 pathogenic related genes using genetic diversity mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(6): 8–13, 44.
- [6] Yin DQ, Wang CB, Wang CB, et al. Epidemiology characteristics of human coxsackievirus A16 and enterovirus 71 circulating in linyi, China, from 2009 to 2017 [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2018, 71(6): 470–473.
- [7] Wang SM, Liu CC. Update of enterovirus 71 infection: epidemiology, pathogenesis and vaccine [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014, 12(4): 447–456.
- [8] 胡跃华, 肖革新, 郭莹, 等. 2008–2011 年中国大陆手足口病流行特征分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 18(8): 693–697, 747.  
Hu YH, Xiao GX, Guo Y, et al. The epidemic features of the hand, foot, and mouth disease during 2008–2011 in China [J]. *Chin J Dis Control Prevent*, 2014, 18(8): 693–697, 747.
- [9] 曹洋, 洪志恒, 金连梅, 等. 2011–2012 年全国手足口病疫情监测分析 [J]. *疾病监测*, 2013, 28(12): 975–980.  
Cao Y, Hong ZH, Jin LM, et al. Surveillance of hand foot and mouth disease in China, 2011–2012 [J]. *Dis Surveill*, 2013, 28(12): 975–980.
- [10] 张英杰, 王超, 曹凯, 等. 中国大陆 2008–2010 年手足口病流行特征聚类分析 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(5): 541–544.  
Zhang YJ, Wang C, Cao K, et al. Epidemic characteristics of hand, foot and mouth disease in mainland China, 2008–2010: a cluster analysis [J]. *Chin J Publ Heal*, 2015, 31(5): 541–544.
- [11] 张璐茹, 蔡源益, 王爱, 等. 2014 年至 2016 年全国手足口病

- 发病季节高峰的圆形分布分析 [J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(6): 524-526, 531.
- Zhang JR, Cai YY, Wang A, et al. Analysis of the seasonal characteristics of hand-foot-and-mouth disease in China from 2014 to 2016, based on circular distribution [J]. J Chin Med Univ, 2017, 46(6): 524-526, 531.
- [12] 彭婉君, 赵彬彬, 武婧, 等. 利用遗传多样性小鼠资源筛选 CA16 致病相关基因 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 180-186.
- Peng WJ, Zhao BB, Wu J, et al. Screening of CA16 pathogenicity-related genes using genetic diversity mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 180-186.
- [13] 常昭瑞, 刘凤凤, 吕斌, 等. 2017 年 1-5 月全国手足口病疫情形势分析 [J]. 疾病监测, 2017, 32(6): 447-452.
- Chang ZR, Liu FF, Lyu B, et al. Analysis on surveillance data of hand, foot and mouth disease in China, January-May 2017 [J]. Dis Surveillance, 2017, 32(6): 447-452.
- [14] Mao Q, Wang Y, Bian L, et al. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases [J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5(7): e75.
- [15] Jin P, Li J, Zhang X, et al. Validation and evaluation of serological correlates of protection for inactivated enterovirus 71 vaccine in children aged 6-35 months [J]. Hum Vaccin Immunother, 2016, 12(4): 916-921.
- [16] Wei M, Meng F, Wang S, et al. 2-Year efficacy, immunogenicity, and safety of vigoo enterovirus 71 vaccine in healthy Chinese children: a randomized open-label study [J]. J Infect Dis, 2017, 215(1): 56-63.
- [17] Zhu W, Jin P, Li JX, et al. Correlates of protection for inactivated enterovirus 71 vaccine: the analysis of immunological surrogate endpoints [J]. Expert Rev Vaccines, 2017, 16(9): 945-949.
- [18] Hu Y, Zeng G, Chu K, et al. Five-year immunity persistence following immunization with inactivated enterovirus 71 type (EV71) vaccine in healthy children: a further observation [J]. Hum Vaccin Immunother, 2018, 14(6): 1517-1523.
- [19] Anasir MI, Poh CL. Advances in antigenic peptide-based vaccine and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1256.
- [20] Fang CY, Liu CC. Recent development of enterovirus A vaccine candidates for the prevention of hand, foot, and mouth disease [J]. Expert Rev Vaccines, 2018, 17(9): 819-831.
- [21] Liu JN, Wang W, Duo JY, et al. Combined peptides of human enterovirus 71 protect against virus infection in mice [J]. Vaccine, 2010, 28(46): 7444-7451.
- [22] Foo DG, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides [J]. Virus Res, 2007, 125(1): 61-68.
- [23] Fan S, Liao Y, Jiang G, et al. Study of integrated protective immunity induced in rhesus macaques by the intradermal administration of a bivalent EV71-CA16 inactivated vaccine [J]. Vaccine, 2020, 38(8): 2034-2044.
- [24] Zhang W, Dai W, Zhang C, et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 94.
- [25] Wang SM, Lei HY, Huang KJ, et al. Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema [J]. J Infect Dis, 2003, 188(4): 564-570.
- [26] Wang SM, Lei HY, Su LY, et al. Cerebrospinal fluid cytokines in enterovirus 71 brain stem encephalitis and echovirus meningitis infections of varying severity [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(7): 677-682.
- [27] Liu L, Zhang Y, Wang J, et al. Study of the integrated immune response induced by an inactivated EV71 vaccine [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54451.
- [28] Caine EA, Fuchs J, Das SC, et al. Efficacy of a trivalent hand, foot, and mouth disease vaccine against enterovirus 71 and coxsackieviruses A16 and A6 in mice [J]. Viruses, 2015, 7(11): 5919-5932.
- [29] Liu CC, Guo MS, Wu SR, et al. Immunological and biochemical characterizations of coxsackievirus A6 and A10 viral particles [J]. Antiviral Res, 2016, 129: 58-66.
- [30] Shi J, Huang X, Liu Q, et al. Identification of conserved neutralizing linear epitopes within the VP1 protein of coxsackievirus A16 [J]. Vaccine, 2013, 31(17): 2130-2136.
- [31] Liu CC, Chou AH, Lien SP, et al. Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of Enterovirus 71 [J]. Vaccine, 2011, 29(26): 4362-4372.
- [32] McCormick SM, Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling [J]. Cytokine, 2015, 75(1): 38-50.
- [33] 高帆, 苏瑶, 卞莲莲, 等. 肠道病毒 71 型灭活疫苗免疫原性比较 [J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(7): 673-677, 684.
- Gao F, Su Y, Bian LL, et al. Comparative analysis of immunogenicity of inactivated enterovirus 71 vaccine [J]. Chin J Biol, 2017, 30(7): 673-677, 684.

[收稿日期] 2021-02-11

张译心,王鑫,刘博,等. 2型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 219-229.

Zhang YX, Wang X, Liu B, et al. Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi - Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 219-229.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.012

## 2型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立

张译心<sup>1,2</sup>, 王鑫<sup>1</sup>, 刘博<sup>1</sup>, 纪凤兰<sup>1</sup>, 温富春<sup>1</sup>, 丁涛<sup>1</sup>, 徐惠波<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省中医药科学院, 长春 130012; 2. 长春中医药大学, 长春 130117)

**【摘要】** 目的 建立2型糖尿病气阴两虚型病证结合动物模型及评价指标。方法 SD大鼠48只随机分为空白组、病证模型组和高糖高脂组,空白组喂饲普通饲料,其余两组喂饲高脂饲料。饲养4周后,病证模型组大鼠禁食12h腹腔注射链脲佐菌素(STZ)40mg/kg,1周后测定大鼠空腹血糖值大于11.1mmol/L视为糖尿病造模成功,继续饲养至14周试验结束。监测大鼠体征变化及各项实验室指标。结果 与空白组比较,病证模型组大鼠第8~14周精神、运动评分均显著升高( $P < 0.01$ ),体重从第4周开始显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),进食量和饮水量均从第8周开始显著增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),抓力从第12周开始显著降低( $P < 0.01$ ),第6~14周的随机血糖、空腹血糖均显著升高( $P < 0.01$ ),尿糖检测结果均显著升高( $P < 0.01$ ),呼吸频率、脉搏幅度、舌象值、PT、APTT、胸腺指数、CD4、CD4/CD8值均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),TC、TG、LDL-C、cAMP、cAMP/cGMP值均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),病理结果显示胰岛组织损伤严重,功能明显下降。结论 采用高糖高脂喂养大鼠4周后腹腔注射STZ40mg/kg,继续饲养至14周可制备2型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型,通过对大鼠进食量、饮水量的测定,运动、精神状态的评分,抓力、呼吸、脉搏、舌象等体征信息的采集,PT、APTT、TC、TG、LDL-C、cAMP、cAMP/cGMP、CD4、CD4/CD8及胸腺指数等指标的检测,结合胰腺组织的病理改变等可较好的反映该模型的证候特点。

**【关键词】** 糖尿病;气阴两虚;病证结合;体征;模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0219-11

### Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi - Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index

ZHANG Yixin<sup>1,2</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>1</sup>, JI Fenglan<sup>1</sup>, WEN Fuchun<sup>1</sup>, DING Tao<sup>1</sup>, XU Huibo<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130012, China.

2. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117)

Corresponding author: XU Huibo. E-mail: xhb\_6505@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish an animal model of type 2 diabetes with deficiency of Qi and Yin, and its evaluation index. **Methods** Forty-eight Sprague Dawley rats were randomly divided into blank, disease and syndrome model, and high sugar and fat groups. The blank group was fed an ordinary diet, whereas the other two groups were fed a high fat diet. After 4 weeks of feeding, rats in the disease model group were fasted for 12 h and then injected with 40 mg/kg

**【基金项目】** 国家重大新药创制专项(2018ZX09711001-009-005)。

Funded by National Major New Drug Innovation and Production Project(2018ZX09711001-009-005).

**【作者简介】** 张译心(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:动物模型的制备。Email: zyx\_1942@163.com

**【通信作者】** 徐惠波(1963—),女,主任药师,硕士生导师,研究方向:中药基础及应用开发。Email: xhb\_6505@163.com

streptozotocin intraperitoneally. After 1 week, the fasting blood glucose level of the rats was measured, and a fasting blood glucose level of  $>11.1$  mmol/L was considered to be successful modeling of diabetes. The rats were continued to be fed until the end of the experiment at 14 weeks. Changes in rat physical signs and various laboratory indexes were monitored.

**Results** Compared with those of rats in the blank group, the mental and motor scores of rats in the disease and syndrome model group were increased significantly at weeks 8~14 ( $P < 0.01$ ). The weight of rats was decreased significantly from week 4 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), food intake and water intake were increased significantly from week 8 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and grip strength was significantly decreased from week 12 ( $P < 0.01$ ). At weeks 6~14, both random and fasting blood glucose were increased significantly, and urine sugar was increased significantly ( $P < 0.01$ ). The respiratory rate, pulse amplitude, and tongue values, PT, APTT, thymus index, and CD4 and CD4/CD8 values were reduced significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). TC, TG, LDL-C, cAMP, and cAMP/cGMP values were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Pathological result showed that islet tissue was seriously damaged, and its function was reduced significantly.

**Conclusions** Rats fed with high glucose and fat for 4 weeks were intraperitoneally injected with 40 mg/kg streptozotocin and further fed with high glucose and fat for 14 weeks to prepare an animal model of type 2 diabetes combined with Qi and Yin deficiency. Food intake, water intake, movement score, mental state score, grasping ability, respiration, pulse, tongue image and other information were collected. PT, APTT, TC, TG, LDL-C, cAMP, cAMP/cGMP, CD4, CD4/CD8 and thymus index were detected. Combined with pathological changes of pancreatic tissue, the syndrome characteristics of this model could be well reflected.

**【Keywords】** diabetes; Qi and Yin deficiency; combination of disease and syndrome; characterization; model

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

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以糖脂代谢紊乱为特征的慢性代谢病,属于中医“消渴”范畴,临床上可将 2 型糖尿病分为气阴两虚证、阴阳两虚证、血瘀气滞证和阴虚热盛证 4 个证型<sup>[1-2]</sup>。为了在基础研究中实现对糖尿病的不同证型进行对症治疗,以更好地了解并诠释中药治疗的机制,采用“拟临床研究”的原则制备病证结合动物模型不失为一种较好的研究方法之一。病证结合动物模型的建立,一方面可为临床治疗提供可靠有效的实验依据,从而进一步了解临床疾病的发生发展规律;另一方面,它既能反映中医证候特点,又能体现疾病的病理变化,与单一疾病模型比较,在研究中药作用时能更充分地突显传统医学对疾病治疗的优势<sup>[3-4]</sup>。本文通过高糖高脂喂养结合腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制备 2 型糖尿病气阴两虚证大鼠模型,通过采集大鼠体征变化和实验室指标,对气阴两虚证大鼠模型进行评价,为 2 型糖尿病气阴两虚证模型的评价标准的建立提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

48 只健康 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体重( $160 \pm 10$ )g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK(辽)-2020-0001】,饲养于吉林省中医药科

学研究院屏蔽环境动物室【SYXK(吉)2020-0009】,室温 18 ~ 25℃,相对湿度 50% ~ 60%,每天 12 h 光照,12 h 黑暗循环,大鼠适应性饲养 1 周,用于实验。本实验经过吉林省中医药科学院动物伦理委员会批准实施(伦理审批号:JLSZKYDWLL2019-001)。

#### 1.1.2 饲料

高糖高脂 KK 饲料购自北京华阜康生物科技股份有限公司,维持饲料购自辽宁长生生物技术股份有限公司。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

链脲佐菌素(Sigma 公司, WXBC7268 V),柠檬酸(北京化工厂, 20150925),柠檬酸钠(北京化工厂, 20180103),肝素钠(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 151809086A),甲醛(天津市北联精细化学品开发有限公司, 20170305)葡萄糖试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 193691),cAMP、cGMP 试剂盒(美国 RD 公司, 201912),CD4、CD8 试剂盒(美国 RD 公司, 202006)。

BGM506 型血糖仪(深圳市家康科技有限公司, 中国),HS11 型数码相机(富士公司, 日本),PowerLab/8S 型多导生物记录仪(AD Instruments, 日本),ELx800 型酶标仪(BioTek Instruments Inc, 美国),GF-D800 型半自动生化分析仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司, 中国),CS-600B 型全自动生化

分析仪(长春迪瑞实业有限公司,中国),YLS-13 A 型大鼠抓力测定仪(山东省医学科学院济南益延科技发展有限公司,中国),DT5-3 型低速台式自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司,中国),Leica RM2255 型石蜡切片机(Leica,德国),Leica EG1140 型石蜡包埋机(Leica,德国),OlympusBX51 型光学显微镜(Olympus,日本),NIS-ELEMENT BR 型图像分析系统(NIKON,日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模

SD 大鼠 48 只随机分为空白组(A 组 12 只)、病证模型组(B 组 20 只)和高糖高脂组(C 组 16 只),A 组喂饲普通饲料,其余两组喂饲高脂饲料。饲养 4 周后,B 组大鼠禁食 12 h 以 40 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ(在 4℃ 冰浴中,以 0.1 mol/L 浓度 pH=4.4 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液新鲜配制),A 组和 C 组腹腔注射同体积柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。注射 1 周后测定 B 组大鼠空腹血糖,空腹血糖值大于 11.1 mmol/L 即视为糖尿病造模成功,继续饲养至 14 周试验结束。

1.2.2 模型评估标准

《中药新药临床研究指导原则》中 2 型糖尿病气阴两虚证候表现如下:咽干口渴、倦怠乏力、多食

易饥、口渴喜饮、气短懒言、舌红少津液、脉细数无力<sup>[5]</sup>。以气阴两虚证候的临床表现为依据,设计“大鼠体征采集表”,采集相关指标作为模型评价标准(见表 1,2)。

1.2.3 大鼠一般状态

每周观察大鼠体征变化,对照评分表记录每只大鼠的运动、精神状态的分值,分值越高,运动、精神状态越差,表明大鼠体征越符合气阴两虚证候表现。

1.2.4 体重、进食量、饮水量测定

每周称量大鼠体重,记录大鼠 24 h 进食量和饮水量 1 次,进食量=(每笼饲料添加量-24 h 后饲料剩余量)/每笼动物只数,饮水量=(每笼饮水添加量-24 h 后饮水剩余量)/每笼动物只数。

1.2.5 抓力测定

每 4 周测定 1 次:先用右手将大鼠按放在抓力板上,左手向前推抓力板,然后右手滑至鼠尾部,左手松开抓力板,待大鼠用力抓住抓力板时,及时加力后拉,以得到最大抓力,各组每只大鼠连续测量 3 次,取平均值。

1.2.6 呼吸、脉搏测定

于实验第 14 周测定大鼠呼吸、脉搏:大鼠麻醉状态下背部朝上放在置于桌面上(自然俯卧状态),

表 1 大鼠体征采集表

Table 1 Evaluation criteria for collecting rat signs

临床表现 Clinical manifestations	大鼠体征 Rat signs	评价指标 Evaluation index
咽干口渴、口渴喜饮 Pharynx dry mouth dry, thirsty like drink	饮水情况 Drinking state	饮水量 Amount of drinking water
倦怠乏力 Tired and weak	精神状态、抓力 Mental state, grip	精神状态评分、抓力强度 Mental state score, grip strength
多食易饥 Eat a lot and get hungry easily	进食情况 Eating state	进食量 Food intake
气短懒言 Short of breath, not very talkative	呼吸、运动情况 Respiratory and exercise conditions	呼吸频率、运动状态评分 Respiratory rate and exercise status score
舌红脉细 Red tongue, thin veins	舌象、脉象 Tongue and pulse	舌体颜色、脉搏幅度 Tongue color, pulse amplitude

表 2 运动、精神状态评分表

Table 2 A rating scale for state of motion and state of mind

评分 Score	运动状态 Motion state	精神状态 Mental state
0 分 0 points	活跃,轻微声响即抬头 Activity, even the slightest sound, caused the rats to raise their heads	正常 Normal
1 分 1 point	行动迟缓,声响加重才抬头 Rats were slow to move, and the sound made the rats louder before they raised their heads	呆滞 Dull
2 分 2 points	对声响无反应,抓起再放下后无行动 No response to sound, pick up and then put down after no action	萎靡 Listlessness

将呼吸传感器的压力带自然平铺在于大鼠背腹部上;将脉搏传感器对准大鼠尾根处的静脉血管,缠绕压力带时注意力度适中,连接多导生理记录仪,使用 Lab Chart7 软件记录各组大鼠的呼吸频率及脉搏幅度。

#### 1.2.7 舌象分析

于实验第 14 周采集大鼠舌象信息:大鼠麻醉状态下,轻背位固定,皮筋牵拉大鼠口腔,使舌体自动暴露,数码相机关闭闪光灯,近景拍摄模式下,将大鼠舌面与标准色卡对照拍摄。分析采用 Photoshop 7.0 软件,设定色阶:黑色:L:22, a:0, b:0;灰色:L:58, a:0, b:0;白色:L:93, a:0, b:0。使用套圈工具,选定舌面(从舌尖到舌面中部),利用 Photoshop 7.0 软件中“直方图”工具,计算该区域的红色值(R 值)、绿色值(G 值)、蓝色值(B 值)。R、G、B 值均为 0 时为纯黑色,均为 255 时为纯白色,提示舌象 R、G、B 值减小,表明舌体颜色越暗,越接近纯黑色,血瘀证时舌体颜色呈暗紫色<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.8 血糖测定

从第 4 周开始,每隔 1 周测定 1 次大鼠的随机血糖、空腹血糖(禁食 12 h),尾静脉采血,采用血糖仪测定血糖值。

#### 1.2.9 尿糖检测

于实验第 8、12、14 周,每组随机选取 10 只大鼠,收集尿液,进行尿糖检测。

#### 1.2.10 糖耐量测定

实验第 14 周最后 1 d,每组随机选取 8 只大鼠禁食 12 h,灌胃葡萄糖溶液(2 g/kg),尾静脉取血,测定大鼠服糖后 0、30、60、120 min 的血糖值,绘制糖耐量曲线。采用近似梯形法计算口服糖耐量试验过程中血糖曲线下面积(area under curve, AUC)。

#### 1.2.11 凝血功能检测

实验结束,大鼠腹腔麻醉,每组随机选取 8 只大鼠,腹主动脉取血 0.5 mL,3.8%柠檬酸钠抗凝,全自动生化分析仪进行活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)检测。

#### 1.2.12 血清 TC、TG、LDL-C 指标检测

每组随机选取 8 只大鼠,腹主动脉取血,全自动生化分析仪分析胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)。

#### 1.2.13 血清 cAMP、cGMP 含量测定及 cAMP/cGMP 计算

每组随机选取 8 只大鼠,腹主动脉取血,分离血

清,-80℃保存备用。用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中环腺苷酸(cAMP)、环鸟苷酸(cGMP)的含量,并计算 cAMP/cGMP 值。

#### 1.2.14 血清 CD4、CD8 含量测定及 CD4/CD8 计算

每组随机选取 8 只大鼠,腹主动脉取血,分离血清,-80℃保存备用。用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中环腺苷酸(cAMP)、环鸟苷酸(cGMP)的含量,并计算 cAMP/cGMP 值。

#### 1.2.15 胸腺指数测定

每组随机选取 8 只大鼠,称量大鼠麻醉前体重,腹主动脉取血,称取胸腺重量,计算胸腺指数,胸腺指数=胸腺重量/体重×100%。

#### 1.2.16 胰腺组织 HE 染色观察

每组随机选取 8 只大鼠,摘取胰腺,将其固定于 10%福尔马林溶液中,HE 染色,做光镜下胰腺组织形态学观察。

### 1.3 统计学分析

运用 SPSS 22.0 软件统计,数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学处理方法采用 SPSS 22.0 One-way ANOVA 最小显著性差异法(LSD)作两两比较,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般状态的观察

结果显示,第 0~14 周时 A 组大鼠精神状态良好、活跃好动、反应灵敏迅速;与 A 组比较,第 8~14 周 B 组大鼠精神、运动评分均显著升高( $P < 0.01$ ),从第 8 周开始精神、运动评分均逐渐升高,说明 B 组大鼠精神状态逐渐由正常转为呆滞,行动逐渐变得迟缓,14 周时大鼠对外界刺激无反应或反应迟钝;C 组大鼠精神、运动评分与 A 组比较始终无显著性差异,表明大鼠精神状态良好,行动活跃(图 1)。

### 2.2 大鼠不同时间体重、进食量、饮水量测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠体重从第 4 周开始显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),进食量和饮水量均从第 8 周开始显著增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );C 组大鼠体重在第 14 周时显著增加,进食量在第 12 周时显著降低,饮水量在第 4、12 周时显著降低,均具有显著性差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )(图 2)。

### 2.3 大鼠不同时间抓力测定结果

结果显示,B 组大鼠第 0 周、4 周、8 周的抓力值与 A 组比较无显著性差异,从第 8 周开始抓力呈降

低趋势,第 12、14 周时大鼠抓力显著低于 A 组( $P < 0.01$ );C 组大鼠第 0、4、14 周的抓力与 A 组比较无显著性差异,第 8、12 周的抓力显著低于与 A 组( $P < 0.01$ )(图 3)。

### 2.4 大鼠呼吸频率和脉搏幅度测定结果

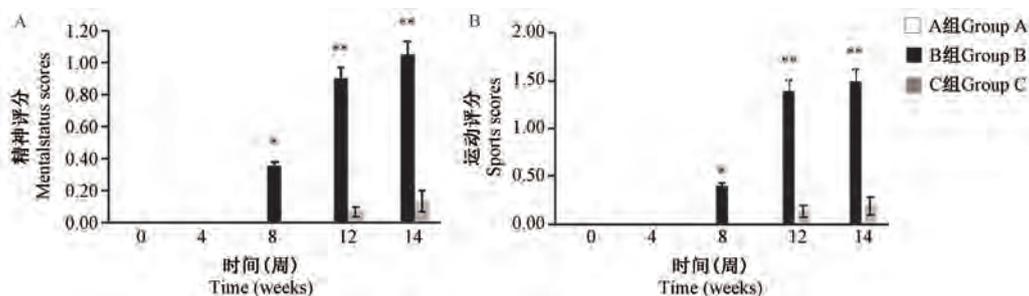
结果显示,从第 0 周开始至第 14 周,B 组大鼠呼吸频率逐渐减弱,第 14 周时呼吸频率显著低于 A 组( $P < 0.01$ );与 A 组比较,B 组大鼠脉搏幅度在第 8 周、14 周时显著降低( $P < 0.01$ )。C 组大鼠第 0 ~ 12 周时呼吸频率逐渐降低,第 14 周时升高,与 A 组比较始终无显著性差异;第 4 周时大鼠脉搏幅度降低,第 8 ~ 14 周保持不变,与 A 组比较,第 14 周时 C 组大鼠脉搏幅度显著高于 A 组( $P < 0.05$ )(图 4)。

### 2.5 大鼠舌象分析结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠舌象的 R、G、B 值均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );C 组大鼠舌象的 R 值显著低于 A 组( $P < 0.05$ ),G、B 值与 A 组比较无显著性差异(图 5)。

### 2.6 大鼠血糖测定结果

结果显示,第 4 周时(STZ 注射前),B 组大鼠的随机血糖、空腹血糖与 A 组比均无显著性差异;第 6 ~ 14 周,B 组大鼠的随机血糖、空腹血糖均显著高于 A 组( $P < 0.01$ )。与 A 组比,第 6 ~ 12 周时,C 组大鼠随机血糖显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );第 10 周时空腹血糖显著升高( $P < 0.05$ ),其余时间与 A 组大鼠空腹血糖比较均无显著性差异(图 6)。



注:与 A 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 大鼠一般状态评分观察

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

Figure 1 Observation of general status score of rats

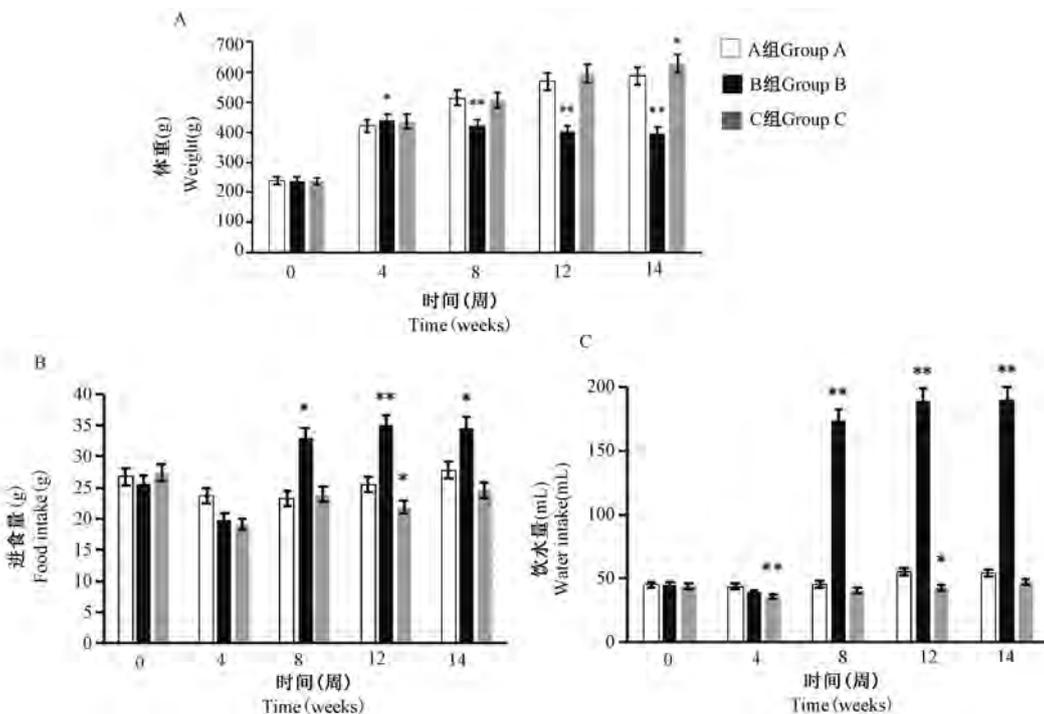


图 2 大鼠不同时间体重、进食量和饮水量测定结果

Figure 2 Measurement results of weight, food intake and water intake of rats at different times

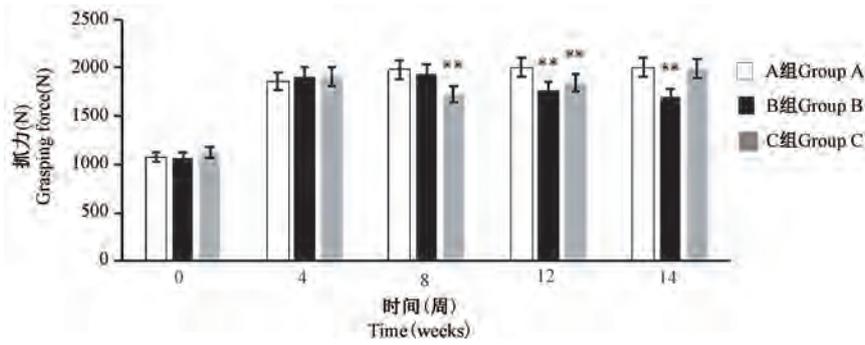


图 3 大鼠不同时间抓力测定结果

Figure 3 Grasping force measurement results of rats at different times

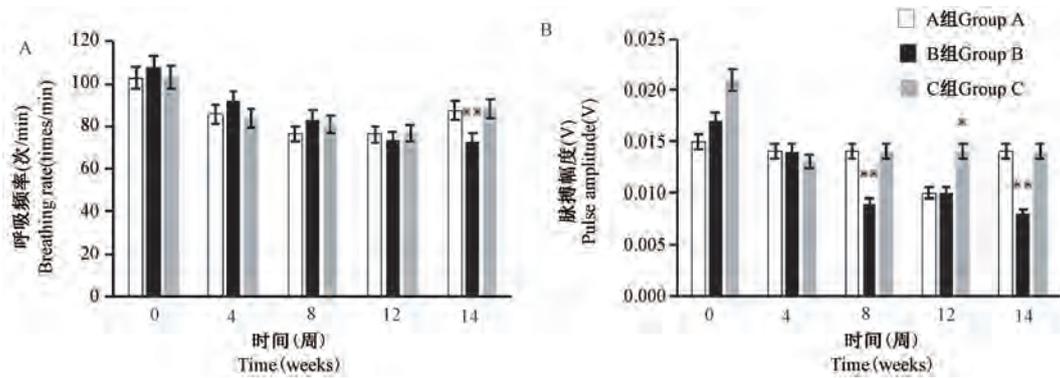


图 4 大鼠呼吸频率和脉搏幅度测定结果

Figure 4 Measurement results of respiratory rate and pulse amplitude in rats

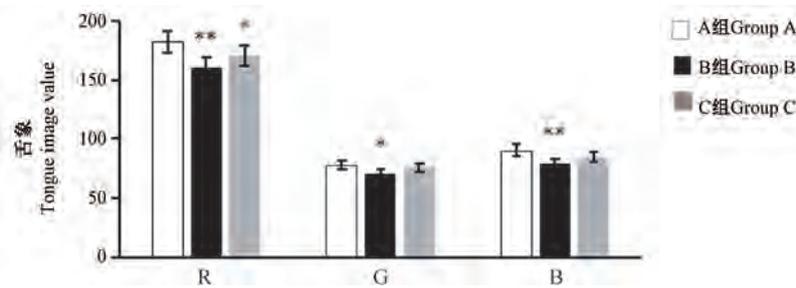


图 5 大鼠舌象分析结果

Figure 5 Analysis results of tongue image of rats

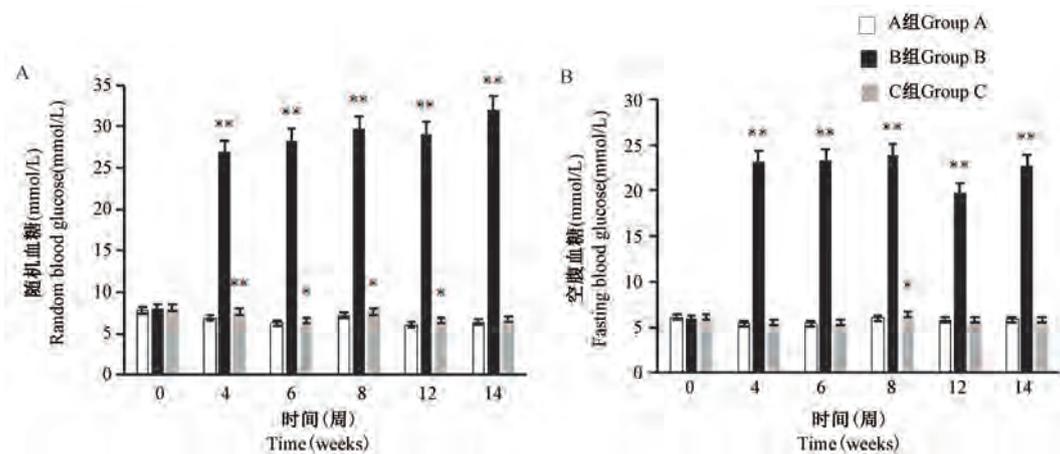


图 6 大鼠血糖测定结果

Figure 6 Measurement results of blood glucose in rats

### 2.7 大鼠尿糖检测结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠 3 次尿糖检测结果均显著升高( $P < 0.01$ );C 组大鼠 3 次尿糖检测结果与 A 组比较均无显著性差异(图 7)。

### 2.8 大鼠糖耐量测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠灌胃葡萄糖后各时间点血糖值均显著升高( $P < 0.01$ ),B 组 AUC 显著高于 A 组( $P < 0.01$ );C 组大鼠灌胃后 120 min 血糖值显著高于 A 组( $P < 0.01$ ),其余时间点的血糖值及 AUC 与 A 组比较均无显著性差异

(图 8)。

### 2.9 大鼠凝血功能指标测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠 PT、APTT 均显著减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),C 组大鼠 PT、APTT 均无显著性差异(图 9)。

### 2.10 大鼠血清 TC、TG、LDL-C 指标测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量均显著升高( $P < 0.01$ );C 组大鼠 TG 含量显著升高( $P < 0.01$ ),TC、LDL-C 含量无显著性差异(图 10)。

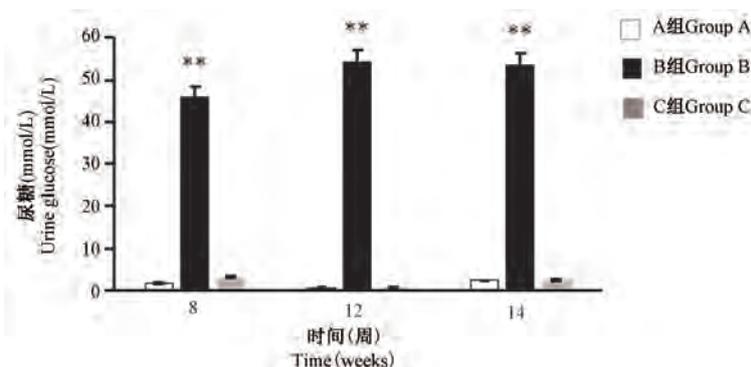


图 7 大鼠尿糖检测结果( $n = 8$ )

Figure 7 Urine glucose detection results of rats( $n = 8$ )

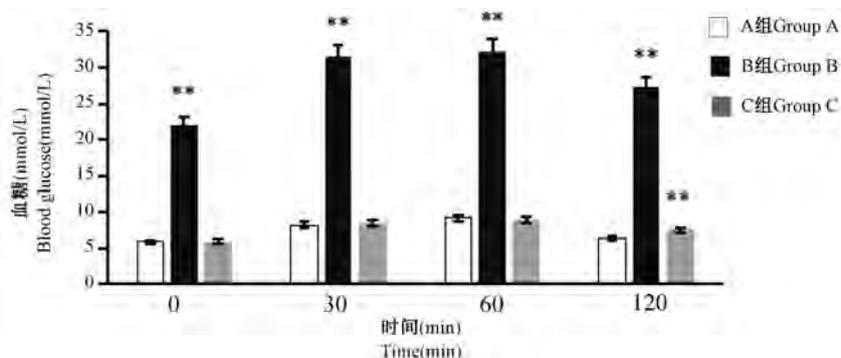


图 8 大鼠糖耐量测定结果( $n = 8$ )

Figure 8 Measurement results of glucose tolerance in rats( $n = 8$ )

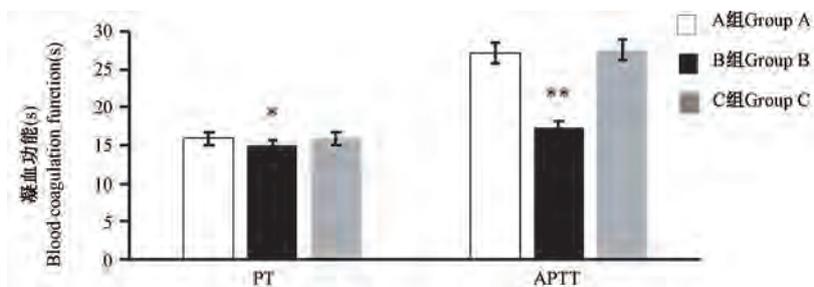


图 9 大鼠凝血功能指标测定结果( $n = 8$ )

Figure 9 Measurement results of coagulation function indexes in rats( $n = 8$ )

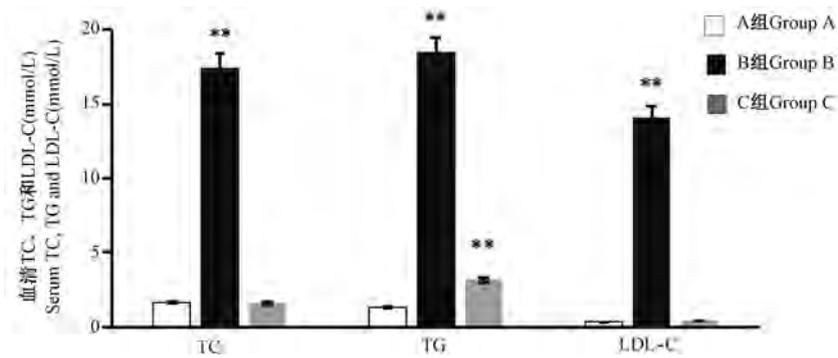


图 10 血清 TC、TG 和 LDL-C 指标测定结果( $n=8$ )

Figure 10 Measurement results of serum TC, TG and LDL-C indexes( $n=8$ )

### 2.11 大鼠血清 cAMP、cGMP 含量及 cAMP/cGMP 测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠血清中 cAMP 含量和 cAMP/cGMP 比值均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );C 组大鼠血清中 cGMP 含量显著低于 A 组,cAMP/cGMP 比值显著高于 A 组,均有显著性差异( $P < 0.01$ ) (图 11)。

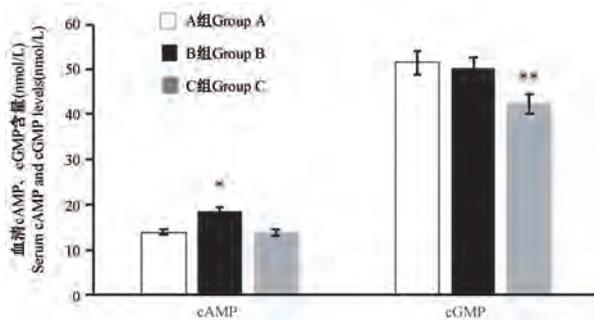


图 11 血清 cAMP、cGMP 含量测定结果( $n=8$ )

Figure 11 Determination of cAMP and cGMP in serum( $n=8$ )

### 2.12 大鼠血清 CD4、CD8 含量及 CD4/CD8 测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠血清中 CD4 含量和 CD4/CD8 比值均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );C 组大鼠血清中 CD4 含量显著降低( $P < 0.05$ ) (图 12)。

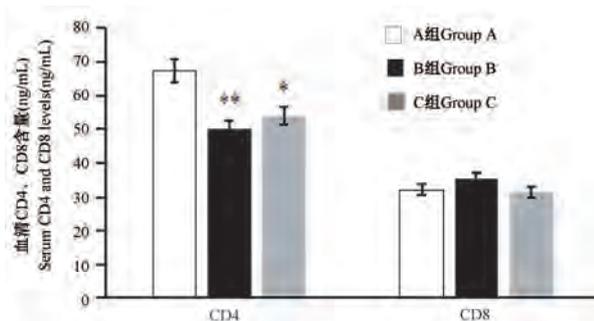


图 12 大鼠血清 CD4、CD8 含量测定结果( $n=8$ )

Figure 12 Determination of CD4 and CD8 in serum of rats( $n=8$ )

### 2.13 大鼠胸腺指数测定结果

结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠胸腺指数显著降低( $P < 0.01$ ),C 组大鼠胸腺指数无显著性差异(图 13)。

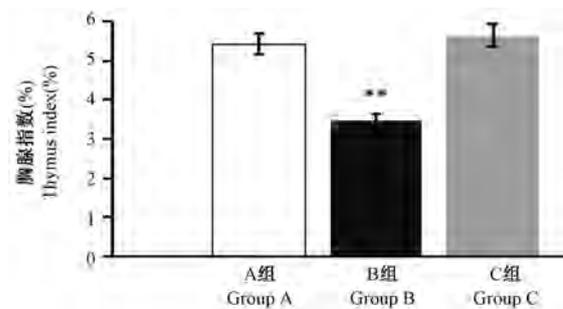


图 13 大鼠胸腺指数测定结果( $n=8$ )

Figure 13 Measurement results of thymus index in rats( $n=8$ )

### 2.14 大鼠胰腺组织 HE 染色结果

结果显示,A 组大鼠的胰腺组织内可见体积较大的胰岛组织,形态圆,分布数量较多,间质疏松;细胞胞浆充盈正常,未见细胞空泡变性,未见细胞固缩现象。

与 A 组比较,B 组大鼠胰腺组织内极少见到胰岛组织分布,胰岛数量显著减少;残存胰岛组织体积较小,其内细胞数量显著减少,细胞胞浆含量显著减少,可见细胞固缩现象,表明 STZ 导致动物胰腺内胰岛组织损伤,胰岛形态明显改变,功能明显下降。

与 A 组比较,C 组大鼠胰腺组织内胰岛数量显著增多,体积较大,形态圆,细胞胞浆丰富,胞浆量增多;少数胰岛细胞出现空泡变性,提示动物需要增强胰岛功能,增加胰岛细胞分泌量,以满足机体对胰岛所产内分泌激素的需求(图 14)。

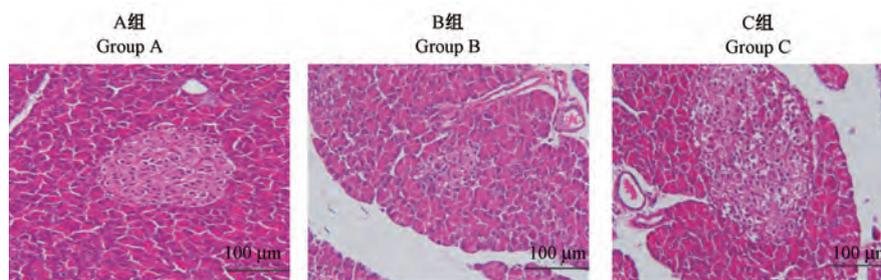


图 14 大鼠胰腺组织病理结果

Figure 14 Histopathological results of pancreas in rats

### 3 讨论

辨证施治是传统医学治病的精髓,如何在基础研究中突出中药的治疗特点一直是中药药效研究亟待解决的问题,病证结合动物模型及其评价方法的建立可以较好地解决这一问题。本文通过高糖高脂饲养结合腹腔注射链脲佐菌素制备 2 型糖尿病大鼠模型,根据《中药新药临床研究指导原则》中 2 型糖尿病气阴两虚证候的临床表现,我们尝试设计了相应的动物体征采集表,对动物在糖尿病发展过程中的症状、体征表现尽量做到定量客观化描述,以此建立一个可操作的 2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型及其评价标准。

中医临床通过“望闻问切”的方法对病证进行判断,本实验以模拟中医临床表现为原则,尝试将四诊法转换为大鼠体征的采集方法,并着重于望诊信息的采集。气阴两虚是糖尿病的核心病机,贯穿糖尿病病程发展的始末<sup>[7]</sup>。糖尿病患者饮食多肥厚油腻,易积食气滞,脾胃郁结,脾胃受损则无以消化精微,致体内运化失常,阴虚阳盛,阳气升而体内热,内热久积而伤阴,阴精亏虚而耗气,消渴日久,循环往复,耗气伤阴,致气阴两虚<sup>[8]</sup>。临床认为气阴两虚型 2 型糖尿病表现为咽干口渴,倦怠乏力,多食易饥,口渴喜饮,气短懒言,舌红少津液,脉细数无力;将临床表现与大鼠体征、评价指标及实验室指标相对应,通过记录客观指标,观察体征变化,对模型进行评价。

首先通过对动物一般状态进行评分反映大鼠运动、精神状态的变化特点,分值越高,动物一般状态越差,以此说明大鼠倦怠懒言的体征特点越明显;通过对抓力、呼吸、脉搏等进行测定,抓力值降低,说明大鼠出现乏力状态,呼吸、脉搏减弱,表明大鼠出现气短、脉细无力等体征改变。

舌象的观察。血液在脉络中的正常运行取决于体内气的充盈和推动,气虚不足则推力弱,致血流不畅;作为血液的载体,脉络还需要阴液的滋养,阴液缺乏会导致脉络阻滞,血液瘀阻,故气阴两虚日久生瘀。试验结果显示,与 A 组比较, B 组大鼠舌象的 R、G、B 值均显著降低, R、G、B 值减小,表明舌体颜色变暗;舌体颜色呈暗紫色,表现为瘀证。说明在模型制备过程中, B 组大鼠可能表现为气阴两虚夹瘀<sup>[9-11]</sup>。

进食量和饮水量的观察。中医临床气阴两虚具有咽干口渴、多食易饥、口渴喜饮的证候表现,我们通过监测进食饮水量来反映这种体征。试验显示, B 组的进食量、饮水量较 A 组显著增加,结合血糖、尿糖、糖耐量等糖尿病基础检测指标的测定,也可综合评价 2 型糖尿病气阴两虚证动物模型的证候表现。

内源性和外源性凝血功能 APTT、PT 的观察。传统医学认为气为血之帅,血为气之母,气不足无以摄血;阴虚则血脉不充,血流运行不畅。气阴两虚则致瘀血阻滞,血凝速度加快。结果显示, B 组 APTT、PT 较 A 组明显缩短,说明可能出现瘀血阻滞,间接反映机体处于气阴两虚状态<sup>[12-13]</sup>。

血脂的观察。气阴两虚时脾胃损伤不能升清降浊,可诱发“痰浊”,痰饮内阻致血液粘稠而瘀血内生,血流不畅致气化失常而留滞成痰,故 TC、TG 和 LDL-C 是中医痰浊评价的重要生化指标<sup>[14-15]</sup>。试验结果显示, B 组 TC、TG 和 LDL-C 值均升高;即在血糖代谢异常同时出现了血脂代谢异常;既反映了 2 型糖尿病的特点,又符合气阴两虚,痰浊内生的机体状态。

免疫功能的观察。气虚由于机体元气不足,气的推动、固摄、运化、温煦等功能减退,或脏腑机能减退,在现代医学中表现为免疫功能紊乱<sup>[16]</sup>。胸腺

是机体重要的中枢免疫器官,CD4、CD8 细胞属于机体免疫细胞—T 淋巴细胞的亚群,二者数量及比例平衡是保持体内免疫功能稳定的关键因素。上述指标都是评价机体免疫力的重要指标<sup>[17-18]</sup>。结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠胸腺指数、CD4、CD4/CD8 值均明显降低,从而反映机体可能处于气阴两虚状态。

cAMP 和 cGMP 的观察。cAMP、cGMP 是反映体液免疫功能的重要指标,其含量可影响机体神经内分泌功能<sup>[19-20]</sup>。研究表明,阴虚时机体交感神经-肾上腺系统功能偏高,表现为第二信使 cAMP 活性升高,而 cAMP/cGMP 比值升高较单一 cAMP 升高更具特异性<sup>[21]</sup>。结果显示,B 组 cAMP、cAMP/cGMP 值均显著高于 A 组,说明机体阴虚状态显现。

总结本实验结果,病证模型动物的体征表现可概括为:精神萎靡,行动迟缓,进食量、饮水量增加,抓力降低,呼吸、脉搏减弱,舌体颜色呈暗紫色等;反映了临床 2 型糖尿病气阴两虚证中咽干口燥、多食易饥、口渴喜饮、倦怠乏力、气短懒言、脉细无力、舌色暗紫等证候特点;同时实验室指标也出现了血糖、尿糖、糖耐量及 TC、TG、LDL-C 值均显著升高,PT、APTT、胸腺指数显著下降,cAMP 和 cAMP/cGMP 值显著升高,CD4、CD4/CD8 值显著降低,胰腺内胰岛组织损伤、功能显著下降等变化,也辅助证明了 B 组大鼠出现 2 型糖尿病气阴两虚证临床表现。而单纯高糖高脂喂养 14 周的大鼠各项指标与 A 组比较,随机血糖、TG、cGMP、CD4 及舌象的 R 值等指标有显著性差异,其余各项指标检测结果无显著性差异,因此,认为该模型还不能全面地反映出 2 型糖尿病气阴两虚证的证候特点。

综上,大鼠高糖高脂喂养 4 周后腹腔注射 STZ 40 mg/kg,继续高糖高脂饲养至 14 周制备的动物模型可较好地反映 2 型糖尿病气阴两虚证的特点。由此说明,通过对动物体征指标进行监测可反映中医证候的发展过程,结合实验室指标进行定量化描述可进一步辅助验证病证结合动物模型的成立及证候特点的表达,二者结合有助于模型的评价,同时也使模型评价更为直观、客观、可操作,标准更易于统一。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.
- [ 2 ] Zuo H, Shi Z, Hussain A. Prevalence, trends and risk factors for the diabetes epidemic in China: A systematic review and meta-analysis [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2014, 104(1): 63-72.
- [ 3 ] 赵建群. 古今消渴病机认识分化探究 [J]. 新中医, 2017, 49(2): 150-152.
- Zhao JQ. Differentiation of ancient and modern understanding of the pathogenesis of xiaoke disease [J]. J New Chin Med, 2017, 49(2): 150-152.
- [ 4 ] 涂家荣, 陈岳祺. 2 型糖尿病中医辨证分型研究 [J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(5): 61-62.
- Gan JR, Chen YQ. Study on correlation between type 2 diabetes and tem syndrome differentiation-typing [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(5): 161-62.
- [ 5 ] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2002.
- Zheng XY. Guiding principles for clinical research of new Chinese medicines [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press; 2002.
- [ 6 ] 林筱洁, 万浩宇, 李志威, 等. 丹红注射液对缺血性中风大鼠舌象的干预研究 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(5): 757-761.
- Lin XJ, Wan HY, Li ZW, et al. Intervention of Danhong injection on tongue manifestation in cerebral ischemic stroke rats [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2019, 28(5): 757-761.
- [ 7 ] 晏和国, 杨博, 侯建婷, 等. 2 型糖尿病气阴两虚证与中医体质分布特点及其相关性 [J]. 中医药通报, 2017, 16(3): 46-49.
- Yan HG, Yang B, Hou JT, et al. The distribution characteristics and correlation of Qi-Yin deficiency syndrome in type 2 diabetes with TCM constitution [J]. Tradit Chin Med J, 2017, 16(3): 46-49.
- [ 8 ] 华婷婷, 孙志. 孙志教授泻胃补脾针法治疗 2 型糖尿病的经验 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(10): 834-836.
- Hua TT, Sun Z. Professor SUN Zhi's experience in the treatment of type 2 diabetes: acupuncture therapy to purge stomach fire and reinforce the spleen [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2017, 41(10): 834-836.
- [ 9 ] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229-234.
- Chen JC, Liu JX, Ma B, et al. Establishment and evaluation of rat model of qi deficiency and blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 61(3): 229-234.
- [ 10 ] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2177-2183.
- Chen JC, Liu JX, Lin CR, et al. Study on establishment of an animal model of Qi deficiency syndrome base on theory of over exertion leading to Qi consumption in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [ 11 ] 林丽贞, 阮诗玮. 糖尿病肾病气阴两虚夹瘀证治疗前后舌象改变的研究 [J]. 糖尿病新世界, 2017, 20(18): 23-24.
- Lin LZ, Ruan SW. Research on tongue image changes before and

- after treatment of syndrome of qi and yin deficiency and stasis of blood stasis in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes New World*, 2017, 20(18): 23-24.
- [12] 张伟健, 刘宏, 陈滔彬, 等. PRLC 对气虚血瘀证大鼠血液流变、脂质代谢及肝肾功能的影响 [J]. *药学研究*, 2018, 37(4): 194-197.
- Zhang WJ, Liu H, Cehn TB, et al. Effect of PRLC on hemorheology, lipid metabolism, hepatic and renal function in qi deficiency and blood stasis rat [J]. *J Pharm Res*, 2018, 37(4): 194-197.
- [13] 李倩. 益气养阴方对气阴两虚证 2 型糖尿病患者血液流变学、炎症机制、凝血功能影响及疗效观察 [J]. *糖尿病新世界*, 2019, 22(6): 71-72, 149.
- Li Q. Effect of Yiqi Yangyin Prescription on hemorheology, inflammation mechanism, coagulation function and curative effect of type 2 diabetes with qi and Yin deficiency syndrome [J]. *Diabetes New World*, 2019, 22(6): 71-72, 149.
- [14] 王静静, 黄树林. 2 型糖尿病气阴两虚型患者血糖和血脂之间的相关性分析 [J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(8): 1500-1502.
- Wang JJ, Huang SL. Correlation between blood glucose and blood lipid in patients with type 2 diabetes mellitus with Qi and Yin deficiency [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2019, 31(8): 1500-1502.
- [15] 李海洋, 覃海知, 晁俊, 等. 糖尿病大血管病变“气阴两虚”态模型的建立 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(3): 325-328.
- Li HY, Tan HZ, Chao J, et al. Establishment of the “Qi and Yin Deficiency” model in the diabetic macrovascular diseases [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2017, 23(3): 325-328.
- [16] 陈进成, 刘建勋, 林成仁, 等. 基于“劳则气耗”理论研究气虚证动物模型的建立方法 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(11): 2177-2183.
- Chen JC, Liu JX, Lin CR, et al. Study on establishment of an animal model of qi deficiency syndrome base on theory of over exertion leading to qi consumption in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2018, 43(11): 2177-2183.
- [17] 李锦灵, 梁一彪, 梁丽萍, 等. 不同大鼠脾气虚证模型对血常规指标的影响 [J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(2): 217-220.
- Li JL, Liang YB, Liang LP, et al. The routine blood indexes in the different rat models with syndrome of spleen qi deficiency [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2017, 33(2): 217-220.
- [18] 张彩云, 肖满珊, 廖双叶, 等. 实验性大鼠脾气虚证模型的建立及指标检测 [J]. *广东药学院学报*, 2015, 31(6): 808-810.
- Zhang CY, Xiao MS, Liao SY, et al. Establishment and evaluation of the experimental rat model of spleen-qi deficiency syndrome [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2015, 31(6): 808-810.
- [19] 吴国学, 李玉洁, 龚曼. 左归丸降低肾阴虚大鼠血清 cAMP/cGMP 比值与其抗氧化作用的关联性研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 2831-2835.
- Wu GX, Li YJ, Gong M. Study on the correlation between the ratio of cAMP/cGMP in serum and anti-oxidation of Zuogui Pills in kidney-yin deficiency model rats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(7): 2831-2835.
- [20] 李玉洁, 魏丹丹, 魏茂林, 等. 基于动物物质与能量代谢检测评价 3 种肾阴虚证模型建立方法 [J]. *中医学报*, 2017, 32(1): 83-88.
- Li YJ, Wei DD, Wei ML, et al. Evaluation of three kinds of kidney yin deficiency modeling based on animal substance and energy metabolism detection [J]. *Acta Chin Med*, 2017, 32(1): 83-88.
- [21] 马慕祯, 董英杰, 雷珊珊, 等. 黄精不同炮制品对气阴两虚模型大鼠的药效研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(10): 83-89.
- Ma MN, Dong YJ, Lei SS, et al. Pharmacodynamic effects of different processed products of *Rhizoma Polygonati* on rat model of qi and yin deficiency [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2019, 53(10): 83-89.

[收稿日期] 2020-09-30

税雪,许荣,赵菊梅,等. 去势抵抗性前列腺癌 PDX 模型研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 230-235.

Shui X, Xu R, Zhao JM, et al. Research progress in PDX models of castration-resistant prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 230-235.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.013

# 去势抵抗性前列腺癌 PDX 模型研究进展

税雪<sup>1,2</sup>, 许荣<sup>2</sup>, 赵菊梅<sup>1\*</sup>, 师长宏<sup>2\*</sup>

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

**【摘要】** 去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 具有较高的发病率和死亡率, 是前列腺癌的主要临床特征, 且预后较差。建立具有 CRPC 特征的肿瘤病人临床手术标本异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 模型对于前列腺癌研究具有重要的意义。本文重点综述了多种 CRPC PDX 模型的主要表型特征, 包括激素非依赖表型、雄激素受体相关表型和神经内分泌表型, 以及病理生理学特征, 以期为 CRPC 的发生机制和靶向药物筛选研究提供良好的实验工具。

**【关键词】** 去势抵抗性前列腺癌; PDX 模型; 雄激素受体; 神经内分泌分化

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0230-06

## Research progress in PDX models of castration-resistant prostate cancer

SHUI Xue<sup>1,2</sup>, XU Rong<sup>2</sup>, ZHAO Jumei<sup>1\*</sup>, SHI Changhong<sup>2\*</sup>

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

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

Corresponding author: SHI Changhong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn; ZHAO Jumei. E-mail: jmz2003.stu@163.com

**【Abstract】** Castration-resistant prostate cancer (CRPC) has high morbidity and mortality, and the prognosis for patients is poor. Establishing patient-derived xenograft models with CRPC characteristics using clinical surgical specimens is critical for CRPC research. In this article, we review the main phenotypic characteristics of a variety of CRPC patient-derived xenograft models, including hormone-independent phenotypes, androgen receptor-related phenotypes and neuroendocrine phenotypes, as well as pathophysiological characteristics, and we discuss potential experimental tools for studying the mechanisms of CRPC and for targeted drug screening for the disease.

**【Keywords】** castration-resistant prostate cancer (CRPC); patient-derived xenograft (PDX); androgen receptor; neuroendocrine differentiation

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

前列腺癌 (prostate cancer, Pca) 的发病率与死亡率呈现逐年攀升趋势, 已成为我国泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁老年男性健康<sup>[1]</sup>。通过药物或手术等手段进行雄激素剥夺 (androgen deprivation therapy, ADT) 是目前治疗 Pca 的主要方

法, 但随着医治时间延长, 大多数患者都将会复发, 发展为去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC), 而 CRPC 患者预后较差, 平均中位生存期不满 2 年<sup>[2]</sup>。已证实, 大多数 CRPC 仍依赖于 AR 信号通路<sup>[3]</sup>, 因此, 一些新型的雄激素

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (32070532)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (32070532).

**【作者简介】** 税雪 (1995—), 女, 研究生, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物。Email: Pamelashui@foxmail.com

**【通信作者】** 师长宏, 男, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病的动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn;

赵菊梅, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物。Email: jmz2003.stu@163.com。

\* 共同通信作者

合成抑制剂和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 通路抑制剂如:阿比特龙和恩杂鲁胺等在临床广泛使用<sup>[4-5]</sup>。但患者最终也会对这些药物产生耐药性。因此,迫切需要开发有效的模拟临床特征的动物模型,开展 CRPC 的发病机制和新型药物的研究。

目前常应用于 CRPC 研究的动物模型主要包括细胞系异种移植模型 (cell line-derived xenografts, CDX), 遗传工程小鼠模型 (genetically-engineered mouse models, GEMM) 和人源化异种移植模型 (patient-derived xenograft, PDX)。常用的 CRPC 细胞系 22RV1, C4-2 和 DU145 等经过长期体外培养,其基因谱表达水平和异质性较原发瘤会发生明显的变化<sup>[6]</sup>;GEMM 模型也由于成本较高且与临床差异较大等限制了其应用<sup>[7]</sup>。PDX 模型的出现,很好的弥补了上述模型的不足。该类模型是通过将患者新鲜的肿瘤组织经皮下、肾包膜等不同方法移植到免疫缺陷小鼠体内建立。因其较好的保留了原发瘤的生物学特征和异质性,在临床药物筛选方面体现出良好的应用前景<sup>[8]</sup>。本文重点介绍利用临床肿瘤标本建立的不同类型的 CRPC PDX 模型,阐述该类模型的主要表型特征和病理生理学特征,以期为 CRPC 的发生机制和靶向药物筛选研究提供良好的实验工具。

## 1 CRPC PDX 模型的表型特征

### 1.1 PDX 模型的激素非依赖表型特征

前列腺癌初期呈激素依赖性生长,在经 ADT 治疗以后,体内雄激素水平下降使肿瘤体积逐渐缩小,但 CRPC 的激素非依赖特性使肿瘤能在雄激素剥夺的情况下复发和远处转移<sup>[9]</sup>。近年来已有多个研究小组直接将复发后患者的肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠中构建了多例 CRPC 的 PDX 模型<sup>[10-12]</sup>。然而,也有研究发现通过这种途径构建的 PDX 模型并非总表现为激素非依赖特性。Corey 等<sup>[13]</sup>在 LuCaP 35 模型中分析发现,CRPC 肿瘤组织中的激素非依赖性细胞在雄激素存在的条件下,又恢复为激素依赖性表型。因此,这种方法构建的模型结果不稳定,人们开始探索其它方法。有研究小组尝试通过对激素依赖性的腺癌 PDX 模型进行 ADT 干预诱导 CRPC 的发生,该模型可以更好的展现临床 CRPC 患者向激素非依赖特性转变的动态发展过程。LAPC-9<sup>[14]</sup>、PC-310<sup>[15]</sup> 和 KuCaP-2<sup>[16]</sup> 就是激素依赖性的 PDX 模型通过去势诱导获得的

CRPC PDX 模型。该类模型保持了与原发肿瘤相似的遗传特征,其生长不依赖于雄激素,表达 AR 和前列腺癌特异抗原 (prostate specific antigen, PSA),很好地模拟了临床 CRPC 的进展过程,即激素依赖向非依赖性的转变<sup>[15-16]</sup>。更为重要的是,通过比对前列腺癌 PDX 模型 CRPC 发生前后的基因表达水平变化,可以深入研究 CRPC 形成的分子机制。比如,有研究者通过该动态转化模型,发现前列腺素 E 受体蛋白 4 (EP4) 水平在 CRPC 后显著升高,且与 PSA 水平呈正相关,这提示 EP4 可能是治疗 CRPC 的潜在靶点<sup>[16]</sup>。综上所述,使用去势诱导的 CRPC PDX 研究前列腺癌由激素依赖表型向激素非依赖性表型的转化过程,将有助于探索 CRPC 的发生发展,从而为临床患者的治疗提供新策略。

### 1.2 PDX 模型的雄激素受体相关表型特征

阻断雄激素-雄激素受体信号通路的转导可以抑制前列腺癌 PDX 模型肿瘤的进展和转移。但外源诱导使 AR 发生基因突变与变异,或表达上调时,该信号通路可再次被激活从而发挥促瘤作用<sup>[17]</sup>。有研究者比对 PDX 模型在去势和给予外源性雄激素的不同条件下肿瘤的生长情况,发现 AR 突变和剪接变异的 CRPC PDX 模型在补充外源性雄激素的情况下生长速度增快,而 AR 缺失的模型生长速度没有变化<sup>[10]</sup>,这提示 CRPC PDX 模型的发展与 AR 有关。因此,越来越多的研究者在建立 CRPC PDX 模型的同时,将模型中 AR 的表达作为一个重要的监测指标。利用 PDX 模型研究发现,一方面 AR 基因变异可能是去势抵抗发生的潜在机制<sup>[11]</sup>。例如,雄激素受体剪接变体 7 (AR splice variant 7, AR-V7) 作为 CRPC 中检出频率最高的剪切变体之一,可以促进 LuCaP 96CR 模型肿瘤的发展<sup>[18]</sup>;另一方面,AR 基因变异与新型内分泌治疗药物的耐药性产生也有关<sup>[19-21]</sup>。Lawrence 等<sup>[10]</sup>在 CRPC PDX 模型中发现了表达缺失的雄激素受体剪接变体 AR-s567es,并证实 AR 缺失和 AR 突变可能是原发肿瘤患者对阿比特龙和恩杂鲁胺耐药的重要分子机制。也有人使用 LuCaP 35CR 模型发现 AR-V7 的变异与 CRPC 耐药性相联系,进而揭示 AR-V7 可作为指导 CRPC 患者药物选择的分子标志物<sup>[12]</sup>,同样的结果也在 CWR22 模型中得到印证<sup>[22]</sup>。

### 1.3 PDX 模型的神经内分泌 (neuroendocrine, NE) 表型特性

神经内分泌前列腺癌 (neuroendocrine prostate

cancer, NEPC) 是一种 CRPC 亚型, 恶性度极高, 不表达 PSA 和 AR, 而突触素 (SYN)、嗜铬粒蛋白 A (CgA)、CD56 和神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 等神经内分泌标志物为阳性。研究表明, NEPC 多发生于 AR 抑制剂治疗之后, 且与临床不良预后明确相关<sup>[23]</sup>。目前对于 NEPC 的起源尚未形成共识, Lin 等<sup>[24]</sup>对前列腺腺癌 PDX 模型 LTL331 和 NEPC PDX 模型 LTL331R 进行了比对研究, 相应的 DNA 和 RNA 测序结果支持 NEPC 可以通过适应性反应直接从腺癌转分化而来的假说, 并且在这过程中可能产生了一组参与神经内分泌转分化 (neuroendocrine differentiation, NED) 的基因。该结果引起了众多学者的关注, 研究者陆续发起了多个 NED 分子机制的研究。基于相关 CRPC PDX 模型和 NEPC PDX 模型的实验证实, 异染色质蛋白 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ )<sup>[25]</sup>、SRRM4<sup>[26]</sup> 及 PEG10<sup>[27]</sup> 的异常表达可能是介导 NEPC 发生的新机制。此外, 也有一部分人支持另一种假说, 即 NEPC 来源于前列腺腺体正常的神经内分泌细胞癌变及前列腺肿瘤干细胞转化。van Haaften-Day 等<sup>[28]</sup>对其所建立的 NEPC 模型 UCRU-PR-2 的综合分析结果, 支持该假说。

截至目前, NEPC 的起源仍在探索中, 研究的热点主要集中于激素依赖性前列腺癌 (hormone-naïve prostate cancer, HNPC)/CRPC 模型向 NEPC 模型动态演化过程。有人直接利用 NEPC 患者肿瘤组织建立了静态 NEPC PDX 模型。这类模型的制备主要是通过将患者新鲜肿瘤组织剪碎后植入 6 ~ 8 周免疫缺陷的雄性小鼠体内, 待瘤体长至适当体积时行去势手术, 去势后小鼠瘤体继续生长并能稳定传代视为建模成功。如 LuCaP 49 模型<sup>[29]</sup>。这类静态模型虽然较好地展现出与原发瘤相似的病理学结构和遗传特征, 但对于模拟前列腺癌临床动态进展过程具有一定的局限性。在将去势后肿瘤再复发的激素依赖性前列腺癌 PDX 模型诱导为 CRPC PDX 模型的基础上, 取该模型的小鼠瘤体接种至已提前去势的雄性小鼠皮下并给予药物等处理因素进而诱导为 NEPC PDX 模型。这种体现疾病动态过程的模型制备方法, 能够完整地再现临床病人的特征, 是理想的动物模型。Jongsma 等<sup>[30]</sup>建立的 NE 分化模型 PC-310, 为 HNPC PDX 模型转变为 NEPC 表型奠定了良好基础。Wu 等<sup>[31]</sup>使用多西紫杉醇诱导 B45354 模型出现 NE 特征, 为研究 NE 细胞在 Pca 进展过程中的作用提供了优良的动物模型。但

由于缺乏大量的 PDX 模型进行支撑和考证, 上述实验结果有待进一步确认, 因此, 建立 NEPC 动态研究模型仍然需要不断地努力。

## 2 CRPC PDX 模型的肿瘤病理生理学特征

为了更好的了解临床患者肿瘤的病理生理学特征, 在 CRPC PDX 模型上进行扩散, 转移和耐药等病理研究, 能够为转移相关信号通路识别和靶向药物测试提供重要参考。

### 2.1 PDX 模型的扩散和转移特性

扩散和转移是前列腺癌重要的生物特征。据调查显示, 转移性 CRPC (metastatic castration resistant prostate cancer, mCRPC) 肿瘤细胞最常定植于骨骼 (55%), 其次是淋巴结 (52%) 和肝 (48%)<sup>[32]</sup>。CRPC 患者一旦发生骨转移, 其死亡风险将显著升高。因此, mCRPC 的扩散和转移机制已成为前列腺癌防治研究的重要环节, 成功建立真实模拟人 CRPC 组织细胞扩散和转移生物学行为及特征的 PDX 模型已成为研究的重点。目前, 制备 mCRPC PDX 的方法多是通过将 CRPC PDX 模型的瘤体制成单细胞悬液, 再经原位注射到免疫缺陷小鼠体内, 观察注射部位肿瘤生长情况<sup>[32]</sup>。这种制备方法的优势在于能在较短的时间内成模, 并且人为决定肿瘤生长部位, 从而提高 mCRPC PDX 模型的成功率。该模型主要应用于转移机制和新药开发研究。多项实验证实, 成骨细胞表型 CRPC PDX 模型在前列腺癌转移研究中具有独特优势。例如, Kiefer 等<sup>[33]</sup>使用骨保护素 Fc-OPG (osteoprotegerin, Fc-OPG) 作用于骨转移 PDX 模型 LuCaP 23.1, 明确了 Fc-OPG 的使用可减慢骨骼瘤的生长速度并降低血清 PSA 水平。Chiang 等<sup>[34]</sup>利用前列腺癌转移性 LTL-313H 和非转移性 LTL-313B 模型的基因表达谱差异, 筛选出与转移相关的驱动基因 GATA2。同样, 这两种模型也被用于 TMEM45B 基因的筛选<sup>[35]</sup>, 并确认上述基因的过表达与前列腺癌的进展和转移密切相关, 从而为预测转移提供了新的生物标志物。

### 2.2 PDX 模型的耐药特性

CRPC 的临床治疗方法以激素治疗和化疗居多, 此外还包括免疫治疗和放射核素治疗。目前已有研究将 CRPC PDX 模型应用于以上不同治疗方案的临床前研究。由于 PDX 模型缺乏免疫细胞, 无法准确模拟机体免疫系统与肿瘤之间的相互作用

关系,因此该模型在肿瘤免疫治疗研究中具有一定的局限性。但免疫系统人源化小鼠模型的成功建立为该类研究提供了良好的实验工具<sup>[36]</sup>。在激素治疗药物的相关研究中,PDX 模型也体现出良好的优势,如阿比特龙(abiraterone)能阻断肿瘤内外雄激素的合成,适用于联合治疗等,从而显著提高进展期 mCRPC 患者的生存期,但也可能导致耐药<sup>[12,37]</sup>。最近有研究将阿比特龙作用于不同系列 LuCaP 模型以评估肿瘤对药物敏感性程度,结果发现 LuCaP 35CR 作为耐阿比特龙的 PDX 模型,表达了一系列与持续低水平 AR 信号转导相关的生物遗传标志物<sup>[38]</sup>。因此,开发这类耐药表型的 CRPC PDX 具有巨大的潜在应用价值,具有代表性的一个例子是 Lee 等<sup>[39]</sup>应用 MDA PCa 118b PDX 模型发现了 CRPC 骨转移的耐药机制,结果显示骨转移灶中也存在对卡博替尼耐药的肿瘤细胞,其耐药原因是因为表达了整联蛋白配体。另外,这类耐药模型还可用于新治疗方案的开发。Suominen 等<sup>[40]</sup>通过耐阿比特龙的 LuCaP 58 模型成功测定出放射性药物镭 223 的作用方式和抗肿瘤功效,结果显示镭 223 能够在短时间内诱导癌细胞的 DNA 双链发生断裂以及 PSA 水平下降,从而成功抑制肿瘤诱导的成骨细胞生长。Low 等<sup>[41]</sup>利用耐恩杂鲁胺的 CRPC PDX 模型证实 RNA 聚合酶 I 抑制剂 BMH-21 可以显著抑制肿瘤的生长并降低 Ki67 的增殖指数。并有研究者将 RNA 聚合酶 I 抑制剂与 PIM 激酶抑制剂联合作用于 PDX 模型,从而开发出一种新型的 CRPC 治疗方法<sup>[42]</sup>。同样,Lawrence 等<sup>[10]</sup>也发现核糖体靶向剂能对耐恩杂鲁胺和阿比特龙的 CRPC PDX 模型重新敏感。此外,随着近年来对 CRPC 耐药机制的深入探索,相关通路的治疗靶标也在不断被开发。如针对 CRPC 对 mTOR 途径的依赖性,La 等<sup>[43]</sup>将 mTOR 途径抑制剂 Rapalink-1 作用于 CRPC PDX 和体外肿瘤类器官发现,Rapalink-1 可以导致小鼠肿瘤消退,具有明显的抗肿瘤效力。

### 3 展望

成功建立模拟临床特征的高保真 CRPC PDX 模型已成为 CRPC 病理机制研究和靶向药物筛选的重要前提。理想的 CRPC PDX 模型不仅需要准确模拟原发肿瘤的生物学特征及其异质性,而且其疾病的进展过程及特定基因的表达情况也应与临床结果高度相似。但目前 CRPC PDX 模型的构建仍

存在诸多问题,如模型的总体成功率较低,成本较高,建模周期长等,这些因素限制了 CRPC PDX 模型的发展与应用。为此,研究者们正尝试采取补充外源性雄激素<sup>[44]</sup>,从激素依赖的前列腺癌模型逐步诱导等不同策略,改进现阶段模型存在的不足,以增加动物模型和人类疾病之间的相似性,更好的促进临床前研究成果向临床的转化。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Lowrance WT, Murad MH, Oh WK, et al. Castration-resistant prostate cancer: AUA guideline amendment [J]. J Urol, 2018, 200: 1264-1272.
- [3] Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(12): 701-711.
- [4] de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2011, 364(21): 1995-2005.
- [5] Hussain M, Fizazi K, Saad F, et al. Enzalutamide in men with nonmetastatic, castration-resistant prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2018, 378: 2465-2474.
- [6] Dobbin ZC, Katre AA, Steg AD, et al. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer [J]. Oncotarget, 2014, 5(18): 8750-8764.
- [7] de Morrée E, Soest R, Aghai A, et al. Understanding taxanes in prostate cancer; importance of intratumoral drug accumulation [J]. Prostate, 2016, 76(10): 927-936.
- [8] van Weerden WM, Bangma C, de Wit R. Human xenograft models as useful tools to assess the potential of novel therapeutics in prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2009, 100(1): 13-18.
- [9] Abd Wahab NA, Lajis NH, Abas F, et al. Mechanism of anti-cancer activity of curcumin on androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 679-713.
- [10] Lawrence MG, Obinata D, Sandhu S, et al. Patient-derived models of abiraterone- and enzalutamide-resistant prostate cancer reveal sensitivity to ribosome-directed therapy [J]. Eur Urol, 2018, 74(5): 562-572.
- [11] Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant [J]. J Clin Invest, 2010, 120(8): 2715-2730.
- [12] Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, et al. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer; induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(18): 5913-5925.
- [13] Corey E, Quinn JE, Buhler KR, et al. LuCaP 35: a new model

- of prostate cancer progression to androgen independence [J]. *Prostate*, 2003, 55(4): 239-246.
- [14] Craft N, Chhor C, Tran C, et al. Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 5030-5036.
- [15] Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Androgen deprivation of the PC-310 [correction of prohormone convertase-310] human prostate cancer model system induces neuroendocrine differentiation [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 741-748.
- [16] Terada N, Shimizu Y, Kamba T, et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1606-1615.
- [17] Zhao N, Peacock SO, Lo CH, et al. Arginine vasopressin receptor 1a is a therapeutic target for castration-resistant prostate cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(498): 1206-1215.
- [18] DiPippo VA, Nguyen HM, Brown LG, et al. Addition of PSMA ADC to enzalutamide therapy significantly improves survival in *in vivo* model of castration resistant prostate cancer [J]. *Prostate*, 2016, 76(3): 325-334.
- [19] Kregel S, Wang C, Han X, et al. Androgen receptor degraders overcome common resistance mechanisms developed during prostate cancer treatment [J]. *Neoplasia*, 2020, 22(2): 111-119.
- [20] Wang S, Yang S, Nan C, et al. Expression of androgen receptor variant 7 (AR-V7) in circulated tumor cells and correlation with drug resistance of prostate cancer cells [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7051-7056.
- [21] Kwegyir-Afful AK, Ramalingam S, Ramamurthy VP, et al. Galeterone and the next generation galeterone analogs, VNPP414 and VNPP433-3 $\beta$  exert potent therapeutic effects in castration-/drug-resistant prostate cancer preclinical models *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1637-1655.
- [22] Seedhouse SJ, Affronti HC, Karasik E, et al. Metastatic phenotype in CWR22 prostate cancer xenograft following castration [J]. *Prostate*, 2016, 76(4): 359-368.
- [23] Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. part II: treatment of relapsing, metastatic, and castration-resistant prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2016, 71(4): 630-642.
- [24] Lin D, Wyatt AW, Xue H, et al. High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1272-1283.
- [25] Ci X, Hao J, Dong X, et al. Heterochromatin protein 1 $\alpha$  mediates development and aggressiveness of neuroendocrine prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(10): 2691-2704.
- [26] Li Y, Donmez N, Sahinalp C, et al. SRRM4 drives neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma under androgen receptor pathway inhibition [J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 68-78.
- [27] Akamatsu S, Wyatt AW, Lin D, et al. The Placental Gene PEG10 promotes progression of neuroendocrine prostate cancer [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(6): 922-936.
- [28] van Haaften-Day C, Raghavan D, Russell P, et al. Xenografted small cell undifferentiated cancer of prostate: possible common origin with prostatic adenocarcinoma [J]. *Prostate*, 1987, 11(3): 271-279.
- [29] True LD, Buhler K, Quinn J, et al. A neuroendocrine/small cell prostate carcinoma xenograft-LuCaP 49 [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(2): 705-715.
- [30] Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Different profiles of neuroendocrine cell differentiation evolve in the PC-310 human prostate cancer model during long-term androgen deprivation [J]. *Prostate*, 2002, 50(4): 203-215.
- [31] Wu P, Xu R, Chen X, et al. Establishment and characterization of patient-derived xenografts for hormone-naïve and castrate-resistant prostate cancers to improve treatment modality evaluation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3848-3861.
- [32] Pinthus JH, Waks T, Schindler DG, et al. WISH-PC2: a unique xenograft model of human prostatic small cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(23): 6563-6567.
- [33] Kiefer JA, Vessella RL, Quinn JE, et al. The effect of osteoprotegerin administration on the intra-tibial growth of the osteoblastic LuCaP 23.1 prostate cancer xenograft [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(5): 381-387.
- [34] Chiang YT, Wang K, Fazli L, et al. GATA2 as a potential metastasis-driving gene in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(2): 451-461.
- [35] Luo F, Yang K, Wang YZ, et al. TMEM45B is a novel predictive biomarker for prostate cancer progression and metastasis [J]. *Neoplasia*, 2018, 65(5): 815-821.
- [36] 郭文文, 乔天运, 张彩勤, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的构建及其在肿瘤治疗研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(11): 98-104.
- Guo WW, Qiao TY, Zhang CQ, et al. Establishment of mouse models with a humanized immune system and applications for tumor immunotherapy [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(11): 98-104.
- [37] Kluetz PG, Ning YM, Maher VE, et al. Abiraterone acetate in combination with prednisone for the treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: U.S. Food and Drug Administration drug approval summary [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(24): 6650-6656.
- [38] Lam HM, Memullin R, Nguyen HM, et al. Characterization of an abiraterone ultrasensitive phenotype in castration-resistant prostate cancer patient-derived xenografts [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2301-2312.
- [39] Lee YC, Lin SC, Yu G, et al. Identification of bone-derived factors conferring de novo therapeutic resistance in metastatic prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(22): 4949-4959.
- [40] Suominen MI, Fagerlund KM, Rissanen JP, et al. Radium-223 inhibits osseous prostate cancer growth by dual targeting of cancer

- cells and bone microenvironment in mouse models [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(15): 4335-4346.
- [41] Low JY, Sirajuddin P, Moubarek M, et al. Effective targeting of RNA polymerase I in treatment-resistant prostate cancer [J]. Prostate, 2019, 79(16): 1837-1851.
- [42] Rebello RJ, Kusnadi E, Cameron DP, et al. The dual inhibition of RNA Pol I transcription and pim kinase as a new therapeutic approach to treat advanced prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(22): 5539-5552.
- [43] La Manna F, De Menna M, Patel N, et al. Dual-mTOR inhibitor Rapalink-1 reduces prostate cancer patient-derived xenograft growth and alters tumor heterogeneity [J]. Front Oncol, 2020, 10: 1012.
- [44] Lawrence MG, Pook DW, Wang H, et al. Establishment of primary patient-derived xenografts of palliative TURP specimens to study castrate-resistant prostate cancer [J]. Prostate, 2015, 75(13): 1475-1483.
- [收稿日期] 2020-07-27

## 中国医学科学院首次建立新冠肺炎恒河猴模型,当选“中国生命科学十大进展”

SARS-CoV-2 引起的 COVID-19 暴发,对全球构成了重大公共卫生威胁。动物模型对于阐明病毒感染与发病机制、传播途径以及药物和疫苗评价十分关键,是国务院联防联控机制科研攻关组部署的五大主攻方向之一。中国医学科学院医学实验动物研究所秦川团队率先建立了 COVID-19 的转基因小鼠模型和恒河猴模型,并于 2020 年 2 月 18 日通过科技部组织的新冠动物模型鉴定。这两种动物模型首次阐明了 SARS-CoV-2 感染的致病性,加深了对 COVID-19 病因学和病理学的认知,促进了抗病毒药物和疫苗研发。

该项研究作为知识创新类项目“新冠肺炎动物模型的构建”,于 2021 年 1 月 13 日当选中国科协生命科学学会联合体评选的 2020 年度中国生命科学十大进展,对防控当前全球面临的新冠肺炎疫情有重大意义。其中,恒河猴新冠肺炎模型研究,由秦川团队联合中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、中国医学科学院病原生物学研究所、首都医科大学的研究团队进行,研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(Animal Model & Experimental Medicine, 2020, 3: 93-97)。

该模型是国际上第一个构建的新冠病毒恒河猴模型,其研制方法和标准已提供给世界卫生组织(WHO),供国际研究使用。

刘云,孙增先. 肺动脉高压动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 236-241.

Liu Y, Sun ZX. Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 236-241.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.014

# 肺动脉高压动物模型研究进展

刘云,孙增先\*

(连云港市第一人民医院药学部,江苏 连云港 222061)

**【摘要】** 肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种预后不良的严重疾病,其发病机制仍不清楚。现有的治疗手段不能治愈,只能减缓疾病的进程。动物模型是研究PAH的重要工具,在PAH病理生理机制研究和防治策略评估中发挥极其重要的作用。本文对经典PAH动物模型(缺氧和野百合碱模型)和PAH双击动物模型的血液动力学改变和肺动脉组织学重构特征进行综述,旨在为PAH新机制和新靶点研究的动物模型选择提供参考。

**【关键词】** 肺动脉高压;动物模型;缺氧;野百合碱

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)02-0236-06

## Research progress in animal models of pulmonary arterial hypertension

LIU Yun, SUN Zengxian\*

(Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222061, China)

Corresponding author: SUN Zengxian. E-mail: sunzx715@163.com

**【Abstract】** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious disease with poor prognosis, and its pathogenesis is still unclear. Current treatment method cannot cure the disease, and can only slow down its progression. Animal models are important tools for the study of PAH, and they play an extremely important role in the study of the pathophysiological mechanisms of the disease and in the evaluation of prevention and treatment strategies. In this review, we discuss the hemodynamic changes and pulmonary artery histological remodeling characteristics of classic PAH animal models (hypoxia and monocrotaline models) and PAH double-clip animal models, with the aim of providing a reference for the selection of animal models for the study of novel mechanisms and new targets for the disease.

**【Keywords】** pulmonary arterial hypertension; animal model; hypoxia; monocrotaline

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

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种致命性心肺疾病,其病理特征是持续性肺血管收缩、血管重构、原位血栓形成和血管周炎性浸润等,导致血管腔狭窄或闭塞,引起肺血管阻力(pulmonary vascular resistance, PVR)和肺动脉压力(pulmonary artery pressure, PAP)进行性增加,

最终导致右心衰竭和死亡<sup>[1-3]</sup>。按病因不同将PAH分为几个亚组,包括特发性、遗传性、药物和毒素诱导的PAH及系统性硬化症等相关形式的PAH,无论其病因如何,所有形式的PAH都表现出相似的肺血管病变,具有共同的病理机制<sup>[4]</sup>。最新流行病学数据显示特发性和遗传性PAH发病率为每百万居

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31871155)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(31871155).

**【作者简介】** 刘云(1984—),女,博士,研究方向:肺动脉高压基础及转化、临床药学。Email:yunliu211315@163.com

**【通信作者】** 孙增先,男,博士,主任药师,教授,研究方向:肺动脉高压基础及转化、个体化用药。Email:sunzx715@163.com

民 5 例,患病率为每百万居民 25 例,并且逐年增加趋势明显<sup>[5]</sup>。PAH 发病机制非常复杂,涉及炎症、氧化应激和代谢转换等机制<sup>[1,6]</sup>,尽管对 PAH 及其发生机制研究取得了很大进展,但目前最先进的治疗方法仍然不能靶向正在进行的重构过程,而是通过调控涉及维持血管张力的信号通路来治疗 PAH,5 年生存率只有 57%<sup>[7-9]</sup>。精确阐明 PAH 发病机制,寻找新的有效治疗策略一直是临床的迫切需求和研究热点,而动物模型是实现这一目标的基础<sup>[10]</sup>。然而,目前还没有一种 PAH 动物模型能够复制 PAH 的所有特征,包括血液动力学改变和组织学重构<sup>[11-12]</sup>。本文对 PAH 动物模型进行回顾性总结,旨在为 PAH 病理机制及防治研究提供理论基础和实验载体。

## 1 缺氧 PAH 大鼠模型

在多种动物物种中,常采用常压和低压缺氧诱导 PAH<sup>[13]</sup>。这个模型在选定的动物品系中具有非常好的可预测性和可重复性<sup>[13]</sup>。但物种间对慢性缺氧的反应存在差异,反应也受到年龄等因素的影响,年轻个体更容易受到这一诱因的影响。最常用的缺氧动物是大鼠和小鼠<sup>[12-13]</sup>。几乎所有研究过的哺乳动物中,缺氧诱导的 PAH 有非常相似的结构改变<sup>[13]</sup>。肺泡壁中正常非肌化末梢小动脉迅速肌化,非肌化的小动脉壁中表达  $\alpha$ -SMA 的细胞迅速增加<sup>[13]</sup>。除了周细胞的分化和/或平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)“迁移”外,局部成纤维细胞募集和分化、单核细胞/祖细胞募集、内皮细胞(endothelial cell, EC)向间充质样细胞的转分化也可以解释这些变化<sup>[13]</sup>。中膜 SMC 显著增殖、肥大,前毛细血管肺动脉增厚<sup>[13]</sup>。炎症在缺氧诱导的重构过程中起着重要作用,缺氧诱导早期和持续期肺动脉特异性血管炎症反应,某些趋化因子/趋化因子受体早于炎性细胞出现,此过程的炎性细胞主要为单核细胞。血管壁内粘附分子和细胞因子持续存在,并伴有持续的炎症浸润<sup>[13]</sup>。此外,大的近端肺动脉显著增厚和纤维化,这些血管明显硬化<sup>[13]</sup>。在缺氧 2 周后,大鼠发生中度 PAH,平均 PAH 增加一倍,这似乎与结构改变的进展有关<sup>[13]</sup>。右心室肥大,但没有右心衰竭的证据<sup>[13]</sup>。大鼠和小鼠对缺氧反应存在明确的差异,小鼠的缺氧反应有种系特异性<sup>[12-13]</sup>。恢复常氧环境可以逆转所有动物模型缺

氧诱导的 PAH<sup>[14-15]</sup>。在这些慢性缺氧模型中,没有类似于人类 PAH 的不可逆的内膜纤维化或丛状病变发生<sup>[12-13]</sup>。缺氧肺结构改变的严重程度还受其他因素的影响,而不仅仅是缺氧。因此,啮齿动物中 PAH 的慢性缺氧模型可以被认为是不太严重的 PAH 模型,并被视为与缺氧相关的人类 PAH 相关,如发生在肺实质疾病、睡眠呼吸紊乱、严重慢性阻塞性肺病和高海拔居住<sup>[13,16]</sup>。炎症、氧化应激、线粒体功能改变等参与了缺氧 PAH 模型机制调控,涉及 Hif-1 $\alpha$ 、p38 MAPK $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、Rho/Rho 等信号路径<sup>[15,17-18]</sup>。

## 2 野百合碱 PAH 大鼠模型

野百合碱(monocrotaline, MCT)是一种吡咯里西啶生物碱,存在于植物紫花野百合中<sup>[13]</sup>。MCT 必须在体内经肝脏细胞色素 P450 3A4 代谢成毒性代谢物 MCT 吡咯(monocrotaline pyrrole, MCTP),进而导致血管内皮细胞损伤和炎症反应<sup>[10,13]</sup>。不同物种和种系对 MCT 反应不同,MCT 诱导 PAH 的首选物种是大鼠,即使给予小鼠 MCTP 也不能获得预期的结果<sup>[11,13,19]</sup>。MCTP 在血浆等水溶液中快速降解(半衰期为 3 ~ 4 s),但它可以在红细胞中积累和转运,保留了与肺组织相互作用的能力,这种作用导致内皮细胞损伤,并于数周后进展为 PAH<sup>[11,20]</sup>。MCT 与其肺毒性存在关系<sup>[11]</sup>,为了提高模型的成功率,通常采用 60 mg/kg 单次腹腔内或皮下注射,3 ~ 4 周后发展为 PAH<sup>[11]</sup>。肺 EC 被认为是 MCTP 的特异性靶点,MCTP 能与 EC 膜发生特异性交联,直接导致 EC 功能受损<sup>[21]</sup>。因此,EC 是最早发生病变的细胞。在 MCT 给药后 9 ~ 24 h EC 发生改变,病变以 EC 肿胀、胞质囊化、胞浆不规则增厚、溶解为特征,并随时间推进而进展,最终扩展到肺血管的各级血管,其中毛细血管和小动脉更为严重<sup>[22]</sup>。毛细血管膜的通透性增加,此时出现血小板和纤维蛋白血栓栓塞,大量的小血管管腔被部分或完全阻塞<sup>[22]</sup>。中膜改变发生在内膜改变之后,其特征是平滑肌肥大、增生,平滑肌延伸至正常非肌化的末梢小动脉<sup>[22]</sup>。细胞外基质(胶原蛋白、弹力蛋白)含量增加,并与增殖的 SMC 共定位<sup>[22]</sup>。外膜水肿和炎症细胞浸润,晚期见成纤维细胞增殖、胶原沉积、出血等<sup>[22]</sup>。在血管重构过程中伴随 SMC 迁移、新内膜形成、SMC 肥大和结缔组织过度形成<sup>[22]</sup>。

小动脉重构发生在中、大动脉之前,且小动脉中膜增厚程度要大于大动脉<sup>[22]</sup>。此过程伴随着 PVR 和 PAP 持续增加,其严重程度随时间推移和 MCT 剂量增加而进展。炎症、氧化应激、代谢重编程等参与了 MCT PAH 模型机制调控,涉及 p38 MAPK $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、PI3K/Akt/mTOR、NO 等信号途径<sup>[11,15,23]</sup>。

MCT 诱导的 PAH 大鼠模型能够模拟人类 PAH 的几个关键方面,包括血管重构、内皮功能障碍、SMC 增殖、炎性细胞浸润和右心室衰竭<sup>[11]</sup>。该模型只需要单次药物注射,且成本低廉,易于重复。其不足之处是不能模拟严重 PAH 病理学的关键特征——新内膜和丛状病变<sup>[12-13]</sup>,以及随时间推移而 PAH 可逆(4 周后),易用药物预防或治愈<sup>[15,19]</sup>。目前临床正在使用的三类药物(内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶抑制剂、前列环素类似物)均是通过对该模型进行评估<sup>[11]</sup>。

### 3 基因工程 PAH 动物模型

随着生物技术的进展,出现各类基因工程 PAH 小鼠模型,如 EglN1 敲除小鼠模型<sup>[12,24]</sup>、IL-6 过表达小鼠模型<sup>[12-13]</sup>、S100A4/Mts1 过表达小鼠模型<sup>[13]</sup>、BMP2 突变小鼠模型<sup>[13-14]</sup>、5-HT 转运体过表达小鼠模型<sup>[14]</sup>等,以及这些基因工程小鼠模型与慢性缺氧的双击试验<sup>[12,14]</sup>。这些基因工程小鼠模型为 PAH 特定基因途径的机制研究和验证提供了证据支持,但其整体 PAH 表型与人类 PAH 疾病表型还有很大差距,还不能作为 PAH 疾病研究的替代模型。

### 4 PAH 双击大鼠模型

经典 PAH 动物模型(缺氧诱导 PAH 模型和 MCT 诱导 PAH 模型)为 PAH 病理基础研究和当前临床治疗做出了卓越的贡献,尤其是 MCT 诱导 PAH 大鼠模型。随着 PAH 病理机制认识的深入,发现经典动物模型不能重现人类严重疾病的关键病理特征<sup>[12-13]</sup>。目前,普遍认为 PAH 的发病机制存在两个关键阶段,第一阶段为肺动脉非特异性中膜和外膜增厚,平滑肌向正常非肌化的小肺动脉末梢延伸,以及异常的炎症细胞反应;第二阶段为进行性重构过程,导致中小肺动脉新内膜形成、丛状动脉病变和血管闭塞性病变,血液流动受限。这两个阶段中的每一个阶段均可导致严重的 PAH、右心

室肥大、失代偿性右心衰竭和死亡。PAH 经典模型的第一阶段特征很明显,然而,缺氧诱导的 PAH 在这个阶段趋于停止,并且没有进展到第二阶段,即肺动脉的非特异性、小动脉明显肌化,但是不会出现复杂的重构过程。此外,延长缺氧引起单核细胞和树突状炎症细胞浸润,但不会引起人类疾病中观察到的 T 细胞浸润。相反,MCT 诱导的 PAH 模型引起的肺血管重构似乎要比缺氧诱导的 PAH 模型严重些,但它仍然不能真正形成类似于在人类观察到的严重丛状动脉病变<sup>[12-13,25]</sup>。MCT 模型诱导肺动脉末梢肌化,除了复杂的炎症反应外,可能归因于其广泛的肺毒性。由此可见,经典模型似乎只是引起 PAH 的第一阶段,而不是第二阶段<sup>[12-13]</sup>。因此,对经典动物模型进行修改已成为 PAH 研究的一项重要工作,已开发了多种“双击”动物模型,如 MCT/缺氧大鼠模型、MCT/肺切除大鼠模型、SU5416/缺氧大鼠模型,以及基因操纵/缺氧小鼠模型等等,以解决 PAH 病理机制第二阶段的关键病理特征,使之更接近于人类 PAH 的病理过程。

#### 4.1 MCT/缺氧大鼠模型

将两个经典模型(慢性缺氧模型和 MCT 模型)组合即为 MCT/缺氧大鼠模型,采用 60 mg/kg 野百合碱单次注射加 4 周慢性缺氧暴露诱导,可以产生严重 PAH 大鼠模型。该模型显示血流动力学和肺动脉组织结构的严重改变,类似于在人类严重 PAH 中所观察,特别是中膜严重肥大、新内膜增厚、内皮异常增殖到的病理特征、丛状病变和血管腔闭塞与纤维蛋白血栓、血管周炎性浸润。这些结构性改变导致 PVR 和 PAP 显著增加,引起更严重的右心室肥大和右心室收缩压增加<sup>[16,26-27]</sup>。

#### 4.2 MCT/肺切除术大鼠模型

MCT 另一个双击模型就是 MCT/肺切除术大鼠模型,该模型是对大鼠实施左肺切除手术一周后,单次腹腔内或皮下注射 MCT 60 mg/kg,4 周后,引起严重 PAH 和进行性右心衰竭。这个模型重现了人类 PAH 病理学的许多关键特征,如中、小肺血管闭塞性新内膜形成、中膜肥大增厚、复杂丛状病变、血管闭塞、血管周炎性增生等表型,最终导致严重 PAH,右心室肥大、功能严重受损<sup>[13,28-29]</sup>。左肺切除导致肺血流量增加和紊乱,剪切应力的剧烈改变触发严重的肺血管重构,导致新内膜形成和复杂丛状病变,PAH 进行性恶化<sup>[13,28]</sup>。在 MCT/肺切除术

早期(3周),显示非特异性组织学改变,如中膜肥大、外膜增厚和小动脉的肌化,但这些变化可能是可逆的。后期(6~8周),产生新内膜和丛状血管病变<sup>[28]</sup>。该模型需要特殊的手术技巧,使用受到一定的限制。

### 4.3 SU5416/缺氧大鼠模型

Taraseviciene-Stewart 于 2001 年推出一种简练的 SU5416/慢性缺氧大鼠模型,将慢性缺氧暴露与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)酪氨酸激酶抑制剂 SU5416 联合应用,即单次注射 20 mg/kg SU5416 后慢性缺氧暴露 3 周,导致新内膜改变的严重血管增生性 PAH,与人类 PAH 丛状动脉病变类似<sup>[13,30-32]</sup>。表现为血管 EC、SMC 过度增殖导致前毛细血管动脉管腔闭合、内皮丛状病变形成,肺血管重构进行性加重,进而导致右心衰竭,即使恢复常氧也不可逆<sup>[13,31,32]</sup>。而 SU5416/常氧暴露大鼠仅引起轻度的 PAH 和肺血管重构<sup>[13]</sup>。该模型导致严重 PAH 的机制可能有以下几个方面:一是存活信号丧失致使 EC 大量凋亡,导致凋亡抗性且表型改变的 EC 出现,这些 EC 的过度增殖产生类似人类 PAH 的丛状动脉病变<sup>[12,31-33]</sup>。二是通过 VEGFR 非依赖性途径上调并激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR),导致雌激素代谢产物增加,促进肺动脉 EC 和 SMC 增殖<sup>[33]</sup>。此外,AhR 通路和缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, Hif)信号传导存在串扰,SU5416 增强 AhR 核转位蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)表达,ARNT(也称为 Hif1 $\beta$ )参与缺氧信号传导,进而增强慢性缺氧的促增殖作用<sup>[33]</sup>。

SU5416/慢性缺氧仅影响肺血管系统,而不影响其他器官的脉管系统<sup>[31-32]</sup>。SU5416 半衰期仅为 30 min,在体内被快速清除,在主要器官及肺中没有积累。但 SU5416 却具有长效抑制活性,这是由于 SU5416 与 EC 膜具有特异的亲合力,优先在 EC 膜浓缩富集,然后再将 SU5416 缓慢释放进入细胞质,并长时间保持 SU5416 对 VEGFR 的抑制作用<sup>[31]</sup>。内皮细胞生存信号丧失、氧化应激等参与了 SU5416/缺氧 PAH 模型机制调控,涉及 VEGFR、TGF- $\beta$ /BMP/Smad、Hif-1 $\alpha$ 、MAPK、AhR 等信号路径<sup>[30,32-33]</sup>。

在 SU5416/缺氧大鼠模型基础上发展的

SU5416/缺氧/常氧大鼠模型,即单次注射 20 mg/kg SU5416 和 3 周慢性缺氧后,恢复常氧 10~11 周<sup>[12,28,31]</sup>。该模型除了由 SU5416/缺氧驱动的严重 PAH 表型外,复氧 10 周导致严重丛状动脉病变形成,不仅重现了人类 PAH 疾病中所见的第一阶段,而且重现了第二阶段。在这个大鼠模型中,三种类型的丛状动脉病变都被重建,即同心层状新内膜、茎样和动脉瘤样复杂病变,这三种类型的复杂病变与人类晚期 PAH 发展的严重丛状动脉病变极为相似,同时 PAH 和右心室肥大显著增加<sup>[12]</sup>。这种大鼠模型成为 PAH 动物模型开发的标杆之作。

### 4.4 其他 PAH 双击模型

其他 PAH 双击模型,如 MCT/主动脉分流大鼠模型<sup>[34]</sup>、左肺切除/SU5416 大鼠模型<sup>[28]</sup>、SU5416/缺氧小鼠模型<sup>[30,32,35]</sup>、IL-6Tg+/缺氧小鼠模型<sup>[12]</sup>以及其他基因操纵/缺氧小鼠模型等,成模效果不如上面介绍的双击模型,实践中应用不多,不代表 PAH 研究的主流实验动物模型。

## 5 结语

PAH 是一种多病因、进行性、机制复杂的人类疾病,血管重构是其关键病理特征,开发能够重现人类 PAH 所有特征动物模型将为 PAH 病理生理机制研究和新的防治策略评价提供重要支撑。目前已开发的 PAH 动物模型均有一定的局限性,如经典 PAH 动物模型(缺氧模型和 MCT 模型)不能再现人类疾病的严重病理学特征(新内膜和丛状病变),而双击模型可以概括人类 PAH 更多的病理特征——进行性、不可逆的肺血管重构,重述严重的 PAH 病理特征。SU5416/缺氧模型可重现 PAH 晚期复杂的丛状病变,但不能重现血栓性病变。其他双击模型只重现 PAH 早期的丛状病变,MCT 双击模型还可呈现血栓性病变和炎症病变。因此,开发简便易行,能够重现人类 PAH 病理生理特征的动物模型仍是努力方向。在实际应用中,应当根据研究目的选择最合适的动物模型,推荐使用一种以上的 PAH 动物模型。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Wang D, Uhrin P, Mocan A, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation as a therapeutic target. Part 1: molecular targets and pathways [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(6): 1586-1607.
- [2] Kylhammar D, Rådegran G. The principal pathways involved in

- the *in vivo* modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary arterial remodelling and pulmonary hypertension [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017, 219(4): 728-756.
- [ 3 ] Tudor RM. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 643-649.
- [ 4 ] Sahay S. Evaluation and classification of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(14): 1789-1799.
- [ 5 ] Swinnen K, Quarek R, Godinas L, et al. Learning from registries in pulmonary arterial hypertension: pitfalls and recommendations [J]. *Eur Respir Rev*, 2019, 28(154): 190050.
- [ 6 ] Berghausen EM, Feik L, Zierden M, et al. Key inflammatory pathways underlying vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Herz*, 2019, 44(2): 130-137.
- [ 7 ] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management [J]. *BMJ*, 2018, 360: j5492.
- [ 8 ] Badlam JB, Bull TM. Steps forward in the treatment of pulmonary arterial hypertension: latest developments and clinical opportunities [J]. *Ther Adv Chronic Dis*, 2017, 8(2-3): 47-64.
- [ 9 ] Vaidya B, Pangallo M, Ruffenach G, et al. Advances in treatment of pulmonary arterial hypertension: patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27(8): 907-918.
- [ 10 ] Gomez AJG, Farkas L, Alhussaini AA, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(4): L363-L369.
- [ 11 ] Nogueira FR, Vitorino R, Ferreira R, et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: a network approach [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 35: 8-16.
- [ 12 ] Carman BL, Predescu DN, Machado R, et al. Plexiform arteriopathy in rodent models of pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(6): 1133-1144.
- [ 13 ] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(6): L1013-L1032.
- [ 14 ] Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(3): 297-309.
- [ 15 ] Church AC, Martin DH, Wadsworth R, et al. The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK- $\alpha$ : a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(4): L333-L347.
- [ 16 ] Lan B, Hayama E, Kawaguchi N, et al. Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension [J]. *PLoS One*, 2015, 10(1): e0117211.
- [ 17 ] 王蕊, 王志萍. 低氧性肺动脉高压的肺血管重建机制研究进展 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2020, 41(3): 301-304.
- Wang R, Wang ZP. Research advances in pulmonary vascular remodeling mechanism of hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Int J Anesth Resus*, 2020, 41(3): 301-304.
- [ 18 ] 李宜桐, 李勇. 低氧性肺动脉高压肺血管重塑机制的研究 [J]. *医学信息*, 2020, 33(15): 26-29.
- Li YT, Li Y. Research on mechanism of pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Med Inform*, 2020, 33(15): 26-29.
- [ 19 ] Ruiter G, de Man FS, Schaliq I, et al. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model [J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(2): 553-556.
- [ 20 ] Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury [J]. *BMC Pulm Med*, 2008, 8: 25.
- [ 21 ] Lamé MW, Jones AD, Wilson DW, et al. Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 29091-29099.
- [ 22 ] Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension-the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 1998, 1(4): 271-346.
- [ 23 ] 程筱涵, 齐靖, 白玉华, 等. 野百合碱诱导肺动脉高压模型的机制研究及潜在临床应用价值进展 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(27): 40-43.
- Cheng XH, Qi J, Bai YH, et al. Advanced mechanisms and potential clinical application value of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension animal model [J]. *Chin Med Herald*, 2020, 17(27): 40-43.
- [ 24 ] Dai Z, Zhao YY. Discovery of a murine model of clinical PAH: mission impossible? [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2017, 27(4): 229-236.
- [ 25 ] Lyle MA, Davis JP, Brozovich FV. Regulation of pulmonary vascular smooth muscle contractility in pulmonary arterial hypertension: implications for therapy [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 614.
- [ 26 ] Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension [J]. *J Vasc Res*, 2012, 49(1): 33-42.
- [ 27 ] Coste F, Guibert C, Magat J, et al. Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the disease [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 47.
- [ 28 ] Katz MG, Fagnoli AS, Gubara SM, et al. The left pneumonectomy combined with monocrotaline or sugen as a model of pulmonary hypertension in rats [J]. *J Vis Exp*, 2019, 2019: 145.
- [ 29 ] Lachant DJ, Meoli DF, Haight D, et al. Low dose monocrotaline causes a selective pulmonary vascular lesion in male and female pneumonectomized rats [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(1): 51-61.

- [30] Weissmann N. VEGF receptor inhibition as a model of pulmonary hypertension in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(10): 1103-1105.
- [31] Sakao S, Tatsumi K. The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension [J]. *Respiration*, 2011, 81(3): 253-261.
- [32] Ciuculan L, Bonneau O, Hussey M, et al. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(10): 1171-1182.
- [33] Strielkov I, Weissmann N. Role of the aryl hydrocarbon receptor in Su5416/hypoxia-induced pulmonary hypertension: a new mechanism for an “Old” model [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(3): 279-281.
- [34] van der Feen DE, Weij M, Smit-van Oosten A, et al. Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension [J]. *J Vis Exp*, 2017, 120: 55065.
- [35] Vitali SH, Hansmann G, Rose C, et al. The Sugden 5416/hypoxia mouse model of pulmonary hypertension revisited: long-term follow-up [J]. *Pulm Circ*, 2014, 4(4): 619-629.

[收稿日期] 2020-09-24

师长宏. 前列腺癌异质性转化 PDX 模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 242-247.

Shi CH. Research progress in patient-derived tumor xenograft models of heterogeneous transformation of prostate cancer [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 242-247.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.015

# 前列腺癌异质性转化 PDX 模型研究进展

师长宏\*

(空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

**【摘要】** 异质性是前列腺癌的主要临床特征,也是影响其治疗效果的主要因素。建立基于临床肿瘤标本的异种移植转化模型,对于前列腺癌的研究具有重要意义。本文就前列腺癌的临床异质性进行总结,综述模拟临床特征的 PDX 模型研究进展,重点关注急需的异质性转化模型,以期为前列腺癌的临床转化机制研究和靶向药物筛选提供理想的动物模型。

**【关键词】** 异质性转化;前列腺癌;病人来源异种移植模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0242-06

## Research progress in patient-derived tumor xenograft models of heterogeneous transformation of prostate cancer

SHI Changhong\*

(Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

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

**【Abstract】** Heterogeneous transformation is not only the major clinical feature of prostate cancer, but also the main factor affecting therapeutic outcome. It is of great importance for the study of prostate cancer to establish patient-derived tumor xenograft (PDX) transformation models. In this paper, we discuss the clinical heterogeneity of prostate cancer, review research progress in PDX models simulating clinical features, and focus on the urgently needed heterogeneous transformation model. We describe the ideal animal model needed for the study of prostate cancer transformation mechanisms and targeted drug screening.

**【Keywords】** heterogeneous transformation; prostate cancer; patient-derived xenograft model

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

前列腺癌(PCa)是全球男性第二大恶性肿瘤,异质性是其主要临床特征<sup>[1]</sup>。虽然雄激素剥夺可有效控制肿瘤生长,但最终会形成去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC),进一步雄激素受体(AR)靶向治疗在延长患者生存期的同时会诱导神经内分泌(neuroendocrine prostate cancer, NEPC)和侵袭变异性(aggressive variant,

AVPC)前列腺癌,出现特征性骨转移,导致难以治愈<sup>[2]</sup>。驱动Pca发生系列转化的分子机制并不是很清楚,主要是缺乏模拟临床特征的异质性转化模型。本文就前列腺癌的临床异质性进行总结,综述基于临床肿瘤病人异种移植(patient derived xenograft, PDX)模型的研究进展,重点关注急需的Pca异质性转化模型,以期为Pca的转化机制研究

[基金项目]国家自然科学基金(32070532)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(32070532).

[作者简介]师长宏(1973—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤动物模型的制备与评价。Email: changhong@fmmu.edu.cn

和靶向药物筛选提供理想的动物模型。

## 1 前列腺癌具有独特的异质性, 需要体内模型展示其进展转化特征

前列腺癌发生和发展的重要因素是雄激素传导信号。手术或药物去势是进展性 PCa 患者标准治疗方式, 然而, 大多数 PCa 患者最初对雄激素剥夺治疗有积极反应, 但在去势 2 ~ 3 年后病情复发, 进展为去势抵抗性前列腺癌 (CRPC) [2]。此时肿瘤细胞为了生长和存活由对雄激素具有不同程度依赖性的混合细胞组成, 具有较强的异质性 [3] (图 1)。在 CRPC 中, 疾病进展最常见的是雄激素受体 (androgen receptor, AR) 信号的再激活, 此时, 多西紫杉醇或新一代雄激素受体抑制剂, 如恩杂鲁胺 (ENZ) 和阿比特龙 (ABI) 被用于 CRPC 的治疗, 在显著提高生存率和生活质量的同时, 大多数患者最终会对这些药物也产生耐药性, 诱导出现 NEPC 的转化和 AVPC [4], 导致临床难以治愈。因此, 雄激素剥夺治疗在诱导 Pca 异质性转化中发挥了最重要作用。

NEPC 是 PCa 的一种恶性突变, 保留了早期 PCa 基因组特征并获得新的分子变化, 此时 AR 信号减弱, 具有高进展风险, 包括促使转移的发生。雄激素阻断是导致患者 NEPC 发生的重要原因, 已证实 CRPC 病人治疗后发生的 NEPC 克隆来自 CRPC-腺癌前体, 而不是预先存在的 NEPC 克隆, 可以基于不同的分子改变将 CRPC-NEPC 从 CRPC-腺癌中区分出来 [5]。Beltran 等 [6] 对患者进行了前列腺切除术, 发现伴有局部淋巴结受累, 最初采用雄激素剥夺 (androgen deprivation therapy, ADT) 治疗, 然后在发生转移和去势抵抗时进行化疗, 数月后, 骨盆软组织活检发现已进展为 NEPC。

AVPC 又称间变性前列腺癌, 在临床上被定义为具有转移特征的 CRPC (mCRPC), 包括内脏转移、骨转移或骨盆中淋巴结转移等 [7], 其中骨转移最常见。临床证实具有侵袭性特征的 CRPC 更适合铂治疗, 如果在 CRPC 进展期间能够及早检测到 NEPC 改变, 则可选择这些个体用于 NEPC 治疗 (铂化疗) 而不是 AR 靶向治疗 [6]。因此, 迫切需要与临床相似的体内模型来充分展示前列腺癌 CRPC、NEPC 和 AVPC 的进展转化特征, 了解其异质性, 开发具有针对性的治疗策略。

## 2 细胞系移植 (CDX) 模型的特征局限, 缺乏异质性

PCa 的研究由于缺乏模拟临床特征的系统性模型一直受到影响。目前常用的细胞系移植 (Cell derived xenograft, CDX) 模型在 ATCC 已报道 1000 个癌细胞系中仅有 7 种 Pca 细胞系 [7-8], 但这些细胞系和模型已应用多年, 在前列腺癌发病机制和药物筛选研究方面发挥了重要作用。比如, AR 对于雄激素依赖性 Pca 病情的发展至关重要, 它激活雄激素后, 调节前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA) 表达并诱导 PCa 细胞的增殖, 因此, Pca 细胞系应关注完整 AR 的表达和雄激素依赖性。LNCaP 是雄激素依赖的代表性细胞系, 可以进一步形成 AR 非依赖性的亚系 LNCaP C4-2, 该细胞具有突变的雄激素受体, 对雄激素有反应性, 分泌 PSA, 更具临床相关性, 主要用于 PCa 发病机制研究, 但该细胞系在体内致瘤性差, 由于雄激素受体的配体结合域中的点突变导致其对抗雄激素的反应异常, 使其具有局限性 [9]。“经典”模型是雄激素非依赖性的 PC3 和 DU145 细胞系, 前者源于人 PCa 的骨转移瘤, 后者具有较低的转移潜能, 来源于人

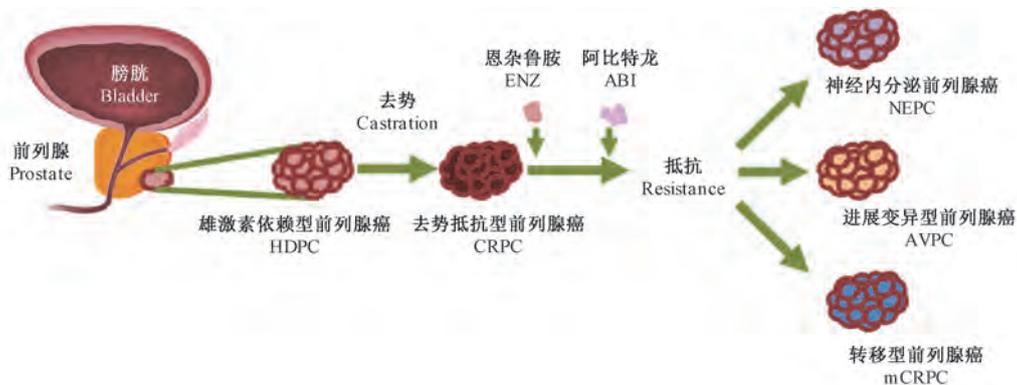


图 1 前列腺癌临床异质性特征

Figure 1 Clinical heterogeneity character of prostate cancer

PCa 的脑转移瘤,这两种细胞裸鼠移植成瘤性较好,主要用于体内筛选实验研究,但二者均缺乏 AR 和 PSA 的表达<sup>[10]</sup>。22Rv1 细胞源于原发性 PCa 骨转移瘤,属于雄激素非依赖性但具有雄激素反应性,表达 AR,但 PSA 低表达,可在裸鼠体内形成肿瘤。NCI-H660 源于前列腺癌淋巴结转移灶,属于雄激素非依赖性,半悬浮生长,形态为上皮神经内分泌样,AR 和 PSA 表达均为阴性。上述细胞系均只体现了前列腺癌某个阶段特征,许多临床表型未在细胞系中出现,代表性有限,作为临床前研究模型不甚理想<sup>[7]</sup>。在临床多见的 CRPC 病人中,治疗的巨大选择压力可导致前列腺癌异质性显著增加,比如 AR 和 PSA 表达水平的变化,雄激素受体的突变,NEPC 表型的出现等。因此,需要大量不同的 CRPC 系列模型来代表不同的抗性机制<sup>[9]</sup>,尤其是动态模型来体现其转化特征。而 CDX 模型仅体现出临床病人某一阶段的静态特征,在模拟前列腺癌多样性和疾病进展过程方面明显不足,因此,发展一种基于同一标本能够诱导反映前列腺癌转化全部过程的模型就成为当前研究的必然趋势。

### 3 PDX 模型具有原发瘤的主要特征,但未能有效体现其临床异质性转化

将 Pca 病人新鲜的肿瘤组织移植到免疫缺陷小鼠建立的原发性 PDX (patient derived xenograft) 模型较好地保持了原发瘤的异质性<sup>[11]</sup>。由于植入免疫缺陷小鼠的 Pca 瘤组织是对雄激素具有不同程度依赖性的混合细胞组成,在未处理的雄性小鼠中,雄激素依赖性细胞有生长优势并最终发展成雄激素敏感的移植模型;雄激素非依赖的肿瘤细胞在去势小鼠体内生长,显示去势抗性,最终表现为激素依赖(hormone naïve primary prostate cancer, HNPC)或 CRPC 特征。该类模型可用于基因组和转录组的分析,评估人 PCa 中异常遗传变化和基因谱,研究模型对雄激素剥夺和多西他赛等药物治疗的反应<sup>[12-13]</sup>。基因组表征显示,在 PCa 患者中检测到的特定基因组异常,例如 PTEN 抑制基因的突变和特定基因的遗传改变在 PDX 移植瘤中很普遍,因此该类模型适合于阐明 Pca 的发生机制<sup>[14]</sup>。目前,前列腺癌 PDX 模型总体成功率较低(10% ~ 30%),首代成瘤时间最长为 12 个月,再次传代需要 4 ~ 16 周<sup>[15]</sup>。大多数前列腺癌 PDX 模型为原发性激素依赖型,缺乏模拟临床特征的 CRPC 转化模型。

### 4 雄激素剥夺可诱导前列腺癌 PDX 模型发生 CRPC 和 NEPC

2016 年 ~ 2017 年 Prostate 连续发文报道了前列腺癌 KuCaP 系列<sup>[16]</sup>和 LuCaP 系列<sup>[17]</sup> PDX 模型,去势后可发生 CRPC 和 NEPC 的转化,提示诱导 PDX 模型发生转化的可行性。KuCaP 系列 PDX 模型来自不同类型的 Pca 临床标本,移植于 SCID 小鼠形成肿瘤模型<sup>[16]</sup>。KuCaP1 来自雄激素抵抗的 PCa 患者肝转移标本,AR 突变为 W742C,移植小鼠去势后肿瘤快速消失,长时间不再复发,AR 和 PSA 阳性,为雄激素依赖性 PDX 模型。KuCaP2 来自于经根治性前列腺切除术后的局部复发肿瘤,雄激素依赖,携带野生型 AR,产生 PSA,去势后肿瘤快速消退,1 ~ 2 月后重新生长,发展为 CRPC。KuCaP3 来自 CRPC 患者,移植小鼠去势后快速消退,多月后重新生长,模拟临床 CRPC 症状,AR 和 PSA 表达阳性,神经内分泌标志物 CGA 阳性,具有人类 NEPC 特征。LuCaP 系列来自转移灶的外科手术标本,包括了 21 种 PCa PDX 模型,初始生长时间从 4 个月到 12 个月<sup>[17]</sup>。一些 PDX 模型肿瘤在去势后消退,还有一些去势后重新生长的肿瘤植入去势小鼠,建立去势抗性模型。该系列模型重现了肿瘤患者组织学特征,包括分化良好的腺癌,低分化腺癌和神经内分泌癌<sup>[18]</sup>。代表了人类 Pca 的主要基因组和表型特征,包括雄激素受体的扩增,PTEN 缺失,TP53 缺失和突变,RB1 缺失,反映了 CRPC 的多样化分子组成。

模拟临床手术去势是诱导前列腺癌 PDX 模型发生 CRPC 的重要手段。Hao 等<sup>[19]</sup>将 10 例雄激素依赖性 PDX 模型进行去势手术,肿瘤体积急剧减小,血清 PSA 水平降低。12 周后,7 例重新生长,血清中 PSA 水平增加,形成与临床 ADT 手术病人相似的 CRPC,同时发现生长因子受体结合蛋白 10 (GRB10)驱动了 CRPC 的发生。KuCaP2 移植瘤小鼠去势后肿瘤快速消退,1 ~ 2 月后重新生长,发展为 CRPC,Array 分析发现前列腺素 E 受体 EP4 亚型表达显著上调,特异性 EP4 拮抗剂可用于 CRPC 治疗<sup>[20]</sup>。提示诱导发生 CRPC 的 PDX 模型可为临床 CRPC 的治疗提供新靶点。

Lin 等<sup>[21]</sup>成功建立了可以由 ADT 诱导的前列腺癌向 NEPC 转化的前列腺癌 PDX 模型 LTL331,原发模型是典型的腺癌,在雄激素刺激下表达 AR 和 PSA,去势后可出现抗性生长并转化为 NEPC 特

征的 LTL331R, 表达一系列神经内分泌标志物, 包括 SYP ( Synaptophysin ), CGA ( ChromograninA ) 和 CD56。当移植到未去势和去势的小鼠, LTL331R 保留其 NEPC 表型和雄激素非依赖性生长, 这表明 NEPC 转化的稳定和不可逆性<sup>[14]</sup>。该研究进一步发现胎盘基因 PEG10 ( growth factor receptor bound protein 10 ) 在转化过程中表达显著升高, NEPC 分化过程中 PEG10 受 AR 和 E2F/RB 信号分子动态调控, 并且 PEG10 促进 NEPC 细胞的增殖和侵袭<sup>[22]</sup>。同样, Jongsma 等<sup>[23]</sup>将雄激素依赖性前列腺癌异种移植 PC-310, 经过长时间的雄激素剥夺处理后, 也可分化出现 NEPC 表型。

## 5 PDX 转化模型少有临床常见骨转移特征

AVPC 的主要特征是形成转移性前列腺癌, 目前尚无有效的治疗方法, 缺乏对疾病进展机制的了解<sup>[7]</sup>。转移的发生受肿瘤内在因素和移植微环境的共同影响, 在 mCRPC 阶段出现特征性成骨细胞骨转移是造成 PCa 发病和死亡的主要原因。现有的前列腺癌 PDX 模型少有骨转移的发生, 主要是因为 Pca 骨转移的发生不仅受肿瘤内在因素的影响 ( 具有骨转移潜能 ), 而且受促进肿瘤细胞亚群转移的微环境控制<sup>[12]</sup>。MDA-PCa-118a 和 MDA-PCa-118b 均来自 PCa 骨转移标本, 移植于去势的雄性裸鼠皮下可以生长, 组织病理学分析显示移植瘤周围被成骨细胞组成的骨基质包围, 骨与肿瘤交界处存在成骨细胞、钙化基质和破骨细胞<sup>[24]</sup>。注射到 SCID 小鼠的股骨表现出强烈的成骨细胞反应, 诱导新生骨形成, 但没有观察到与临床相似的骨转移发生。将来自 LuCaP 的 PDX 肿瘤细胞直接注射到小鼠胫骨中, 发现只有部分能在骨中增殖, 同样, 该模型也不能自发地从皮下转移到骨<sup>[25]</sup>。目前所有可用的成骨细胞骨转移模型都是雄激素响应, 但是, 是否需要雄激素受体用于 PCa 细胞诱导新骨形成, 以及诱导的新骨如何影响 PCa 细胞在骨的生长和存活, 相应机制尚不完全清楚, 主要是因为很少有模型重现 PCa 与骨的相互作用<sup>[15]</sup>。

## 6 展望

### 6.1 AR 抑制剂可能诱导 PDX 模型发生 NEPC 和 AVPC 的转化

目前针对 NEPC 的治疗效果不佳, 由于缺乏相应的转化模型, 无法深入研究 NEPC 表观遗传特性,

使得 NEPC 临床诊断变得困难<sup>[6]</sup>。如果能够利用 PDX 模型复制 Pca 从腺癌到 NEPC 的演变则可以深入揭示 NEPC 的发生机制, 评估肿瘤对 NEPC 靶向药物的反应, 阐明 Pca 进展和治疗抵抗的机制。KuCaP 和 LuCaP 两种系列 PDX 模型虽然具有前列腺癌主要临床特征, 但未能有效体现 NEPC 复杂的转化过程。由于临床 Pca 病人大部分通过治疗存在雄激素依赖向非依赖的转化, 因此, 理想的前列腺癌 PDX 模型应该是通过控制雄激素, 模仿临床的主要特征, 即 CRPC 和 NEPC 复杂的转换过程<sup>[23]</sup>。AR 信号是前列腺发育过程中上皮细胞分化所必需的因素, 其抑制剂可促发前列腺癌细胞重编程, 通过转分化机制发展为 NEPC。所以, AR 靶向药物用于 CRPC 的治疗, 在提高病人存活期的同时, 大多数患者会产生耐药, 诱导 NEPC 和 AVPC 的发生。新型的 AR 靶向药物阿比特龙 ( 或是恩杂鲁胺 ) 被批准用于临床 CRPC 的治疗, 但大多数患者会诱导 NEPC 和 AVPC 前列腺癌的发生, 产生耐药性<sup>[7]</sup>。因此, AR 靶向抑制剂可诱导前列腺癌 PDX 模型发生 NEPC 和 AVPC 转化。

### 6.2 筛查骨转移潜能标本, 进行原位移植促进前列腺癌骨转移的发生

根据基因型特征筛选具有转移潜能的前列腺癌标本可能促发骨转移。Y 染色体特有的去甲基酶 JARID1D 具有抑制前列腺癌侵袭的作用, 其机制为 JARID1D 可特异性结合侵袭转移相关基因的启动子, 抑制转移的发生, 实验证实转移性 Pca 中 JARID1D 的表达通常是缺失的<sup>[26-27]</sup>。单胺氧化酶 A ( monoamine oxidase A, MAOA ) 是线粒体膜结合酶。已证实 MAOA 是通过激活肿瘤基质中的旁分泌 Shh 信号, 成为临床上 PCa 骨和内脏转移的重要介质<sup>[28]</sup>。MAOA 通过刺激 IL-6 从成骨细胞释放, 利于骨微环境中的肿瘤细胞生长, 并通过成骨细胞产生核因子  $\kappa$  B 受体活化因子配体 RANKL ( receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand ) 和 IL-6 活化破骨细胞, 触发骨骼定植<sup>[29]</sup>。已证实 MAOA 高表达的前列腺癌标本具有强的骨转移潜能。成纤维细胞生长因子 9 ( fibroblast growth factor 9, FGF9 ) 是 FGF 家族的成员之一, 在前列腺癌细胞中表达<sup>[30]</sup>。骨转移标本 MDA PCa 118a 和 118b 植入后 SCID 小鼠股骨后诱导了强烈的成骨反应, 基因表达谱显示 FGF9 是上调最多的基因, 诱导成骨细胞增殖<sup>[22]</sup>。联合进行上述三个基因的筛查可能获得高转移潜

## 能的 PDX 模型

前列腺癌转移的发生与移植微环境密切相关。无论是小鼠肾包膜移植还是皮下移植,都少有骨转移的发生。Wang 等<sup>[31]</sup>报道将 Pca 患者的肿瘤组织移植到补充有睾酮的雄性 NOD-SCID 小鼠肾包膜。连续移植 5 次后,将瘤组织移植到小鼠前列腺中,将淋巴结转移灶(Pca-met-1)再次移植小鼠前列腺中,可发生多个器官转移,包括肺、肝、淋巴结和骨,出现溶骨现象,AR 和 PSA 的表达与原发瘤一致,提示前列腺原位移植是促发 Pca 骨转移的重要条件。

### 6.3 理想的 PDX 模型应完整反映前列腺癌进展各阶段的生物学特征

与其他肿瘤相比,前列腺癌 PDX 模型数量较少,能够形成一系列模拟疾病进展的模型更有限,且关于前列腺癌 PDX 模型的数据库尚不完善。虽然 AR 信号是调控 Pca 异质性转化的重要因素,但缺乏其调控骨转移的直接证据,主要是缺乏与临床相近的 Pca 模型来动态展示雄激素依赖到非依赖直至骨转移的发生。

已报道的 KuCaP 系列和 LuCaP 系列 PDX 模型也具有部分临床转化特征,但均为各个阶段的孤立模型,形成不同的系列组合,不能完整反映 Pca 临床转化进程,且未发生骨转移;上述模型的标本来自进展性或转移病人,仅代表一小部分癌症表型,不能完全概括其异质性<sup>[27]</sup>;一些模型缺乏 Pca 细胞的标志,如 AR 和 PSA 的表达<sup>[6]</sup>。因此,完整的模拟临床特征的动物模型应反映 PCa 进展的早期阶段至晚期直至转移期的生物学特性,包括 CRPC 的发生、从腺癌到 NEPC 的转化以及转移的发生,特别是同一标本能够诱导转化反应的全部过程,获得配对比较模型,用于基因型和表型的比较研究,探索其异质性发生的机制。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [ 2 ] Shigeta K, Kosaka T, Hongo H, et al. Castration-resistant prostate cancer patients who had poor response on first androgen deprivation therapy would obtain certain clinical benefit from early docetaxel administration [J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(5): 546-553.
- [ 3 ] Akamatsu S, Inoue T, Ogawa O, et al. Clinical and molecular features of treatment-related neuroendocrine prostate cancer [J]. Int J Urol, 2018, 25(4): 345-351.
- [ 4 ] Shishodia G, Koul S, Koul HK. Protocadherin 7 is overexpressed in castration resistant prostate cancer and promotes aberrant MEK and AKT signaling [J]. Prostate, 2019, 79(15): 1739-1751.
- [ 5 ] Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer [J]. Nat Med, 2016, 22(3): 298-305.
- [ 6 ] Beltran H, Rickman DS, Park K, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets [J]. Cancer Discov, 2011, 1(6): 487-495.
- [ 7 ] Wu X, Gong S, Roy BP, et al. Current mouse and cell models in prostate cancer research [J]. Endocr Relat Cancer, 2013, 20(4): 155-170.
- [ 8 ] Vlachostergios PJ, Puca L, Beltran H. Emerging variants of castration-resistant prostate cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2017, 19(5): 32.
- [ 9 ] Castanares MA, Copeland BT, Chowdhury WH, et al. Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin [J]. Prostate, 2016, 76(2): 215-225.
- [ 10 ] van Weerden WM, Bangma C, de Wit R. Human xenograft models as useful tools to assess the potential of novel therapeutics in prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2009, 100(1): 13-18.
- [ 11 ] 赵宁宁, 张正, 王彦博, 等. 基于人源化免疫重建的患者来源肿瘤组织异种移植模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 804-808.
- [ 12 ] Zhao NN, Zhang Z, Wang YB, et al. Research progress on humanized patient-derived xenograft (Hu-PDX) models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 804-808.
- [ 12 ] 陈薛, 谭邓旭, 赵宁宁, 等. 前列腺癌人源性异种移植裸鼠模型的建立与治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 38-43.
- [ 12 ] Chen X, Tan DX, Zhao NN, et al. Establishment and treatment of prostate cancer PDX model [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 38-43.
- [ 13 ] Inoue T, Terada N, Kobayashi T, et al. Patient-derived xenografts as *in vivo* models for research in urological malignancies [J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(5): 267-283.
- [ 14 ] Lange T, Oh-Hohenhorst SJ, Joosse SA, et al. Development and characterization of a spontaneously metastatic patient-derived xenograft model of human prostate cancer [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17535.
- [ 15 ] Shi C, Chen X, Tan D. Development of patient-derived xenograft models of prostate cancer for maintaining tumor heterogeneity [J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(5): 519-528.
- [ 16 ] Yoshikawa T, Kobori G, Goto T, et al. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation [J]. Prostate, 2016, 76(11): 994-1003.
- [ 17 ] Nguyen HM, Vessella RL, Morrissey C, et al. LuCaP prostate cancer patient-derived xenografts reflect the molecular heterogeneity of advanced disease and serve as models for evaluating cancer therapeutics [J]. Prostate, 2017, 77(6): 654-671.
- [ 18 ] Young SR, Saar M, Santos J, et al. Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts [J].

- Prostate, 2013, 73(12): 1251–1262.
- [19] Hao J, Ci X, Xue H, et al. Patient-derived hormone-naive prostate cancer xenograft models reveal growth factor receptor bound protein 10 as an androgen receptor-repressed gene driving the development of castration-resistant prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2018, 73(6): 949–960.
- [20] Terada N, Shimizu Y, Kamba T, et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1606–1615.
- [21] Lin D, Wyatt AW, Xue H, et al. High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1272–1283.
- [22] Kim S, Thaper D, Bidnur S, et al. PEG10 is associated with treatment-induced neuroendocrine prostate cancer [J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(1): 39–49.
- [23] Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Androgen deprivation of the PC-310 correction of prohormone convertase-310 human prostatecancer model system induces neuroendocrine differentiation [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 741–748.
- [24] Li ZG, Mathew P, Yang J, et al. Androgen receptor-negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(8): 2697–2710.
- [25] Young SR, Saar M, Santos J, et al. Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts [J]. *Prostate*, 2013, 73(12): 1251–1262.
- [26] Li N, Dhar SS, Chen TY, et al. JARID1d is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(4): 831–843.
- [27] Wu P, Xu R, Chen X, et al. Establishment and characterization of patient-derived xenografts for hormone-naïve and castrate-resistant prostate cancers to improve treatment modality evaluation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3848–3861.
- [28] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase a mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(7): 2891–2908.
- [29] Wu JB, Yin L, Shi C, et al. MAOA-dependent activation of Shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(3): 368–382.
- [30] Huang Y, Jin C, Hamana T, et al. Overexpression of FGF9 in prostate epithelial cells augments reactive stroma formation and promotes prostate cancer progression [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(8): 948–960.
- [31] Wang Y, Xue H, Cutz JC, et al. An orthotopic metastatic prostate cancer model in SCID mice via grafting of a transplantable human prostate tumor line [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(11): 1392–1404.

[收稿日期] 2020-09-21

黄涛,张海涛,李志雄,等. 非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 248–255.  
Huang T, Zhang HT, Li ZX, et al. Research progress in non-human primate virus infection models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 248–255.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.016

# 非人灵长类动物在病毒感染模型中的研究进展

黄涛<sup>1,2,3</sup>, 张海涛<sup>1,2,3</sup>, 李志雄<sup>2</sup>, 曹华<sup>2,3\*</sup>, 王心睿<sup>2,3\*</sup>

(1. 福建省儿童医院,福州 350011; 2. 福建医科大学附属福建省妇幼保健院国家卫健委非人灵长类生育调节技术评价重点实验室,福州 350001; 3. 福建医科大学附属福建省妇幼保健院医学研究中心,福州 350001)

**【摘要】** 动物疾病模型作为研究人类疾病的中介,在医学研究中发挥着巨大的作用。非人灵长类动物与人类的免疫学和生理学相似性,使非人类灵长类动物模型在研究病毒发病机理、免疫力、疫苗和药物抗感染功效等方面具有重要价值,对研究人类病毒感染性疾病以及新型病毒如 SARS-CoV-2 的治疗和预防发挥着不可或缺的作用。本文主要介绍了非人灵长类动物作为实验动物模型在人类几种常见的病毒感染性疾病中的研究进展,以及在研究新型冠状病毒 SARS-CoV-2 中发挥的重要作用。

**【关键词】** 动物模型;非人灵长类动物;病毒感染模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0248-08

## Research progress in non-human primate virus infection models

HUANG Tao<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Haitao<sup>1,2,3</sup>, LI Zhixiong<sup>2</sup>, CAO Hua<sup>2,3\*</sup>, WANG Xinrui<sup>2,3\*</sup>

(1. Fujian Children's Hospital, Fuzhou 350011, China. 2. Key Laboratory of Technical Evaluation of Fertility Regulation for Non-human Primate, National Health Commission, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001.

3. Medical Research Center, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou 350001)

Corresponding author: WANG Xinrui. E-mail:waxiru@sjtu.edu.cn; CAO Hua. E-mail:caohua69@fjmu.edu.cn

**【Abstract】** In the study of human diseases, animal models play a critical role in medical research. The immunological and physiological similarities between non-human primates and humans have prompted non-human primate models to be used to study virus pathogenesis, immunity, and the efficacy of vaccines and drugs. They play an indispensable role in the study of human viral infectious diseases, including emerging new viruses, such as SARS-CoV-2. In this article, we focus on the research progress in non-human primates as experimental animal models of several important human viral infectious diseases, including the important role of non-human primates in the study of SARS-CoV-2.

**【Keywords】** animal models; non-human primates; virus infection model

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

非人灵长类动物(non-human primates, NHP)在生理、认知能力、神经解剖学、社会复杂性、繁殖和发育等方面与人类具有高度相似性<sup>[1]</sup>。与人类的遗传

物质有 75% ~ 98.5% 的同源性<sup>[2]</sup>,这种同源性在基础和转化生物医学研究中发挥着重要的作用。啮齿类动物虽用途广泛,对回答许多基础研究问题非常有

**【基金项目】** 中央引导地方科技发展专项资金(2019L3019)。

Funded by the Chinese Central Government Guides Local Special Funds for Scientific and Technological Development(2019L3019).

**【作者简介】** 黄涛,男,硕士,研究方向:非人灵长类动物疾病模型及药物安全性评价。Email:ht562916161@163.com

**【通信作者】** 王心睿,男,博士,助理研究员,研究方向:表观遗传学。Email:waxiru@sjtu.edu.cn;

曹华,男,博士,教授,主任医师,研究方向:先天性心脏病。Email:caohua69@fjmu.edu.cn。

\* 共同通信作者

帮助,但由于缺乏灵巧的大脑结构,免疫系统和运动技能欠佳以及新陈代谢功能的差异等,限制了它们的用途。许多病原体(如流感、HIV 或登革热)对各自的宿主呈高度嗜性,用小鼠不能复制这种人类疾病,因此也限制了将小鼠用作某些传染病的模型<sup>[3-4]</sup>。由于 NHP 与人类在生理和解剖学上的相似性,在某些方面的研究具有独特的优势和价值(表 1),尤其对病

原体的易感性,在病毒感染性疾病动物模型上更具有优势<sup>[5]</sup>,是研究人类传染病最广泛使用的动物模型<sup>[6]</sup>。NHP 已经用于研究人类感染已有数十年的历史,在控制疾病参数和不受限制的组织获取能力的辅助下,在疫苗、药物疗法和其他免疫治疗方式的开发中发挥了重要作用。本文着重介绍 NHP 在病毒感染性疾病动物模型中的研究进展。

表 1 非人灵长类动物模型在生物医学研究领域的主要优势

Table 1 Major advantages of non-human primate models for the areas of biomedical research

研究领域 Area of research	非人灵长类动物模型优势 Advantages of non-human primates models
传染性疾病 Infectious disease	在传染性感染具有极易感性 Very susceptible to infectious diseases
生殖学 Reproductive	生殖生理学方面的内分泌调节与人类具有相同的关键性特征,包括下丘脑反馈、卵巢功能、子宫和阴道的生理、妊娠以及绝经的建立与控制等方面 Endocrine regulation in reproductive physiology has the same key characteristics as humans, including hypothalamic feedback, ovarian function, physiology of the uterus and vagina, pregnancy, and the establishment and control of menopause
免疫学 Immunology	在免疫系统的发育成熟方面与人类最为相似 Most similar to humans in terms of the development and maturity of the immune system
神经科学 Neuroscience	NHP 大脑在几个方面与人的大脑非常相似,包括脑电生理、皮质神经元的数量和密度、额叶前额皮质大和髓鞘形成 NHP brain is very similar to the human brain in several aspects, including electrophysiology, the number and density of cortical neurons, the size of the frontal prefrontal cortex, and myelination
药理学 Pharmacology	具有与人相似的药物敏感性,并用于研究药物的个体差异等 Has drug sensitivity similar to humans, and is used to study individual differences in drugs
遗传学 Genetics	与人类具有相同的特定疾病相关的基本遗传过程,例如产生前列腺特异性抗原基因 KLK3 等 Have the same basic genetic process related to specific diseases as humans, such as the production of the prostate specific antigen gene KLK3
认知 Cognition	与其他哺乳动物相比,NHP 的大脑相对较大,对于测试人类认知进化模型具有无限的价值 Compared with other mammals, NHP has a relatively large brain, which is of infinite value for testing human cognitive evolution models
衰老 Senescence	与人类在衰老相关的脑功能专业化方面的相似性更高,例如核团、海马体的投射途径和神经支配方式 It is more similar to the specialization of human brain functions related to aging, such as the nucleus, the projection pathways of the hippocampus, and the innervation method
行为学 Behavior	与人类社会和环境复杂性的相似能够在行为学上进行社会学和心理学相关研究 Similar to the complexity of human society and environment, enabling sociological and psychological research in behavioral sciences

## 1 HIV 病毒感染模型

人类艾滋病(AIDS)是由 HIV 病毒引起,该病毒被细分为 HIV-1 型(M、N、O 和 P 亚型)和 HIV-2 型(A 至 I 亚型),其中 HIV-1 型中 M 亚型在世界上最普遍存在<sup>[7]</sup>。通过猿猴/人类免疫缺陷病毒(SHIV)感染 NHP,能够模拟人类 HIV 感染的大多数病毒学、免疫学和临床标志,现已用来研究 HIV/AIDS 的传播、生理病理机制、免疫学和治疗干预措施的最合适模型<sup>[8]</sup>,促进了有关 cART(联合抗逆转录病毒疗法)治疗、免疫细胞耗竭效应、中和抗体的给药或产生、疫苗疗法和潜伏期逆转剂等的更深入研究<sup>[9]</sup>。

病毒感染诱导产生的抗体(Abs)可被直接用作预防或治疗,并且间接地用于帮助指导抗 HIV 疫苗的设计<sup>[10]</sup>。HIV 病毒通过快速突变表面抗原蛋白位点从而避免被体内免疫系统反应产生的抗体而消灭,而广义中和抗体(bnAbs)能够靶向这些病毒带有高度保守的功能相关暴露位点而发挥作用<sup>[11]</sup>。通过 SHIV 感染的恒河猴,刺激宿主免疫反应产生的中和 HIV-1 特异性单克隆抗体具有强效的治疗效果<sup>[12]</sup>。在非人灵长类动物中感染猿猴/人类免疫缺陷病毒(SHIV)能够像人类一样产生 bnAbs,这类 SHIV/NHP 感染的恒河猴模型可作为研究 bnAbs 的理想动物模型<sup>[13]</sup>,为 HIV-1 的单克隆抗体疗法提供研究思路。研究者从 HIV 感染者体内分离出单独

抗体,通过三元特异性中和抗体组合,从中找出了最佳的组合方式:VRC01 搭配 PGDM1400 和 10E8v4,(三种抗体分别与病毒的 CD4<sup>+</sup>结合位点,近膜外缘区域(MPER)和 V1V2 多糖位点结合),在 SHIV 非灵长类动物模型中具有完全的免疫力<sup>[14-15]</sup>。

HIV 病毒的感染有时会导致各种神经系统症状,统称为神经艾滋病(Neuro AIDS)。艾滋病感染早期,Neuro AIDS 最明显的表现形式为 HIV 痴呆,在晚期表现为认知、运动和行为症状<sup>[16]</sup>。建立 AIDS 和 Neuro AIDS 的非人类灵长类动物模型对于研究 HIV 感染中枢神经系统、神经病理学中发生的单核细胞和巨噬细胞蓄积至关重要。巨噬细胞的转移在神经系统发病中具有重要的作用<sup>[17]</sup>,通过单克隆抗体实验性耗竭 CD8 淋巴细胞后感染的 SIVmac251 恒河猴得到 CD8 淋巴细胞耗竭模型,能够快速引起艾滋病感染和持续的高病毒血症<sup>[18]</sup>,并加速巨噬细胞在中枢神经系统中的聚集<sup>[19]</sup>。同样使用重组抗 CD4 抗体(CD4R1)在 SIVmac251 感染前消耗 RM CD4<sup>+</sup>T 细胞建立的恒河猴模型,显示病毒复制大量增加并发展为艾滋病,巨噬细胞占淋巴结和粘膜组织中所有 SIV vRNA<sup>+</sup>细胞的 80%,促炎性单核细胞发生大量扩增,小胶质细胞也导致感染并异常激活<sup>[20]</sup>。通过分子克隆得到 SIVsm804E-CL757(CL757)衍生病毒进一步开发了 Neuro AIDS 模型,诱导神经系统疾病过程中没有快速进展,因此更能反映出 HIV 感染中 Neuro AIDS 的进程,为研究中枢神经系统疾病进展和研究中枢神经系统病毒库提供有效模型<sup>[21]</sup>。

## 2 HBV 感染模型

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球慢性肝病的主要原因之一。病毒感染与细胞炎症、氧化应激和 DNA 损伤相关,可能导致肝损伤,例如慢性肝炎、纤维化、肝硬化,最后引起肝细胞癌<sup>[22]</sup>。

黑猩猩是第一个被报道用于急性 HBV 感染的动物模型,并在 HBV 疫苗的研发上做出了巨大贡献<sup>[23]</sup>,但是黑猩猩由于伦理的问题使用受到限制。一些大型猿猴如长臂猿猴和狒狒也被证明具有易感性,但是不及黑猩猩更接近于人类,在新的抗 HBV 疗法研究中尤其是免疫治疗的发展受到了限制,而小型灵长类动物(新、旧世界猴)(图 1)模型因此得到发展。由于种属特异性因素,导致其他灵

长类动物难以感染,为了模拟 HBV,通过离体杆状病毒介导 HBV 基因组转移得到重组杆状病毒(Bac-HBV),在转导至原代恒河猴肝细胞第 9 天后,检测到乙肝表面抗原分泌,以及病毒 DNA、RNA 和共价闭合的环状 DNA,因此显示了杆状病毒具有介导穿越物种屏障的作用<sup>[24]</sup>,这种跨物种作用成功地建立了 HBV 新世界猴模型。HBV 通过 preS1 多肽与牛磺胆酸钠共转运多肽(NTCP,由 SLC10A1 编码)结合侵入肝细胞<sup>[25-26]</sup>,NTCP 是恒河猴肝细胞中乙型肝炎病毒感染的限制性宿主因子<sup>[27]</sup>。通过病毒载体介导 NTCP 在恒河猴肝细胞中表达,能够使其易于感染 HBV,并能够在血清中检测 HBV 的 DNA 以及肝细胞中检测 HBV 的 DNA、RNA 和 HBV 核心抗原(HBcAg),成功建立了与 HBV 感染相关的生理学模型<sup>[28]</sup>。基于人与松鼠猴之间 NTCP 的高度同源性,用嵌入 WMHBV(绒毛猴乙肝病毒)传染性基因组的相关腺病毒(AAV-WMHBV)感染松鼠猴,在肝中能够检测到共价闭合环状 DNA,在新生和成年的松鼠猴感染模型中达到病毒血症持续时间比其他 NHP 的长两倍多,持续维持 6 ~ 8 个月的病毒血症,这可能作为测试 HBV 治疗药物的合适模型,用于替代其他 HBV-NHP 动物模型<sup>[29]</sup>。

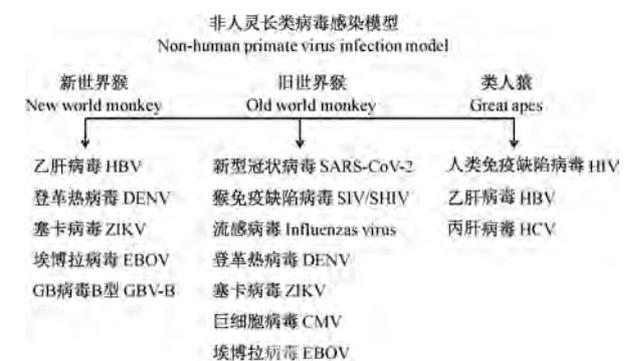


图 1 非人灵长类动物病毒感染模型

Figure 1 Non-human Primate virus infection model

## 3 流感病毒感染模型

流感病毒分为甲型、乙型和丙型三类。乙型和丙型流感病毒能够分别导致季节性流感和小儿高热伴上呼吸道疾病<sup>[30]</sup>。甲型流感病毒能引起人类大流行和季节性流感,其表面包含血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)两种糖蛋白,并有多种亚型,HA 在病毒结合和内化中执行关键功能,而 NA 则促进病毒从细胞表面释放。人类甲型流感病毒亚型主要包括 1918 年和 2009 年的 H1N1 病毒,1957 年的

H2N2 病毒和 1968 年的 H3N2 病毒,甲型流感病毒还包括新兴高致病流感病毒 H5N1(1997 年香港爆发)和 H7N9(2013 年在我国报道人类感染)等。由于大流行流感病毒人畜共患死亡率较高,且比季节性流感病毒的感染性还要强,目前已成为重要的公共卫生问题。

### 3.1 H1N1 流感病毒模型

研究表明,用 1918 年流感病毒感染食蟹猴能够引起高致病性呼吸道感染,最终导致急性呼吸窘迫和死亡<sup>[31]</sup>。此外,受感染的动物出现了以抗病毒应答失调为特征的免疫应答,但是不足以提供机体保护,这表明非典型的宿主固有免疫反应可能导致致死性。流感病毒调节宿主免疫反应的能力可能是高致病流感病毒的一个共同特征。Skinner 等<sup>[32]</sup>用 2009 年大流行 H1N1(pH1N1)流感病毒感染初生恒河猴,在感染的第 1 天至第 6 天未观察到临床症状,而是出现亚临床双相热。用带有血凝素(HA)或核蛋白(NP)的候选疫苗进行免疫,在亚临床恒河猴模型中,发现血液干扰素的活性是一个显著的标志物,并可作为评价流感病毒疫苗效力的指标。Safronetz 等<sup>[33]</sup>在建立食蟹猴模型的基础上,用大流行初期(A/Mexico/4108/2009 和 A/Mexico/InDRE4487/2009)两种遗传相似但临床上不同的 SOIV(swine-origin influenza virus(SOIV)(H1N1))分离株感染食蟹猴,在临床疾病、病毒学、宿主反应以及组织病理学参数与季节性 H1N1 病毒进行比较,显示出了更严重的感染,并观察到两种 SOIV 分离株在病毒复制、宿主转录和细胞因子反应以及疾病进展方面的异质性。用猪源性大流行 H1N1 菌株 A/Mexico/InDRE4487/2009 对食蟹猴、恒河猴和普通绒猴进行比较研究发现,三种猴都容易受到感染,并发展为上下呼吸道感染<sup>[34]</sup>。食蟹猴和恒河猴疾病易感性进行比较,食蟹猴在上呼吸道和肺中的病毒复制水平显著更高,涉及病毒生产的峰值水平和持续时间,以及体温都较高,而在恒河猴中更容易观察到呼吸窘迫等临床症状。引起病毒的差异复制的原因可能是食蟹猴的气管和支气管中唾液酸- $\alpha$ -2,6-Gal 糖(人类甲型流感病毒的受体)的表达水平显著比恒河猴高(50 ~ 73 倍),结果显示食蟹猴具有更均匀、更高水平的病毒复制以及体温的升高,这可作为大流行 H1N1 流感病毒研究的模型<sup>[34-35]</sup>。在进行流行性病毒传播研究中,用 2009 年大流行性病毒 A/California/07/2009(H1N1pdm)

证明了人类流感病毒分离株可以有效地感染并在新世界猴种普通绒猴(Callithrix Jacchus)之间传播,被感染的动物经血清转化,表现出类似人的症状,这可能是研究流感病毒传播的可行模型<sup>[36]</sup>,并且普通绒猴可作为季节性或高致病性禽流感病毒感染的动物模型<sup>[37]</sup>。

### 3.2 H5N1 流感病毒模型

1997 年高致病性禽流感病毒(HPAIV)H5N1 在我国香港爆发,在禽类鸡中的感染死亡率高达 75%,并在人类中引发严重疾病,死亡率高于 50%<sup>[38]</sup>。较高的死亡率迫使需要 NHP 感染模型来研究人类 HPAIV 的发病机理以及开发针对 HPAIV 的新疫苗或药物。Kuiken 等<sup>[39]</sup>用甲型流感病毒 A/Hong Kong/156/97(H5N1)感染四只食蟹猴,感染病变中坏死性支气管间质性肺炎在病理上与人类原发性流感病毒性肺炎相似,表明食蟹猴是用于研究人类 H5N1 病毒感染的发病机制的合适动物模型。Muramoto 等<sup>[40]</sup>为了了解 H5N1 病毒诱发人类严重疾病的机制,用 6 种 H5N1 病毒感染食蟹猴,比较了它们的致病性和对病毒感染的整体宿主反应,确定了由这些 H5N1 病毒引起的病毒复制能力和疾病严重程度差异,为哺乳动物中 H5N1 病毒的发病机理提供了新的认识。Chen 等<sup>[41]</sup>用流感病毒 A/Tiger/Harbin/01/2002(H5N1)感染恒河猴,产生了急性间质性肺炎和弥漫性肺泡损伤,表明肺是 H5N1 病毒感染的主要目标器官,证实恒河猴适合作为 H5N1 病毒研究的新灵长类动物模型尤其是 H5N1 病毒传播的研究。

建立更接近自然传播途径的动物感染模型对研究病毒传播以及发病机制具有重要意义。在研究一种冷适应的减毒疫苗(AH/Aca)时,鼻内免疫两次的恒河猴能够诱导产生强大的中和抗体反应以及 HA 特异性 CD4<sup>+</sup> T 细胞免疫反应,引发针对高致病性 H5N1 病毒感染的保护性免疫<sup>[42]</sup>。在前期 NHP 感染模型中,是在气管内将含有流感病毒的悬浮液倒入肺中<sup>[43]</sup>,而这在自然传播中并不会发生。Fujiyuki 等<sup>[44]</sup>使用日本分离株(A/whooper swan/Hokkaido/1/2008, H5N1 clade 2.3.2.1)对恒河猴和食蟹猴以小液滴接触方式在气管内进行接种,两种猴均观察到上下呼吸道感染及病毒脱落,较高剂量下接种恒河猴引起更严重的流感症状。通过气溶胶途径(吸入雾化)对高致病性 H5N1 流感病毒进行了 NHP 的实验性感染,食蟹猴吸入雾化的

H5N1 流感病毒会导致暴发性肺炎,迅速发展为急性呼吸窘迫综合征,在整个肺叶引起更广泛的感染<sup>[45-46]</sup>。这种新方式感染的非人类灵长类动物模型将推进疫苗的研发和新的治疗方法,以预防和治疗由高致病性禽流感病毒引起的人类疾病。

### 3.3 N7N9 流感病毒模型

低致病性 N7N9 流感病毒(LPAIV)于 2013 年在中国报道,2017 年突变为高致病性菌株,导致人类严重感染并在中国八省家禽中爆发疫情<sup>[47]</sup>。用 A/Anhui/1/2013(H7N9)病毒株感染食蟹猴,可发展为短暂、轻度至重度疾病,肺的组织病理学变化与人类相似,虽然程度较轻,但有弥漫性肺泡损伤、多形核细胞浸润、透明膜形成、肺细胞增生和纤维增生变化,在呼吸组织上的附着模式与在人的附着模式更为相似<sup>[48-49]</sup>。与其他流感病毒相比,H7N9 菌株 NA 中容易出现 R289 K、E119 V、A246T 或 H274Y 突变,降低了神经氨酸酶抑制剂(NAI)的敏感性。食蟹猴模型可以预测体内出现抗 NAI 钠抑制剂的 H7N9 病毒的几率,这对新的 NAI 的开发具有重要作用<sup>[50-51]</sup>。

## 4 登革热病毒(DENV)感染模型

登革热是伊蚊在人与人之间传播的全身性病毒感染性疾病,严重威胁着人的生命。目前已有 128 个国家发现登革热病毒,影响全球一半以上人口,随着气候变化和城市化,登革热的传播范围也将进一步扩大<sup>[52]</sup>。由于可能缺乏反映登革热临床症状的动物模型,目前的预防和治疗策略还远远不够。有研究开发了小鼠登革热模型,用于研究 DENV 发病机理和免疫应答<sup>[53]</sup>。但是小鼠模型在病理和病毒学分析方面具有一定局限性<sup>[54]</sup>。用新世界猴普通狨猴接种 DENV,能够表现出高水平的病毒血症,并在淋巴结、脾和胸腺在内的淋巴器官及非淋巴器官检测到 DENV 基因组,可作为研究继发性和原发性 DENV 感染的动物模型,用于疫苗开发<sup>[55-56]</sup>。但是新世界猴在免疫反应方面与旧世界猴有所不同,主要包括在组织相容性复杂等位基因和抗体交叉反应性的差异<sup>[57]</sup>。用旧世界恒河猴接种 DENV,出现较低水平的病毒滴度和较轻的症状<sup>[58]</sup>,由于缺乏与 DENV 相关的临床体征,登革热恒河猴模型可能不够完善,但通过改良的登革热恒河猴模型可能在早期评估登革热疫苗的效力和安全性可能存在作用<sup>[59]</sup>。通过接种 DENV-409-48 株

的旧世界猴冠毛猕猴(*Macaca radiata*),实验检测到 DENV 非结构蛋白 1 抗原,并观察到高病毒血症,表明用 DV-409-48 感染的冠毛猕猴可以用作研究 DENV 的可靠灵长类动物模型<sup>[60]</sup>。尽管非人类灵长类动物模型存在固有局限性,但通过一些模型改进,以及新的模型发现,这些模型结果仍然对研究致病机理,测试 DENV 药物和评估登革热疫苗效力方面有重要价值。

## 5 SARS-CoV-2 感染模型

由新型  $\beta$  冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)<sup>[61]</sup>已扩散全球,病例数迅速增加,截止 2020 年 9 月 6 日,累计感染人数达 2676 万,死亡人数达 87 万,全球疫情异常严峻。动物模型对于研究病毒感染发病机制以及特异的治疗药物或疫苗不可或缺,因此开发针对 SARS-CoV-2 的动物模型用于研究病毒发病机制,评估和筛选针对新冠肺炎的候选药物或疫苗迫在眉睫。秦川团队利用 ACE2 转基因小鼠率先制备了新冠病毒模型,研究病毒在小鼠模型中的组织病理学,阐明了 hACE2 小鼠中 SARS-CoV-2 的致病性<sup>[62]</sup>。并建立了年轻和老年恒河猴感染模型,揭示了 SARS-CoV-2 引起的老年猴间质性肺炎比幼猴严重<sup>[63]</sup>,提供了深入了解其致病机制的信息,并促进了针对预防 SARS-CoV-2 的疫苗和 COVID-19 治疗药物的开发。通过对恒河猴气管接种,组织病理学观察表明,SARS-CoV-2 感染可引起间质性肺炎,其特征在于充血和水肿,以及肺泡中单核细胞和淋巴细胞的浸润。在呼吸道组织(包括气管、支气管和肺)中鉴定出 SARS-CoV-2 RNA。并且还分别从口咽拭子、支气管和肺中分离出病毒<sup>[64-66]</sup>。并有研究小组建立了年轻和老年食蟹猴 SARS-CoV-2 感染模型,与 MERS-CoV 和 SARS-CoV 发病机制进行了比较,显示出不同的临床特征,为疾病的预防和治疗提供了依据<sup>[67]</sup>。研究显示原发性 SARS-CoV-2 感染可以激发免疫保护机制,并能够避免再次感染<sup>[68-69]</sup>。非人类灵长类动物在此次 SARS-CoV-2 的研究中提供了一个有价值的动物模型平台,为疾病的预防提供了重要依据,并为该疾病机制的研究,药物的研发疫苗的评价提供有用模型,大大加快了人们攻克新冠肺炎的速度。

## 6 其他病毒感染模型

除以上 NHP 病毒感染模型外,NHP 还用于寨

卡病毒(ZIKV)<sup>[70]</sup>和巨细胞病毒(CMV)<sup>[71]</sup>等病毒感染模型(图1)。NHP在阐明ZIKV发病机理和评价候选疫苗方面已经发挥了巨大作用<sup>[72]</sup>,并在新旧世界猴中恒河猴<sup>[73]</sup>、食蟹猴<sup>[74]</sup>、普通狨猴<sup>[75]</sup>、松鼠猴和泉猴<sup>[76]</sup>等中制造出早期怀孕期间感染模型,证实了胎儿神经病理学,以及小儿畸形和其他先天性寨卡综合征<sup>[77]</sup>。CMV非人灵长类动物模型已被用于研究CMV发病机制、原发感染的免疫应答以及后遗症,这种非人类灵长类动物模型为研发HCMV疫苗带来进一步的可能<sup>[78-80]</sup>。NHP还用于EBOV、GBV-B等病毒感染研究,并必将为今后可能出现的新型病毒继续做出重要贡献。

## 7 小结与展望

NHP对人类致病性病毒具有极度易感性,能够有效模拟人类病毒感染性疾病,并随着NHP实验动物模型制备的不断完善,对疾病的发病机制研究,以及药物的开发和疫苗评价具有不可估量的作用。但是非人灵长类动物作为国家保护动物,资源比较稀缺,所以进一步发展并扩大NHP种质资源具有重要意义,尤其是SPF级(无特定病原体)非人灵长类实验动物。NHP不仅在病毒感染性疾病中的具有重要应用,还在脑科学、生殖生育、器官移植、干细胞研究等领域也具有重要应用,相信在未来的医学发展与进步上,NHP将会发挥出更加不可估量的价值。

### 参 考 文 献(References)

- [1] Capitanio JP, Emborg ME. Contributions of non-human primates to neuroscience research [J]. *Lancet*, 2008, 371(9618): 1126-1135.
- [2] Yan G, Zhang G, Fang X, et al. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11): 1019-1023.
- [3] Coers J, Starnbach MN, Howard JC. Modeling infectious disease in mice: co-adaptation and the role of host-specific IFN- $\gamma$  responses [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(5): e1000333.
- [4] McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation [J]. *Bio Pharmacol*, 2014, 87(1): 162-171.
- [5] Friedman H, Ator N, Haigwood N, et al. The critical role of nonhuman primates in medical research [J]. *Pathog Immun*, 2017, 2(3): 352-365.
- [6] Manickam C, Shah SV, Lucar O, et al. Cytokine-mediated tissue injury in non-human primate models of viral infections [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2862.
- [7] Peeters M, Jung M, Ayouba A. The origin and molecular epidemiology of HIV [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013, 11(9): 885-896.
- [8] Garcia T T, Huot N, Ploquin MJ, et al. Non-human primates in HIV research: achievements, limits and alternatives [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 46: 324-332.
- [9] Policicchio BB, Pandrea I, Apetrei C. Animal models for HIV cure research [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 12.
- [10] Burton DR, Hangartner L. Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design [J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: 635-659.
- [11] Burton DR, Pognard P, Stanfield RL, et al. Broadly neutralizing antibodies present new prospects to counter highly antigenically diverse viruses [J]. *Science*, 2012, 337(6091): 183-186.
- [12] Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys [J]. *Nature*, 2013, 503(7475): 224-228.
- [13] Gao N, Wang W, Wang C, et al. Development of broad neutralization activity in simian/human immunodeficiency virus-infected rhesus macaques after long-term infection [J]. *AIDS*, 2018, 32(5): 555-563.
- [14] Xu L, Pegu A, Rao E, et al. Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques [J]. *Science*, 2017, 358(6359): 85-90.
- [15] Crunkhorn S. HIV: Trispecific antibodies block infection [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(11): 754.
- [16] Albarillo F, O'Keefe P. Opportunistic Neurologic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16(1): 10.
- [17] Burdo TH, Lackner A, Williams KC. Monocyte/macrophages and their role in HIV neuropathogenesis [J]. *Immunol Rev*, 2013, 254(1): 102-113.
- [18] Williams K, Westmoreland S, Greco J, et al. Magnetic resonance spectroscopy reveals that activated monocytes contribute to neuronal injury in SIV neuroAIDS [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2534-2545.
- [19] Nowlin BT, Burdo TH, Midkiff CC, et al. SIV encephalitis lesions are composed of CD163(+) macrophages present in the central nervous system during early SIV infection and SIV-positive macrophages recruited terminally with AIDS [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(6): 1649-1665.
- [20] Micci L, Alvarez X, Irielle RI, et al. CD4 depletion in SIV-infected macaques results in macrophage and microglia infection with rapid turnover of infected cells [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(10): e1004467.
- [21] Matsuda K, Riddick NE, Lee CA, et al. A SIV molecular clone that targets the CNS and induces neuroAIDS in rhesus macaques [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(8): e1006538.
- [22] Sukowati CH. Significance of hepatitis virus infection in the oncogenic initiation of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(4): 1497-1512.

- [23] Lanford RE, Walker CM, Lemon SM, et al. The chimpanzee model of viral hepatitis: advances in understanding the immune response and treatment of viral hepatitis [J]. *ILAR J*, 2017, 58 (2): 172–189.
- [24] Lucifora J, Vincent IE, Berthillon P, et al. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model [J]. *Hepatology*, 2010, 51(6): 1954–1960.
- [25] Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, et al. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(1): 48–64.
- [26] Müller SF, König A, Döring B, et al. Characterisation of the hepatitis B virus cross-species transmission pattern via Na<sup>+</sup>/taurocholate co-transporting polypeptides from 11 New World and Old World primate species [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (6): e0199200.
- [27] Lempp FA, Wiedtke E, Qu B, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2017, 66(3): 703–716.
- [28] Burwitz BJ, Wettengel JM, Mück-Häusel MA, et al. Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2146.
- [29] Chen CY, Wine BY, Chavez D, et al. Woolly monkey – HBV infection in squirrel monkeys as a surrogate nonhuman primate model of HBV infection [J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(3): 371–386.
- [30] Matsuzaki Y, Abiko C, Mizuta K, et al. A nationwide epidemic of influenza C virus infection in Japan in 2004 [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 783–788.
- [31] Kobasa D, Jones SM, Shinya K, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus [J]. *Nature*, 2007, 445(7125): 319–323.
- [32] Skinner JA, Zurawski SM, Sugimoto C, et al. Immunologic characterization of a rhesus macaque H1N1 challenge model for candidate influenza virus vaccine assessment [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2014, 21(12): 1668–1680.
- [33] Safronetz D, Rockx B, Feldmann F, et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques [J]. *J virol*, 2011, 85(3): 1214–1223.
- [34] Mooij P, Koopman G, Mortier D, et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza virus replicates to higher levels and induces more fever and acute inflammatory cytokines in cynomolgus versus rhesus monkeys and can replicate in common marmosets [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126132.
- [35] Safronetz D, Rockx B, Feldmann F, et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza A virus isolates show heterogeneous virulence in macaques [J]. *J Virol*, 2011, 85(3): 1214–1223.
- [36] Moncla LH, Ross TM, Dinis JM, et al. A novel nonhuman primate model for influenza transmission [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78750.
- [37] Kiyoko IH, Noriko N, Maki K, et al. The marmoset as an animal model of influenza: infection with A (H1N1) pdm09 and highly pathogenic A (H5N1) viruses via the conventional or tracheal spray route [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 844.
- [38] Neumann G, Chen H, Gao GF, et al. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties [J]. *Cell Res*, 2009, 20 (1): 51–61.
- [39] Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Van Amerongen G, et al. Pathology of human influenza A (H5N1) virus infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) [J]. *Vet Pathol*, 2003, 40(3): 304–310.
- [40] Muramoto Y, Shoemaker JE, Le MQ, et al. Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in non-human primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *J Virol*, 2014, 88(16): 8981–8997.
- [41] Chen Y, Deng W, Jia C, et al. Pathological lesions and viral localization of influenza A (H5N1) virus in experimentally infected Chinese rhesus macaques: implications for pathogenesis and viral transmission [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(2): 227–233.
- [42] Fan S, Gao Y, Shinya K, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated H5N1 vaccine in nonhuman primates [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(5): e1000409.
- [43] Muramoto Y, Shoemaker JE, Le MQ, et al. Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in nonhuman primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses [J]. *J Virol*, 2014, 88(16): 8981–8997.
- [44] Fujiyuki T, Yoneda M, Yasui F, et al. Experimental infection of macaques with a wild water bird-derived highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12): e83551.
- [45] Wonderlich ER, Swan ZD, Bissel SJ, et al. Widespread virus replication in alveoli drives acute respiratory distress syndrome in aerosolized H5N1 influenza infection of macaques [J]. *J Immunol*, 2017, 198(4): 1616–1626.
- [46] Watanabe T, Iwatsuki HK, Kiso M, et al. Experimental infection of Cynomolgus Macaques with highly pathogenic H5N1 influenza virus through the aerosol route [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 4801.
- [47] Qi W, Jia W, Liu D, et al. Emergence and adaptation of a novel highly pathogenic H7N9 influenza virus in birds and humans from a 2013 human-infecting low-pathogenic ancestor [J]. *J Virol*, 2018, 92(2): e00921.
- [48] de Wit E, Rasmussen AL, Feldmann F, et al. Influenza virus A/Anhui/1/2013 (H7N9) replicates efficiently in the upper and lower respiratory tracts of cynomolgus macaques [J]. *Mbio*, 2014, 5(4): e01331–01314.
- [49] Siegers JY, Short KR, Leijten LM, et al. Novel avian-origin influenza A (H7N9) virus attachment to the respiratory tract of five animal models [J]. *J Virol*, 2014, 88(8): 4595–4599.

- [50] Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M, et al. Emergence of H7N9 influenza a virus resistant to neuraminidase inhibitors in nonhuman primates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(8): 4962–4973.
- [51] Tang J, Zhang J, Zhou J, et al. Highly pathogenic avian influenza H7N9 viruses with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors showed comparable replication capacity to their sensitive counterparts [J]. *Virology*, 2019, 531(1): 87.
- [52] Messina JP, Brady OJ, Golding N, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(9): 1508–1515.
- [53] Coronel RC, Gutiérrez BH, Medina MS, et al. Humanized mice in dengue research: a comparison with other mouse models [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(1): 39.
- [54] Zompi S, Harris E. Animal models of dengue virus infection [J]. *Viruses*, 2012, 4(1): 62–82.
- [55] Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, et al. Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates [J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(12): 2955–2967.
- [56] Azami NAM, Moi ML, Ami Y, et al. Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets (*Callithrix jacchus*) [J]. *Virology*, 2018, 515(1): 51.
- [57] Asada Y, Kawamoto Y, Shotake T, et al. Molecular evolution of IgG subclass among nonhuman primates: implication of differences in antigenic determinants among Apes [J]. *Primates*, 2002, 43(4): 343–349.
- [58] Clark KB, Onlamoon N, Hsiao HM, et al. Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? [J]. *Front Microbiol*, 2013, 4: 305.
- [59] Borges MB, Marchevsky RS, Carvalho PR, et al. Detection of post-vaccination enhanced dengue virus infection in macaques: An improved model for early assessment of dengue vaccines [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(4): e1007721.
- [60] Kato F, Ishida Y, Kawakami A, et al. Evaluation of *Macaca radiata* as a non-human primate model of Dengue virus infection [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3421.
- [61] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497–506.
- [62] Bao L, Deng W, Huang B, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice [J]. *Nature*, 2020, 583(7818): 830–833.
- [63] Yu P, Qi F, Xu Y, et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 [J]. *Animal Model Exp Med*, 2020, 3(1): 93–97.
- [64] Shan C, Yao YF, Yang XL, et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques [J]. *Cell Res*, 2020, 30(8): 670–677.
- [65] Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585(7824): 268–272.
- [66] Gao Q, Bao L, Mao H, et al. Rapid development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2020, eabc1932.
- [67] Rockx B, Kuiken T, Herfst S, et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model [J]. *Science*, 2020, 368(6494): 1012–1015.
- [68] Bao L, Deng W, Gao H, et al. Reinfection could not occur in SARS-CoV-2 infected rhesus macaques [J]. *BioRxiv*, 2020, 3: 13.
- [69] Chandrashekar A, Liu J, Martinot AJ, et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 812–817.
- [70] Chang C, Ortiz K, Ansari A, et al. The Zika outbreak of the 21st century [J]. *J Autoimmun*, 2016, 68: 1–13.
- [71] Itell HL, Kaur A, Deere JD, et al. Rhesus monkeys for a nonhuman primate model of cytomegalovirus infections [J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 25: 126–133.
- [72] Peter A, Larocca RA, Wanwisa D, et al. Therapeutic and protective efficacy of a dengue antibody against Zika infection in rhesus monkeys [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6): 721–723.
- [73] Martinot AJ, Abbink P, Afacan O, et al. Fetal neuropathology in Zika virus-infected pregnant female rhesus monkeys [J]. *Cell*, 2018, 173(5): 1111–1122.
- [74] Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1104–1107.
- [75] Seferovic M, Sánchez-San MC, Tardif SD, et al. Experimental Zika virus infection in the pregnant common marmoset induces spontaneous fetal loss and neurodevelopmental abnormalities [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16131.
- [76] Vanchiere JA, Ruiz JC, Brady AG, et al. Experimental Zika virus infection of neotropical primates [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 98(1): 173–177.
- [77] Alves DSE, Fink K. Animal models for dengue and Zika vaccine development [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1062: 215–239.
- [78] Yue Y, Barry PA. Rhesus cytomegalovirus a nonhuman primate model for the study of human cytomegalovirus [J]. *Adv Virus Res*, 2008, 72: 207–226.
- [79] Fan Q, Nelson CS, Bialas KM, et al. Plasmablast response to primary rhesus cytomegalovirus (CMV) infection in a monkey model of congenital CMV transmission [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2017, 24(5): e00510.
- [80] Kolb P, Sijmons S, McArdle MR, et al. Identification and functional characterization of a novel Fc gamma-Binding glycoprotein in rhesus cytomegalovirus [J]. *J Virol*, 2019, 93(4): e02077.

奎秀莹,代解杰. 寨卡病毒母婴传播及动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 256-261.

Kui XY, Dai JJ. Research progress in mother-to-child transmission of Zika virus and animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 256-261.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.017

# 寨卡病毒母婴传播及动物模型的研究进展

奎秀莹,代解杰\*

(北京协和医学院/中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118)

**【摘要】** 寨卡病毒(Zika virus)是属于黄病毒科黄病毒属的一种虫媒病毒,可经过埃及伊蚊和白纹伊蚊叮咬传播,也可通过血液、泪液传播,以及性传播和母婴垂直传播。寨卡病毒一旦感染孕妇,就会有导致胎儿感染的可能。成人多出现一些较轻的临床症状,但胎儿更容易受到中枢神经系统的伤害,继而诱发小头畸形,重症脑部发育缺陷以及一些神经系统性炎症,因此,阻断寨卡病毒的传播及感染迫在眉睫。为了能够对寨卡病毒母婴传播途径有更全面的认识,研究其致病机理,并且找到有效的预防、检测和治疗方法,建立成功的动物模型极为关键。文章将对目前已有的寨卡病毒母婴传播在各种动物模型上的研究进展进行综合整理。

**【关键词】** 寨卡病毒;垂直传播;动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0256-06

## Research progress in mother-to-child transmission of Zika virus and animal models

KUI Xiuying, DAI Jiejie\*

(Peking Union Medical College/Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Medical Biology, Kunming 650118, China)

Corresponding author: DAI Jiejie. E-mail: dj@imbcams.com.cn

**【Abstract】** Zika virus is an arbovirus of the Flaviviridae family that is transmitted by the bites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, by blood and tears, as well as by sexual and vertical mother-to-child transmission. Once a pregnant woman is infected, there is a risk of infection to the fetus. Adults may have some mild clinical symptoms, but fetuses are more vulnerable to central nervous system involvement, which can lead to microcephaly, severe brain defects, and neuroinflammation. Therefore, it is extremely urgent to block the spread and infection of Zika virus. To better understand the mother-to-child transmission route of Zika virus, to study the pathogenic mechanisms, and to discover effective prevention, detection and treatment method, the establishment of reliable animal models is crucial. In this paper, we review the recent progress in mother-to-child transmission of Zika virus in various animal models.

**【Keywords】** Zika virus; vertical transmission; animal models

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

寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)是一种单股正链RNA病毒,属于黄病毒科黄病毒属,与其他黄病毒类似,寨卡病毒基因组长约 $1.1 \times 10^4$  bp,只有一个

开放阅读框(open reading frame, ORF),编码3个结构蛋白和7个非结构蛋白,包括5'端的结构蛋白C、prM和E,以及3'端的NS1、NS2a、NS2、NS3、NS4a、

**【基金项目】** NSFC-云南联合基金重点支持项目(U1702282),云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019)。

Funded by NSFC-Joint Foundation of Yunnan Province(U1702282), Yunnan Province Science and Technology Talent and Platform Plan Project(2017HC019).

**【作者简介】** 奎秀莹(1995—),女,硕士,研究方向:人类疾病动物模型的建立及疾病机理。Email: 2659634944@qq.com

**【通信作者】** 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型的建立与应用。Email: dj@imbcams.com.cn

NS4b 和 NS5<sup>[1-2]</sup>。寨卡病毒引起的疾病是一种虫媒传染性疾病,在人群中的传染率极高,一旦感染该病毒,一部分人即出现头痛、发热、关节疼痛等多种病症<sup>[3]</sup>,有的还会引起神经系统性疾病,其可经白纹伊蚊和埃及伊蚊叮咬传播,因而这一病毒的传播更加迅速<sup>[4-5]</sup>。寨卡病毒早在 1947 年就被发现,但直到 2015 年美洲大爆发后其对胎儿健康发育的破坏性影响才被公认<sup>[6]</sup>。到 2016 年,南美洲和中美洲已有 31 个国家和地区报道了这一虫媒病毒的传播<sup>[7]</sup>。同年 2 月,中国、日本和韩国也陆续报道了寨卡病毒的感染病例,这标志着寨卡病毒已蔓延至全球<sup>[8]</sup>。经过对感染病毒者的追踪调查以及多项研究,发现寨卡病毒还可通过血液、泪液传播、性传播以及母婴传播<sup>[9-11]</sup>,研究者对被感染的埃及伊蚊后代进行实验室检测后,发现其后代的多个内脏器官以及唾液腺中都有寨卡病毒 RNA 的存在,同样证实了寨卡病毒可经母婴垂直传播<sup>[12]</sup>。一旦孕妇感染上该病毒也就意味着新生儿有极大概率会携带这一病毒,并且婴儿的神经系统、身体发育也会受到严重阻碍,即寨卡病毒的垂直传播会导致神经前体细胞感染和脑实质破坏<sup>[13]</sup>。

目前已有大量的研究发现寨卡病毒的感染可导致机体出现从轻度发热到重度神经系统紊乱甚至婴儿死亡等症状<sup>[14-15]</sup>。早前人们得出结论,寨卡病毒感染孕妇,胎儿比较突出的先天性寨卡综合征 (congenital Zika syndrome, CZS) 症状为小头畸形、脑部发育不全、眼部异常以及关节挛缩等<sup>[16-18]</sup>,而顺利出生的婴儿则常伴有癫痫、发育迟缓和视力障碍<sup>[19]</sup>。近期有文献报道,有些出现先天性寨卡综合征的婴儿在影像学上未观察到脑成像异常,因而,在判定婴儿是否有先天性寨卡综合征时,还需关注除影像学外的其他症状<sup>[20]</sup>。从各个地区的不同病例身上也发现孕妇感染寨卡病毒后,母体和胎儿均会表现出发烧、结膜炎、皮疹等症状<sup>[21]</sup>,多个病例均证实寨卡病毒可以通过母婴垂直传播感染胎儿,并且能够导致胎儿出现比成年人更严重的病症,实验观察到胎儿多表现出中枢神经系统紊乱,生长受限,头部发生小头畸形等<sup>[22-23]</sup>,以及一些眼部疾病,常见的包括视网膜局灶性色素斑点和脉络膜视网膜萎缩<sup>[24]</sup>,严重者甚至会导致孕妇流产和胎儿死亡<sup>[25-26]</sup>。

为了能够更细致地研究寨卡病毒垂直传播的全过程,探究病毒在母婴之间的传播路径,寻找阻

断寨卡病毒母婴传播的突破口,很多研究人员都在致力于妊娠期间寨卡病毒动物模型的建立,希望能够较大幅度地模拟寨卡病毒在人类身上的垂直传播过程,以便开展病毒感染胎儿的相关研究。一个成功的动物模型能够在研究病毒感染分子机制、药物治疗以及疫苗研发等多个方面起到不可替代的作用。在已有的研究中,很多研究者发现不同的动物感染寨卡病毒后,动物的表现有很多相似之处,同时也存在一定的差异。

## 1 寨卡病毒感染孕期小鼠

有研究显示,寨卡病毒感染未怀孕小鼠,或一些妊娠期间免疫能力强的雌鼠时,会出现病毒无法复制或没有临床症状的现象,说明小鼠的天然免疫系统可以阻挡部分病毒的侵入<sup>[27]</sup>。但对于大多妊娠期间的雌鼠,其免疫功能都会受到一定影响,这也就减弱它们身体抵抗病毒入侵的能力,以致于雌鼠在妊娠期间易出现各种疾病。Miner 等<sup>[28]</sup>的实验表明,在怀孕雌鼠胚胎期第 6.5 天和第 7.5 天进行皮下注射寨卡病毒,胚胎期第 13.5 天有胎儿死亡,并被母体吸收,剩下部分胎盘残留,未死亡的将雌鼠施以安乐死后,取出的胎盘可见到明显的胎盘颜色发白,组织坏死,胎儿的冠臀长度相比对照而言也有缩小。为确定母体中的寨卡病毒是否侵入到胎儿体内,研究者们还对胎儿进行了病毒检测,结果显示,在胎儿头部及体内有高水平的寨卡病毒核酸并且其核酸有复制能力。在 Cugola 等人<sup>[29]</sup>的研究中发现,接种过寨卡病毒的雌鼠产下的小鼠有显著的全身生长迟缓和宫内生长受限的现象,大脑皮层出现畸形,细胞数目减少且皮层厚度也下降,qPCR 检测结果证实,小鼠大脑内的病毒核酸量远高于身体的其它组织。此外,他们还观察到小鼠眼部与正常小鼠相比存在一些异常,这与人类感染寨卡病毒后新生儿的眼部畸形症状较为相似<sup>[24]</sup>。野生型 C57BL/6 小鼠是个能够稳定传代的品系,目前有较多研究者利用该品系小鼠进行实验。在 Yockey 等<sup>[30]</sup>的实验中,他们用寨卡病毒感染怀孕的野生型 C57BL/6 雌鼠,利用电子显微镜可观察到胎儿的大脑皮层和小脑中存在寨卡病毒,尽管在 RT-PCR 的检测中未检测到病毒颗粒。通过腹腔注射的方式接种病毒,可在脑室区的胶质细胞中检测到病毒<sup>[31]</sup>。而通过直接接种病毒至母体羊水或子宫中的方法感染时,能够看到自然流产、脊髓缺损、

运动神经元和眼部畸形,或是存活的小鼠颅内钙化的显著临床症状<sup>[32-33]</sup>。

Yockey 等<sup>[30]</sup>的实验则证实了寨卡病毒感染怀孕雌鼠的阴道后,病毒能够经黏膜感染小鼠,并导致胎儿的感染,野生型小鼠和缺乏 I 型干扰素的小鼠感染后均会出现胎儿生长受限以及脑内病毒水平较高的现象,缺乏 I 型干扰素的小鼠胎儿症状尤为显著,有的雌鼠甚至会流产。有研究表明,寨卡病毒对小鼠体内 I 型干扰素信号通路中的关键中心体小鼠 STAT2 的拮抗能力较弱,导致病毒的外周感染受阻<sup>[34-35]</sup>。因而研究人员利用 C57BL/6 小鼠进行了两组实验,一组是 I 型干扰素受体基因敲除的小鼠和野生小鼠杂交,之后采用皮下注射的方式进行病毒感染,另一组是在病毒感染之前对受精的小鼠加入 I 型干扰素受体抗体,感染结果显示,两组实验小鼠均出现垂直传播现象,胎儿都有宫内生长受限的症状<sup>[36]</sup>,基因敲除后的小鼠表现更为明显,还有胎盘损伤、胎儿发白及头部感染等现象<sup>[28]</sup>。在近期研究中,研究人员还发现利用 RT-PCR 进行病毒核酸检测时,I 型干扰素缺陷的雌鼠体内胎盘中的病毒含量要远高于胎儿体内,然而胎儿已出现较显著的生长受限以及头部畸形的临床症状了<sup>[37]</sup>,这一结果表明寨卡病毒在怀孕雌鼠体内通过胎盘传播感染的概率极高,并且对胎儿有较强的致病性。利用寨卡病毒感染小鼠进行体内成像,追踪病毒在小鼠体内的感染路径,也能清晰地看到寨卡病毒垂直传播的动态效果<sup>[38]</sup>。

在小鼠 I 型干扰素会使寨卡病毒感染受阻的研究基础上,Gorman 等<sup>[39]</sup>用同源重组的方式将人 STAT2 等位基因插入到 C57BL/6 小鼠的 STAT2 位点,再对其进行皮下注射寨卡病毒,结果显示,母体血清和脾中含有高浓度的寨卡病毒,胎儿的头部、胎盘以及胎盘与子宫内壁的连接层也可以检测到较高的病毒 RNA。

## 2 寨卡病毒感染孕期非人灵长类动物

在灵长类动物中,有不少研究者对恒河猴进行了实验。Dudley 等<sup>[40]</sup>对妊娠期分别为 31、38 d(孕中期)的恒河猴接种寨卡病毒后,追踪观察,发现感染后第 2 天就能在血浆、尿液甚至唾液中检测到  $10^5$  左右的病毒含量,之后的 4 ~ 6 d 逐步增加,母体中的 CD8<sup>+</sup> T 细胞数量显著高于未怀孕的恒河猴,妊娠 31 d 的恒河猴表现尤为明显,NK 细胞的活性也有

所升高,但这一表现与未怀孕的感染猴体内水平相当,未见突出异常。此外,在胎儿的脑内能够检测到较高水平的寨卡病毒。在 Nguyen 等<sup>[41]</sup>的研究中,怀孕恒河猴的血液、尿液中均可检测到寨卡病毒的存在,4 只实验猴中,有 2 只可在唾液中检测到病毒存在,有 1 只可在羊水中检测到,此外,4 只实验猴均表现出明显的血浆病毒血症。超声成像显示,在妊娠最后 1 个月时,胎儿的头围相较于正常胎儿小了一个标准差。进行 qRT-PCR 后,胎儿身体的多个组织中检测到寨卡病毒核酸,包括淋巴、肺、脾、肝等。经组织病理学分析,发现胎儿均表现出轻微至中度严重性不等的化脓性中耳炎,4 只胎儿中有 3 只出现化脓性羊膜炎,另 1 只则出现轻度至中度化脓性肺炎。此外,还有的胎儿出现化脓性肺炎、化脓性淋巴结炎和化脓性肝炎等。眼部组织病理分析还发现有视网膜、脉络膜和视神经的炎症,但未发现胎儿脑内的异常表现。

在更近的妊娠期恒河猴感染实验<sup>[42]</sup>中,4 只怀孕恒河猴分别在妊娠 41、50、64 和 90 d 时静脉接种寨卡病毒。其中妊娠 41 d 时接种的实验猴胎儿在接种 7 d 后即死亡,且能在胎儿体内和胎盘中检测到较高的病毒载量。其余 3 只均未见胎儿死亡,根据实验需要安乐死后对婴儿和母体进行进一步的分析。妊娠 64 d 接种的母体会出现间歇性胎盘出血的现象,生产的婴儿生长受限,导致个体相对较小。妊娠 50、90 d 接种的婴儿个体没有明显的小头畸形症状,体型在恒河猴平均范围内,只是生长有所迟缓。在婴儿的多个器官中都检测到寨卡病毒,尤其是脑部存在大量病毒,还观察到脑内出现钙化和神经前体细胞明显减少的现象。这一结论与人类胎儿感染后大脑脑室周围白质钙化相吻合<sup>[43-44]</sup>。

近期,另一项用恒河猴建立新生儿寨卡病毒感染模型的研究<sup>[45]</sup>表明,在母体和胎儿体内利用 RT-PCR 技术都能检测到较高水平的寨卡病毒 RNA,胎儿头部与正常动物相比虽没有出现畸形,但头围明显缩小,并且胎盘出现异于常见双胎盘的单盘状结构。此外,研究人员还进行了心脏病理学、功能性神经病理学、感觉以及安乐死后的后期神经病理学观察,发现听觉和视觉未见明显异常,但心脏收缩时出现杂音,且胸片也显示心脏肿大,神经方面出现抽搐、运动迟缓和脑内出现不同程度的损伤,包括钙化,炎症,不同神经细胞增加或丢失等情况。

除恒河猴外,用豚尾猴进行寨卡病毒感染实验

也有相似的症状出现。皮下接种人工高剂量寨卡病毒后(每只接种量为  $7 \log_{10}$  PFU, 蚊子叮咬传播一般为  $1 \log_{10}$  PFU ~  $5 \log_{10}$  PFU<sup>[46-47]</sup>), 显微镜观察, 可见胎儿也出现严重的神经系统损伤, 包括脑发育不全、脑室周围白质胶质增生、轴突细胞损伤, 神经前体细胞减少等。此外, 还有豚尾猴的室管膜细胞也显示有损伤现象<sup>[48]</sup>。

此外, 狨猴在感染寨卡病毒后也会出现一些类似于人的症状。Seferovic 等<sup>[49]</sup>在用寨卡病毒对怀孕 68、79 d 的狨猴进行肌肉注射感染后, 两组狨猴都出现胎儿死亡, 流产的明显表征, 尸检时也能够检测到胎盘和胎儿中存在极高的病毒 RNA 含量, 明显高于母体肾、淋巴中的载量水平。

因此, 通过开发模拟自然经胎盘传播的非灵长类动物模型<sup>[50]</sup>, 可以对进一步开发和优化直接胎儿接种模型有较大的启发和帮助, 为解决寨卡病毒发病机制研究中还未解决的关键问题提供研究平台, 并从中寻找阻断寨卡病毒感染相关的方法, 以便更好的指导临床试验<sup>[43]</sup>。

### 3 寨卡病毒感染鸡胚

在人们发现寨卡病毒可导致胎儿出现严重临床症状后, 有研究者采用可有效扩增多种病毒的鸡胚进行了羊膜卵穿刺接种感染试验。他们发现, 鸡胚在接种后的临床症状对寨卡病毒有较强的剂量依赖性, 高剂量的病毒接种可直接导致胚胎死亡, 而相对低剂量的病毒可导致鸡胚生长受限, 脑组织发育受到抑制, 大脑皮层区域脑心室出现较空的状态<sup>[51]</sup>, 出生的小鸡伴有小头样症状表现, 在中枢神经系统以及身体各个器官中也能够检测到有效的寨卡病毒复制<sup>[52]</sup>。鸡胚对寨卡病毒的易感性, 病毒感染后的致死情况以及与人类较类似的神经系统变化等优势提示我们, 可利用鸡胚作为模式动物进行寨卡病毒的胚胎感染机理研究<sup>[53]</sup>。然而由于鸡胚在进化关系上与人类稍有距离, 并且其孵育时间过短, 往往在还未见胚胎有明显变化时, 就出现胚胎死亡或者出生的现象, 实验者难以进行某一时段具体研究, 因而可以将鸡胚和其他物种动物模型相互补充, 实现寨卡病毒致病机理从整体到局部的一系列研究。

### 4 总结与展望

目前全球已有多个实验室建立了各自的寨卡

病毒动物模型, 其中应用较为广泛的就是啮齿类和非人灵长类, 其中, 小鼠和恒河猴还被建立了妊娠期的感染模型。小鼠的研究相对全面且多样化, 包括免疫健全小鼠、I 类/II 类干扰素受体缺乏小鼠以及各类免疫缺陷型小鼠等寨卡病毒感染模型。从实验结果总体来看, 免疫健全的小鼠普遍对寨卡病毒有一定程度的耐受能力, 若建立动物模型将不利于后续对病毒传播能力和致病机制的评价<sup>[54-55]</sup>。而缺乏干扰素受体和免疫缺陷型小鼠感染后会出现一些与人类感染后相似的症状, 可以根据不同的研究需求来利用具有相应缺陷型的小鼠模型进行寨卡病毒的分子机制研究, 病毒疫苗和治疗药物的前期评价等。此外, 小鼠的生殖周期相对较短, 利用妊娠期间的小鼠来建立模型可以在较短时间内得到实验所需数据, 由于其体型小的优势, 进行体内病毒感染追踪成像时也较容易操作。

从非人灵长类动物的实验结果可以看出, 妊娠期恒河猴感染寨卡病毒后胎儿所表现出的生长迟缓, 脑部神经细胞损伤、减少, 神经系统损伤, 多个器官和胎盘病毒水平极高, 以及部分育龄较小胎儿死亡等现象, 从临床表现来看, 恒河猴是对病毒入侵胎儿感染机制研究最恰当的材料, 也是病毒疫苗和药物有效性评价不可替代的实验模型。然而, 它们繁殖周期较长, 实验成本高等问题也是很多实验室所面临的实际难题。因此, 在对寨卡病毒的各项研究中, 可以将非灵长类动物用于后期实验, 不仅能够达到实验验证和评价的效果, 还能很大程度上节约时间成本和经济成本。

目前由寨卡病毒给人们带来了不小的影响, 尤其是病毒经胎盘垂直传播对新生儿造成的感染, 影响其一生, 对社会造成了较大的负担, 而只有合适的动物模型才能够更清楚地研究病毒如何从母体子宫经胎盘侵入胎儿体内, 从根本上阻断这一方式的传播, 减小病毒对下一代造成的影响。现有的动物模型, 都只能分别从其中一些方面模拟出人类的感染症状, 要想对其垂直传播进行更进一步的研究, 目前仍缺乏一个较合适的动物模型, 这对寨卡病毒的深入研究也是一个较大的阻碍。在未来的研究中, 需要寻找更合适的动物来建立寨卡病毒垂直传播的感染模型, 为探究其垂直传播感染路径及其分子机制, 开发预防性疫苗, 寻找有效的检测办法及治疗方法提供更佳的平台。

#### 参 考 文 献 (References)

[1] White MK, Wollébo HS, David BJ, et al. Zika virus: an

- emergent neuropathological agent [J]. *Ann Neurol*, 2016, 80(4): 479-489.
- [ 2 ] Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses [J]. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 23-61.
- [ 3 ] 蒋小武, 孟祥莉, 胡群, 等. 寨卡病毒动物感染模型研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(6): 558-562.  
Jiang XW, Meng XL, Hu Q, et al. Progress in animal infection models for Zika virus [J]. *Chin J Zoon*, 2018, 34(6): 558-562.
- [ 4 ] Routhu NK, Byrareddy SN. Host-Virus Interaction of ZIKA virus in modulating disease pathogenesis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2017, 12(2): 219-232.
- [ 5 ] Yun SI, Lee YM. Zika virus: an emerging flavivirus [J]. *J Microbiol*, 2017, 55(3): 204-219.
- [ 6 ] Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, et al. Zika virus [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(16): 1552-1563.
- [ 7 ] Heukelbach J, Alencar CH, Kelvin AA, et al. Zika virus outbreak in Brazil [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10(2): 116-120.
- [ 8 ] Deng YQ, Zhao H, Li XF, et al. Isolation, identification and genomic characterization of the Asian lineage Zika virus imported to China [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2016, 59(4): 428-430.
- [ 9 ] Miner JJ, Diamond MS. Zika virus pathogenesis and tissue tropism [J]. *Cell Host Microbe*, 2017, 21(2): 134-142.
- [ 10 ] Song BH, Yun SI, Woolley M, et al. Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 308: 50-64.
- [ 11 ] Russell K, Hills SL, Oster AM, et al. Male-to-female sexual transmission of Zika virus-united states, january-april 2016 [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(2): 211-213.
- [ 12 ] Li CX, Guo XX, Deng YQ, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(4): e23.
- [ 13 ] Valentine GC, Seferovic MD, Fowler SW, et al. Timing of gestational exposure to Zika virus is associated with postnatal growth restriction in a murine model [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2018, 219(4): e401-e409.
- [ 14 ] Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, et al. Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(2): e0004517.
- [ 15 ] Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, et al. Zika and the risk of microcephaly [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(5): 498.
- [ 16 ] Valentine G, Marquez L, Pammi M. Zika virus-associated microcephaly and eye lesions in the newborn [J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2016, 5(3): 323-328.
- [ 17 ] Valentine G, Marquez L, Pammi M. Zika virus epidemic: an update [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2016, 14(12): 1127-1138.
- [ 18 ] Adebajo T, Godfred CS, Viens L, et al. Update: interim guidance for the diagnosis, evaluation, and management of infants with possible congenital Zika virus infection-United States, october 2017 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2017, 66(41): 1089-1099.
- [ 19 ] Ventura CV, Maia M, Travassos SB, et al. Risk factors associated with the ophthalmoscopic findings identified in infants with presumed Zika virus congenital infection [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(8): 912-918.
- [ 20 ] Antoniou E, Orovou E, Sarella A, et al. Zika virus and the risk of developing microcephaly in infants: a systematic review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(11): 3806.
- [ 21 ] Hamel R, Liègeois F, Wichit S, et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions [J]. *Microbes Infect*, 2016, 18(7-8): 441-449.
- [ 22 ] Zaluca C, Melo VC, Mosimann AL, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015, 110(4): 569-572.
- [ 23 ] Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(10): 951-958.
- [ 24 ] de Paula FB, de Oliveira DJR, Prazeres J, et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in salvador, brazil [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(5): 529-535.
- [ 25 ] Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, et al. Zika virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(2): e0004517.
- [ 26 ] Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in rio de janeiro [J]. *N Engl J Med*. 2016, 375(24): 2321-2334.
- [ 27 ] Lazear HM, Govero J, Smith AM, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(5): 720-730.
- [ 28 ] Miner JJ, Cao B, Govero J, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1081-1091.
- [ 29 ] Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models [J]. *Nature*, 2016, 534(7606): 267-271.
- [ 30 ] Yockey LJ, Varela L, Rakib T, et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection [J]. *Cell*, 2016, 166(5): 1247-1256.
- [ 31 ] Wu KY, Zuo GL, Li XF, et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice [J]. *Cell Res*, 2016, 26(6): 645-654.
- [ 32 ] Shi Y, Li S, Wu Q, et al. Vertical transmission of the Zika virus causes neurological disorders in mouse offspring [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3541.
- [ 33 ] Cui L, Zou P, Chen E, et al. Visual and motor deficits in grown-up mice with congenital Zika virus infection [J]. *EBioMedicine*, 2017, 20: 193-201.
- [ 34 ] Grant A, Ponia SS, Tripathi S, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling [J]. *Cell Host*

- Microbe, 2016, 19(6): 882-890.
- [35] Kumar A, Hou S, Airo AM, et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling [J]. EMBO Rep, 2016, 17(12): 1766-1775.
- [36] Richner JM, Himansu S, Dowd KA, et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection [J]. Cell, 2017, 169(1): 176.
- [37] Jaeger AS, Murrieta RA, Goren LR, et al. Zika viruses of African and Asian lineages cause fetal harm in a mouse model of vertical transmission [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019, 13(4): e0007343.
- [38] Wang T, Li P, Zhang Y, et al. *In vivo* imaging of Zika virus reveals dynamics of viral invasion in immune-sheltered tissues and vertical propagation during pregnancy [J]. Theranostics, 2020, 10(14): 6430-6447.
- [39] Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection [J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(5): 672-685.
- [40] Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection [J]. Nat Commun, 2016, 7: 12204.
- [41] Nguyen SM, Antony KM, Dudley DM, et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(5): e1006378.
- [42] Coffey LL, Keesler RI, Pesavento PA, et al. Intraamniotic Zika virus inoculation of pregnant rhesus macaques produces fetal neurologic disease [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2414.
- [43] Chimelli L, Melo ASO, Avvad PE, et al. The spectrum of neuropathological changes associated with congenital Zika virus infection [J]. Acta Neuropathol, 2017, 133(6): 983-999.
- [44] Zare MM, Poretti A, Huisman TA, et al. Neuroimaging findings of congenital Zika virus infection: a pictorial essay [J]. Jpn J Radiol, 2017, 35(3): 89-94.
- [45] Steinbach RJ, Haese NN, Smith JL, et al. A neonatal nonhuman primate model of gestational Zika virus infection with evidence of microencephaly, seizures and cardiomyopathy [J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227676.
- [46] Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, et al. Variation in aedes aegypti mosquito competence for Zika virus transmission [J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(4): 625-632.
- [47] Costa-da-Silva AL, Ioshino RS, Araújo HR, et al. Laboratory strains of aedes aegypti are competent to Brazilian Zika virus [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171951.
- [48] Adams WKM, Nelson BR, Stencel BJE, et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain [J]. Nat Med, 2018, 24(3): 368-374.
- [49] Seferovic M, Sánchez SMC, Tardif SD, et al. Experimental Zika virus infection in the pregnant common marmoset induces spontaneous fetal loss and neurodevelopmental abnormalities [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6851.
- [50] Adams WKM, Stencel BJE, Kapur RP, et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate [J]. Nat Med, 2016, 22(11): 1256-1259.
- [51] Goodfellow FT, Tesla B, Simchick G, et al. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(22): 1691-1697.
- [52] Guerbois M, Fernandez SI, Azar SR, et al. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by aedes aegypti mosquitoes in the Americas [J]. J Infect Dis, 2016, 214(9): 1349-1356.
- [53] 黄燕霞, 张萍. 寨卡病毒感染动物模型研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2018, 18(2): 260-263.
- Huang YX, Zhang P. Progress in animal models for Zika virus infection [J]. J Trop Med, 2018, 18(2): 260-263.
- [54] Lazear HM, Lancaster A, Wilkins C, et al. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(1): e1003118.
- [55] Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2016, 94(6): 1362-1369.

[收稿日期] 2020-08-20

孙庆云, 闫振宇. 间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 262-267.  
Sun QY, Yan ZY. Research progress and application of stem cells in the repair of osteoarthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 262-267.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.018

# 间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用

孙庆云<sup>1</sup>, 闫振宇<sup>1,2\*</sup>

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

**【摘要】** 骨关节炎是一种以软骨退化和软骨下骨改变为特征的慢性退行性疾病, 其患病率随着人口老龄化的加剧而迅速增长。目前仍没有合适的药物和手术可以完全治疗骨关节炎。随着细胞疗法的出现, 间充质干细胞的独特优势被不断发现, 其治疗骨关节炎的研究也越来越多。本文就间充质干细胞对骨关节炎的修复机制进行综述。本文描述了间充质干细胞的特性和功能, 以及它们在骨关节炎动物模型和临床中的治疗机制。

**【关键词】** 骨关节炎; 间充质干细胞; 修复机制; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0262-06

## Research progress and application of stem cells in the repair of osteoarthritis

SUN Qingyun<sup>1</sup>, YAN Zhenyu<sup>1,2\*</sup>

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.

2. the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

Corresponding author: YAN Zhenyu. E-mail: hbyzy2011@163.com

**【Abstract】** Osteoarthritis is a chronic degenerative disease characterized by cartilage degeneration and subchondral bone changes, and its prevalence has increased rapidly along with the aging of the population. There is still no drug or surgical treatment that completely resolves osteoarthritis. With the advent of cell therapy, the unique advantages of stem cells have been gradually uncovered, and their use in the treatment of osteoarthritis is increasingly studied. In this article, we review the mechanisms by which stem cells repair osteoarthritis. We describe the properties and function of mesenchymal stem cells and their therapeutic mechanisms of action in osteoarthritis in animal models and in the clinic setting.

**【Keywords】** osteoarthritis; mesenchymal stem cells; mechanisms; animal model

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

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以软骨下骨改变和软骨退化为特征的慢性退行性疾病。据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计, 60岁及以上的患者中, 男性大约占10%, 女性大

约占18%, 在患病的人群中大约有80%的患者会伴有有关节活动障碍<sup>[1]</sup>。作为常见的慢性退行性疾病, OA不仅因功能障碍导致关节疼痛, 还会影响睡眠进而影响着患者的生活质量<sup>[2]</sup>。目前的常规治疗

[基金项目] 2019年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

Funded by the Government Funded Clinical Excellence Training Program of Hebei Province.

[作者简介] 孙庆云 (1993—), 女, 硕士研究生, 专业: 血液内科学。Email: 1084689337@qq.com

[通信作者] 闫振宇 (1974—), 男, 主任医师, 教授, 博士, 研究方向: 止血与血栓。Email: hbyzy2011@163.com

主要是药物控制,包括非甾体抗炎药(NSAIDs)、透明质酸(HA)、简单止痛药和皮质类固醇,但这些治疗虽然起到了缓解症状的作用,减轻了因活动障碍引发的疼痛,并能控制炎症,但并不能减缓关节的进行性退化<sup>[3]</sup>。当常规治疗无法缓解症状时,则需要进行关节清创术等外科手术治疗,这些治疗虽然有一定疗效,但并不会产生长期效果<sup>[4]</sup>。终末期患者最常用的治疗手段就是关节置换术,虽然能使关节恢复活动能力,但置换的关节存在使用年限的问题,并且由于手术创伤会造成感染甚至形成血栓。伴随着研究的逐渐深入,将新的细胞移植到组织损伤部位进行修复的细胞疗法越来越受到人们的重视<sup>[5]</sup>。近代组织工程发展的自体软骨细胞移植(*autologous chondrocyte implantation*, ACI)和基质诱导的关节软骨细胞移植(*matrix-induced articular chondrocytes implantation*, MACI)已被证实对 OA 有一定的疗效<sup>[6]</sup>。但是软骨细胞的培养以及移植细胞时的手术创伤仍是难以避免的难题。该方法的局限性促进了细胞疗法的进展,因此多项潜能的间充质干细胞(*mesenchymal stem cells*, MSCs)成为了研究者的选择。在这里,将进一步描述关于 MSCs 的特性和功能,以及它们在 OA 动物模型和临床中的治疗机制。

1960 年末, *Friedenstein* 等<sup>[7]</sup>首次发现了 MSCs。它是中胚层来源的成体干细胞,可以从如骨髓、脂肪等多种组织中分离出来,同时也具有分化为如软骨细胞、成骨细胞等多种细胞的能力<sup>[8]</sup>。国际细胞治疗学会(*International Society for Cellular Therapy*, ISCT)对 MSCs 的定义有三个标准:(1)能贴壁生长;(2)表达 CD105、CD73、CD90,不表达 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD79a 或 CD19 和 HLA-DR;(3)能多向分化<sup>[9]</sup>。目前 MSCs 修复 OA 的机制主要包括:分化为软骨细胞、分泌抗炎因子、调节免疫系统、降低炎症因子释放<sup>[10]</sup>。但越来越多的研究证实 MSCs 来源的外泌体(MSC-Exos)也对延缓 OA 进展起到一定的作用<sup>[11]</sup>。这些观察激起了人们对 MSCs 修复关节软骨的浓厚兴趣。

## 1 MSCs 对 OA 的修复机制

### 1.1 MSCs 的成软骨特性

有研究显示,在特定的诱导条件下,在体外培养的 MSCs 可向软骨细胞分化,且软骨的形成模拟了胚胎软骨的发育和生长<sup>[12]</sup>。不同的细胞因子或

生长因子,如胰岛素样生长因子(IGF),骨形态蛋白(BMP),转移生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ ),均已被证明对软骨组织的修复起着促进作用<sup>[13]</sup>。最近有研究发现维生素 D 可以促进骨髓间充质干细胞(*bone marrow mesenchymal stem cells*, BMSCs)的增殖和迁移,并在 BMSCs 的定向软骨分化中发挥潜在的作用。TGF- $\beta$ 1 通过调控 ERK/JNK 信号通路参与维生素 D 的功能作用<sup>[14]</sup>。Sox9 是软骨发育的关键转录因子,卓群豪等<sup>[15]</sup>通过向小鼠膝关节内注射 Sox9 基因转染的 BMSCs,观察到转染后的细胞可促进小鼠膝关节的软骨修复。以上研究显示 MSCs 的成软骨特性是修复 OA 软骨损伤的一种重要机制。

### 1.2 MSCs 的抗炎和免疫调节作用

OA 患者的关节因炎症因子的浸润呈现一种低度炎症的状态,软骨基质分解代谢产物可引发巨噬细胞和免疫细胞释放炎症因子,进而通过改变软骨细胞功能加速软骨损伤<sup>[16]</sup>。有研究报道 MSCs 通过分泌多种生长因子促进血管生成,例如血管内皮生长因子(*vascular endothelial growth factor*, VEGF)、成纤维细胞生长因子 2(*fibroblast growth factor 2*, bFGF)、胰岛素样生长因子-1(*insulin-like growth factor-1*, IGF-1)、肝细胞生长因子(*hepatocyte growth factor*, HGF)等。VEGF、bFGF、HGF、IGF-1、TGF- $\beta$  还可防止细胞凋亡,HGF、bFGF 也有抵抗纤维化的能力<sup>[17]</sup>。其次 MSCs 在免疫调节方面通过抑制树突细胞(*dendritic cells*, DCs)、自然杀伤细胞(*natural killer cells*, NKs)、T 细胞、B 细胞的增殖发挥作用,还能分泌可溶性因子如吲哚胺 2,3-二氧合酶(*indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO)、TNF 刺激基因 6(*TNF-stimulated gene 6*, TSG6)、一氧化氮(*nitric oxide*, NO)、白介素 10(*interleukin-10*, IL-10)、CC-趋化因子配体 2(*CC-chemokine ligand 2*, CCL2)、前列腺素 E2(*prostaglandin E2*, PGE2)进而对调节免疫系统起着关键作用<sup>[18-20]</sup>。综上所述, MSCs 分泌的抗炎因子以及抑制免疫细胞的增殖对 OA 炎症修复起着重大作用。

### 1.3 MSCs 的细胞外囊泡的作用

MSCs 衍生的细胞外囊泡(EVs),已被证明在介导组织再生和免疫调节方面发挥作用<sup>[21]</sup>。EVs 可由多种类型的细胞产生,如免疫细胞、内皮细胞、MSCs 等,并且存在于各种生物液体中,包括血液、尿液、滑液等<sup>[22]</sup>。EVs 根据其大小、组成和来源分为外泌体(*Exosomes*)、微囊泡(*microvesicles*)和凋亡

小体 (apoptotic bodies), 其中 Exosomes 研究最为广泛<sup>[23]</sup>。所有的 EVs 都富含蛋白质、脂质和核酸 (DNA、mRNA、miRNA、tRNA), 可以传递给受体细胞, 从而有助于细胞间的交流<sup>[24]</sup>。

最近有证据表明, MSC-Exos 可促进软骨再生。2016 年, Zhang 等<sup>[25]</sup> 首次证明关节内注射 EMSC-Exos 可使缺损处软骨和软骨下骨恢复。随后在 2017 年, Cosenza 等<sup>[26]</sup> 发现 Exos 或 MPs 均能再现 MSCs 的治疗作用。且通过基因载体或化学合成修饰的 MSC-Exos 也可改变某些 miRNA 或 LncRNA 的表达, 从而影响 OA 的治疗<sup>[27-29]</sup>。与 MSCs 的细胞治疗相比, MSC-Exos 代表了一种更安全、更有效的治疗方式。

## 2 MSCs 在动物模型研究和人类临床研究中的疗效

### 2.1 MSCs 在 OA 中的应用

MSCs 无论在大型动物还是小型动物 OA 模型中的应用表明单独或协同其他因素关节内注射自体或同种异体 MSCs 均可改善 OA 症状 (见表 1)。动物模型的成功极大地促进了临床研究, 并为今后的临床研究提供了一定的科学依据<sup>[30-31]</sup>。根据表 2 可知无论是 MSCs 移植或是关节内注射都可修复 OA 损伤, 但 MSCs 注射的剂量仍没有一个固定的标准, 所以仍需要我们进行大量的临床研究加以确定和完善。

表 1 MSCs 在 OA 动物模型中的应用

Table 1 Application of MSCs in animal models of OA

细胞类型 Cell type	动物类型 Animal type	治疗效果 Treatment effect
骨髓间充质干细胞 BMSCs	山羊 Goat	受损关节显示内侧半月板明显再生、关节软骨退变、骨赘重塑和软骨下硬化均减轻 <sup>[32]</sup> Damaged joints showed marked regeneration of the medial meniscus, degeneration of the articular cartilage, osteophytic remodeling, and subchondral sclerosis were reduced <sup>[32]</sup>
富血小板血浆+脂肪间充质干细胞 PRP+ADSCs	比格犬 Beagle dog	PRP+ADSCs 通过促进细胞外基质合成和软骨细胞增殖, 进而抑制炎症, 延缓 OA 进展 <sup>[33]</sup> PRP and MSCs treatments have a beneficial effect on OA via the stimulation of ECM synthesis and chondrocyte proliferation and via the inhibition of inflammatory reaction <sup>[33]</sup>
脂肪间充质干细胞 ADSCs	小鼠 Mice	单次注射 ADSCs 可以抑制滑膜增厚和软骨破坏 <sup>[34]</sup> A single injection inhibits synovial thickening and cartilage destruction <sup>[34]</sup>
骨髓间充质干细胞 BMSCs	兔 Rabbit	关节表面受损软骨丢失和磨损减少, 组织学评分和软骨含量明显改善 <sup>[35]</sup> Joint surface showed less cartilage loss and surface abrasion, and significantly better in histological scores and cartilage content <sup>[35]</sup>

表 2 MSCs 在 OA 中的临床研究

Table 2 Clinical studies of MSCs in OA

细胞类型 Cell type	治疗方式 Treatment mode	治疗效果 Treatment effect
骨髓间充质干细胞 BMSCs	MSCs 移植 Transplantation	证明了 MSCs 移植用于软骨修复的长期安全性和有效性 <sup>[36-37]</sup> Demonstrated the long-term safety and efficacy of MSCs transplantation for cartilage repair <sup>[36-37]</sup>
骨髓间充质干细胞 BMSCs	关节腔内注射 Intra-articular injection	4 名患者注射 $8 \sim 9 \times 10^6$ 个自体 BMSCs 后患者的疼痛和功能均有所改善, 其 5 年随访表明 4 名患者的临床参数虽有所下降, 但仍好于基线 <sup>[38-39]</sup> Four patients showed improvement in pain and function after injection of $8 \sim 9 \times 10^6$ autologous BMSCs, and their subsequent 5-year follow-up indicated that the clinical parameters of the four patients, although decreased, were still better than those at baseline <sup>[38-39]</sup>
脂肪间充质干细胞 ADSCs	关节腔内注射 Intra-articular injection	关节腔内注射 $1.0 \times 10^8$ 个 ADSCs 可改善膝关节功能和疼痛, 且无不良反应, 并可通过透明样关节软骨的再生减少软骨缺损 <sup>[40]</sup> Intra-articular injection of $1.0 \times 10^8$ ADSCs into the osteoarthritic knee improved function and pain of the knee joint without causing adverse events, and reduced cartilage defects by regeneration of hyaline-like articular cartilage <sup>[40]</sup>

## 2.2 MSCs 在血友病性关节炎 (hemophilic arthropathy, HA) 中的应用

MSCs 在治疗 OA 中发挥了极大的作用,因此也为治疗其他疾病提供了思路。目前 HA 仍没有较好的治疗办法,终末期患者接受手术的风险也很大,因此 MSCs 对 HA 动物模型的治疗的有效性吸引了研究者的目光,通过对动物进行干预,针刺基因缺陷动物或通过自体血输注的方式构建 HA 动物模型,随后进行关节内注射 MSCs,观察疗效,结果证明 MSCs 的治疗是有一定的作用的<sup>[41-42]</sup>。动物模型的成功刺激了其在临床上的应用,2013 年 Ebihara 等<sup>[43]</sup>研究证明了自体血清培养自体 BMSCs 治疗 HA 的可行性。随后 Buda 的报告也指出, BMSCs 移植联合滑膜切除术和踝关节镜清创术,并使用自体富血小板纤维蛋白治疗血友病踝关节软骨病变。平均随访 2 年后,软骨修复、关节功能均得到改善<sup>[44]</sup>。

## 2.3 MSCs 在类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 中的应用

MSCs 不仅在 OA、HA 的治疗上有一定的作用,在治疗 RA 上也有一定体现,通过输注 II 型胶原构建小鼠胶原性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA)。进而使用该动物模型进行一系列的实验研究表明 MSCs 对治疗 CIA 小鼠有一定的疗效<sup>[45-46]</sup>,最近一项实验也证明 ADSCs 关节内注射可使 RA 小鼠滑膜炎和关节软骨明显改善,这进一步为开发 RA 患者的局部治疗提供了新的途径<sup>[47]</sup>。但目前在临床研究中 MSCs 治疗 RA 的结果仍存在分歧,Jun 等<sup>[48]</sup>的研究证明 MSCT 是治疗难治性 RA 的一种安全方法,但其有效性需要进一步研究。而在 2019 年一项 I/II 期临床实验中也提示 BMSCs 治疗的 RA 可明显改善症状但疗效不能维持 12 个月,此外, BMSCs 还有助于减少甲氨蝶呤和泼尼松龙的使用<sup>[49]</sup>。

## 3 展望与不足

众所周知,OA 是一种慢性退行性的骨关节病,给中老年人及社会带来了巨大的经济负担。目前的治疗方法仍有很多限制与不足, MSCs 疗法提供了一种新的治疗途径。以上研究证明 MSCs 在治疗 OA、HA、RA 都显示出了极好的治疗效果。它主要通过分泌营养因子,调节免疫应答,以及其外泌体的作用来修复受损的软骨。在多项动物实验中已

经展现了其治疗效果,并且在临床实验中也有一定的体现。因此该技术对软骨修复的效果是令人鼓舞的。但也仍然存在一些问题,如 MSCs 的治疗剂量、更优化的治疗方式、理想细胞的来源以及定向分化的各种潜在分子机制仍不明确。因此,仍需要大量的实验来研究 MSCs 治疗 OA 的诸多问题。随着交叉学科的开展与成熟,相信 MSCs 能够为 OA 提供更多的选择和帮助。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Gao SG, Li KH, Zeng KB, et al. Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1): 82-87.
- [ 2 ] Gore M, Tai KS, Sadosky A, et al. Clinical comorbidities, treatment patterns, and direct medical costs of patients with osteoarthritis in usual care: a retrospective claims database analysis [J]. *J Med Econ*, 2011, 14(4): 497-507.
- [ 3 ] Hochberg MC, Altman RD, April KT, et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(4): 465-474.
- [ 4 ] Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, et al. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee [J]. *Am J Sports Med*, 2009, 37(10): 2053-2063.
- [ 5 ] Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, et al. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions [J]. *Maturitas*, 2014, 78(3): 188-198.
- [ 6 ] Kon E, Filardo G, Di Martino A, et al. ACI and MACI [J]. *J Knee Surg*, 2012, 25(1): 17-22.
- [ 7 ] Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1966, 16(3): 381-390.
- [ 8 ] Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(4): 680-687.
- [ 9 ] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [ 10 ] 赵瑞鹏, 段王平, 董政权, 等. 间充质干细胞在骨关节炎软骨修复中的机制及应用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(11): 1999-2002.  
Zhao RP, Duan WP, Dong ZQ, et al. Cartilage repair: the role of mesenchymal stromal cells in osteoarthritis [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(11): 1999-2002.
- [ 11 ] 吴鸿斌, 杨华, 汪健, 等. 间充质干细胞及其来源的外泌体在骨关节炎治疗中的研究进展 [J]. *中华老年骨科与康复电*

- 子杂志, 2019, 5(2): 114-117.
- Wu HP, Yang H, Wang J, et al. Research progress of mesenchymal stem cells and their exosomes in the treatment of osteoarthritis [J]. Chin J Geriatr Orthop Rehabil (Electron Edit), 2019, 5(2): 114-117.
- [12] Dexheimer V, Frank S, Richter W. Proliferation as a requirement for *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(12): 2160-2169.
- [13] Heng BC, Cao T, Lee EH. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage *in vitro* [J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1152-1167.
- [14] Jiang X, Huang B, Yang H, et al. TGF- $\beta$ 1 is involved in vitamin D-induced chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating the ERK/JNK pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2230-2241.
- [15] 卓群豪, 张伟娜, 李舰, 等. 膝关节腔内注射 Sox9 转染骨髓间充质干细胞修复膝关节骨关节炎 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(5): 736-741.
- Zhuo QH, Zhang WN, Li J, et al. Intra-articular injection of Sox9-transfected bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of knee osteoarthritis [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2017, 21(5): 736-741.
- [16] Pers YM, Ruiz M, Noël D, et al. Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives [J]. Osteoarthr Cartilage, 2015, 23(11): 2027-2035.
- [17] Ruiz M, Cosenza S, Maumus M, et al. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis [J]. Expert Opin Biol Ther, 2016, 16(1): 33-42.
- [18] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications [J]. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1009-1016.
- [19] Kean TJ, Lin P, Caplan AI, et al. MSCs: delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation [J]. Stem Cells Int, 2013, 2013: 732742.
- [20] Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 3057624.
- [21] Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, et al. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on *in vitro* stimulated T cells [J]. Front Immunol, 2014, 5: 556.
- [22] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications [J]. Mol Ther, 2015, 23(5): 812-823.
- [23] Li JJ, Hosseini BE, Grau GE, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles for treating joint injury and osteoarthritis [J]. Nanomaterials (Basel), 2019, 9(2): 261.
- [24] Penfornis P, Vallabhaneni KC, Whitt J, et al. Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment [J]. Int J Cancer, 2016, 138(1): 14-21.
- [25] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration [J]. Osteoarthr Cartilage, 2016, 24(12): 2135-2140.
- [26] Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16214.
- [27] Mao G, Zhang Z, Hu S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 247.
- [28] Liu Y, Zou R, Wang Z, et al. Exosomal KLF3-AS1 from hMSCs promoted cartilage repair and chondrocyte proliferation in osteoarthritis [J]. Biochem J, 2018, 475(22): 3629-3638.
- [29] Liu Y, Lin L, Zou R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis [J]. Cell Cycle, 2018, 17(21-22): 2411-2422.
- [30] Guo W, Zheng X, Zhang W, et al. Mesenchymal stem cells in oriented PLGA/ACECM composite scaffolds enhance structure-specific regeneration of hyaline cartilage in a rabbit model [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 6542198.
- [31] Kamei N, Ochi M, Adachi N, et al. The safety and efficacy of magnetic targeting using autologous mesenchymal stem cells for cartilage repair [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2018, 26(12): 3626-3635.
- [32] Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12): 3464-3474.
- [33] Yun S, Ku SK, Kwon YS. Adipose-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma synergistically ameliorate the surgical-induced osteoarthritis in Beagle dogs [J]. J Orthop Surg Res, 2016, 11: 9.
- [34] ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(11): 3604-3613.
- [35] Chiang ER, Ma HL, Wang JP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in rabbits [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149835.
- [36] Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees [J]. Osteoarthr Cartilage, 2002, 10(3): 199-206.
- [37] Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(2): 146-150.
- [38] Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients [J]. Int J Rheum Dis, 2011, 14(2): 211-215.

- [39] Davatchi F, Sadeghi AB, Mohyeddin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients [J]. *Int J Rheum Dis*, 2016, 19(3): 219–225.
- [40] Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(5): 1254–1266.
- [41] Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(9): 1802–1813.
- [42] Ravanbod R, Torkaman G, Mophid M, et al. Experimental study on the role of intra-articular injection of MSCs on cartilage regeneration in haemophilia [J]. *Haemophilia*, 2015, 21(5): 693–701.
- [43] Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, et al. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy [J]. *Haemophilia*, 2013, 19(2): e87–e89.
- [44] Buda R, Cavallo M, Castagnini F, et al. Treatment of hemophilic ankle arthropathy with one-step arthroscopic bone marrow-derived cells transplantation [J]. *Cartilage*, 2015, 6(3): 150–155.
- [45] Zhang Q, Li Q, Zhu J, et al. Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice [J]. *Peer J*, 2019, 7: e7023.
- [46] Tian S, Yan Y, Qi X, et al. Treatment of type II collagen-induced rat rheumatoid arthritis model by interleukin 10(IL10)-mesenchymal stem cells (BMSCs) [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2923–2934.
- [47] Ueyama H, Okano T, Orita K, et al. Local transplantation of adipose-derived stem cells has a significant therapeutic effect in a mouse model of rheumatoid arthritis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3076.
- [48] Jun L, Xia L, Huayong Z, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA [J]. *Clin Rheumatol*, 2012, 31(1): 157–161.
- [49] Shadmanfar S, Labibzadeh N, Emadedin M, et al. Intra-articular knee implantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis patients with knee involvement: Results of a randomized, triple-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical trial [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(4): 499–506.

[收稿日期] 2020-09-07

林丽珍,范杰诚,郭培武,等. 神经退行性疾病动物模型嗅觉障碍的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 268-274.  
Lin LZ, Fan JC, Guo PW, et al. Research progress in animal models of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(2): 268-274.  
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.02.019

# 神经退行性疾病动物模型嗅觉障碍的研究进展

林丽珍<sup>1</sup>, 范杰诚<sup>2</sup>, 郭培武<sup>2</sup>, 朱宗景<sup>2</sup>, 丁晨英<sup>2</sup>, 张淑云<sup>2\*</sup>

(1. 潍坊医学院康复医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261000)

**【摘要】** 神经退行性疾病是由神经元结构或功能逐渐丧失导致认知及运动障碍的一类不可逆损伤性疾病。其病理改变主要表现为中枢神经的老年斑、神经元纤维缠结、神经元减少等。在神经退行性疾病中, 嗅觉障碍通常比经典的运动和认知障碍发生的更早, 故将嗅觉障碍作为神经退行性疾病的临床标志有助于此类疾病的早期发现, 而其病理过程、发病机制的研究以及治疗药物的筛选和评价都需要合适的动物模型。因此, 本文就不同神经退行性疾病嗅觉功能障碍的主要动物模型作一综述。

**【关键词】** 神经退行性疾病; 嗅觉障碍; 动物模型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 02-0268-07

## Research progress in animal models of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases

LIN Lizhen<sup>1</sup>, FAN Jiecheng<sup>2</sup>, GUO Peiwu<sup>2</sup>, ZHU Zongjing<sup>2</sup>, DING Chenying<sup>2</sup>, ZHANG Shuyun<sup>2\*</sup>

(1. Faculty of Rehabilitation Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China.  
2. Department of Rehabilitation Medicine, Weifang People's Hospital, Weifang 261000)

Corresponding author: ZHANG Shuyun. E-mail: John-lw@sohu.com

**【Abstract】** Neurodegenerative diseases are irreversible diseases caused by the gradual loss of neuronal structure or function, leading to cognitive or motor disorders. The pathological changes mainly include senile plaques in the central nervous system, neurofibrillary tangles and neuronal loss. In neurodegenerative diseases, olfactory dysfunction usually occurs earlier than classic motor and cognitive disorders. Using olfactory dysfunction as a clinical sign of neurodegenerative disease can help us to detect such diseases in the early stage. Investigation of the neuropathogenesis of the disease as well as screening and evaluation of therapeutic drugs require appropriate animal models. Therefore, in this paper, we review the main animal models of olfactory dysfunction in different neurodegenerative diseases.

**【Keywords】** neurodegenerative diseases; olfactory disorders; animal models

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

神经退行性疾病是一类以特异性神经元大量丢失为主要特征的慢性进展性疾病, 它包括一大类常见的慢性病, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森 (Parkinson's disease, PD)、运动神经元病、多系统萎缩和亨廷顿病 (Huntington

disease, HD) 等。在临床上, 神经退行性疾病的症状呈多样化, 几个系统损害的临床症状常互相叠加, 从而缺乏特异性的临床特征和生物学标记。多项研究表明, 在神经退行性疾病中, 嗅觉功能障碍的发生通常早于经典的运动和认知障碍症状<sup>[1]</sup>, 而动

[作者简介] 林丽珍(1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经退行性疾病康复。Email: 461383015@qq.com

[通信作者] 张淑云(1968—), 女, 医学硕士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 神经系统性疾病康复。Email: John-lw@sohu.com

物模型是研究此类疾病嗅觉减退病因和神经基础的有用工具。因此,本文就阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病嗅觉障碍的主要动物模型作简要综述,以期对神经退行性疾病的早期诊断和治疗提供支持。

## 1 阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的典型表现为进行性记忆力下降和逐渐加重的认知障碍,其病理特征主要为 $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid- $\beta$  protein, A $\beta$ )在大脑皮层和海马区沉积形成老年斑、神经元细胞内神经纤维缠结及脑皮层和海马区神经细胞减少。A $\beta$ 蛋白是一种含有 39 ~ 43 个氨基酸残基的多肽片段<sup>[2]</sup>。多数学者认为 A $\beta$  蛋白的沉积可作为 AD 患者嗅觉受累的标志。

研究表明,AD 患者早期可能存在嗅觉、听觉、视觉障碍,相关动物实验已经证明 AD 早期视觉、听觉减退<sup>[3]</sup>,但嗅觉障碍比听觉或视觉下降更加具备作为 AD 预警信号的能力<sup>[4]</sup>,动物以及临床研究表明,嗅觉障碍出现于 AD 患者早期,且出现时间早于记忆力下降等典型表现。Braak 病理分期显示,经内嗅区皮质和内嗅区皮质在 AD 的 I-II 期就已出现神经元纤维缠结,典型的认知损害出现在 V-VI 期<sup>[5]</sup>。

### 1.1 $\beta$ -淀粉样前体蛋白转基因模型

$\beta$ -淀粉样前体蛋白(amyloid- $\beta$  precursor protein, APP)转基因小鼠模型多用于 AD 嗅觉障碍机制的研究。APP 是一种广泛存在于全身组织细胞上的单次跨膜蛋白,经蛋白酶裂解后会产生具有毒性作用的 A $\beta$  蛋白。

将包含双重突变 Lys670-> Asn, Met671-> Leu 的人类 APP695 插入到小鼠 ion 蛋白粘粒载体,所得 APP 转基因小鼠与年龄匹配的 B6SJL/J 非转基因(野生型)小鼠作对照,选取 3 ~ 4 个月、6 ~ 7 个月、16 个月大、21 ~ 29 个月的 Tg2576 突变型和野生型小鼠。采用氨基甲酸乙酯麻醉后进行组织学采集。Wesson 等<sup>[6]</sup>采用此模型首次将嗅觉系统中淀粉样蛋白与嗅觉感知损伤联系起来,发现过度表达人类 APP 的小鼠在 3 个月时嗅觉系统中有较多淀粉样蛋白和 A $\beta$  沉积,表现出进行性嗅觉缺陷,气味辨别能力下降。同时,小鼠嗅球中的肾小球层比

其他任何脑区更早地观察到了非纤维性 A $\beta$  的沉积,即人的嗅球比其他脑区受损更早且更严重。Saar 等<sup>[7]</sup>在实验中发现,与对照组相比,嗅球体积显著减少,这与先前报道的小鼠嗅球结构改变一致。气味信息处理的第一步发生在嗅球肾小球层中,根据嗅球中是否有 A $\beta$  沉积,该模型可预测嗅觉筛查在 AD 中的指标作用,且在提供针对 APP 或 A $\beta$  对 AD 的治疗效果方面有很大优势。

### 1.2 APP/PS1 双转基因模型

APP/PS1 双转基因模型在症状和体征方面能较好地模拟 AD 的特点。采用两种质粒将小鼠/人淀粉样前体蛋白(mouse/human amyloid precursor protein, Mo/HuAPP695swe)和突变的人早老素 1(presenilin 1, PS1-d $\Delta$ 9)基因分别转入小鼠细胞,分别由各自的小鼠胚蛋白启动子元件控制其表达。选取 4 个不同年龄组(2、4、6、8 个月),每组有 4 个野生型(WT)和 4 个双转基因纯合(2xTG)雌性小鼠(N532)。该小鼠模型最早是由 David Borcheh 建立的,特征是随着月龄的增长,A $\beta$  水平增多,并且有报道指出,此模型中 A $\beta$  的表达是性别依赖的,且雌性小鼠 A $\beta$  水平高于雄性小鼠<sup>[8]</sup>。Kurt 等<sup>[9]</sup>发现 2 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠开始出现 A $\beta$  沉积,6 月龄后 A $\beta$  沉积逐渐增加。Gengler 等<sup>[10]</sup>发现 APP/PS1 转基因小鼠在 2 月龄时脑皮质区出现脑淀粉样物质沉积,4 月龄时皮质和海马区域的细胞外 A $\beta$  沉积都显著增多,A $\beta$  斑块被小胶质细胞、星形胶质细胞包绕。Saiz 等<sup>[8]</sup>采用此模型对嗅球、嗅前核和嗅结节内的生长抑素(omatostatin, SOM)、小白蛋白(parvalbumin, PV)和钙调蛋白(calretininexpressing, CR)细胞进行定量分析,发现 SOM 和 CR 的表达提前下降,而 PV 在疾病进展后期下降,表明嗅觉结构中 SOM 和 CR 细胞早期就已坏死。Li 等<sup>[11]</sup>发现 3 ~ 4 月龄的小鼠开始出现嗅觉障碍,6 ~ 7 月龄的小鼠开始出现记忆、学习障碍且嗅觉障碍严重。该模型多用于研究 AD 嗅觉障碍中 A $\beta$  沉积随时间的变化,可为 AD 干预的时间段提供有效依据,但此模型外源基因表达不稳定、繁殖力差,费用高。

### 1.3 P301 L-tau 转基因模型

在正常的神经元中,tau 蛋白主要富集于神经元轴突内,与微管结合,维持微管的稳定性,异常情况

下,tau 蛋白过度磷酸化。

将质粒 pR5 显微注射到 F1 雄性小鼠原核中,产生表达人类 tau 亚型 htau40 和致病性突变 P301 L 的 P301 L-tau 转基因小鼠(tau 小鼠)。该模型可用于研究小鼠嗅觉功能障碍与脑内一氧化氮含量的关系。免疫细胞化学实验证明,小鼠嗅球富含 NO 生成细胞<sup>[12]</sup>。而 NO 与气味信息处理密切相关<sup>[13]</sup>。AD 患者血液或鞘内 NO 水平均低于正常对照组<sup>[14-15]</sup>。Hu 等<sup>[16]</sup>采用此模型发现嗅觉功能障碍与 tau 小鼠大脑中 NO 生成减少有关,尤其是嗅球中 NO 的减少,NO 代谢产物硝酸盐/亚硝酸盐浓度降低,使得 tau 蛋白异常磷酸化增加,导致嗅觉受损。此外,在另一项研究中发现,6 个月大的 tau 小鼠嗅觉辨别能力受损,对其进行病理分析显示过度磷酸化的 tau 蛋白是 AD 成对螺旋丝的主要成分,tau 病变发生在内嗅区的早期<sup>[17]</sup>。Liu 等<sup>[18]</sup>研究发现,转基因 tau 蛋白在小鼠内侧内嗅皮层的表达可诱导内源性 tau 蛋白过度磷酸化,并在海马积聚,抑制神经元活性,从而导致海马依赖的非空间嗅觉记忆受损。此模型虽缺乏 AD 典型病理变化 A $\beta$  的沉积,但在嗅觉功能障碍原因方面的研究具有重要意义。

#### 1.4 APP/PS1/tau 三转基因小鼠模型

三转基因小鼠模型(triple-transgenic murine model of Alzheimer's disease, 3xTg-AD)先由 PS1<sub>M46V</sub> 单转基因雌雄小鼠交配得到纯合子小鼠,然后分别把两种突变基因 APP<sub>Swe</sub> 和 TauP301 L 显微注射入纯合子的胚胎干细胞,得到的小鼠经筛选得到 3xTg-AD 小鼠,该模型表现出严重的气味记忆缺陷,在梨状核、眶额皮质以及海马中存在明显的免疫染色,而在气味主要加工区域嗅球中没有明显的 A $\beta$  和 tau 蛋白免疫反应性,但有严重的嗅觉缺陷<sup>[19]</sup>。其中一种解释是 A $\beta$  在嗅觉系统的其他部位比在嗅球中出现得更早,这种解释也在后来的研究中证明是正确的<sup>[20]</sup>。Zhang 等<sup>[21]</sup>发现 4 月龄 3xTg-AD 小鼠饮用 6  $\mu$ g/mL 硒代蛋氨酸 12 周,嗅球层 A $\beta$  的表达和 A $\beta$  沉积有所下降,即硒代蛋氨酸对 AD 嗅觉功能障碍有潜在治疗作用。这种转基因小鼠更多模仿了人 AD 脑中区域性的病理改变,能较全面地复制 AD 病理症状与运动特征。

## 2 帕金森病动物模型

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见

于中老年的神经系统变性疾病,其病理改变表现为中脑黑质纹状体内多巴胺能神经元的变性死亡,异常突触核蛋白聚集物在神经元内沉积。研究表明,PD 早期的非运动症状主要是嗅觉障碍和便秘,便秘在 PD 男性患者运动症状前 10 ~ 20 年出现,在女性患者出现的时间还有待研究<sup>[22]</sup>,28% ~ 80% 的 PD 患者早期存在便秘现象<sup>[23]</sup>,相关动物模型也已证明 PD 患者早期便秘的存在。PD 患者嗅觉障碍在运动症状数年之前出现,约 90% 的患者在 PD 早期即出现嗅觉障碍<sup>[24]</sup>,其灵敏度为 88%,特异度为 83%<sup>[25]</sup>。PD 的 Braak 病理分期显示嗅球与嗅前核在 I 期就已受累,典型的运动症状出现在 III、IV 期<sup>[26]</sup>。

#### 2.1 6-OHDA 模型

6-羟基多巴胺(6-hydroxidopamine, 6-OHDA)是一种儿茶酚胺类似物,亲水性,不能穿过血脑屏障,须通过特定的定位程序,将其直接注射到黑质、纹状体、内侧前脑束<sup>[27]</sup>。6-OHDA 进入细胞就立即被氧化,导致活性氧物质和多巴胺醌形成,这些活性氧物质和多巴胺醌能抑制线粒体呼吸链复合体 I,从而诱导与氧化应激相关的细胞毒性。向不同部位注射 6-OHDA,会产生不同的嗅觉障碍。将 6-OHDA 直接注入大鼠嗅球,几天后发现大鼠黑质内多巴胺能神经元变性,且存在从黑质到嗅球的多巴胺能投射,使嗅球肾小球层的中间神经元多巴胺数量增加,进而抑制嗅觉感受器以产生嗅觉减退<sup>[28-29]</sup>。向大鼠黑质双侧注入 6-OHDA,注射 7 d 后嗅球肾小球层周围神经元丢失,嗅觉识别能力下降<sup>[29]</sup>。单侧和双侧向背侧纹状体注射 6-OHDA,很快伏隔核和嗅结节多巴胺能变性,小鼠表现出嗅觉辨别障碍<sup>[30]</sup>。该模型小鼠经多巴胺替代疗法治疗后可明显改善其嗅觉,这为 PD 患者多巴胺调节嗅觉途径的治疗提供参考方向。

#### 2.2 MPTP 模型

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)是一种亲脂性的毒素,易穿过血脑屏障。在大脑中,MPTP 被单胺氧化酶 B 转化为有毒物质 1-甲基-4-苯基吡啶(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP<sup>+</sup>),MPP<sup>+</sup> 被多巴胺转运蛋白摄取并在多巴胺能神经元内积累,通过抑制线粒体呼吸链复合体 I 引起线粒体损伤和氧

化应激<sup>[31]</sup>。

MPTP 有三种模型:(1)急性模型,1 ~ 2 d 内单次或分次向动物腹腔或皮下每千克体重注射 10 ~ 96 mg MPTP。该类模型在小剂量时引起的神经损伤较轻,属于症状前模型,常用于代偿机制研究;大剂量时引起急性神经元变性坏死,常用于晚期 PD 的神经解剖、生化等研究。(2)亚急性模型,1 至数周内分次按每千克体重给予 100 ~ 200 mg 或更高剂量 MPTP,神经损伤呈进行性加重,常用于一些反应较慢的代偿机制研究,如受体表达等。(3)慢性模型,多见于猴模型制备。数月内给予一定剂量 MPTP 使猴子产生稳定的 PD 症状,一般每周静脉注射 MPTP 每千克体重 0.3 ~ 0.5 mg,直至产生典型 PD 运动障碍,历时半年至 2 年,总量约 20 ~ 40 mg。嗅觉研究应用较多的是亚急性模型。Prediger 等<sup>[25]</sup>表明,鼻腔注射 MPTP 能显著降低大鼠嗅球和黑质酪氨酸羟化酶的表达,致嗅球、纹状体的多巴胺浓度在注射 7 ~ 14 d 后降低,大鼠出现嗅觉辨别障碍,相比之下,大鼠腹腔注射 MPTP 14 ~ 21 d 后出现嗅球和纹状体多巴胺浓度降低,继而显现嗅觉障碍,这可能是与大鼠在 MPTP 全身给药时相对不敏感有关。该模型的嗅觉、认知、运动能力损伤的时间进程与 PD 临床症状最为吻合,是研究 PD 发病机制常用模型。

### 2.3 鱼藤酮模型

鱼藤酮是一种除草剂、杀虫剂,天然存在于某些植物的根茎中,高亲脂性,很容易通过血脑屏障和细胞膜。鱼藤酮会阻断线粒体呼吸链复合体 I,增加活性氧物质并降低谷胱甘肽水平,导致氧化应激,加剧细胞氧化损伤<sup>[32]</sup>。

皮下注射方法为:将 45 只健康大鼠随机分为 3 组,每组 15 只。正常组大鼠正常喂养,不予处理,假手术组大鼠颈背部注射葵花油溶剂(2 mg/kg,不含鱼藤酮),模型组大鼠注射同等体积鱼藤酮葵花油溶剂(2 mg/kg,鱼藤酮试剂与葵花油融合,两溶液配比为 2 mg/mL)。每日上午 9:00 注射,连续 28 d。李亚楠等<sup>[33]</sup>在建模结束 1 d 后,对各组大鼠分别进行行为学评分,假手术组和正常组均未出现异常行为表现,模型组大鼠出现明显的异常行为。鱼藤酮所致的 PD 动物模型还有腹腔注射、口服给药、立体定位注射、静脉注射、吸入给药,环境接触给药。口

服给药 7 d 后,小鼠嗅球中  $\alpha$ -突触核蛋白聚集并开始出现嗅觉辨别障碍<sup>[34]</sup>。鼻腔注射鱼藤酮还会引起嗅球的线粒体应激和电生理改变,并增强  $\alpha$ -突触核蛋白磷酸化和聚集<sup>[34-35]</sup>。小鼠每天在鱼藤酮环境中暴露 2 h,连续 2 周,在埋藏食物试验中  $\alpha$ -突触核蛋白在嗅前核积聚,显示嗅觉缺陷<sup>[36]</sup>。该模型几乎复制了啮齿类动物的所有帕金森病特征,使用广泛,操作简单,成本低,但该物质引发的死亡率高,PD 典型症状不明显。

### 2.4 转基因模型

用于研究 PD 的转基因动物模型主要有  $\alpha$ -突触核蛋白模型、Parkin 模型、PINK1 模型、DJ-1 模型。其中,嗅觉障碍研究较多的是  $\alpha$ -突触核蛋白模型。将人类  $\alpha$ -突触核蛋白 A53T 突变基因插入到神经特异性启动子 PDGF 的下游,构建  $\alpha$ -突触核蛋白 A53T 表达载体。用显微注射法将载体注射到小鼠中,制备转基因小鼠。Taguchi 等<sup>[37]</sup>发现 9 月龄小鼠出现的嗅觉减退与嗅球中磷酸化突触核蛋白的显著积聚一致。过度表达  $\alpha$ -突触核蛋白 A53T 的转基因小鼠气味辨别缺陷<sup>[38]</sup>。Taguchi 等<sup>[39]</sup>在另一项研究中指出,磷酸化的  $\alpha$ -突触核蛋白首先出现在嗅球,3 个月后扩散到海马和杏仁核,12 个月后传递到黑质和蓝斑。此模型与以上模型相比操作复杂,技术要求高,在 AD 的嗅觉障碍研究中应用较少。

## 3 亨廷顿病动物模型

亨廷顿病(Huntington disease, HD)是一种常染色体显性遗传性神经退行性疾病。病理改变特点是纹状体和大脑皮质的神经细胞脱失。临床证据表明,嗅觉功能障碍可能在明显的运动或认知障碍之前出现。除嗅觉障碍外,HD 是否还有其它早期表现还有待进一步研究。

### 3.1 N-端 R6/2 转基因模型

R6/2 模型表达突变的人类亨廷顿基因的外显子 1,含有约 150 个 CAG 重复序列含有约 150 个 CAG 重复序列<sup>[40]</sup>。将大小为  $1 \times 10^3$  的人类 5'端 HTT 基因作为启动子,插入小鼠基因组中,获得 R6/2 转基因雄性小鼠,将携带 R6/2 的转基因雄性小鼠与野生雌性小鼠杂交。5 ~ 6 周显示 HD 病理症状,通常 13 周以上不能存活<sup>[41]</sup>。Kohl 等<sup>[42]</sup>通过上述

方法,发现 R6/2 转基因小鼠纹状体受到严重损害时不能为神经元的成熟提供足够的信号,且嗅球内的相关微环境干扰了新成熟神经元的存活和整合,使神经母细胞发育受到影响。Kandasamy 等<sup>[43]</sup>在得出以上结论的同时,转基因小鼠嗅球细胞增值减少,出现嗅觉障碍。该模型是目前用于研究 HD 使用最广泛的,小鼠发病早,病情进展快,其大量 CAG 重复序列符合青少年 HD 的发病特征,适用于研究表型剧烈的青少年 HD。

### 3.2 N-端 R6/1 转基因模型

R6/1 模型表达突变的人类亨廷顿基因的外显子 1,具有 115 个 CAG 重复序列<sup>[44]</sup>。将携带 R6/1 转基因的雄性小鼠与野生雌性小鼠杂交,所生小鼠每天光照 12 h,食物和水自由获取。饲养 4 周后,取小鼠尾部组织进行 PCR 基因分型。在催眠诱导全身麻醉下皮下植入芯片进行鉴定。在 R6/1 转基因小鼠模型中,神经元可塑性降低。Mo 等<sup>[45]</sup>认为梨状皮质神经元和可塑性标记物的减少可能是导致 R6/1 小鼠嗅觉功能障碍的原因,与野生型小鼠相比,在运动障碍开始之前,R6/1 小鼠 8 周龄时已出现嗅觉功能障碍。梨状皮质通过外侧嗅束接受嗅球的直接投射,并投射到大脑区域,在气味辨别和气味记忆中起着重要作用。Lazic 等<sup>[46]</sup>等在研究中表明,梨状皮质可塑性降低与气味辨别选择性损害有关,在 HD 早期阶段,气味辨别和气味识别能力均受损,且气味辨别受损更严重。该模型小鼠发病年龄较晚,病情进展缓慢,更有利于观察 HD 典型症状前的表现。

## 4 总结

神经退行性疾病作为不可逆损伤性疾病,典型表现出现时大多处于疾病中晚期,已错过最佳治疗时间,因此,嗅觉障碍对此类疾病的早期诊断具有重大意义。综上所述,在神经退行性疾病中,目前已成功构建的动物模型主要有转基因模型和神经毒素模型两大类。AD 嗅觉障碍动物模型多采用转基因模型,虽技术要求高,花费较大,但其能较好地模拟 AD 临床行为和病理特征。PD 嗅觉障碍动物模型以神经毒素类模型使用最多,其操作简单,重复性好。HD 嗅觉障碍的动物模型相对较少,可重复性差,还需进一步研究。

嗅觉障碍动物模型有助于研究神经退行性疾病的病理过程、发病机制以及对治疗药物进行筛选和评价,对疾病的早期诊断和治疗有重大意义,有可能成为人类攻克此类疾病的重要手段。但在 AD、PD、HD 动物模型中观察到的嗅觉障碍因自身选择性不足,因此,未来的研究应着眼于探讨三大类神经退行性疾病早期嗅觉障碍间的差异,从而为疾病早期诊断、鉴别诊断以及治疗提供有力证据。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] Prediger RD, Schamne MG, Sampaio TB, et al. Animal models of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases [ J ]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 164: 431-452.
- [ 2 ] 姚钱, 郑红云, 李艳. 阿尔兹海默症发病机制研究进展 [ J ]. *职业与健康*, 2019, 35(15): 2153-2156.  
Yao Q, Zheng HY, Li Y. Research progress on the pathogenesis of Alzheimer's disease [ J ]. *J Occup Health*, 2019, 35(15): 2153-2156.
- [ 3 ] Fischer ME, Cruickshanks KJ, Schubert CR, et al. Age-related sensory impairments and risk of cognitive impairment [ J ]. *J Am Geriatr Soc*, 2016, 64: 1981-1987.
- [ 4 ] Murphy C. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease [ J ]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(1): 11-24.
- [ 5 ] 陈超, 肖世富. 嗅觉障碍与阿尔茨海默病 [ J ]. *中国现代神经疾病杂志*, 2010, 10(2): 191-196.  
Chen C, Xiao SF. Olfactory disorders and Alzheimer's disease [ J ]. *Chin J Contemp Neurol Neurosurg*, 2010, 10(2): 191-196.
- [ 6 ] Wesson DW, Levy E, Nixon RA, et al. Olfactory dysfunction correlates with amyloid-burden in an Alzheimer's disease mouse model [ J ]. *J Neurosci*, 2010, 30(2): 505-514.
- [ 7 ] Saar G, Cheng N, Belluscio L, et al. Laminar specific detection of APP induced neurodegeneration and recovery using MEMRI in an olfactory based Alzheimer's disease mouse model [ J ]. *Neuroimage*, 2015, 118: 183-192.
- [ 8 ] Saiz SD, de La Rosa PC, Ubeda BI, et al. Interneurons and beta-amyloid in the olfactory bulb, anterior olfactory nucleus and olfactory tubercle in APPxPS1 transgenic mice model of Alzheimer's disease [ J ]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2013, 296: 1413-1423.
- [ 9 ] Kurt MA, Davies DC, Kidd M, et al. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes [ J ]. *Exp Neurol*, 2001, 171(1): 59-71.
- [ 10 ] Gengler S, Hamilton A, Hölscher C. Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice [ J ]. *PLoS One*, 2010, 5

- (3): e9764.
- [11] Li W, Li S, Shen L, et al. Impairment of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb of APP/PS1 mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 2.
- [12] Kosaka T, Kosaka K. Heterogeneity of nitric oxide synthase-containing neurons in the mouse main olfactory bulb [J]. *Neurosci Res*, 2007, 57(2): 165-178.
- [13] Kishimoto J, Keverne EB, Hardwick J, et al. Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system; a histochemical, immunological and in situ hybridization study [J]. *Eur J Neurosci*, 1993, 5(12): 1684-1694.
- [14] Corzo L, Zas R, Rodríguez S, et al. Decreased levels of serum nitric oxide in different forms of dementia [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 420(3): 263-267.
- [15] Tarkowski E, Ringqvist A, Blennow K, et al. Intrathecal release of nitric oxide in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2000, 11(6): 322-326.
- [16] Hu Y, Ding W, Zhu X, et al. Olfactory dysfunctions and decreased nitric oxide production in the brain of human P301L tau transgenic mice [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(4): 722-730.
- [17] Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(15): 5827-5831.
- [18] Liu X, Zeng K, Li M, et al. Expression of P301L-hTau in mouse MEC induces hippocampus-dependent memory deficit [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3914.
- [19] Cassano T, Romano A, Macheda T, et al. Olfactory memory is impaired in a triple transgenic model of Alzheimer disease [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 224(2): 408-412.
- [20] 罗超群, 文安, 杨赟, 等. 阿尔茨海默病相关嗅觉障碍研究进展 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2016, 23(6): 434-437.
- Luo CQ, Wen A, Yang B, et al. Research progress of olfactory disorders related to Alzheimer's disease [J]. *Chin J Neuroimmunol Neurol*, 2016, 23(6): 434-437.
- [21] Zhang ZH, Chen C, Wu QY, et al. Selenomethionine ameliorates neuropathology in the olfactory bulb of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1595.
- [22] Chen H, Burton EA, Ross GW, et al. Research on the premotor symptoms of Parkinson's disease: clinical and etiological implications [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121(11-12): 1245-1252.
- [23] Klingelhofer L, Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease-the gut-brain axis and environmental factors [J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(11): 625-636.
- [24] Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(6): 329-339.
- [25] Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, et al. The risk is in the air; Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2006, 202(2): 391-403.
- [26] 王黎萍, 桂小红. 帕金森病早期标志物及诊断价值 [J]. *实用老年医学*, 2019, 33(12): 1236-1238, 1242.
- Wang LP, Gui XH. Early markers and diagnostic value of Parkinson's disease [J]. *Prac Geriatr*, 2019, 33(12): 1236-1238, 1242.
- [27] 杨东明, 杨利峰, 赵德明, 等. 帕金森病动物模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 397-404.
- Yang DM, Yang LF, Zhao DM, et al. Research progress on animal models of Parkinson's disease [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 397-404.
- [28] Höglinger GU, Alvarez FD, Arias CO, et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(3): 333-348.
- [29] Ilkiv JL, Kmita LC, Targa ADS, et al. Dopaminergic lesion in the olfactory bulb restores olfaction and induces depressive-like behaviors in a 6-OHDA model of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 56(2): 1082-1095.
- [30] Valle LP, Drucker CR. Unilateral olfactory deficit in a hemiparkinson's disease mouse model [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(12): 948-953.
- [31] Bezaud E, Dovero S, Prunier C, et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(17): 6853-6861.
- [32] Cicchetti F, Drouin OJ, Gross RE. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(9): 475-483.
- [33] 李亚楠, 马骏, 余沛豪, 等. 鱼藤酮帕金森病模型的建立与评价 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(3): 175-179, 272-273.
- Li YN, Ma J, Yu PH, et al. Establishment and evaluation of rotenone Parkinson's disease model [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2020, 38(3): 175-179, 272-273.
- [34] Morais LH, Hara DB, Bicca MA, et al. Early signs of colonic inflammation, intestinal dysfunction, and olfactory impairments in the rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease [J]. *Behav Pharmacol*, 2018, 29(2-3): 199-210.
- [35] Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, et al. Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb

- [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 51: 106–115.
- [36] Liu Y, Sun JD, Song LK, et al. Environment-contact administration of rotenone: A new rodent model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 294: 149–161.
- [37] Taguchi T, Ikuno M, Hondo M, et al.  $\alpha$ -Synuclein BAC transgenic mice exhibit RBD-like behaviour and hyposmia: a prodromal Parkinson's disease model [J]. *Brain*, 2020, 143(1): 249–265.
- [38] Hansen C, Björklund T, Petit GH, et al. A novel  $\alpha$ -synuclein-GFP mouse model displays progressive motor impairment, olfactory dysfunction and accumulation of  $\alpha$ -synuclein-GFP [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 56: 145–55.
- [39] Taguchi T, Ikuno M, Yamakado H, et al. Animal model for prodromal Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1961.
- [40] Smail S, Bahga D, McDole B, et al. Increased olfactory bulb BDNF expression does not rescue deficits in olfactory neurogenesis in the Huntington's disease R6/2 mouse [J]. *Chem Senses*, 2016, 41(3): 221–232.
- [41] 张雪艳, 李军, 闫森. 亨廷顿病模型进展及展望 [J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44(4): 526–530.  
Zhang XY, Li J, Yan S. Progress and prospect of Huntington's disease mode [J]. *J Chongqing Med Univ*, 2019, 44(4): 526–530.
- [42] Kohl Z, Regensburger M, Aigner R, et al. Impaired adult olfactory bulb neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11: 114.
- [43] Kandasamy M, Rosskopf M, Wagner K, et al. Reduction in subventricular zone-derived olfactory bulb neurogenesis in a rat model of Huntington's disease is accompanied by striatal invasion of neuroblasts [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116069.
- [44] Nicnocaill B, Haraldsson B, Hansson O, et al. Altered striatal amino acid neurotransmitter release monitored using microdialysis in R6/1 Huntington transgenic mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 13(1): 206–210.
- [45] Mo C, Renoir T, Hannan AJ. Novel ethological endophenotypes in a transgenic mouse model of Huntington's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 276: 17–27.
- [46] Lazic SE, Goodman AO, Grote HE, et al. Olfactory abnormalities in Huntington's disease: decreased plasticity in the primary olfactory cortex of R6/1 transgenic mice and reduced olfactory discrimination in patients [J]. *Brain Res*, 2007, 1151: 219–226.

[收稿日期] 2020-08-14